



Universidad de Costa Rica
Sede Rodrigo Facio Brenes
Facultad de Microbiología

Trabajo Final de Graduación para optar por el grado de Licenciatura en Microbiología y
Química Clínica

**Determinación de la composición proteómica y perfil toxicológico del veneno de
Bothriechis nubestris y evaluación de la inmunoreactividad y neutralización por parte
de un antiveneno poliespecífico para Centroamérica.**

Johelen Chacón Arguedas
B71994

San José, Costa Rica
Julio, 2023

Hoja de aprobación

Los que aquí firmamos damos fe que este trabajo posee todas las correcciones indicadas el día de la presentación oral de este Trabajo Final de Graduación:



Dr. Julián Fernández Ulate

Tutor



Dr. Bruno Lomonte Vigliotti

Lector



Ing. Stephanie Chaves Araya

Lector



Dr. Ariel Brenes Glenn

Presidente del Tribunal



Dr. Manuel Jiménez Díaz

Profesor designado

Dedicatorias y agradecimiento

Este Trabajo Final de Graduación es la última etapa de muchos años de esfuerzo, dedicación, alegrías, tristezas y estrés. Le agradezco enormemente a Dios por darme la sabiduría para poder sobrellevar estos años de estudio y por darme la iluminación necesaria para seguir siempre el camino correcto.

Le agradezco a mi mamá, que es un pilar fundamental en todos los aspectos de mi vida, incluyendo el ámbito académico. Sus consejos en redacción serán eternamente agradecidos. Sin ella no podría haber llegado a donde me encuentro hoy.

A mi papá le agradezco el acompañamiento y apoyo que me ha brindado todos estos años de vida académica.

A mis tíos y abuelos les agradeceré sus palabras de apoyo en mis momentos más vulnerables y su preocupación en ayudarme a salir adelante.

A Joshua le agradezco su apoyo en los momentos difíciles, el darme motivación en los momentos donde no había, su disposición a leer y todas las recomendaciones realizadas.

Al Dr. Fernández le estaré eternamente agradecida por la paciencia y su tutoría a lo largo de este trabajo.

Al Dr. Lomonte y a la Ing. Chaves les agradezco el haber invertido su tiempo en leer este trabajo y darme recomendaciones sobre como mejorar el mismo.

A mis compañeros de internado les estaré agradecida siempre por haber convertido esta etapa en un momento inolvidable y feliz de mi vida.

Índice General

Índice De Figuras	5
Justificación	6
Hipótesis	8
Objetivos.....	8
Resumen.....	9
Antecedentes	10
Metodología	15
Resultados	22
Discusión	31
Conclusiones	34
Referencias Bibliográficas	36

Índice De Figuras

Figura 1. Ejemplar adulto de <i>Bothriechis nubestris</i> , perfil de elución de RP- HPLC de proteínas del veneno de <i>B. nubestris</i> y análisis SDS-PAGE.	23
Figura 2. Composición del veneno de <i>Bothriechis nubestris</i> según familias de proteínas, expresada como porcentaje del contenido total de proteínas.....	24
Figura 3. Actividad fosfolipasa A ₂ de los venenos de <i>B. nubestris</i> y <i>B. asper</i> sobre el sustrato sintético monodisperso ácido 4-nitro-3-octanoiloxibenzoico.	25
Figura 4. Actividad proteolítica del veneno de <i>Bothriechis nubestris</i>	26
Figura 5. Evaluación de la actividad mitotóxica provocada por los venenos de <i>B. nubestris</i> y <i>B. asper</i>	27
Figura 6. Disminución en el hematocrito provocada por el veneno de <i>B. nubestris</i>	27
Figura 7. Reconocimiento de veneno de <i>B. asper</i> y reconocimiento cruzado de veneno de <i>B. nubestris</i> por el antiveneno equino comercial preparado contra venenos de vipéridos (PoliVal- ICP), evaluado por ELISA.....	29
Figura 8. Reconocimiento cruzado de las principales fracciones RP-HPLC del veneno de <i>B. nubestris</i> por un antiveneno equino comercial producido contra venenos de vipéridos (PoliVAL-ICP).	30

Justificación

El envenenamiento ofídico causado por las mordeduras de serpientes es un problema de salud pública y es catalogado por la OMS como una enfermedad tropical desatendida. Se estima que al año ocurren alrededor de 5.4 millones de mordeduras de serpientes, de las cuales entre 1.8 y 2.7 millones terminan en envenenamientos, a nivel mundial. Estos envenenamientos resultan en la muerte de 81 000 a 138 000 personas y en la adquisición de secuelas físicas y psicológicas por parte de los afectados que ven alterada su calidad de vida y la de sus familias (OMS, 2021). Los envenenamientos ofídicos se consideran una enfermedad desatendida debido a que ocurren principalmente en comunidades rurales, las cuales cuentan con bajos ingresos económicos, así como sistemas de salud débiles y escasos recursos médicos (Gutiérrez et al., 2017).

En Costa Rica se estima que ocurren de 500 a 600 mordeduras de serpiente anualmente, lo que se refleja en una incidencia de 13 casos por cada 100 000 habitantes. A nivel país, la mortalidad por estos accidentes ofídicos ha disminuido hasta alcanzar una tasa de mortalidad entre 0,02 y 0,15 casos por cada 100 000 habitantes, entre los años de 1993 y 2006 (Gutiérrez et al., 2020). Cabe mencionar que en 1953 dicha tasa alcanzó valores de 4,93 por cada 100 000 habitantes, por lo que se observa una disminución significativa de la misma (Fernández & Gutiérrez, 2008). Esta disminución en la mortalidad se debe en gran parte a la creación del “Programa de sueros Antiofídicos” del Ministerio de Salud Pública en 1967, el cual ha permitido la producción de sueros antiofídicos a nivel nacional (Gutiérrez et al., 2020). Lo anterior, facilitó la distribución del suero a lo largo del país, principalmente a las zonas más afectadas por estos eventos como los son Puntarenas y Limón (Fernández & Gutiérrez, 2008).

Centroamérica, por su riqueza biológica y por sus características ecológicas, posee una abundante variedad de serpientes, aproximadamente 150 especies, de las cuales 41 se consideran venenosas (Brenes, 2014). Las familias de serpientes causantes de la mayor cantidad de envenenamientos ofídicos son las familias Viperidae y Elapidae. La familia

Viperidae se clasifica en los géneros: *Agkistrodon*, *Atropoides*, *Bothriechis*, *Bothrops*, *Cerrophidion*, *Metlapilcoatlus*, *Crotalus*, *Lachesis* y *Porthidium* (Freund et al., 2022).

Los venenos provenientes de las serpientes de la familia Viperidae se caracterizan por causar afectaciones locales importantes y manifestaciones asociadas a sangrado, coagulopatías y choque hipovolémico. Para tratar el envenenamiento causado por una mordedura de serpientes en Costa Rica se utiliza el antiveneno producido por el Instituto Clodomiro Picado (ICP) (Freund et al., 2022).

Para complementar la producción de antivenenos, el ICP realiza la caracterización de los venenos de las diversas especies de serpientes halladas en el país. Hasta hace pocos años, dicha caracterización se llevaba a cabo mediante un enfoque bioquímico tradicional. Este enfoque tradicional se centraba en el aislamiento de algunas toxinas, así como el análisis de sus características bioquímicas, sus efectos fisiopatológicos y su mecanismo de acción. Esta metodología requería grandes cantidades de veneno, por lo que estos estudios se realizaban en aquellos venenos que se encontraban disponibles en cantidades más abundantes (Lomonte et al., 2014).

Hoy en día el análisis proteómico es el enfoque más utilizado en el estudio de los venenos de serpientes. Esta estrategia permite obtener una identificación de las toxinas secretadas en el veneno y su abundancia en el mismo, además de conferir ventajas sobre el método tradicional, como lo son una mayor sensibilidad y un menor tiempo de análisis. La caracterización proteómica es una herramienta de alto valor en el estudio de los procesos fisiopatológicos producidos por el veneno. Asimismo, presenta beneficios en áreas como la investigación básica, diagnóstico clínico y en el desarrollo de drogas con un potencial uso clínico (Lomonte et al., 2014).

A pesar de que los antivenenos son la mejor herramienta disponible para combatir el envenenamiento ofídico, su capacidad neutralizante puede no ser óptima al enfrentarse a venenos que no se encuentran dentro del inóculo utilizado para su formulación (Calvete et al., 2007). En antiveneno del ICP hasta hace poco tiempo fue producido a partir del veneno

completo de tres importantes especies de vipéridos presentes en el país. Se ha visto que a pesar de que para su formulación solo se emplearon estos tres venenos, el antiveneno resultante es efectivo contra la gran mayoría de vipéridos del país. Lo anterior debido al reconocimiento cruzado que se presenta con los componentes que comparten los venenos esta familia (Gutiérrez et al., 1988).

Conocer las toxinas secretadas y su abundancia en un veneno de serpiente, facilita el desarrollo de una estrategia para analizar el reconocimiento de cada componente de los venenos por parte de los anticuerpos presentes en los antivenenos. Al caracterizar un nuevo veneno se pueden realizar pruebas de inmunoreactividad y neutralización por parte antiveneno existente. Lo anterior permite conocer si el antiveneno con el que se cuenta, presenta un efecto protector frente a este nuevo veneno (Lomonte, 2012). Si el antiveneno no permite una adecuada neutralización, el análisis proteómico abre la puerta a diseñar protocolos de inmunización utilizando las toxinas más relevantes del veneno, con el objetivo de mejorar su capacidad neutralizante (Calvete et al., 2007).

Hipótesis

El veneno de *Bothriechis nubestris* no presenta diferencias significativas con respecto al veneno de otras especies de vipéridos a nivel de composición proteómica, perfil toxicológico, inmunoreactividad y neutralización por parte de un antiveneno poliespecífico para Centroamérica.

Objetivos

Objetivo general: Determinar la composición proteómica y perfil toxicológico del veneno de *B. nubestris*, así como su inmunoreactividad y neutralización por parte de un antiveneno poliespecífico para Centroamérica.

Objetivos específicos:

- i. Determinar la composición proteómica y el perfil toxicológico del veneno de *B. nubestris*.

- ii. Evaluar la inmunoreactividad del veneno de *B. nubestris* por parte de un antiveneno poliespecífico para Centroamérica.
- iii. Analizar la neutralización de la actividad letal del veneno de *B. nubestris* por parte de un antiveneno poliespecífico para Centroamérica.

Resumen

Bothriechis nubestris es la serpiente venenosa más reciente en ser descrita en Costa Rica. Esta especie se encuentra en las regiones central y norte de la Cordillera de Talamanca. Muchas características del veneno de esta víbora arbórea todavía no han sido estudiadas. Usando el veneno de un espécimen, se realizó un análisis del proteoma, las actividades toxicológicas y el inmunoreconocimiento y neutralización por parte de un antiveneno polivalente para Centroamérica. Las toxinas de la familia metaloproteinasas son las más abundantes del veneno, las cuales conforman el 50% de las proteínas totales del mismo. Una cantidad considerable de Lectinas tipo C también fueron encontradas en el veneno de *B. nubestris*. En concordancia con la composición proteómica, las pruebas *in vitro* mostraron que el veneno de *B. nubestris* presenta alta actividad proteolítica y baja actividad fosfolipasa A₂, así como una actividad hemorrágica considerable *in vivo*. La mionecrosis provocada por la inyección de veneno en el gastrocnemio de ratones no fue estadísticamente significativa. Ensayos preclínicos *in vivo* demostraron que el antiveneno polivalente producido por el Instituto Clodomiro Picado presenta una neutralización adecuada de la hemorragia y la letalidad provocada por el veneno.

Antecedentes

Las serpientes son reptiles pertenecientes al Orden Squamata, se caracterizan por poseer piel cubierta por escamas y un hueso cuadrado móvil que les permite mover la maxila superior para ingerir presas de gran tamaño. Todas las serpientes son depredadores, por lo que se alimentan de otros animales. Las serpientes tienen varias formas de atrapar a sus presas. Algunas serpientes no venenosas como las pertenecientes a la familia Colubridae utilizan sus colmillos para inmovilizar presas pequeñas y posteriormente devorarlas. Las boas y pitones aunque tampoco poseen veneno, utilizan la constricción para atrapar a sus presas, que suelen ser más grandes. Por último, las serpientes venenosas utilizan secreciones tóxicas para inmovilizar y matar a sus presas (Sasa et al., 2019).

El veneno es una mezcla compleja de proteínas, compuesto principalmente por toxinas que pueden o no tener actividades enzimáticas. Éste, al ser inoculado por la serpiente en sus presas, produce efectos patológicos variados, como inmovilización y muerte, e incluso colabora con el proceso de digestión de las mismas (Sasa et al., 2019). Es importante mencionar que las serpientes atacan a sus presas únicamente para obtener alimento. Debido a lo anterior, las mordeduras en humanos son eventos meramente accidentales, dado que la reacción de ataque o mordedura a humanos no es más que un comportamiento de defensa, las serpientes no lo hacen para infligirle daño al ser humano o para alimentarse de él. (Organización Panamericana de la Salud, 2009). Sin embargo, dependiendo de la cantidad de veneno inoculado por la serpiente, el envenenamiento en humanos puede provocar desde efectos pasajeros hasta la muerte (Sasa et al., 2019).

En Costa Rica se encuentran 144 especies de serpientes, de las cuáles solamente 24 se consideran venenosas. Del total de serpientes venenosas 17 se encuentran dentro de la familia Viperidae (Solórzano, 2022). La subfamilia Crotalinae corresponde a víboras pertenecientes a la familia Viperidae que poseen la característica distintiva de poseer una foseta loreal, que es termorreceptora, para detectar a sus presas. Desde el punto de vista médico las víboras son las serpientes más importantes ya que son la causa de la mayoría de accidentes ofídicos en la región. Estas pueden morder cualquier parte del cuerpo por su

capacidad de apertura de la boca y lo largo de sus colmillos, además su veneno puede ocasionar efectos severos y de consideración (Sasa et al., 2019).

El envenenamiento por serpientes de la familia Viperidae se caracteriza por afectaciones locales importantes como edema, dolor, necrosis, manifestaciones asociadas a sangrado y afectaciones sistémicas como choque hipovolémico (Gutiérrez, 1980). Dentro de los principales componentes de los venenos de los vipéridos en América se encuentran toxinas de las familias metaloproteinasa, serina proteínasa, fosfolipasa A₂, lectinas tipo C, desintegrina, péptidos potenciadores de bradicinina y hialuronidasa (Gutiérrez et al., 2011).

El edema presente en este tipo de envenenamientos es un efecto multifactorial originado por la acción directa del veneno sobre la microvasculatura, y por acciones indirectas sobre leucocitos (ej. mastocitos) que liberan factores inflamatorios. Lo anterior conlleva a un aumento en la permeabilidad vascular y extravasación. El edema generado produce consecuencias importantes como desplazamiento de fluido del compartimento vascular al compartimento tisular intersticial. Lo anterior, aunado a la hemorragia causada por el veneno, provoca a un cuadro hipovolémico que en algunos casos desencadena en una alteración hemodinámica, la cual conduce a un choque cardiovascular. Estos efectos son causados por proteínas de la familia metaloproteinasas y otros componentes del veneno (Gutiérrez et al., 2011).

El sangrado local es otra de las manifestaciones comunes en el envenenamiento por vipéridos. Este se manifiesta mediante equimosis, hematomas y sangrado a través de los orificios ocasionados por la mordedura de la serpiente. Esta manifestación se debe principalmente a metaloproteinasas dependientes de zinc llamadas también hemorraginas. Estas se dividen en varias clases, dependiendo de su estructura organizada en dominios. Las metaloproteinasas P-I poseen únicamente el dominio metaloproteinasa, las P-II contienen el dominio metaloproteinasa y además dominios desintegrina. La P-III posee los mismos dominios que la P-II con la adición de un dominio rico en cisteína. Por último, la P-IV posee los mismos dominios que la P-III con la adición de una cadena polipeptídica homóloga a lectinas tipo C. Los dominios adicionales al dominio metaloproteinasa dirigen la hemorragina

a sitios relevantes en la microvasculatura, inhiben la agregación plaquetaria y bloquean la inhibición de la hemorragina por inhibidores séricos. Las metaloproteinasas con actividad hemorrágica más potente son las P-III (Gutiérrez et al., 2011).

Las serina proteinasas son otra familia de proteínas presentes en el veneno de gran cantidad de serpientes de la familia Viperidae. Estas proteínas pueden actuar directamente sobre el fibrinógeno generando fibrina. Por su acción se les denomina enzimas tipo trombina, sin embargo a diferencia de la trombina estas enzimas generan trombos débiles, fácilmente degradables por el sistema fibrinolítico. La trombina libera fibrinopéptidos A y B a partir del fibrinógeno, en cambio la mayoría de serina proteinasas liberan solamente el fibrinopéptido A. Es necesaria la presencia de ambos fibrinopéptidos para generar un trombo estable, al haber solamente fibrinopéptido A se genera un trombo débil. Lo anterior conlleva al consumo de fibrinógeno y por ende la alteración de los tiempos de coagulación (Yonamine et al., 2013).

La necrosis en tejidos, otra de las manifestaciones de envenenamiento por vipéridos, es desencadenada por proteínas como las fosfolipasas A₂ que ocasionan miotoxicidad en músculo esquelético. El mecanismo de acción de estas fosfolipasas A₂ miotóxicas se basa en la unión y desorganización de la membrana plasmática de las células musculares. Un subgrupo de estas proteínas carece de dicha actividad enzimática aunque conserva la capacidad de dañar las fibras musculares. Se ha demostrado que el sarcolema es el principal sitio de acción de estas proteínas, en donde ocurre una rápida pérdida de permeabilidad. (Fernandes et al., 2014)

Los antivenenos son un recurso fundamental en el tratamiento de los accidentes ofídicos. El utilizado para el tratamiento de mordeduras de vipéridos, es el antiveneno polivalente PoliVal-ICP. Este se produce mediante la inmunización activa de caballos adultos sanos con una mezcla de partes iguales de veneno de *Bothrops asper*, *Crotalus simus*, *Lachesis stenophrys* y *Crotalus durissus pifanorum* (Alfaro-Chinchilla et al., 2021). Al inyectar a los caballos con dosis crecientes de esta mezcla, en conjunto con un adyuvante, los animales generan una respuesta inmune que da origen a los anticuerpos que

posteriormente son purificados. Esos anticuerpos purificados son inyectados en humanos en casos de accidentes ofídicos, para poder neutralizar el veneno (Gutiérrez et al., 1988).

En Costa Rica, la mayoría de los accidentes ofídicos son causados por serpientes de la familia Viperidae (Freund et al., 2022). Las serpientes crotalinas pertenecen a la familia Viperidae y son las serpientes más importantes desde el punto de vista médico ya que son la causa de la mayoría de accidentes ofídicos en la región. Estas se clasifican en 3 grandes grupos: víboras arborícolas, víboras rastreras y grandes víboras. Las víboras arborícolas incluyen a todos los miembros de la familia *Bothriechis*, que son especies que suelen encontrarse en la vegetación. Se encuentran en la base o copas de los árboles y presentan colores verdes y amarillos que facilitan el camuflaje. Estas serpientes poseen características como cuerpos estilizados y delgados, así como cola prensil para poder sostener el cuerpo al colgarse (Sasa et al., 2019).

Dentro del género *Bothriechis* se encuentra *Bothriechis nubestris*, la más reciente especie de serpiente venenosa descubierta y descrita en Costa Rica. Esta serpiente anteriormente estaba clasificada dentro de la especie *Bothriechis nigroviridis*, pero gracias a análisis filogenéticos y morfológicos se ha podido clasificar como una especie aparte. *B. nubestris* se encuentra distribuida en las zonas altas de Costa Rica como la porción norte y central de la Cordillera de Talamanca. También se ha reportado en el Cerro de la Muerte ubicado en San Gerardo de Dota de Costa Rica, especialmente en la zona de transición de bosque nuboso y bosque lluvioso (Doan et al., 2016).

B. nubestris es una víbora arborícola con el dorso verde con manchas negras, escamas superciliares ausentes y escamas supraoculares con una forma característica de riñón. Además, posee 150-160 escamas ventrales, característica que permite distinguir a *B. nubestris* de *B. nigroviridis*, ya que esta última presenta de 136-149 escamas ventrales. *B. nigroviridis* posee escamas supraoculares más anchas, que no presentan forma de riñón, por lo que también se utiliza para realizar la distinción. Adicionalmente la ausencia de escamas superciliares ayuda a diferenciar a *B. nubestris* de otras serpientes del género *Bothriechis* como *B. schlegelii* y *B. supraciliaris* (Doan et al., 2016).

Para analizar el veneno de *B. nubes*, se utilizarán diversas estrategias que se han desarrollado para el estudio de venenos de serpiente. Una de ellas es la estrategia venómica o “snake venomics”. Esta estrategia inicia con una separación de los diferentes componentes del veneno mediante RP-HPLC; una vez obtenidos los diferentes componentes, se procede a realizar una corrida electroforética, luego una digestión de las de las proteínas separadas en el gel y por último la secuenciación parcial mediante espectrometría de masas de cada componente. Mediante este protocolo es posible conocer con certeza la composición de cada veneno y el porcentaje de cada familia proteica en el mismo (Lomonte et al, 2014). Esta metodología es sumamente valiosa a la hora de comprender aspectos evolutivos de las serpientes. Facilita también el estudio de los perfiles toxicológicos de los distintos venenos y sus efectos biológicos. Incluso ha sido una gran herramienta en el desarrollo y mejoramiento de drogas terapéuticas (Calvete et al., 2007).

Previo a la implementación de la estrategia venómica en el estudio de los venenos de serpiente, la única estrategia que se utilizaba para caracterizar e identificar los componentes proteicos de interés en los venenos, era la purificación de proteínas guiada por bioensayo (Sahyoun et al., 2022). Esta estrategia se centraba en el aislamiento de las toxinas, obtener las características bioquímicas de las mismas, sus efectos fisiopatológicos y su mecanismo de acción.

Una variante de la estrategia venómica tradicional, que se ha utilizado recientemente en la caracterización de venenos es el análisis por *shotgun*. Este análisis consiste en una digestión trípica del veneno completo, los péptidos resultantes de esta digestión son separados mediante RP-HPLC e identificados mediante espectrometría de masas. Esta estrategia permite la recuperación de proteínas poco abundantes, ya que pueden perderse durante el paso de separación realizado en la estrategia venómica tradicional (Sahyoun et al., 2022).

Metodología

Veneno y Antiveneno

El veneno de *B. nubestris* fue proporcionado por el Laboratorio para la Investigación de Animales Peligrosos (LIAP) del Instituto Clodomiro Picado. Dicho veneno fue previamente liofilizado y se almacenó en un congelador a -20 °C. Adicionalmente, el antiveneno poliespecífico para Centroamérica (PoliVal-ICP) fue proporcionado por la Sección de Producción del Instituto Clodomiro Picado (Lote 5880417 POLQ).

Animales de laboratorio

Se emplearon ratones CD1 de ambos sexos con un pesos de 16-18 g y 18-20 g, de acuerdo con los protocolos establecidos por el Comité institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUA) de la Universidad de Costa Rica (permiso No. 052-2019).

HPLC de fase reversa y SDS-PAGE

El fraccionamiento por HPLC de fase reversa del veneno de *B. nubestris* se realizó en un cromatógrafo Agilent 1200. Las muestras de veneno crudo (2 mg) se disolvieron en 200 µL de solución A (ácido trifluoroacético al 0,1%; TFA), se centrifugaron a 15.000 revoluciones por minuto durante 5 min para eliminar los residuos sólidos y se separaron en una columna C18 (250 x 4.6 mm, partículas de 5 µm tamaño; Teknokroma).

La elución se realizó a una velocidad de flujo de 1 mL/min aplicando un gradiente hacia la solución B (TFA al 0,1% en acetonitrilo), de la siguiente manera: 0% B durante 5 min, 0-15% B durante 10 min, 15- 45% B durante 60 min, 45-70% B durante 10 min, y 70% B durante 9 min. La absorbancia se midió a 215 nm y las fracciones observadas en el cromatograma se recogieron manualmente. El solvente fue eliminado de las muestras utilizando una centrifuga de vacío (SpeedVac, Thermo). Posteriormente, las proteínas

presentes en las fracciones se separaron mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%, en condiciones reductoras y no reductoras. Finalmente, las bandas obtenidas fueron teñidas con azul de Coomassie R-250.

Espectrometría de masas de las fracciones obtenidas por RP-HPLC y SDS-PAGE y estimación de la composición proteómica de los venenos.

Se cortaron las bandas proteicas del gel de SDS-PAGE, las cuales se sometieron a reducción (ditiotreitól 10 mM), alquilación (yodoacetamida 50 mM) y digestión en gel toda la noche con tripsina bovina grado secuenciación (en bicarbonato de amonio 25 mM), utilizando una estación de trabajo automatizada (Intavis). Los péptidos resultantes se sometieron a ionización en nanoelectrospray acoplada a espectrometría de masas en tándem en un espectrómetro de masas Q-Exactive Plus® (Thermo scientific). Se separaron 12 µL de cada digestión triptica a 200 nL/min con una columna C18 Easy-spray® (15 cm x 75 µm, partículas de 3 µm tamaño) usando un cromatógrafo nano-Easy® 1200.

Se generó un gradiente de 0,1% de ácido fórmico (solución A) a 80% de acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico (solución B): 1-5% B en 1 min, 5-26% B en 25 min, 26-79% B en 4 min, 79-99% de B en 1 min y 99% de B en 4 min, para un tiempo total de 35 min. Los espectros de masas se adquirieron en modo positivo a 1,9 kV, a una temperatura capilar de 200 °C, utilizando un barrido en el rango de 400-1600 m/z, con un tiempo máximo de inyección de 100 ms, un objetivo de AGC de 3×10^6 y una resolución de Orbitrap de 70.000. Los 10 iones principales con 2-5 cargas positivas se fragmentaron con un objetivo AGC de 1×10^5 , un tiempo de inyección máximo de 110 ms, una resolución de 17 500, un recuento de bucles de 10, una ventana de aislamiento de 1,4 m/z y un tiempo de exclusión dinámico de 5 segundos.

Los espectros MS/MS se procesaron para definir las coincidencias con péptidos de familias de proteínas conocidas, por similitud con secuencias contenidas en la base de datos de la glándula de veneno de *B.nubestris* y *B.nigroviridis* (Mason et al., 2020), utilizando Peaks X®. La carbamidometilación de cisteína se estableció como una modificación fija,

mientras que la desamidación de la asparagina y glutamina o la oxidación de metionina se establecieron como modificaciones variables, permitiendo hasta 3 escisiones perdidas por la tripsina. Los parámetros para la aceptación de coincidencias se establecieron en FDR <0,1%, puntuación de proteína $-10\lg P \geq 150$ y péptidos únicos ≥ 1 . Finalmente, se estimó la abundancia relativa de cada familia de proteínas (% del total de proteínas del veneno) mediante la integración del cromatograma RP-HPLC a 215 nm, utilizando el software Chem Station® B.04.01 (Agilent). Para las fracciones que presentaron más de una banda en el SDS-PAGE, la distribución porcentual se asignó por densitometría, utilizando un registrador ChemiDoc® y el software Image Lab® v.2.0 (Bio-Rad). Además, cuando se produjo la detección de varios tipos de proteínas en la misma digestión de banda de SDS-PAGE, su distribución porcentual se estimó sobre la base de los datos de intensidad de los espectros de nLC-MS/MS.

Las fracciones de RP-HPLC de mayor abundancia, una vez secas, también se disolvieron en acetonitrilo al 50 % y ácido fórmico al 0,1 %, y se analizaron mediante infusión directa (velocidad de flujo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$) utilizando un espectrómetro de masas Q-Exactive Plus® (Thermo Fisher Scientific) con una fuente de ionización por electrospray (HESI) para determinar la masa monoisotópica de las proteínas intactas. Los espectros de MS se adquirieron en modo positivo, utilizando un voltaje de ionización de 3,9 kV, un barrido en el rango de 800 a 2500 m/z, una resolución de 140 000 y un objetivo de AGC de 3×10^6 .

El veneno de *B. nubestris* también se analizó mediante un análisis por *shotgun*. Para ello, se sometieron a una reducción 15 μg de veneno con ditioneitol 20 mM durante 30 min a 56 °C, alquilación con yodoacetamida 100 mM durante 20 min en la oscuridad a temperatura ambiente, se incubó con ditioneitol 30 mM durante 30 min a temperatura ambiente y la digestión se realizó con tripsina grado secuenciación a 37 °C durante la noche, en un volumen total de 35 μL . Se añadió ácido fórmico (1 μL), se centrifugaron los péptidos trípticos y se cargaron 12 μL de mezcla peptídica (0,9 μg) en una columna C18 (75 μm x 2 cm, partícula de 3 μm de tamaño; PepMap, Thermo) en un nano- Cromatógrafo Easy 1200 (Thermo). Después de lavar con ácido fórmico al 0,1 % (solución A), los péptidos se separaron a 200 nl/min en una columna C18 Easyspray® (75 μm x 15 cm, partícula de 3 μm

de tamaño; PepMap, Thermo). Se desarrolló un gradiente hacia la solución B (acetonitrilo al 80 %, ácido fórmico al 0,1 %) en un total de 120 min (1–5 % B en 1 min, 5–26 % B en 84 min, 26–80 % B en 30 min, 80–99 % B en 1 min y 99 % B en 4 min). Los espectros de masas se adquirieron usando un espectrómetro de masas Q-Exactive Plus® (Thermo) operado en modo positivo a 2,1 kV, con una temperatura capilar de 200 °C, usando un barrido en el rango de 400–1600 m/z, tiempo máximo de inyección de 100 ms, objetivo AGC de 3×10^6 y resolución de Orbitrap de 70 000. Los 10 iones principales con 2 a 4 cargas positivas se fragmentaron con un objetivo de AGC de 1×10^5 , AGC mínimo de 2×10^3 , tiempo de inyección máximo de 110 ms, tiempo de exclusión dinámica de 5 s y resolución de 17 500. Los espectros de MS/MS se procesaron para la asignación de coincidencias de péptidos a familias de proteínas conocidas por similitud con secuencias contenidas en la base de datos transcriptómica de glándulas de veneno de *B. nubes* y *B. nigroviridis* (Mason et al., 2020) usando Peaks X® (Bioinformatics Solutions). La carbamidometilación de cisteína se estableció como una modificación fija, mientras que la desamidación de la asparagina o la glutamina y la oxidación de la metionina se establecieron como modificaciones variables, permitiendo hasta 3 escisiones perdidas por la tripsina. Los parámetros para la aceptación de coincidencias se establecieron en FDR<0,1 %, detección de al menos un péptido único, con péptidos significativos y puntuación de proteína $-10 \lg P \geq 150$.

Determinación de la actividad PLA₂ del veneno de *B. nubes*

Para evaluar esta actividad, se utilizó el sustrato sintético ácido 4-nitro-3-octanoiloxibenzoico (4-NOBA), disuelto en acetonitrilo a 1 mg/mL. Se realizaron diluciones seriadas de las muestras en una placa de 96 pocillos, para este fin se utilizaron cantidades de veneno entre 2.5 µg y 40 µg. Las cantidades de veneno utilizadas fueron disueltas en 25 µL de agua. El sustrato se mezcló con la muestra de PLA₂ y de buffer (Tris-HCl 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,1 M, pH 8,0). La placa se incubó a 37°C por 60 minutos, luego se midió la absorbancia a 405 nm en un lector multiskan FC (Thermo Scientific). El cambio en la absorbancia en 60 min determinó la actividad PLA₂. Una unidad corresponde a un cambio de 1 en absorbancia después de 60 min. Cada concentración de veneno se analizó por triplicado. Se utiliza el veneno de *B. asper* como control.

Determinación de la actividad Proteolítica del veneno de *B. nubestris*

Diferentes cantidades de veneno de *B. nubestris* y *B. asper* (1.25- 40 µg) se disolvieron en 20 µL de 50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 8. A cada concentración se le agregaron 100 µL de azocaseína (10 mg/mL disuelto en el buffer utilizado anteriormente) y se incubaron a 37°C por 90 minutos. La reacción se detuvo con 200 µL de ácido tricloroacético al 5%. La mezcla se centrifugó y 150 µL del sobrenadante se mezclaron con 150 µL de 0.5 M NaOH; se midió la absorbancia a 450 nm. La actividad proteolítica se expresa como el aumento de la absorbancia a 450 nm en comparación con el sustrato solo. Cada punto representa la media ± SD de triplicados. Se utiliza el veneno de *B.asper* como control

Determinación de la actividad Hemorrágica del veneno de *B. nubestris*

La actividad hemorrágica se determinó en ratones CD-1 con un peso entre 18-20 g. Se inyectó de manera intradérmica en la región abdominal de los ratones cantidades variables del veneno de *B. nubestris* (1,25, 2,5, 5, 10, y 20 µg). Luego de 2 horas, se sacrificaron los animales y se les removió la piel abdominal. En la parte interna de la piel de los ratones se midió el tamaño de la lesión hemorrágica. La actividad hemorrágica se expresó como Dosis Hemorrágica Mínima (DHM), correspondiente a la dosis de veneno que indujo un área hemorrágica de 10 mm de diámetro. Se utilizaron 3 animales por grupo y como control negativo se inyectó un grupo de ratones con PBS. Se utiliza el veneno de *B.asper* como control

Determinación de la actividad coagulante del veneno de *B. nubestris*

Para la determinación de la actividad coagulante se incubó plasma humano citratado (200 µL) a 37°C por 5 min. Posteriormente se agregaron 100 µL de soluciones que contenían 20 µg de veneno de *B. nubestris*, 20 µg de veneno de *B. asper* o solo solución salina tamponada con fosfato (PBS; 0.12 M NaCl, 40 mM fosfato de sodio, pH 7.2). Estas mezclas

fueron incubadas a 37°C. Se anotó el tiempo en el que ocurrió la coagulación del plasma. Si en una hora no había ocurrido la coagulación del plasma, se determinó que el veneno no posee actividad coagulante. Cada concentración de veneno se analizó por triplicado. Se utiliza el veneno de *B. asper* como control.

Miotoxicidad y efecto en hematocrito provocada por el veneno de *B. nubestris*

Para evaluar la miotoxicidad de los venenos, se inyectaron 50 µg de veneno de *B. nubestris* o *B. asper*, en un volumen de 50 µL de PBS, en el gastrocnemio de ratones CD-1 con un peso de 18-20 g. Después de 3 horas se obtuvo una muestra de sangre de la cola en tubos capilares heparinizados que fueron centrifugados para obtener el plasma y medir visualmente el hematocrito. Del plasma se tomaron 4 µL y se midió la actividad de la enzima Creatina Quinasa (CK), que es liberada por las fibras musculares dañadas, mediante un ensayo cinético UV (Wiener Lab, Germany). Se utilizaron 5 animales por grupo y como control negativo se inyectó un grupo de ratones con PBS. Se utiliza el veneno de *B. asper* como control.

Prueba de letalidad

Dosis de 5, 10, 20, 30 y 40 µg del veneno de *B. nubestris* se disolvieron en 200 µL de PBS y se inyectaron intravenosamente (vena caudal) en ratones CD-1 con un peso entre 16-18 g. Los ratones se monitorearon durante 24 horas. Se anotaron las muertes y se calculó la dosis letal media (LD₅₀) utilizando el análisis Probits del software BioStat. Se utilizaron 5 animales por grupo y como control negativo se inyectó un grupo de ratones con PBS.

Inmunoreactividad

Se realizó un ELISA utilizando una placa de 96 pocillos, donde se recubrió cada pocillo con 1 µg de veneno de *B. nubestris* o de *B. asper*, diluido en 100 µL de PBS. La placa se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente. El exceso de veneno fue decantado y el bloqueo se realizó incubando la placa por 30 min con 100 µL de PBS que contenía

albúmina bovina al 1 % en cada pocillo. Posterior a esta incubación la placa fue lavada 5 veces con PBS.

Se agregó 100 μ L de antiveneno polivalente a cada pocillo, utilizando diluciones dobles desde 1:4000 hasta llegar a una dilución de 1:128 000 y se dejó incubar por 90 min a temperatura ambiente, se utilizó como diluyente PBS con 1% de albúmina bovina. En los pocillos control, se le agregó a los venenos un falso antiveneno preparado con plasma de un caballo sin inmunizar, realizando las mismas diluciones descritas anteriormente. Luego de su debida incubación, se realizaron 5 lavados con PBS y se agregó anticuerpos anti-IgG de caballo hecho en conejo conjugado con fosfatasa alcalina. Posteriormente se realizó una incubación durante dos horas a temperatura ambiente. Finalmente, después de los lavados se le agregó a cada pocillo 100 μ L de *p*-nitrofenilfosfato como sustrato y los resultados fueron obtenidos utilizando el lector de placas Multiskan a 405 nm. Se utiliza el veneno de *B. asper* como control.

Neutralización de la letalidad de los venenos por el suero polivalente del ICP

Para evaluar la capacidad neutralizante del antiveneno polivalente se utilizó una dosis reto de veneno que corresponde a 4 veces la LD₅₀ previamente determinada. Se mezcló el veneno con distintas cantidades del antiveneno y se incubó por 30 min a 37°C. Las mezclas se inyectaron mediante vía intravenosa en ratones CD-1 con un peso entre 16-18 g. Los ratones fueron monitoreados por un periodo de 24 horas y se anotaron las muertes, para estimar la dosis de antiveneno que protege al 50% de los ratones (ED₅₀) de la prueba utilizando el análisis Probits del software BioStat.

Análisis estadístico

El análisis de la significancia estadística de las diferencias entre valores promedios se realizó utilizando la prueba t de Student, en los casos en los que se compararon dos grupos. Para la comparación de tres o más grupos se utilizó un análisis ANOVA, seguido por la prueba de Tukey. Se estableció un valor de $p < 0,05$ como valor de corte para significancia estadística.

Resultados

Estudio proteómico

El veneno de *B. nubestris* se separó en 24 fracciones mediante RP-HPLC (Fig. 1B). Posteriormente, las 31 bandas obtenidas mediante electroforesis SDS-PAGE a partir de estas fracciones, en condiciones reductoras (Fig. 1C) se analizaron y asignaron a familias de proteínas usando espectrometría de masas en tándem (Fig. 2). Las proteínas de la familia metaloproteinasas fueron las más abundantes en el veneno, ya que representan el 50% del total de proteínas del mismo. Otras familias de proteínas se encontraron en menor cantidad en el veneno después del análisis MS/MS de las bandas de proteína, entre ellas lectinas tipo C (13,0 %), péptidos/material no proteico (11,6 %), serina proteinasas (7,6 %), L-aminoácido oxidasa (7,0 %), fosfolipasa A₂ (3,9 %), disintegrina (3,8 %), CRISP (3,1 %), factor de crecimiento endotelial vascular de veneno de serpiente (<0,1 %) y factor de crecimiento nervioso (<0,1 %). (Tabla suplementaria S1).

Adicionalmente, mediante el análisis proteómico por *shotgun* se identificaron proteínas de las familias de péptidos potenciadores de bradiquinina, nucleotidasas y fosfodiesterasas que no se lograron identificar mediante el enfoque proteómico tradicional. (Tabla suplementaria S2).

Las proteoformas que se lograron detectar en el veneno de *B. nubestris* utilizando ambos enfoques de espectrometría de masas en tándem (Tablas complementarias S1 y S2) incluyeron las metaloproteinasas SVMPII-1, SVMPII-2, SVMPII-3, SVMPII-4, SVMPII-5, SVMPIII-2, SVMPIII-3, SVMPIII-4, SVMPIII-5, SVMPIII-6. Adicionalmente, las proteoformas pertenecientes a la familia de lectinas tipo C detectadas incluyeron CTL-1, CTL-3, CTL-4, CTL-5, CTL-6 y CTL-7. Además, las proteoformas de serina proteinasas identificadas incluyeron SVSP-1, SVSP-2, SVSP-3, SVSP-4, SVSP-5, SVSP-6, SVSP-7 y SVSP-8. Finalmente, otras proteoformas detectadas fueron CRISP-1, PLA₂-3, LAAO-1, VEGF-1, VEGF-2, NGF-1, NUC-1, PDE-1 y BPP-1. No se encontraron proteínas de la familia de las hialuronidasas utilizando espectrometría de masas.

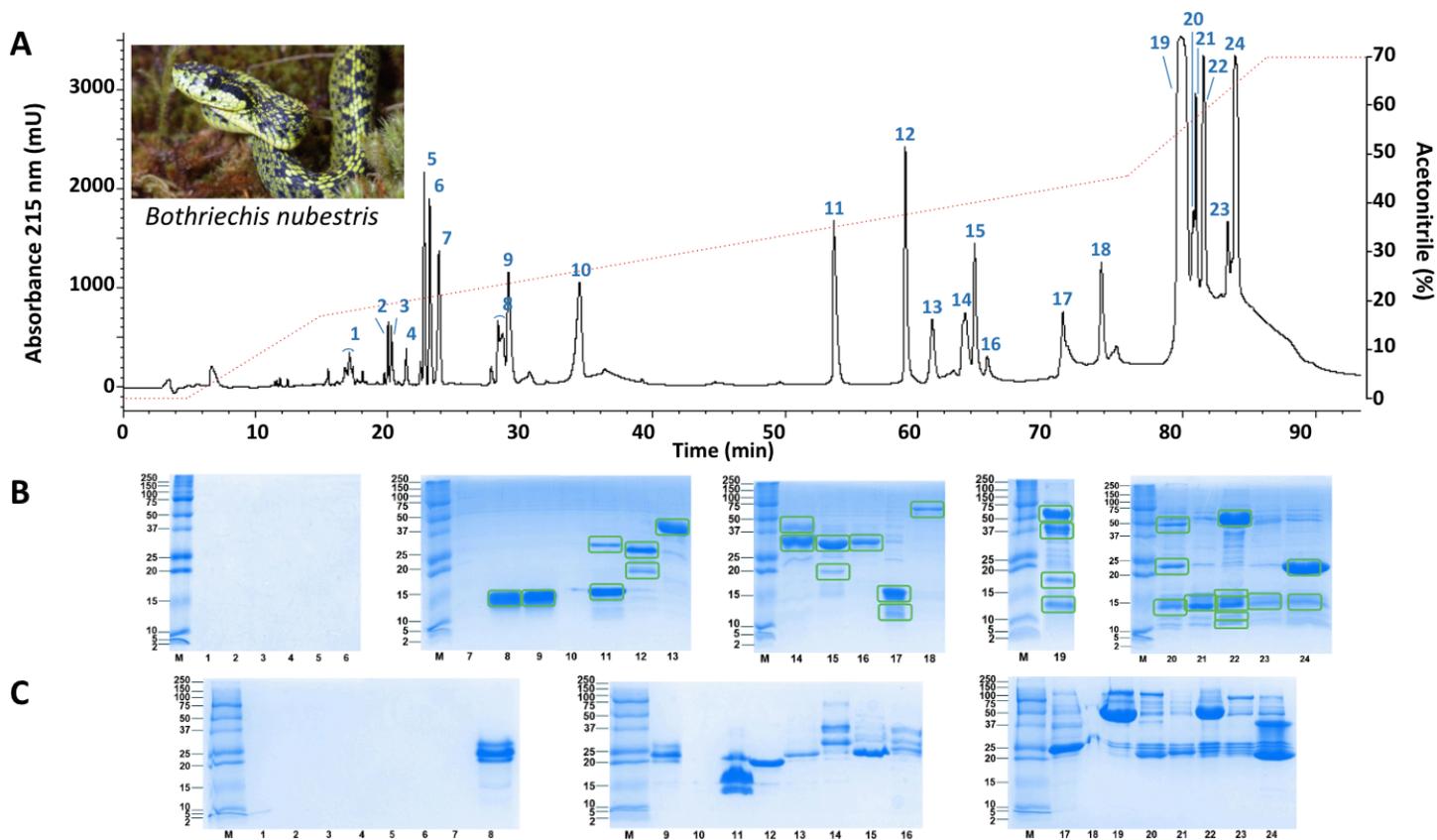


Figura 1. Ejemplar adulto de *Bothriechis nubestris* (fotografía realizada por Mahmood Sasa) y perfil de elución de RP- HPLC de proteínas del veneno de *B. nubestris* (A), seguido de análisis SDS PAGE. Para el fraccionamiento del veneno se utilizó una columna C18 con gradiente de acetonitrilo, como se describe en la metodología. Posteriormente se realizó SDS-PAGE para el fraccionamiento adicional de proteínas en condiciones reductoras (B) y no reductoras (C). Los marcadores de peso molecular (M) están marcados en kDa. Las bandas de SDS-PAGE de geles reducidos se escindieron, se digirieron en gel con tripsina y se analizaron mediante nESI-MS/MS para la asignación a familias de proteínas.

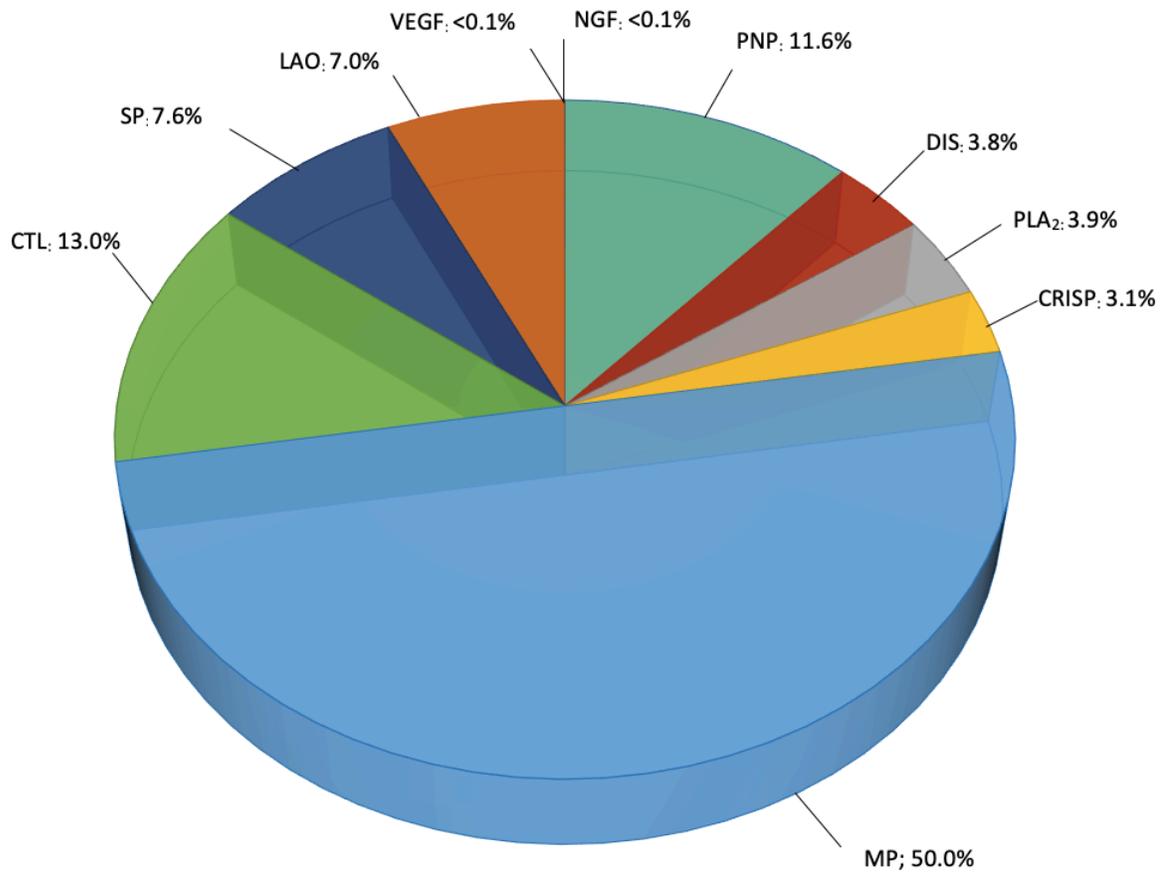


Figura 2. Composición del veneno de *Bothriechis nubestris* según familias de proteínas, expresada como porcentaje del contenido total de proteínas. PLA₂: fosfolipasa A₂; MP: metaloproteinasas; LAO: L-aminoácido oxidasa; PNP: péptidos y/o componentes no proteicos; SP: serina proteinasa; CTL: lectina de tipo C/similar a lectina; DIS: desintegrina; CRISP: proteína secretora rica en cisteína; NGF: factor de crecimiento nervioso; VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular.

Actividades *in vitro* e *in vivo* del veneno de *B. nubestris*

El veneno de *B. nubestris* no mostró actividad PLA2 *in vitro*, utilizando el método con 4-NOBA, a diferencia del control con *B. asper*.(Fig. 3). Por otro lado, este veneno mostró una gran actividad proteolítica *in vitro* sobre la azocaseína, similar a la del veneno de *Bothrops asper*, el cual fue utilizado como control (Fig. 4). El veneno de *B. nubestris* (20 µg) no provocó la coagulación del plasma humano citratado después de 60 minutos, mientras que el tiempo de coagulación provocado por la misma cantidad de veneno de *B. asper* fue de $17,3 \pm 2,1$ segundos. El PBS, que corresponde al control negativo, no provocó la coagulación del plasma humano citratado después de 60 minutos.

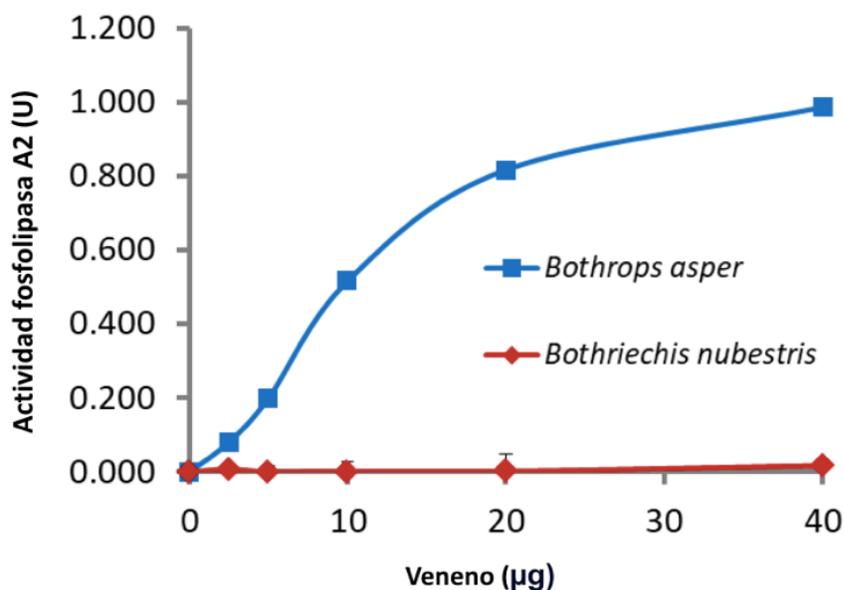


Figura 3. Actividad fosfolipasa A₂ de los venenos de *B. nubestris* y *B. asper* sobre el sustrato sintético monodisperso ácido 4-nitro-3-octanoiloxibenzoico. Se incubaron diferentes cantidades de los venenos con el sustrato sintético (60 min a 37 °C) y una unidad se definió como un cambio de 1 en la absorbancia a 405 nm. Cada punto representa la media \pm DE de triplicados.

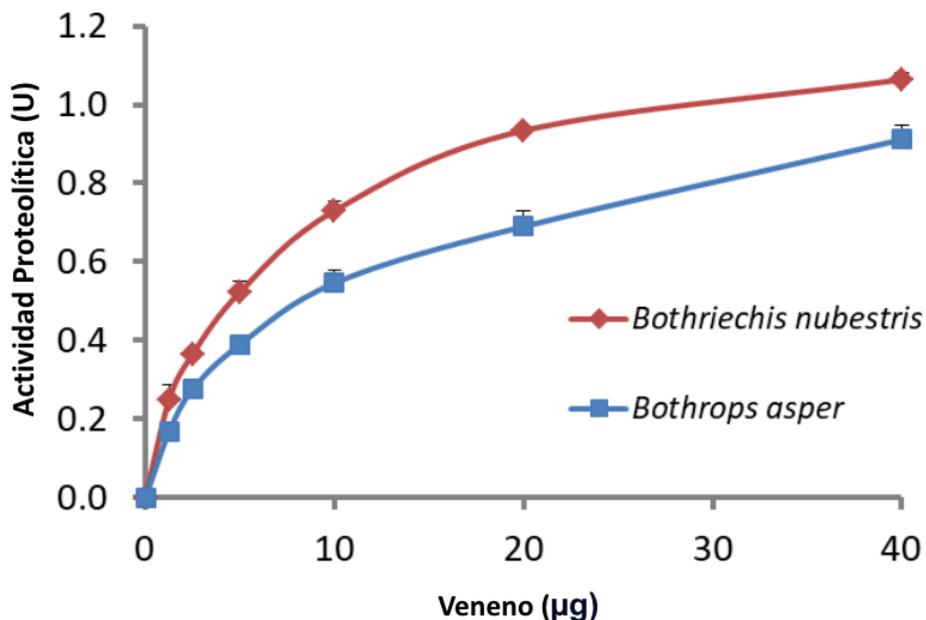


Figura 4. Actividad proteolítica del veneno de *Bothriechis nubestris*. Se incubaron cantidades variables de veneno de *B. nubestris* y de *Bothrops asper* con azocaseína, como se describe en la metodología. La actividad se expresó como el aumento de la absorbancia a 450 nm en comparación con el sustrato solo. Una unidad se definió como un cambio de 1 en la absorbancia. Cada punto representa la media \pm DE de triplicados.

En el análisis *in vivo* de la actividad miotóxica, el veneno de *B. nubestris*, inyectado en ratones, no aumentó significativamente la creatina quinasa (CK) en plasma en comparación con los ratones inyectados con PBS. Por otro lado, *Bothrops asper* provocó un aumento significativo de la actividad de la CK en el plasma en comparación con los ratones inyectados con PBS (Fig. 5). Adicionalmente, se midió el hematocrito y se observó una disminución significativa del mismo en los ratones inyectados con veneno de *B. nubestris* ($31 \pm 3 \%$) en comparación con los ratones inyectados con PBS ($50 \pm 3 \%$). Es importante mencionar que el plasma obtenido se encontraba claro sin signos de hemólisis (Fig. 6).

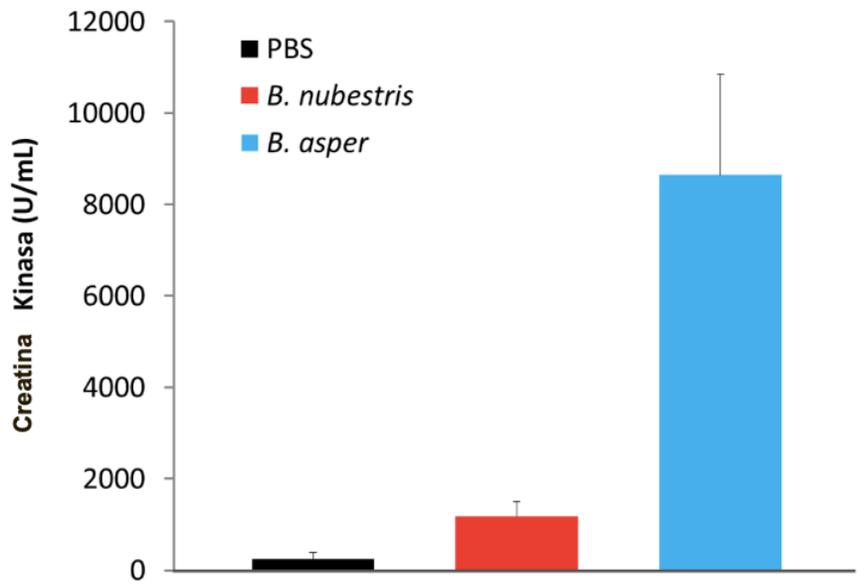


Figura 5. Evaluación de la actividad miotóxica provocada por los venenos de *B. nubestris* y *B. asper*. Las barras representan la media \pm DE de cinco ratones. Las diferencias entre los valores de actividad de CK del veneno de *B. asper* y PBS son significativas ($p < 0,001$). Los valores de actividad CK del veneno de *B. asper* y *B. nubestris* presentan una diferencia significativa entre ellos ($p < 0,001$).

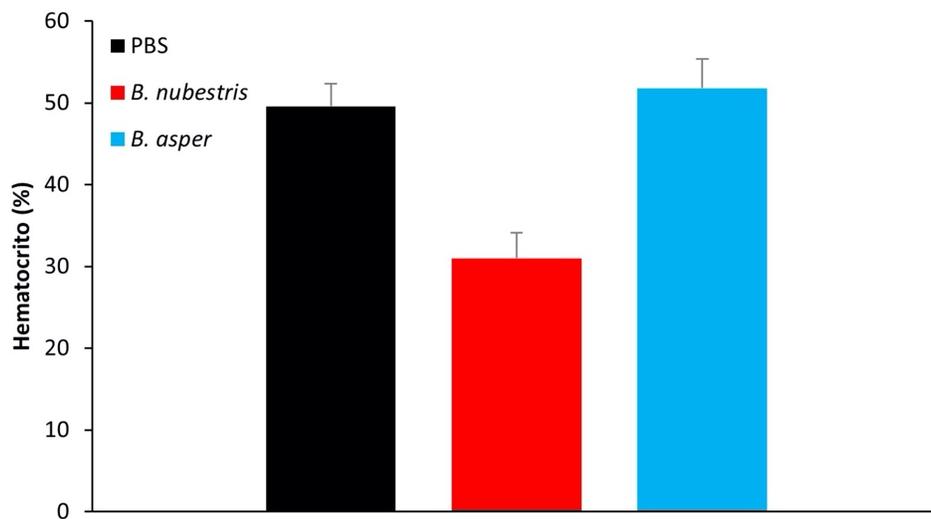


Figura 6. Disminución en el hematocrito provocada por el veneno de *B. nubestris*. Las barras representan la media \pm DE de cinco ratones. Las diferencias entre los valores de hematocrito

del veneno de *B. nubestris* y PBS son significativas ($p < 0,001$). Los valores de hematocrito del veneno de *B. asper* y *B. nubestris* presentan una diferencia significativa entre ellos ($p < 0,001$).

La DL_{50} intravenosa del veneno de *B. nubestris* en ratones fue de 21,5 μg (límites de confianza del 95 %: 15,6–29,5 μg) por ratón de 16–18 g, o 1,26 $\mu\text{g/g}$ (límites de confianza del 95 %: 0,92–1,74 $\mu\text{g/g}$). El veneno de *B. nubestris* presentó una dosis hemorrágica mínima de 1,85 μg de veneno.

Inmunoreconocimiento y neutralización por antiveneno PoliVal-ICP

Se evaluó mediante ELISA la capacidad de inmunorreconocimiento del suero antiofídico polivalente del ICP hacia el veneno completo de *B. nubestris* y sus fracciones más abundantes obtenidas mediante RP-HPLC. Los resultados mostraron que el veneno de *B. nubestris* fue reconocido con una intensidad similar en comparación con el veneno de *B. asper* (Fig. 7). Las fracciones 20 y 22 del veneno de *B. nubestris* presentaron el mayor reconocimiento entre todas las demás fracciones analizadas. Ambas fracciones están conformadas principalmente por proteínas de las familias Metaloproteinasa y Lectina tipo C (Fig. 8).

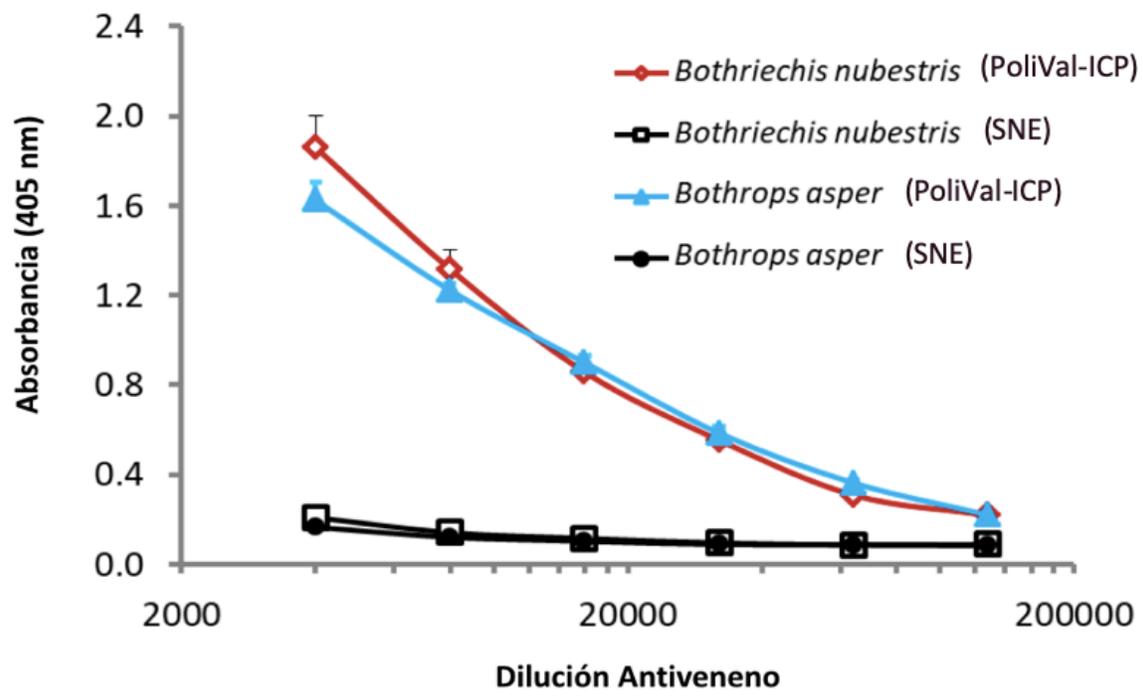


Figura 7. Reconocimiento de veneno de *B. asper* y reconocimiento cruzado de veneno de *B. nubestris* por el antiveneno equino comercial preparado contra venenos de vipéridos (PoliVal-ICP), evaluado por ELISA. Cada punto representa la media \pm DE de triplicados.

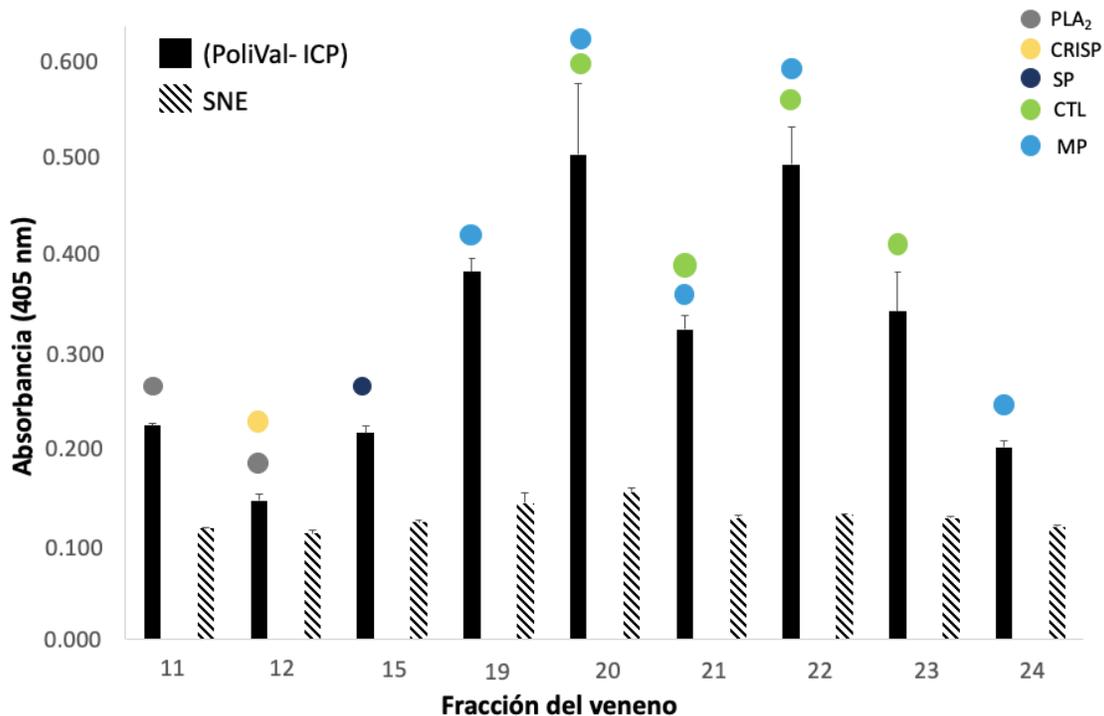


Figura 8. Reconocimiento cruzado de las fracciones más abundantes, obtenidas mediante P-HPLC, del veneno de *B. nubestris* por un antiveneno equino comercial producido contra venenos de vipéridos (PoliVal-ICP). Cada barra representa la media \pm DE de pocillos por triplicado. Los círculos de colores sobre las barras indican la familia de proteínas o las dos familias de proteínas principales identificadas en cada fracción cromatográfica: Fosfolipasa A₂ (PLA₂), proteína secretora rica en cisteína (CRISP), serina proteinasa (SP), metaloproteinasa (MP), lectina de tipo C/similar a lectina (CTL).

La actividad letal de una dosis reto de 4 DL₅₀ del veneno de *B. nubestris* fue completamente neutralizada por el antiveneno PoliVal-ICP en una proporción de 0,5 mg de veneno/mL de antiveneno. Las mezclas de veneno y antiveneno fueron inyectadas en los ratones por la vía intravenosa. La ED₅₀ del antiveneno PoliVal-ICP fue de 0,61 mg de veneno/mL de antiveneno con un error estándar de 0,99.

En la neutralización de la actividad hemorrágica, el grupo control presentó una hemorragia de $397 \pm 60 \text{ mm}^2$, cuando se utilizó 500 μL de antiveneno/1 mg de veneno el área de hemorragia disminuyó significativamente ($p < 0,01$) a $216 \pm 64 \text{ mm}^2$. El área hemorrágica usando 2000 μL de antiveneno/1 mg de veneno disminuyó casi completamente a $30 \pm 17 \text{ mm}^2$. Lo anterior indica que el PoliVal-ICP logra la neutralización de la actividad hemorrágica del veneno de *B. nubes*.

Discusión

La composición proteica de la gran mayoría de venenos de vipéridos incluye aproximadamente 30% de metaloproteinasas. Estas proteínas actúan degradando los componentes de las membranas basales que subyacen a las células endoteliales de los vasos capilares, provocando la ruptura de las paredes de los mismos y permitiendo el escape del contenido sanguíneo hacia el espacio extravascular (Takeda et al., 2012). El veneno de *B. nubes* posee un alto porcentaje de metaloproteinasas, que concuerda con el gran efecto hemorrágico y la disminución del hematocrito observado en ratones que fueron inyectados con distintas dosis de veneno. La alta cantidad de metaloproteinasas observadas en el veneno también concuerda con los resultados reportados en el análisis transcriptómico de glándulas de veneno de esta especie (Mason et al., 2020).

En venenos de serpientes con bajas o nulas cantidades de metaloproteinasas, se reporta ausencia de actividad hemorrágica. Lo anterior ocurre en casos como en el veneno de *B. nigroviridis* del Valle Central de Costa Rica, en el no fue posible detectar metaloproteinasas mediante un análisis proteómico y se reporta ausencia de actividad hemorrágica en dosis de 100 μg de veneno (Fernández et al., 2010). Esto respalda la separación de *B. nigroviridis* y *B. nubes* se separaron en dos especies diferentes (cita)

El veneno de *B. nubes* presenta en su composición proteica una cantidad considerable de proteínas de la familia lectina de tipo C. Esto concuerda con los resultados obtenidos en el análisis transcriptómico de las glándulas de veneno de esta especie (Mason et al., 2020). En las demás especies del género *Bothriechis* la cantidad de lectinas de tipo C presente en los venenos es muy baja o no detectable (Lomonte et al., 2014). Lo anterior hace

que la presencia de cantidades considerables de proteínas de esta familia en el veneno de *B. nuberstris*, se convierta en un rasgo característico de esta especie. Las lectinas de tipo C se caracterizan por no tener un efecto fisiopatológico marcado, a pesar de esto algunas favorecen la coagulación sin necesidad de cofactores proteicos, lo cual lleva al consumo de factores de coagulación, contribuyendo en la hemorragia. Otras lectinas tipo C inhiben algunos factores de coagulación al unirse a ellos, como es el caso de los factores IX y X. Ambos escenarios conllevan a una pérdida de la hemostasia y a que se favorezca la hemorragia (Arlinghaus & Eble, 2012). Con base en lo anterior, se puede decir que la cantidad considerable de Lectinas tipo C presentes en el veneno de *B. nuberstris* respaldan el importante efecto hemorrágico provocado por el mismo.

Dentro del análisis proteómico del veneno de *B. nuberstris* se encontró una cantidad significativa de péptidos o componentes no proteicos, en este caso ese porcentaje es probablemente constituido en su mayoría por péptidos potenciadores de bradiquinina. Estos péptidos también se encontraron durante el análisis del transcriptoma de este veneno (Mason et al., 2020). Adicionalmente, en el análisis del transcriptoma del veneno de *B. nuberstris* se encontró un transcripto de hialuronidasa, sin embargo durante el análisis proteómico no se encontraron proteínas pertenecientes a esta familia. Es importante mencionar que la presencia de estos transcriptos hallados en las glándulas de veneno no garantiza que las proteínas estén presentes en el veneno. La aparición de transcriptos de toxinas que no secretadas en el veneno podría indicar que estos genes exhiben un patrón de expresión individual o temporal a lo largo de la vida de la serpiente, o que codifican por proteínas de veneno de muy baja abundancia (Durban et al., 2011).

El análisis proteómico demostró la presencia de una fosfolipasa K49 u homólogo de fosfolipasa A₂. La fosfolipasa K49 es una proteína que conserva la estructura de esta familia de proteínas, pero carece de actividad catalítica. La sustitución de un aspartato en la posición 49 por una lisina, hace que la proteína pierda un componente esencial de su maquinaria catalítica. Las fosfolipasas K49 no hidrolizan los fosfolípidos de membrana de células miogénicas en cultivo o de músculo maduro, a diferencia de las PLA₂ catalíticas. Es por esta

razón que, aunque se haya demostrado la presencia de proteínas de la familia PLA₂ en el veneno de *B. nubestris*, éste no presenta actividad fosfolipasa *in vitro*. (Fernandes et al., 2014)

Las fosfolipasas K49, a pesar de carecer de actividad catalítica, pueden generar mionecrosis por mecanismos no enzimáticos basados principalmente en mecanismos de permeabilización de membrana, aunque no en la misma magnitud que su homólogo catalítico. La baja miotoxicidad provocada por el veneno de *B. nubestris* se explica por la poca cantidad de proteínas de la familia PLA₂ presentes en el veneno y a que las PLA₂ presentes en veneno son no catalíticas (Lomonte & Rangel, 2012).

Las metaloproteinasas y las serina proteinasas son de las proteínas más abundantes en los venenos de serpientes, especialmente en los venenos de vipéridos. El veneno de *B. nubestris* no es la excepción en este caso, ya que presenta una elevada cantidad de ambas familias de proteínas en su composición. Estas proteinasas tienen la capacidad de causar la ruptura de otras proteínas mediante la hidrólisis de los enlaces peptídicos, por lo tanto son sumamente útiles en el proceso de digestión e inmovilización de las presas. Tanto las metaloproteinasas como las serina proteinasas son capaces de hidrolizar la azocaseína, que es el sustrato utilizado para evaluar la actividad proteolítica en este trabajo. Por lo tanto, es congruente hallar niveles altos de actividad proteolítica en el veneno de *B. nubestris* (Kalogeropoulos et al., 2019).

El antiveneno polivalente producido por el Instituto Clodomiro Picado fue capaz de reconocer el veneno completo de *B. nubestris*. Dicho reconocimiento fue comparable al que este antiveneno realiza frente al veneno de *B. asper*. El veneno de *Crotalus simus*, *Bothrops asper* y *Lachesis stenophrys*, al igual que el veneno de *B. nubestris*, están compuestos en su mayoría por metaloproteinasas (Lomonte et al., 2014). Estos tres venenos junto con el veneno de *Crotalus durissus pifanorum* son los que se utilizan en la formulación del PoliVal-ICP. Lo anterior puede ser una explicación al alto reconocimiento por reacción cruzada que presenta el antiveneno al enfrentarse al veneno de *B. nubestris* PoliVal-ICP. Además de reconocer el veneno completo de *B. nubestris*, el PoliVal-ICP reconoce varias de las

principales fracciones del veneno con una alta señal. Dichas fracciones están compuestas por Metaloproteinasas y Lectinas de tipo C.

Los ensayos pre-clínicos indicaron que el PoliVal-ICP es capaz de neutralizar *in vivo* la letalidad y la hemorragia provocada por el veneno de *B. nubestris* en ratones. Lo anterior se debe a que los anticuerpos presentes en el suero antiofídico reaccionan de manera cruzada con componentes del veneno de *B. nubestris*. Dichos componentes pertenecen a las mismas familias de proteínas que se encuentran presentes en los venenos utilizados en la formulación del antiveneno, como lo son las metaloproteinasas. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el suero antiofídico polivalente debería ser una herramienta eficaz en el tratamiento de accidentes ofídicos que involucren a esta especie.

El descubrimiento y la exposición de la composición proteómica del veneno de esta nueva especie, facilita la comprensión de su biología, el seguimiento de sus aspectos evolutivos y la diferenciación con especies cercanas. (Durban et al., 2011).

Conclusiones

El análisis proteómico del veneno de *B. nubestris* determinó que la principal fracción de proteínas presentes en el mismo son las metaloproteinasas, las cuales abarcan el 50% del proteoma del veneno. Al presentar una gran cantidad de proteínas de esta familia el veneno genera un gran efecto hemorrágico, importante en caso de un envenenamiento ofídico.

El análisis proteómico por la metodología *shotgun* brinda información relevante sobre proteínas poco abundantes en el veneno, las cuales se pueden perder durante el paso de separación realizado en la estrategia venómica tradicional. Sin embargo, esta metodología no se puede utilizar para el análisis cuantitativo de las proteínas presentes en dicho veneno.

Anteriormente se consideraba a *B. nubestris* dentro de la especie *B. nigroviridis*, el análisis proteómico realizado y los análisis de actividades *in vitro* e *in vivo* del veneno de *B. nubestris* respaldan la clasificación de estas serpientes en dos especies diferentes.

Se ha demostrado que las fosfolipasas presentes en el veneno carecen de actividad catalítica y son muy escasas, por lo tanto, no se esperaría encontrar una miotoxicidad de importancia en las víctimas de accidente ofídico provocado por esta especie.

Tres de los cuatro venenos incluidos en la formulación del suero antiofídico polivalente producido por el ICP, y utilizado en el tratamiento de accidentes ofídicos provocado por vipéridos en Centroamérica, presentan a las metaloproteinasas como su principal componente. Una reactividad cruzada entre estas metaloproteinasas y las presentes en el veneno de *B. nubestris* explica que este veneno sea inmunoreconocido y neutralizado adecuadamente por parte del antiveneno polivalente producido por el ICP.

Todos los ensayos realizados indican un buen pronóstico en caso del tratamiento de un envenenamiento ofídico provocado por *B. nubestris* con el antiveneno polivalente producido en el ICP. Lo anterior debido a que los resultados obtenidos en este trabajo indican que existe un buen reconocimiento y neutralización de dicho veneno por parte de este antiveneno. .

Referencias bibliográficas

- Alfaro-Chinchilla, A., Segura, Á., Gómez, A., Díaz, C., Corrales, G., Chacón, D., Arguedas, M., Estrada, R., Gutiérrez, J. M., & León, G. (2021). Expanding the neutralization scope of the Central American antivenom (PoliVal-ICP) to include the venom of *Crotalus durissus pifanorum*. *Journal of Proteomics*, *246*, 104315. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104315>
- Arlinghaus, F. T., & Eble, J. A. (2012). C-type lectin-like proteins from snake venoms. *Toxicon*, *60*(4), 512–519. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.001>
- Brenes, M. G. (2014). Accidente Ofídico. *Revista Medica De Costa Rica Y Centroamerica*, (611), 539- 550.
- Calvete, J. J., Juárez, P., & Sanz, L. (2007). Snake venomics. Strategy and applications. *Journal of Mass Spectrometry*, *42*(11), 1405–1414. <https://doi.org/10.1002/jms.1242>
- Doan, T. M., Mason, A. J., Castoe, T. A., Sasa, M., & Parkinson, C. L. (2016). A cryptic palm-pitviper species (Squamata: Viperidae: Bothriechis) from the Costa Rican highlands, with notes on the variation within *B. nigroviridis*. *Zootaxa*, *4138*(2), 271. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4138.2.3>
- Durban, J., Juárez, P., Angulo, Y., Lomonte, B., Flores-Díaz, M., Alape-Girón, A., Sasa, M., Sanz, L., Gutiérrez, J. M., Dopazo, J., Conesa, A., & Calvete, J. J. (2011). Profiling

the venom gland transcriptomes of Costa Rican snakes by 454 pyrosequencing. *BMC Genomics*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-259>

Fernandes, C. A. H., Borges, R. J., Lomonte, B., & Fontes, M. R. M. (2014). A structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A2-like proteins from viperid snake venoms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1844(12), 2265–2276. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.09.015>

Fernández, J., Lomonte, B., Sanz, L., Angulo, Y., Gutiérrez, J. M., & Calvete, J. J. (2010). Snake Venomics of *Bothriechis nigroviridis* Reveals Extreme Variability among Palm Pitviper Venoms: Different Evolutionary Solutions for the Same Trophic Purpose. *Journal of Proteome Research*, 9(8), 4234–4241. <https://doi.org/10.1021/pr100545d>

Fernández, P., & Gutiérrez, J. M. (2008). Mortality due to snakebite envenomation in Costa Rica (1993–2006). *Toxicon*, 52(3), 530–533. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.06.018>

Freund, F. C., Barquero, F. M., & Monge, S. M. R. (2022). Accidente ofídico: un enfoque al manejo en primer nivel de atención. *Revista Medica Sinergia*, 7(2), e756–e756. <https://doi.org/10.31434/rms.v7i2.756>

Gutiérrez, J. M. (1980). Venenos de Serpientes de América: Sus efectos en el Organismo. *Ciencias Veterinarias*, 2(3), 277-289.

Gutiérrez, J. M., Arias Rodríguez, J., & Alape Girón, A. (2020). Envenenamiento ofídico en Costa Rica: logros y tareas pendientes. *Acta Médica Costarricense*, 62(3).
<https://doi.org/10.51481/amc.v62i3.1072>

Gutiérrez, J. M., Calvete, J. J., Habib, A., Harrison, R., Williams, D., & Warrell, D. (2017). Snakebite envenoming. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1).
<https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.64>

Gutiérrez, J.M ., Lomonte, B., Rojas, G., Gené, J.A ., Chaves, F., Estrada, R., Alvarado, J., Rojas, E & Robles, A. (1988) El suero antiofídico polivalente producido en Costa Rica: Estabilidad y capacidad neutralizante. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 9 (2), 155-169. <https://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v9n2/art7.pdf>

Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., Rucavado, A., Chaves, F. (2011). Venenos de serpientes de la familia Viperidae en América: bioquímica y fisiopatología. D'Suze, G., Corzo, G., Paniagua, J.F (Eds), Emergencias médicas por animales ponzoñosos en las Américas (pp. 461-487).

Instituto Clodomiro Picado. (2016). El envenenamiento por mordedura de serpiente en Centroamérica. https://icp.ucr.ac.cr/sites/default/files/paragraphs-img/El_envenenamiento_por_mordedura_en_Centroamerica_2016_0.pdf

- Kalogeropoulos, K., Treschow, A., auf dem Keller, U., Escalante, T., Rucavado, A., Gutiérrez, J., Laustsen, A., & Workman, C. (2019). Protease Activity Profiling of Snake Venoms Using High-Throughput Peptide Screening. *Toxins*, *11*(3), 170. <https://doi.org/10.3390/toxins11030170>
- Lomonte, B. (2012). Venenos de serpiente: de la investigación al tratamiento. *Acta Médica Costarricense*, *54*(2), 86-96.
- Lomonte, B., Fernández, J., Sanz, L., Angulo, Y., Sasa, M., Gutiérrez, J. M., & Calvete, J. J. (2014). Venomous snakes of Costa Rica: Biological and medical implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of snake venomics. *Journal of Proteomics*, *105*, 323–339. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.020>
- Lomonte, B., & Rangel, J. (2012). Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A2 to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicon*, *60*(4), 520–530. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.02.007>
- Mason, A. J., Margres, M. J., Strickland, J. L., Rokyta, D. R., Sasa, M., & Parkinson, C. L. (2020). Trait differentiation and modular toxin expression in palm-pitvipers. *BMC Genomics*, *21*(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6545-9>
- Organización Mundial de la Salud. (2021). *Mordeduras de serpientes venenosas*. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>

- Organización Panamericana de la Salud. (2009). Manual para la identificación, prevención y tratamiento de mordeduras de serpientes venenosas en Centro América. (vol. 1). https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50423/manualidentificacion_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Sahyoun, C., Rima, M., Mattei, C., Sabatier, J.-M., Fajloun, Z., & Legros, C. (2022). Separation and Analytical Techniques Used in Snake Venomics: A Review Article. *Processes*, 10(7), 1380. <https://doi.org/10.3390/pr10071380>
- Sasa, M., Bonilla, F., & Chaves, F. (2019). *Serpientes venenosas de Costa Rica: biología básica* .(1era ed.). Instituto Clodomiro Picado.
- Solórzano, A. (2022). *Serpientes de Costa Rica*. (2da ed.) San José, Costa Rica: INBio.
- Takeda, S., Takeya, H., & Iwanaga, S. (2012). Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1824(1), 164–176. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.04.009>
- Yonamine, C. M., da Silva, Á. R. de B. P., & Magalhães, G. S. (2013). Serine proteases — Cloning, Expression and Potential Applications. *An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology - from Analytical Procedures to Biomedical Applications*. <https://doi.org/10.5772/53063>