

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y BIOLÓGICA DE INHIBIDORES
ENDÓGENOS DE VENENO PRESENTES EN EL PLASMA DE LA
SERPIENTE *CROTALUS SIMUS* (SERPENTES: VIPERIDAE)

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de
Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología para
optar al grado y título de Maestría Académica en Inmunología

ARTURO CHANG CASTILLO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2022

Dedicatoria

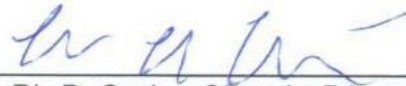
Esta tesis se la dedico a mi abuela, Cecilia, por siempre inculcarme el valor de la educación y darme el apoyo para superarme como profesional.

Agradecimientos

Se le agradece a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por proveer el financiamiento para llevar a cabo este proyecto bajo el código 741-C1-066.

A nivel personal, le quiero agradecer a mi familia por darme el apoyo económico y emocional para poder llevar a cabo esta maestría. A mi comité de tesis por apoyarme y ayudarme a resolver todos los problemas que se me presentaron a lo largo de la tesis. Y a las personas del Instituto Clodomiro Picado que me extendieron una mano para ayudarme con lo que necesitara.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Inmunología.”



Ph.D. Carlos Chacón Díaz

Representante de la Decana Sistema de Estudios de Posgrado



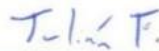
M.Sc. Aarón Gómez Argüello

Director de Tesis



Ph.D. Mariángela Vargas Arroyo

Asesora



Ph.D. Julián Fernández Ulate

Asesor



Ph.D. Teresa Escalante Muñoz

**Representante del Director Programa de Posgrado en Microbiología,
Parasitología, Química Clínica e Inmunología**



Arturo Chang Castillo

Candidato

Tabla de Contenidos

Portada	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	ii
Hoja de aprobación	iii
RESUMEN	vi
Lista de cuadros	vii
Lista de figuras	viii
Lista de abreviaturas	x
Introducción	1
Hipótesis	7
Objetivo General	7
Objetivos específicos	7
Materiales y métodos	8
Serpientes	8
Obtención de muestras biológicas	8
Separación de proteínas plasmáticas con potencial inhibitorio	9
Separación de las proteínas por técnicas cromatográficas	9
Cromatografía Líquida de Alto Desempeño en Fase Reversa (RP-HPLC)	9
Interacción entre inhibidores plasmáticos y veneno de <i>C. simus</i>	10
Separación de proteínas por electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE)	10
Identificación de proteínas por espectrometría de masas en tándem (MS/MS)	11
Actividades biológicas y bioquímicas	12
Análisis biológicos <i>in vivo</i> utilizando un modelo murino	13
Análisis bioquímicos <i>in vitro</i> mediante ensayos enzimáticos	17
Análisis estadístico	20
Resultados	21
Separación de proteínas plasmáticas con potencial inhibitorio	21
Separación de proteínas por técnicas cromatográficas	21
Separación de proteínas por medio de SDS-PAGE	25
Identificación de proteínas por medio de espectrometría de masas en tándem (MS/MS)	30

Actividades biológicas y bioquímicas	32
Discusión	37
Conclusiones	43
Anexos	44
Bibliografía	47

RESUMEN

Las serpientes venenosas presentan una mezcla compleja de toxinas de origen proteico con diferentes actividades farmacológicas. Un mecanismo de resistencia que las serpientes y otros organismos presentan contra estas toxinas es la síntesis de inhibidores plasmáticos que neutralizan las actividades de estas toxinas. En este estudio se utilizó un enfoque basado en cromatografía, electroforesis y proteómica para separar e identificar una fracción de inhibidores a partir del plasma de la serpiente cascabel neotropical, *Crotalus simus*. También se utilizó una batería de pruebas para probar si tienen actividad neutralizante contra las actividades del veneno de esta serpiente. Y por último se comparó la actividad neutralizante de estos inhibidores con el suero antiofídico comercial PoliVal-ICP. Se obtuvo una fracción de proteínas plasmáticas que se identificaron parcialmente por espectrometría de masas en tándem como inhibidores de fosfolipasa A₂ tipo gamma (γ PLI). Esta fracción neutralizó las actividades letal, miotóxica y coagulante del veneno de *C. simus*, pero no las actividades desfibrinogenante, hemorrágica ni proteolítica. En comparación con el suero PoliVal-ICP, los inhibidores son más potentes en neutralizar la actividad letal del veneno, si se considera la masa de proteína inyectada en los ratones. Pero el suero es más versátil que los inhibidores, ya que neutraliza todas las actividades del veneno. Se concluye que los inhibidores de fosfolipasa A₂ identificados son eficaces en neutralizar la letalidad del veneno de esta especie de serpiente porque neutralizan las fosfolipasas A₂ responsables tanto de la actividad miotóxica como de la actividad letal.

Lista de cuadros

Cuadro 1. Identificación de familias de proteínas a partir de bandas de SDS-PAGE de inhibidores detectadas por MS/MS Q-Exactive Plus® (Thermo).	33
Cuadro 2. Actividades tóxicas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> del veneno de <i>C. simus</i> .	34
Cuadro 3. Neutralización de actividades tóxicas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> del veneno de <i>C. simus</i> con suero PoliVal-ICP e inhibidores plasmáticos de <i>C. simus</i> .	35

Lista de figuras

Figura 1. Cromatograma de fraccionamiento de plasma de *C. simus* por cromatografía de afinidad con una columna de Sepharosa acoplada con veneno de *C. simus*. Pico A: fracción no-unida. Pico B: fracción unida (inhibidores). La absorbancia está expresada como AU. 21

Figura 2. Cromatograma de fraccionamiento por RP-HPLC de los inhibidores. Los tiempos de retención de las fracciones se encuentran en el Anexo 1. La absorbancia está expresada como mAU. 22

Figura 3. Cromatogramas de fraccionamiento por RP-HPLC. **A** fracción de inhibidores, **B** interacción entre inhibidores y veneno de *C. simus*. Los tiempos de retención de las fracciones se encuentran en el Anexo 2. 24

Figura 4. SDS-PAGE 15% de las fracciones de RP-HPLC de los inhibidores plasmáticos (Fig. 2). MM= Marcador Molecular PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder de Thermo Fisher Scientific; P= Plasma *C. simus* bajo condiciones no-reductoras; Inh= inhibidores; A-E= fracciones del cromatograma de la Fig. 2; NR= condiciones no-reductoras; R= condiciones reductoras. 26

Figura 5. Fraccionamiento por RP-HPLC de veneno de *C. simus* incubado por 30 min a 37 °C con los inhibidores. MM= Marcador Molecular PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder de Thermo Fisher Scientific. Inh= inhibidores; V= veneno; InhV= inhibidores incubados con veneno. Las letras A a L corresponden a las fracciones de la Fig. 3 (ver Anexo 1 para tiempos de retención). Todas las fracciones fueron corridas bajo condiciones no-reductoras. Continúa. 27

Figura 5. Fraccionamiento por RP-HPLC de veneno de *C. simus* incubado por 30 min a 37 °C con los inhibidores. MM= Marcador Molecular PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder de Thermo Fisher Scientific. Inh= inhibidores; V= veneno; InhV= inhibidores incubados con veneno. Las letras M a T corresponden a las fracciones de la Fig. 3 (ver Anexo 1 para tiempos de retención). Todas las fracciones fueron corridas bajo condiciones no-reductoras. Continúa. 28

Figura 5. Fraccionamiento por RP-HPLC de veneno de *C. simus* incubado por 30 min a 37 °C con los inhibidores. MM= Marcador Molecular PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder de Thermo Fisher Scientific. Inh= inhibidores; V= veneno; InhV= inhibidores incubados con veneno. Las letras U a Y corresponden a las fracciones de la Fig. 3 (ver Anexo 1 para tiempos de retención). Todas las fracciones fueron corridas bajo condiciones no-reductoras.

29

Figura 6. Cromatograma de fraccionamiento de inhibidores por RP-HPLC (Protocolo 1). Inserto: SDS-PAGE al 15% con fracciones colectadas de la corrida mostrada; todas las muestras se corrieron bajo condiciones no-reductoras. Los números en el inserto representan las bandas cortadas para identificación por MS/MS.

31

Figura 7. Actividad fosfolipasa A₂ del veneno de *C. simus* (A) sobre el sustrato 4-NOBA y sus neutralizaciones con suero PoliVal-ICP (B) e inhibidores de *C. simus* (C). D) Controles de veneno, suero PoliVal-ICP (1925 µg/pocillo) e inhibidores (73.5 µg/pocillo). Los valores encima de cada barra corresponden a las absorbancias a 425 nm de cada control. Cada valor es la absorbancia promedio del triplicado menos la absorbancia promedio del triplicado del blanco.

35

Figura 8. Actividad fosfolipasa A₂ del veneno de *C. simus* (A) sobre yema de huevo como sustrato y sus neutralizaciones con suero PoliVal-ICP (B) e inhibidores de *C. simus* (C). D) Controles de sólo: veneno, suero PoliVal-ICP (15400 µg/tubo) e inhibidores (796 µg/tubo). Los valores encima de cada barra corresponden a los µL de NaOH 0.018 N consumidos en cada control. Cada valor corresponde a los µL de NaOH 0.018 N consumidos promedio del triplicado de cada control menos los µL de NaOH 0.018 N consumidos promedio del triplicado del blanco.

36

Lista de abreviaturas

CRD: Dominios de Reconocimiento de Carbohidratos.

DCM-P: Dosis Coagulante Mínima en Plasma.

DDM: Dosis Desfibrinogenante Mínima.

DE: Dosis Eficaz.

DE₅₀: Dosis Eficaz 50%.

DHM: Dosis Hemorrágica Mínima.

DL₅₀: Dosis Letal 50%.

DMM: Dosis Miotóxica Mínima.

Fab: Fragmento de unión a antígeno.

Fc: Fragmento cristalizabile.

F(ab')₂: Fragmentos de unión a antígeno.

Ig: Inmunoglobulina.

LRR: Repeticiones Ricas en Leucina.

nAChR: Receptor nicotínico de acetilcolina.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PBS: Amortiguador Fosfato Salino.

PLA₂: Fosfolipasas A₂.

PLI: Inhibidor de Fosfolipasas A₂.

RP-HPLC: Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento en Fase Reversa.

SDS-PAGE: Gel de Electroforesis con Dodecilsulfato de Sodio.

SVMP: Metaloproteinasas de Veneno de Serpiente.

SVMPI: Inhibidor de Metaloproteinasas de Veneno de Serpiente.

SVSP: Serina-Proteasa de Veneno de Serpiente.



Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Arturo Chang Castillo, con cédula de identidad 114500679, en mi condición de autor del TFG titulado Caracterización bioquímica y biológica de inhibidores endógenos de veneno presentes en el plasma de la serpiente *Crotalus simus* (Serpentes: Viperidae)

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO *

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: 1 año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:

Nombre Completo: Arturo Chang Castillo

Número de Carné: B01701 Número de cédula: 114500679

Correo Electrónico: arturo.chang@ucr.ac.cr

Fecha: 23/09/2022 Número de teléfono: 8704-4606

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Aarón Miguel Gómez Argüello

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

Introducción

De las 143 especies de serpientes presentes en Costa Rica, 23 de ellas presentan un veneno lo suficientemente tóxico como para tener relevancia clínica en seres humanos y animales domésticos o de granja (1). Las dos especies de mayor importancia en cuanto a envenenamiento son las serpientes terciopelo, *Bothrops asper*, y cascabel neotropical, *Crotalus simus* (previamente *Crotalus durissus durissus*), ya que provocan la mayor cantidad de los accidentes ofídicos en el país (2,3).

Los venenos de serpientes son una mezcla de proteínas con propiedades farmacológicas que causan un envenenamiento en la víctima o en la presa. Para el caso de cascabeles (géneros *Crotalus* y *Sistrurus*), sus venenos se pueden clasificar en tipo I o tipo II. Los venenos tipo I presentan una alta concentración de metaloproteinasas de veneno de serpiente (SVMPs) y una menor actividad letal. Mientras que los venenos tipo II tienen una baja concentración de SVMPs, alto contenido de fosfolipasas A₂ (PLA₂) y una mayor actividad letal (4,5). En los venenos tipo I se presentan hemorragias como su efecto principal, causadas principalmente por los altos niveles de SVMPs; mientras que para los venenos tipo II se presenta neurotoxicidad y miotoxicidad, debido a la presencia de crotolina y crotamina, respectivamente (6).

El veneno de *C. simus* se clasifica diferente entre individuos adultos y neonatos, donde los neonatos presentan un veneno tipo II, pero al pasar a la adultez, sufren un cambio ontogenético en su veneno en el que hacen una transición a un veneno tipo I (6,7,8). Es por esto que el envenenamiento por mordedura de individuos adultos de *C. simus* causa hemorragia, edema y defibrinación, pero tiene letalidad y miotoxicidad bajas. Por otro lado, en modelos murinos, los individuos neonatos causan un cuadro de envenenamiento diferente al de adultos, en el que se evidencia neurotoxicidad y miotoxicidad altas (7,8); aunque no hay reportes de que esto se dé en humanos.

La toxicidad de los venenos se da por actividades bioquímicas particulares de familias específicas de proteínas. La actividad proteolítica está causada por serina proteasas de veneno de serpiente (SVSPs) y por SVMPs (9,10,11). Las

SVSPs contribuyen en la proteólisis de proteínas relacionadas con la coagulación, por lo que tienen un efecto sobre la hemostasis, que puede causar trombosis (12). Éstas pueden tener actividad fibrinogenolítica, fibrinolítica o ambas, pero cortan los factores de la cascada de coagulación en lugares que no son los usuales, lo que resulta en formación de coágulos no-funcionales que se desagregan fácilmente (13). Esto causa que se utilicen los factores de coagulación de manera inapropiada, por lo que no se forma el coágulo y genera la hemorragia. Otras SVSPs tienen actividad anticoagulante indirecta al activar proteínas plasmáticas cuya función es impedir la formación de coágulos (14,15), por lo que inducen hemorragia.

Las SVMPS se conocen como hemorraginas, ya que son las principales responsables de los efectos hemorrágicos. Están subclasificadas en SVMPS PI, PII, PIII o PIV, siendo estas últimas las menos comunes (16). Su actividad consiste en degradar componentes de la matriz extracelular en la membrana basal de los vasos sanguíneos, principalmente el colágeno tipo IV, lo que causa la ruptura de los vasos sanguíneos, conllevando a la hemorragia (10,11). También hay SVMPS con actividades coagulantes (17) y anticoagulantes (18).

En el género *Crotalus*, el componente de mayor relevancia del grupo de las fosfolipasas A_2 (PLA₂) es una β -neurotoxina llamada crotoxina, la cual es un complejo heterodimérico de dos proteínas, una ácida y otra básica (19,20). El componente ácido se conoce como crotoxina A, crotapotina o CA, y no tiene actividad enzimática ni toxicidad; mientras que el componente básico, conocido como crotoxina B o CB, es una fosfolipasa A_2 con actividad neurotóxica (19,20). Si bien la CB presenta actividad neurotóxica por sí misma, existe una sinergia cuando ésta se encuentra en complejo con el componente CA, que aumenta su actividad (21,22).

La crotoxina impide la liberación de vesículas de acetilcolina de la neurona presináptica a la sinapsis neuromuscular, bloqueando la transmisión de señales nerviosas a la fibra muscular (23,24,25); otras investigaciones han apuntado a que también hay una actividad de bloqueo post-sináptico (26,27). Además de

tener actividad neurotóxica, también se ha visto que la crotoxina presenta cardiotoxicidad (28), miotoxicidad (29,30,31) y nefrotoxicidad (32).

Dada la complejidad en composición y la peligrosidad de los venenos de serpiente, se necesita de un antídoto ante una mordedura. Para esto, se administra de manera intravenosa el suero antiofídico, que es la única terapia aprobada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el envenenamiento por mordedura de serpiente (33). Este suero consiste en una preparación terapéutica de inmunoglobulinas G (IgG) completas o fragmentadas enzimáticamente (Fab o $F(ab')_2$), las cuales tienen especificidad contra el veneno de la serpiente responsable de la mordedura. Éstas se generan por medio de la hiperinmunización de un animal. Para esto, normalmente se inmunizan caballos (34), pero en otros casos se utilizan burros, camellos, conejos, llamas u ovejas (35,36,37,38). Para hacer la inmunización, se puede utilizar el veneno de una sola especie de serpiente (suero antiofídico monoespecífico) o el de varias especies de serpientes (suero antiofídico poliespecífico o polivalente) (33,39,40).

Para eliminar la región Fc de los anticuerpos, las IgGs completas pueden ser sometidas a una digestión enzimática con pepsina o papaína, y así obtener solo una molécula de $F(ab')_2$ o Fab, respectivamente, que también son capaces de neutralizar las toxinas (41,42). En ambos casos, al no tener la región Fc, la respuesta anti-Ig equina por parte del paciente se reduce levemente (41). De manera alternativa, se ha estado desarrollando la posibilidad de usar anticuerpos monoclonales contra proteínas específicas asociadas a una actividad tóxica (43), con la desventaja de que se tendría que crear al menos un anticuerpo monoclonal para cada familia de proteínas presentes en el veneno.

Debido a que los venenos son mezclas complejas de toxinas y, en ciertos casos, de muy alta peligrosidad, surge la duda de cuál es el mecanismo mediante el cual las serpientes resisten su propia toxicidad, ya que podría proveer una alternativa o un complemento a la terapia actual. Al respecto, se han descrito varios mecanismos que han desarrollado estos organismos para resistir un auto envenenamiento y que se describirán a continuación.

El aparato glandular productor de veneno almacena las toxinas, de manera que funge como una barrera física al impedir la salida de las toxinas a otros compartimentos (44). Además, se sintetizan compuestos de baja masa molecular que inhiben las actividades de las proteínas dentro de la glándula; entre ellos está el citrato, que es un agente quelante de cationes, algunos de los cuales son indispensables para algunas enzimas del veneno (45,46); y tripéptidos que inhiben específicamente a SVMPs (47,48,49,50). Otra manera de evitar que las enzimas funcionen dentro de la glándula es sintetizarlas como zimógenos, cuya actividad se inhibe a través de una secuencia conservada que bloquea la activación del dominio catalítico (51,52,53).

En el caso de que sí se dé una filtración de las toxinas a algún compartimento, las serpientes también poseen mecanismos de protección contra un envenenamiento. Uno de ellos es la modificación estructural de los receptores blanco de algunas de las toxinas, lo que impide la unión de éstas a los receptores; como es el caso del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) en fibras de músculo esquelético de *Naja haje* (54,55). Éste presenta una arginina *N*-glicosilada en la posición 189 del nAChR, y cuya glicosilación impide la unión de la toxina al receptor. Pero también existen factores humorales de origen proteico que se consideran parte de la inmunidad innata ante sus propias toxinas (56,57,58,59). Estos factores humorales se conocen como inhibidores endógenos plasmáticos, y son sintetizados en el hígado (60,61) y en las glándulas de veneno (62,63).

Los inhibidores endógenos plasmáticos se dividen en inhibidores de PLA₂s (o PLIs) e inhibidores de SVMPs (o SVMPIs). Hasta el momento no se han identificado inhibidores endógenos plasmáticos de SVSPs. El modelo de neutralización propone que hay una unión no-covalente del inhibidor con su toxina respectiva, de manera que esta última pierde su capacidad de producir daño (64). Para el caso de los PLIs, se sabe que son proteínas de fase aguda positivas, ya que en la serpiente *Gloydius brevicaudus* su expresión en el hígado aumenta cuando se inyecta veneno intramuscularmente en individuos de esta misma especie (65).

Los PLIs son glicoproteínas oligoméricas sin actividad proteolítica. Tienen una estructura cuaternaria mediada por interacciones no-covalentes de tres a seis subunidades. Los PLIs tienen una masa de entre 75 y 120 kDa y se clasifican como tipo α , β o γ , basándose en las estructuras que las conformen (66). Los tipo- α tienen similitud con Dominios de Reconocimiento de Carbohidratos o CRDs (Carbohydrate Recognition Domain) de lectinas tipo C, con una masa de entre 75 y 120 kDa; tienen entre tres y seis subunidades de 20 a 25 kDa cada una, e inhiben PLA₂s ácidas (66,67,68). Los tipo- β contienen repeticiones ricas en leucina o LRR (Leucine-Rich Repeats), son trímeros de 50 kDa por subunidad, e inhiben PLA₂s básicas (66,69,70). Los tipo- γ son glicoproteínas ácidas con estructuras de tres dedos, cuyas secuencias contienen dos patrones en tándem de residuos de cisteínas y dos motifs de tres dedos; tienen una masa de entre 90 y 130 kDa, conformadas por entre tres y seis subunidades de 20 a 31 kDa (66,68,70).

En cuanto a los SVMPIs plasmáticos, éstos son glicoproteínas ácidas, con puntos isoeléctricos de menos de 3.5 a 5.4, y con una alta estabilidad térmica y de pH (71,72). Su clasificación se puede hacer de acuerdo con su masa molecular nativa o a la familia proteica a la que pertenecen. Con respecto a la masa molecular nativa, se encuentran dos grupos: uno con proteínas de baja masa molecular (entre 40 y 95 kDa) y otro de alta masa molecular (entre 700 y 1090 kDa). Con respecto a la familia proteica, se encuentran cuatro familias: el grupo de las fetuinas/superfamilia de las Cistatinas, la superfamilia de los genes de las IgG, la familia lectina P35 ficolina/opsonina y una proteína a la cual todavía no se le ha asignado una familia (59). Pero de éstas, solo el grupo de las fetuinas/superfamilia de las Cistatinas y la proteína sin familia asignada (73) se encuentran en serpientes.

Se han realizado estudios funcionales que demuestran la capacidad neutralizante que estos inhibidores endógenos plasmáticos de serpientes tienen sobre el veneno de éstas en modelos *in vivo* e *in vitro* (67,68,74,75,76,77). En Costa Rica se reporta el aislamiento, a partir de plasma de *Bothrops asper*, de un PLI tipo- α (BaMIP) de PLA₂ miotóxica; éste neutraliza la actividad PLA₂ de las miotoxinas I y III, y las actividades miotóxica, edematizante y citolítica contra las

cuatro isoformas de miotoxina presentes en el veneno (76). Además, también se reporta el aislamiento de dos PLIs de *Cerrophidion sasai* (previamente *Cerrophidion godmani*), uno tipo- α y otro tipo- γ , de PLA₂ miotóxicas. El inhibidor tipo- α (CgMIP-II) neutraliza las actividades PLA₂, miotóxica, edematizante y citolítica de la miotoxina I; mientras que el tipo- γ (CgMIP-I) neutraliza selectivamente la toxicidad de la miotoxina II (68).

Por otra parte, si bien el suero antiofídico es el único tratamiento aprobado, éste es reconocido por el cuerpo del paciente como un antígeno, lo que resulta en una respuesta contra las inmunoglobulinas del suero. Esta respuesta se puede dar de dos maneras: 1) como una reacción inmediata (o reacción anafiláctica) y 2) como una reacción tardía (o enfermedad del suero) (78). En la primera se da una reacción al momento de la administración del antiveneno, que puede consistir en urticaria, broncoespasmos e hipotensión (79,80). Mientras que la segunda se da entre una a dos semanas después, y puede incluir fiebre, urticaria, picazón, y en algunos casos linfadenopatía, daño renal por proteinuria y dolor en las articulaciones (35,80).

A pesar de que los inhibidores endógenos también son proteínas heterólogas, éstas son más pequeñas, lo que podría causar que pasen desapercibidas ante el sistema inmune. Además, no precipitan cuando se unen a las toxinas del veneno (81), como sí lo hacen los anticuerpos del suero antiofídico (82), lo que podría reducir la probabilidad de enfermedad del suero. Por ello, elucidar detalles sobre el funcionamiento de los inhibidores endógenos de serpientes es atractivo para utilizarlos como alternativa o complemento al método tradicional para el tratamiento contra las mordeduras de serpientes.

Hipótesis

El plasma sanguíneo de serpientes *Crotalus simus* presenta un conjunto de proteínas plasmáticas con propiedades inhibitorias contra su propio veneno.

Objetivo General

Identificar y caracterizar mediante técnicas bioquímicas y biológicas el conjunto de proteínas plasmáticas de *C. simus* que tengan posibles propiedades inhibitorias del veneno de esta misma especie para determinar su actividad biológica en la serpiente.

Objetivos específicos

1. Aislar y purificar por medio de técnicas cromatográficas y electroforéticas el conjunto de proteínas plasmáticas de *C. simus* que tengan posibles propiedades inhibitorias del veneno de esta misma especie.
2. Caracterizar bioquímicamente mediante técnicas proteómicas el conjunto de proteínas plasmáticas de *C. simus* que tengan posibles propiedades inhibitorias del veneno de esta misma especie.
3. Caracterizar biológicamente por medio de pruebas *in vitro* e *in vivo* en un modelo murino la posible actividad neutralizante del conjunto de proteínas plasmáticas de *C. simus* para determinar si poseen propiedades inhibitorias del veneno de esta misma especie.
4. Comparar la eficacia neutralizante de proteínas plasmáticas de *C. simus* con propiedades inhibitorias con la eficacia del antiveneno comercial producido en el Instituto Clodomiro Picado.

Materiales y métodos

Serpientes

Se utilizó 30 individuos adultos de ambos sexos de *Crotalus simus* que cumplieron con los siguientes requisitos: sobrepasar los 90 cm de longitud corporal, haber completado el proceso de cuarentena, haber sido adaptados satisfactoriamente a las condiciones de cautiverio del serpentario del Instituto Clodomiro Picado (ICP) (individuos entre 1 y 5 años en cautiverio) y estar en buen estado de salud sin lesiones aparentes. Individuos con presencia de ectoparásitos, malnutrición evidente, deshidratación, enfermedad y/o estado de gravidez en hembras, se excluyeron del estudio. Los individuos se mantuvieron en un recinto con temperaturas entre los 27-31 °C con una humedad relativa entre los 66-88%.

El uso experimental de las serpientes fue aprobado por el Comité Institucional de Cuido y Uso de Animales (CICUA) bajo el permiso CICUA-007-2020.

Obtención de muestras biológicas

Antes de sangrar a los individuos, primero se inmovilizaron al insertar cada uno dentro de un tubo de PVC transparente, desde la cabeza hasta alrededor de la mitad del cuerpo, dejando libre la cola para realizar la colecta de muestra. Se tomaron muestras de sangre con jeringas de 3 mL y agujas calibre 20G a partir de la vena coccígea por la región caudal de cada individuo; se procuró no sobrepasar el 0.8% del peso corporal de las serpientes (83), que es aproximadamente 1 mL en individuos adultos. Las muestras se depositaron en tubos con heparina de litio, para no interferir con factores bioquímicos plasmáticos. Las muestras se centrifugaron a 3000 r.p.m. por 5 min y los plasmas se recuperaron en un tubo cónico para obtener una mezcla de todos los individuos sangrados. Por último, se hicieron alícuotas en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL y éstos se guardaron a -20 °C hasta su posterior uso.

Separación de proteínas plasmáticas con potencial inhibitorio

Separación de las proteínas por técnicas cromatográficas

Cromatografía por afinidad

Se utilizó una columna para cromatografía por afinidad con esferas de Sepharosa acopladas con veneno de *Crotalus simus*. La columna se confeccionó siguiendo el protocolo descrito por Lomonte (84). El conjunto de plasmas se pasó por esta columna por medio de un sistema de cromatógrafo abierto Bio-Rad BioLogic LP y utilizando el software LP Data View v1.03. El plasma se corrió en la columna siguiendo el protocolo descrito por Lomonte (84). La detección de las proteínas se hizo a 280 nm. Se colectó las fracciones no-unida y unida, donde la fracción unida es la parte de la muestra que se consideró como la fracción con potencial inhibitorio, ya que interacciona de manera no-covalente con las toxinas en la columna. La fracción no-unida se descartó. A la fracción unida se le ajustó el pH con NaOH 1 M directamente sobre la fracción; se buscó mantener el pH de esta fracción alrededor de 6, para evitar precipitación. Para eliminar el exceso de sales y concentrar las proteínas de la fracción unida, ésta se centrifugó y diafiltró con agua MilliQ a 3000 g por 15 min por ciclo en filtros para centrifuga Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit con una membrana con tamaño de poro de 10 kDa. Se conservó el retenido y se descartó el permeado. Al retenido se le considera la fracción de posibles inhibidores plasmáticos de veneno, de ahora en adelante llamados solamente inhibidores.

Cromatografía Líquida de Alto Desempeño en Fase Reversa (RP-HPLC)

Fraccionamiento por RP-HPLC de los inhibidores

Se midió la concentración de los inhibidores en un NanoDrop 2000c. De ser necesario, se diluyó en solución A (0.5% acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético), de manera que la concentración de proteína quedara entre 2 y 5 µg/µL. Cada muestra se centrifugó por 5 min a 10000 r.p.m. y 200 µL del sobrenadante se inyectaron en un cromatógrafo Agilent 1200 Series empleando un bucle de 200 µL y una columna C18 Agilent Zorbax Eclipse Plus (4.6 x 250 mm, 5-micrones). Se utilizó un gradiente lineal de solución A (5% acetonitrilo,

0.1% ácido trifluoroacético) a solución B (95% acetonitrilo, 0.1% ácido trifluoroacético) a un flujo de 1 mL/min con un detector de luz UV a una longitud de onda de 215 nm. Primero se utilizaron las siguientes condiciones de corrida (Protocolo 1): 0-10% B de 0-10 min; 10-50% B de 10-40 min; 50-70% B de 40-60 min; y de 70-80% B de 60-90 min. Luego se refinó el protocolo y se utilizaron las siguientes condiciones de corrida (Protocolo 2): 0-15% B de 0-5 min; 15-40% B de 5-50 min; 40-60% B de 50-85 min; y 60-80% B de 85-90 min. Los picos (fracciones) se colectaron en tubos de vidrio, se secaron en un concentrador al vacío Thermo Scientific Savant SpeedVac SPD1030. Por último, se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Interacción entre inhibidores plasmáticos y veneno de *C. simus*

Se incubó por 30 min a 37 °C una solución de veneno de *C. simus* con una solución de inhibidores (a una relación 1:2) con una concentración final de 10 µg/µL para el veneno y 1.35 µg/µL para los inhibidores. Posterior a ello, se inyectaron 200 µL de la solución veneno en un cromatógrafo Agilent 1100 Series empleando un bucle de 200 µL y una columna C18 Agilent Zorbax Eclipse Plus (4.6 x 250 mm, 5-micrones). Se utilizó un gradiente lineal de solución A (5% acetonitrilo, 0.1% ácido trifluoroacético) a solución B (95% acetonitrilo, 0.1% ácido trifluoroacético) a un flujo de 1 mL/min y con un detector de luz UV a una longitud de onda de 215 nm. Las condiciones de corrida fueron las siguientes: 0% B 0-5 min; 0-15% B de 5 a 15 min; 15-45% B de 15 a 75 min; 45-70% B de 75-85 min; 70% B de 85-94 min. Como controles, se realizaron dos corridas bajo las mismas condiciones, pero con una solución de veneno a 10 µg/µL sin inhibidores y una de inhibidores sin veneno. Se colectaron las fracciones mayoritarias de la corrida de los inhibidores incubados con veneno de *C. simus* y se compararon con las reportadas por Calvete *et al.* (6) para adultos de *C. simus*.

Separación de proteínas por electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La concentración proteica, ya sea en plasma o fracciones (de afinidad o RP-HPLC) se midió por medio de un NanoDrop 2000c. El plasma fue diluido de

manera que se cargaran ≈ 15 μg de proteína. Para el caso de las fracciones cromatográficas se cargó un máximo de 15 μg de proteína por pocillo en geles SDS-PAGE a concentraciones de 15% de acrilamida. Las fracciones de RP-HPLC de inhibidores se trabajaron bajo condiciones reductoras (5 min a 100 °C, con 2-mercaptoetanol como agente reductor) y no-reductoras, mientras que las de interacción inhibidores y veneno, solo bajo condiciones no-reductoras. La tinción de los geles se realizó con Azul de Coomassie R-250. La digitalización de los geles se hizo con un equipo Bio-Rad® Molecular Imager ChemiDoc XRS System™ y el análisis por densitometría se realizó con el software Image Lab versión 2.0.1.

Identificación de proteínas por espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

Para determinar la masa y la secuencia parcial de las proteínas, se utilizó el protocolo descrito por Alfaro-Chinchilla *et al.* (85). Brevemente, las fracciones de inhibidores obtenidas a partir de RP-HPLC fueron separadas por un SDS-PAGE al 15%. Las bandas presentes en el SDS-PAGE se cortaron del gel y se sometieron al siguiente procedimiento: reducción automatizada con ditioneitol 10 mM, alquilación con yodoacetamida 50 mM y digestión en gel a 37 °C por toda la noche con tripsina porcina pancreática de grado para secuenciación. Los péptidos resultantes se identificaron por medio de un espectrómetro de masas Q-Exactive Plus® (Thermo).

De cada muestra digerida, se cargaron 12 μL en una columna PepMap de 2 cm x 75 μm , se separaron en un cromatógrafo nano-Easy® 1200 con una columna analítica C18 Easy-spray® de 2 cm x 75 μm con un tamaño de partícula de 3 μm a un flujo de 200 nL/min. Se utilizó un gradiente lineal de solución A (ácido fórmico al 0.1%) a solución B (acetonitrilo al 80% con ácido fórmico al 0.1%) bajo el siguiente esquema: 1-5% B de 0 a 1 min, 5-26% B de 1 a 26 min, 26-79% B de 26 a 30 min, 79-99% B de 30 a 31 min, y 99% B de 31 a 35 min. Los espectros de masas se hicieron en modo positivo a 1.9 kv, con una temperatura capilar de 200 °C, con escaneo a 400-1600 m/z, 100 ms como tiempo máximo de inyección, meta de AGC de 3×10^6 , y una resolución orbitrap

de 70,000. Los 10 iones más altos con 2-5 cargas positivas se fragmentaron con una meta de AGC de 1×10^5 , con 110 mseg como tiempo máximo de inyección, una resolución de 17,500, conteo en bucle de 10, ventana de aislamiento de 1.4 m/z y un tiempo de exclusión dinámica de 5 s. Espectros MS/MS se procesaron por asignación de péptidos asociados a familias proteicas por similitud con secuencias contenidas en la base de datos UniProt/SwissProt (Serpentes, marzo y diciembre 2020), utilizando Peaks X®.

Una vez obtenida la identificación parcial de los inhibidores, se tomó el identificador de la proteína más cercana y se insertó en la herramienta Compute pI/Mw de ExPASy para obtener un posible punto isoeléctrico teórico de cada inhibidor basándose en los identificados en la base de datos.

Actividades biológicas y bioquímicas

Cada una de estas actividades consistió en dos partes: 1) comprobar la inocuidad de inhibidores y 2) determinar si éstos tienen la capacidad de neutralizar las actividades biológicas del veneno de *C. simus*.

Para comprobar la inocuidad, se utilizó la misma batería de pruebas biológicas que se utilizan para la descripción de las actividades de los venenos de serpientes y su respectiva neutralización; es decir, se utilizaron los inhibidores, sin la presencia del veneno, y así verificar que su uso no tiene un efecto deletéreo en los ratones o que causan interferencia en las pruebas. A esto se le llamó control de interferencia.

Para determinar si los inhibidores tienen la capacidad de neutralizar el veneno de *C. simus*, se realizó la neutralización de las actividades descritas para este veneno. Para las neutralizaciones de las actividades del veneno se utilizó la fracción unida entera proveniente de la cromatografía por afinidad sin fraccionar. Como punto de comparación de la neutralización de las actividades, se utilizó el suero antiofídico PoliVal-ICP, ya que incluye el veneno de *C. simus* dentro de la mezcla de inmunización (86).

Análisis biológicos *in vivo* utilizando un modelo murino

En el caso de *C. simus*, las actividades recomendadas por Gutiérrez *et al.* (87) y la Organización Mundial de la Salud (33) corresponden a las actividades letal, hemorrágica, miotóxica y desfibrinogenante. Se utilizaron ratones CD-1 de diferentes pesos dependiendo de la prueba. Como recomendación de la OMS, se utilizó un mínimo de 4 o 5 ratones (dependiendo de la prueba) por concentración de muestra para que cada prueba sea estadísticamente significativa (33). Con el fin de cumplir con las tres Rs de la investigación en animales (Reemplazar, Reducir y Refinar), se utilizaron valores de referencia publicados para las actividades del veneno de *C. simus*, ya que con esto se redujo el uso de ratones. Pero para hacer una comparación estadística entre la capacidad neutralizante del suero PoliVal-ICP y la fracción de inhibidores (los antivenenos), sí se realizaron las pruebas de neutralización en los ratones. En los casos donde los inhibidores no presentaron actividad neutralizante para una prueba, no se realizó la neutralización con suero PoliVal-ICP para reducir el uso de ratones, ya que la actividad neutralizante de este suero se ha descrito previamente.

Para determinar si las proteínas plasmáticas tienen capacidad neutralizante, se realizó la neutralización de las actividades del veneno mencionadas anteriormente de acuerdo con la metodología usada por Rojas *et al.* (88). Brevemente, se utilizó una dosis “reto” de veneno constante incubada a 37°C por 30 min con concentraciones variables de antiveneno o inhibidores. Dependiendo de la prueba, la neutralización se representó como Dosis Eficaz 50% (DE₅₀) o como Dosis Eficaz (DE). Como control positivo, un grupo de ratones se inyectó solamente con la dosis reto de veneno. Por último, para verificar que las proteínas de los inhibidores son inocuas sobre el modelo murino, se hizo un control de “interferencia”, donde se inyectó a un grupo de ratones con la dosis más alta de inhibidores disuelta en PBS y sin veneno.

El uso experimental de los ratones fue aprobado por el Comité Institucional de Cuido y Uso de Animales (CICUA) bajo el permiso CICUA-007-2020.

Neutralización de la actividad letal

Para la actividad letal se utilizó el protocolo descrito por Solano *et al.* (89). Brevemente, se inyectaron grupos de cinco ratones de 16-18 g con soluciones a diferentes concentraciones de inhibidores o suero incubadas a 37°C por 30 min con dosis reto de dos Dosis Letales 50% (DL₅₀) de veneno de *C. simus*. Cada DL₅₀ corresponde a la dosis que mata el 50% de los ratones, que para *C. simus* equivale a 7.1 µg de veneno/ratón, según Gómez *et al.* (90). Un grupo de ratones se inyectó con la dosis reto (control positivo) y otro con PBS (control negativo). A cada ratón se le inyectó 0.5 mL de la solución respectiva por la vía intraperitoneal y a las 48 h se contabilizaron los ratones muertos. La neutralización se representó como DE₅₀, que se expresó como la proporción de µL PoliVal-ICP/mg veneno o µL inhibidores/mg veneno que reducen la actividad de la dosis de veneno en un 50%. También se calculó como µg PoliVal-ICP/mg veneno o µg inhibidores/mg veneno. La DE₅₀ se calculó por medio del método de Probitos (91).

Dadas las diferencias de concentración proteica entre el suero PoliVal-ICP y los inhibidores que hacen difícil comparar su capacidad neutralizante de la actividad letal del veneno, las neutralizaciones también se expresaron en términos de potencia. La dosis efectiva media (DE₅₀), es usada como una expresión para el evalúo de la potencia (P) del antiveneno, siguiendo la siguiente fórmula:

$$P = ((n - 1) * DL50)/DE50$$

Ecuación 1

Donde **P** es la cantidad de veneno, expresado como masa o el número de dosis efectivas medias, que es completamente neutralizado por una unidad de volumen de antiveneno (inhibidor o suero). Además, **P** es independiente de **n** (número de DL₅₀), basándose en la diferencia entre la razón de DL₅₀/DE₅₀, por lo que es recomendada para expresar valores de neutralización considerando las variaciones intrínsecas de la técnica (92).

Neutralización de la actividad hemorrágica

Para esta prueba se utilizó el protocolo descrito por Gutiérrez *et al.* (93). Brevemente, se inyectaron grupos de cuatro ratones de 18-20 g con soluciones a diferentes concentraciones de inhibidores o suero incubadas a 37 °C por 30 min con una dosis reto de 5 Dosis Hemorrágica Mínimas (DHM) de veneno. Cada DHM corresponde a la dosis de veneno que crea una lesión de 10 mm de diámetro, que para *C. simus* equivale a 6.1 µg, según Segura *et al.* (86). Un grupo de ratones se inyectó con la dosis reto (control positivo) y otro con PBS (control negativo). A cada ratón se le inyectó 0.1 mL de la solución correspondiente por la vía intradérmica en la región abdominal. A las 2 h de la inyección, se sacrificaron los ratones mediante inhalación de CO₂, se les removió la piel y se midió el área hemorrágica en la parte interna de ésta. El diámetro de la lesión se calculó mediante la fórmula $d = 2 \times (\sqrt{\text{área hemorrágica}/\pi})$. Con los valores de diámetro de la lesión y las diferentes proporciones de µL inhibidores/mg veneno, se preparó una curva dosis-respuesta; mediante ésta, se calculó la Dosis Eficaz Media (DE₅₀), definida como la razón de µL antiveneno/mg veneno o µL inhibidores/mg veneno en la que el diámetro de la lesión hemorrágica corresponde a la mitad del diámetro producido por el control de veneno.

Neutralización de la actividad desfibrinogenante

Para la actividad desfibrinogenante se utilizó el protocolo descrito por Gené *et al.* (94). Brevemente, se inyectaron grupos de cuatro ratones de 18-20 g con soluciones a diferentes concentraciones de inhibidores o suero incubadas a 37 °C por 30 min con una dosis reto de dos Dosis Desfibrinogenante Mínima (DDM). Cada DDM corresponde a la dosis que induce incoagulabilidad de la sangre de los cuatro ratones inyectados con esa dosis, que para *C. simus* equivale a 2 µg/ratón según Segura *et al.* (86). Un grupo de ratones se inyectó con la dosis reto (control positivo) y otro con PBS (control negativo). A cada ratón se le inyectó 0.2 mL de la solución correspondiente por la vía intravenosa en la vena caudal. Al transcurrir 1 h de la inyección, se anestesiaron a los ratones por la vía inhalatoria con un algodón con isofluorano en un recipiente cerrado.

Seguidamente, los ratones se sangraron por medio de punción cardíaca para obtener al menos 0.2 mL de sangre que se colocaron en tubos de ensayo; luego de 2 h, se verificó si se formó o no un coágulo. La capacidad neutralizante de la actividad desfibrinogenante se expresó como DE, que es la razón de μL antiveneno/mg veneno o μL inhibidor/mg veneno en que todas las muestras de sangre de ratones inyectados coagulan.

Neutralización de la actividad miotóxica

Para la actividad miotóxica se utilizó el protocolo descrito por Gené *et al.* (94) con algunas modificaciones tomadas de Segura *et al.* (86). Brevemente, se inyectaron grupos de cuatro ratones de 18-20 g con soluciones a diferentes concentraciones de inhibidores o suero incubadas a 37 °C por 30 min con una dosis reto de tres Dosis Miotóxica Mínimas (DMM). Cada DMM corresponde a la dosis de veneno que causa que la actividad creatina kinasa (CK) plasmática aumente cuatro veces en los ratones inyectados con veneno, con respecto a los inyectados con PBS. De acuerdo con Segura *et al.* (86), 3 DMM equivale a 100 μg /ratón. A cada ratón se le inyectó 50 μL de la solución correspondiente, por la vía intramuscular en el gastrocnemio de la pata derecha. Un grupo de ratones se inyectó con la dosis reto (control positivo) y otro con PBS (control negativo). A las 3 h después de la inyección, se sangraron los ratones. Para ello, éstos se colocaron en un sistema de restricción de movimiento, se les cortó el extremo de la cola con un bisturí y se colectó alrededor de 25 μL de sangre en tubos heparinizados, que luego se sellaron con plasticina en un extremo. Los ratones se sacrificaron mediante inhalación de CO_2 . Los tubos capilares se centrifugaron para obtener el plasma y se determinó la actividad CK de éste por medio del kit comercial CK-NAC Unitest (Wiener, St Ingbert, Alemania). Los valores de la actividad CK se expresaron como U/L. Se preparó una curva dosis-respuesta con los valores de los μg antiveneno/mg de veneno o μg inhibidor/mg de veneno y la actividad CK en plasma. Por medio de ésta se calculó la DE_{50} , que es la proporción de μg antiveneno/mg de veneno o μg inhibidor/mg de veneno que reduce la actividad en un 50% la actividad CK plasmática de los ratones inyectados con la dosis de veneno.

Análisis bioquímicos *in vitro* mediante ensayos enzimáticos

Al igual que con las pruebas *in vivo*, se probó que los inhibidores no interfirieran con la prueba y luego la capacidad neutralizante. El análisis enzimático *in vitro* que la OMS recomienda utilizar para *C. simus* es el de la actividad coagulante con plasma humano citratado (94), pero también se incluyeron la actividad fosfolipasa A₂ por el método de Holzer & Mackessy (95) y de Dole (96), y la actividad proteolítica (97). Para estas pruebas, sí se describió cada actividad del veneno y luego se hizo la neutralización de la actividad respectiva con sus respectivos controles. Los ensayos de neutralización del veneno se realizaron incubando el veneno con suero PoliVal-ICP o con los inhibidores por 30 min a 37 °C. Los controles positivos de la neutralización se realizaron con la dosis reto del veneno sin antiveneno, mientras que los negativos se hicieron con el buffer respectivo. Asimismo, un grupo control consistió en incubar la solución de inhibidores con el buffer respectivo de la prueba. Para todas las pruebas, cada nivel se realizó por triplicado.

Actividad procoagulante

Para la actividad coagulante se utilizó el protocolo descrito por Gené *et al.* (94). En el primer método, se agregó 0.2 mL de plasma humano citratado a tubos de vidrio y se incubó 5 minutos a 37°C. Luego, a cada tubo se le agregaron 0.1 mL de una de varias concentraciones de veneno disuelto en PBS. Cada concentración se trabajó por triplicado. Para el control negativo se agregó 0.1 mL de PBS a los 0.2 mL de plasma humano citratado; también se realizó por triplicado. Una vez agregado el veneno o el PBS al plasma, se determinó el tiempo de coagulación de éste con un cronómetro. Por último, se preparó una curva dosis-respuesta con los valores de dosis de veneno y de tiempo de coagulación; mediante ésta se calculó la Dosis Coagulante Mínima-Plasma (DCM-P), que corresponde a la dosis de veneno que causa que el plasma coagule en un tiempo de 60 s.

Para la neutralización de la actividad coagulante se utilizaron dos DCM-P (0.06 µg/µL) como dosis reto en 0.1 mL. Se incubaron a 37 °C por 30 min varias

dosis de antiveneno o de inhibidores con una dosis reto de veneno. Ésta se representó como DE (Dosis Efectiva) que, en este caso, corresponde a los μL antiveneno/mg veneno o μL inhibidores/mg veneno en que el tiempo de coagulación del plasma citratado se prolonga tres veces en comparación con las muestras que solamente tienen veneno.

Actividad fosfolipasa A_2

Para la actividad fosfolipasa A_2 se utilizaron los protocolos descritos por Holzer & Mackessy (95) y por Dole (96). Brevemente, en el protocolo de Holzer & Mackessy, se agregaron en una placa de microtitulación de 96 pozos 200 μL de buffer (Tris-HCl 0.01 M, CaCl_2 0.01 M, NaCl 0.1 M, pH 8), 25 μL de sustrato 4-NOBA (ácido 4-nitro-3-octanoiloxi-benzoico) a 1 mg/mL (disuelto en acetonitrilo) y 25 μL de veneno a diferentes concentraciones. Como blanco, se utilizó 225 μL de buffer con 25 μL de sustrato. Como controles se utilizaron 200 μL de buffer con 25 μL de veneno a dosis reto y 25 μL de sustrato (control positivo); 200 μL de buffer con 25 μL de inhibidores y 25 μL de sustrato (control de interferencia de inhibidores); 200 μL de buffer con 25 μL de PoliVal-ICP y 25 μL de sustrato (control de interferencia de PoliVal-ICP). Esto se incubó a 37 °C por 60 min y se leyó a 425 nm. Se preparó una curva dosis-respuesta y a partir de ella se calculó la actividad fosfolipasa A_2 , que es la dosis a la que se produce un cambio en la absorbancia de 0.1.

Para el protocolo de Dole, en tubos de vidrio con 1 mL de una solución de yema de huevo se agregaron 0.1 mL de una de varias concentraciones de proteína disuelta en PBS y se incubaron a 37°C por 30 min. Luego, a la solución de yema con la muestra de proteína se le agregó 5 mL de mezcla de extracción (40:10:1 de isopropanol:heptano: H_2SO_4 concentrado) y se esperó 10 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se agregaron 2 mL de heptano, 3 mL de agua y se agitaron. Se tomaron 2 mL de la fase superior resultante y se trasladaron a tubos limpios. A esta fase superior se le agregó 1 mL de la muestra de titulación (10:1 de etanol absoluto:azul de timol al 0.1% en agua). Luego, se tituló con NaOH al 0.018 N hasta que se dio un viraje de color amarillo a verdoso. Con estos datos se construyó una curva de μL de NaOH consumidos por cada

$\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ de veneno de *C. simus* y de esta forma se determinó la dosis de veneno que provocó un consumo de NaOH promedio. Por último, la actividad PLA₂ se expresó como los μEq de ácidos grasos liberados con base en el NaOH consumido por unidad de tiempo y masa de enzima (μEq de ácidos grasos liberados/mg/min).

Para la neutralización de la actividad fosfolipasa A₂ se incubaron, a 37°C por 30 min, diferentes concentraciones de inhibidores o suero con una cantidad constante de veneno. Luego, se siguió el protocolo descrito para la actividad fosfolipasa A₂ respectiva anteriormente descritos y se hicieron las respectivas curvas de dosis-respuesta. La neutralización de esta actividad se expresó como DE₅₀ que es la proporción de μL de antiveneno/mg veneno a la que la actividad fosfolipasa A₂ se redujo en un 50%.

Actividad proteolítica

Para la actividad proteolítica se utilizó el protocolo descrito por Wang *et al.* (97). Brevemente, se añadieron 20 μL de una de las diferentes concentraciones de veneno a 100 μL de sustrato (10 mg/mL de azocaseína disuelta en Tris 50 mM, NaCl 0.15 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 8). Una vez que esta mezcla se incubó a 37°C por 90 min, se detuvo la reacción con 200 μL de ácido tricloroacético 5%, y se centrifugó a 2000 rpm por 5 min. Del sobrenadante se tomaron 150 μL , se le agregaron 150 μL de NaOH 0.5 mM y se midió la absorbancia a 450 nm. Se preparó una curva dosis-respuesta y se calculó la actividad proteolítica, la cual se expresó como unidades/mg de proteína, donde un cambio de 0.2 en la absorbancia por minuto corresponde a una unidad.

Para la neutralización de la actividad proteolítica se utilizó el método descrito por Gutiérrez *et al.* (93) aplicado al de Wang *et al.* (97). Para esto, se incubaron a 37°C por 30 min diferentes concentraciones de PoliVal-ICP o inhibidores con una dosis reto de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Luego, se siguió el protocolo descrito para la actividad proteolítica (97) y se hicieron las respectivas curvas de dosis-respuesta. La neutralización de esta actividad se expresó como DE₅₀, que es la

proporción de μL antiveneno/mg veneno o μL inhibidores/mg veneno a la que la actividad proteolítica se redujo en un 50%.

Análisis estadístico

Las actividades *in vitro* se presentaron como media \pm desviación estándar; mientras que las actividades *in vivo* se presentaron como media e Intervalos de Confianza al 95% (IC95%). Diferencias en los valores de las DE_{50} s de la neutralización de la actividad letal fueron consideradas significativas cuando no se evidenció traslape en los IC95%. Para los casos de la neutralización de la actividad mitotóxica y procoagulante, se compararon por medio de un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía los niveles más altos de cada antiveneno con respecto al control positivo y se hizo un análisis post-hoc de Dunnett. Para la actividad mitotóxica se eliminaron dos ratones del análisis. Se utilizó un criterio estadístico de decisión de $\alpha = 95\%$, por lo que los valores de probabilidad (P) < 0.05 se consideraron como estadísticamente significativos. Para realizar las pruebas estadísticas se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 20.

Resultados

Separación de proteínas plasmáticas con potencial inhibitorio

Separación de proteínas por técnicas cromatográficas

Cromatografía por afinidad

A partir de la cromatografía de afinidad se colectó una fracción de proteínas plasmáticas que interactúan con el veneno (Fig. 1, pico B). Esta fracción es la que se consideró como los inhibidores plasmáticos de veneno. Se hicieron dos corridas por sesión y se concentraron las fracciones unidas, obteniendo una concentración de entre 2.40 y 5.98 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Sin embargo, se eligió trabajar a concentraciones de 3.00 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ o menos, ya que a concentraciones mayores las proteínas precipitaron.

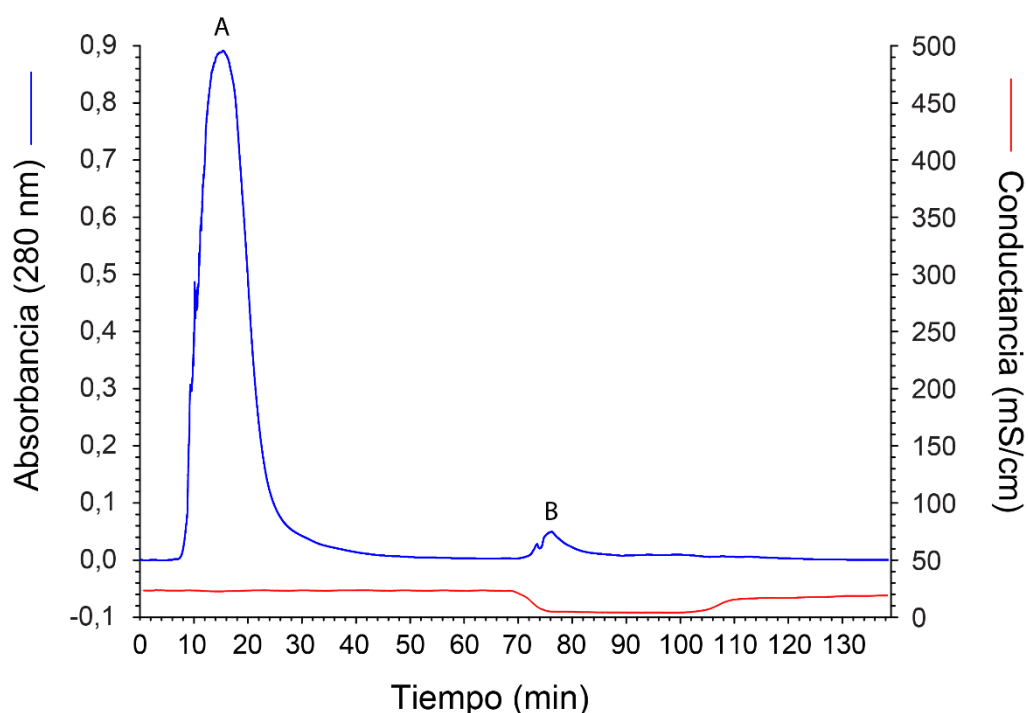


Figura 1. Cromatograma de fraccionamiento de plasma de *C. simus* por cromatografía de afinidad con una columna de Sepharosa acoplada con veneno de *C. simus*. Pico A: fracción no-unida. Pico B: fracción unida (inhibidores). La absorbancia está expresada como AU.

RP-HPLC

Fraccionamiento por RP-HPLC de los inhibidores

Luego de obtener los inhibidores (Fig. 1, pico B), éstos se fraccionaron por medio de RP-HPLC (Fig. 2) para obtener fracciones más simples que permitieran una mayor pureza a la hora de someterlas a SDS-PAGE. Se observó la presencia de cinco picos en el cromatograma, dos a mayor concentración (Fig. 2, picos A y B) y tres minoritarios (Fig. 2, picos C, D y E).

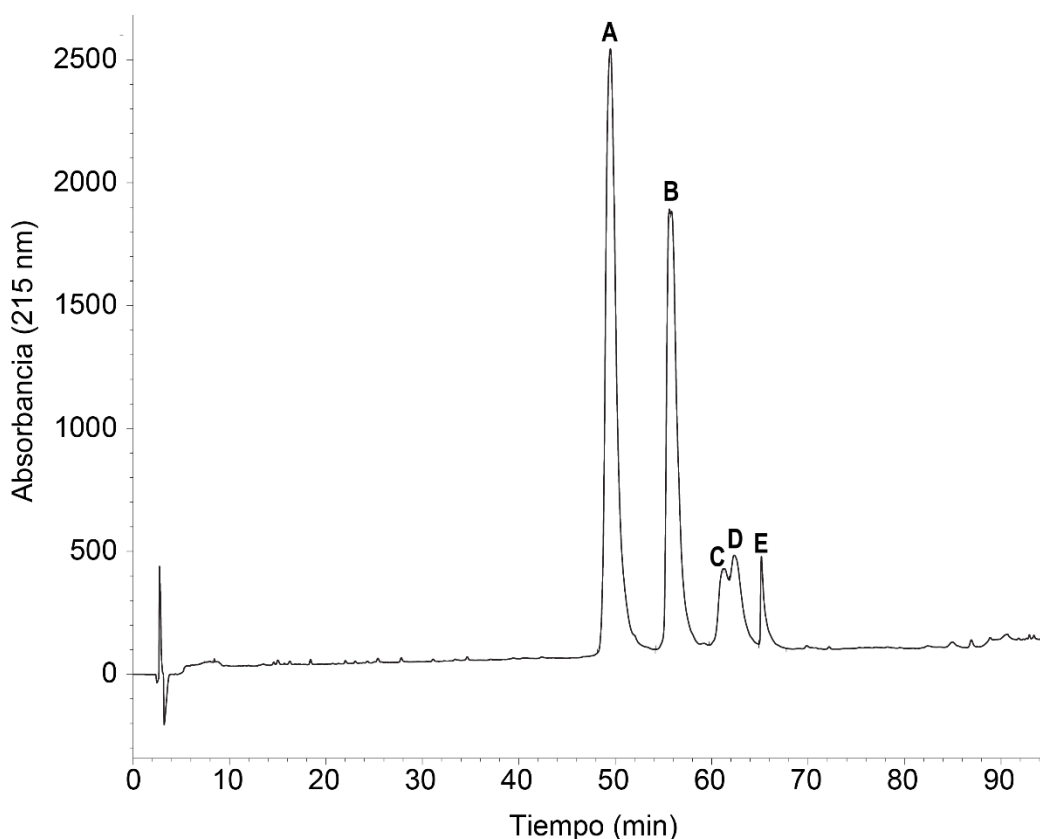


Figura 2. Cromatograma de fraccionamiento por RP-HPLC de los inhibidores. Los tiempos de retención de las fracciones se encuentran en el Anexo 1. La absorbancia está expresada como mAU.

Interacción entre los inhibidores plasmáticos y el veneno de *C. simus*

En el cromatograma de los inhibidores plasmáticos pre-incubados con el veneno de *C. simus* (Fig. 3), se observó un aumento de la absorbancia de fracciones H a la O con respecto a las fracciones equivalentes en la corrida

control del veneno de *C. simus*. También se observó la aparición de una nueva fracción (Fig. 3C, pico K) y un aumento en los picos Q a S.

Utilizando como referencia los picos e identificaciones generadas por Calvete *et al.* (6), se compararon los picos del cromatograma de interacción inhibidores-veneno y el del control de solo veneno (Fig. 3C, 3B, respectivamente). En ellos se observó que la fracción correspondiente a las PLA₂ presentó un aumento junto con la aparición de una nueva fracción (Fig. 3C, picos J y K). Además, se observó un aumento en la región de las SVSPs (fracciones L a O), L-aminoácido oxidasas (fracción P), SVMP P-I (fracciones Q a R) y SVMP P-III (fracciones S y T) (6). Para verificar que el aumento en estas fracciones es por la presencia de los inhibidores y no por variaciones entre las corridas, se comparó el patrón electroforético de las bandas de los inhibidores (Fig. 5, carril Inh) con los carriles correspondientes. Las bandas de los inhibidores se observaron en los carriles correspondientes a las fracciones J y K (PLA₂), L a O (SVSPs), P (L-AAO), Q a R (SVMP P-I), y S y T (SVMP P-III).

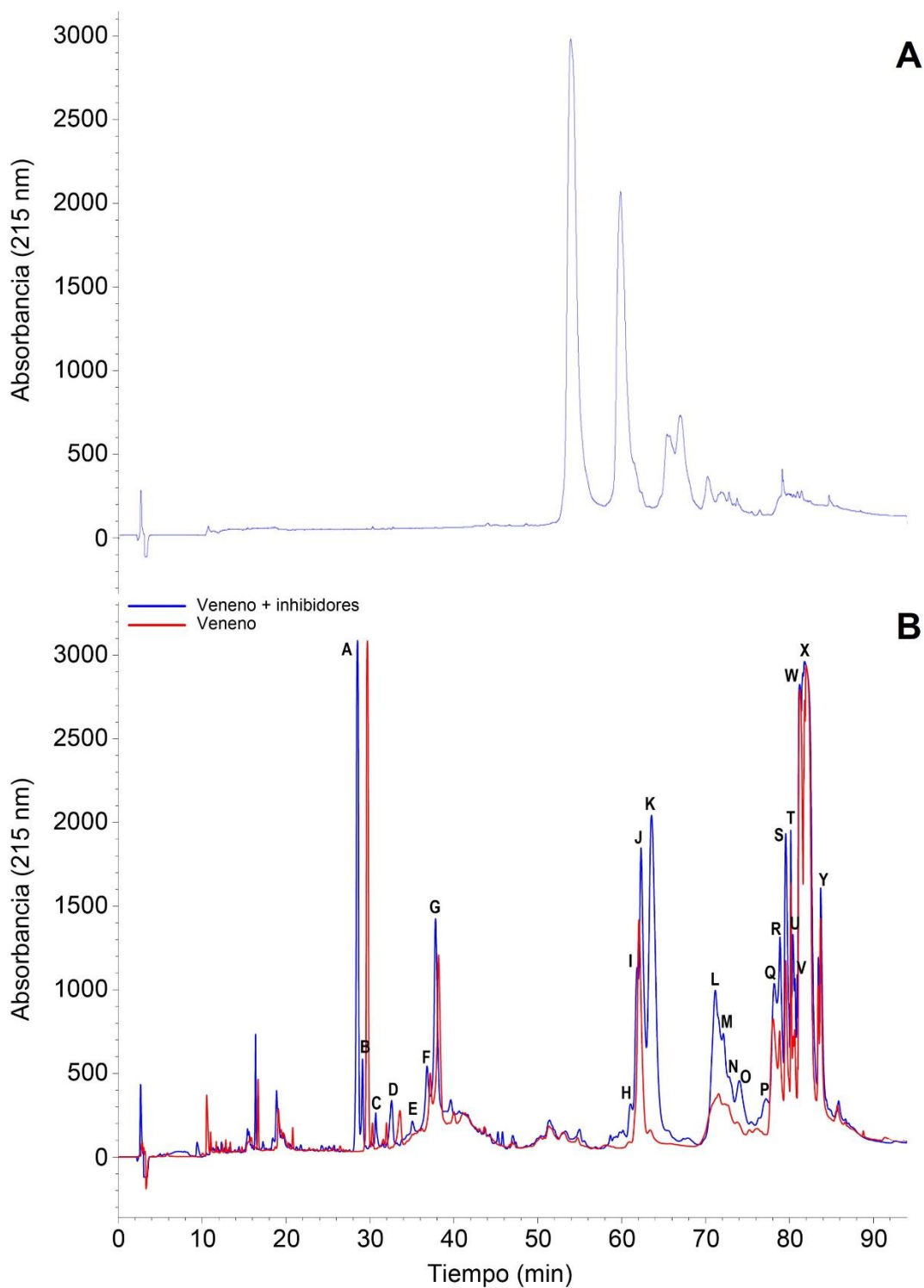


Figura 3. Cromatogramas de fraccionamiento por RP-HPLC. **A** fracción de inhibidores, **B** interacción entre inhibidores y veneno de *C. simus*. Los tiempos de retención de las fracciones se encuentran en el Anexo 2.

Separación de proteínas por medio de SDS-PAGE

Luego de coleccionar y secar las fracciones de RP-HPLC de los inhibidores, éstas se disolvieron en 50 μ L de agua MilliQ y se les midió su concentración de proteína en un NanoDrop a una absorbancia de 280 nm para calcular y cargar un máximo de 15 μ g de proteína por carril. Para las fracciones A hasta la D de RP-HPLC de los inhibidores se observó que hay pocas diferencias de masa molecular entre las bandas de las muestras reducidas y no-reducidas (Fig. 4A, carriles A y B; Fig. 4B, carriles C y D), donde las proteínas mayoritarias presentan una masa molecular aparente de entre 15 y 30 kDa. Solamente se dio la aparición de bandas de menor masa molecular, pero sin cambiar la migración de las bandas más concentradas. En este caso, la masa aparente de las bandas bajo condiciones reductoras se observó entre los 15 y 30 kDa (Fig. 4A, carriles A y B; Fig. 4B, carriles C y D).

Únicamente la fracción E presentó un cambio entre condiciones no-reductoras y reductoras, donde se observó una banda de \approx 250 kDa bajo condiciones no-reductoras (Fig. 4, carril E-NR), pero bajo condiciones reductoras ésta desapareció y aparecieron dos bandas de entre 50 y 70 kDa (Fig. 4, carril E-R); lo que indica una estructura cuaternaria mediada por enlaces disulfuro.

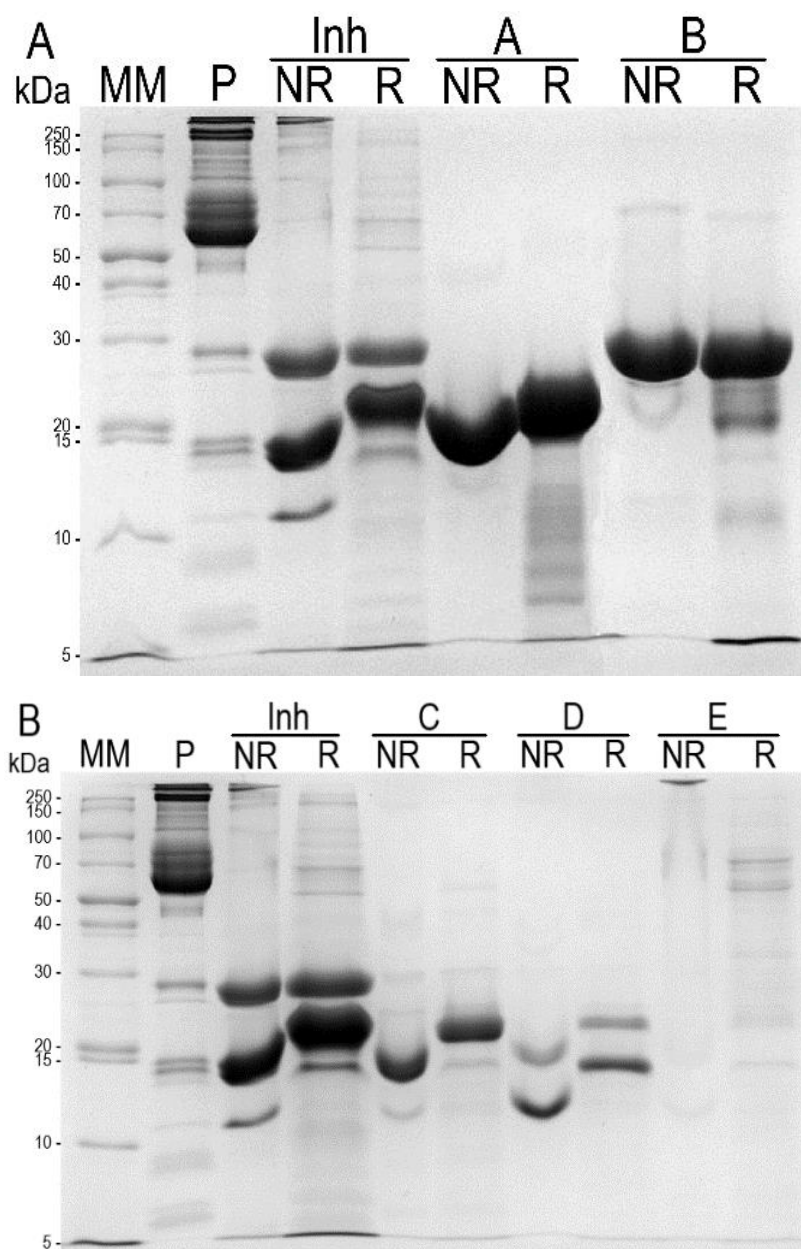


Figura 4. SDS-PAGE 15% de las fracciones de RP-HPLC de los inhibidores plasmáticos (Fig. 2). MM= Marcador Molecular PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder de Thermo Fisher Scientific; P= Plasma *C. simus* bajo condiciones no-reductoras; Inh= inhibidores; A-E= fracciones del cromatograma de la Fig. 2; NR= condiciones no-reductoras; R= condiciones reductoras.

Para las fracciones del experimento de la interacción entre los inhibidores y el veneno de *C. simus*, en los SDS-PAGE se observó la presencia de bandas correspondientes a las de los inhibidores (Fig. 5, carriles Inh e InhV) en los carriles correspondientes a los picos J a N y Q a T (Fig. 5).

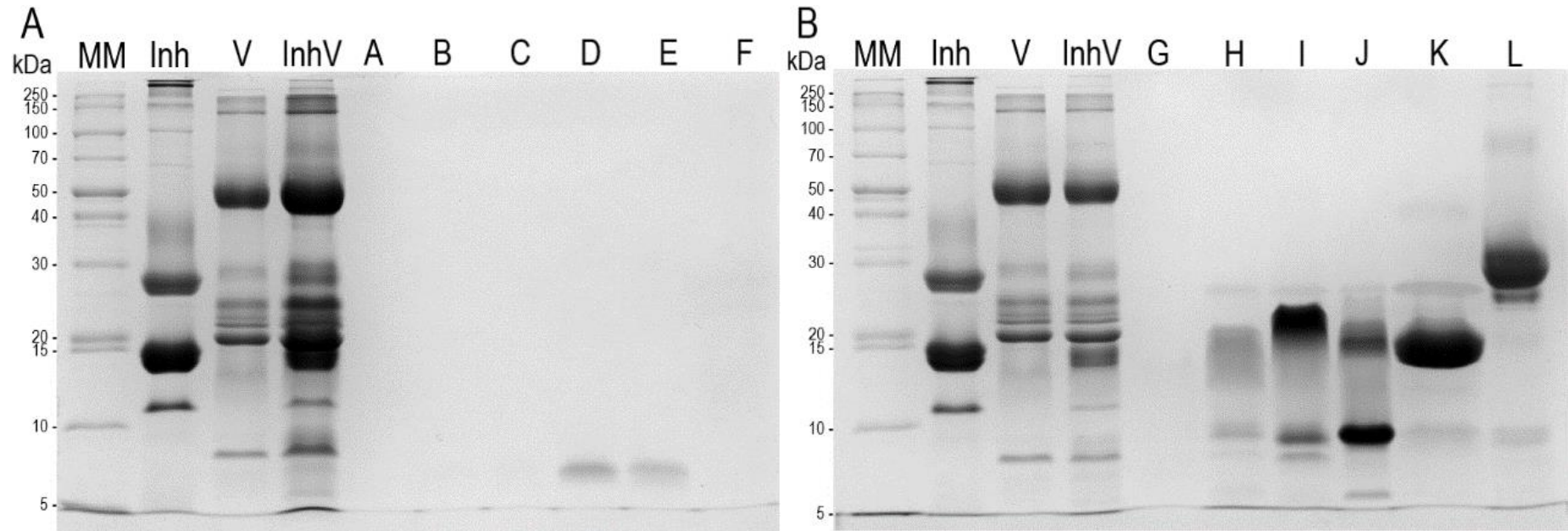


Figura 5. Fraccionamiento por RP-HPLC de veneno de *C. simus* incubado por 30 min a 37 °C con los inhibidores. MM= Marcador Molecular PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder de Thermo Fisher Scientific. Inh= inhibidores; V= veneno; InhV= inhibidores incubados con veneno. Las letras A a L corresponden a las fracciones de la Fig. 3 (ver Anexo 1 para tiempos de retención). Todas las fracciones fueron corridas bajo condiciones no-reductoras. Continúa.

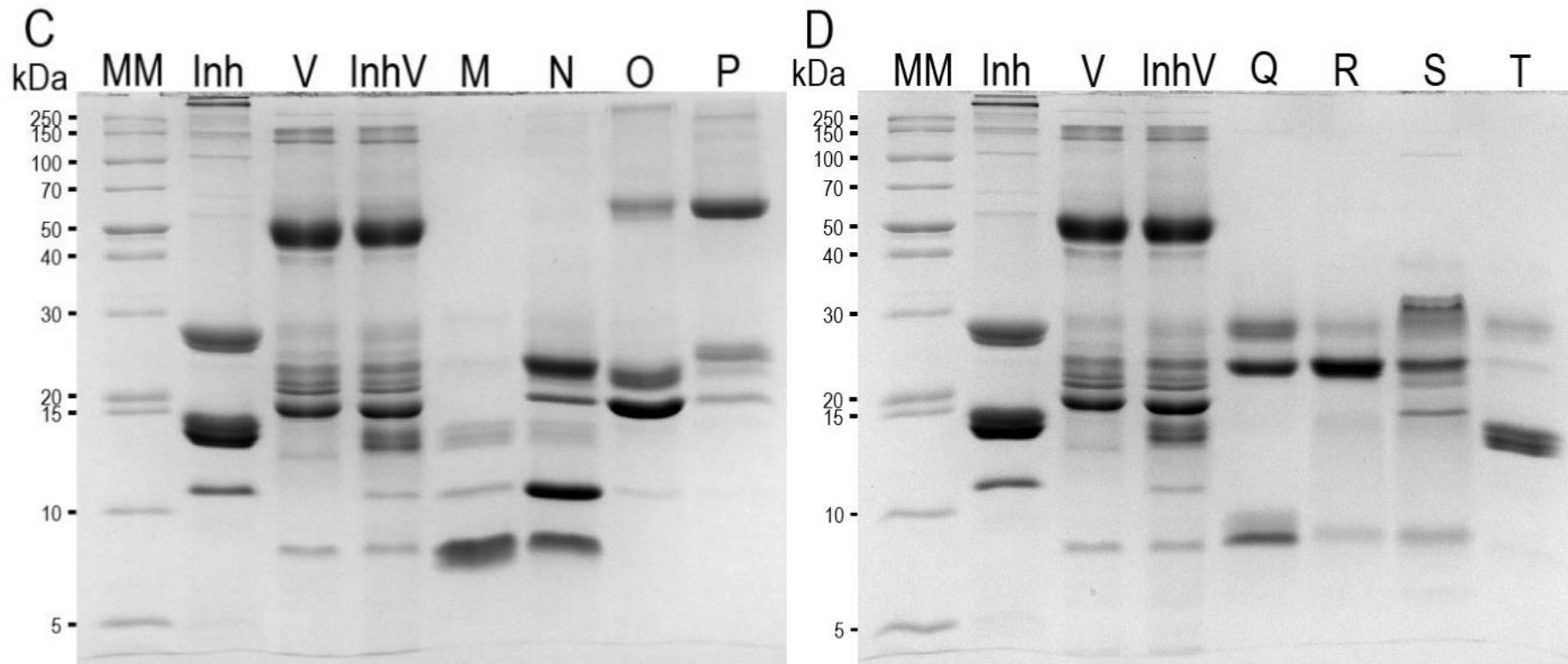


Figura 5. Fraccionamiento por RP-HPLC de veneno de *C. simus* incubado por 30 min a 37 °C con los inhibidores. MM= Marcador Molecular PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder de Thermo Fisher Scientific. Inh= inhibidores; V= veneno; InhV= inhibidores incubados con veneno. Las letras M a T corresponden a las fracciones de la Fig. 3 (ver Anexo 1 para tiempos de retención). Todas las fracciones fueron corridas bajo condiciones no-reductoras. Continúa.

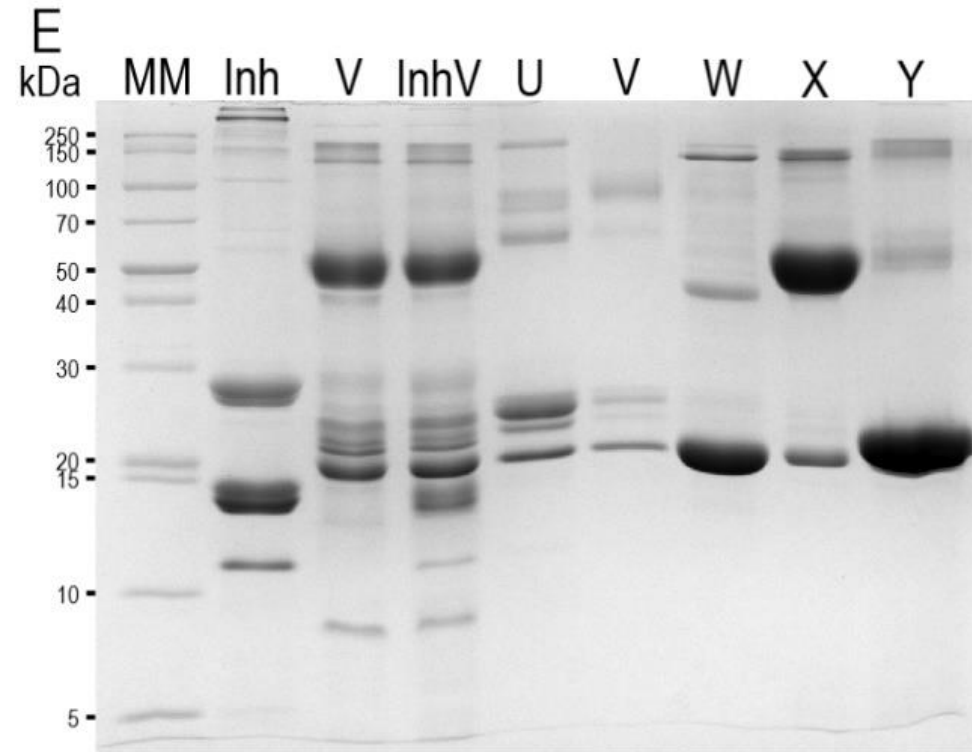


Figura 5. Fraccionamiento por RP-HPLC de veneno de *C. simus* incubado por 30 min a 37 °C con los inhibidores. MM= Marcador Molecular PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder de Thermo Fisher Scientific. Inh= inhibidores; V= veneno; InhV= inhibidores incubados con veneno. Las letras U a Y corresponden a las fracciones de la Fig. 3 (ver Anexo 1 para tiempos de retención). Todas las fracciones fueron corridas bajo condiciones no-reductoras.

Identificación de proteínas por medio de espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

Para la identificación parcial de proteínas por MS/MS, se utilizó el Protocolo 1 de fraccionamiento por RP-HPLC (Fig. 6). Las fracciones obtenidas se corrieron en un SDS-PAGE al 15% (Fig. 6, inserto), donde las bandas se sometieron a digestión en gel y los péptidos resultantes se identificaron por MS/MS (Cuadro 1). Todas las proteínas se identificaron parcialmente como inhibidores de fosfolipasa A₂ tipo gamma (γ PLI) de dos especies diferentes: una de *Bothrops jararacussu* (código A8I4M3) y la otra de *Protobothrops elegans* (código D9N4B9). No se identificó ningún otro tipo de inhibidor. Ambas proteínas identificadas se reportan con una masa molecular de alrededor de 22 kDa. Sin embargo, en el SDS-PAGE se observó que las bandas 2, 5, 7 y 8 tienen una masa aparente de ≤ 22 kDa, las 1 y 4 tienen una masa aparente de entre 25 y 37 kDa, y las 3 y 6 tienen una masa aparente ≥ 250 kDa.

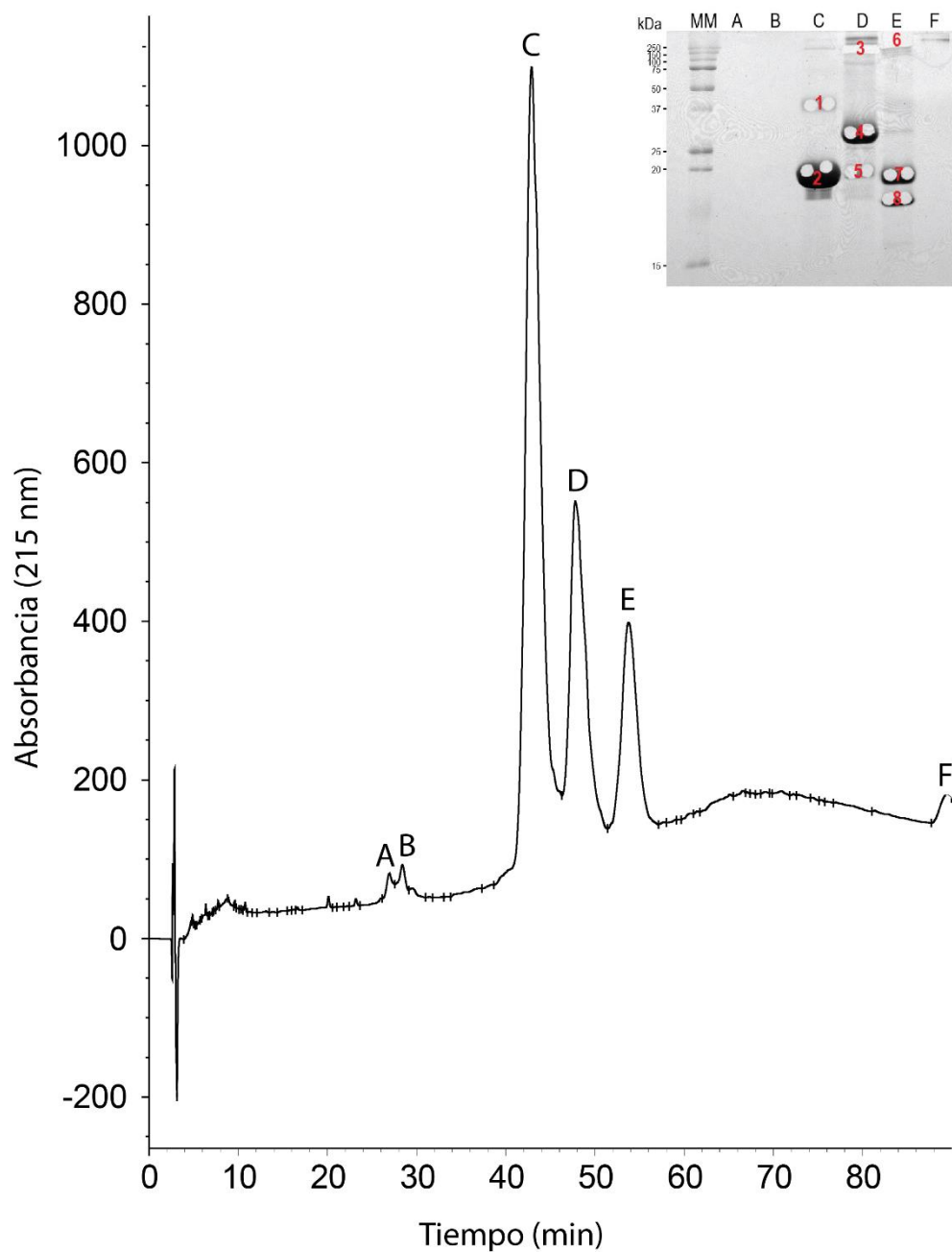


Figura 6. Cromatograma de fraccionamiento de inhibidores por RP-HPLC (Protocolo 1). Inserto: SDS-PAGE al 15% con fracciones colectadas de la corrida mostrada; todas las muestras se corrieron bajo condiciones no-reductoras. Los números en el inserto representan las bandas cortadas para identificación por MS/MS.

Cuadro 1. Identificación de familias de proteínas a partir de bandas de SDS-PAGE de inhibidores detectadas por MS/MS Q-Exactive Plus® (Thermo).

Banda en gel	Iones		Péptidos más representativos identificados en cada banda ^a	Masa molecular teórica (kDa)	pI teórico	Familia de proteínas	Código
	m/Z	Z					
1	784.3690	2	TVHKNCFSSSI CK	22178	5.79	Phospholipase A ₂ Inhibitor	A8I4M3
2	784.3694	2	TVHKNCFSSSI CK	22178	5.79	Phospholipase A ₂ Inhibitor	A8I4M3
3	551.7343	2	NCFSSSICK	22178	5.79	Phospholipase A ₂ Inhibitor	A8I4M3
4	740.8591	2	GCATESLCTLL QK	22148	5.24	Phospholipase A ₂ Inhibitor Gamma	D9N4B9
5	784.3624	2	TVHKNCFSSSI CK	22178	5.79	Phospholipase A ₂ Inhibitor Gamma	A8I4M3
6	804.9100	2	GCATESLCTLL QKK	22148	5.24	Phospholipase A ₂ Inhibitor Gamma	D9N4B9
7	804.8093	2	GCATESLCTLL QKK	22148	5.24	Phospholipase A ₂ Inhibitor Gamma	D9N4B9
8	804.9088	2	GCATESLCTLL QKK	22148	5.24	Phospholipase A ₂ Inhibitor	D9N4B9

^a Todos los péptidos identificados de cada banda se encuentran en el Anexo 3.

Actividades biológicas y bioquímicas

En las pruebas biológicas *in vivo*, se demostró que los inhibidores tienen una capacidad neutralizante significativa sobre la actividad letal (IC_{95%}) y miotóxica ($F = 22.768$ (2; 10), $p < 0.0001$), pero no presentaron capacidad neutralizante sobre las actividades hemorrágica y desfibrinogenante (Cuadro 3). En estas pruebas, el suero PoliVal-ICP se encontraba a una concentración de entre 60-77 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y los inhibidores entre 2-2.62 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. El análisis de potencia de su capacidad neutralizante sobre la actividad letal se hizo tanto por medio de masa de antiveneno inyectada (μg antiveneno/mg veneno) como por medio de

volumen de antiveneno inyectado (μL antiveneno/mg veneno). Bajo esta premisa, se observó que los inhibidores tuvieron una potencia más alta en comparación con el suero PoliVal-ICP cuando se realizó el análisis por medio de masa de antiveneno inyectada; pero el suero PoliVal-ICP presentó una potencia más alta cuando se hizo el cálculo por medio de volumen de antiveneno inyectado (Cuadro 3).

De las pruebas bioquímicas *in vitro*, los inhibidores sí presentaron una capacidad neutralizante significativa ($F= 19.928$ (2; 26), $p < 0.0001$) sobre la actividad coagulante del veneno, y su DE fue más baja en comparación con el suero PoliVal-ICP (Cuadro 3). En cuanto a la actividad fosfolipasa A_2 (PLA $_2$) por el método de Holzer y Mackessy, se logró calcular la actividad PLA $_2$ del veneno, pero la neutralización de este no se pudo calcular para los inhibidores ni para el suero PoliVal-ICP (Cuadro 3; Fig. 7). Bajo el método de Dole, tampoco se logró determinar si los inhibidores presentan una actividad neutralizante o no de la actividad PLA $_2$, por una posible interferencia, pero sí se logró para el suero PoliVal-ICP (Cuadro 3; Fig. 8B). Los inhibidores no demostraron tener capacidad neutralizante sobre la actividad proteolítica del veneno (Cuadro 3).

Cuadro 2. Actividades tóxicas *in vitro* e *in vivo* del veneno de *C. simus*.

Actividad	Valor de referencia o calculado
<i>In vivo</i>	
Letal ($\mu\text{g}/\text{ratón}$)	9.2 [4.7-18.1]*
Hemorrágica (μg)	6.1 \pm 0.4*
Desfibrinogenante (μg)	2*
Miotóxica (U/L)	803 \pm 236*
<i>In vitro</i>	
Coagulante (μg)	4.18 \pm 0.23
Fosfolipasa A_2 Dole ($\mu\text{Eq}/\text{mg}/\text{min}$)	22.72 \pm 1.21
Fosfolipasa A_2 Holzer & Mackessy ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0.331 \pm 0.06
Proteolítica (U/mg)	6.52 \pm 0.02

* En apego a las recomendaciones del ARRIVE y las 3Rs de la OMS, los valores de las actividades letal, hemorrágica, desfibrinogenante y miotóxica fueron tomados como referencia de Segura *et al.* (86).

Cuadro 3. Neutralización de actividades tóxicas *in vitro* e *in vivo* del veneno de *C. simus* con suero PoliVal-ICP e inhibidores plasmáticos de *C. simus*.

Actividad	Neutralización con PoliVal-ICP		Neutralización con inhibidores	
	DE o DE ₅₀ ^a	Potencia ^b	DE o DE ₅₀ ^a	Potencia ^b
<i>In vivo</i>				
Letal (μL/mg)^c	119.05 [43.38-172.12]	0.077	1612.19 [621.89-9433.96]	0.006
Letal (μg/mg)^c	7381.1 [2689.56-10671.44]	0.001	3758.06 [1449-21981.13]	0.002
Hemorrágica (μL/mg)	NE	NA	NN	NA
Desfibrinogenante (μL/mg)	NE	NA	NN	NA
Miotóxica (μL/mg)	8.55 ± 1.79	NA	19.83 ± 18.63	NA
Miotóxica (μg/mg)	615.94 ± 129.11	NA	51.96 ± 48.81	NA
<i>In vitro</i>				
Coagulante (μL/mg)	188.6 ± 104.75	NA	16.38 ± 7.52	NA
Fosfolipasa A₂ método Dole (μL/mg)	30.67 ± 3.26	NA	NR/NC	NA
Fosfolipasa A₂ método Holzer & Mackessy (μL/mg)	NR/NC	NA	NR/NC	NA
Proteolítica (μL/mg)	634.91 ± 11.96	NA	NN	NA

^a DE expresada como la proporción de μL de antiveneno/mg de veneno en la que el tiempo de coagulación se prolonga tres veces con respecto al tiempo de coagulación del veneno solo. DE₅₀ expresada como μg antiveneno que neutraliza el 50% de la actividad respectiva (Cuadro 2). En ambos casos, los valores se expresaron como promedio [IC 95%].

^b Expresada como la proporción de DL₅₀ que es neutralizada por μg de antiveneno.

NA: No Aplica; NE: No Evaluada; NN: No Neutraliza; NR/NC: No Reportada y No Calculable bajo las metodologías utilizadas.

^c Se utilizaron 2 DL₅₀ como dosis reto.

En la actividad PLA₂ del veneno de *C. simus*, se obtuvieron dos curvas: una para el método de Holzer y Mackessy, que emplea el sustrato 4-NOBA (Fig. 7A), y otra para el de Dole, que usa yema de huevo como sustrato (Fig. 8A). A partir de estas curvas, se eligieron las dosis reto para la neutralización bajo cada método: 2.50 µg/µL (62.5 µg/pozo) para el de Holzer y Mackessy, y 0.0625 µg/µL (6.25 µg/pozo) para el de Dole.

Con el método de Holzer y Mackessy, no se obtuvo una clara neutralización sobre el veneno por parte del suero PoliVal-ICP (Fig. 7B) ni de los inhibidores (Fig. 7C). Los controles de suero e inhibidores presentaron una absorbancia baja, mientras que el control positivo con veneno presentó una absorbancia alta (Fig. 7D).

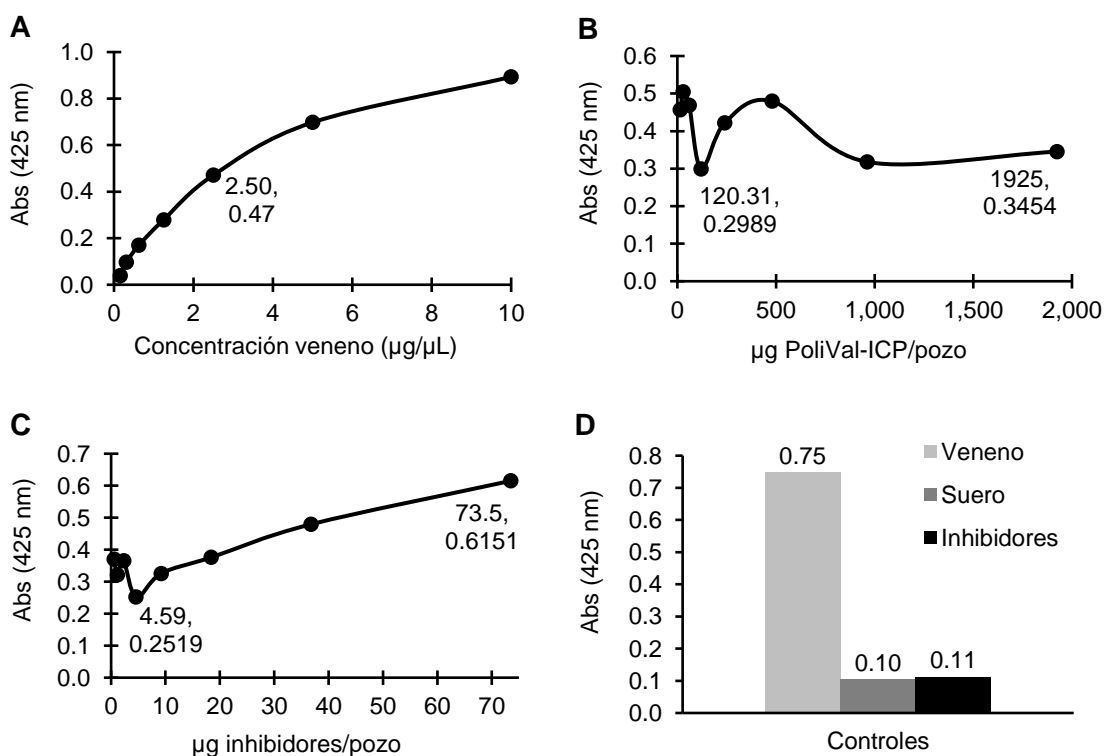


Figura 7. Actividad fosfolipasa A₂ del veneno de *C. simus* (A) sobre el sustrato 4-NOBA y sus neutralizaciones con suero PoliVal-ICP (B) e inhibidores de *C. simus* (C). D) Controles de veneno, suero PoliVal-ICP (1925 µg/pocillo) e inhibidores (73.5 µg/pocillo). Los valores encima de cada barra corresponden a las absorbancias a 425 nm de cada control. Cada valor es la absorbancia promedio del triplicado menos la absorbancia promedio del triplicado del blanco.

Con el método de Dole, se observó una neutralización por parte del suero PoliVal-ICP (Fig. 8B), pero no se observó ninguna neutralización por parte de los inhibidores (Fig. 8C). Sin embargo, en los controles se observa que no hay una cantidad relevante de μL de NaOH consumidos con el suero PoliVal-ICP, pero sí hay una cantidad relevante de μL de NaOH consumidos con solo los inhibidores, que es similar a la del control positivo (Fig. 8D).

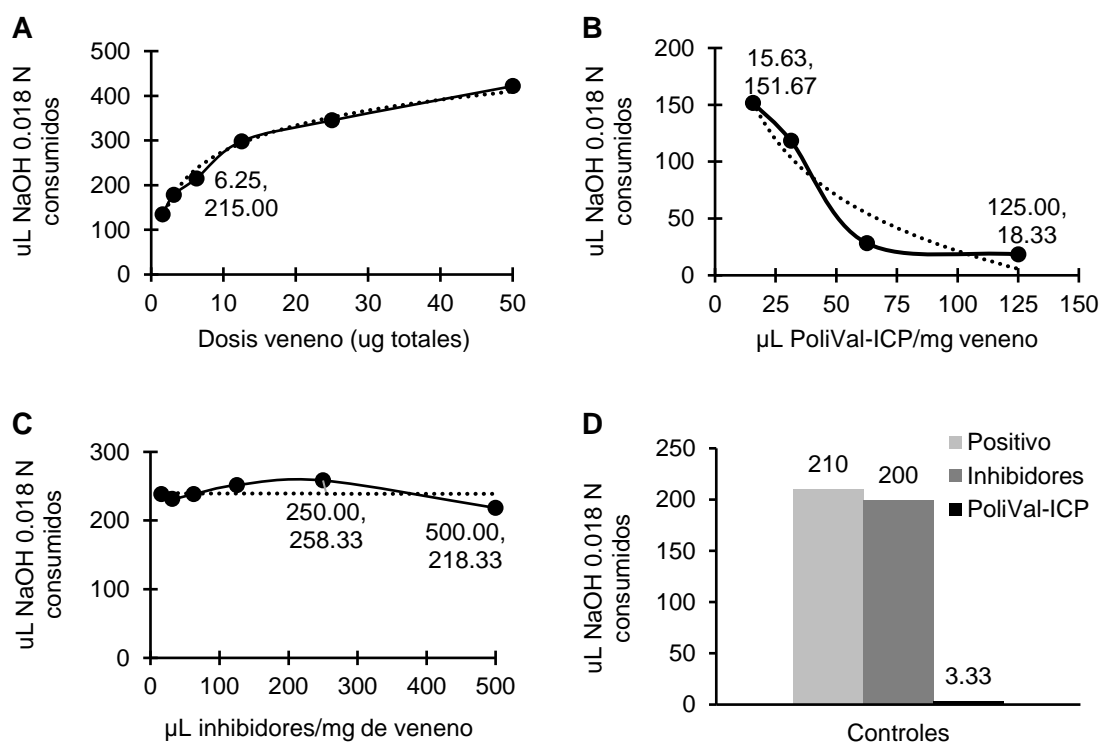


Figura 8. Actividad fosfolipasa A_2 del veneno de *C. simus* (A) sobre yema de huevo como sustrato y sus neutralizaciones con suero PoliVal-ICP (B) e inhibidores de *C. simus* (C). D) Controles de sólo: veneno, suero PoliVal-ICP (15400 μg /tubo) e inhibidores (796 μg /tubo). Los valores encima de cada barra corresponden a los μL de NaOH 0.018 N consumidos en cada control. Cada valor corresponde a los μL de NaOH 0.018 N consumidos promedio del triplicado de cada control menos los μL de NaOH 0.018 N consumidos promedio del triplicado del blanco.

Discusión

Dado que estos inhibidores son proteínas de fase aguda que se encuentran a baja concentración en sangre en condiciones de homeostasis (65) y que las serpientes que se eligieron para este estudio presentaban un buen estado de salud, es de esperarse que se obtenga poca cantidad de inhibidores plasmáticos a partir de la fracción unida de la cromatografía por afinidad (Fig. 1). Estas proteínas tampoco aumentan debido al estrés por manipulación durante el sangrado, ya que el mecanismo propuesto para el aumento en sangre de estos inhibidores involucra la formación de un complejo inhibidor:PLA₂ y su interacción con los hepatocitos de la serpiente (65).

Por su parte, los inhibidores presentaron una inestabilidad proteica al precipitar en solución. Para mejorar esto, se utilizaron los datos de proteómica para obtener el punto isoeléctrico teórico de los inhibidores. Los inhibidores presentaron puntos isoeléctricos teóricos ácidos de 5.24 y 5.79, pero estos puntos isoeléctricos son de los polipéptidos de las proteínas en la base de datos, pero no necesariamente de los inhibidores identificados para *C. simus* ya que la secuencia puede variar entre ellos y, por ende, su punto isoeléctrico. A partir de esta información, se ajustó el pH a 6.0 posterior a la cromatografía por afinidad. Esto redujo la precipitación de las proteínas en solución y aumentó la concentración de entre ≈ 1.5 y $3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ a $\approx 3-6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Cada una de las fracciones de RP-HPLC de estos inhibidores (Fig. 2; Fig. 6) mostraron tener el mismo patrón electroforético de bandas bajo condiciones no-reductoras como reductoras (Fig. 4), por lo que se determinó que no hay enlaces disulfuro mediando la estructura cuaternaria de las subunidades de la proteína nativa. Esto se ajusta a lo reportado para γPLI : a) una estructura cuaternaria mediada por interacciones no-covalentes, y b) subunidades con una masa de 20 a 31 kDa (66,68,70). Solamente se encontró una proteína a baja concentración (Fig. 4B, carriles E-NR y E-R; Fig. 6 inserto, carriles D, E y F, bandas 3 y 6), que sí presentaba estructura mediada por enlaces disulfuro, ya que su estructura bajo condiciones no-reductoras pasó de tener una masa por encima de 250 kDa (Fig. 4B, carril E-NR), a presentar dos bandas de entre 50 y

70 kDa (Fig. 4B, carril E-R). Sin embargo, dos de estas proteínas (Fig. 6 inserto, carriles D y E, bandas 3 y 6) contenían secuencias que se encuentran en γ PLIs de 22 kDa (Cuadro 6).

Los γ PLI plasmáticos presentó una interacción con las toxinas a nivel *in vivo*, ya que sí se observó un efecto neutralizante de la fracción de los inhibidores sobre la letalidad del veneno en ratones (Cuadro 3); por lo que se confirma que hay una interacción inhibidores-veneno, y que ésta logra neutralizar la actividad letal del veneno. Cabe destacar que los inhibidores neutralizaron la actividad letal a pesar de estar a una menor concentración inicial que el suero PoliVal-ICP (2.8 μ g/ μ L para los inhibidores vs 62 μ g/ μ L para el suero). Hay que recalcar que los datos de neutralización del suero PoliVal-ICP sobre la letalidad en este trabajo son congruentes con los de otros reportes (86). También, por medio del análisis de potencia se demostró que son más neutralizantes que el suero PoliVal-ICP sobre la letalidad del veneno (Cuadro 3) si se considera solamente la masa de proteína inyectada. Sin embargo, se reporta que los anticuerpos neutralizantes específicos contra las toxinas del veneno presentes en el suero PoliVal-ICP rondan entre 10 y 40% (98); por lo que el suero PoliVal-ICP presenta una potencia superior a la calculada, si se consideran solo los anticuerpos específicos contra el veneno de *C. simus*.

A pesar de esto, se recomienda usar más DL₅₀S para probar hasta dónde llega la capacidad neutralizante de los inhibidores plasmáticos sobre el veneno, ya que en este estudio se utilizaron 2 DL₅₀S, mientras que en otros estudios normalmente se utilizan 4 DL₅₀S (86). Asimismo, estabilizar los inhibidores en solución para obtener una mayor concentración sería de utilidad para probar dosis reto más altas y equiparar la concentración con la del suero PoliVal-ICP y hacer una comparación más apropiada entre ambos.

Dos enfoques que se podrían probar serían: 1) utilizar los inhibidores en conjunto con el suero PoliVal-ICP y comparar su capacidad neutralizante en comparación con los inhibidores y suero PoliVal-ICP por separado; y 2) utilizar estos inhibidores contra venenos de otras especies de *Crotalus* u otros venenos ricos en PLA₂, para comprobar si hay reactividad cruzada.

Por otro lado, no se identificaron inhibidores de SVMPs (SVMPis). Esto es contrastante con el perfil de toxinas en el veneno de serpientes *C. simus* adultas, ya que éste contiene un porcentaje de 7.6% de PLA₂ (de los cuales solo el 4.1% del total del veneno representa a la neurotoxina crotoxina) y un 71.7% de SVMPs (6); lo que quiere decir que es un veneno tipo I con alto contenido de SVMPs (4, 5). También se reporta que hay una variabilidad intraespecífica bastante amplia en cuanto al porcentaje de abundancia de la familia de las PLA₂ en el veneno de *C. simus* de diferentes regiones geográficas, donde el porcentaje varía entre 4.1 y 28.7% (90). A pesar de esto, el veneno de *C. simus* sigue presentando un perfil de veneno tipo I, por lo que no era esperable que este fuera neutralizado con solamente inhibidores de fosfolipasa A₂.

Lo anterior se puede explicar por la presencia de la crotoxina que, si bien está en poca cantidad en el veneno de *C. simus* adultos, es la toxina responsable de la inmovilización/incapacitación (por neurotoxicidad) y letalidad de las presas en el veneno de las especies del género *Crotalus* sp (99). Esto se sabe tanto por diferentes valores de letalidad en diferentes subespecies de *C. simus* dada por la variación en el contenido de PLA₂ (99), como por ensayos donde la inactivación de PLA₂ con pBPB (un inhibidor sintético de PLA₂) reduce la letalidad del veneno de *C. simus* (86). Para la crotoxina purificada de *C. simus* se reportan valores de letalidad de entre 0.18 y 0.65 µg/g de ratón, donde además se observa en tres especies de *Crotalus* sp. que entre más porcentaje de crotoxina en el veneno, más letal es éste (100). Esto explica por qué las actividades letal y miotóxica fueron las únicas en neutralizarse, ya que las PLA₂ del veneno del género *Crotalus* sp. son las responsables de las actividades neurotóxica y miotóxica (100). Mientras que la actividad desfibrinogenante y la hemorrágica están causadas por SVSPs y SVMPs, respectivamente (86); familias para las cuales no se identificaron inhibidores plasmáticos (Cuadro 1).

Una posible explicación de por qué no se encontraron SVMPis es que se ha propuesto que las SVMPs pueden tener funciones accesorias a la letalidad. Dentro de ellas se mencionan funciones más enfocadas en la predigestión de las presas y la evasión de depredadores, antes que de letalidad (101,102). Con respecto a esto, se ha observado que ratones inyectados con 8.75 µg/g de ratón

de la toxina CsH1, una SVMP P-III de *C. simus*, desarrollan una hemorragia sistémica pulmonar, y éstos mueren hasta que son sacrificados a los 360 min de haber sido inyectados (103); en comparación con la crotoxina, que tiene DL_{50s} de entre 0.18 y 0.65 $\mu\text{g/g}$ de ratón (100). Esto no solo provee diversidad funcional a un mismo grupo de toxinas, sino que también da la oportunidad de alimentarse de diferentes grupos taxonómicos de presas al tener diferentes blancos moleculares (102). Por lo que probar los tiempos de muerte en diferentes organismos con diferentes grupos de toxinas aisladas de cada género y/o especie de serpiente, podría ser de utilidad para poner a prueba esta hipótesis.

Otra posibilidad es que, al haber un cambio ontogenético en neonatos de veneno tipo II (alta letalidad, bajo contenido de SVMPs) a tipo I (baja letalidad, alto contenido de SVMPs) en adultos (6), este cambio ontogenético no se replique a nivel de inhibidores. Esto puede deberse a que hay otros mecanismos para neutralizar la acción de las SVMPs dentro de la glándula de veneno (e.g. compuestos quelantes (45,46) y péptidos inhibidores (47,48,49,50) o síntesis de SVMPs en forma de zimógenos (51,52,53)); mientras que las PLA_2 no tienen estos mecanismos en el aparato glandular de veneno, por lo que su escape de la glándula tiene que ser abordado por otros mecanismos.

Con tal de aclarar esta pregunta, se pueden tomar dos abordajes: 1) filogenético: para determinar los tiempos en que surgieron los inhibidores y el cambio ontogenético en el perfil de las toxinas, y observar si el surgimiento de este cambio se da antes o después del surgimiento de los PLIs; y 2) de bioprospección: donde se haga un estudio más profundo o con un enfoque experimental diferente para comprobar si en realidad hay una ausencia de SVMPIs o si la metodología utilizada en este estudio no fue capaz de encontrarlos.

Dentro de los experimentos *in vitro*, las bandas de las fracciones J a L del experimento de interacción inhibidores-veneno son las que presentaron mayor concentración con respecto al control de veneno. Dado que la identificación por MS/MS indicó que los inhibidores son del tipo γ PLI, se espera que estos tengan una interacción con las PLA_2 (Fig. 3, picos J y K; Fig. 5, carriles J y K). Sin

embargo, el pico J (las PLA₂) de veneno de *C. simus* sale a un porcentaje de acetonitrilo de alrededor de 40% (Fig. 3), el cual es similar al porcentaje de acetonitrilo del pico A de los inhibidores (Fig. 2), por lo que podría ser una coincidencia en los tiempos de elución y no una verdadera interacción entre los inhibidores y las PLA₂.

De la misma manera, cada subunidad de los inhibidores tiene una masa molecular de ≈ 22 kDa (Cuadro 1), que es similar a la de la subunidad CB de la crotoxina (14-16 kDa) reportada para *C. simus* (6), por lo que las bandas se verían muy cercanas en el SDS-PAGE. Debido a que tanto los tiempos de retención por RP-HPLC como la posición de las bandas en los geles podrían darse por coincidencias en hidrofobicidad y masa, la interacción entre inhibidor-PLA₂ se debería comprobar por metodologías más robustas.

Una tecnología que podría ayudar a elucidar si en realidad hay una interacción entre ellas es la Resonancia de Plasmones de Superficie (o SPR, por sus siglas en inglés), ya que demostró que hay una interacción no-covalente de muy alta afinidad entre la toxina jararhagina de *Bothrops jararaca* y la antitoxina plasmática DM43 de *Didelphis aurita* (104).

De las actividades bioquímicas *in vitro*, destaca la presencia de una neutralización por parte de los inhibidores sobre la actividad coagulante en plasma (Cuadro 3), a pesar de no haber neutralización de la actividad desfibrinogenante en ratones (Cuadro 3). Aunado a esto, hay una ausencia de inhibidores de SVMPs y de SVSPs (Cuadro 1), que son las toxinas responsables de los efectos procoagulantes en este veneno (86). Además, los efectos hemostáticos reportados para las PLA₂s son anticoagulantes, no procoagulantes (105,106,107), por lo que la presencia de γ PLIs no explicaría la neutralización de la actividad coagulante en plasma.

Sin embargo, existe la posibilidad de que las proteínas identificadas como inhibidores de fosfolipasa A₂ también tengan interacción con otras proteínas. En la Fig. 3 se observa que las fracciones asociadas a las SVSPs (6) presentan un aumento cuando se incubó el veneno con los inhibidores (Fig. 3C, fracciones L a O), lo cual podría indicar una posible interacción entre los inhibidores y las

SVSPs. Para comprobar esta hipótesis se podría utilizar la técnica de SPR ya mencionada (104), y realizar la prueba de neutralización de los inhibidores sobre veneno completo y sobre SVSPs purificadas; asimismo, se podría neutralizar con PMSF, un inhibidor de SVSPs ya descrito (108), y comparar los tiempos de coagulación con los de los inhibidores. De ser el caso que los inhibidores sí sean los responsables de neutralizar la actividad coagulante del veneno, no se encontró una neutralización por parte de ellos sobre la actividad desfibrinogenante. Esto podría ser por la cantidad de inhibidor que se utilizó para realizar la neutralización de la prueba, por lo que intentar con concentraciones más altas de inhibidor es otra alternativa.

Con respecto a la actividad PLA₂, si bien se obtuvo una neutralización de la actividad miotóxica (de la cual las PLA₂ son responsables) por parte de los inhibidores, no se obtuvo una clara neutralización de la actividad PLA₂ bajo ninguno de los dos métodos *in vitro* (Fig. 7C; Fig. 8C). Sin embargo, a pesar de que sí se observó una neutralización de esta actividad con el suero PoliVal-ICP bajo el método de Dole (Fig. 8B), tampoco se logró observar una neutralización bajo el método de Holzer & Mackessy (Fig. 7B). Esto indica que el método de Holzer & Mackessy no es apropiado para probar la capacidad neutralizante del antiveneno o los inhibidores. En cuanto al método de Dole, no se puede descartar la capacidad neutralizante de los inhibidores, ya que el control de sólo los inhibidores indica que hay un alto consumo de NaOH, inclusive similar al del veneno (Fig. 8D). Esto quiere decir que, de haber un efecto neutralizante, éste estaría siendo enmascarado por el consumo de NaOH visto en la solución control de los inhibidores.

Dado que el efecto neutralizante podría estar enmascarado por debajo del consumo de NaOH del control de los inhibidores (Fig. 8D), se podría intentar con una dosis reto de veneno más alta. Esto podría causar un consumo de NaOH mayor al generado por el control de los inhibidores, dando la posibilidad de observar si hay una curva de neutralización. Otra alternativa sería probar con otras metodologías que no estén basadas en pH o espectrofotometría. Una opción sería el método de hemólisis indirecta, que consiste en medir los halos

de hemólisis producidos por el veneno sobre geles de agarosa con eritrocitos y yema de huevo (109); esto permitiría comparar el daño generado por el veneno cuando es neutralizado con el suero PoliVal-ICP y con los inhibidores.

Conclusiones

La metodología utilizada fue útil para separar, a partir de plasma, proteínas identificadas como inhibidores de fosfolipasa A₂ tipo gamma. A pesar de que solo se identificó este tipo de inhibidor, no se descarta la posibilidad de la existencia de otros tipos de inhibidores dirigidos contra otras toxinas que podrían ser aislados bajo otra metodología.

Dado que las PLA₂ son las responsables de la actividad miotóxica y letal en el veneno de *C. simus*, se confirmó que los inhibidores aislados en este estudio tienen una actividad neutralizante contra estas toxinas, ya que lograron neutralizar ambas actividades. Sin embargo, aunque estén identificados como inhibidores de PLA₂, existe la posibilidad que estén dirigidos a más de un tipo de blanco, ya que se presentó neutralización de la actividad coagulante. Se necesitan hacer más pruebas para determinar si los inhibidores son exclusivos de un blanco (solamente PLA₂) o si también pueden neutralizar otro tipo de toxinas.

En comparación con el suero antiofídico comercial PoliVal-ICP, la fracción de inhibidores aislados en este estudio presenta una mejor neutralización de las actividades letal y miotóxica, siempre que se tome en cuenta la cantidad de proteína inyectada. Pero el suero, al estar más concentrado, presenta una mejor neutralización basándose en el volumen inyectado. Por otro lado, hay que considerar que el suero PoliVal-ICP también neutraliza otras actividades importantes en el tratamiento por envenenamiento ofídico, como la defibrinogenante y hemorrágica, que no son neutralizadas por estos inhibidores.

Anexos

Anexo 1. Tiempos de elución (min) de los picos del cromatograma de RP-HPLC de la Fig. 2.

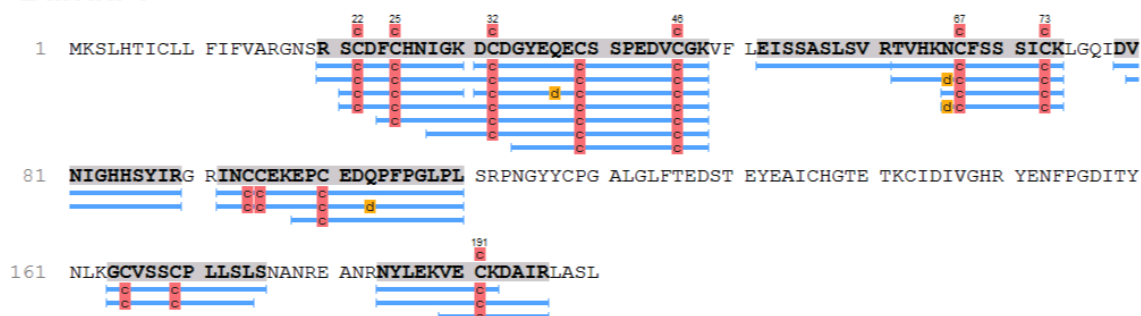
Pico	Tiempo de elución (min)
A	49.491
B	55.604
C	61.160
D	62.335
E	65.154

Anexo 2. Tiempos de elución (min) de las fracciones del cromatograma de RP-HPLC de la Fig. 3.

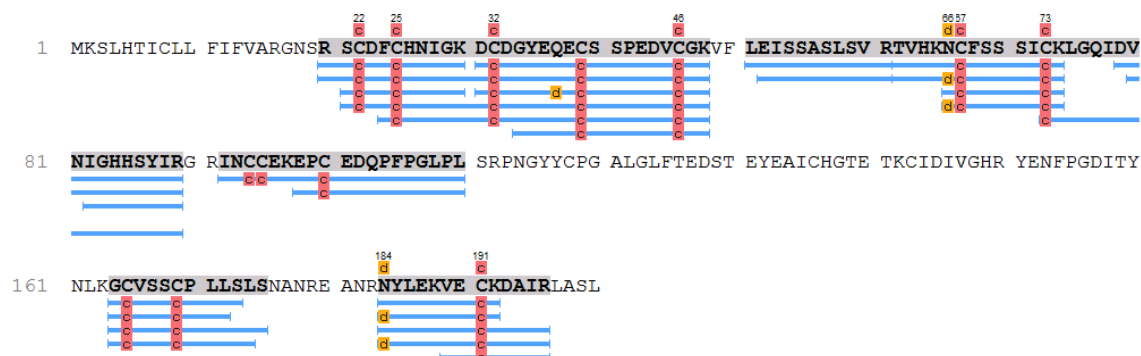
Fracción	Tiempo de elución (min)	Fracción	Tiempo de elución (min)
A	28.517	N	72.8
B	29.117	O	74.026
C	30.7	P	76.9
D	32.4	Q	78.178
E	35	R	78.866
F	36.805	S	79.549
G	37.814	T	80.153
H	61.056	U	80.407
I	61.838	V	80.637
J	62.304	W	81.203
K	63.554	X	81.588 y 81.775
L	71.158	Y	83.439 y 83.72
M	72.121		

Anexo 3. Identificación de péptidos a partir de las bandas del inserto de la Fig. 6. Los péptidos identificados están representados por líneas celestes. El resaltado gris representa la secuencia que estos péptidos cubren de la secuencia de referencia. Las letras c, d y o indican presencia de carbamidometilación, deamidación y oxidación, respectivamente.

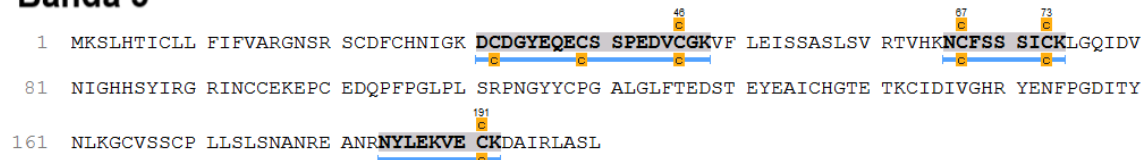
Banda 1



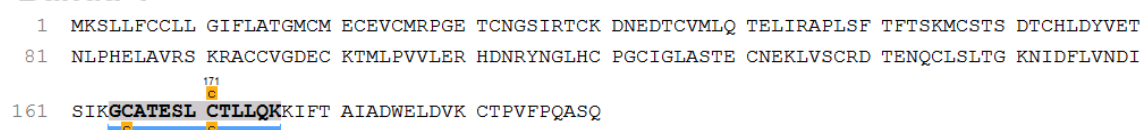
Banda 2



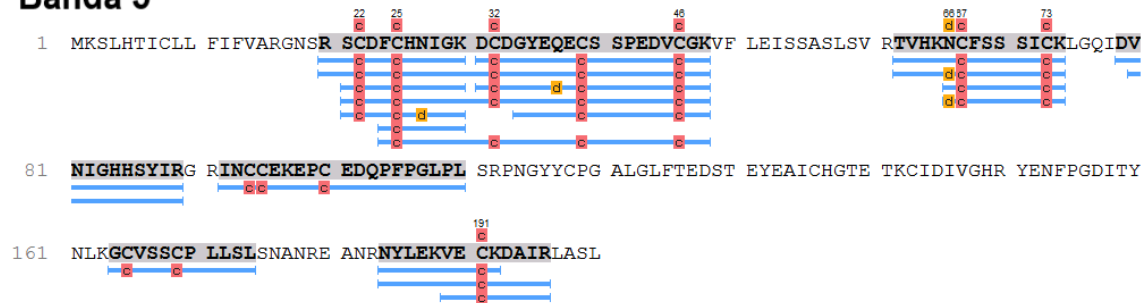
Banda 3



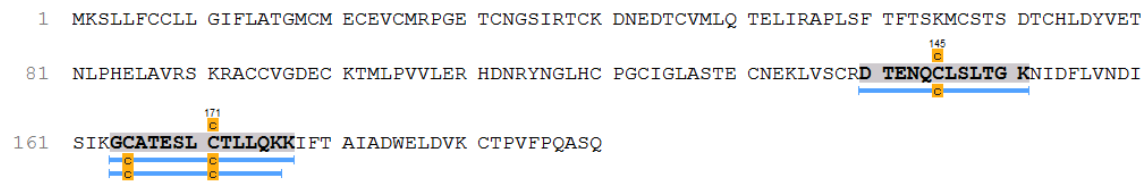
Banda 4



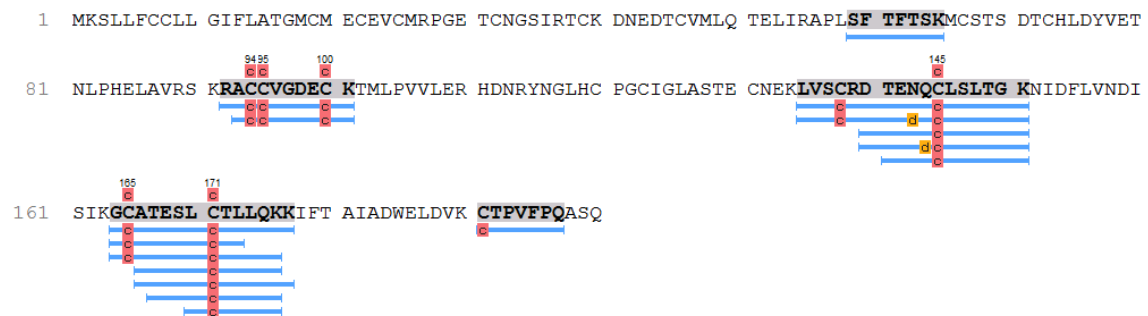
Banda 5



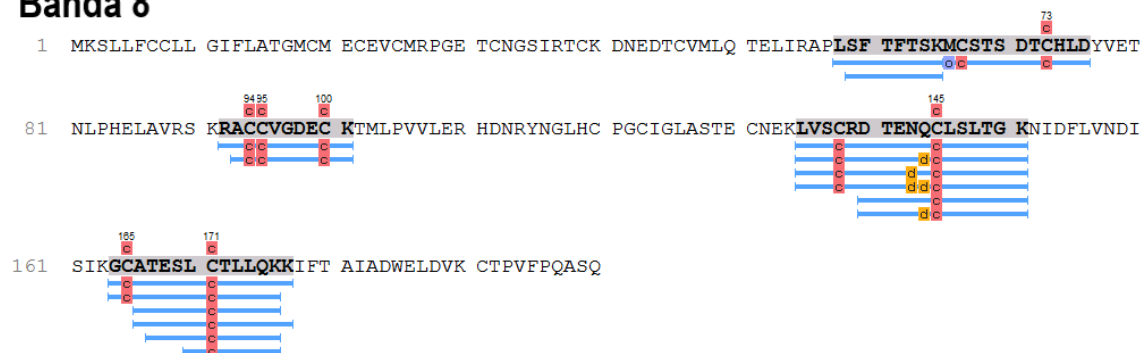
Banda 6



Banda 7



Banda 8



Bibliografía

1. Uetz P, Etzold T. 1996. The EMBL/EBI Reptile Database. *Herpetol Rev* 27(4):174–175.
2. Sasa M, Vázquez S. 2003. Snakebite envenomation in Costa Rica: a revision of incidence in the decade 1990-2000. *Toxicon* 41:19–22.
3. Fernández P, Gutiérrez JM. 2008. Mortality due to snakebite envenomation in Costa Rica (1993–2006). *Toxicon* 52:530–533.
4. Mackessy SP. 2008. Venom Composition in Rattlesnakes: Trends and Biological Significance, p 495–510. *In* Hayes WK, Beaman KR, Cardwell MD, Bush SP (ed), *The Biology of Rattlesnakes*. Loma Linda University Press, Loma Linda, California.
5. Mackessy SP. 2010. The field of reptile toxinology: snakes, lizards and their venoms, p 3–23. *In* Mackessy SP (ed), *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. CRC Press/Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida.
6. Calvete JJ, Sanz L, Cid P, de la Torre P, Flores-Díaz M, Dos Santos MC, Borges A, Bremo A, Angulo Y, Lomonte B, Alape-Girón A, Gutiérrez JM. 2010. Snake Venomics of the Central American Rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* Complex Points to Neurotoxicity as an Adaptive Paedomorphic Trend along *Crotalus* Dispersal in South America. *J Proteom Res* 9:528–544.
7. Gutiérrez JM, Dos Santos MC, De Fatima Furtado M, Rojas G. 1991. Biochemical and pharmacological similarities between the venoms of newborn *Crotalus durissus durissus* and adult *Crotalus durissus terrificus* rattlesnakes. *Toxicon* 29(10):1273–1277.

8. Saravia P, Rojas E, Arce V, Guevara C, López JC, Chaves E, Velásquez R, Rojas G, Gutiérrez JM. 2002. Geographic and ontogenetic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: Pathophysiological and therapeutic implications. *Rev Biol Trop* 50(1):337–346.
9. de Souza LL, Stransky S, Guerra-Duarte C, Flor-Sá A, Schneider FS, Kalapothakis E, Chávez-Olórtegui C. 2015. Determination of Toxic Activities in *Bothrops* spp. Snake Venoms Using Animal-Free Approaches: Correlation Between *In Vitro* Versus *In Vivo* Assays. *Toxicol Sci* 147(2):458–465. doi: 10.1093/toxsci/kfv140
10. Herrera C, Escalante T, Voisin M-B, Rucavado A, Morazán D, Macêdo JKA, Calvete JJ, Sanz L, Nourshargh S, Gutiérrez JM, Fox JW. 2015. Tissue Localization and Extracellular Matrix Degradation by PI, PII and PIII Snake Venom Metalloproteinases: Clues on the Mechanisms of Venom-Induced Hemorrhage. *PLoS Negl Trop Dis* 9(4):e0003731. doi:10.1371/journal.pntd.0003731
11. Herrera C, Voisin M-B, Escalante T, Rucavado A, Nourshargh S, Gutiérrez JM. 2016. Effects of PI and PIII Snake Venom Haemorrhagic Metalloproteinases on the Microvasculature: A Confocal Microscopy Study on the Mouse Cremaster Muscle. *PLoS One* 11(12): e0168643. doi: 10.1371/journal.pone.0168643
12. Matsui T, Fujimura Y, Titani K. 2000. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim Biophys Acta* 1477:146–156. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00268-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00268-X)
13. Serrano SMT, Maroun RC. 2005. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon* 45:1115–1132.

14. Kisiel W, Kondo S, Smith KJ, McMullen BA, Smith LF. 1987. Characterization of a protein C activator from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. *J Biol Chem* 262:12607–12613.
15. Stocker K, Fischer H, Meier J, Brogli M, Svendsen L. 1987. Characterization of the protein C activator Protac from the venom of the southern copperhead (*Agkistrodon contortrix*) snake. *Toxicon* 25:239–252.
16. Fox JW, Serrano SMT. 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 45:969–985.
17. Loria GD, Rucavado A, Kamiguti AS, Theakston RD, Fox JW, Alape A, Gutierrez JM. 2003. Characterization of 'basparin A,' a prothrombin activating metalloproteinase, from the venom of the snake *Bothrops asper* that inhibits platelet aggregation and induces defibrination and thrombosis. *Arch Biochem Biophys* 418:13–24.
18. Swenson S, Markland Jr. FS. 2005. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. *Toxicon* 45:1021–1039.
19. Hendon RA, Fraenkel-Conrat H. 1971. Biological Roles of the Two Components of Crotoxin. *Proc Nat Acad Sci* 68(7):1560–1563.
20. Rübtsamen K, Breithaupt H, Habermann E. 1971. Biochemistry and Pharmacology of the Crotoxin Complex. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 270:274–278.
21. Bon C. 1982. Synergism of the two subunits of crotoxin. *Toxicon* 20:105–109.

22. Faure G, Xu H, Saul FA. 2011. Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric beta-neurotoxin. *J Mol Biol* 412:176–191.
23. Brazil OV. 1966. Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. *Mem Inst Butantan* 33:981–992.
24. Chang CC, Lee JD. 1977. Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venom, is a presynaptic toxin acting like betabungarotoxin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 296:159–168.
25. Delot E, Bon C. 1993. Model for the interaction of crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin, with presynaptic membranes. *Biochemistry* 32:10708–10713.
26. Bon C, Changeux JP, Jeng TW, Fraenkel-Conrat H. 1979. Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. *Eur J Biochem* 99:471–481.
27. Brazil OV, Fontana MD, Heluany NF. 2000. Nature of the postsynaptic action of crotoxin at guinea-pig diaphragm end-plates. *J Nat Toxins* 9:33–42.
28. Santos PE, Souza SD, Freire-Maia L, Almeida AP. 1990. Effects of crotoxin on the isolated guinea pig heart. *Toxicon* 28:215–224.
29. Kouyoumdjian JA, Harris JB, Johnson MA. 1986. Muscle necrosis caused by the sub-units of crotoxin. *Toxicon* 24:575–583.
30. Salvini TF, Amaral AC, Miyabara EH, Turri JAO, Danella PM, de Araújo HS. 2001. Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. *Toxicon* 39:1141–1149.
31. Melo PA, Burns CF, Blankemeyer JT, Ownby CL. 2004. Membrane depolarization is the initial action of crotoxin on isolated murine skeletal muscle. *Toxicon* 43:111–119.

32. Monteiro HS, da Silva IM, Martins AM, Fonteles MC. 2001. Actions of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat kidney. *Braz J Med Biol Res* 34:1347–1352.
33. World Health Organization (WHO). 2018. WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. Ginebra, Suiza. Replacement of Annex 2 of WHO Technical Report Series, No. 964, p. 203, 316–324. Recuperado de: https://www.who.int/bloodproducts/snake_antivenoms/snakeantivenomguide/en/ (accedido el 13 de noviembre, 2019).
34. Gutiérrez JM, Rojas E, Quesada L, León G, Núñez J, Laing GD, Sasa M, Renjifo JM, Nasidi A, Warrell DA, Theakston RDG, Rojas G. 2005. Pan-African polyspecific antivenom produced by caprylic acid purification of horse IgG: an alternative to the antivenom crisis in Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 99:468–475.
35. Lalloo DG, Theakston RDG. 2003. Snake antivenoms. *J Toxicol Clin Toxicol* 41(3):277–290.
36. Beghini DG, Hernández-Oliveira S, Rodrigues-Simioni L, Novello JC, Hyslop S, Marangoni S. 2004. Anti-sera raised in rabbits against crotoxin and phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* venom neutralize the neurotoxicity of the venom and crotoxin. *Toxicon* 44:141–148.
37. Herrera M, León G, Segura A, Meneses F, Lomonte B, Chippaux JP, Gutiérrez JM. 2005. Factors associated with adverse reactions induced by caprylic acid-fractionated whole IgG preparations: comparison between horse, sheep and camel IgGs. *Toxicon* 46:775–81.

38. Fernández GP, Segura A, Herrera M, Velasco W, Solano G, Gutiérrez JM, León G. 2010. Neutralization of *Bothrops mattogrossensis* snake venom from Bolivia: Experimental evaluation of llama and donkey antivenoms produced by caprylic acid precipitation. *Toxicon* 55:642–645.
39. Gutiérrez JM, León G, Lomonte B, Angulo Y. 2011. Antivenoms for snakebite envenomings. *Inflamm Allergy Drug Targets* 10(5):369–380.
40. Arroyo C, Solano S, Herrera M, Segura A, Estrada R, Vargas M, Villalta M, Gutiérrez JM, León G. 2015. *Lachesis stenophrys* reduces the equine antibody response towards *Bothrops asper* venom used as co-immunogen in the production of polyspecific snake antivenom. *Toxicon* 103:99–105.
41. León G, Monge M, Rojas E, Lomonte B, Gutiérrez JM. 2001. Comparison between IgG and F(ab')₂ polyvalent antivenoms: neutralization of systemic effects produced by *Bothrops asper* venom in mice, extravasation to muscle tissue, and potential for induction of adverse reactions. *Toxicon* 39:793–801.
42. Al-Abdulla I, Garnvwa JM, Rawat S, Smith DS, Landon J, Nasidi A. 2003. Formulation of a liquid ovine Fab-based antivenom for the treatment of envenomation by the Nigerian carpet viper (*Echis ocellatus*). *Toxicon* 42:399–404.
43. Fernandes I, Assumpção GG, Silveira CRF, Faquim-Mauro EL, Tanjoni I, Carmona AK, Alves MFM, Takehara HA, Rucavado A, Ramos OHP, Moura-da-Silva AM, Gutiérrez JM. 2010. Immunochemical and biological characterization of monoclonal antibodies against BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 56:1059–1065.
44. Mackesy SP, Baxter LM. 2006. Bioweapons synthesis and storage: The venom gland of front-fanged snakes. *Zool Anz* 245:147–159.

45. Francis B, Seebart C, Kaiser II. 1992. Citrate is an endogenous inhibitor of snake venom enzymes by metal-ion chelation. *Toxicon* 30(10):1239–1246.
46. Odell GV, Ferry PC, Vick LM, Fenton AW, Decker LS, Cowell RL, Ownby CL, Gutiérrez JM. 1998. Citrate inhibition of snake venom proteases. *Toxicon* 36(12):1801–1806.
47. Robeva A, Politi V, Shannon JD, Bjarnason JB, Fox JW. 1991. Synthetic and endogenous inhibitors of snake venom metalloproteinases. *Biomed Biochim Acta* 50(4-6):769–773.
48. Huang KF, Hung CC, Wu SH, Chiou SH. 1998. Characterization of Three Endogenous Peptide Inhibitors for Multiple Metalloproteinases with Fibrinolytic Activity from the Venom of Taiwan Habu (*Trimeresurus mucrosquamatus*). *Biochem Biophys Res Commun* 248:562–568.
49. Munekiyo SM, Mackessy SP. 2005. Presence of peptide inhibitors in rattlesnake venoms and their effects on endogenous metalloproteinases. *Toxicon* 45:255–263.
50. Wagstaff SC, Favreau P, Cheneval O, Laing GD, Wilkinson MC, Miller RL, Stöcklin R, Harrison RA. 2008. Molecular characterisation of endogenous snake venom metalloproteinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 365:650–656
51. Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE. 1990. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: Evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci USA* (87):364–368.
52. Hite LA, Shannon JD, Bjarnason JB, Fox JW. 1992. Sequence of a cDNA Clone Encoding the Zinc Metalloproteinase Hemorrhagic Toxin e from *Crotalus atrox*:

- Evidence for Signal, Zymogen, and Disintegrin-like Structures. *Biochemistry* 31:6203–6211.
53. Grams F, Huber R, Kress LF, Moroder L, Bode W. 1993. Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. *FEBS Lett* 335(1):76–80.
54. Servent D, Mourier G, Antil S, Ménez A. 1998. How do snake curaremimetic toxins discriminate between nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Toxicol Lett* 102-103:199–203.
55. Takacs Z, Wilhelmsen KC, Sorota S. 2001. Snake α -neurotoxin binding site on the Egyptian cobra (*Naja haje*) nicotinic acetylcholine receptor is conserved. *Mol Biol Evol* 18(9):1800–1809.
56. Omori-Satoh T, Sadahiro S, Ohsaka A, Murata R. 1972. Purification and characterization of an antihemorrhagic factor in the serum of *Trimeresurus flavoviridis*, a crotalid. *Biochim Biophys Acta* 285:414–426.
57. Straight R, Glenn JL, Snyder CC. 1976. Antivenom activity of rattlesnake blood plasma. *Nature* 261:259–260.
58. Faure G. 2000. Natural inhibitors of toxic phospholipases A₂. *Biochimie* 82:833–840.
59. Perales J, Neves-Ferreira AGC, Valente RH, Domont GB. 2005. Natural inhibitors of snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *Toxicon* 45:1013–1020.
60. Okumura K, Masui K, Inoue S, Ikeda K, Hayashi K. 1999. Purification, characterization and cDNA cloning of a phospholipase A₂ inhibitor from the serum of the non-venomous snake *Elaphe quadrivirgata*. *Biochem J* 341:165–171.

61. Gomes CM, de Moraes-Zani K, Lu S, de Souza Buarque D, Braz GRC, Grego KF, Tanaka AS, Tanaka-Azevedo AM. 2017. Differential transcript profile of inhibitors with potential anti-venom role in the liver of juvenile and adult *Bothrops jararaca* snake. PeerJ 5:e3203. DOI 10.7717/peerj.3203
62. Junqueira-de-Azevedo ILM, Ching ATC, Carvalho E, Faria F, Nishiyama Jr. MY, Ho PL, Diniz MRV. 2006. *Lachesis muta* (Viperidae) cDNAs reveal diverging pit viper molecules and scaffolds typical of cobra (Elapidae) venoms: Implications for snake toxin repertoire evolution. Genetics 173:877–889.
63. Lima RM, Estevão-Costa MI, Junqueira-de-Azevedo ILM, Ho PL, Diniz MRV, Fortes-Dias CL. 2011. Phospholipase A₂ inhibitors (β PLIs) are encoded in the venom glands of *Lachesis muta* (Crotalinae, Viperidae) snakes. Toxicon 57:172–175.
64. Bastos VA, Gomes-Neto F, Perales J, Neves-Ferreira AGC, Valente RH. 2016. Natural inhibitors of snake venom metallopeptidases: History and Current Challenges. Toxins 8(9):250. doi:10.3390/toxins8090250
65. Kinkawa K, Shirai R, Watanabe S, Toriba M, Hayashi K, Ikeda K, Inoue S. 2010. Up-regulation of the expressions of phospholipase A₂ inhibitors in the liver of a venomous snake by its own venom phospholipase A₂. Biochem Biophys Res Commun 395:377–381. doi:10.1016/j.bbrc.2010.04.024
66. Ohkura N, Okuhara H, Inoue S, Ikeda K, Hayashi K. 1997. Purification and characterization of three distinct types of phospholipase A₂ inhibitors from the blood plasma of the Chinese mamushi, *Agkistrodon blomhoffii siniticus*, Biochem J 325:527–531.

67. Lizano S, Lomonte B, Fox JW, Gutiérrez JM. 1997. Biochemical characterization and pharmacological properties of a phospholipase A₂ myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Bothrops asper*. *Biochem J* 326:853–859.
68. Lizano S, Angulo Y, Lomonte B, Fox JW, Lambeau G, Lazdunski M, Gutiérrez JM. Two phospholipase A₂ inhibitors from the plasma of *Cerrophidion (Bothrops) godmani* which selectively inhibit two different group-II phospholipase A₂ myotoxins from its own venom: isolation, molecular cloning and biological properties. *Biochem J* 346:631–639.
69. Okumura K, Inoue S, Ikeda K, Hayashi K. 2002. Identification of β -type phospholipase A₂ inhibitor in a nonvenomous snake, *Elaphe quadrivirgata*. *Arch Biochem Biophys* 408:124–130.
70. Shirai R, Michihisa T, Hayashi K, Ikeda K, Inoue S. 2009. Identification and characterization of phospholipase A₂ inhibitors from the serum of the Japanese rat snake, *Elaphe climacophora*. *Toxicon* 53:685–692.
71. Domont GB, Perales J, Moussatché H. 1991. Natural anti-snake venom proteins. *Toxicon* 29:1183–1194.
72. Thwin MM, Gopalakrishnakone P. 1998. Snake envenomation and protective natural endogenous proteins: a mini review of the recent developments (1991–1997). *Toxicon* 36:1471–1482.
73. Borkow G, Gutiérrez JM, Ovadia M. 1994. A potent antihemorrhagin in the serum of the non-poisonous water snake *Natrix tessellata*: isolation, characterization and mechanism of neutralization. *Biochim Biophys Acta* 1201:482–490.
74. Fortes-Dias CL, Lin Y, Ewell J, Diniz CR, Liu TY. 1994. A phospholipase A₂ inhibitor from the plasma of the South American Rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *J Biol Chem* 269(22):15646–15651.

75. Soares AM, Marcussi S, Stábeli RG, França SC, Giglio JR, Ward RJ, Arantes EC. 2003. Structural and functional analysis of BmjMIP, a phospholipase A₂ myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 302:193–200.
76. Oliveira CZ, Menaldo DL, Marcussi S, Santos-Filho NA, Silveira LB, Boldrini-França J, Rodrigues VM, Soares AM. 2008. An α -type phospholipase A₂ inhibitor from *Bothrops jararacussu* snake plasma: Structural and functional characterization. *Biochimie* 90:1506–1514.
77. Gimenes SNC, Ferreira FB, Silveira ACP, Rodrigues RS, Yoneyama KAG, dos Santos JI, Fontes MCdM, Brites VLdC, Santos ALQ, Borges MH, Lopes DS, Rodrigues VM. 2014. Isolation and biochemical characterization of a γ -type phospholipase A₂ inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* snake serum. *Toxicon* 81:58–66.
78. de Silva HA, Ryan NM, de Silva HJ. 2015. Adverse reactions to snake antivenom, and their prevention and treatment. *Br J Clin Pharmacol* 81(3):446–452. DOI:10.1111/bcp.12739
79. Stone SF, Isbister GK, Shahmy S, Mohamed F, Abeysinghe C, Karunathilake H, Ariaratnam A, Jacoby-Alner TE, Cotterell CL, Brown SGA. 2013. Immune Response to Snake Envenoming and Treatment with Antivenom; Complement Activation, Cytokine Production and Mast Cell Degranulation. *PLoS Negl Trop Dis* 7(7):e2326. doi:10.1371/journal.pntd.0002326
80. Morais VM, Massaldi H. 2009. Snake antivenoms: adverse reactions and production technology. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 15(1):2–18.

81. Borkow G, Gutiérrez JM, Ovadia M. 1995. Isolation, characterization and mode of neutralization of a potent antihemorrhagic factor from the serum of the snake *Bothrops asper*. *Biochim Biophys Acta* 1245:232–238.
82. Lomonte B, Escolano J, Fernández J, Sanz L, Angulo Y, Gutiérrez JM, Calvete JJ. 2008. Snake Venomics and Antivenomics of the Arboreal Neotropical Pitvipers *Bothriechis lateralis* and *Bothriechis schlegelii*. *J Proteom Res* 7:2445–2457. doi:10.1021/pr8000139
83. Allender MC, Mitchell MA, Phillips CA, Gruszynski K, Beasley VR. 2006. Hematology, plasma biochemistry, and antibodies to select viruses in wild-caught eastern massasauga rattlesnakes (*Sistrurus catenatus catenatus*) from Illinois. *J Wild Dis* 42 (1):107-114.
84. Lomonte B. 2004. Manual de laboratorio de Inmunología General. Universidad de Costa Rica, p. 31-37.
85. Alfaro-Chinchilla A, Segura A, Gómez A, Díaz C, Corrales G, Chacón D, Arguedas M, Estrada R, Gutiérrez JM, León G. 2021. Expanding the neutralization scope of the Central American antivenom (PoliVal-ICP) to include the venom of *Crotalus durissus pifanorum*. *J Proteomics*, 246, 104315.
86. Segura A, Herrera M, Mares FR, Jaime C, Sánchez A, Vargas M, Villalta M, Gómez A, Gutiérrez JM, León G. 2017. Proteomic, toxicological and immunogenic characterization of Mexican west-coast rattlesnake (*Crotalus basiliscus*) venom and its immunological relatedness with the venom of Central American rattlesnake (*Crotalus simus*). *J Proteomics* 158:62–72.
87. Gutiérrez JM, Solano G, Pla D, Herrera M, Segura A, Vargas M, Villalta M, Sánchez A, Sanz L, Lomonte B, León G, Calvete JJ. 2017. Preclinical evaluation

of the efficacy of antivenoms for snakebite envenoming: State-of-the-art and challenges ahead. *Toxins* 9:163. doi:10.3390/toxins9050163

88. Rojas E, Quesada L, Arce V, Lomonte B, Rojas G, Gutiérrez JM. 2005. Neutralization of four Peruvian *Bothrops* sp snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Perú and Costa Rica: preclinical assessment. *Acta Trop* 93(1):85–95.
89. Solano G, Segura A, Herrera M, Gómez A, Villalta M, Gutiérrez JM, León G. 2010. Study of the design and analytical properties of the lethality neutralization assay used to estimate antivenom potency against *Bothrops asper* snake venom. *Biologicals* 38:577–585.
90. Gómez A, Solano G, Chang-Castillo A, Chacón D, Corrales G, Segura A, Estrada R, León G. 2021. Intraspecific variability of the Central American rattlesnake (*Crotalus simus*) venom and its usefulness to obtain a representative standard venom. *Toxicon* 202:20–26. doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.09.006>
91. Finney DJ. 1971. *Probit Analysis*. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
92. Morais V, Ifran S, Berasain P, Massaldi H. 2010. Antivenoms: potency or median effective dose, which to use? *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 16(2): 191–193.
93. Gutiérrez JM, Gené JA, Rojas G, Cerdas L. 1985. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 23(6):887–893.
94. Gené JA, Roy A, Rojas G, Gutiérrez JM, Cerdas L. 1989. Comparative study on the coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa

- Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 27:841–848.
95. Holzer M, Mackessy SP. 1996. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. *Toxicon* 34:1149–1155.
96. Dole VP. 1956. A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. *J Clin Invest* 35:150–154.
97. Wang WJ, Shih CH, Huang TF. 2004. A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkilysin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Biochem Biophys Res Commun* 324:224–230.
98. Segura A, Herrera M, Villalta M, Vargas M, Gutiérrez JM, León G. 2012. Assessment of snake antivenom purity by comparing physicochemical and immunochemical methods. *Biologicals* 41(2):93–97. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.11.001>
99. Neri-Castro E, Lomonte B, Gutiérrez MdC, Alagón A, Gutiérrez JM. 2010. Intraspecies variation in the venom of the rattlesnake *Crotalus simus* from Mexico: Different expression of crotoxin results in highly variable toxicity in the venoms of three subspecies. *J Proteomics* 87:103–121.
100. Neri-Castro E, Hernández-Dávila A, Olvera-Rodríguez A, Cardoso-Torres H, Bénard-Valle M, Bastiaans E, López-Gutiérrez O, Alagón A. 2019. Detection and quantification of β -neurotoxin (crotoxin homologs) in the venom of the rattlesnakes *Crotalus simus*, *C. culminatus* and *C. tzabcan* from Mexico. *Toxicon X* 2:100007. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2019.100007>
101. Davies EL, Arbuckle K. Coevolution of Snake Venom Toxic Activities and Diet: Evidence that Ecological Generalism Favours Toxicological Diversity. *Toxins* 11:711. doi: [10.3390/toxins11120711](https://doi.org/10.3390/toxins11120711)

102. Bernardoni JL, Sousa LF, Wermelinger LS, Lopes AS, Prezoto BC, Serrano SM, Zingali RB, Moura-da-Silva AM. 2014. Functional variability of snake venom metalloproteinases: adaptive advantages in targeting different prey and implications for human envenomation. *PLoS One* 9(10):e109651.
103. Castro AC, Escalante T, Rucavado A, Gutiérrez JM. 2021. Basement membrane degradation and inflammation play a role in the pulmonary hemorrhage induced by a P-III snake venom metalloproteinase. *Toxicon* 197:12–23. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.04.012>
104. Brand GD, Salbo R, Jørgensen TJD, Bloch Jr C, Erba EB, Robinson CV, Tanjoni I, Moura-da-Silva AM, Roepstorff P, Domont GB, Perales J, Valente RH, Never-Ferreira AGC. 2012. The interaction of the antitoxin DM43 with a snake venom metalloproteinase analyzed by mass spectrometry and surface plasmon resonance. *J Mass Spectrom* 47:567–576.
105. Kini RM, Evans HJ. 1987. Structure-function relationships of phospholipases. The anticoagulant region of phospholipases A₂. *J Biol Chem* 262(30):14402–14407. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)47808-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47808-8)
106. Sajevic T, Leonardi A, Krizaj I. 2011. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon* 57(7):627–645. doi: [10.1016/j.toxicon.2011.01.006](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.01.006)
107. Nielsen VG. 2019. Carbon monoxide inhibits the anticoagulant activity of phospholipase A₂ from *Crotalus adamanteus* venom. *J Thromb Thrombolysis* 47:73–79. doi: <https://doi.org/10.1007/s11239-018-1763-6>
108. Zelanis A, Tashima AK, Rocha MMT, Furtado MF, Camargo ACM, Ho PL, Serrano SMT. 2010. Analysis of Ontogenetic Variation in the Venom Proteome/Peptidome of *Bothrops jararaca* Reveals Different Strategies to Deal with Prey. *J Proteome Res* 9:2278–2291. doi: <https://doi.org/10.1021/pr901027r>

109. Gutiérrez JM, Ávila C, Rojas E, Cerdas L. 1988. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon* 26(4):411–413.