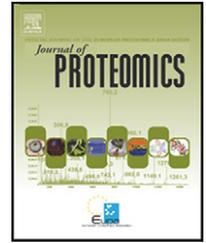


disponible en www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/jprot

Venómica y Antivenómica de la Serpiente *Bothrops colombiensis*, una víbora médicamente importante perteneciente al complejo: *Bothrops atrox-asper* endémico de Venezuela: Contribución a su taxonomía y al manejo de mordeduras

Juan J. Calvete^a, Adolfo Borges^{b,c}, Álvaro Segura^d, Marietta Flores-Díaz^d,
Alberto Alape-Girón^d, José María Gutiérrez^d, Nardy Diez^e, Leonardo De Sousa^f,
Demetrio Kiriakos^{f, g}, Eladio Sánchez^h, José G. Faks^b, José Escolano^a, Libia Sanza^a

^aInstituto de Biomedicina de Valencia, CSIC, Jaime Roig 11, 46010 Valencia, España

^bLaboratorio de Toxinas Animales, Centro de Biociencias y Medicina Molecular, Instituto de Estudios Avanzados, Caracas, Venezuela

^cInstituto de Medicina Experimental, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

^dInstituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

^eLaboratorio de Proteómica, Centro de Biotecnología, Instituto de Estudios Avanzados, Caracas, Venezuela

^fCentro de Investigaciones en Ciencias de La Salud, Núcleo de Anzoátegui, Universidad de Oriente, Puerto La Cruz, Venezuela

^gSerpentario de Medicina Tropical, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, Puerto La Cruz, Venezuela

^hCentro de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte MG, Brasil

ARTICLE DATA

Palabras clave:

Veneno de serpiente

Bothrops colombiensis

Familias de proteínas de veneno de

serpiente Proteómica

Toxinas víboras

Secuenciación N-terminal

Espectrometría de masas

Antivenenos

Antiveneno ABC antibiótico y anticrotálico

Antiveneno polivalente

(Crotalinae) ICP

ABSTRACTO

El estatus taxonómico de la víbora de importancia médica del complejo *Bothrops atrox-asper* endémico de Venezuela, que ha sido clasificado como *Bothrops colombiensis*, permanece: "incertae cedis". Para ayudar a resolver esta pregunta, el proteoma del veneno de *B. colombiensis* se caracterizó por el fraccionamiento por HPLC de fase inversa seguido del análisis de cada fracción cromatográfica por SDS-PAGE, secuenciación N-terminal, huellas digitales de masas MALDI-TOF y espectrometría de masas en tándem de disociación inducida por colisión de péptidos tripticos. El veneno contenía proteínas pertenecientes a 8 tipos de familias. PI Zn²⁺-metaloproteinasas y K49 PLA₂ esas moléculas comprenden más del 65% de las proteínas del veneno. Otras familias de proteínas de veneno comprendían PIII Zn²⁺-metaloproteinasas (11,3%), D49 PLA₂s (10,2%), L-aminoácido oxidasa (5,7%), la desintegrina colombistatina de tamaño medio (5,6%), serina proteinasas (1%), péptidos potenciadores de bradicinina (0,8%), un fragmento de DC (0,5%) y una proteína CRISP (0,1%). Una comparación de los proteomas de veneno de *B. colombiensis* y *B. atrox* no apoyó la sinonimia sugerida entre estas dos especies. Los homólogos más cercanos a *B. colombiensis* Las proteínas del veneno parecían ser toxinas de *B. asper*. Una estimación aproximada de la similitud entre los venenos de *B. colombiensis* y *B. asper* indicó que estas especies comparten aproximadamente 65-70% de sus venenos (proteomas). El estrecho parentesco de *B. colombiensis* y *B. asper* apunta al antepasado de *B. colombiensis* como la fundadora centroamericana. Este hallazgo puede ser relevante para reconstruir la historia natural y la cladogénesis de *Bothrops*. Además, la reactividad cruzada inmunológica prácticamente indistinguible de un antisuero venezolano (producido contra una mezcla

* Autor correspondiente. Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC, Jaime Roig 11, 46010 Valencia, España. Tel. : +34 96 339 1778; fax: +34 96 369 0800.

Dirección de correo electrónico: jcalvete@ibv.csic.es (JJ Calvete).

de *B. colombiensis* y *Crotalus durissus cumanensis* venenos) y el antiveneno polivalente ICP costarricense (producido contra una mezcla de *B. asper*, *Crotalus simus*, y *Lachesis stenophrys* venenos) en contra de los venenos de *B. colombiensis* y *B. asper*, apoya este punto de vista y sugiere la posibilidad de usar indistintamente estos antivenenos para el manejo de mordeduras de serpientes por cualquiera de estas especies de *Bothrops*. Sin embargo, nuestros análisis también evidenciaron la limitada capacidad de reconocimiento o avidez de ambos antivenenos hacia una serie de componentes del veneno de *B. colombiensis* y *B. asper* en particular desintegrinas de tamaño mediano, péptidos potenciadores de bradiquinina, PLA₂ proteínas y PI Zn²⁺-metaloproteinasas.

© 2009 Elsevier BV Todos los derechos reservados.

1. Introducción

El género *Bothrops* (subfamilia Crotalinae de Viperidae) comprende 32 (<http://www.reptile-database.org>) o 37 especies

[1] de pitvipers, comúnmente conocidas como puntas de lanza, que están ampliamente distribuidas en América Latina tropical, desde el noreste de México hasta Argentina, y el sur de las islas del bajo Caribe [1]. Entre la fauna de víboras de pitbull de América del Sur, el género *Bothrops* muestra la mayor diversidad con respecto al número de especies, morfología y rasgos de historia natural.[1,2]. El análisis de divergencia de secuencia sugiere que el antepasado común de todos los *Bothrops* fue el primer viperido en colonizar América del Sur, en algún momento durante el Mioceno, 10-Hace 23 millones de años (mya) [2]. La rápida dispersión y diversificación de *Bothrops* en Sudamérica puede haber ocurrido a través de radiaciones adaptativas en hábitats desprovistos de competidores viperidos.[2]. Una sola especie, el antepasado de *B. asper*, reinvasió América Central, donde sigue siendo la única especie extendida de *Bothrops* [2]. El subsiguiente levantamiento de los Andes del norte y las montañas de la parte baja de América Central en el Mioceno tardío o Plioceno temprano (8-5mya), que culminó con el cierre del Istmo de Panamá 3,5mya

[3], puede haber fragmentado aún más la herpetofauna centro y norte de América del Sur en poblaciones alopatricas, influyendo así en la cladogénesis de *Bothrops* [2-5].

La filogenia de *Bothrops* ha sido objeto de varias revisiones taxonómicas, pero aún no se comprende del todo [1,2,6,7]. *Bothrops* (sensu lato) es un clado parafilético compuesto por al menos cinco linajes separados [1,2,6]. El *Bothrops asper* atrox El complejo representa un clado monofilético de víboras de tamaño mediano a grande ampliamente distribuidas por las partes tropicales de América Central y del Sur. [1,2]. El estado y las alianzas filogenéticas de muchas de las especies reconocidas convencionalmente dentro del *asper*-atrox grupo (*B. asper*, *B. atrox*, *B. colombiensis*, *B. isabellae*, *B. leucurus*, *B. marajoensis*, *B. moojeni*, y *B. pradoi*) todavía están abiertos a la discusión [2,6,8]. Resolver las identidades de las poblaciones y los límites de las especies dentro del *B. asper*-atrox complejo sigue siendo un problema desafiante que requiere una mayor revisión taxonómica.

Descrito originalmente por Hallowell en 1845 como *Trigonocephalus colombiensis* [9], el estado taxonómico de *B. colombiensis* (Manapare Lancehead Viper; localidad tipo, "República de Colombia, a menos de doscientas millas de Caracas, Venezuela") ha sido un tema de debate [10]. El nombre *B. colombiensis* se ha utilizado para las poblaciones del *B. asper*-atrox grupo del norte de Venezuela. Roze [11] mencionó que el propio Hallowell sospechaba *T. colombiensis* ser idéntico con *T. lanceolatus* (*B. atrox*). Sandner-Montilla [12] considerado el nombre *B. colombiensis* como nomen oblitum y sinónimo de *B. lanceolatus*

descrito por Lacépède en 1789. Johnson y Dixon [10] considerado *B. colombiensis* en la sinonimia de *B. atrox*.

Sin embargo, el análisis de la secuencia de ADN mitocondrial mostró que *B. colombiensis* es distinto de *B. atrox* de Surinam, y más cerca de *B. asper* de Belice [2]. *B. asper* también fue reconocido como conoespecífico con *B. atrox* antes de ser separado por Hoge [13]

basado en sutiles diferencias morfológicas. La mayoría de las autoridades ahora consideran *B. atrox* y *B. asper* como especies distintas [1]. El rango de *B. atrox* rodea parcialmente la supuesta gama de *B. colombiensis* (Venezuela occidental, central y nororiental y norte del río Orinoco [14]), excepto en el centro norte de Venezuela, y referencias que reconocen *B. atrox* y *B. colombiensis* como diferentes no indican simpatría de las dos especies [1]. Por otro lado, *B. asper*, otra especie adaptable de amplio rango, comparte una relación de distribución con

B. colombiensis en el norte de América del Sur. Según Campbell y Lamar [1], las especies *B. asper* y *B. atrox* se distribuyen en Venezuela, pero estos autores no reconocen *B. colombiensis* como una especie separada. Claramente, el estado evolutivo y taxonómico de las poblaciones venezolanas del complejo *B. asper*-atrox conocido como *B. colombiensis* es incierto y requiere más estudios.

En las últimas décadas, se han logrado avances significativos en la resolución de filogenias como resultado directo de la aceptación y el refinamiento de los métodos cladísticos. Además, el uso combinado de características moleculares (en particular, información de secuencia de ADN mitocondrial y actividades enzimáticas) con caracteres morfológicos tradicionales ha ayudado a aumentar la solidez y resolución de hipótesis filogenéticas. El veneno es un rasgo derivado compartido de las serpientes avanzadas (Caenophidia). La composición del veneno de serpiente se hereda en lugar de ser inducida por el medio ambiente, y está bajo un estricto control genético.[15] y por lo tanto, la tipificación de la proteína del veneno puede generar valiosos marcadores moleculares para fines taxonómicos. [dieciséis-18]. Además de la importancia evolutiva y ecológica de los venenos, el envenenamiento accidental por mordedura de serpiente constituye un peligro para la salud pública de gran relevancia en Centro y Sudamérica que tiene un impacto en términos de mortalidad y morbilidad.[19-24]. Las especies de *Bothrops* infligen el noventa por ciento de las mordeduras de serpientes en América Central y del Sur [19]. La especie prototípica del *asper*-atrox complejo se encuentran entre las serpientes venenosas más peligrosas de América Latina tropical. *B. asper* es considerada la serpiente más peligrosa de Centroamérica. En Costa Rica es responsable de la mayoría de las mordeduras de serpientes [20-24]. *B. atrox* es la causa de más muertes humanas en América del Sur que cualquier otro reptil estadounidense

[22]. En Venezuela *B. colombiensis* se ha informado a la cuenta

para más del 36% de los más de 5000 accidentes por mordedura de serpiente causados anualmente por especies del género *Bothrops*, *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Porthidium*, *Crotalus*, *Lachesis* y *Micrurus* [14,25]. En el período 1980-1990, se registraron 586 muertes por mordedura de serpiente en Venezuela, lo que representa la principal causa de mortalidad por envenenamiento animal en este país [26,27].

Los venenos de ambosropoides inducen un cuadro fisiopatológico complejo caracterizado por efectos locales y sistémicos como edema, mionecrosis, ampollas, hemorragia, desfibrinación, shock y nefrotoxicidad. [20-22]. Un conocimiento sólido de la composición de toxinas de los venenos de *Bothrops* no solo es relevante para la sistemática sino también para los campos de la medicina, la farmacología y la toxicología. Aquí, presentamos una caracterización proteómica detallada del veneno de *B. colombiensis*. Comparación de los proteomas de veneno de *B. colombiensis*, *B. asper* [5] y *B. atrox* [28] sugiere un estrecho parentesco notable entre *B. colombiensis* y *B. asper* de la vertiente del Pacífico de Costa Rica. Nuestros datos apoyan la hipótesis de que la población conocida como

B. colombiensis es probable que corresponda a *B. asper*. Además, un antiveneno polivalente producido en el Instituto Clodomiro Picado (San José, Costa Rica) contra una mezcla de venenos de *B. asper*, *C. simus*, y *L. stenophrys*, y un antiveneno levantado en Venezuela contra una mezcla de *B. colombiensis* y *Cd. cumanensis* venenos mostraron la misma inmunoreactividad hacia *B. asper* y *B. colombiensis* toxinas. La relevancia de esta observación para la taxonomía y el manejo de mordeduras de serpientes *B. colombiensis* se discute.

2. Sección experimental

2.1. Venenos y antivenenos

El veneno de *B. colombiensis* fue agrupada de serpientes capturadas cerca de las localidades venezolanas de Santa Bárbara (Estado Barinas), San Felipe (Estado Yaracuy), Barlovento (Estado Miranda) y Araira (Estado Miranda), y mantenidas en cautiverio en el serpentario de la Universidad de Oriente, Puerto La Cruz, Venezuela. El veneno de *Bothrops atrox* se obtuvo de especímenes recolectados cerca de Pucallpa, Departamento de Ucayali, Perú, y conservados en el serpentario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Muestras de veneno de *B. asper* se obtuvieron de especímenes recolectados en las regiones del Caribe (Distrito Quesada, San Carlos, provincia de Alajuela) y Pacífico (Distrito de Sabanillas, Acosta, provincia de San José) de Costa Rica y mantenidos en cautiverio en el Serpentario del Instituto Clodomiro Picado (Universidad de Costa Rica, San José) [5]. Los venenos crudos se centrifugaron a baja velocidad para eliminar las células y los desechos, se liofilizaron, se pesaron en una microbalanza y se almacenaron a -20 ° C hasta su uso. Los grupos de veneno se prepararon mezclando cantidades iguales de muestras de al menos 11 especímenes de ambos sexos del Caribe o de las regiones del Pacífico. Se ha informado de la caracterización proteómica de estos venenos.[5].

El antiveneno de caballo anti-botrópico y anticrotalico (ABC) utilizado para el estudio del antivenómico (Lote L138, fecha de caducidad: septiembre de 2009) se preparó contra una mezcla de venenos de *Bothrops colombiensis* y *Cd. cumanensis* en el Centro de Biotecnología, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela (UCV). Las inmunoglobulinas se purificaron mediante munición

precipitación con sulfato de sodio y por digestión con pepsina. El antiveneno polivalente (*Crotalinae*) (lote 4201007POLQ, fecha de caducidad: octubre de 2010) fabricado en el Instituto Clodomiro Picado (ICP), Universidad de Costa Rica, se produjo inmunizando caballos con una mezcla de cantidades iguales de veneno de *Bothrops asper*, *Crotalus simus*, y *Lachesis stenophrys* obtenido de especímenes adultos mantenidos en cautiverio en el serpentario del ICP [29]. Las inmunoglobulinas completas se purificaron mediante precipitación con ácido caprílico.[30]. La concentración de IgG se determinó espectrofotométricamente usando un coeficiente de extinción (ϵ) de 1,4 para una concentración de IgG de 1 mg / ml a 280 nm utilizando una cubeta de paso de luz de 1 cm [31].

2.2. Aislamiento de proteínas de veneno

Para separaciones por HPLC de fase inversa, 2-5 mg de veneno crudo liofilizado de *B. colombiensis* se disolvieron en 100 μ L de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,05% y acetonitrilo al 5%, y el material insoluble se eliminó mediante centrifugación en una centrífuga Eppendorf a 13.000 \times gramo durante 10 min a temperatura ambiente. Las proteínas en el material soluble se separaron usando un ETTAN™ Sistema LC HPLC (Amersham Biosciences) y un

Licrosfera RP100 C₁₈ columna (250 \times 4 mm, 5 μ tamaño de partícula m) eluido a 1 ml / min con un gradiente lineal de TFA al 0,1% en agua (solución A) y acetonitrilo (solución B) (5% B durante 10 min, seguido de 5-15% B durante 20 min, 15-45% B durante 120 min y 45-70% de B durante 20 min). La detección de proteínas se realizó a 215 nm y los picos se recogieron manualmente y se secaron en un Speed-Vac (Savant). Las abundancias relativas (% del total de proteínas del veneno) de las diferentes familias de proteínas en los venenos se estimaron a partir de la relación de la suma de las áreas de los picos cromatográficos de fase inversa que contienen proteínas de la misma familia con el área total de la proteína del veneno. picos. En sentido estricto, y según Lambert-Ley de Beer, las cantidades relativas calculadas corresponden a la " % de enlaces peptídicos totales en la muestra", que es una buena estimación del % en peso (g / 100 g) de un componente de veneno en particular. Las contribuciones relativas de diferentes proteínas que eluyen en la misma fracción cromatográfica se estimaron por densitometría después de la separación SDS-PAGE.

2.3. Caracterización de proteínas aisladas por HPLC

Las fracciones de proteína aisladas se sometieron a análisis de secuencia N-terminal (usando un instrumento Procise, Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) Siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron búsquedas de similitud de secuencias de aminoácidos en los bancos de datos disponibles utilizando el programa BLAST[32] implementado en el motor de búsqueda WU-BLAST2 en <http://www.bork.embl-heidelberg.de>. Las masas moleculares de las proteínas purificadas se determinaron mediante SDS-PAGE (en geles de poliacrilamida al 12 o 15%) y mediante espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI) utilizando un QTrap de Applied Biosystems.™ Espectrómetro de masas 2000 [33] operado en modo de carga múltiple mejorada en el rango 600-1700 m / z.

2.4. Digestión enzimática en gel y huellas dactilares masivas

Las bandas de proteína de interés se escindieron de los geles SDS-PAGE teñidos con Coomassie Brilliant Blue y se sometieron a

reducción automatizada con DTT y alquilación con yodoacetamida, y digestión en gel con tripsina de páncreas bovino de grado de secuenciación (Roche) utilizando un digestor ProGest (Genomic Solutions) siguiendo las instrucciones del fabricante. 0,65µL de las mezclas de péptidos trípticos (volumen total de ~ 20 µL) se colocaron en un portamuestras MALDI-TOF, mezclado con un volumen igual de una solución saturada de α-ácido ciano-4-hidroxicinámico (Sigma) en acetonitrilo al 50% que contiene TFA al 0,1%, secado y analizado con un espectrómetro de masas Voyager-DE Pro MALDI-TOF de Applied Biosystems, operado en modos de extracción retardada y reflector. Una mezcla de péptidos trípticos de *Cratylia floribunda* Lectina semilla (código de acceso SwissProt P81517) preparada y caracterizada previamente en nuestro laboratorio se utilizó como patrón de calibración de masa (rango de masa, 450-3300 Da).

2.5. Masa en tándem de disociación inducida por colisión espectrometría (CID-MS / MS)

Para la secuenciación de péptidos, la mezcla de digestión de proteínas se cargó en una columna capilar de nanopulverización y se sometió a análisis de espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI) utilizando un espectrómetro de masas QTrap (Applied Biosystems). [33] equipado con una fuente de nanopulverización (Protana, Dinamarca). Se analizaron iones doble o triplemente cargados de péptidos seleccionados de los espectros de huellas dactilares de masa MALDI-TOF en modo MS de resolución mejorada y los iones monoisotópicos se fragmentaron usando la herramienta Ion de producto mejorada con Q0 captura. La resolución mejorada se realizó a 250 amu / s en toda la masa abarcar. Los ajustes para los experimentos de MS / MS fueron los siguientes: Q1- resolución de la unidad; Energía de colisión de Q1 a Q2-30-40 eV; Barrera de entrada Q3- 8 V; LIT (trampa de iones lineales) Q3 tiempo de llenado- 250 ms; y tasa de escaneo Q3- 1000 amu / s. Los espectros CID se interpretaron manualmente o utilizando una versión con licencia del programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) contra una base de datos privada que contiene 927 secuencias de proteínas de viperidos depositadas en la base de datos SwissProt / TrEMBL (UniProtKB / Swiss-Prot Release 56.4 de 4 de noviembre de 2008; UniProtKB / TrEMBL versión 39.4 del 4 de noviembre de 2008; <http://us.expasy.org/sprot/>; 212 en SwissProt, 715 en TrEMBL) más las secuencias de iones peptídicos previamente asignadas de proyectos de veneno de serpientes llevados a cabo en nuestro laboratorio [5,34-38]. La tolerancia de masa MS / MS se estableció en ± 0,6 Da. La carbamidometil cisteína y la oxidación de metionina fueron modificaciones fijas y variables, respectivamente.

2.6. Antivenenos: inmunodepleción de las proteínas del veneno Costa por los antivenenos polivalentes de Rican y Venezuela

Hemos acuñado el término "antivenenos" para la identificación de proteínas de veneno que portan epítomos reconocidos por un antiveneno utilizando técnicas proteómicas [34]. Brevemente, se disolvieron dos miligramos de veneno completo en 70µL de tampón fosfato 20 mM, pH 7,0, mezclado con 4 mg de IgG antiveneno polivalente purificado e incubado con agitación suave durante 1 ha 37 ° C. A partir de entonces, 6 mg de antisuero IgG anti-caballo de conejo (Sigma) en 350µSe añadieron L de tampón fosfato 20 mM, pH 7,0, y la mezcla se incubó durante 1 hora más a 37°C. Los inmunocomplejos se precipitaron mediante centrifugación a 13.000 rpm durante 30 min en una centrífuga Eppendorf y el sobrenadante se sometió a separación de fase inversa como

descrito para el aislamiento de proteínas de veneno. Las fracciones de HPLC se caracterizaron como se describió anteriormente. Las muestras de control se sometieron al mismo procedimiento, excepto que no se incluyeron IgG antiveneno en la mezcla de reacción.

2.7. Neutralización de la letalidad

La capacidad del antiveneno polivalente ICP para neutralizar la actividad letal de *B. colombiensis* el veneno se evaluó como se describió anteriormente [39]. Brevemente, la dosis letal mediana (LD₅₀) de veneno se estimó en ratones CD-1 (16-18 g) inyectando intraperitonealmente varias dosis de veneno. Fallecidos se registraron durante 48 hy LD₅₀ fue estimado por probits. Para los ensayos de neutralización, mezclas de una cantidad fija de Se prepararon veneno y volúmenes variables de antiveneno y se incubaron durante 30 min a 37 ° C. Alícuotas de las mezclas, que contiene 4 dosis letales medias (LD₅₀) de veneno, se inyectaron en ratones CD-1 por vía intraperitoneal. Control los ratones recibieron 4 LD₅₀s de veneno sin antiveneno. Fallecidos se registraron durante 48 horas y la dosis efectiva media (DE₅₀) fue estimado por probits, y definido como la relación veneno / antiveneno en el que se logró un 50% de protección. ED₅₀ se expresó como los miligramos de veneno neutralizados por mililitro de antiveneno [39].

2.8. Electroforesis en gel bidimensional (2-DE)

La 2-DE se realizó esencialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante (GE Healthcare Amersham Biosciences) a menos que se indique lo contrario. Para enfoque isoeléctrico (IEF), 40µg de *B. colombiensis*, *B. atrox* y *B. asper* los venenos se disolvieron en DeStreak™ solución de rehidratación con anfolitos portadores al 1% pH 3-10 y se aplica sobre 7 cm pH 3-10 tiras lineales de gradiente de pH inmovilizado (IPG). La IEF se realizó con una unidad de enfoque isoeléctrico Ettan-IPGphor a 20 ° C aplicando las siguientes condiciones: 300 V (0,5 h), rampa a 1000 V (0,5 h), rampa a 5000 (1,3 h) y 5000 V (0,5 h). Después de IEF, las tiras de IPG se mantuvieron en -70 ° C hasta su uso. Para la segunda dimensión (SDS-PAGE), los IPG se equilibraron durante 15 min con agitación suave a temperatura ambiente en tampón de equilibrio (6 Murea, 2% [p / v] SDS, 30% [v / v] glicerol, 50 mM Tris-HCl [pH 8,8]) que contiene DTT al 1% (p / v), seguido de 15 min de equilibrio en tampón que contiene yodoacetamida al 3% (p / v). Luego se colocaron tiras de IPG encima de 8-Geles SDS-PAGE al 15% y se procesan en una unidad de electroforesis Protean II (Bio-Rad) a temperatura ambiente. Las manchas de proteína se visualizaron mediante tinción con PlusOne™ protocolo de tinción con plata.

3. Resultados y discusión

3.1. Caracterización del proteoma del veneno de *B. colombiensis*

A pesar de su importancia médica en Venezuela, la literatura sobre la composición de toxinas y actividades biológicas del veneno de *B. colombiensis* es escasa. De hecho, solo 6 referencias se enumeran en PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) [40-45], y ninguna secuencia de proteína de veneno de esta especie está disponible en la base de datos SwissProt / TrEMBL. Para abordar la necesidad

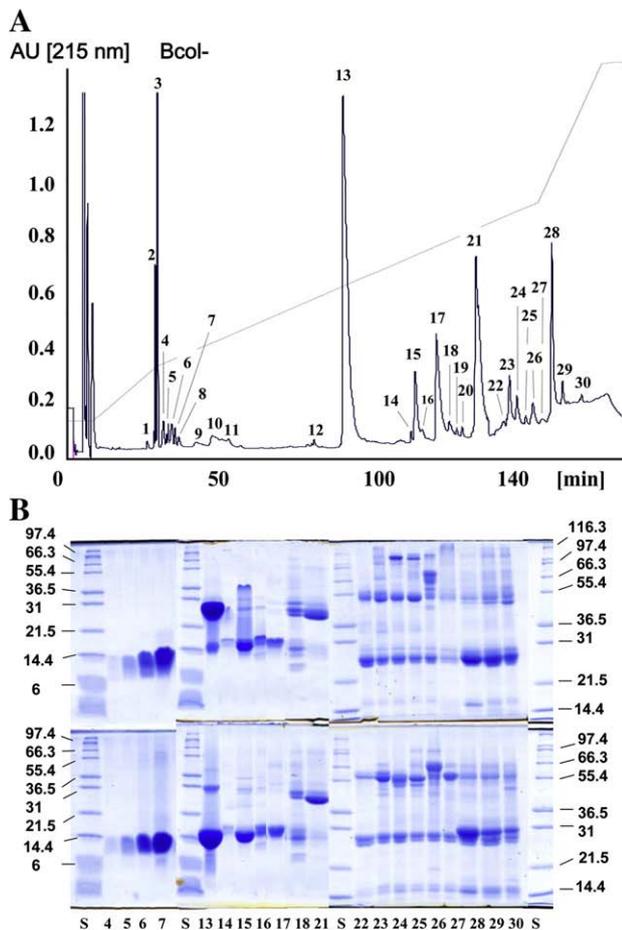


Figura 1 -Caracterización del proteoma del veneno de *B. colombiensis*. (A) Separación por HPLC de fase inversa de las proteínas del veneno de *B. colombiensis*. Se aplicaron dos miligramos de proteínas totales de veneno a un Lichrosphere RP100 C18 columna, que luego se desarrolló con las siguientes condiciones cromatográficas: isocráticamente (5% B) durante 10 min, seguido de 5-15% B durante 20 min, 15-45% B durante 120 min y 45-70% de B durante 20 min. Las fracciones se recogieron manualmente y se caracterizaron mediante secuenciación N-terminal, espectrometría de masas ESI, huellas dactilares de masas de péptidos trípticos y CID-MS / MS de iones peptídicos seleccionados doble o triplemente cargados. Los resultados se muestran en *tabla 1*. (B) SDS-PAGE que muestra la composición de proteínas de las fracciones de proteína de veneno separadas por HPLC de fase inversa mostradas en el panel A y ejecutadas en condiciones no reducidas (paneles superiores) y reducidas (paneles inferiores). Los marcadores de masa molecular (en kDa) se indican al lado de cada gel. Las bandas de proteínas se escindieron y se caracterizaron mediante huellas dactilares masivas y CID-MS / MS. Los resultados se muestran en *tabla 1*.

para estudios detallados del proteoma del veneno de *B. colombiensis*, buscamos caracterizar el complemento de proteínas secretadas, lo que puede contribuir a una comprensión más profunda de la biología, ecología y filogenética de esta población de serpientes, y también puede servir como punto de partida para estudiar las correlaciones estructura-función de toxinas individuales. Con este fin, el veneno crudo agrupado se fraccionó por fase inversa

HPLC (*Figura 1A*), seguido del análisis de cada fracción cromatográfica mediante SDS-PAGE (*Figura 1B*), secuenciación N-terminal y espectrometría de masas MALDI-TOF (*tabla 1*). Las fracciones de proteína que muestran una sola banda electroforética, masa molecular y secuencia N-terminal se asignaron directamente mediante análisis BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) a una familia de proteínas conocida. Las fracciones de proteína que mostraban extremos N heterogéneos o bloqueados se analizaron mediante SDS-PAGE y las bandas de interés se sometieron a reducción automatizada, carbamidometilación y digestión tríptica en gel. Los péptidos trípticos resultantes se analizaron luego mediante huella dactilar de masas MALDI-TOF seguido de determinación de la secuencia de aminoácidos de iones peptídicos seleccionados doble y triplemente cargados mediante espectrometría de masas en tándem de disociación inducida por colisión. Los espectros de iones del producto se interpretaron manualmente para de novo secuenciación y las secuencias de iones peptídicos deducidas por CID-MS / MS (*tabla 1* y *Tabla 2*) se enviaron a búsquedas de similitud BLAST. Las 30 fracciones aisladas por HPLC de fase inversa (*Figura 1*) comprendía al menos 20 proteínas diferentes (*Tabla 3*), que pertenecen a 8 grupos diferentes de toxinas (*Figura 2*), distribuida en 2 familias de proteínas principales, metaloproteína de veneno de serpiente (SVMP) y fosfolipasa

(PLA₂), que representan el 86% del total de proteínas del veneno y 6 familias de proteínas menores (péptidos potenciadores de bradicinina, desintegrina, fragmento DC, proteína secretora rica en cisteína, serina proteínasa y L-aminoácido oxidasa (LAO)).

Sánchez y colaboradores han informado del aislamiento y caracterización de una desintegrina (colombistatina) del veneno de *Bothrops colombiensis* [45]. La colombistatina contiene 73 aminoácidos (masa molecular promediada por isótopos de 7.778 kDa), incluido un motivo RGD, y plaquetas inducidas por ADP inhibidas agregación (IC₅₀ de 210 nM), la adherencia de las células cancerosas de la orina humana (T24) y del melanoma cutáneo (SK-Mel-28) a la fibronectina, y migración celular [45]. La secuencia N-terminal y la masa molecular de la colombistatina son idénticas a las de la desintegrina de tamaño medio eluida en la fracción 5 de *Figura 1* (*tabla 1*). Según sus masas moleculares, las moléculas de desintegrina que se encuentran en las fracciones 4 y 6-8 pueden corresponder a formas truncadas N- y C terminales de colombistatina (*tabla 1*).

Los resultados del veneno revelaron que las principales familias de toxinas de *B. colombiensis* son SVMP (42% del veneno total proteínas) y PLA₂ (44%), proporcionando pistas para racionalizar los distintos signos de envenenamiento causado por este *Bothrops* especies. Un estudio de las actividades fibrino (geno) líticas, procoagulantes, hemorrágicas y letales del veneno crudo y fracciones de *B. colombiensis* veneno se ha publicado recientemente [44]. Este informe proporciona evidencia bioquímica de que las metaloproteinasas albergan las actividades no hemorrágicas y coagulantes informadas por Gabrijelcic et al. [40] estar asociado con una proteína de aproximadamente 92 kDa en condiciones no reductoras y 67 kDa en SDS-PAGE reducida. El PIIISVMP aislado en fracciones 24-25 (*tabla 1*) exhibe las características moleculares de los [44] α-enzima fibrinogenasa. Otras metaloproteinasas (B50 kDa, es decir, el PISVMP y el PIII-SVMP eluyendo en fracciones 26-30) (*Figura 1*

y *tabla 1*) puede ser responsable de las actividades fibrinolíticas y hemorrágicas presentes en *B. colombiensis* veneno [44]. Por otro lado, el veneno crudo mostró actividad amidolítica (similar a calicreína y t-PA) [44] probablemente vinculado a la presencia de serina proteinasas. Las serina proteinasas pueden

tabla 1 - Asignación de las fracciones aisladas de fase inversa de Bothrops colombiensis el veneno (Figura 1A) a familias de proteínas mediante secuenciación de Edman N-terminal, espectrometría de masas y fragmentación inducida por colisión mediante nESI-MS / MS del péptido seleccionado iones de bandas de proteínas digeridas en gel

HPLC fracción	Secuenciación N-terminal	Isótopo-promediado molecular masa	Péptido ion		Secuencia derivada de MS / MS	Familia de proteínas / proteínas
			m / z	z		
Bcol-						
1	notario público					
4	GEEDCGAPENPCDAA	7204 Da	684,6	3	XRPGAQCAEGXCCDQCR*	Desintegrina colombistatina 3-70 [39]
			575,8	2	CTGQSADCPR*	
5	EAGEEDCGAPENPC	7778 Da				Desintegrina colombistatina 1-73 [39]
6	EAGEEDCGAPENPC	7555 Da				Desintegrina colombistatina 1-71 [39]
7	EAGEEDCGAPENPCD	7408 Da				Desintegrina colombistatina 1-70 [39]
8	EEEDCGAPENPCDAAT	7462 Da				Desintegrina colombistatina 4-72 [39]
9-11	Obstruido	1371.1	685,9	2	ZGGWPRPGPEIPP	Péptido potenciador de bradiquinina
		1385.1	693.1	2	ZKWPRPGPEIPP	Fragmento DC del péptido potenciador de bradiquinina [- Q7T1T5]
12	SPPVCGNYFVEVGEE*	23 kDa	502.1	2	GQGTYYCR*	
			898,6	3	SEC DIAESCTGQSPECTDDFHR*	
13	SLFELGKMLQETGK*	13721 Da	766,9	2	SYGAYGCNCGVXGR*	K49-PLA ₂ [P24605 L114d]
			868,6	2	EXCECDKAVAXCXR*	
			542,6	2	YXKPCXCK*	
			665,3	2	MILQETGKNPAK*	
			697,9	2	TXVCGENNSCXK*	
			738,8	2	KDRYSYSWKDK*	
			721,9	2	ENXNTYNKKYR*	
			523,8	2	TDRYSYSR*	
14-dieciséis	SLIEFAKMILEETKR*	13936 Da	637,3	2	YMAYPDXCK*	D49-PLA ₂ [P20474]
			753.1	2	CCFVHDCCYGK*	
			864,6	2	QXCECDKAAAVCFR*	
			992,5	2	TYKKRYMAYPDFLCK	
			919,6	3	RLFPFYTTYGCYCGWGGQGPQ*	
17	NLWQFEMLIMKIAKTSGFYFS	13862 Da	753.1	2	CCFVHDCCYGK*	D49-PLA ₂ [-Q8AXY1, P81243]
			726,6	2	NLWQFEMLIMK	
			490,3	2	QXCECDR*	
			882,6	2	NLWQFEMLIMKIAK	
			682,3	3	DNKDTYDMKYWFYGA	
18	VIGGDECDINEHPFL	28 kDa ▼ / ■				Serina proteinasa CRUJIENTE
	SVDFDSESPRKNEIQ*	26 kDa ▼ / ■	569,6	2	SVDFDSESPR*	
			768,9	2		MEWYPEAANAER*
			635,6	3		KPNEIQNEIVDLHNSLR*
	DAKOTA DEL NORTE	24 kDa ▼ / ■	548,3	2	TXTSFGWEWR*	PI-metaloproteinasa [- P83512]
			790,6	2	VHEMLNTVNGFYR*	
			883,6	2	SVDVHALXANXEVWSK*	
			610,9	2	HSVGVVRDHSK*	
	NLWQFEMLIMKIAKTSGF	14 kDa ▼ / ■	882,9	2	NLWQFEMLIMKIAK	D49-PLA ₂ [-Q8AXY1, P81243] D49-PLA ₂ [-Q8AXY1, P81243]
19, 20	NLWQFEMLIMKIAKTSGF	14 kDa ▼ / ■	753.1	2	CCFVHDCCYGK*	
			490,3	2	QXCECDR*	
21-30	Obstruido	23255 Da	548,3	2	TXTSFGWEWR*	PI-metaloproteinasa [- P83512]
			790,6	2	VHEMLNTVNGFYR*	
			883,6	2	SVDVHALXANXEVWSK*	
			547,3	2	YNSNXNTR*	
			838,6	2	YIELAVADHGIFTK*	
			610,9	2	HSVGVVRDHSK*	
			532,6	2	NPLEECFR*	
22-25	ADDRNPLEECFRETD*	52 kDa ▼ / ■	630,3	2	FWEDDGXHGK*	L-aminoácido oxidasa [- Q6TGQ9]
			647,3	2	EGWYANXPGMR*	
			676,6	2	SAGQXYEESXQK*	
			743,8	2	ETDYEEFXEXAK*	
			857,3	2	DPGVXEYVPKPEVGGK*	
			509,3	2	NGXSTSNPK*	
			569,8	2	HDDXFAYEK*	
			761,8	2	ADDRNPLEECFR*	
	SLPQFAKMILQET	16 kDa ▼ / ■				PLA ₂
	VIGGDECNINEHRSL	27 kDa ▼ / ■				Serina proteinasa
24	DAKOTA DEL NORTE	98 ▼ / 48 ■ kDa	902,3	2	YFVEVGEECDGSPR*	PIII-metaloproteinasa
			810,9	2	XYEXVNXXNVXYR*	

Tabla 1 (continuado)

HPLC fracción	Secuenciación N-terminal	Isótopo-promediado molecular masa	Péptido ion	Secuencia derivada de MS / MS	Familia de proteínas / proteínas
			m / z Z		
<u>26</u>	DAKOTA DEL NORTE	66 kDa▼	590,8 2	ZXWTPSEQR _*	PIII-metaloproteinasas
			688,3 2	YVEFWVXDHR	
<u>27-30</u>	DAKOTA DEL NORTE	56 kDa▼	590,8 2	ZXWTPSEQR _*	PIII-metaloproteinasas
			810,9 2	XYEXVXXNVXYR _*	
<u>28-30</u>	TPEQRQYVILVIV	26 kDa▼ / ■	548,3 2	TXTSFGQWR _*	PI-metaloproteinasas [- P83512]
			790,6 2	VHEMLNTVNGFYR _*	
			610,9 2	HSVGVVRDHSK _*	
<u>30</u>	DAKOTA DEL NORTE	48 kDa▼	526,3 2	GNYGYCR _*	PIII-metaloproteinasas
	DAKOTA DEL NORTE	16 kDa▼	766,9 2	SYGAYGCNCGVXGR	PLA ₂ [Q9PVE3]

X, lle o Leu. A menos que se indique lo contrario, para la secuenciación N-terminal y los análisis MS / MS, los residuos de cisteína se piridiletaron y carbamidometilaron, respectivamente; Las masas moleculares de las proteínas nativas se determinaron mediante espectrometría de masas de ionización por electropulverización, MALDI-TOF (*) o por SDS-PAGE antes (▼) o después (■) reducción de muestra con β-mercaptoetanol; np, material no peptídico encontrado. ND, no determinado. Proteínas que comparten secuencias de péptidos trípticos con homólogas B. asper las proteínas del veneno están en negrita y subrayadas y las secuencias de péptidos trípticos internos y N-terminales comunes están marcadas con asteriscos.

también incluyen enzimas coagulantes similares a la trombina, aunque su concentración en este veneno parece ser muy baja. Aunque el PLA₂-efectos asociados del veneno de B. colombiensis no tengo investigado, el gran contenido de K49-PLA₂ en el veneno apoya la hipótesis de que las actividades tóxicas de B. colombiensis El veneno puede incluir una potente miotoxicidad local y actividades formadoras de edema. [46,47].

3.2. El perfil proteico del veneno de B. colombiensis defiende una estrecha relación filogenética con B. asper. Una hipotética tendencia evolutiva

Todos los identificados B. colombiensis Las proteínas del veneno muestran una fuerte similitud con las entradas de las especies de Bothrops (tabla 1), destacando la estrecha relación filogenética de B. colombiensis

Tabla 2 - Identificación mediante análisis MS / MS de componentes no tóxicos presentes en las separaciones por HPLC de fase inversa de los sobrenadantes de muestras inmunodepleidas que se muestran en los paneles A, B y C de Figura 6. C, carbamidometil cisteína, respectivamente

Fracción de HPLC			Masa molecular	m / z	Z	Secuencia de péptidos	Proteína
Bcol		Bas (P)					
ABS / AS	ICP-AS	ABC / AS					
	a	a, b	33, 31 kDa	690,6	2	TEKDAFGNANSAR	Peroxidasa de rábano picante [1WAW_A]
				818,9	2	VVSTLPIAHQDWLR	Fragmento Fc de IgG de conejo [2VUO_A]
			28 kDa	601,4	2	LSVPTSEWQR	Fragmento Fc de IgG de conejo [2VUO_A]
				818,9	2	VVSTLPIAHQDWLR	
				621,6	3	TTPAVLSDSGSYFLYSK	
h-l	gramo-j	gramo-norte	50 kDa	887,9	2	VPQVYLAPHDPDLAK	Caballo de cadena pesada de IgG [AAG01011]
				601,4	2	LSVPTSEWQR	Fragmento Fc de IgG de conejo [2VUO_A]
				818,9	2	VVSTLPIAHQDWLR	
			48 kDa	480,1	2	AAVESACPR	Peroxidasa de rábano picante [1WAW_A]
				511,3	2	DAFGNANSAR	
				794,1	2	GLCPLNGNLSALVDFDLR	
				690,6	2	TEKDAFGNANSAR	
				601,4	2	LSVPTSEWQR	Fragmento Fc de IgG de conejo [2VUO_A]
				818,9	2	VVSTLPIAHQDWLR	
			28 kDa	601,4	2	LSVPTSEWQR	Fragmento Fc de IgG de conejo [2VUO_A]
				818,9	2	VVSTLPIAHQDWLR	
				621,6	3	TTPAVLSDSGSYFLYSK	
			26 kDa	516,4	2	YAASSYLTR	Caballo de cadena ligera de IgG [AAA50975]
				762,6	2	VTQGTTSVVQSFNR	Ig de cadena kappa b4 conejo [AAB59259]
				601,4	2	LSVPTSEWQR	Fragmento Fc de IgG de conejo [2VUO_A]
				818,9	2	VVSTLPIAHQDWLR	

Las masas moleculares fueron estimado por SDS-PAGE después de la reducción con β-mercaptoetanol.

Tabla 3 - Descripción general de la presencia relativa de proteínas de diferentes familias de toxinas en el veneno de Bothrops colombiensis

Familia proteica	% de proteínas totales de veneno		
	BB asper colombiensis	Pacífico Caribe	
BPP / C-NP	0,8	-	-
Desintegrina media	5,6	1,4	2,1
Fragmento DC	0,5	B0,1	B0,1
CRUJIENTE	0,1	0,1	0,1
PLA ₂ (• K49	44,3	45,1	28,8
• D49	34,1	36,0	18,8
	10,2	9,1	10,0
Serina proteinasa	B1	4,4	18,2
L-aminoácido oxidasa	5,7	4,6	9,2
Lectina de tipo C	-	0,5	0,5
Zn ²⁺ - metaloproteinasa	42,1	44,0	41,0
{ • PI _{II}	11,3	13,5	8,8
	30,8	30,5	32,2

A modo de comparación, la composición de la toxina del veneno de adultos *B. asper* de las regiones del Pacífico y el Caribe de Costa Rica informó en [5] están listados.

con los géneros de ambos poides sudamericanos de NewWorld [6]. En particular, los homólogos más cercanos a *B. colombiensis* proteínas parecen ser proteínas de veneno de *B. asper* [5]. Fig. 3 muestra la estrecha correspondencia entre los perfiles de elución de fase inversa de las proteínas del veneno de estas especies de *Bothrops*. *B. colombiensis* proteínas que exhiben una alta homología con *B. asper* las toxinas están subrayadas en tabla 1 y sus secuencias de proteínas y péptidos comunes están marcadas con asteriscos.

En Costa Rica *B. asper* se distribuye en dos poblaciones geográficamente aisladas separadas desde el Mioceno tardío o el Plioceno temprano (8-Hace 5 millones de años) junto a la cresta de la alta montaña que se extiende

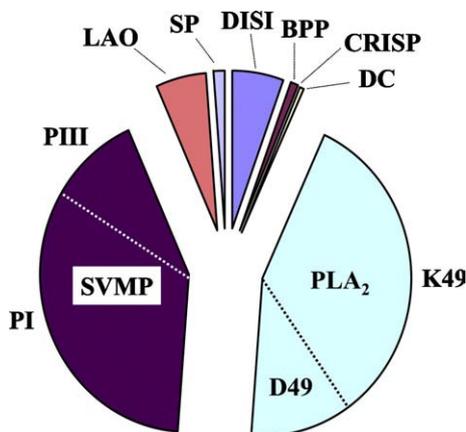


Figura 2 -Composición proteica general de *B. colombiensis* veneno. BPP, péptido potenciador de bradicinina; DC, fragmento rico en desintegrina / cisteína de veneno de serpiente PIII Zn²⁺ - metaloproteinasa (SVMP); DISI, desintegrina; SP, serina proteinasa; LAO, L-aminoácido oxidasa; PLA₂, fosfolipasa A₂; CRISP, proteína secretora rica en cisteína. Los detalles de las proteínas individuales caracterizadas se muestran en tabla 1, y los porcentajes de las diferentes familias de toxinas en el veneno se enumeran en Tabla 3.

diagonalmente a través del centro a lo largo de todo el país. Se han reportado variaciones geográficas en la composición del veneno entre el Caribe y el Pacífico. *B. asper*

poblaciones [5]. Los perfiles de HPLC de fase inversa (Fig. 3) y la composición general de toxinas venenosas de *B. colombiensis* (Tabla 3) tienen un parecido más cercano al veneno de *B. asper* especímenes del Pacífico (P) más que de los de la región del Caribe (C) de Costa Rica. Para una estimación aproximada de la similitud en la composición de proteínas entre los venenos de *B. colombiensis* y *B. asper*, calculamos la cifra relativa de características estructurales comunes. Las dos especies comparten 55 de las 77 secuencias de aminoácidos enumeradas en tabla 1, indicando que *B. colombiensis* y *B. asper* (P) comparten aproximadamente el 70% de su proteoma de veneno. La similitud entre *B. colombiensis* y *B. asper* (C) fue de aproximadamente el 65%. La gran semejanza entre estos venenos no se limita a ninguna familia de toxinas en particular, pero se extiende a desintegrinas, fragmento DC, PLA₂s, serina proteinasas, LAO y metaloproteinasa PI y PIII (Fig. 3, tabla 1). Por otro lado, nuestro estudio sobre venenos contradice claramente la sinonimización de *B. colombiensis* con *B. atrox*

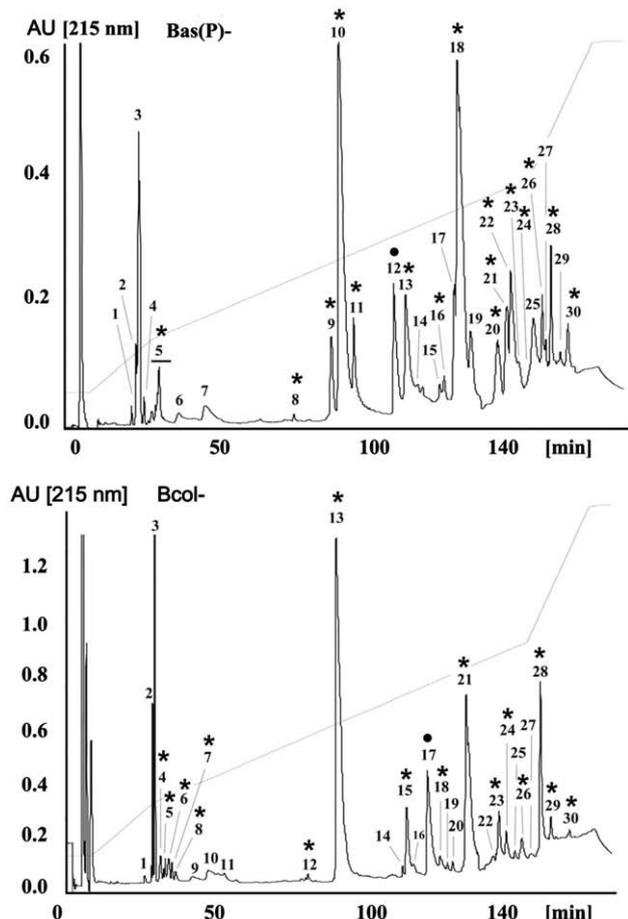


Fig. 3 -Comparación de las separaciones por HPLC de fase inversa de las proteínas del veneno de *B. asper* (panel superior) y *B. colombiensis* (panel inferior). Proteínas que presentan un tiempo de elución cromatográfico idéntico y que contienen Las secuencias de péptidos trípticos están marcadas con asteriscos. PLA₂ moléculas Bas (P) -12 y Bcol-17, marcadas con círculos cerrados, comparten secuencias de iones peptídicos pero eluyen en momentos diferentes. Para obtener información detallada, consulte tabla 1.

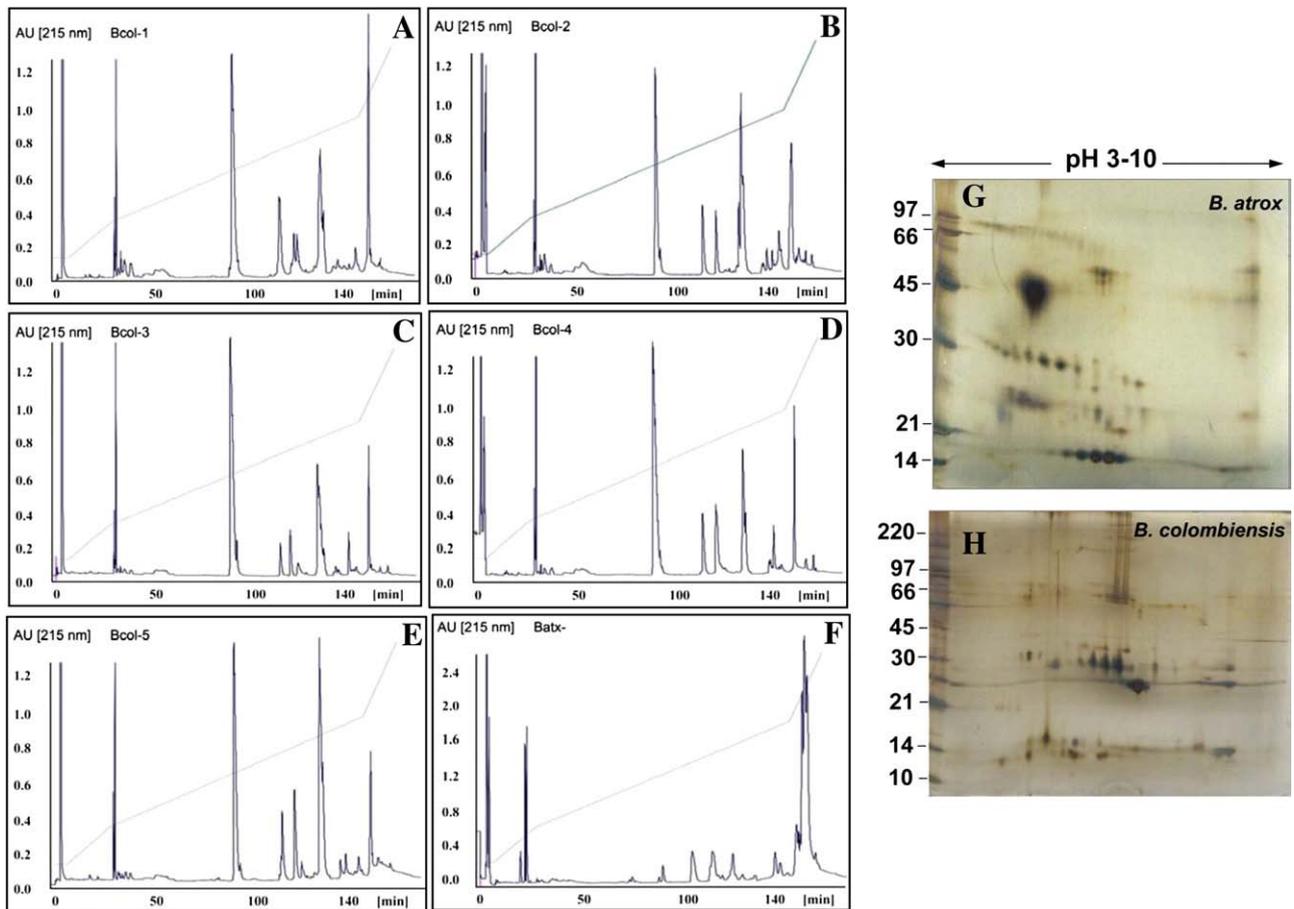


Figura 4 -Comparación de los cromatogramas de HPLC de fase inversa y las separaciones 2DE de *B. colombiensis* y *B. atrox* proteínas de veneno. Paneles A-E muestran los perfiles de proteínas de veneno de los venenos de *B. colombiensis* recolectados de diferentes lugares en Venezuela (ver Figura 5A): Bcol-1 (Sabana de Uchire, Estado Anzoátegui), Bcol-2 (San Felipe, Estado Yaracuy), Bcol-3 (Araira, Estado Miranda), Bcol-4 (Barlovento, Estado Miranda) y Bcol-5 (Santa Bárbara, Estado Barinas). Panel F, separación por HPLC de fase inversa de las proteínas del veneno de *B. atrox* (Brasil). Una caracterización detallada de las variaciones geográficas observadas en los venenos de *B. colombiensis* se informará en otro lugar. Paneles H y G, separaciones electroforéticas bidimensionales de las proteínas del veneno de *B. colombiensis* (Mano *B. atrox* (G) venenos).

[10]. Una comparación de los proteomas de veneno de *B. colombiensis* capturados en diferentes localidades de Venezuela con el de *B. atrox* evidencia pequeñas variaciones geográficas en la composición del primero y poca similitud entre los perfiles de HPLC de fase inversa del *B. colombiensis* y *B. atrox* los venenos (Figura 4, paneles A-F). Este punto es particularmente evidente cuando se comparan las separaciones electroforéticas bidimensionales de las proteínas del veneno (Figura 4, paneles H frente a G). Además, los datos de proteómica (tabla 1 en este trabajo versus tabla 1 en [28]) muestran que solo 9 péptidos (2 de un L-aminoácido oxidasa, 1 de un PIII-SVMP, 3 de una molécula CRISP y 3 de PLA2 P20474) de aproximadamente 200 secuencias de iones informadas [28] parece ser conservado en las dos especies. Además, las proteínas tipo lectina de tipo C representan abundantes toxinas en adultos. *B. atrox* veneno (de la región amazónica brasileña), mientras que estas moléculas no se han detectado en el *B. colombiensis* proteoma de veneno. Además, las secuencias de péptidos de la principal metaloproteína PI que se encuentran en *B. atrox* el veneno (Figura 1 en [28]) se apartan de los tramos polipeptídicos correspondientes de la metaloproteína hemorrágica BaP1 (P83512), que está fuertemente conservada en *B.*

colombiensis y *B. asper* venenos, siendo los homólogos más cercanos las PI-metaloproteínas Q8QG89 de *B. insularis* seguido por la PII-metaloproteína Q98SP2 de *B. jararaca*.

En conjunto, nuestros resultados indican un parentesco más estrecho de *B. colombiensis* y *B. asper* que cualquiera de estas especies con *B. atrox*. Esta conclusión, en el contexto de la hipótesis de que *B. asper* Surgió por la dispersión de una sola especie de boteropoide sudamericano en América Central. [2], apunta al antepasado de *B. colombiensis* como la fundación *B. asper* especies ancestrales (Figura 5). La llegada de los colonos centroamericanos puede haber sido anterior al levantamiento de las montañas de la parte baja de América Central (8-5 Mya), que fragmentó la herpetofauna homogénea original de las tierras bajas de Costa Rica en poblaciones alopatricas del Caribe y el Pacífico [3,4].

3.3. Antivenenos de *B. colombiensis*: componentes del veneno inmunodepletado por antivenenos polivalentes

El envenenamiento accidental por especies de *Bothrops* constituye un problema de salud pública relevante en Centro y Sudamérica

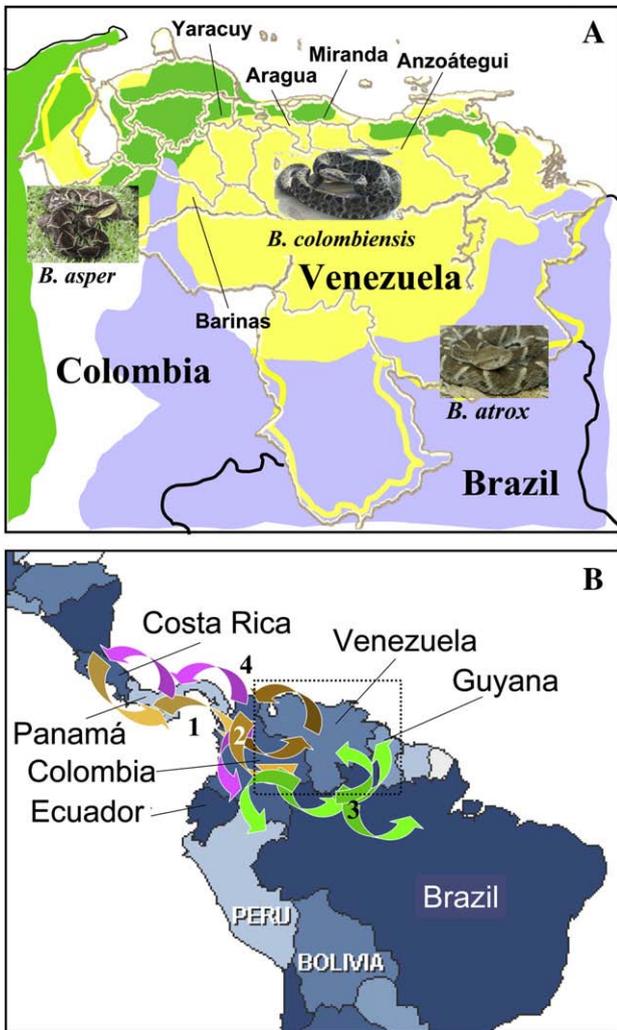


Figura 5 -Distribución geográfica de *B. colombiensis*, *B. asper*, y *B. atrox* (A) y el escenario biogeográfico para la colonización bidireccional de *Bothrops* sugerido por los datos de venenos (B). Panel A, distribución geográfica aproximada de *B. colombiensis* (amarillo), *B. asper* (verde), y *B. atrox* (gris) en el norte de Sudamérica dentro del rango resaltado en el panel B (adaptado de Campbell y Lamar

[1]). La ubicación de los estados donde *B. colombiensis* Los especímenes recolectados para este estudio se indican en el mapa físico de Venezuela. Panel B, detalle de Centroamérica y la parte norte de Sudamérica. Las flechas de color ocre en el mapa muestran las direcciones hipotéticas de colonización de América del Sur por el ancestro común de *Bothrops* en algún momento durante el Mioceno, 10-23 millones de años [2] (1), la radiación y diversificación de *Bothrops* en América del Sur (2 y 3) estableciendo los patrones actuales de distribución de *B. colombiensis* (marrón) y *B. atrox* (verde), y la reinvasión de Centroamérica por una sola especie, el antepasado de *B. asper*, (4) (flechas magenta). Las flechas no apuntan a la distribución geográfica exacta de las serpientes. Comparación de los proteomas de veneno de especies dentro del

asper-atrox puntos de grupo en el antepasado de *B. colombiensis* como la fundación *B. asper* especies ancestrales.

[19-22]. El tratamiento adecuado del envenenamiento por serpientes depende fundamentalmente de la capacidad de los antivenenos para revertir la coagulopatía inducida por el veneno, la hemorragia, el shock hipotensivo y otros signos de envenenamiento sistémico. Se producen varios antivenenos en América Latina utilizando diferentes venenos en los esquemas de inmunización.[48]. Cada uno de estos antivenenos es eficaz contra el envenenamiento por veneno de serpiente no incluido en el protocolo de inmunización, lo que demuestra el alto grado de reactividad cruzada inmunológica entre los venenos de serpiente crotalina de América Central y del Sur. Una consecuencia práctica de esta circunstancia afortunada es la posibilidad de utilizar estos antivenenos heterólogos para eludir la disponibilidad restringida de antivenenos específicos de especie en algunas regiones. Sin embargo, antes de probarlos en ensayos clínicos, los antivenenos deben evaluarse experimentalmente evaluando su capacidad neutralizante frente a las actividades tóxicas y enzimáticas más relevantes de los venenos de serpientes. Se han adaptado pruebas de laboratorio sencillas para la evaluación de antivenenos [49 y referencias citadas]. Nuestro enfoque de antivenenos[33,50] es simple y fácil de implementar en un laboratorio de química de proteínas y, por lo tanto, puede representar otro protocolo útil para investigar la inmunoreactividad y, por lo tanto, la posible utilidad terapéutica de los antivenenos frente a venenos homólogos y heterólogos.

Siguiendo las recomendaciones de los talleres internacionales que apuntan a la necesidad de fortalecer la producción y distribución de antiveneno en Centro y Sudamérica, y en otras regiones del mundo. [51-53], hemos investigado el espectro de reconocimiento y neutralización de toxinas mediante dos antivenenos dirigidos a los venenos de serpientes filogenéticamente cercanas y de importancia médica, *B. asper* y *B. colombiensis*, para evaluar su grado de reactividad cruzada. Figura 6 muestra una separación de fase inversa de *B. colombiensis* proteínas del veneno recuperadas en la fracción soluble después de la incubación del veneno con el antiveneno ABC venezolano (panel A) o el antiveneno polivalente ICP (panel B) seguido de inmunoprecipitación con antisuero IgG anti-caballo de conejo. Ambos antivenenos mostraron esencialmente la misma inmunoreactividad. Esencialmente, inmunoprecipitaron todos los fragmentos de DC, PIII-SVMP (excepto Bcol-26 / Bas-25 de 65 kDa), serina proteinasas, CRISP y L-aminoácido oxidasa, pero mostraron una inmunoreactividad limitada hacia las desintegrinas de tamaño mediano (Bcol 4-8),

PLA2 moléculas (Bcol 13-17) y PI-SVMP (Bcol 21-26 y Bcol 28-29). Estimamos que 25-El 35% de las últimas toxinas fueron sólo parcialmente inmunodepletado de *B. colombiensis* veneno por los antivenenos. De manera similar, el antiveneno ABC inmunodeplejo PIII-SVMP, serina proteinasas, CRISP, L-aminoácido oxidasa y moléculas similares a lectina de tipo C del veneno de *B. asper* (Figura 6C). Por otro lado, la desintegrina de tamaño mediano (BasP5), fragmento DC (BasP8), PLA2 moléculas (BasP9-13), y las PI-SVMPs BasP18, BasP22 y BasP27 fueron sólo parcialmente (~ 35-40%) inmunoprecipitado del veneno de *B. asper* de la vertiente del Pacífico de Costa Rica.

Sus perfiles inmunológicos evidencian aún más el estrecho parentesco evolutivo entre *B. colombiensis* y *B. asper*. Nuestros resultados también revelan una limitación de los dos antivenenos probados para precipitar y, por lo tanto, probablemente neutralizar, los componentes proteicos de bajo grado de veneno de ambos venenos. El fracaso de los antivenenos para reconocer toxinas de baja masa molecular (6 kDa a B32 kDa, predominantemente PLA2 proteínas y α -neurotoxinas) se ha informado previamente [34,50,54,55]. Nuestra

estudios antivenómicos presentes y previos [34,50] reveló la existencia en los venenos de viperidos de las tres posibles clases de toxinas con respecto a su inmunoreactividad hacia los antivenenos: toxinas C, toxinas completamente inmunodepletibles; Ptoxinas, toxinas parcialmente inmunodepleídas; y N-toxinas, proteínas no inmunoprecipitables. Además, las toxinas de clase P no pudieron eliminarse completamente del veneno aumentando hasta cinco veces la relación antiveneno / veneno, lo que sugiere que estas toxinas son poco inmunogénicas y desencadenan la generación de anticuerpos de baja afinidad en el caballo. Suponiendo un vínculo entre el in vitro capacidad de inmunodepleción de toxinas de un antiveneno

y es in vivo neutralizando la actividad hacia las mismas moléculas de toxina, los futuros protocolos de inmunización deberían hacer uso de mezclas de inmunógenos para mejorar la generación de anticuerpos de alta afinidad contra las toxinas de clase P y clase N.

La eficacia del antiveneno ICP en la neutralización de *B. colombiensis* el veneno fue evidenciado por la abrogación del efecto letal. La dosis letal mediana de *B. colombiensis* el veneno, por vía intraperitoneal, fue de 7,76 mg / kg en ratones. Ensayos de neutralización con el antiveneno polivalente ICP indicó que la dosis media efectiva (DE₅₀) fue 2,16 mg de veneno neutralizado por ml de antiveneno (límites de confianza del 95%: 1,56-2,99 mg de veneno por ml de antiveneno). Para comparativo propósitos, el DE₅₀ de este antiveneno contra el veneno de *B. asper* se ha informado como 3 mg de veneno / ml de antiveneno [56].

3.4. Observaciones finales y perspectivas

La filogenia del *B. atrox-asper* El complejo aún está lejos de resolverse y la identidad de varios taxones sigue sin estar clara. A partir del examen de 374 especímenes de América Central, Sasa [57] concluyó que "el valor taxonómico de algunos caracteres comúnmente empleados en *B. atrox-asper* teclas [1] Debe considerarse con precaución, especialmente porque varios de los rasgos se superponen en gran medida entre las especies o están influenciados por el género, la localidad o la etapa de la vida.". Nuestro estudio de veneno y antivenómico del veneno combinado de especímenes de la víbora venezolana Manapare lancehead pitviper, *B. colombiensis*, capturado en diferentes áreas de Venezuela, que van desde Barinas (suroeste), Yaracuy (noroeste), hasta Araraira y Barlovento (centro norte), proporciona un fuerte apoyo para su relación filogenética más cercana con *B. asper* que a *B. atrox*. Sin embargo, aunque nuestros datos estarían en consonancia con la sinonimia sugerida de *B. colombiensis* y *B. asper*, el estado taxonómico y los límites de las especies de las poblaciones de *Bothrops* venezolanas siguen siendo un problema desafiante. Una subespecie suele surgir como consecuencia del aislamiento geográfico dentro de una especie, representa un

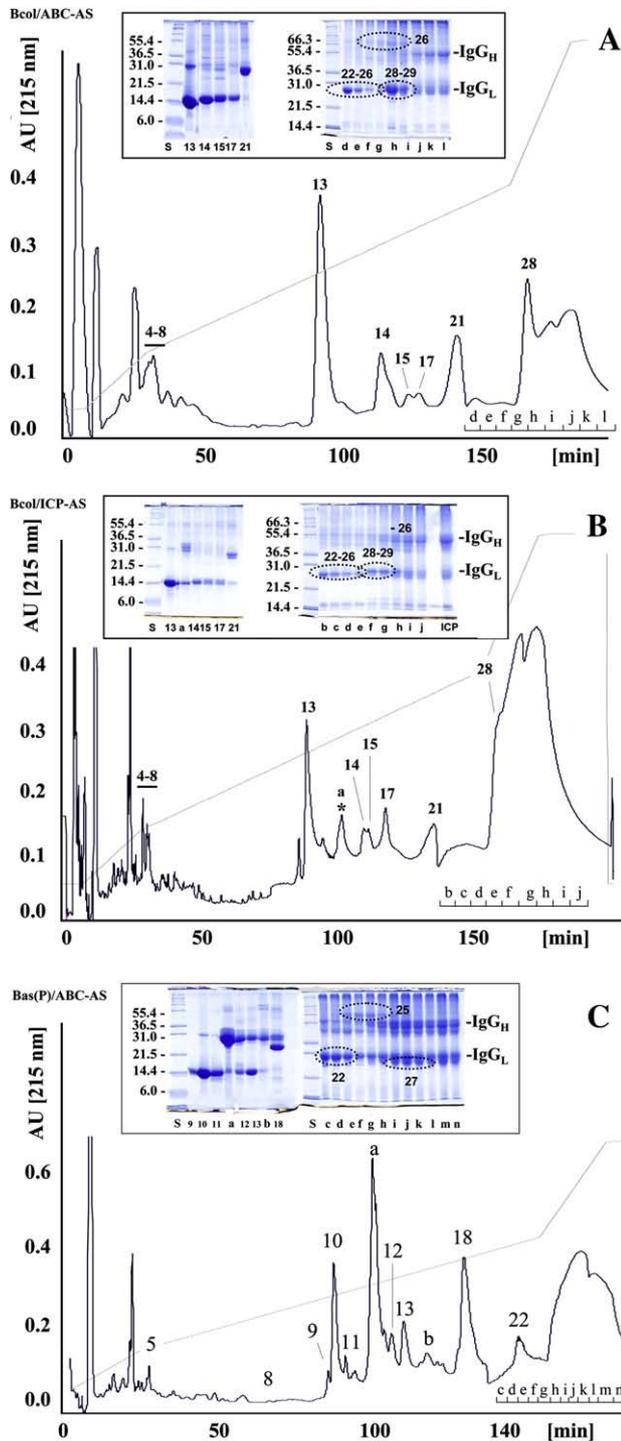


Figura 6 - Inmunodepleción de las proteínas del veneno por los antivenenos polivalentes. Los paneles A y B muestran, respectivamente, separaciones de fase inversa de *B. colombiensis* proteínas del veneno recuperadas después de la incubación del veneno crudo con el antiveneno venezolano anti-botrotoxic y anticrotalico y con el antiveneno costarricense polivalente (*Crotalinae*), seguido de antisuero IgG anti-caballo de conejo e inmunoprecipitación. Los insertos muestran un análisis SDS-PAGE de β -fracciones reducidas en mercaptoetanol marcadas en los cromatogramas. La numeración de las fracciones de proteínas es como en

tabla 1. Panel C, separación por HPLC de fase inversa de *B. asper* proteínas del veneno no inmunoprecipitadas incubando el veneno crudo con el antiveneno venezolano anti-botrotoxic y anti-crotalico, seguido de antisuero IgG anti-caballo de conejo e inmunoprecipitación. Numeración de proteínas como en [5]. Pico etiquetado "a" y "b" en los paneles B y C corresponden a fragmentos de IgG con secuencia N-terminal

LLGGPSVFIIPKPK. CID-MS / MS de iones de péptido tríptico de las bandas proteicas de 50 kDa y 25 kDa en fracciones h-l (panel A), g-j (panel B) y g-n (panel C) fueron identificados por MS / MS como fragmentos de IgG de los anticuerpos primarios y secundarios usados para la inmunoprecipitación (Tabla 2).

subdivisión taxonómica que se ubica justo debajo de una especie y comprende un grupo geográficamente separado de individuos genéticamente distintos cuyos miembros pueden cruzarse. Por tanto, la clasificación de *B. colombiensis* y *B. asper* como variaciones geográficas de la misma especie, como subespecie o como especies distintas requiere un esfuerzo adicional considerable, incluidos análisis genómicos y de campo detallados. No obstante, nuestro estudio puede ser relevante para reconstruir la historia natural y la cladogénesis de *Bothrops*. La variabilidad geográfica e individual bien documentada del veneno entre las especies de *Bothrops*

[5], y la superposición de los rangos de distribución de Colombia *B. asper* y amazónico *B. atrox* con *B. colombiensis* [1,14], piden análisis proteómicos comparativos adicionales de venenos de especímenes de poblaciones aisladas y de especímenes que habitan áreas de sospecha de simpatría para investigar el grado de variabilidad intraespecífica e intrapoblacional y las relaciones interespecíficas.

Una caracterización completa de los proteomas de veneno de *B. colombiensis* también puede contribuir a una comprensión más profunda de la fisiopatología de los envenenamientos por esta serpiente. Un objetivo principal de nuestros estudios combinados de veneno y antiveneno es la comprensión de la especificidad del antiveneno como un primer paso hacia el desarrollo de antivenenos mejorados con un perfil de neutralización de toxinas más completo. Por lo tanto, el conocimiento de las contribuciones relativas de diferentes familias de toxinas del veneno a la composición del veneno podría ser relevante para generar protocolos de inmunización que provoquen la producción de anticuerpos específicos de la toxina que muestren una mayor especificidad y efectividad que los antídotos convencionales producidos inmunizando caballos con veneno completo. Por otro lado, la notable similitud de los venenos de *B. colombiensis* y *B. asper* puede considerarse como una circunstancia afortunada para el manejo de las mordeduras de serpientes por cualquiera de estas especies de *Bothrops*.

Envenenamientos por *B. colombiensis* (LD₅₀ intraperitoneal en ratones = 5,8-11,6 µg / g) [44] y *B. asper* (LD₅₀ intraperitoneal en ratones = 2,8-3,7 µg / g) [58; <http://www.venomdoc.com/LD50/ld50ip.html>] se caracterizan por daño tisular local (dermonecrosis, ampollas, edema, hemorragia local y mionecrosis), y en casos severos por alteraciones sistémicas como defibrina (ogenación), trombocitopenia, hipoagregación plaquetaria, sangrado distante del sitio de la picadura, coagulación intravascular diseminada, shock cardiovascular e insuficiencia renal aguda [59-61]. La tasa de mortalidad en Costa Rica se ha mantenido en niveles bajos (por debajo de 0,2 por 100.000 habitantes y, en la mitad de los años, por debajo de 0,1 por 100.000 habitantes) para el período 1993-2006. Esto es probablemente una consecuencia de enfrentar el envenenamiento por mordedura de serpiente como un problema de salud pública junto con la mejora continua de la producción local de antivenenos y su distribución generalizada a hospitales y clínicas. [62]. El antiveneno polivalente fabricado en el Instituto Clodomiro Picado (ICP, Universidad de Costa Rica) utilizando una mezcla de tres serpientes (*B. asper*, *C. simus*, *L. stenophrys*)

Se ha informado que los venenos neutralizan la letalidad y las actividades hemorrágicas, caseinolíticas, coagulantes, defibrinantes, fibrinolíticas y fibrinogenolíticas de varios venenos de serpientes de América Central y del Sur. [39,63,64]. Aunque el espectro de actividades neutralizadoras del antiveneno ABC venezolano se levantó contra una mezcla de los venenos de *B. colombiensis* y *C. cumanensis* queda por investigar, la administración de este antiveneno reduce la tasa de mortalidad.

debido a *B. colombiensis* envenenamiento del 8% (sin tratamiento) a 0,7% [59,65]. La indistinguible reactividad inmunológica cruzada de los anticuerpos polivalentes ABC venezolanos y los anticuerpos polivalentes ICP costarricenses frente a los venenos de *B. colombiensis* y *B. asper* sugieren fuertemente la posibilidad de usar indistintamente cualquiera de estos antivenenos para el manejo de mordeduras de serpientes por cualquiera de estas especies de *Bothrops* (es decir, si la disponibilidad del antiveneno se ve comprometida). Aunque esta hipótesis necesita ser probada más a fondo mediante estudios de neutralización preclínicos más detallados, la caracterización del veneno utilizando nuestro enfoque antivenómico proporciona una base para la presunta protección del antiveneno polivalente ICP contra el letal, hemorrágico, coagulante, desfibrilador, fibrina (ogen) olítico y actividades caseinolíticas de *B. colombiensis* veneno, que están asociados con serina proteinasas y / o PIII-SVMP [66]. Nuestro estudio también predice la capacidad limitada de neutralización de los antivenenos ABC e ICP hacia una serie de componentes del veneno de *Bothrops*, sobre todo BPP, desintegrinas de tamaño mediano,

PLA₂s, y algunas moléculas de PI-SVMP.

Los antivenenos idealmente deberían neutralizar todos los componentes del veneno que juegan un papel en la fisiopatología del envenenamiento. Sin embargo, los protocolos de inmunización contra el veneno se han basado en la inyección de veneno crudo desde que se describieron los antídotos de primera generación hace más de 100 años.[67,68], y hacer un intento de dirigir la respuesta inmune a las proteínas del veneno más devastadoras (muchas proteínas del veneno no son tóxicas y muchas proteínas del veneno de baja masa molecular son altamente tóxicas pero débilmente inmunogénicas). En consecuencia, es probable que la dosis-eficacia de los antivenenos se vea afectada por la presencia de anticuerpos redundantes frente a moléculas no tóxicas y la falta de potentes anticuerpos neutralizantes frente a toxinas de pequeña masa molecular. Esto, a su vez, da como resultado la necesidad de volúmenes elevados para efectuar el tratamiento y el consiguiente aumento del riesgo de enfermedad del suero y reacciones adversas tempranas (efectos anafilácticos y anafilactoides). Los antivenenos se pueden mejorar mediante el uso de enfoques proteómicos y moleculares para seleccionar epítomos candidatos para el diseño basado en la estructura de anticuerpos de alta afinidad.[69], incluidos los que se dirigen a las toxinas P y N. Las construcciones de ADN diseñadas basadas en la estructura que codifican una serie de epítomos distribuidos relevantes y generalizados se han utilizado con éxito para la inmunización.[70]. Estos nuevos enfoques para diseñar anticuerpos la carta dependen fundamentalmente de un conocimiento detallado de la composición y el perfil inmunológico de la toxina del veneno. Nuestros protocolos venómicos y antivenómicos pueden resultar útiles para un conocimiento más preciso de los componentes del veneno más relevantes y abundantes y para la identificación de toxinas no reconocidas por los antivenenos, allanando así el camino para el diseño de inmunoterapias más efectivas.

Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado con la beca BFU2007-61563 del Ministerio de Educación y Ciencia de Madrid, proyectos de la Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Costa Rica (741-A7-611), CRUSA-CSIC (2007CR0004) y CYTED (206AC0281). Los viajes entre España y Costa Rica fueron financiados por Acciones Integradas 2006CR0010 entre el CSIC y la Universidad de Costa Rica (UCR).

REFERENCIAS

- [1] Campbell JA, Lamar WW. Los reptiles venenosos del hemisferio occidental. Ithaca: Comstock Publishing Associates; 2004.
- [2] Wüster W, Salomão MG, Quijada-Mascareñas JA, Thorpe RS, Duckett GJ, Puerto MG, et al. Orígenes y evolución de la fauna de víboras de pitbull de América del Sur: evidencia del análisis de la secuencia de ADN mitocondrial. En: Schuett GW, Höggren M, Douglas ME, Greene HW, editores. Biología de las víboras. Eagle Mountain Publishing LC; 2002. p. 111-28.
- [3] Coates AG, Obando JA. La evolución geológica del istmo centroamericano. En: Jackson JBC, Budd AF, Coats AG, editores. Evolución y medio ambiente en América tropical. Chicago: University of Chicago Press; 1996. p. 21-56.
- [4] Savage JM. El enigma de la herpetofauna centroamericana: ¿dispersiones o vicarianza? *Ann Mo Bot Gard* 1982; 69: 464-547.
- [5] Alape-Girón A, Sanz L, Escolano J, Flores-Díaz M, Madrigal M, Sasa M, et al. Veneno de serpiente del pitviper cabeza de lanza *Bothrops asper*: Variaciones geográficas, individuales y ontogenéticas. *J Proteome Res* 2008; 7: 3556-71.
- [6] Castoe TA, Parkinson CL. Modelos mixtos bayesianos y filogenia de pitvipers (Viperidae: Serpentes). *Mol Phylogenet Evol* 2006; 39: 91-110.
- [7] Wüster W, Golay P, Warrell DA. Sinopsis de desarrollos recientes en la sistemática de serpientes venenosas. *Toxicon* 1997; 35: 319-40.
- [8] Wüster W, Salomão MG, Thorpe RS, Puerto G, Furtado MFD, Hoge SA, et al. Sistemática de la *Bothrops atrox* complejo: nuevos conocimientos del análisis multivariado y la información de la secuencia del ADN mitocondrial. En: Thorpe RS, Wüster W, Malhotra A, editores. Serpientes venenosas, ecología, evolución y mordedura de serpiente. Oxford: Clarendon Press; 1999. p. 99-114.
- [9] Hallowell E. Descripciones de reptiles de América del Sur, supuestamente nuevas. *Proc Acad Nat Sci Philad* 1845; 2: 241-7.
- [10] Johnson JD, Dixon JR. Situación taxonómica de la macagua venezolana, *Bothrops colombiensis*. *J Herpetol* 1984; 18: 329-32.
- [11] Roze JA. Sobre especímenes tipo Hallowell de reptiles de Venezuela en la colección de la Academia de Ciencias Naturales de Filadelfia. *Not Nat (Filadelfia)* 1958; 309: 1-4.
- [12] Sandner-Montilla F. La necesaria revalidación de *Bothrops lanceolatus* (Lacépède, 1789) y el paso a sinonimia de *B. colombiensis* (Hallowell, 1845). *Mem Cient Ofidiología* 1979; 3.
- [13] Hoge AR. Informe preliminar sobre Crotalinae Neotropical (Serpentes: Viperidae). *Mem Inst Butantan* 1965; 42/43: 179-310.
- [14] Lancini AR, Kornacker PM. Die Schlangen von Venezuela. Caracas: Armitano Editores; 1989. 262 págs.
- [15] Daltry JC, Wüster W, Thorpe RS. Dieta y evolución del veneno de serpiente. *Nature* 1996; 379: 537-40.
- [16] Souza GHMF, Catharino RR, Iffa DR, Eberlin MN, Hyslop S. Toma de huellas dactilares de péptidos de venenos de serpiente mediante espectrometría de masas de ionización por nanoelectropulverización por infusión directa: uso potencial en la identificación y taxonomía de venenos. *J Mass Spectrom* 2008; 43: 594-9.
- [17] Calvete JJ, Escolano J, Sanz L. El veneno de serpiente de la especie *Bitis* revela una gran variación en la composición de la toxina del veneno intragénero: aplicación a la taxonomía de taxones congénéricos. *J Proteome Res* 2007; 6: 2732-45.
- [18] Tashima AK, Sanz L, Camargo ACM, Serrano SMT, Calvete JJ. Veneno de serpiente de los pitvipers brasileños *Bothrops cotiara* y *Bothrops fonsecai*. Identificación de marcadores taxonómicos. *J Proteomics* 2008; 71: 473-85.
- [19] Gutiérrez JM, Theakston RD, Warrell DA. Enfrentando el desatendido problema del envenenamiento por mordedura de serpiente: la necesidad de una asociación global. *PLoS Med* 2006; 3: e150-9.
- [20] Gutiérrez JM. Toxicología clínica de la mordedura de serpiente en Centroamérica. En: Meier J, White J, editores. Manual de Clínica Toxicología de venenos y venenos animales. Boca Raton, FL: CRC Press; 1995. p. 645-sesenta y cinco.
- [21] Serpientes venenosas. En: Thorpe RS, Wuster W, Malhotra A, editores. Ecología, Evolución y Mordedura de Serpiente. Oxford: Clarendon Press; 1997.
- [22] Warrell DA. Mordeduras de serpiente en América Central y del Sur: epidemiología, características clínicas y manejo clínico. En: Campbell JA, Lamar WW, editores. Los reptiles venenosos del hemisferio occidental. Ithaca: Comstock Publishing Associates; 2004. p. 709-62.
- [23] Meier J, White J, editores. Manual de toxicología clínica de venenos y venenos animales. Florida: CRC: Boca Raton; 1995.
- [24] Ventilador HW, Cardoso JLC. Toxicología clínica de las mordeduras de serpientes en América del Sur. En: Meier J, White J, editores. Manual de toxicología clínica de venenos y venenos animales. Florida: CRC Press; 1995. p. 667-88.
- [25] Rodríguez-Acosta A, Uzcatogui W, Azuaje R, Aguilar I, Girón M. Análisis clínico y epidemiológico de los accidentes por mordeduras de serpientes del género *Bothrops* en Venezuela. *Rev Cubana Med Trop* 2000; 52: 90-4.
- [26] DeSousa L, Vásquez D, Salazar D, Valecillos R, Vásquez D, Rojas M, et al. Mortalidad humana por envenenamiento de invertebrados y vertebrados en el estado Monagas, Venezuela. *Invest Clin* 2005; 46: 241-54.
- [27] Navarro J, Caraballo A, Sánchez E, Pérez JC, Rodríguez-Acosta A. Aspectos epidemiológicos y clínicos de las mordeduras de serpientes en el estado Monagas, Venezuela. *Rev Fac Medicina (Caracas)* 2003; 26: 100-4.
- [28] Guércio RAP, Shevchenko A, Shevchenko A, López-Lozano JL, Paba J, Sousa MV, et al. Variaciones ontogenéticas en el proteoma del veneno de la serpiente amazónica *Bothrops atrox*. *Proteoma Sci* 2006; 4:11.
- [29] Angulo Y, Estrada R, Gutiérrez JM. Alteraciones clínicas y de laboratorio en caballos durante la inmunización con veneno de serpiente para la producción de antiveneno polivalente (Crotalinae). *Toxicon* 1997; 35: 81-90.
- [30] Rojas G, Jiménez JM, Gutiérrez JM. Fraccionamiento con ácido caprílico de plasma de caballo hiperinmune: descripción de un procedimiento simple para la producción de antiveneno. *Toxicon* 1994; 32: 59-67.
- [31] Fasman DG, editor. Manual Práctico de Bioquímica y Biología Molecular. Boston: CRC Press; 1992.
- [32] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W y col. Gapped BLAST y PSI-BLAST: una nueva generación de programas de búsqueda de bases de datos de proteínas. *Res de ácidos nucleicos* 1997; 25: 3389-402.
- [33] Le Blanc JC, Hager JW, Ilisiu AM, Hunter C, Zhong F, Chu I. Capacidades de escaneo únicas de un nuevo espectrómetro de masas de trampa de iones lineal híbrido (Q TRAP) utilizado para aplicaciones proteómicas de alta sensibilidad. *Proteómica* 2003; 3: 859-69.
- [34] Lomonte B, Escolano J, Fernández J, Sanz L, Angulo Y, Gutiérrez JM, et al. Venenos de serpientes y antivenómicos de las víboras neotropicales arbóreas *Bothriechis lateralis* y *Bothriechis schlegelii*. *J Proteome Res* 2008; 7: 2445-57.
- [35] Calvete JJ, Juárez P, Sanz L. Venenos de serpientes. Estrategia y aplicaciones. *J Mass Spectrom* 2007; 42: 1405-14.
- [36] Angulo Y, Escolano J, Lomonte B, Gutiérrez JM, Sanz L, Calvete JJ. Veneno de serpientes de víboras centroamericanas: pistas para racionalizar los distintos perfiles de envenenamiento de *Atropoides nummifer* y *Atropoides picadoi*. *J Proteome Res* 2008; 7: 708-19.
- [37] Sanz L, Escolano J, Ferretti M, Biscoglio MJ, Rivera E, Crescenti EJ, et al. Venenos de serpientes de los Bushmasters de América Central y del Sur. Comparación de la composición de toxinas de *Lachesis muta* recopilados a partir de análisis proteómico frente a transcriptómico. *J Proteómica* 2008; 71: 46-60.
- [38] Sanz L, Ayzazyan N, Calvete JJ. Veneno de serpiente de las víboras de montaña armenias *Macrovipera lebetina obtusa* y *Vipera raddei*. *J Proteómica* 2008; 71: 198-209.
- [39] Bogarín G, Morais JF, Yamaguchi K, Stephano MA, Marcelino JR, Nishikawa AK, et al. Neutralización de la serpiente crotalina

- venenos de América Central y del Sur por antivenenos producidos en Brasil y Costa Rica. *Toxicon* 2000; 38: 1429-41.
- [40] Gabrijeljčić D, Drujan B, Gubensek F. Proteinasa coagulante de *Bothrops colombiensis* veneno. *Toxicon* 1982; 20: 275-8.
- [41] Rodríguez-Acosta A, Alonso R, Castro I, Aguilar A, Girón ME. Preparación de toxoide a partir del veneno de *Bothrops colombiensis* (Serpiente de Centro y Sudamérica). *Roum Arch Microbiol Immunol* 1991; 50: 209-14.
- [42] Rodríguez-Acosta A, Monterrey F, Céspedes G, Finol HJ. Alteraciones estructurales y ultraestructurales del encéfalo ocasionados por veneno de la serpiente mapanare (*Bothrops colombiensis*). *Rev Toxicol* 2003; 20: 199-203.
- [43] Galán JA, Guo M, Sánchez EE, Cantu E, Rodríguez-Acosta A, Pérez JC, et al. Análisis cuantitativo de venenos de serpientes utilizando marcaje de isótopos a base de polímeros solubles. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7: 785-99.
- [44] Girón ME, Salazar AM, Aguilar I, Pérez JC, Sánchez EE, Arocha-Piñango CL, et al. Actividades hemorrágicas, coagulantes y fibrino (geno) líticas del veneno crudo y fracciones de mapanare (*Bothrops colombiensis*) serpientes. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2008; 147: 113-21.
- [45] Sánchez EE, Rodríguez-Acosta A, Palomar R, Lucena SE, Bashir S, Soto JG, Pérez JC. Colombistatina: desintegrina aislada del veneno de la serpiente sudamericana (*Bothrops colombiensis*) que inhibe eficazmente la agregación plaquetaria y la adhesión celular SK-Mel-28. *Arco. Toxicol. en prensa*, DOI 10.1007 / s00204-008-0358-y.
- [46] Ownby CL, Selistre de Araujo HS, White SP, Fletcher JE. Lisina 49 fosfolipasa A₂ proteínas. *Toxicon* 1999; 37: 411-45.
- [47] Lomonte B, Angulo Y, Calderón L. Una descripción general de la lisina-49 fosfolipasa A₂miotoxinas de venenos de serpientes crotalidas y sus determinantes estructurales de la acción miotóxica. *Toxicon* 2003; 42: 885-901.
- [48] Meier J. Antivenenos disponibles comercialmente ("sueros hiperinmunes", "antivenenos", "antisuero") para antiveneno. En: Meier J, White J, editores. *Manual de toxicología clínica de venenos y venenos animales*. Florida: CRC Press; 1995. p. 689-721.
- [49] Bogarín G, Romero M, Rojas G, Lutsch C, Casadamont M, Lang J y col. Neutralización, por un mono específico *Bothrops lanceolatus* antiveneno, de actividades tóxicas inducidas por venenos de serpiente *Bothrops* homólogos y heterólogos. *Toxicon* 1999; 37: 551-7.
- [50] Gutiérrez JM, Sanz L, Escolano J, Fernández J, Lomonte B, Angulo Y, et al. Veneno de serpiente de las víboras de fosa de las Antillas menores *Bothrops caribbaeus* y *Bothrops lanceolatus*: correlación con las actividades toxicológicas y la inmunorreactividad de un antiveneno heterólogo. *J Proteome Res* 2008; 7: 4396-408.
- [51] Theakston RDG, Warrell DA, Griffiths E. Informe de un taller de la OMS sobre estandarización y control de antivenenos. *Toxicon* 2003; 41: 541-57.
- [52] Organización Mundial de la Salud. Rabia y envenenamientos. Un problema de salud pública desatendido. Informe de una reunión consultiva. Ginebra: OMS; 2007.
- [53] Gutiérrez JM, Higashi HG, Wen FH, Burnouf T. Fortalecimiento de la producción de antiveneno en laboratorios públicos de Centro y Sudamérica: informe de un taller. *Toxicon* 2007; 49: 30-5.
- [54] Fry BG, Wickramaratna JC, Jones A, Alewood PF, Hodgson WC. Especies y variaciones regionales en la eficacia del antiveneno contra la neurotoxicidad in vitro de los venenos de la víbora de la muerte (*Acanthophis*). *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 175: 140-8.
- [55] Juez RK, Henry PJ, Mirschin P, Jelinek G, Wilce JA. Toxinas no neutralizadas por el antiveneno de serpiente marrón. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 213: 117-25.
- [56] Saravia P, Rojas E, Escalante T, Arce V, Chaves E, Velásquez R, et al. El veneno de *Bothrops asper* de Guatemala: actividades tóxicas y neutralización por antivenenos. *Toxicon* 2001; 39: 401-5.
- [57] Sasa M. Variación morfológica en el pit viper cabeza de lanza *Bothrops asper* (Garman) (Serpentes: Viperidae) de Mesoamérica. *Rev Biol Trop* 2002; 50: 259-71.
- [58] Bolaños R. Toxicidad de los venenos de serpientes costarricenses para el ratón blanco. *Am J Trop Med Hyg* 1972; 21: 360-3.
- [59] Rodríguez C, Omaña B. Clínica y tratamiento de los accidentes ofídicos de Venezuela. Mimeo. Hospital Leopoldo Manrique T. Caracas, Venezuela. 1999.
- [60] Otero R, Gutiérrez J, Mesa MB, Duque E, Rodríguez O, Arango JL, et al. Complicaciones de las mordeduras de serpientes *Bothrops*, *Porthidium* y *Bothriechis* en Colombia. Una clínica y estudio epidemiológico de 39 casos atendidos en un hospital universitario. *Toxicon* 2002; 40: 1107-14.
- [61] Rucavado A, Soto M, Escalante T, Loría GD, Arni R, Gutiérrez JM. Trombocitopenia e hipoagregación plaquetaria inducida por *Bothrops asper* veneno de serpiente. Toxinas implicadas y su contribución a la hemorragia pulmonar inducida por metaloproteinasas. *Thromb Haemostas* 2005; 94: 123-31.
- [62] Fernández P, Gutiérrez JM. Mortalidad por envenenamiento por mordedura de serpiente en Costa Rica (1993-2006). *Toxicon* 2008; 52: 530-3.
- [63] Gutiérrez JM, Gené JA, Rojas G, Cerdas L. Neutralización de las actividades proteolíticas y hemorrágicas de venenos de serpientes costarricenses por un antiveneno polivalente. *Toxicon* 1985; 23: 887-93.
- [64] Gené JA, Roy A, Rojas G, Gutiérrez JM, Cerdas L. Estudio comparativo sobre coagulantes, desfibrinantes, fibrinolíticos y actividades fibrinogenolíticas de los venenos de serpientes crotalinas costarricenses y su neutralización por un antiveneno polivalente. *Toxicon* 1989; 27: 841-8.
- [65] Navarrete S, Luis F. Taxonomía e historia natural de las serpientes de Venezuela. Mimeo. Jornadas de Actualización, Manejo Básico de Accidentes con Animales Venenosos en Venezuela, Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. Noviembre de 2002.
- [66] Swenson S, Markland FS. Enzimas olíticas de fibrina (ogen) de veneno de serpiente. *Toxicon* 2005; 45: 1021-39.
- [67] Calmette A. Contribution à l'étude du venin des serpents. Immunization des animaux et traitement de l'envenimation. *Ann Inst Pasteur* 1894; 8: 275-7.
- [68] Calmette A. Propriétés du sérum des animaux immunisés contre le venin des serpents et thérapeutique de l'envenimation. *CR Acad Sci (Paris)* 1894; 68: 720-2.
- [69] Ferreira RN, Machado de Avila RA, Sánchez EF, Maria WS, Molina F, Granier C, et al. Los anticuerpos contra los epítomos sintéticos inhiben la actividad enzimática de la mutalislina II, una metaloproteinasas del veneno de la serpiente bushmaster. *Toxicon* 2006; 48: 1098-103.
- [70] Wagstaff SC, Laing GD, Theakston RGD, Pappaspyridis C, Harrison RA. Bioinformática e inmunización con ADN multiepítomo para diseñar un antiveneno racional para serpientes. *PLoS Med* 2006; 3: e184.