

Universidad del Valle de Guatemala

Facultad de Ciencias y Humanidades



Evaluación de composición proteica del veneno de *Bothrops asper* y determinación de posibles efectos diferenciales en la terapia de suero antiofídico para regiones norte y sur en Guatemala.

Trabajo de graduación presentado por

Daniel Fernando Reyes Enríquez

para optar al grado académico de Licenciado en Biotecnología Molecular

Guatemala

2022

Evaluación de composición proteica del veneno de *Bothrops asper*
y determinación de posibles efectos diferenciales en la terapia de
suero antiofídico para regiones norte y sur en Guatemala.

Universidad del Valle de Guatemala

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Bioquímica y Microbiología



Evaluación de composición proteica del veneno de *Bothrops asper* y determinación de posibles efectos diferenciales en la terapia de suero antiofídico para regiones norte y sur en Guatemala.

Trabajo de graduación presentado por

Daniel Fernando Reyes Enríquez

para optar al grado académico de Licenciado en Biotecnología Molecular

Guatemala

2022

Vo. Bo.

(f)



(PhD. Luis Diego Archila Diaz)

Tribunal Examinador

(f)



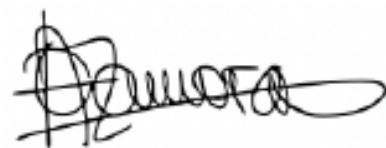
(M.Sc. José Miguel Morales Santiago)

(f)



(M.Sc. Jorge Eduardo Chang Estrada)

(f)



(PhD. Olga Alejandra Zamora Jerez)

Fecha de aprobación: 7 diciembre Guatemala de 2022.

PREFACIO

Durante este proyecto el mayor aprendizaje que tuve ha sido como las relaciones interpersonales y un interés en común por descubrir, entender y comprobar cómo funcionan los sistemas que nos rodean, son capaces de permitirnos avanzar como comunidad científica hacia un futuro con menor desigualdad.

Estoy perpetuamente agradecido con Msc. Jorge Chang y Msc. Miguel Morales por haberme ayudado desde los inicios del planteamiento del proyecto y en cada paso hasta este punto final. Con PhD. Alejandra Zamora estoy igualmente agradecido desde el momento en el que me permitió apoyar con el bioterio de salamandras y ranas de la universidad. Lugar en donde desde 2019 empecé a interesarme por orientar mi carrera hacia ramas de la biología. Con PhD. Diego Archila estoy agradecido por su calidad como director de carrera, catedrático e investigador, ya que desde la primera instancia en la que pudimos conversar me sentí en confianza de que sería apoyado a lo largo de todo el trabajo y siempre tendría un lugar al cual poder acudir con dudas.

Si bien quisiera poder dedicar páginas completas de agradecimientos a todas las personas que me apoyaron durante el proceso quiero al menos dejar por nombre a las personas que fueron fundamentales en mi experiencia en la universidad y a quienes les debo gran parte de la persona en la que me he convertido.

Lic. Priscila Juárez, por creer en mi y apoyarme desde el curso de Diseño e Innovación para el Desarrollo. Y darme ánimos durante los puntos más difíciles del trabajo de laboratorio.

Lic. Zabdi López, por ayudarme a comprender uno de los temas que más me ha fascinado en la ciencia y proveer incontables recursos de literatura que hicieron posible conectar varios puntos de este trabajo.

PhD. Krisztina Rios, por su apoyo con todo el trabajo relacionado a proteínas y enzimas.

Msc. Ana Lucia Dubón, por su apoyo con conocimientos de biología celular y técnicas de laboratorio que fueron fundamentales para esta investigación.

Msc. Elizabeth Solorzano, por su apoyo como catedrática a lo largo de proyectos de bioinformática y trabajos fuera del curso que ayudaron a proporcionar un entendimiento mas profundo de este proyecto.

Msc. Augusto Franco, por su ayuda como mentor en investigación.

PhD. José Juárez (Willy), por su apoyo en aspectos clave del mundo de la investigación científica y organización.

Msc. Daniel Ariano, por la ayuda con la extracción de veneno de *B. asper*.

Carlos Patzán, por su ayuda como mentor en el campo de la herpetología e invaluable ayuda a lo largo del proyecto.

Danny Mazariegos, por permitir acceso al Centro de Rescate Antigua Exotic y ayudar en la colecta de muestras de veneno de *B. asper*.

Roland Griffin, por su ayuda durante los procesos de extracción de veneno en el Parque Zoológico la Aurora.

A mis amistades durante la universidad que me ayudaron a crecer como persona y a formar de los recuerdos más valiosos que atesoro: Freddy Vásquez, Luz Osorio, Mori, Daniel Gygax, Mila y Glenda.

Finalmente, agradezco a las personas que han hecho todo esto posible, mis padres, Erick Reyes y Mirza Enríquez. Mis hermanos, Orlando Reyes y Gracie Reyes. Y mi abuela, Graciela.

<<Nada es demasiado maravilloso para ser cierto si obedece a las leyes de la naturaleza.>>

Michael Faraday

CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	JUSTIFICACIÓN.....	3
III.	OBJETIVOS.....	5
	A. Principal 5	
	B. Específicos.....	5
IV.	HIPÓTESIS	6
V.	MARCO TEÓRICO	7
	A. Ecología de <i>Bothrops asper</i>	7
	B. Biogeografía de <i>Bothrops asper</i>	8
	C. Veneno de <i>Bothrops asper</i>	16
	D. Contexto epidemiológico.....	20
	E. Aspectos clínicos	21
VI.	METODOLOGÍA.....	25
	A. Bioética del estudio	25
	B. Extracción de veneno.....	25
	C. Conservación de veneno.....	26
	D. Cuantificación de proteínas por método de Bradford.....	26
	E. Ensayo SDS Page	27
	F. Ensayo de hemólisis libre en sangre.....	29
	G. Ensayo de inmunodifusión	30
VII.	RESULTADOS	31

A. Concentración proteica de muestras de veneno estimada por ensayo Bradford.....	31
B. Ensayo de SDS Page	32
C. Ensayo comparativo de hemólisis libre en sangre.....	37
D. Ensayo de inmunodifusión	38
VIII. DISCUSIÓN	41
A. Ensayo Bradford	41
B. Ensayo SDS Page	41
C. Ensayo de hemólisis	44
D. Ensayos de inmunodifusión.....	45
E. Hipótesis sobre cambio en la composición del veneno	46
F. Recomendaciones	47
IX. CONCLUSIONES.....	49
IV. LITERATURA CITADA	50
X. ANEXOS	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Filogenética del género <i>Bothrops</i>	10
Figura 2. Reconstrucción de la distribución de asociaciones de bosques neotropicales de tierras bajas en el Último Máximo Glacial (hace 18,000 años).	12
Figura 3. Distribución de <i>Bothrops asper</i> en Centroamérica y Sudamérica.....	14
Figura 4. Principales cadenas montañosas de Guatemala.....	15
Figura 5. A. Paciente de 12 años, presento envenenamiento leve localizado en la mordedura, 12 horas después de la mordedura no presento más síntomas. B. Paciente de 30 años presentó inflamación extensa fuera de la extremidad afectada, varias ampollas, necrosis local, sangrado vaginal y sangre incoagulable. 24 horas después de la mordedura la paciente presento falla renal aguda. C. Paciente de 2 años fue mordido en 3 ocasiones en la pierna por una <i>B. asper</i> , 12 horas previas a ser ingresado a un centro hospitalario. Presento inflamación local en los 3 segmentos de las mordeduras, y formación ampollas, al igual que necrosis localizada. El paciente no era capaz mover los dígitos del pie, lo que sugiere síndrome compartimental. También se presentó sangre incoagulable, esto asociado a la falla renal aguda. El miembro fue amputado. D. Paciente de 12 años se presentó al centro médico 36 horas luego de la mordedura, inicialmente fue tratado con medicina tradicional. Presento síndrome compartimental, ampollas y necrosis en la piel. La inflamación afecta a 3 segmentos de la extremidad. El paciente presento necrosis tubular y fallo renal agudo, al igual que sangre incoagulable y neumonía. La extremidad fue amputada.	23
Figura 6. Curva estándar de calibración para el ensayo Bradford.	27
Figura 7. Patrón de bandas generado a partir de gel de SDS, el eje x comprende cada uno de los pozos con muestras siendo el orden de muestras según el código del Cuadro 7 el siguiente: (1-N1), (2-N2), (3-N3), (4-N4), (5-N5), (6-Escalera), (7-S1), (7-S2), (7-S3) y (7-S4). El eje y comprende el peso molecular en relación con la distancia recorrida por la escalera molecular. El orden de etiquetado de los grupos de proteínas corresponde al orden	

conforme se fueron visualizando las bandas en el software y no tiene relación con el peso molecular de la banda.33

Figura 8. Actividad hemolítica observada en muestras de sangre bovina desfibrinada para una mezcla de veneno de los individuos del sur y de norte. En contraste con un control positivo de Fosfolipasa A2 a una concentración de 300 ug.....37

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Tiempos de divergencia estimados en millones de años, area ancestral y eventos putativos para la evolución de clados de <i>Bothrops</i>	13
Cuadro 2. Familiar proteicas y toxinas específicas del veneno de <i>Bothrops asper</i>	18
Cuadro 3. Efectos locales y sistemáticos asociados a la gravedad del envenenamiento de <i>Bothrops asper</i>	22
Cuadro 4. Preparación del tampón de corrida.....	27
Cuadro 5. Preparación del gel de resolución.....	28
Cuadro 6. Preparación de gel agrupador.....	28
Cuadro 7. Datos adicionales sobre individuos evaluados.....	31
Cuadro 8. Concentración de muestras de veneno a una disolución de 1:100, realizada para obtener valores de absorbancia dentro de la curva estándar que se muestra en la Figura 5.	32
Cuadro 9. Asociación de bandas a complejos proteicos, las proteínas asociadas se relacionan de los estudios de proteómica realizados por Calvete et al. (2011)	34
Cuadro 10. Concentración relativa de complejos proteicos por banda.....	35
Cuadro 11. Interacción de ensayos de inmunodifusión	38
Cuadro 12. Ensayo estadístico 2 a la k.....	39

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Carta aprobación bioética.....	57
Anexo 2. Extracción de veneno en colección privada de Carlos Patzán	58
Anexo 3. Extracción de veneno en Centro de rescate Antigua Exotic	58
Anexo 4. Extracción de veneno en el Parque Zoológico La Aurora.....	59
Anexo 5. Absorbancias de estándares de curva de calibración.....	59
Anexo 6. Gel de SDS Page corrido durante 6 horas	60
Anexo 7. Gel de SDS Page corrido durante 9 horas	60
Anexo 8. Ensayos de inmunodifusión No. 1 – Código (S1), prueba con antiofidico polivalente de Costa Rica.....	61
Anexo 9. Ensayos de inmunodifusión No. 1 – Código (S1), prueba con antiofidico polivalente de Biol.	61
Anexo 10. Ensayos de inmunodifusión No. 2 – Código (S2), prueba con antiofidico polivalente de Costa Rica.....	62
Anexo 11. Ensayos de inmunodifusión No. 2 – Código (S2), prueba con antiofidico polivalente de Biol.	62
Anexo 12. Ensayos de inmunodifusión No. 3 – Código (S3), prueba con antiofidico polivalente de Costa Rica.....	63
Anexo 13. Ensayos de inmunodifusión No. 3 – Código (S3), prueba con antiofidico polivalente de Biol.	64
Anexo 14. Ensayos de inmunodifusión No. 4 – Código (S4), prueba con antiofidico polivalente de Costa Rica.....	64
Anexo 15. Ensayos de inmunodifusión No. 4 – Código (S4), prueba con antiofidico polivalente de Biol.	65
Anexo 16. Ensayos de inmunodifusión No. 5 – Código (N1), prueba con antiofidico polivalente de Costa Rica.....	65

Anexo 17. Ensayos de inmunodifusión No. 5 – Código (N1), prueba con antiofidico polivalente de Biol.	66
Anexo 18. Ensayos de inmunodifusión No. 6 – Código (N2), prueba con antiofidico polivalente de Costa Rica.....	66
Anexo 19. Ensayos de inmunodifusión No. 6 – Código (N2), prueba con antiofidico polivalente de Biol	67
Anexo 20. Ensayos de inmunodifusión No. 7 – Código (N3), prueba con antiofidico polivalente de Costa Rica.....	67
Anexo 21. Ensayos de inmunodifusión No. 7 – Código (N3), prueba con antiofidico polivalente de Biol	68
Anexo 23. Ensayos de inmunodifusión No. 8 – Código (N4), prueba con antiofidico polivalente de Biol	69
Anexo 24. Ensayos de inmunodifusión No. 9 – Código (N5), prueba con antiofidico polivalente de Costa Rica.....	69
Anexo 25. Ensayos de inmunodifusión No. 9 – Código (N5), prueba con antiofidico polivalente de Biol.	70

RESUMEN

En Centroamérica y Suramérica, el género *Bothrops* es responsable por la mayoría de los accidentes ofídicos, dentro de esta agrupación una de las especies más abundantes es *Bothrops asper*, también conocida como Barba Amarilla. En Guatemala se atribuye el 34% de los envenenamientos a esta especie, que en conjunto con un tiempo promedio de viaje de 4-6 horas para llegar a un centro de salud y poca disponibilidad de sueros antiofídicos, hace que varios de los envenenamientos resulten en amputación de extremidades o muerte. Se ha estudiado la exposición a diferentes presiones selectivas, que producen cambios en la composición del veneno de la especie. Lo cual puede causar que los cuadros clínicos de envenenamiento difieran evolución y relaciones evolutivas en la mayor parte de su área de distribución, exceptuando las poblaciones del norte y sur de Guatemala, que surgieron a partir de las poblaciones que migraron de Honduras y El Salvador hacia el norte. Esta separación biogeográfica resulta en una significativamente. Evidenciando la necesidad de evaluar la composición de los venenos de diferentes poblaciones para poder determinar las implicaciones que tendría en accidentes ofídicos y su subsecuente tratamiento con los sueros antiofídicos disponibles. Los resultados mostraron diferencias a nivel de población en concentración de ciertos grupos de proteínas cercanos en peso molecular, respecto a la actividad hemolítica y en relación con la neutralización de toxinas respecto a antisueros de uso comercial en el país. Lo que establece que la dirección de investigación es la correcta y se requieren más datos sobre individuos de estas regiones, así como ensayos más específicos acerca de las diferencias entre veneno a nivel poblacional.

ABSTRACT

In Central and South America, the genus *Bothrops* is responsible for most ophidian accidents. Within this group, one of the most abundant species is *Bothrops asper*, also known as Fer-De-Lance. In Guatemala, 34% of poisonings are attributed to this species, which together with an average travel time of 4-6 hours to reach a health center and little availability of anti-venom serums, causes several of the poisonings to result in limb amputation or death. Evolution and evolutionary relationships have been studied in most of its range, except for populations in northern and southern Guatemala, which arose from populations that migrated north from Honduras and El Salvador. This biogeographic separation results in exposure to different selective pressures, which produce changes in the composition of the venom of the species. Which can cause the clinical pictures of poisoning to differ significantly. Evidencing the need to evaluate the composition of the venoms of different populations in order to determine the implications that it would have in snakebite accidents and its subsequent treatment with the available snakebite sera. The results showed differences at the population level in the concentration of certain groups of proteins close in molecular weight, with respect to the hemolytic activity and in relation to the neutralization of toxins with respect to antisera for commercial use in the country. This establishes that the research direction is the correct one and more data on individuals from these regions are required, as well as more specific tests on the differences between venoms at the population level.

I. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la composición y concentración proteica del veneno de *Bothrops asper* y determinar efectos diferenciales en la terapia de suero antiofídico para las regiones norte y sur en Guatemala. Partiendo desde un punto de vista exploratorio para separar a la especie en las poblaciones del norte y sur del país según el contexto biogeográfico.

El género tuvo origen en Suramérica, y fue migrando hacia el norte hasta llegar a México pasando por Centroamérica. Las poblaciones de Honduras y El Salvador se dividieron en dos grupos que migraron hacia Guatemala. El primer grupo circundando la Sierra de las Minas hacia el departamento de Petén. El segundo grupo dirigiéndose hacia el borde de la Sierra Madre de Chiapas y continuando por el sur del Guatemala hasta llegar al estado de Chiapas en México (Silva et al., 2013). El tiempo aproximado de divergencia de estos grupos es de 1.7 millones años, por lo que es posible que frente a presiones selectivas instigadas por diferentes ambientes se hayan dado cambios filogenéticos que resultaran en diferentes composiciones proteicas en el veneno (Hadman, et al., 2018).

La importancia de evaluar la composición y concentración de distintas poblaciones se traduce al posible efecto que tendrán sobre cuadros clínicos al momento de un accidente ofídico. Una concentración distinta en una familia de proteínas como lo son las fosfolipasas A2, puede causar hemopatologías más severas, dándole al paciente una menor ventana de tiempo para recibir tratamiento. Debido a que los principales riesgos frente a un accidente ofídico de especies del género *Bothrops* constan de fallo sistémico de órganos, necrosis localizada al área de la mordedura, y riesgo de hemorragias. Es importante determinar si una población tiene un mayor potencial para causar daños al paciente (Segura et al., 2012).

A pesar de que la distribución del género *Bothrops* se extiende desde el centro de México hasta el norte de Suramérica, los países de Centroamérica son las regiones con una mayor tasa de mortalidad asociada a accidentes ofídicos, exceptuando Costa Rica. En el caso de Guatemala el índice de accidente ofídico asociados a *Bothrops*, es de 34%, siendo uno de los más altos de la región (López-Lozano et al., 2012).

Diferentes factores están asociados al alto grado de heridas graves y mortalidad en casos de envenenamiento por *B. asper* en Guatemala; dentro de los principales factores está el tiempo en que se logra recibir asistencia médica, se estima que este puede ser en promedio 6 horas. Además de esto, la mayoría de los centros de asistencia médica no se encuentran preparados en un sentido de equipo, material, ni en capacitaciones para tratar con este tipo de casos (Cavete, et al., 2011). El tratamiento que se le suele dar al paciente al ingresar consiste en una desinfección general del área de la mordedura e inmovilización de la extremidad. Seguido de esto el centro de asistencia médica se comunicará con un centro médico u hospital para organizar el traslado, lo cual puede tomar varias horas. Una vez en un hospital, en el 60% de los casos habrá dosis de suero antiofídico disponibles, por tanto, comenzará el análisis del daño por envenenamiento (Sousa et al., 2018).

Los casos más graves de envenenamiento resultan en amputación de extremidades para evitar la extensión de la necrosis en el tejido. Sin embargo, existen otros riesgos a tomar en cuenta, las hemopatologías producidas por el veneno pueden desencadenar un fallo sistémico de órganos, siendo los órganos más afectados: los riñones, hígado y cerebro. En este caso se les dará prioridad de atención a los órganos orden de importancia. Un menor porcentaje de casos desencadenan una respuesta inflamatoria fuerte, que al estar cerca de una mordedura en el rostro o torso del paciente, pueden llegar a causar inflamación dentro del cráneo. Para tratar las complicaciones mencionadas anteriormente el primer paso en el tratamiento es la terapia de antisueros (Freitas-de-Sousa et al., 2015).

Este estudio planteo abordar cuatro ensayos para evaluar la composición y concentración proteica del veneno de *B. asper*. El ensayo de Bradford produjo resultados asociados a la concentración de proteínas de cada muestra analizada. El ensayo de SDS Page, permitió separar la muestra compleja de proteínas en sus pesos moleculares

asociados. El ensayo de hemolisis libre en sangre permitió evaluar a grandes rasgos si la actividad de proteínas como fosfolipasa A2 y similares son capaces de producir una hemopatología diferenciada entre poblaciones. Finalmente, los ensayos de inmunodifusión permitieron observar la neutralización de una muestra de veneno a su dosis equivalente de neutralización recomendada por el fabricante del suero antiofídico. Se evaluó factores como la intensidad de la banda del complejo antígeno-anticuerpo.

Se determinó que la concentración de proteínas entre muestras de veneno tiende a variar entre individuos adultos, desde 570 mg por muestra hasta 650 mg, aunque estas diferencias están más asociadas al tamaño del espécimen que a una población como tal (Calvete et al. 2009; Calvete et al. 2011). En el caso del ensayo de SDS Page se encontraron 10 complejos proteicos en forma de bandas y se encontró una diferencia relevante en cuanto a la concentración de algunas muestras (Rucavado et al. 2001; Calvete 2001). El ensayo de hemolisis libre en sangre mostró cómo las diferencias en la composición veneno puede resultar en una actividad hemolítica mayor. Finalmente, para el ensayo de inmunodifusión se observó una actividad diferenciada al momento de emplear el suero antiofídico polivalente Biol y el suero antiofídico polivalente producido en Costa Rica, siendo el último el que mostró la menor actividad neutralizante (Moreira et al., 2014).

II. JUSTIFICACIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se reportan en promedio 5.4 millones de accidentes ofídicos cada año, de estos 1.8 a 2.7 corresponden a envenenamientos y de estos 130,000 resultan en muerte. Mientras que 400,000 casos culminan en discapacidades crónicas, desfiguración y/o amputación (World Health Organization, 2017).

La mayoría de los casos de envenenamientos se dan en regiones agrícolas, debido a la constante perturbación de hábitats o bien el entrecruzamiento entre regiones de producción y áreas en de distribución de especies de importancia médica. La principal problemática que afecta a la población de áreas rurales es el tiempo en el que se logra acceder a un centro médico y los costos del tratamiento; esto incluye: dosis de suero antiofídico, el transporte al centro médico, transfusiones de sangre, injertos de tejido, amputaciones, etc. En la mayoría de los países de Centroamérica las muertes y costos asociados por accidentes ofídicos superan a los costos que generan enfermedades tropicales desatendidas (ETD) como lo es el caso del dengue (Ortero et al. 2002). Los accidentes ofídicos han sido altamente desentendidos por gobiernos y se asocian a países con economías en desarrollo, siendo las personas en condiciones de pobreza y pobreza extrema son las más afectadas (Gutiérrez & José, 2011).

En Centroamérica y Suramérica, la serpiente Barba Amarilla (*Bothrops asper*) también conocida como Víbora Terciopelo o Fer-de-Lance es considerada una de las más peligrosas de la región (Campbell & Lamar, 2004). En Guatemala el 34% de los accidentes ofídicos corresponden a esta especie. Los síntomas asociados a las toxinas neurotóxicas, hemotóxicas y citotóxicas son los siguientes: enema e hinchazón inmediata en el área mordida, seguido de sangrado excesivo y dolor en el área. La persona luego experimenta fiebre, sangrado en encías y nariz, sangrado gastrointestinal, hematuria, hipotensión,

náuseas y vómitos. La necrosis empieza a producirse en un promedio de entre 4 a 6 horas, aunque casos reportados en el sur de Guatemala han descrito la necrosis hasta en 2 horas luego de la mordedura (Köhler & Gunther, 2003).

La composición del veneno ha sido analizada en ejemplares recolectados de México, Costa Rica, Colombia, Panamá, Venezuela y Colombia. Y es a partir de estos y de ejemplares de países que poseen casos de envenenamientos por la especie que se producen sueros antiofídicos. En Guatemala se reconoce la existencia de 3 de sueros antiofídicos: El producido por el Instituto Clodomiro Picado (ICP) y el suero antiofídico MYNN, elaborados con venenos costarricenses y mexicanos respectivamente. Y, por último, el antisuero polivalente elaborado por el Instituto Biológico Argentino (Otero-Patiño et al. 2007).

Diferentes casos de envenenamiento por *Bothrops asper* en el país han reportado distintos niveles de efectividad respecto a los antisueros empleados. Se han descrito casos en los que ha sido requerida una mayor dosis del antisuero, a pesar de esto, algunas veces llegan a ser infectivos. Las diferencias de estas reacciones pueden agruparse en dos regiones distintivas de Guatemala, el sur y norte del país. Tomando como división biogeográfica la Sierra de los Cuchumatanes y la Sierra Madre. Pero a su vez tomando en cuenta la falla Motagua – Polochic y el corredor seco para evaluar como la especie ha ascendido en el continente americano desde su origen en Sudamérica.

Este estudio propone investigar las diferencias a nivel proteico de muestras de veneno de especímenes del norte y sur del país. Así como evaluar las diferencias en interacciones con los sueros antiofídicos comerciales a través de ensayos de inmunodifusión.

III. OBJETIVOS

A. Principal

Evaluar la composición y concentración proteica del veneno de *Bothrops asper* y determinar los posibles efectos diferenciales en la terapia de suero antiofídico para regiones norte y sur en Guatemala.

B. Específicos

- Evaluar el potencial de la técnica de SDS Page para reconocer diferencias poblacionales a nivel de patrones y expresión proteica en condiciones reductoras.
- Contrastar la actividad hemolítica del veneno entre promedios poblacionales en muestras de sangre de cordero.
- Comparar la neutralización de las proteínas contenidas en el veneno para diferentes poblaciones según el antisuero comercial utilizado.

IV. HIPÓTESIS

Hipótesis nula (H₀): Las condiciones biogeográficas que han separado a la especie luego de su migración de Suramérica hacia Norteamérica han causado cambios en la composición proteica del veneno lo que resulta en una concentración y actividad distinta en geles SDS Page, así como la reacción ante antisueros comerciales.

Hipótesis alternativa (H_a): Las condiciones biogeográficas que han separado a la especie luego de su migración de Suramérica hacia Norteamérica no han causado cambios en la composición proteica del veneno lo que resulta en una concentración y actividad distinta en geles SDS Page, así como la reacción ante antisueros comerciales.

V. MARCO TEÓRICO

A. Ecología de *Bothrops asper*

B. asper a nivel de especie presenta alto grado de dimorfismo sexual, a partir de los 7 meses de edad las hembras de la especie presentan un crecimiento mayor y más acelerado. En promedio un individuo adulto mide entre 1.4-1.8 metros de longitud, mientras que este promedio en hembras es de 1.5-2.3 metros. Aunque, la longitud máxima confirmada de una hembra ha sido de 2.5 metros. En general el grosor del cuerpo de las hembras suele ser igualmente mayor respecto al de los machos, lo que el peso también conlleva la misma relación de dimorfismo (Buttenhoff & Vogt, 1995).

En términos de proporción la cabeza de las hembras suele igualmente ser más grande que la de los machos, esto se da en una proporción entre dos y tres veces más grande. La coloración de la especie es bastante variada con suele ser el caso en la familia *viperidae*, sin embargo, el patrón constante entre todos los individuos consta de rayas diagonales que forman diamantes, siendo el contorno de la figura de un color blanco mientras que el exterior es de algún tono marrón. Otro aspecto representativo de varias especies del género, incluyendo a *B. asper*, es como la mandíbula inferior suele presentar un color que varía desde amarillo a marrón pálido. Cabe destacar que la coloración en individuos juveniles tiende a ser más brillante, además, los machos juveniles pueden llegar a presentar la punta de la cola con una coloración pálida respecto al resto del cuerpo (Peferoen, 2014).

La alimentación de *B. asper* ha sido evaluada en una población de 56 especímenes entre preservados y vivos por el Instituto Clodomiro Picado en Costa Rica. Las presas han sido identificadas como aves, mamíferos, reptiles, anuros y en menor medida artrópodos. La variedad en la dieta implicó un alto grado de oportunismo, la mayoría de las presas constan de ratones y aves, lo que contrasta con los animales más habituales en zonas con perturbación humana (Buttenhoff & Vogt, 1995). La depredación se da forma activa,

aunque se estima que una gran número de presas son resultado de emboscadas (Peferoen, 2014).

En términos del ecosistema que habita la especie, las selvas tropicales de la región norte y sur de Guatemala comprenden el rango de distribución. La selva tropical es lluviosa, presenta clima ecuatorial (tipo Af) o monzónico (Am), lo que implica un clima cálido y constante durante todo el año. El máximo de temperatura al día puede ser de hasta 35 °C mientras que la temperatura promedio anual suele mantenerse entre 25 y 27 °C. En este tipo de ecosistema, inclusive entre la temperatura promedio del mes más frío respecto al más cálido no supera una diferencia mayor a 2 °C. Las precipitaciones, que son superiores a 1500 mm, se distribuyen regularmente a lo largo de todo el año, por eso se mantiene una fuerte humedad constante (Barquero-González, et al. 2020).

B. Biogeografía de *Bothrops asper*

La región tropical incluye al continente Suramericano, Centroamérica, el Sur de México y las Antillas. Esta región comprende la mayor biodiversidad en el planeta, e hipótesis respecto a esta biodiversidad se extienden desde especiación alopátrica hasta desplazamiento ecológico por el surgimiento de cadenas montañosas (Antonelli, Nylander Persson, & Sanmartín, 2009). Límites geográficos como ríos han actuado como barreras precigóticas (Wallace, 1852). Mientras que hábitats fragmentados como consecuencias de cambios climáticos durante el Pleistoceno han contribuido al grado de especiación (Haffer, 1969). La tendencia de diversificación es continua ya que no presenta diferencias significativas entre las tasas de especiación en el Paleógeno, Neógeno y Cuaternario (Bacon, Molnar, Antonelli, Crawford, Montes & Vallejo-Pareja, 2016; Hoorn et al., 2010; Rull, 2011). Por último, algunas hipótesis explican la diversificación mediante barreras ecofisiológicas intrínsecas como la temperatura, especialmente en vertebrados ectotérmicos y la radiación en nichos que estaban en gran medida desocupados.

Las primeras estimaciones para la divergencia del género *Bothrops* determinan que ocurrió aproximadamente hace 13 millones de años. Este grupo de investigadores fue el primero en obtener un volumen significativo de ADN mitocondrial del género, y sugieren que el ancestro en común de *Bothrops* colonizó Suramérica durante el Mioceno entre hace 23-10 millones de años. El género *Bothrops* está distribuido a lo largo de la región tropical,

con especies de una amplia y abundante distribución como *B. asper* y *B. atrox* y, especies restringidas como *B. pirajai* y *B. muriencis*. Además, las especies pueden presentarse desde 0 msnm hasta 3,500 msnm haciendo que los nichos abarcados por el género sean diversos y sujetos a presiones selectivas variables durante un periodo evolutivo corto (Campbell & Lamar, 2004; Carrasco, Harvey, & Muñoz Saravia, 2009; Carrasco, Leynaud, & Scrocchi, 2010; Harvey, 1994; Lirada-Silva et al., 2009; Wallach et al., 2014). La mayoría de las especies son continentales, terrestres y habitan zonas boscosas, como *B. atrox*, *B. jararaca*, *B. asper* y *B. leucurus*. Aunque también existen especies de comportamiento arbóreo y presentes en bosque nuboso como *B. bilineatus*. También hay especies que prefieren espacios abiertos con vegetación más pequeña como es el caso de *B. erythromelas*.

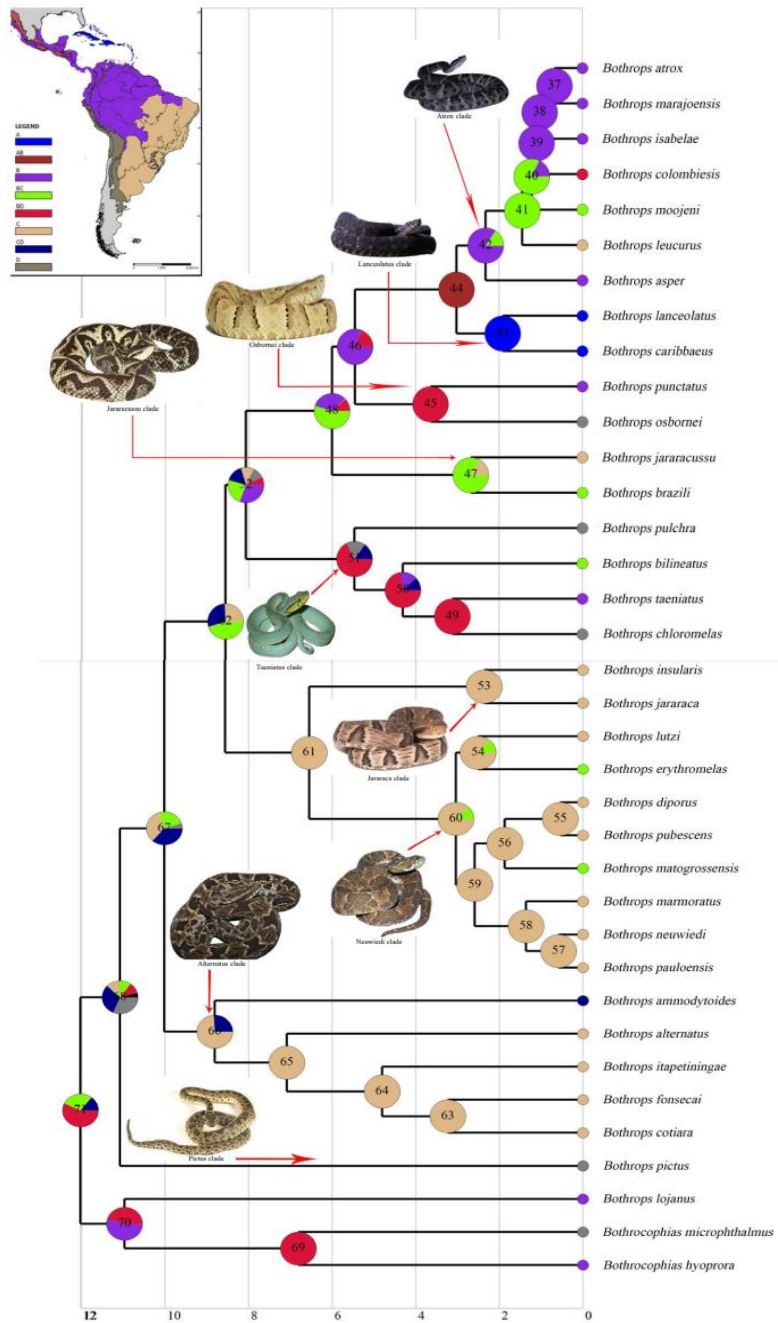


Figura 1. Filogenética del género *Bothrops*

Fuente: Adaptado de Hamdan et al., (2019)

La Figura 1 muestra la historia biogeográfica del género de serpientes *Bothrops* a través de aspectos temporales y geográficos de diversificación. La barra en la parte inferior da la escala de tiempo absoluta en millones de años antes del presente. El rango moderno para cada taxón está codificado por colores y se dibujó en los linajes terminales antes del

nombre de cada taxón. Los gráficos circulares en los nodos internos representan las probabilidades marginales de cada área ancestral alternativa. Solo se muestran las áreas ancestrales de los nodos basales. Los códigos corresponden a: D. subregión chacoana: C; subregión brasileña: B; sudamericano Zona de Transición: D; Subregión antillana: A.

Las diferencias en la actualidad entre especies pueden explicarse con eventos geológicos como el surgimiento de la Cordillera de los Andes que inició el movimiento de la especie hacia el norte de Suramérica tras su colonización en el sur de Argentina (Webb, 1976). Además de este tipo de eventos, transiciones climáticas produjeron la segmentación de bosques como en el caso de la Glaciación del Pleistoceno. La subsecuente desaparición de glaciares y aumento de temperaturas reunieron estas secciones aisladas y promovieron un movimiento hacia el norte del continente (Webb, 1976). La transición del clima y vegetación durante el Plio-Pleistoceno en conjunto con el levantamiento del Istmo de Panamá que unió a Norteamérica y Sudamérica durante el Plioceno tardío provocó cambios sin precedentes para las biotas aisladas (Simpson, 1980).

Parte de la complejidad de estudiar el ascenso de especies por Centroamérica es que no se encuentran muchos registros fósiles debido a las condiciones climáticas y tipos de suelo dificultan la fosilización de especímenes. Sin embargo, los mamíferos han sido de los grupos más estudiados porque poseen en algunas zonas de Centroamérica restos conservados que han sido datados y han dado información sobre los tiempos de migración. Por tanto, aproximando que la movilidad de diferentes especies y estimando los tiempos filogenéticos. Esto permite que se puedan establecer correlaciones en cómo se han movilizadо grupos de mamíferos contemporáneos de reptiles. Las principales inferencias evolutivas obtenidas acorde a los registros fósiles de mamíferos son las siguientes: El taxón inmigrante aparece en Norteamérica y Suramérica poco después de la formación del istmo de Panamá, una ola temprana de especies adaptadas al xérico fue seguida por una segunda ola de especies adaptadas al medio (Explicar que adaptaciones) y, la mayoría de los intercambios habían concluida al comienzo del Pleistoceno medio (Webb, 1976).

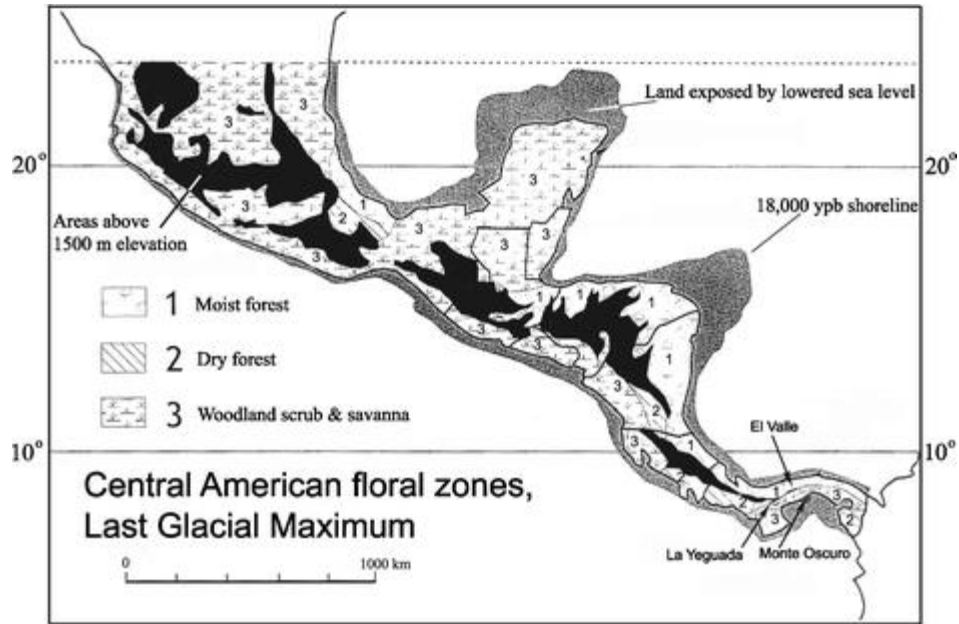


Figura 2. Reconstrucción de la distribución de asociaciones de bosques neotropicales de tierras bajas en el Último Máximo Glacial (hace 18,000 años).

Fuente: Woddburne, (2010).

El Plio-Pleistoceno corresponde a un periodo de transición de hábitats similares a bosques húmedos y cálidos a hábitats más a sabanas más frías y secas (Hooghiemstra & Cleef, 1995). Los bosques húmedos de tierras bajas fueron reemplazados por bosques de sabanas con la disminución de temperatura globales y creciente aridez, seguido de esto ocurren todos los cambios ambientales ambientes del Cuaternario empezaron en 2.588 millones de años al presente. Como se muestra en la Figura 2, esto sugiere que cambios severos en el clima y hábitats formasen los patrones de especiación de los clados más jóvenes de *Bothrops*. El resultado de estos eventos relacionados a la heterogeneidad ambiental extrema ha sido reportada con una variedad de fauna neotropical, para serpientes del género *Pituophis* (Bryson, García-Vázquez, & Riddle, 2011), mosquitos (Conn & Mirabello, 2007) y aves (Grau, Pereira, Silveira, Wajntal, & Höfling, 2005).

Cuadro 1. Tiempos de divergencia estimados en millones de años, area ancestral y eventos putativos para la evolución de clados de *Bothrops*.

Clados de <i>Bothrops</i>	Área ancestral	Media de tiempo de divergencia (millones de años)	Eventos putativos y referencias
B. taeniatus	Subregión Brasileña + Zona transicional suramericana	5.47 [0.10–16.77]	Elevación rápida del Este de la Cordillera de los Andes (Gregory-Wodzicki, 2000)
B. osbornei	Subregión Brasileña + Zona transicional suramericana	3.64 [0.1–11.9]	Elevación del Norte de los Andes (Hoorn et al., 2010)
B. neuwied	Subregión Chaco	3.04 [0.2–9.25]	Cambios en el clima y vegetación (Machado et al., 2014)
B. jararaca	Subregión Chaco	2.37 [0.3–7.66]	Fluctuaciones en el nivel del mar (Graziotin et al., 2006)
B. atrox	Subregión Chaco + Subregión Brasileña	2.32 [0.5–7.59]	Surgimiento del puente terrestre panameño (Parkinson et al., 2002; Simpson, 1980; Webb, 1976; Wüster, Salomão, et al., 2002)
B. lanceolatus	Subregión Antillana	1.91 [0.2–6.43]	Dispersión de agua y especiación en Islas (Wüster, Thorpe, et al., 2002)

A su vez el Cuadro 1 explica como el caldo de *B. atrox* inició su diversificación hace 3.02-2.32 millones de años. *B. atrox*, concluye su ascenso en el continente suramericano al llegar al puente terrestre panameño, debido que en este punto el linaje se diversifica a *B. asper*, este último siendo la única especie de *Bothrops* que llega a Centroamérica. El caso de especiación entre Norteamérica, Centroamérica y Sudamérica se ha reportado en varios clados de fauna tan recientemente como hace 2 millones de años, lo que sugiere que al formarse el Istmo de Panamá empieza la diversificación del clado *B. atrox*.

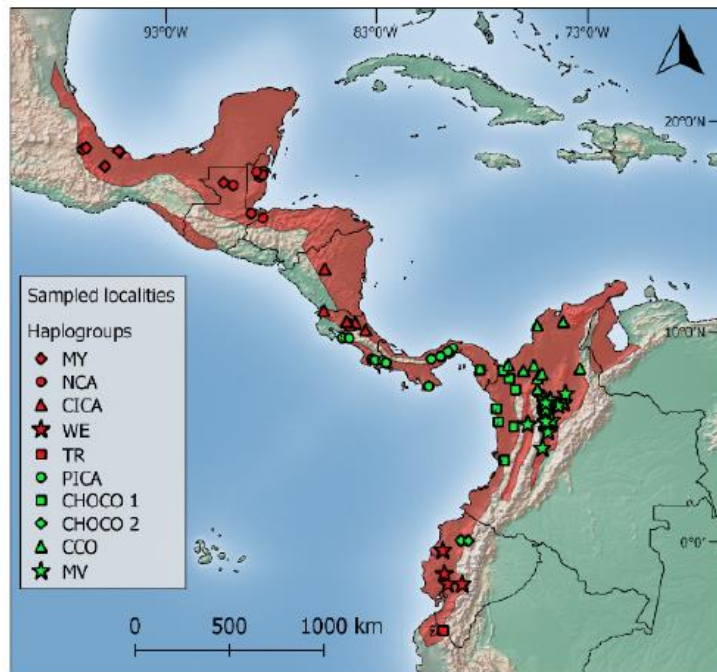


Figura 3. Distribución de *Bothrops asper* en Centroamérica y Sudamérica.

Fuente: Hernández et al., (2013)

En la Figura 2 se muestra el ascenso de *B. asper* por Centroamérica se da a lo largo de la región en presencia de barreras geográficas como la depresión de Nicaragua, la depresión de Panamá y el estrecho de Tehuantepec. En el sur de Guatemala y estado de Chiapas en México se encuentra una población poco estudiada que ha sido aislada del resto por tres cadenas montañosas, Sierra Madre de Chiapas en el sur de México, Sierra de las Minas cercana al centro de Guatemala y Sierra de los Cuchumatanes hacia el norte del país. Partiendo del clado del Istmo Caribeño Centroamericano que según el Cuadro 1 surge hace

1.10-2.51 millones de años que conforme asciende en Nicaragua y Honduras llega a ser el clado del Caribe Centroamericano Nuclear que se origina hace 0.73-1.87 millones de años. Este último al acercarse a la frontera entre Guatemala y Honduras encuentra un corredor biológico por El Salvador, específicamente en la unión de estos tres países por los siguientes departamentos, Esquipulas, Guatemala – Nueva Concepción, Honduras – Metapán, El Salvador. Este corredor permite el paso de la especie hacia el sur de Guatemala y la misma Sierra Madre de Chiapas cierra el paso de la especie haciendo que esta solo sea capaz de llegar al lado Este de la Cordillera Tres Picos en el estado de Chiapas, México (Hernández et al., 2013).



Figura 4. Principales cadenas montañosas de Guatemala

Fuente: Redón et al. (2003)

El acontecimiento de separación que ocurre en la especie *B. asper* es comparable con el que inicio la movilización del género *Bothrops* en Suramérica, aunque a una menor escala. Con el contexto geográfico de la Figura 2 durante la finalización del último periodo de glaciación y subsecuente calentamiento de la región, las regiones segmentadas de bosque capaces de albergar poblaciones de *B. asper* se unen y permiten el avance de la especie por

el territorio. Eventualmente este mismo aumento en la temperatura provocaría una nueva segmentación de bosque húmedo convirtiéndolo a un bosque más seco (Segura et al., 2010).

Esto junto con la llegada de humanos y urbanización de áreas ampliaría esta brecha, haciendo insostenible a la población de *B. asper* localizar en El Salvador para dar lugar a dos poblaciones en Guatemala separadas por 0.73-1.87 millones de años (Silva et al. 2003).

C. Veneno de *Bothrops asper*

El veneno de *B. asper* al igual que la mayoría de los venenos, está compuesto dos por dos partes, un componente no proteico y una mezcla compleja de proteínas que resulta en una actividad enzimática variada y selectiva. La parte no proteica del veneno además de ser menos biológicamente activa también corresponde en promedio únicamente al 10% de la composición del veneno. Esta parte se compone de iones de metales, molecular orgánicas como péptidos, lípidos, nucleósidos, carbohidratos y aminos (Hawary & Hassan, 1974). Los constituyentes metálicos analizados en el estudio de Moav et al. (1964) a lo largo de 17 especies incluyendo las familias, *Crotalidae*, *Viperidae* y *Elapidae* han sido: calcio, zinc, magnesio, sodio, potasio, cobre y manganeso. Cabe destacar que aquellos con la mayor concentración fueron sodio y potasio, mientras que los cationes divalentes en mayor presencia fueron de magnesio, calcio y zinc. Parte de la poca información respecto a este aspecto de la composición del veneno de serpientes se debe a la falta de un efecto fisiológico notable a causa de estos compuestos en contraste con las proteínas. Algunos estudios han indagado sobre el contenido no metálico e inorgánico, pero fuera de destacar que hay presencia de fosforo en el veneno, existe poca información sobre las implicaciones (Grasset et al. 1956).

Estudios de proteómica de la especie han dilucidado la presencia de al menos 8 familias distintas de proteínas. Agrupados de la siguiente forma: metaloproteasas de tipo PI- y PII-SVMP (41-44%), fosfolipasas A2 tipo K49- y D49-PLA2s (29-45%), serina proteasas o SVSP (4-18%), L-aminoácido oxidasas (5-9%), desintegrinas que son proteínas no enzimáticas (1-2%), proteínas similares a lectina tipo C (0.5%), proteínas secretoras de cisteína o CRISP (0.1%) y fragmentos de proteínas DC (<0.1%) (Serrano, 2013). Un gran número de estas proteínas han sido caracterizadas bioquímica y estructuralmente mediante técnicas filtración y dimensión en equipos como UHPLC/HPLC, MADI-TOF,

espectroscopia de rayos X, entre otros. Sin embargo, varias proteínas no han sido caracterizadas como se describió previamente, sino que han sido descritos aspectos biomecánicos de forma parcial (Sousa et al., 2018).

La variabilidad del veneno ha sido descrita en estudios como el de Calvete et al. (2011). Al estudiar 16 poblaciones distintas de *Bothrops atrox* en Suramérica, se estableció una relación directa entre cambios en proporciones de familiar proteicas y barreras biogeográficas entre los grupos. Lo que sugiere una presión simpátrica entre los grupos que orienta cambios en el veneno. Este tipo de análisis es relativamente reciente, sin embargo, muestra como a nivel de población una especie puede llegar a poseer un carácter mayormente hemorrágico en el veneno que otra población, como sucedió para algunos grupos de *Bothrops atrox*. A su vez el Cuadro 2 explica como el caldo de *B. atrox* inició su diversificación hace 3.02-2.32 millones de años. Dando como resultado en familias de proteínas específicas, de las cuales la mayoría también se encuentran presentes en *B. asper* (Sousa et al., 2018).

Cuadro 2. Familiar proteicas y toxinas específicas del veneno de *Bothrops asper*.

Familia proteica	Toxina específica	Peso molecular kDa	Secuencia de aminoácidos	Referencias
Fosfolipasa A ₂				
D49	PLA I	40	-	Ferlan and Gubensek (1978)
	PLA II	16	-	Ferlan and Gubensek (1978)
	PLA ₂ 1	11	-	Alagón et al. (1980)
	PLA ₂	11	-	Alagón et al. (1980)
	PLA ₂	29	-	Alagón et al. (1980)
	Miotoxina I	15	-	Gutiérrez et al. (1984)
	Miotoxina PLA ₂	15	-	Mebis & Samejima (1986)
	Miotoxina III	15	P20474	Kaiser et al. (1990)
K49	Miotoxina II	15	P23605 1CLO	Lomonte et al. (1990)
	Miotoxina IV	15	-	Diaz et al. (1995)
Metaloproteasa				
P-I	Proteinasa G	18	-	Aragón-Ortiz & Gubensek (1987)
	BaP1	23	P83512, 1ND1	Gutiérrez et al. (1995)
	BaH1	64	-	Borkow et al. (1993)
	BH2	26	-	Borkow et al. (1993)

Familia proteica	Toxina específica	Peso molecular kDa	Secuencia de aminoácidos	Referencias
	BH3	55	-	Borkow et al. (1993)
	BaH4	69	-	Franceschi et al. (2000)
	Basparina A	70	-	Loría et al. (2003)
Serina Proteasa				
	Asperasa	30	-	Aragón-Ortiz & Gubensek (1978)
	Ficozima	25	-	Foltova et al. (1990)
	Proteína similar a Trombina	27	Q072L6	Pérez et al. (2008)
L-aminoácido oxidasa				
	Lao 1	125	-	Umaña (1982)
	Lao 2a	125	-	Umaña (1982)
	Lao 2b	130	-	Umaña (1982)
Proteína similar a lectina tipo C				
	Aspercetina	30	-	Rucavado et al. (2001)
Desintegrina				
	Bothrasperina	8	-	Pinto et al. (2003)

D. Contexto epidemiológico

La mayoría de los casos de envenenamiento ocurren en áreas con producción agrícola llegando a porcentajes tan altos como el 85 al 90% de los casos. Dentro de este grupo la mayoría de los casos se dan en adultos jóvenes entre 15-45 años siendo mayoritariamente hombres, y el siguiente número alto de casos se da en niños. En general las mordeduras se presentan en extremidades inferiores (Gutiérrez et al., 2006; Otero et al., 1992; Sasa & Vázquez, 2003). La incidencia de los casos al igual que la mortalidad, varían de forma extensa entre países. Inclusive dentro de un mismo país regiones pueden tener bastas diferencias según factores etno-antropológicos,

En Guatemala el acceso a antídotos es escaso y un alto porcentaje de las ocasiones el recorrido para llegar a un centro médico implica horas de transporte. La escases de los sueros antiofídicos en Guatemala es el resultado de problemas sistemáticos asociados a educación y salud. Si bien la mayor parte de la población del país tiene conocimiento sobre que son los sueros antiofídicos, pocos conocen sobre la existencia de diferentes tipos asociados al género de serpientes frente al cual pueden neutralizar las proteínas del veneno. Tampoco se conoce sobre quiénes son los distribuidores o bien diferentes marcas de sueros antiofídicos presentes en el país (Gutiérrez et al., 2006). Esto en conjunto con que para la mayoría de la población la única forma de adquirir sueros antiofídicos es en centros hospitalarios en casos de envenenamientos y como distribuidores particulares solo trabajan con empresas como ingenios o fincas, complica el acceso para el resto de la población. Pocos centros de salud se encuentran preparados para tratar con el cuadro clínico de un envenenamiento. La mayoría de los hospitales principales del país están capacitados, pero presentan una sobrecarga de pacientes lo que dificulta el trato de pacientes. Además del tiempo requerido para llegar a estos centros (Gutiérrez et al., 2006).

De entre el 40-50% de los pacientes reciben alguna forma de primeros auxilios según los siguientes métodos: extractos de plantas, productos químicos, métodos físicos, oraciones, etc. Estos factores ralentizan el ingreso de pacientes a centros hospitalarios, en ocasiones hasta en 6 horas o más luego de la mordedura (Otero et al., 2000; Otero-Patiño et al., 1998; Otero-Patiño, 2008). La prevención de secuelas y muerte depende del adecuado tratamiento con terapia de sueros antiofídicos en menos de 2 horas después de la

mordedura. Atención médica después de este rango de tiempo presenta un riesgo alto de insuficiencia renal aguda y hemorragia en el sistema nervioso central. Igualmente se aumenta el riesgo de síndrome de compartimental y necrosis local, resultando en amputación de la extremidad. Esto es consistente con especímenes de 1 metro de largo en adelante (Otero, 1994; Otero et al., 2002).

E. Aspectos clínicos

En cuestión de síntomas, los casos de envenenamiento a causa *B. asper* no suelen variar entre las regiones del Centroamérica y Suramérica. Como se puede apreciar en el Cuadro 3 el síntoma más común en el envenenamiento local Bothropico es la presencia de un edema en el 95% de los casos y se presenta luego 5 minutos de la mordedura. El siguiente síntoma de mayor prevalencia consiste en la hemorragia localizada, la equimosis es visible de entre de 5 a 30 minutos luego de la mordedura. El 12% de los casos pueden llegar a presentar ampollas mientras que, el 10% pueden presentar formas de dermonecrosis y mionecrosis, esto luego de entre 6 y 8 horas (Rosenfeld, 1971; Kamiguti & Cardoso, 1989; Kerrigan, 1991; Kamiguti et al., 1996). Síntomas de envenenamientos por especies de la familia Viperidae como lo es el caso de *B. asper*. Incluyen la defibrinogénación para el 60-70% luego de 30-60 minutos, para los casos en donde se considera un envenenamiento moderado o grave. La trombocitopenia suele presentarse en un 30% de los casos, mientras que la hipotensión se da en un rango de entre 10-14%. El sangrado sistémico se da entre el 25-30% de los casos, con sangrado gingival, hematurias y en heridas recientes. (França and Málaque, 2003; Gutiérrez and Lomonte, 2003; Otero, 1994, 2007; Otero et al., 1992).

Cuadro 3. Efectos locales y sistemáticos asociados a la gravedad del envenenamiento de *Bothrops asper*

Gravedad	Síntomas locales	Síntomas sistemáticos
Baja	Dolor moderado, edema menor y hemorragia insignificante.	Signos vitales y coagulación dentro de parámetros normales
Intermedia	Inflamación en la región de la mordedura formando un aumento alrededor de 4 cm o menor de alto. Hematoma y sangrado escaso o nulo. No se produce necrosis en la herida.	Sangre incoagulable, sin sangrado sistemático, pero con alteraciones hemodinámicas levemente fuera de rangos normales.
Grave	Inflamación en la región de la mordedura y segmentos cercanos a la extremidad (ej. Mordedura en la pierna que produce inflamación hasta el muslo), inflamación mayor a 4 cm de alto. Sangrado local, ampollas y sin necrosis.	Sangre incoagulable, sangrado sistemático (ej. Gigival, hematuria, heridas recientes). Alteraciones hemodinámicas leves, no hay presencia de insuficiencia renal.
Critica	Inflamación extensa llegando hasta el abdomen independientemente de la extremidad mordida. Ampollas, sangrado local, necrosis y síndrome compartimental.	Sangre incoagulable, hemorragia sistémica, hipotensión en casos acompañada con shock intravascular. Típicamente se presenta falla renal, hemorragia cerebral o falla multisistémica de órganos.

Fuente: Otero et al., (2007)

Teóricamente, únicamente los pacientes que presentan un caso de envenenamiento de gravedad intermedia son aquellos que se encuentran en un riesgo serio de presentar secuelas para el resto de su vida. Sin embargo, esta proposición es idílica, la realidad del caso es que inclusive envenenamientos gravedad baja pueden llegar a producir secuelas en ausencia de terapia de antisuero. En términos de ontogenia, *B. asper* presenta un mayor contenido de proteínas fosfolipasas A2 en su estadio adulto, que es considerado una vez el individuo sobrepasa 1 metro de longitud (Alape-Girón et al., 2008). Por otro lado, el envenenamiento de especímenes juveniles presenta un mayor contenido de

metaloproteinasas. Esto se relaciona directamente con sangre incoagulable por periodos extensos, riesgo mayor de hemorragias sistémicas y suero en sangre relativamente bajo.

En especies cercanamente relacionadas como *Bothrops jararaca* que presentan especímenes catalogados como adultos, tomando en cuenta que miden más que 1 metro de longitud. Muestran necrosis y hemorragia sistémica en casos de envenenamiento. Mientras que los individuos juveniles presentan patologías asociados a coagulación y sangrado en el área, pero no al nivel de sangrado sistémico (Senise, Yamashita & Santoro, 2015).



Figura 5. A. Paciente de 12 años, presento envenenamiento leve localizado en la mordedura, 12 horas después de la mordedura no presento más síntomas. B. Paciente de 30 años presento inflamación extensa fuera de la extremidad afectada, varias ampollas, necrosis local, sangrado vaginal y sangre incoagulable. 24 horas después de la mordedura la paciente presento falla renal aguda. C. Paciente de 2 años fue mordido en 3 ocasiones en la pierna por una *B. asper*, 12 horas previas a ser ingresado a un centro hospitalario. Presento inflamación local en los 3 segmentos de las mordeduras, y formación ampollas, al igual que necrosis localizada. El paciente no era capaz mover los dígitos del pie, lo que sugiere síndrome compartimental. También se presentó sangre incoagulable, esto asociado a la falla renal aguda. El miembro fue amputado. D. Paciente de 12 años se presentó al centro médico 36 horas luego de la mordedura, inicialmente fue tratado con

medicina tradicional. Presento síndrome compartimental, ampollas y necrosis en la piel.

La inflamación afecta a 3 segmentos de la extremidad. El paciente presento necrosis tubular y fallo renal agudo, al igual que sangre incoagulable y neumonía. La extremidad fue amputada.

En términos del veneno que suele poseer un individuo se poseen precedentes de *B. asper*, correspondientes a Colombia. Una hembra de un largo de 1.75 metros produjo un peso seco de veneno de 130 ug con una concentración de 1000 ug. Aunque han sido reportados pesos secos de 458 ug en peso seco con una concentración de hasta 1530 ug (Bolaños, 1984).

Los sueros antiofídicos bothropicos suelen ser capaces de neutralizar entre un rango de 2-3.5 mg de veneno. La cantidad de dosis depende de la respuesta del paciente al tratamiento. El suero administra en perfusión intravenosa a 15 gotas/min o 50 ml/h y con un intervalo entre dosis de 3 horas de observación para evaluar la evolución del cuadro clínico del paciente. Factores que pueden afectar la eficiencia de este tipo de terapia es la especificidad de anticuerpos respecto a las proteínas del veneno, isoformas de proteínas de familias proteicas que pueden compartir dos poblaciones pueden implicar cambios drásticos. Principalmente esto se debe a un factor de concentración para variabilidad de proteínas entre poblaciones (Nina-Cueva et al. 2020).

VI. METODOLOGÍA

A. Bioética del estudio

El estudio empleó 9 individuos adultos de *Bothrops asper* para realizar extracciones de veneno. Todos los individuos fueron capturados como adultos de su estadio silvestre y formaban parte de exhibiciones en el Parque Zoológico la Aurora, el Centro de Rescate Antigua Exótica y la colección privada de Carlos Patzán. Para asegurar el bienestar de los individuos se completó el formulario y se aprobó el protocolo propuesto por el Comité de Ética, para el Uso y Cuidado animal de la Universidad del Valle de Guatemala CEUCA – UVG.

B. Extracción de veneno

Los venenos del Norte corresponden a 5 individuos del Parque Zoológico la Aurora, forman parte de una donación para investigación hacia la Universidad del Valle de Guatemala. Los venenos del Sur corresponden a individuos recolectados en Antigua Exótica, un centro de rescate y revocación de animales silvestres ubicado en la cercanía de Antigua Guatemala. Las muestras del Norte provinieron de la colección privada de Carlos Patzán, un ex trabajador del Parque Zoológico La Aurora. Y de individuos del Parque Zoológico La Aurora.

Para el estudio únicamente fue requerida una extracción de veneno por individuo, para lo cual se empleó el siguiente procedimiento. La cabeza de la serpiente se sujetó entre los dedos índice y pulgar, justo detrás del ángulo de la mandíbula, mientras que el cuerpo de la serpiente se sostuvo entre el tronco y el brazo del manipulador de serpientes. Al aplicar una presión suave, las mandíbulas de la serpiente se abrieron a la fuerza y los colmillos quedaron expuestos. Los colmillos se empujaron a través de una membrana de Parafilm enganchada sobre el borde de un recipiente de Beaker de 250 ml y se exprimió el

veneno evitando que se produjeran laceraciones dentro de la boca de la serpiente que contaminaran la muestra con sangre (Tanjoni et al., 2005).

Después de la extracción del veneno, los colmillos se retiraron con cuidado del recipiente de recolección. Seguido de esto el individuo fue colocado en su recinto y el veneno se recolecto del Beaker para transferirlo a tubos Eppendorf de 1.5 ml (Guércio et al., 2001).

C. Conservación de veneno

Las muestras de veneno una vez recolectadas son colocadas en una hielera con una temperatura promedio de 4 grados Celsius, luego son trasladados por no más de 4 horas hasta llevar al a Universidad del Valle de Guatemala en donde son refrigerados a -20 grados Celsius. Luego de una semana son liofilizados y guardados de nuevo a -20 grados Celsius.

D. Cuantificación de proteínas por método de Bradford

La cuantificación de proteínas depende una curva estándar con la que contrastar la absorbancia de las muestras de veneno. Para esto se prepararon 6 estándares de albumina sérica bovina (BSA) disuelto en agua ultrapura. Los estándares fueron: 100 ug/ml, 200 ug/ml, 400 ug/ml, 600 ug/ml, 900 ug/ml, 1200 ug/ml y 1500 ug/ml.

Luego, 20 ul de cada estándar se agregaron a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y añadió 1 ml de reactivo de Bradford. Se realizo una incubación de 20 min en oscuridad, seguido se iniciaron las mediciones con el blanco que eran 20 ul de agua ultrapura y 1 ml de reactivo de Bradford. La absorbancia se midió en 595 nm (Saldarriaga et al., 2003).

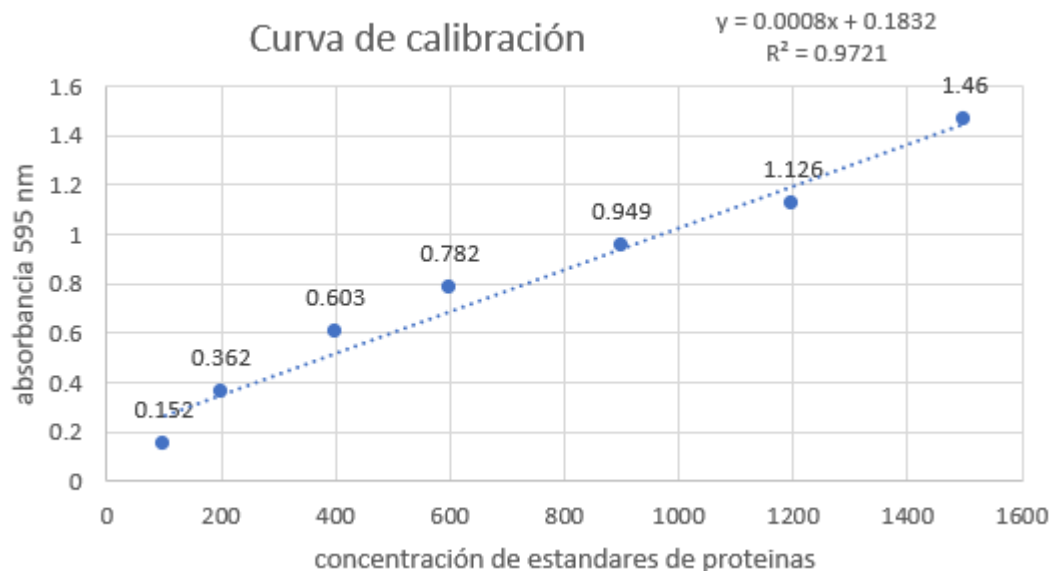


Figura 6. Curva estándar de calibración para el ensayo Bradford.

Cada una de las muestras de veneno se preparó en triplicado y se empleó el promedio de la absorbancia para la estimación de la concentración.

E. Ensayo SDS Page

Se empleó el sistema de Owl Dual-Gel Vertical Electrophoresis System P10DS de Thermo Fisher Scientific, para la producción de geles. Se prepararon las siguientes soluciones para el ensayo: solución de Tris-HCl 1M a un pH de 6.8, solución de Tris-HCl 1.5 M a un pH de 8.8, solución de APS 10%, solución de acrilamida al 40% (Laemlli et al., 1997). A partir de estas soluciones iniciales se preparó lo siguiente:

Cuadro 4. Preparación del tampón de corrida.

Reactivo	Concentración final	Stock	Volumen
Tris Base	25 mM		3.025 g
Glicina	192 mM		14.4 g
SDS	0.1%	10%	10 ml

Fuente: Laemlli et al., (1997).

El porcentaje de acrilamida en el gel de resolución se ajustó al 12% para todos los ensayos realizados.

Cuadro 5. Preparación del gel de resolución.

Reactivo	Concentración	Concentración final	Volumen (ul)
Agua			4400
Acrilamida/bis acrilamida (19:1)	5%	40%	3000
Tris-HCl. pH 8.8	125 mM	1 M	2500
SDS	0.1%	20%	100
APS 10%			50
TEMED			10

Fuente: Laemmli et al., (1997).

Una vez cargado el gel dentro del sistema se cubrió con una capa delgada de isopropanol para suavizar la superficie y facilitar la polimerización del gel. Seguido de esto se dejó polimerizar durante 1 hora y, por último, se extrajo el isopropanol y se limpiaron los residuos con papel (Laemmli et al., 1997).

Cuadro 6. Preparación de gel agrupador.

Reactivo	Concentración	Concentración final	Volumen (ul)
Agua			3697
Acrilamida/bis acrilamida (19:1)	5%	40%	623
Tris-HCl. pH 6.8	125 mM	1 M	630
SDS	0.1%	10%	5
APS 10%			40
TEMED			10

Fuente: Laemmli et al., (1997).

El gel agrupador se dejó polimerizar durante 30 minutos, seguido de esto se retiraron los peines y se armó el sistema de electroforesis. Los pocillos fueron lavados con el tampón de corrido empleando una micropipeta para eliminar residuos de acrilamida sin polimerizar. Las muestras de veneno fueron diluidas en agua ultrapura hasta llegar a una concentración de 15 ug de proteína y mezclaron en una proporción 1:1 con el tampón de muestra. Seguido de esto las muestras fueron incubadas a 95 grados Celsius durante 6 minutos (Laemmli et al., 1997). Una vez montado el sistema, la fuente de poder se configuro para una alimentación constante de 110 V durante 6 horas, los tiempos de corrida se vieron afectados por el amperaje producido en las instalaciones de la Universidad del Valle de Guatemala.

Una vez producidos los geles de SDS Page, se empleo el software Online Gel Analyzer, para producir los mapas de bandas de proteínas. Con ello igualmente se etiqueto cada muestra y banda reconocible. Además, se obtuvo un valor de intensidad de banda, empleando como control positivo la escalera molecular de la cual se conoce la concentración. Se analizó una población respecto a otra para evaluar cambios notables a nivel de intensidad de banda que puede sugerir un cambio en la concentración a nivel superficial y exploratorio.

F. Ensayo de hemólisis libre en sangre

La hemolisis libre en sangre es una prueba asociada a la capacidad de una muestra para causar lisis celular. Empleando la fosfolipasa A2 como control positivo, se estableció una concentración de 300 ug en un volumen de 1 ml. Las muestras de veneno se diluyeron en agua ultrapura para llevar a una misma concentración. Empleando agua ultrapura como blanco en el espectrofotómetro se tomaron todas las mediciones a una longitud de onda de 700 nm. El tiempo de análisis fue 35 minutos tomando mediciones de absorbancia cada minuto, la idea de esto fue poder ciclar entre pruebas que se realizaron al mismo tiempo. Finalmente, al colocar cada uno de los valores de absorbancia acorde al tiempo, se evaluaron los datos respecto a las líneas de tendencia que se formaron. (Moretto Del Rei et al., 2001).

G. Ensayo de inmunodifusión

El ensayo partió de la preparación de una solución de agar al 0.5% en PBS, la solución se colocó en baño maría hasta alcanzar la homogeneidad y se colocó en cajas Petri a una altura aproximada de 0.5 cm. Se evito perturbar la superficie y se ingresaron las cajas Petri al horno a una temperatura de 50 grados Celsius durante 5 horas (Hornbeck, 2017).

Una vez seca la capa inicial de agar, se preparó una solución de agar al 2% en PBS y se repitió el proceso de homogenización. Los pocillos se realizaron de forma individual empleando una aguja quirúrgica. Se realizaron a una distancia de 1 cm del pozo central y a 0.5 cm entre sí en los extremos. Cada pozo fue rellenado con 15 ul de muestra, evitando que quedaran remanentes en la parte exterior de los pozos (Hornbeck, 2017).

Para establecer si existe una diferencia significativa entre la el tipo de antídoto en relación al grado de neutralización, así como si la interacción entre población evaluada tiene un efecto significativo. Se diseño un ensayo estadístico 2 a la k. Debido que los datos no tienen una distribución normal se requirió una prueba no paramétrica y que pudiese evaluar dos niveles dentro de las muestras.

VII. RESULTADOS

A. Concentración proteica de muestras de veneno estimada por ensayo Bradford

A pesar de que las concentraciones finales varían entre sí, esta diferencia no implicó ninguna asociación respecto a las poblaciones evaluadas. La cantidad de veneno está más relacionada al tamaño del individuo, debido a que el único factor de selección fueron individuos de más de 1 metro de largo, hubo cierta variabilidad.

Cuadro 7. Datos adicionales sobre individuos evaluados

Código de individuo	Población	Largo (m)	Tiempo en cautiverio
S1	Sur	1.5	Silvestre
S2	Sur	2.0	Silvestre
S	Sur	1.6	Más de 10 años
S4	Sur	1.4	Silvestre
X	Norte	2.2	8 años
Nn	Norte	1.2	Más de 5 años
Na	Norte	1	Más de 5 años
N-	Norte	1.2	Más de 5 años
Nj	Norte	1.7	Más de 5 años

Cada individuo corresponde a la siguiente locación, los códigos (S1), (S2) y (S3) fueron recolectados del Centro de Rescate Antigua Exótica en donde luego de pasar por una revisión impartida por un veterinario se aceptó a realizar el proceso de extracción. Los códigos (N1) y (N2) corresponden a individuos de la Colección Privada de Carlos Patzán. Los códigos (S4), (N3), (N4) y (N5) corresponden a individuos del Parque Zoológico la Aurora.

Cuadro 8. Concentración de muestras de veneno a una disolución de 1:100, realizada para obtener valores de absorbancia dentro de la curva estándar que se muestra en la Figura 5.

No. de muestra	Código de muestra	Población	Promedio de absorbancia 595 nm	Concentración final (ug)
1	S1	Sur	0.613	602.84
2	S2	Sur	0.657	592.25
3	S3	Sur	0.695	639.75
4	S4	Sur	0.642	573.50
5	N1	Norte	0.658	593.50
6	N2	Norte	0.669	607.25
7	N3	Norte	0.683	624.75
8	N4	Norte	0.671	609.75
9	N5	Norte	0.643	574.75

B. Ensayo de SDS Page

Los geles producidos en los anexos 5 y 6 produjeron el siguiente patrón de bandas. Para el análisis de bandas e intensidad se empleó el software Free Online Gel Analyzer para interpretar las imágenes. En ambos ensayos se produjeron 10 bandas, a pesar de que no pueden considerarse proteínas individuales por los pesos moleculares cercanos, si es posible realizar agrupaciones de pesos moleculares cercanos. La diferencia en intensidad de bandas es igualmente un indicativo de la intensidad, esta fue medida y asociada a cada muestra para realizar un promedio poblacional.

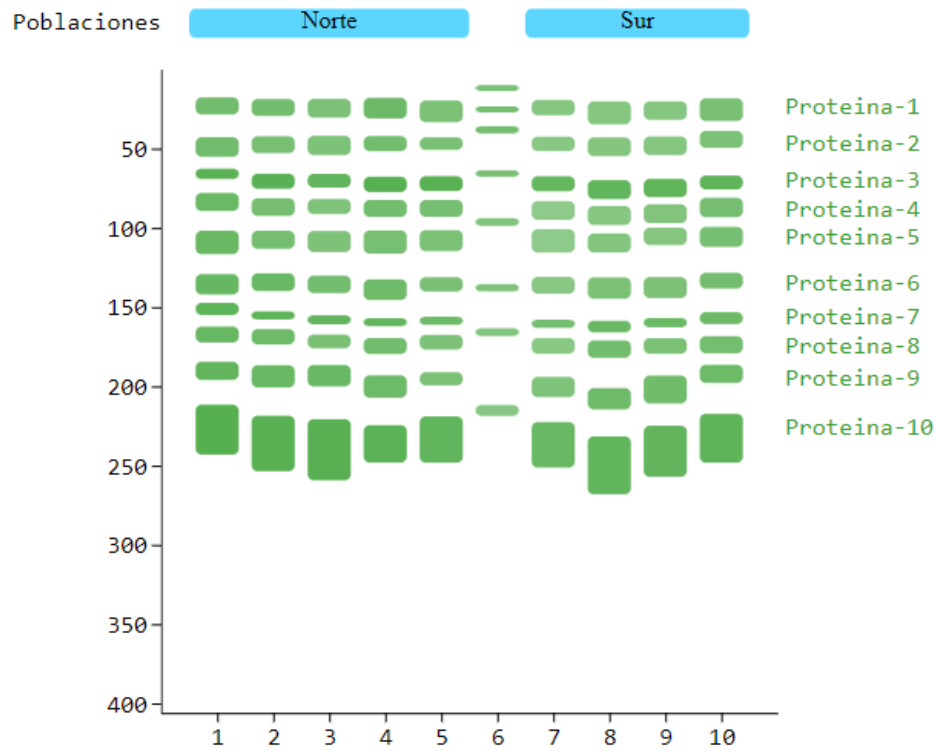


Figura 7. Patrón de bandas generado a partir de gel de SDS, el eje x comprende cada uno de los pozos con muestras siendo el orden de muestras según el código del Cuadro 7 el siguiente: (1-N1), (2-N2), (3-N3), (4-N4), (5-N5), (6-Escalera), (7-S1), (7-S2), (7-S3) y (7-S4). El eje y comprende el peso molecular en relación con la distancia recorrida por la escalera molecular. El orden de etiquetado de los grupos de proteínas corresponde al orden conforme se fueron visualizando las bandas en el software y no tiene relación con el peso molecular de la banda.

Cuadro 9. Asociación de bandas a complejos proteicos, las proteínas asociadas se relacionan de los estudios de proteómica realizados por Calvete et al. (2011)

Banda	Peso molecular kDa	Proteínas asociadas
Proteína-10	11.76-15.92	Bothrasperina
		PLA ₂ 1 PLA ₂ 2
		Miotoxina PLA ₂
		Miotoxina I Miotoxina II Miotoxina III Miotoxina IV
Proteína-9	16.16-19.71	PLA II
		Proteinasa G
Proteína-8	23.32-25.96	BaP1 BH2
		Ficozima
Proteína-7	26.55-30.87	Proteína similar a Trombina
		PLA ₂ 3
		Aspercetina
		Asperasa
Proteína-6	38.27-40.24	PLA I
Proteína-5	56.49-58.37	BH3
Proteína-4	69.2-76.47	PIII

Banda	Peso molecular kDa	Proteínas asociadas
Proteína-3	70.23-88.25	Basparina A
		BaH4
Proteína-2	117.24-125.36	Lao 1 Lao 2a
Proteína-1	131.14-138.52	Lao 2b

Los resultados asociados a que proteínas se encuentran en cada banda tienen cierto grado de error, el más notable está asociado al peso molecular que se ha reportado en la literatura y el encontrado en el gel de electroforesis. Específicamente con lo reportado en la sección de proteómica por Calvete et al. (2011), los pesos moleculares varían significativamente.

Empleando el promedio de intensidad de cada banda se analizó el factor de aumento requerido por el promedio de intensidad de bandas del Norte para alcanzar el promedio de intensidad de bandas del Sur.

Cuadro 10. Concentración relativa de complejos proteicos por banda

Proteína-1		
Intensidad de Banda	Promedio de intensidad	Factor respecto a población Sur
Población Norte	93422	1.25
Población Sur	116686.25	
Proteína-2		
Intensidad de Banda	Promedio de intensidad	Factor respecto a población Sur
Población Norte	87810.8	1.23
Población Sur	108029	
Proteína-3		
Intensidad de Banda	Promedio de intensidad	Factor respecto a población Sur
Población Norte	96560.4	1.34
Población Sur	119719.25	
Proteína-4		
Intensidad de Banda	Promedio de intensidad	Factor respecto a población Sur
Población Norte	84127.8	1.31
Población Sur	110576	

Proteína-5		
Intensidad de Banda	Promedio de intensidad	Factor respecto a población Sur
Población Norte	107950.4	1.11
Población Sur	119719.25	
Proteína-6		
Intensidad de Banda	Promedio de intensidad	Factor respecto a población Sur
Población Norte	95812.6	1.21
Población Sur	116870	
Proteína-7		
Intensidad de Banda	Promedio de intensidad	Factor respecto a población Sur
Población Norte	53670.4	1.36
Población Sur	73241.25	
Proteína-8		
Intensidad de Banda	Promedio de intensidad	Factor respecto a población Sur
Población Norte	79204.4	1.31
Población Sur	103960.25	
Proteína-9		
Intensidad de Banda	Promedio de intensidad	Factor respecto a población Sur
Población Norte	129720.2	1.26
Población Sur	163731.25	
Proteína-10		
Intensidad de Banda	Promedio de intensidad	Factor respecto a población Sur
Población Norte	358854.2	1.18
Población Sur	424410.75	

C. Ensayo comparativo de hemólisis libre en sangre

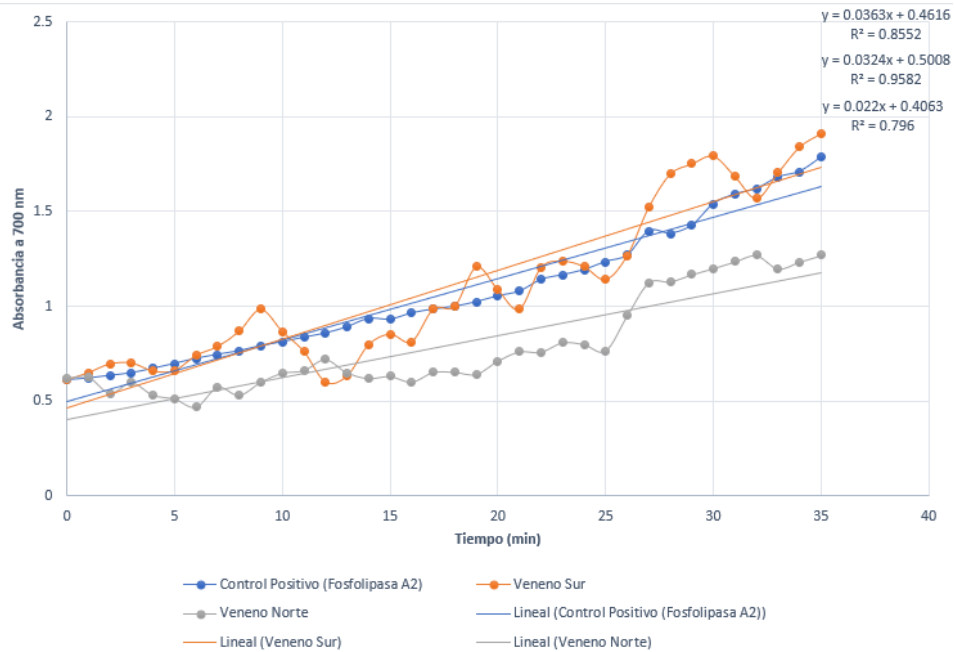


Figura 8. Actividad hemolítica observada en muestras de sangre bovina desfibrinada para una mezcla de veneno de los individuos del sur y de norte. En contraste con un control positivo de Fosfolipasa A2 a una concentración de 300 ug.

El ensayo mostró una tendencia diferenciada entre las poblaciones evaluadas. Evaluando la línea del centro como control positivo, se observa como la población del sur está por debajo de la actividad generada por 300 ug de fosfolipasa A2 en un 1 ml de sangre de cordero. Mientras que la población del norte supero esta actividad hemolítica.

La linealidad de los datos es aceptable, estando todos por encima de un R cuadrado de 0.8, conforme las células se lisaron en la muestra los restos de células se dispersan en lo que se convierte una fase líquida y una fase semi líquida. Por tanto, durante las mediciones se evitó mover extensamente la celda conteniendo la muestra para no mezclar las fases. Se le dio a cada muestra un tiempo aproximado de espera para homogenizarse, siendo de 10 segundos.

D. Ensayo de inmunodifusión

Cuadro 11. Interacción de ensayos de inmunodifusión

Muestra	Interacción							
	Suero antiofídico polivalente Costa Rica				Suero antiofídico polivalente Biol Argentina			
	A	B	C	D	A	B	C	D
1	+	+++	-	-	++	+	-	++
2	+	++	-	-	++	+	-	++
3	+	++	-	-	+++	+	-	+
4	+	++	-	-	++	+	-	++
5	++	+++	-	-	+	++	-	+
6	+	++	-	-	++	+	-	+
7	+	+	-	-	++	+	-	+
8	+	++	-	-	++	++	-	++
9	+	+	-	-	+	+	-	++

El cuadro contiene la siguiente nomenclatura, + implica que hay identidad en la muestra, - implica que no hay identidad, los ensayos pueden evaluarse en un rango de +, ++, +++ acorde a la intensidad observada del complejo antígeno-anticuerpo. 0 implica solo una identidad parcial. Mientras que las letras A, B, C y D corresponden a: A veneno de *Bothrops asper* como control positivo, B veneno de *Crotalus simus*, C agua como control negativo y D veneno de *Metlapilcoatlus occiduus*. Únicamente las muestras de veneno de *B. asper* corresponden a individuos distintos, el resto de los venenos B, C y D provienen de un mismo individuo. Las figuras de cada una de las pruebas se encuentran en anexos.

Las hipótesis de la prueba estadística 2 a la K fueron las siguientes:

Por nivel A

- Ho: No existe diferencia estadísticamente significativa en el grado de neutralización debido a los niveles de región.
- Ha: Existe diferencia estadísticamente significativa en el grado de neutralización debido a los niveles de región.

Por nivel B

- Ho: No existe diferencia estadísticamente significativa en el grado de neutralización debido a los niveles de tipo de suero.
- Ha: Existe diferencia estadísticamente significativa en el grado de neutralización debido a los niveles de tipo de suero.

Por efecto AB

- Ho: No existe diferencia estadísticamente significativa en el grado de neutralización debido al efecto de la interacción entre los niveles de región y tipo de suero.
- Ha: Existe diferencia estadísticamente significativa en el grado de neutralización debido al efecto de la interacción entre los niveles de región y tipo de suero.

Cuadro 12. Ensayo estadístico 2 a la k

ANOVA				
Factores	S.C	G.L	M.C	F
Factor A	0.25	2	0.25	0.8571
Factor B	2.25	2	2.25	7.7143
Interacción AB	0.00	2	0.00	0.0000
Residual	3.50	12	0.29	
Total	6.00	15		

El Factor A, corresponde a la población evaluada (0::Norte y 1::Sur). Factor B, corresponde al tipo de suero antiofídico evaluado (0::Costa Rica y 1::Argentina). Los resultados de la prueba estadística mostraron que el tipo de suero antiofídico tienen un efecto significativo sobre el grado de neutralización de la muestra. Mientras que la

población y la interacción población/tipo de suero antiofídico respecto a nivel de neutralización no posee una diferencia significativa.



Figura 9. Ensayo de inmunodifusión con orden inverso con una muestra del veneno de *B. asper* (N1) en el centro, suero antiofídico polivalente de costa rica en el pozo izquierdo y suero antiofídico polivalente Biol de Argentina en el pozo derecho.

VIII.DISCUSIÓN

A. Ensayo Bradford

La concentración de proteínas en las muestras no mostró ninguna diferencia a nivel poblacional, la variación puede explicada mayormente por las diferencias fisiológicas de los individuos. Factores como la edad, alimentación, tamaño, y salud en general, no fueron evaluada. Debido a que algunas de las muestras de veneno se obtuvieron de individuos rescatados que se encontraron en zonas donde implicaban un riesgo para personas, se desconoce cuáles fueron las condiciones de desarrollo previas a la extracción de veneno (Daban, 2001). Esta diferenciación entre las condiciones de individuos empleados para la extracción de veneno y la concentración del veneno sirve para ejemplificar la variabilidad propia de accidentes ofídicos.

Parte del porque la concentración aparente de todas las muestras de veneno excede el promedio general de la literatura puede deberse a la metodología seleccionada. Convencionalmente, es preferible emplear un proceso de liofilización para extraer todo el peso de agua de la muestra. El resultado de este proceso puede pesarse y tratarse como una concentración de peso seco. Un ensayo Bradford permite una aproximación, sin embargo, no un dato lo suficientemente exacto como para compararlo con la literatura (Antunes, Yamashita, Barbaro, Saiki & Santoro, 2010).

B. Ensayo SDS Page

El gel de electroforesis SDS Page, mostró 10 bandas individuales para cada una de las muestras evaluadas. Al analizar los pesos moleculares con relación a la escalera molecular utilizada se asociaron las proteínas en pesos moleculares similares para establecer la muestra compleja que contiene cada banda. Este método sirve como aproximación para identificar las posibles proteínas dentro de una banda.

Cada una de las bandas posee un valor de intensidad, esto es dado por el software (Gel Analyzer Online) empleado para analizar el gel. Al comparar estos valores de intensidad respecto a al promedio de intensidad para las bandas de la población Sur, se encontró que el veneno de individuos del Sur posee una mayor concentración relativa de proteínas. Evaluando aquellos factores que superaron en un factor 1.25 la concentración de la población Norte se obtienen las siguientes agrupaciones de bandas: Proteína-3, Proteína-4, Proteína-7, Proteína-8 y Proteína-9. Esto se traduce en una diferencia significativa para las siguientes proteínas:

Proteína-3, posibles Basparina A y BaH4; La metaloproteinasa de veneno de serpiente basparina A (SVMP) es una glicoproteína que activa la protombina a través de la formación de meizotrombina, sin emplear cofactores adicionales. Por lo que se le considera un activador de protrombina. En ensayos con ratones se ha encontrado que esta proteína no induce alteraciones tisulares locales, ni hemorragia sistemática. Pero si ha mostrado la formación de trombos oclusivos en vasos pulmonares por lo que puede que este sea de sus principales aportes en el envenenamiento por *B. asper* (Loria et al. 2003). La metaloproteinasa hemorrágica BaH4 ha mostrado actividad proteolítica sobre caseína, polvo de piel azul y fibrina. Así mismo en ensayos con ratones, esta proteína ha desarrollado hemorragias severas en músculos gastrocnemios y cremáster. Por lo que esta proteína puede desarrollar un papel relevante en el sangrado local y sistemático durante el envenenamiento (Franceschi et al. 2000).

Proteína-4, posible BaH1. La metaloproteinasa BaH1 se reconoce como una proteína con capacidad de inducir hemorragia en tejidos, aunque no está relacionada a una acción citotóxica sobre el endotelio. Lo que sugiere que los daños a células endoteliales son el resultado de un mecanismo indirecto que aun requiere estudio. Sin embargo, los efectos y aportes durante un accidente ofídico son evidentes (Lomonte et al. 1994).

Proteína-7, posibles Proteína similar a Trombina, PLA₂3, Aspercetina y Asperasa. La serina proteinasa con actividad similar a la trombina fomenta la producción de micro coágulos en la sangre, así como la desfibrinogénación. Además, ha mostrado inducir ciertos cambios en comportamiento y pérdida de reflejos en ratones (Pérez et al. 2008). La fosfolipasa A2 tipo 3 se diferencia del resto ser parte del subgrupo: Asp49(D49) que es la

proteína que posee actividad de fosfolipasa y ser la isoforma y Lys49 (K49) básica con 266 residuos con 16 residuos de metionina. La proteína presenta una actividad altamente miotóxica, presenta hemólisis indirecta, inhibición de agregación plaquetaria y propiedades asociadas a la hipotensión. Sin embargo, el factor miotóxico suele ser el más grave, sobre todo cuando se da sinergia con miotóxicos D49 y K49 (Ferreira et al. 2013). La aspercetina perteneciente a las lectinas tipo C ha mostrado inducir la agregación plaquetaria en presencia de plasma. Si bien esta proteína carece de efecto anticoagulante y no aglutina eritrocitos, si induce la caída rápida de plaquetas y prolonga el tiempo de sangrado. Por lo que desarrolla un papel importante en la trombocitopenia (Rucavado, 2001). La serina proteasa asperasa, ha sido evaluada mediante inyección intravenosa en ratones. Lo que ha provocado coagulopatías, específicamente desfibrinación. A su vez induce un efecto de pérdida de enderezamiento, opistótono y rotaciones intermitentes sobre el eje longitudinal del cuerpo, sin embargo, los efectos desaparecen al cabo de 10 minutos (Pérez et al. 2008).

Proteína-8, posibles BaP1, BH2 y Ficozima. La metaloproteína BaP1 ha exhibido actividad hemorrágica débil, siendo necesarios al menos 20 µg inyectados de forma intramuscular en ratones. La toxina también es capaz de degradar componentes de la membrana basal colágeno. Por último, activa el sistema del complemento e induce quimiotaxis de neutrófilos al ser evaluada en ratones (Carolina et al. 2013). La metaloproteína BH2 demuestra tener actividad hemorrágica pulmonar al realizarse ensayos en ratones, resultando esto en la muerte del individuo, lo que da indicios sobre su toxicidad sistemática y papel durante el envenenamiento. La ficozima actúa como enzima convertidora de fibrinógeno, por tanto, su papel es la transformación de fibrinógeno en fibrina para la formación de microcoágulos durante el accidente ofídico (Fortová, Dyr & Suttner, 1990).

Proteína-9, posibles PLA II y Proteína G. Esta fosfolipasa A2 corresponde a la clase Asp49-PLA₂, el mecanismo miotóxico a aun no es conocido, sin embargo, la actividad es similar a la fosfolipasa A2 descrita anteriormente (Ferreira et al. 2013). La metaloproteína proteína G es una glicoproteína reconocida principalmente por su actividad hidrolítica sobre sustratos de proteína como caseína, hemoglobina y fibrinógeno.

A pesar de esto la proteína no muestra actividad hemorrágica, estereolítica o amilolítica (Aragon-Ortiz & Gubensek, 1987).

A pesar de que las proteínas descritas anteriormente son las que presentan la mayor probabilidad de ser las responsables de generar las bandas en el gel de SDS Page, cabe mencionar que las diferencias observadas en actividad hemolítica y respecto a la neutralización del veneno mediante ensayos de inmunodifusión pueden deberse a la presencia de isoformas aun no reconocidas. Por lo que es necesario continuar el análisis de veneno a nivel poblacional mediante técnicas como SDS Page de dos dimensiones (Alape-Girón et al. 2008). De igual forma, como se traducen estos cambios en la concentración relativa de proteínas para los accidentes ofídicos aun depende de conocer las proteínas que aumentan la concentración como tal. De momento el alcance del estudio permite establecer que las coagulopatías, miotoxicidad y citotoxicidad se verán aumentadas para la mayoría de los casos severos de envenenamiento en la región Sur del país. Y hasta qué punto esto puede tener un efecto diferencial sobre los pacientes dependerá de estudios clínicos consecuentes.

C. Ensayo de hemólisis

La medición de hemoglobina libre en sangre demostró como el comportamiento respecto al tiempo de cada muestra fue diferencial. El uso 300 ug de veneno y del control positivo se escogieron a partir de la concentración total del veneno obtenido. En promedio se obtuvieron alrededor de 600 ug de veneno por cada individuo dentro del estudio. Al contrastar el comportamiento de la Figura 7 con las posibles proteínas que causan la diferencia en concentración del veneno entre poblaciones, ambos ensayos apuntan a que hay una diferencia significativa en proteínas asociadas a la hemolisis. Tomando en cuenta que de las proteínas de mayor concentración que constituyen el veneno de *B. asper* corresponden al grupo de las fosfolipasas A2, este es uno de los principales puntos de interés para continuar la investigación.

Parte de la problemática con este ensayo es que el uso de la muestra cruda de veneno contiene proteínas que no presentarán actividad respecto a la muestra de sangre de bovino. Además de esto, conforme la prueba se extiende en mediciones y aumenta la lisis celular, los datos de espectrofotómetro pueden verse alterados por la separación de la muestra en

una fase líquida y una semisólida conteniendo la mayoría de los restos celulares. Si bien el experimento ejemplifica una diferencia en actividad, también justifica el uso de ensayo específicos para medir actividad enzimática. Tomando como punto de partida a la fosfolipasa A2, las mediciones de la actividad enzimática pueden realizarse mediante el ensayo de coagulación de emulsión de yema de huevo descrito por Vidal y Stoppani, 1986.

Cabe destacar que un modelo animal es fundamental para entender la extensión de los efectos del veneno y como las diferentes familias de proteínas interactúan a nivel histológico sobre el modelo animal (Lomonte, Angulo & Calderón, 2003).

D. Ensayos de inmunodifusión

La formación de las líneas de precipitado entre pozos como se muestra en la Figura 8 y en los anexos de ensayos de inmunodifusión corresponde a la formación del complejo antígeno-anticuerpo, por lo que, a mayor intensidad y tamaño de línea de precipitado, mayor es la cantidad de toxinas que han sido neutralizadas para la muestra. Esta unión es específica por lo que cada anticuerpo corresponde a un antígeno. En el contexto de la función de un suero antiofídico, el propósito es neutralizar a la mayor cantidad de toxinas asociadas a los daños más severos del tejido y condiciones que pongan en riesgo la vida de la persona como hemorragias sistémicas (Kruse et al. 1991). La especificidad necesaria para neutralizar la mayoría de las toxinas se consigue mediante el uso de las mismas toxinas para producción de antisuero. De modo que un antisuero cuyo objetivo es ser anti bothropico para un territorio como Guatemala requiere que durante inmunización del animal se emplee veneno de *Bothrops* de Guatemala.

Acorde al supuesto anterior se evaluaron los sueros antiofídicos de más fácil acceso presentes en Guatemala y se determinó que el suero antiofídico polivalente Biol, producido en Argentina, es que presenta la mayor capacidad neutralizante frente a una muestra de veneno de *B. asper*. Tanto para la población del norte como sur se demostró esta diferencia estadísticamente significativa, a pesar de que no se encontró diferencia de neutralización a nivel de poblaciones, esto puede deberse por la sensibilidad de la prueba.

Si bien a nivel exploratorio la prueba de inmunodifusión muestra una diferencia entre poblaciones, es necesario corroborar estos datos con modelos animales para entender la extensión del daño que se puede generar a nivel histológico al simular un

envenenamiento. Esto en conjunto con más pruebas como espectroscopia de masa, metodologías con base a ELISA y espectroscopia de rayos X, permitirán dilucidar las interacciones específicas de antígeno-anticuerpo que se producen y ayudará a entender las limitaciones de los sueros antiofídicos y la relación entre sí para contrarrestar proteínas del veneno de *B. asper*. Parte fundamental de la línea de investigación es poder presentar un panorama sobre el tratamiento de accidentes ofídicos a nivel de país, y evaluar las rutas más efectivas para reducir la mortalidad de este tipo de eventos en conjunto con las secuelas irreversibles graves que presenta el 90% de las personas afectadas.

E. Hipótesis sobre cambio en la composición del veneno

Como se ha descrito en el marco teórico, las dos poblaciones de *B. asper* en Guatemala han pasado aisladas por al menos 2.1 millones de años. Al ser depredadores generalistas cuyo principal método de caza es emboscar a la presa y presentar un alto grado de adaptación a ecosistemas perturbados por actividades humanas. Es posible que las poblaciones se vean sujetas distintas presiones evolutivas que causen cambios la deriva genética, la estructura poblacional y el flujo de genes.

En el estudio de Calvete et al. (2001) se analizaron 16 poblaciones diferentes de *Bothrops atrox* a lo largo del norte y centro de Suramérica. Como resultado encontraron que el patrón de variabilidad intraespecífica de PLA2 puede haberse originado por eventos de dispersión que resultaron en la colonización de nuevos hábitats y diferenciación del grupo original en poblaciones simpátricas. Por lo tanto, el mapeo de la diversidad molecular entre poblaciones conespecíficas en un mapa físico proporciono varias rutas para rastrear la dispersión que dio con la distribución biogeográfica actual de la especie.

En otro caso con *Crotalus scutulatus* en donde acorde a la disponibilidad de presas, la población de un área geográfica tiende a tener un veneno de carácter principalmente neurotóxico (Lomonte, Angulo & Calderón, 2003). En este caso la principal hipótesis sugiere que, debido al alto contenido de aves en la dieta de la serpiente, se favorece veneno capaz de paralizar a la presa en el menor tiempo posible. Mientras que otra población posee un veneno de carácter hemorrágico. Esto según el estudio se asocia a presas de mayor tamaño que representan un estilo de caza en donde la serpiente persigue a la presa conforme

esta sucumbe a una hemorragia sistemática (Pérez, Rucavado, Sanz, Calvete, & Gutiérrez, 2008).

En el caso descrito anteriormente, factores como la variación del nicho que ocupaba la población, así como ventajas evidentes de cierto tipo de veneno, fueron aspectos claves para comprender la variación de veneno entre poblaciones. Por lo que este precedente establece el siguiente paso en el análisis de veneno de *B. asper* a nivel de poblaciones Norte y Sur. Ya que se ha establecido que existe una diferencia significativa entre los venenos. Lo que hace que la probabilidad de que también exista una diferencia entre accidentes ofídicos se alta.

F. Recomendaciones

Las recomendaciones se han planteado en dos aspectos, el principal siendo como mejorar respecto al trabajo realizado para la generación de más datos y aspectos mejorables sobre las técnicas empleadas en este trabajo.

- A pesar de que el protocolo de Bradford para la cuantificación de proteínas establece que el tiempo de incubación puede realizarse de entre 5 a 30 minutos, los resultados obtenidos se dieron con una incubación de 20 minutos. Por tanto, para muestras similares se recomienda esta modificación.
- Se recomienda emplear un proceso de liofilización al comienzo del estudio, esto en parte por el beneficio de conservación de la muestra, pero de igual forma para el análisis de concentración proteica, ya que el proceso elimina el agua de la muestra y el peso final puede emplearse para establecer una concentración proteica aproximada.
- Debido a que una corrida extensa en el sistema de SDS Page puede aumentar la temperatura significativamente, se recomienda un sistema de reflujo enfriado con hielo durante toda la corrida. Esto permite mantener la temperatura más baja y evitar que el gel se derrita durante el ensayo.
- Al momento de cargar las muestras en el gel de SDS Page, se recomienda emplear un volumen de 15 ul de muestra, esto permite una mayor claridad de bandas, aunque es al costo de un proceso llamado “smearing” que hace que el carril de la banda se va de coloración azul debido a rastros de la muestra.

- Igualmente se recomienda no emplear los carriles de los extremos del gel, ya que estos son los que sufren la mayor distorsión al momento de realizar el ensayo.
- Es oportuno cargar de forma alterna un carril si y uno no, esto evita que factores como la difusión lateral hagan que las muestras se mezclen entre si y se pierdan bandas debido a esta contaminación.
- Durante la electroforesis de SDS Page, es posible modificar la concentración del Buffer de corrida en relación con el amperaje durante la corrida. Esto únicamente se recomienda en casos donde el amperaje proveniente de la fuente eléctrica se bajó, de 30 mA hacia abajo. La importancia de esto es mantener una velocidad mayor de corrida en el gel evitando la difusión horizontal de muestra en el gel.
- En el ensayo de hemolisis, se recomienda ampliar los tiempos de medición, debido a la actividad hemolítica que se produce por la enzima fosfolipasa A2 y las muestras de veneno. Esto permite que al momento en donde se forma una fase líquida y una semisólida, el movimiento de la celda de medición no perturbe esta mezcla dando resultados con alto margen de error.
- Analizar diferencias a nivel de ecosistema para las poblaciones del Norte y Sur, determinando si existen factores bióticos que hayan influido en el cambio del veneno.
- Convalidar los resultados obtenidos por el SDS Page mediante SDS Page de dos dimensiones, HPLC y MALDI-TOF. Realizando análisis propios de proteómica.
- Corroborar con modelos animales si existe una diferencia significativa a nivel de actividad hemolítica para el veneno.

IX. CONCLUSIONES

- A pesar de que se han encontrado aspectos diferenciales en la composición del veneno de las poblaciones evaluadas de *Bothrops asper*. No se logró establecer específicamente que proteína o proteínas son las causantes de los efectos observados en el ensayo de hemólisis de sangre.
- Es altamente probable que las diferencias entre poblaciones sean de relevancia médica debido a su efecto en la sangre. Por lo que es necesario realizar ensayos clínicos de los efectos del envenenamiento en modelos animales para establecer los efectos in vivo.
- Debido a la alta variabilidad en reportes de la concentración del veneno de *Bothrops asper*, hace que el ensayo de Bradford y los resultados sean un estándar para esta medición, tomando en consideración el tamaño, edad, y alimentación de los especímenes son datos acordes a la mayor parte de la literatura.
- El ensayo SDS logró mostrar la mayoría de las bandas esperadas para las muestras de veneno. El factor de error respecto a los pesos de las proteínas y los que se establecieron mediante la correlación con la escalera molecular se debió en su mayoría a las condiciones de corrida.
- La concentración de bandas específicas del ensayo SDS Page mostraron como ciertos grupos proteicos presentan una concentración distinta. A pesar de que se desconoce con exactitud a que proteínas corresponde esta diferencia, se llegó a una aproximación respecto al peso molecular.
- Existe una actividad hemolítica diferenciada entre poblaciones respecto a la actividad que expone la enzima fosfolipasa A2.
- A pesar de que ambos sueros antiofídicos mostraron una actividad de neutralización, la intensidad de la banda y por ende la cantidad de proteínas que se neutralizan mediante la interacción del complejo antígeno anticuerpo es diferente. Presentando una mayor actividad el suero antiofídico polivalente Biol.

IV. LITERATURA CITADA

Akerström, B; Brodin, T; Reis, K; Björck, L (1985). Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies . *The Journal of immunology* (American Association of Immunologists) 135 (4): 2589-2592.

Antunes, T. C., Yamashita, K. M., Barbaro, K. C., Saiki, M., & Santoro, M. L. (2010). Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon*, 56(8), 1443–1458. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2010.08.011>

Aragon-Ortiz F, Gubensek F. Characterization of a metallo-proteinase from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom (1987). *Toxicon*;25(7):759-66. doi: 10.1016/0041-0101(87)90126-7. PMID: 3672544.

Brada, Daniela; Roth, Jurgen (1984). 'Golden blot'--Detection of polyclonal and monoclonal antibodies bound to antigens on nitrocellulose by protein A-gold complexes ['Detección con oro' -- Detección de anticuerpos monoclonales y policlonales unidos a antígenos sobre nitrocelulosa por complejos de proteína A-oro]. *Analytical Biochemistry (Elsevier)* 142 (1): 79-83. [doi:10.1016/0003-2697\(84\)90518-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90518-9).

Burnette, Harry W (1981). Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate — polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A [Western blot: transferencia electroforética de proteínas desde geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico a nitrocelulosa no modificada y detección radiográfica con anticuerpos y proteína A radioionizada]. *Analytical Biochemistry (United States: Academic Press)* 112 (2):195-203. [doi:10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5).

Calderón, L., & Lomonte, B. (1998). Immunochemical characterization and role in toxic activities of region 115-129 of myotoxin II, a Lys49 phospholipase A2 from *Bothrops*

asper snake venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 358(2), 343–350.
<https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0853>

Calvete, J. J., Sanz, L., Angulo, Y., Lomonte, B., & Gutiérrez, J. M. (2009). Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Letters*, 583(11), 1736–1743.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.029>

Calvete JJ, Sanz L, Pérez A, Borges A, Vargas AM, Lomonte B, Angulo Y, Gutiérrez JM, Chalkidis HM, Mourão RH, Furtado MF, Moura-Da-Silva AM (2011). Snake population venomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. *J Proteomics*. Apr 1;74(4):510-27. doi: 10.1016/j.jprot.2011.01.003.

Campbell J. A. & Lamar W. W. (2004). *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Cornell University Press. Ithaca, USA.

Carolina P. Bernardes, Danilo L. Menaldo, Erika Camacho, José C. Rosa, Teresa Escalante, Alexandra Rucavado, Bruno Lomonte, José M. Gutiérrez, Suely V. Sampaio, (2013) Proteomic analysis of *Bothrops pirajai* snake venom and characterization of BpirMP, a new P-I metalloproteinase, *Journal of Proteomics*, Volume 80, Pages 250-267, ISSN 1874-3919, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.01.021>.

Daban, Joan-Ramon (2001). Fluorescent labeling of proteins with Nile red and 2-methoxy-2,4-diphenyl-3(2H)-furanone: Physicochemical basis and application to the rapid staining of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels and Western Electrophoresis 5 (22): 874-880. [doi:10.1002/1522-2683\(200102\)5:5<874::AID-ELPS874>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200102)5:5<874::AID-ELPS874>3.0.CO;2-U).

Davis BJ (1964). Disc Electrophoresis. 2, Method and application to human serum proteins. *New York Acad. Sci* 121: 404-427. [PMID 14240539](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14240539/).

Davis BJ, Ornstein L (1959). A new high-resolution electrophoresis method. Delivered at the Society for the Study of Blood at the New York Academy of Medicine.

Ferreira FB, Gomes MS, de Souza DL, Gimenes SN, Castanheira LE, Borges MH, et al. (2013) Molecular cloning and pharmacological properties of an acidic PLA2 from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxins* (Basel); 5(12):2403-2419.

Francis, B., Gutierrez, J. M., Lomonte, B., & Kaiser, I. I. (1991). Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A2. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 284(2), 352–359. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90307-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90307-5)

Franceschi A, Rucavado A, Mora N, Gutiérrez JM. (2000) Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon*. Jan;38(1):63-77. doi: 10.1016/s0041-0101(99)00127-0. PMID: 10669012.

Grasset, E., Brechbuhler, T., Schwarz, D.E., Pongranz, E. (1956) Comparative analysis and electrophoretic fractionations of snake venoms with special reference to *Vipera russelli* and *Vipera aspis* venoms: In: Buckely, E.E., Porges, N. (Eds.): *Venoms*, pp. 153–169. *American Association for the Advancement of Science Publication 44*, Washington D.C.

Golgi C (1873). Sulla struttura della sostanza grigia del cervello. *Gazzetta Medica Italiana*(Lombardia) 33: 244-246.

Gutiérrez J. M. & Lomonte B. (2009). Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. pp.352-365. En: *Animais peçonhentos no Brasil*. Biología, clínica e terapêutica dos acidentes. Eds. Cardoso J. L. C., França F. O. S., Wen F. H., Málaque C. M. S. & Haddad Jr V. 2ª ed. Sarvier, São Paulo, Brasil.

Gutiérrez, José. (2011). Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. 51 (1), 1-16.

El-Hawary, M.F.S., Hassan, F. (1979) Physicochemical properties of venoms of *Cerastes cerastes* and *Cerastes vipera*. *Egypt. J. Phys. Sci.* 1, 9–18

Hempelmann E, Schulze M, Götze O (1984). Free SH-groups are important for the polychromatic staining of proteins with silver nitrat. Neuhof V (ed) *Electrophoresis '84*, Verlag Chemie Weinheim 1984: 328- 330.

Kerenyi L, Gallyas F (1973). «Über Probleme der quantitativen uswertung der mit physikalischer Entwicklung versilberten Agarelektrophoretogramme». *Clin. Chim. Acta* 47: 425-436.

Köhler, Gunther, (2003) “Reptiles de Centroamérica”, p.299, *Herpeton*, Verlag Elke Köhler, Offenbach, Alemania,

Kohlrausch F (1897). Ueber Concentrations-Verschiebungen durch Electrolyse im Inneren von Lösungen und Lösungsgemischen. *Ann.J.Phys.u.Chem.* 62: 209-239.

Kurien, Biji T; Scofield, Hal (2009). Chapter 3 - Introduction to Protein Blotting. Introduction to Protein Blotting [Introducción a la transferencia de proteínas]. *Methods in Molecular Biology* (en inglés) 536. *Humana Press*. pp. 9-22. [doi:10.1007/978-1-59745-542-8_3](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-542-8_3).

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): 680-685. [PMID 5432063](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5432063/).

Lomonte B, Gutiérrez JM, Borkow G, Ovadia M, Tarkowski A, Hanson LA. (1994) Activity of hemorrhagic metalloproteinase BaH-1 and myotoxin II from *Bothrops asper* snake venom on capillary endothelial cells in vitro. *Toxicon*. Apr;32(4):505-10. doi: 10.1016/0041-0101(94)90302-6.

Loría GD, Rucavado A, Kamiguti AS, Theakston RD, Fox JW, Alape A, Gutiérrez JM. 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*. 2003 Oct 1;418(1):13-24. doi: 10.1016/s0003-9861(03)00385-0. PMID: 13679078.

Lomonte, B., Angulo, Y., & Calderón, L. (2003). An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon*, 42(8), 885–901. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.008>

Ma, Hongbao (2006). Western Blotting Method (pdf). *The Journal of American Science* (Department of Medicine, Michigan State University, Estados Unidos) 2 (2): 23-27.

Mahmood, Tahrin; Yang, Ping-Chang (2012). Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting [Western blot: Técnica, teoría y solución de problemas]. *N Am J Med Sci* (en inglés) (Canadá: Medknow Publications) 4 (9): 429-434 [doi:10.4103/1947-2714.100998](https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998).

Moav, B., Gilter, S., Wellwart, Y., Amiel, S. (1964) Tracing and trace element composition of snake venom by activation analysis. *Radiochem. Meth. Anal. Proc. Symp.* (Salzburg) 1, 205–215

Pérez, A.V., Rucavado, A., Sanz, L., Calvete, J.J., Gutiérrez, J.M., 2008. Isolation and characterization of a serine proteinase with thrombinlike activity from the venom of the snake *Crotalus simus* Braz. *J. Med. Biol. Res.* 41, 12–17.

Olsen, I; Wiker, HG (2009). Diffusion blotting for rapid production of multiple identical imprints from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis on a solid support. *Methods Mol Biol* 536: 35-38. [doi:10.1007/978-1-59745-542-8_5](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-542-8_5).

Ornstein L (1964). DISC ELECTROPHORESIS. I. BACKGROUND AND THEORY. *Ann N Y Acad Sci.* 121: 321-349. [PMID 14240533](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14240533/).

Otero R., Gutiérrez J., Mesa M. B., Duque E., Rodríguez O., Arango J. L. et al. (2002). Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon.* 40: 1107-1114.

Otero-Patiño R., Silva-Haad J. J., Barona-Acevedo M. J., Toro-Castaño M. F., Quintana-Castillo J. C., Díaz-Cadauid A. et al. (2007) Accidente bothrópico en Colombia: estudio multicéntrico de la eficacia y seguridad de Antivipmyn-Tri®, un antiveneno polivalente producido en México. *Iatreia.* 20: 244-262.

Peferoen, M; Huybrechts, R; De Loof, (1982). Vacuum-blotting: a new simple and efficient transfer of proteins from sodium dodecylsulfate--polyacrylamide gels to nitrocelulose. *FEBS Letters* (Elvesier) 145 (2). [doi:10.1016/0014-5793\(82\)80202-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(82)80202-0).

Raymond S, Weintraub L. (1959). Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science* 130: 711. [PMID 14436634](#).

Renart, Jaime; Reiser, Jakob; Stark, George R (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl AcadSci U S A* (en inglés) 76 (7): 3116-3120. [doi:10.1073/pnas.76.7.3116](#).

Rodrigues, C., Alves, C., Santos-neto, A. J., Fernandes, C., & Lan, F. M. (2007). Analysis of tricyclic antidepressant drugs in plasma by means of solid-phase microextraction-liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, October, 1342–1347. <https://doi.org/10.1002/jms>

Rucavado, Alexandra & Soto, Mónica & Kamiguti, Aura & Theakston, R.D.G. & Fox, Jay & Escalante, Teresa & Gutiérrez, José. (2001). Characterization of Aspercetina, a Platelet Aggregating Component from the Venom of the Snake *Bothrops asper* which Induces Thrombocytopenia and Potentiates Metalloproteinase-induced Hemorrhage. *Thrombosis and haemostasis*. 85. 710-5. [10.1055/s-0037-1615657](#).

Rüchel R, Steere RL, Erbe EF (1978). Transmission-electron microscopic observations of freeze-etched polyacrylamide gels. *J Chromatogr*. 166: 563-575.

Schägger H, von Jagow G (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*. 166 (2): 368-379. [PMID 2449095](#).

Senise LV, Yamashita KM, Santoro ML. *Bothrops jararaca* envenomation: Pathogenesis of hemostatic disturbances and intravascular hemolysis. *Exp Biol Med* (Maywood). 2015 Nov;240(11):1528-36. doi: 10.1177/1535370215590818. Epub 2015 Jun 16. PMID: 26080462; PMCID: PMC4935303.

Shapiro AL, Viñuela E, Maizel JV Jr. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*. 28 (5): 815-820. [PMID 4861258](#).

Soares, B. S., Rocha, S. L. G., Bastos, V. A., Lima, D. B., Carvalho, P. C., Gozzo, F. C., Demeler, B., Williams, T. L., Arnold, J., Henrickson, A., Jørgensen, T. J. D., Souza, T. A. C. B., Perales, J., Valente, R.H., Lomonte, B., Gomes-Neto, F., & Neves-Ferreira, A. G. C. (2022). Molecular Architecture of the Antiophidic Protein DM64 and its Binding Specificity to Myotoxin II From *Bothrops asper* Venom. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8(January), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.787368>

Switzer RC 3rd, Merrill CR, Shifrin S (1979). «A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels.». *Anal Biochem*. 98 (1): 231-237. [PMID 94518](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/94518/).

Weber K, Osborn M (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*. 244 (16): 4406-4412. [PMID 5806584](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5806584/).

Wiltfang J, Arold N, Neuhoff V (1991). «A new multiphasic buffer system for sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis of proteins and peptides with molecular masses 100,000-1000, and their detection with picomolar sensitivity.». *Electrophoresis* 12 (5): 352-366. [PMID 1718736](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1718736/).

World Health Organization. (2017). Addressing the burden of snakebite envenoming Health Topics, Author: Bernadette Abela-Ridder and Ashok Moloo

X.ANEXOS

Anexo 1. Carta aprobación bioética



Comité de Ética, para el Uso y Cuidado Animal de la Universidad del Valle de Guatemala CEUCA - UVG

Investigador Principal: Daniel Ariano Sánchez (Asesor) & Daniel Fernando Reyes Enríquez (Tesisista)

Edificio y oficina: Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Humanidades

E-Mail: dariano@uvg.edu.gt / rey18144@uvg.edu.gt

Teléfono: 57183250

Número de propuesta: I – 2022 (6)

Guatemala, 12 de octubre de 2022

Estimado(s) Investigador(es),

Por este medio se hace constar que la propuesta de investigación titulada: **Variación proteica del veneno de *B. asper* en regiones del norte y sur de Guatemala y su neutralización con antisuero comercial**, ha sido evaluada por miembros del comité de Ética, para el Uso y Cuidado Animal de la Universidad Del Valle de Guatemala (CEUCA – UVG).

Se ha realizado una revisión del protocolo con el fin de asegurar el cuidado y uso ético a los animales que serán utilizados para cumplir con los propósitos de la investigación. Se ha determinado que se cumple con los requisitos necesarios, así como también se ha cumplido con los procedimientos y lineamientos descritos por el comité y se han tomado consideraciones necesarias para la seguridad de los investigadores.

Por este medio se le informa que se autoriza realizar las prácticas con *animales tal y como se describen* en el protocolo final sometido al CEUCA UVG, por un período de un año a partir de la fecha de la presente carta.

Se le solicita que, si hubiese necesidad de hacer cualquier otra modificación a lo descrito en la propuesta, se comunique de nuevo con el comité para que dichas enmiendas sean evaluadas de manera que se pueda garantizar que se cumple a cabalidad con los lineamientos del CEUCA-UVG. Asimismo, rogamos que, al finalizar su trabajo de investigación, se comparta con el comité los resultados o publicaciones derivadas de la investigación.

Sin otro particular quedo a sus órdenes,



MV Vanessa Granados B
Médico Veterinario
Colegiado 997
CEUCA - UVG
Comité de Ética, Uso y Cuidado Animal
Universidad del Valle de Guatemala.

Anexo 2. Extracción de veneno en colección privada de Carlos Patzán



Anexo 3. Extracción de veneno en Centro de rescate Antigua Exotic



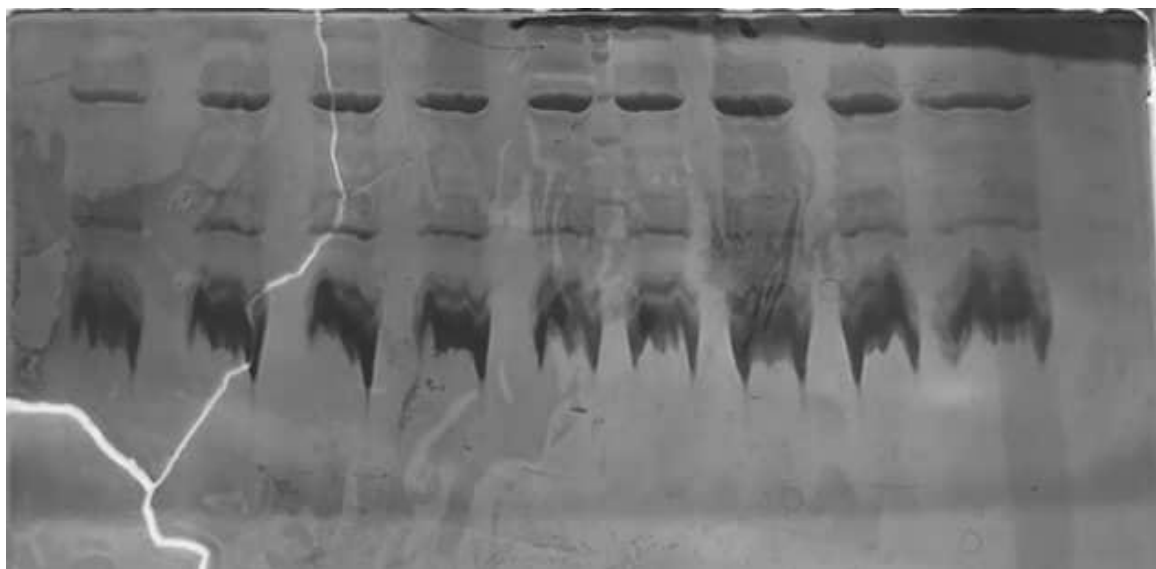
Anexo 4. Extracción de veneno en el Parque Zoológico La Aurora



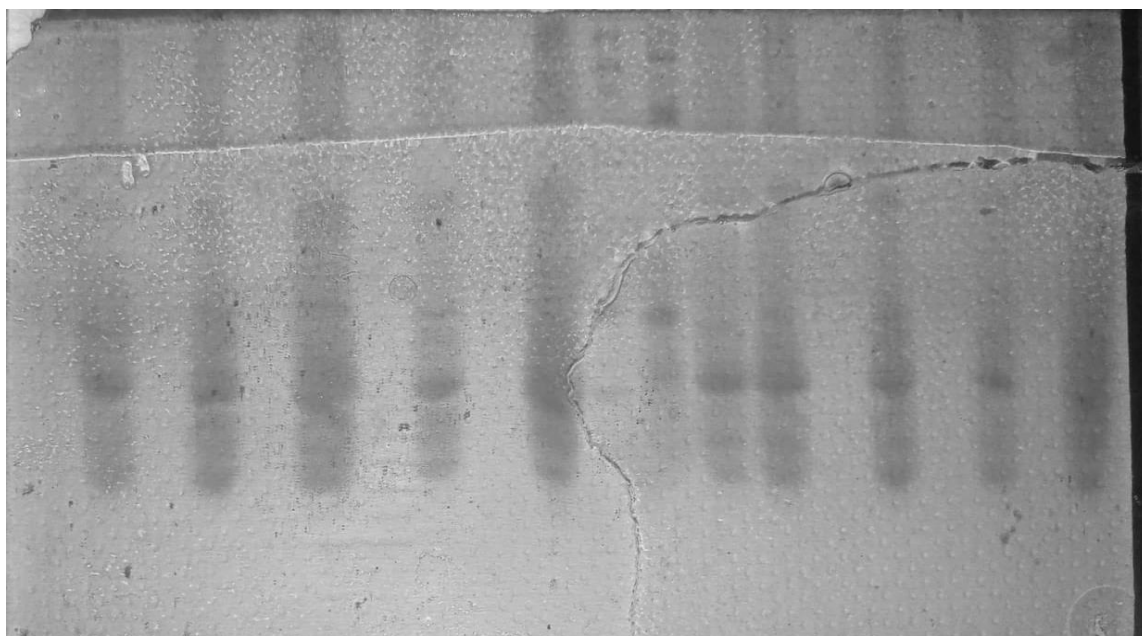
Anexo 5. Absorbancias de estándares de curva de calibración

Concentración de Estándar ug/ml	Absorbancia a 595 nm	Logaritmo en Base 10
100	0.152	-0.81815641
200	0.362	-0.44129143
400	0.603	-0.21968269
600	0.782	-0.10679325
900	0.949	-0.02273379
1200	1.126	0.051538391
1500	1.460	0.164352856

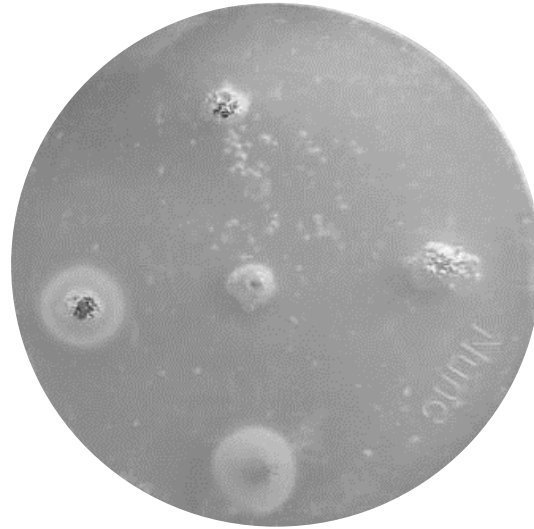
Anexo 6. Gel de SDS Page corrido durante 6 horas



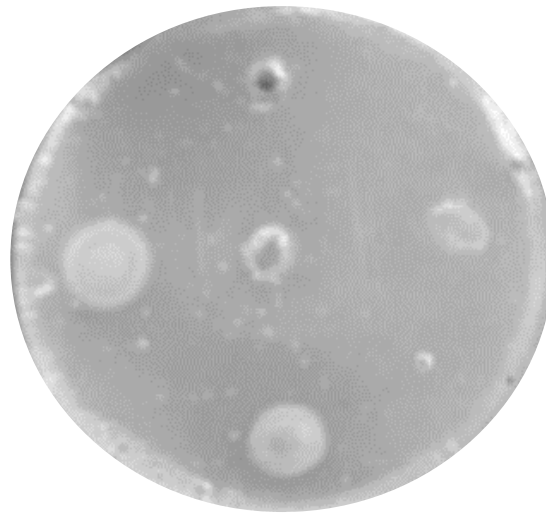
Anexo 7. Gel de SDS Page corrido durante 9 horas



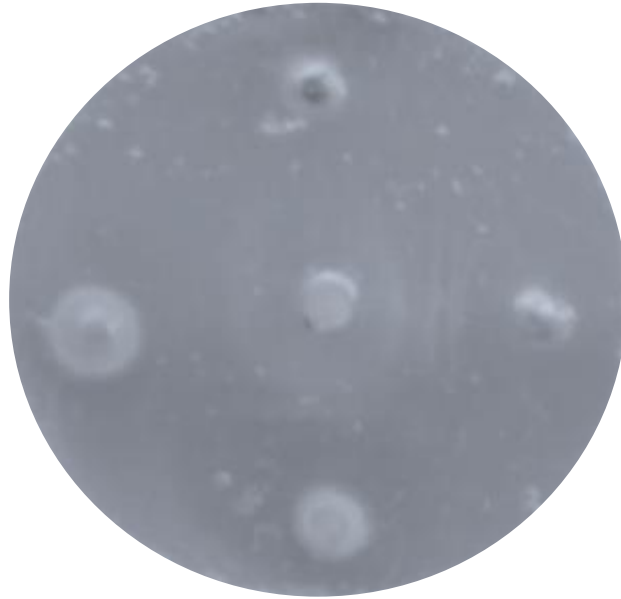
Anexo 8. Ensayos de inmunodifusión No. 1 – Código (S1), prueba con antiofidico polivalente de Costa Rica.



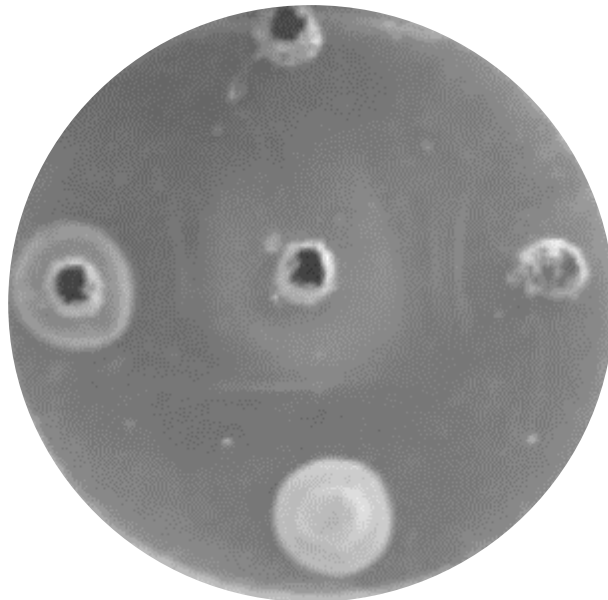
Anexo 9. Ensayos de inmunodifusión No. 1 – Código (S1), prueba con antiofidico polivalente de Biol.



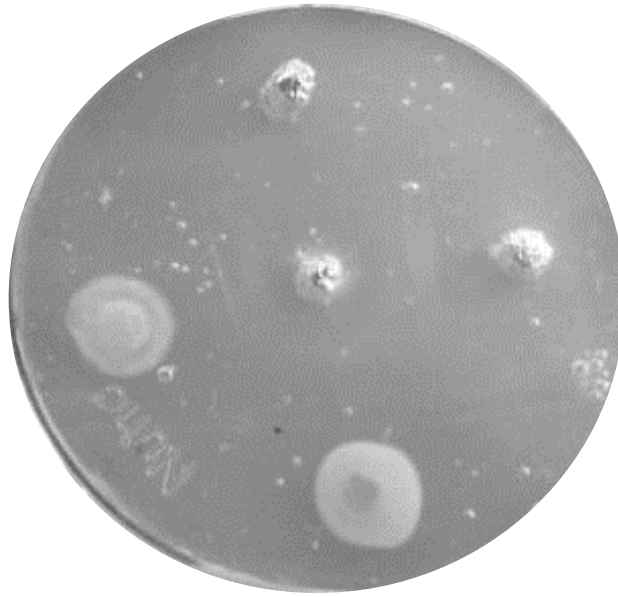
Anexo 10. Ensayos de inmunodifusión No. 2 – Código (S2), prueba con antiofidico polivalente de Costa Rica.



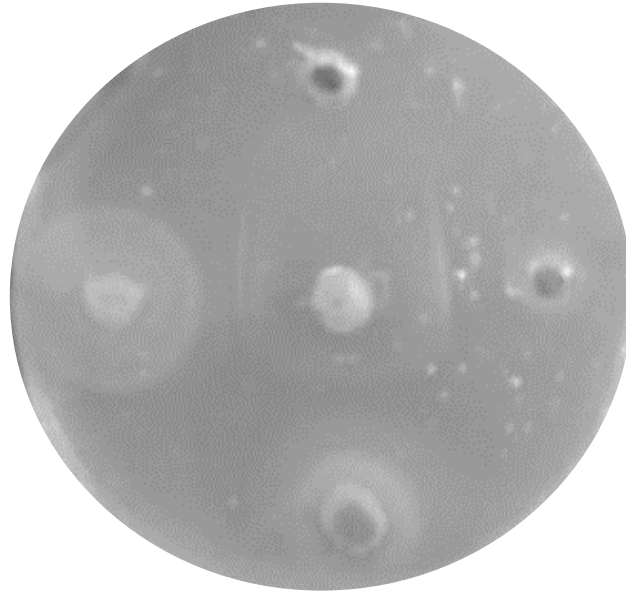
Anexo 11. Ensayos de inmunodifusión No. 2 – Código (S2), prueba con antiofidico polivalente de Biol.



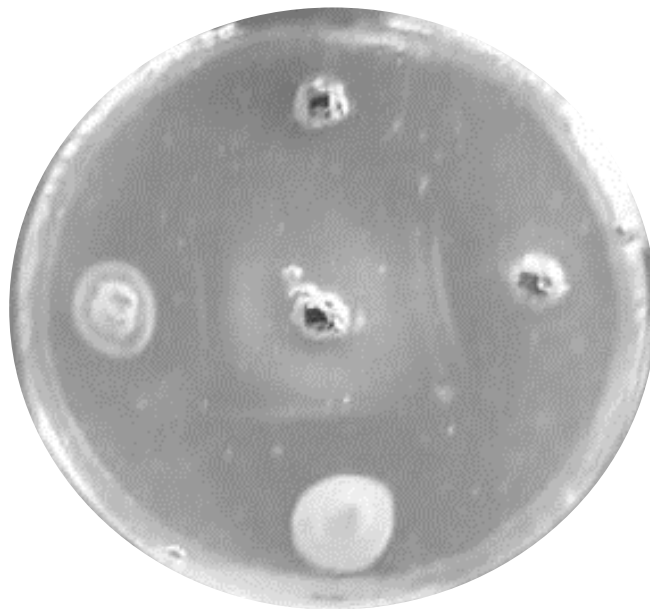
Anexo 12. Ensayos de inmunodifusión No. 3 – Código (S3), prueba con antiofidico polivalente de Costa Rica.



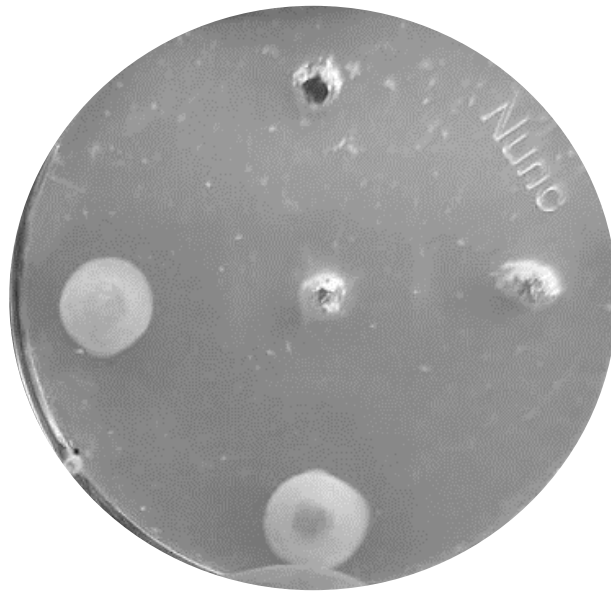
Anexo 13. Ensayos de inmunodifusión No. 3 – Código (S3), prueba con antiofidico polivalente de Biol.



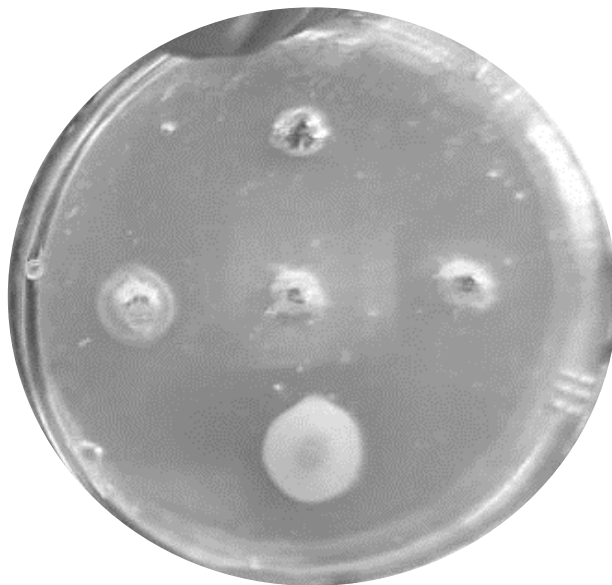
Anexo 14. Ensayos de inmunodifusión No. 4 – Código (S4), prueba con antiofidico polivalente de Costa Rica.



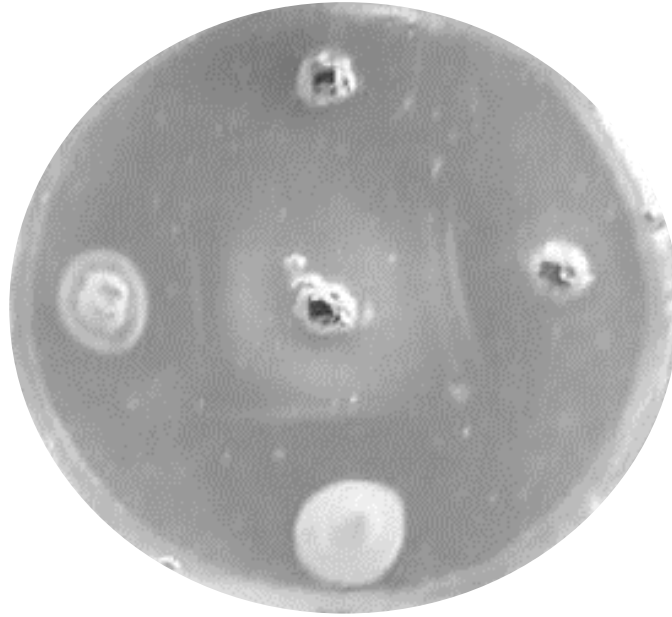
Anexo 15. Ensayos de inmunodifusión No. 4 – Código (S4), prueba con antiofidico polivalente de Biol.



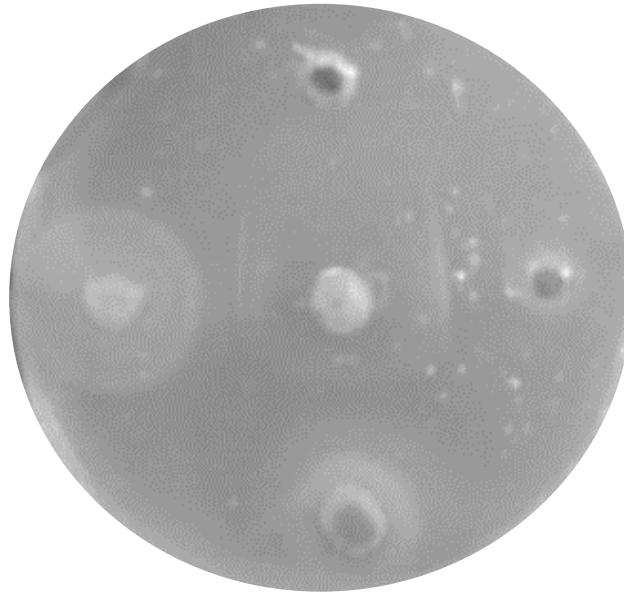
Anexo 16. Ensayos de inmunodifusión No. 5 – Código (N1), prueba con antiofidico polivalente de Costa Rica



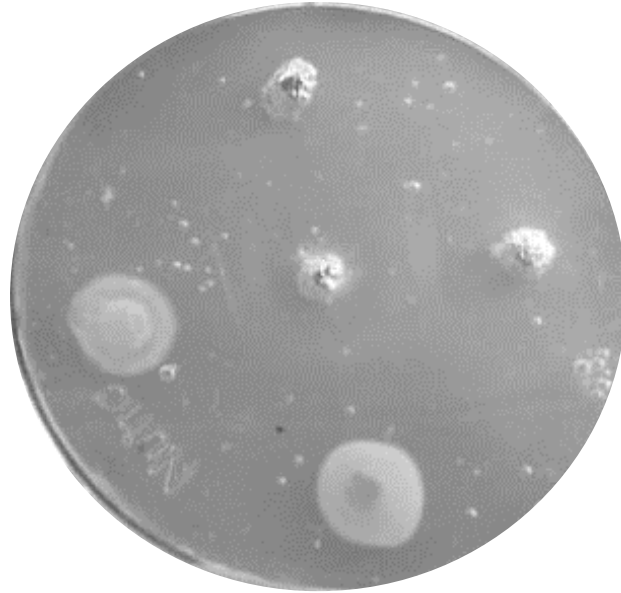
Anexo 17. Ensayos de inmunodifusión No. 5 – Código (N1), prueba con antiofidico polivalente de Biol.



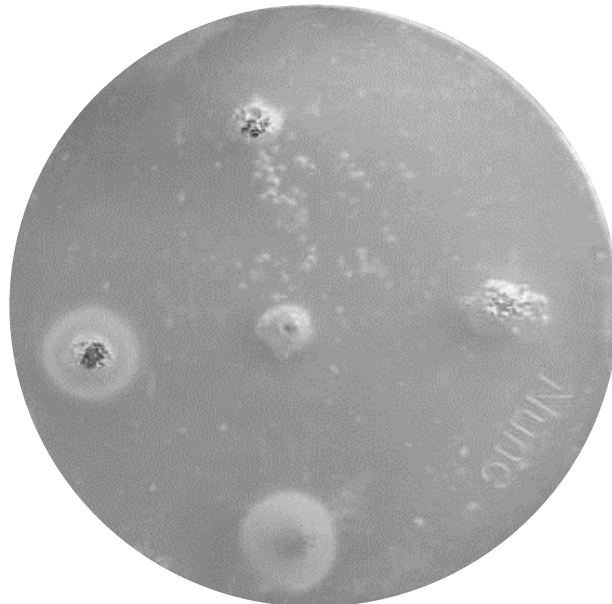
Anexo 18. Ensayos de inmunodifusión No. 6 – Código (N2), prueba con antiofidico polivalente de Costa Rica.



Anexo 19. Ensayos de inmunodifusión No. 6 – Código (N2), prueba con antiofidico polivalente de Biol.



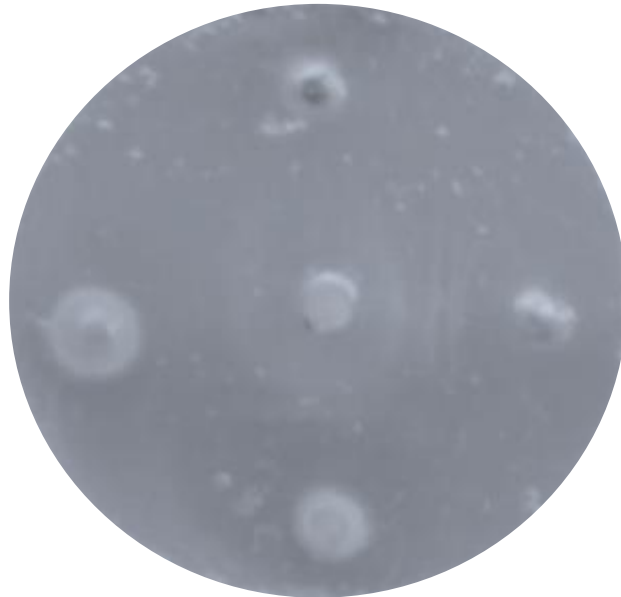
Anexo 20. Ensayos de inmunodifusión No. 7 – Código (N3), prueba con antiofidico polivalente de Costa Rica



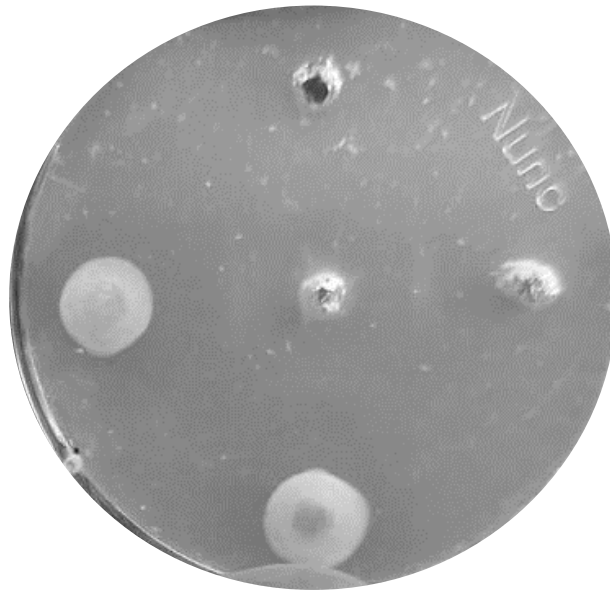
Anexo 21. Ensayos de inmunodifusión No. 7 – Código (N3), prueba con antiofidico polivalente de Biol.



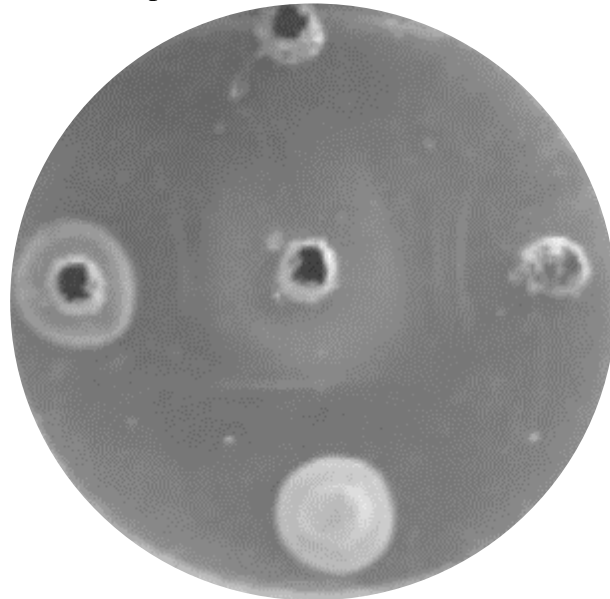
Anexo 22. Ensayos de inmunodifusión No. 8 – Código (N4), prueba con antiofidico polivalente de Costa Rica.



Anexo 23. Ensayos de inmunodifusión No. 8 – Código (N4), prueba con antiofidico polivalente de Biol.



Anexo 24. Ensayos de inmunodifusión No. 9 – Código (N5), prueba con antiofidico polivalente de Costa Rica



Anexo 25. Ensayos de inmunodifusión No. 9 – Código (N5), prueba con antiofidico polivalente de Biol.

