



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FOSFOLIPASAS A₂

DEL VENENO DE SERPIENTE *Lachesis acrochorda*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
ADRIÁN MARCELO FRANCO VÁSQUEZ

TUTOR PRINCIPAL:
Dr. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
Instituto de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
Dr. MAURICIO ALBERTO TRUJILLO ROLDÁN
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. JOSÉ FERNANDO LAZCANO PÉREZ
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología

Ciudad de México. Junio, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia. A mi mamá Adielá y mi papá Diego, por su inmenso amor, consejos, motivación y fortaleza que a diario se encargaban de transmitirme. Por su ejemplo y sus palabras “fuerza, constancia y perseverancia”. Gracias por siempre confiar en mí.

A mi hermana Carolina y mi hermano Juan Diego, su paciencia, acompañamiento, tranquilidad, cariño y consejos fueron de gran importancia en este proceso.

A Dios, la vida y el universo por permitirme estar vivo y cumpliendo mis metas.

A todas las personas que siempre desde sus mentes y sus corazones me enviaron las mejores energías y han estado al pendiente de mí y mi proceso.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar mis estudios de maestría en esa gran institución.

Al Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros por abrirme las puertas de su laboratorio, su paciencia, confianza y total apoyo en todas mis decisiones.

Al Dr. Mauricio Trujillo y al Dr. Fernando Lazcano quienes se desempeñaron como mis tutores en mi proceso de maestría. Sus consejos, correcciones y recomendaciones fueron fundamentales para realizar este trabajo.

A los miembros del comité sinodal Dr. Enrique Rudiño Piñera, Dra. Alejandra Hernández Santoyo, Dr. Alejandro Carbajal Saucedo, Dr. Gerardo Corzo Burguete y el Dr. Horacio Reyes Vivas.

Al Maestro Giovanni Blandón Marín por proporcionar amablemente el material biológico para la realización del estudio.

Al Dr. Sergio Román y la Dra. Diana Aparicio de la Unidad de Proteómica del INMEGEN por el apoyo en los estudios de espectrometría de masas y electroforesis bidimensional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca 750525 de la convocatoria de becas nacionales del segundo periodo de 2019.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado PAEP.

El programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. En particular a la maestra Norma, Julio, Adelina, la Dra. Ana Clorinda y la Dra. Claudia Treviño siempre prestos a apoyar y atender de la manera más amable y humana posible.

A los miembros de los laboratorio de cromatografía y pruebas biológicas del Instituto de Química. Maestras Carmen, Lucero, Eréndida, Teresa y al maestro Antonio por su gran apoyo y disponibilidad siempre.

A Yohaina por todo su apoyo incondicional y constante motivación antes y durante todo el proceso.

A mis compañeros de laboratorio: Alan, Daniel, Esteban, Jorge, María, Martha, Miguel, Noé y Noel. De ustedes aprendí muchas cosas y compartí ratos muy agradables, hicieron del laboratorio un espacio muy agradable.

Una dedicatoria muy especial para alguien a quien admiré mucho en el corto tiempo que lo conocí. Sin embargo, sus historias y trayectoria siempre estarán presentes en mí. Es un orgullo enorme para mi haber desarrollado mi trabajo de investigación en el laboratorio con el Dr. Barbarin Arreguín Lozano, que en paz descanse.

Para recordarlo, un párrafo que escribió al final de su libro “Mis memorias”, que refleja el amor que tuvo el Dr. Barbarin por su trabajo, su institución, la ciencia y la innovación:

“He completado los pendientes y faltantes ... No lo considero el fin de mi vida, sigo trabajando en la UNAM, mi alma mater; me intereso en el futuro de la bioquímica dentro del instituto, área que inicié en el año 1954; ahora como un colaborador de mi hijo Roberto en algunos proyectos. Observo nuevas tecnologías y el trabajo de sus jóvenes alumnos, y el avance de sus investigaciones.”



Índice de contenido

Índice de Figuras	1
Índice de Tablas	2
Índice de abreviaturas	3
1. Resumen	4
2. Abstract.....	5
3. Introducción.....	6
4. Marco teórico	7
4.1. Suborden Serpentes.....	7
4.1.1. Familia Viperidae.....	7
4.1.2. Género <i>Lachesis</i>	8
4.1.3. <i>Lachesis acrochorda</i> (<i>Bothrops acrochordus</i> García, 1896)	10
4.2 Componentes del veneno de serpiente y su modo de acción	11
4.3 Toxinas aisladas de <i>Lachesis acrochorda</i>	20
4.4 Enzimas	21
4.4.1 Fosfolipasas A ₂ (PLA ₂).....	22
4.4.1.1 Fosfolipasas A ₂ del género <i>Lachesis</i>	27
4.5 Citotoxicidad	30
5 Justificación.....	31
6 Objetivos	32
6.1 Objetivo General	32
6.2 Objetivos Específicos.....	32
7 Hipótesis	32
8 Materiales y Métodos	32
8.1 Extracción del material biológico	33
8.2 Cuantificación de proteínas	33
8.3 Electroforesis SDS PAGE.....	34
8.4 Purificación del veneno	34
8.4.1 Ultrafiltración	35
8.4.2 Cromatografía de Fase Reversa	35
8.4.3 Pruebas de actividad.....	35
8.4.3.1 Pruebas de actividad de Fosfolipasa A ₂	35

8.4.3.2	Pruebas inhibición de actividad de Fosfolipasa A ₂	36
8.5	ESI - QQQ:	36
8.6	Identificación por espectrometría de masas (MS/MS).....	37
8.7	Actividad inhibitoria del crecimiento de líneas celulares de cáncer de humano.....	37
9	Resultados y discusión	39
9.1	Cuantificación de proteínas extracto total	39
9.2	Ultrafiltración	40
9.3	Prueba de actividad de PLA ₂ para extracto crudo y fracción 10-30 kDa	40
9.4	RP-HPLC, SDS-PAGE y prueba de actividad en la fracción 10-30 kDa.....	41
9.5	Recirculación de fracción P12	42
9.6	Identificación de proteínas.....	47
9.7	Ensayos de citotoxicidad sobre líneas cancerosas e inhibición de actividad	52
10.	Conclusiones	54
11.	Perspectivas	55
12.	Referencias	56

Índice de Figuras

Figura 1. Características morfológicas de los vipéridos.....	8
Figura 2. Distribución geográfica del género Lachesis..	9
Figura 3. Lachesis acrochorda.....	10
Figura 4. Distribución geográfica de Lachesis acrochorda.....	11
Figura 5. Proporciones relativas de las familias proteicas.....	13
Figura 6. Representación del mecanismo de acción por ataque hidrolítico de varios tipos de fosfolipasas A ₁ , A ₂ , B, C y D.....	23
Figura 7. Alineamiento múltiple de secuencias de PLA ₂	26
Figura 8. Estructura tridimensional de las PLA ₂ del grupo I/II.....	27
Figura 9. Área de estudio.....	33
Figura 10. Gel de poliacrilamida SDS PAGE 10%.....	39
Figura 11. Prueba de actividad PLA ₂	40
Figura 12. Caracterización cromatográfica y electroforética de la fracción con masas entre 10-30 kDa.....	41
Figura 13. Prueba de actividad PLA ₂ P11, P12 y P13..	42
Figura 14. Gel de electroforesis SDS PAGE al 12.5% fracción P12.....	43
Figura 15. Cromatografía líquida de fase reversa de la fracción P12.....	43
Figura 16. Espectro de masas ESI-MS/MS de la fracción P12.1.	45
Figura 17. Gel 2D, gradiente 4-16% de acrilamida, 7 cm, pH 3-10.....	46
Figura 18. Alineamiento múltiple de las secuencias parciales de L. acro PLA ₂ -01, 02 y 03 con P2A2_LACST y D3IVZ4_LACMT.....	51
Figura 19. Porcentaje de inhibición de distintas líneas cancerosas.....	52

Índice de Tablas

Tabla 1. Composición del veneno de los Elápidos.	14
Tabla 2. Composición del veneno de los Crotalinos.....	16
Tabla 3. Composición del veneno de los Víperinos.....	19
Tabla 4. Composición del veneno del género Lachesis	21
Tabla 5. PLA ₂ citosólicas.....	23
Tabla 6. PLA ₂ secretorias.....	24
Tabla 7. PLA ₂ calcio-independientes.....	24
Tabla 8. PLA ₂ enzimas degradantes de factores activadores plaquetarios o acetil hidrolasas. ...	25
Tabla 9. PLA ₂ lisosomal calcio-independiente	25
Tabla 10. Fosfolipasas A ₂ aisladas de los venenos de las serpientes del género Lachesis	29
Tabla 11. Efectos toxicológicos y farmacológicos de las toxinas aisladas de venenos de serpientes y sus aplicaciones actuales.....	30
Tabla 12. Actividad de fluorescencia y actividad específica de PLA ₂ del control positivo y las fracciones.....	44
Tabla 13. Resumen de purificación de la PLA ₂	47
Tabla 14. Alineamiento de la proteína PA2A_LACST con los péptidos trípticos identificados en L.acro PLA ₂ -01	48
Tabla 15. Alineamiento de la proteína D3IVZ4_L4CMT con los péptidos trípticos identificados en L.acro PLA ₂ -02..	49
Tabla 16. Alineamiento de la proteína D3IVZ4_L4CMT con los péptidos trípticos identificados en L.acro PLA ₂ -03.	50
Tabla 17. Efecto de agentes quelantes sobre la actividad de PLA ₂ de la fracción P12.1.	53

Índice de abreviaturas

3FTx	Toxinas de tres dedos
BCA	Ácido Bicinconínico
CRiSP	Proteínas ricas en cisteína
CTL	Lectinas tipo-C
CYS	Cistatina
DIS	Desintegrinas
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbante Ligado a Enzimas
ESI	Ionización por Electrospray
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
KUN	Péptidos Kunitz
LAAO	L-amino oxidasas acidas
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz – tiempo de vuelo
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
MVC	Componente menor del veneno
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NP	Péptidos natriurético
pH	Potencial de hidrógeno
PLA ₂	Fosfolipasas A ₂
QQQ	Triple Cuadrupolo
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución fase reversa
SDS PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SRB	Sulforodamina B
SVMP	Metaloproteasas de veneno de serpiente
SVSP	Proteasa serínica de veneno de serpiente
TCA	Ácido tricloroacético
UIBMB	Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

1. Resumen

El veneno de las serpientes es una mezcla compleja de moléculas biológicas que lesionan y dañan los diferentes sistemas vitales, específicamente los que se relacionan con la circulación, respiración y el movimiento. Independiente del género de serpientes, la composición del veneno muestra una clara relación con los lugares que frecuentan y las interacciones de depredación a las que se enfrentan. En la actualidad, la ciencia ha generado avances importantes relacionados a la investigación de venenos de serpientes, desde conocer su composición, su mecanismo de acción fisiológico al ingresar a otros organismos, hasta el uso de estos con fines médicos. Para llegar a este propósito, se requirió el uso de técnicas que están ligadas a la proteómica, transcriptómica y toxicovenómica. Estas técnicas se utilizaron para caracterizar bioquímica y fisicoquímicamente los componentes del veneno y determinar su variación en las diferentes especies.

Lachesis acrochorda es un vipérido poco frecuente y poco estudiado que habita bosques primarios. Su veneno es una mezcla compleja de compuestos con actividad biológica que utiliza para defenderse y capturar a sus presas. Este trabajo se enfocó en el aislamiento, purificación parcial, identificación y caracterización de varias isoformas de PLA₂ del veneno de dicho organismo. El análisis bioquímico del veneno mostró un extracto rico en componentes de bajo y mediano peso molecular de entre 10-30 kDa con actividad de PLA₂. Esta fracción inhibió el crecimiento de líneas canceras de glía de sistema nervioso central (U251) en un 19.98%. Además, a partir de la fracción 10-30 kDa se obtuvo el pico P12.1, el cual presentó el valor más alto de actividad específica que fue de 583 UA/μg y del que se identificaron tres isoformas de PLA₂. La masa molecular aproximada de las PLA₂s fue de 14 kDa que corresponden a fosfolipasas A₂ ácidas. Se demostró la dependencia a calcio de las isoformas y se corroboró su similitud con otras proteínas a través un alineamiento múltiple, exponiendo el alto grado de conservación de algunos aminoácidos de estas biomoléculas con las reportadas anteriormente para la especie y el género.

2. Abstract

Snake venom is a complex mixture of biological molecules that injure and damage different vital systems. Specifically, those related to circulation, respiration, and movement. Regardless of the genus of snakes, the composition of the venom shows a clear relationship with the places they frequent and the predatory interactions it faces. Nowadays, science has generated important advances related to the investigation of snake venoms. From knowing their composition, their physiological mechanism of action when entering other organisms, to the use of venoms for medical purposes. To achieve this purpose, the use of techniques linked to proteomics, transcriptomics and toxicovenomics were required to characterize biochemically and physicochemically the components of the venom and its variability in different species.

Lachesis acrochorda is a rare and poor studied viperid that inhabits primary forests. Its venom is a complex mixture of compounds with biological activity that it uses to defend itself and capture its prey. This work focused on the isolation, partial purification, identification and characterization of various PLA₂ isoforms from the venom of the organism. The biochemical analysis of the venom showed an extract rich in low and medium molecular weight components between 10-30 kDa with PLA₂ activity. This fraction inhibited the growth of central nervous system glyca cancer (U251) by 19.98%. In addition, from the 10-30 kDa fraction, the P12.1 peak was obtained, which presented the highest value of specific activity that was 583 AU/μg and then three isoforms of PLA₂ were identified from this peak. The approximate molecular mass of the PLA₂s were 14 kDa corresponding to acidic phospholipases A₂. The calcium dependence of the isoforms were demonstrated and their similarity with other proteins was corroborated through a multiple alignment, showing high degree of conservation of some amino acids of these biomolecules with those previously reported for the species and genus.

3. Introducción

Las toxinas de los venenos probablemente evolucionaron a partir de un número pequeño de proteínas con funciones fisiológicas normales y se transformaron en un potente mecanismo de ataque y defensa. En el veneno de las serpientes, se observa un rasgo adaptativo trófico proveniente de cientos de años de evolución (Madrigal *et al.*, 2012). Esto, a su vez genera la existencia de una gran variabilidad en la composición de los venenos a nivel de población, algo fácilmente explicable debido a la enorme especiación en sus linajes, un aproximado de 3100 especies (Shibata, *et al.*, 2018) que demuestran una amplia radiación de fenotipos, siendo esta una clave para explicar la facilidad de adaptación de las serpientes a diferentes nichos y por ende a alimentarse de diferentes presas.

Actualmente, las serpientes venenosas se clasifican principalmente en tres familias, de las que se destacan dos: Elapidae y Viperidae, las cuales se caracterizan por que la totalidad de sus especies son productoras de venenos altamente tóxicos. A la familia Viperidae se le han realizado el mayor número de estudios relacionados a la composición del veneno. Sin embargo, es poco lo que se sabe sobre las toxinas de los venenos. Es a esta familia a la que pertenece el género *Lachesis*, cuya historia filogenética y filogeográfica pudo aclararse solo hasta el año 2004, puesto que su descripción estaba sesgada solo a conceptos polítipicos derivados de sus distribuciones geográficas y no a estudios que pudiesen aportar un concepto definitivo.

Con relación a la especie *Lachesis acrochorda*, la composición de su veneno es la menos estudiada del género. En la actualidad, se ha reportado el análisis proteómico realizado por Madrigal y colaboradores en el 2012 y un solo estudio en el que se logró aislar y purificar una metaloproteasa y una lectina que reconoce de galactosa del veneno de esta especie (Núñez Rangel *et al.*, 2012).

El presente trabajo describe el proceso de aislamiento, purificación parcial, identificación y caracterización de nuevos compuestos del veneno de *L. acrochorda* con actividad de PLA₂, con actividad sobre líneas cancerosas humanas.

4. Marco teórico

4.1. Suborden Serpentes

El suborden *Serpentes* es un grupo muy diverso a nivel mundial, lo integran alrededor de 3788 especies pertenecientes a 26 Familias (Uetz & Hošek, 2019). Se caracteriza por poseer un cuerpo con forma cilíndrica alargada, cuya piel está cubierta por diversas escamas; carecer de extremidades, aunque algunas especies presentan vestigios de estas cerca a la cloaca; no poseer tímpano auricular, lo que les hace imposible percibir sonidos, pero tienen estribo que al estar articulado a la mandíbula inferior le permite percibir vibraciones (Mattison, 2007). Poseen lengua bifurcada que les sirve como órgano olfatorio y táctil, acoplado a sacos nasales accesorios, denominados órganos de Jacobson, ayudándoles a percibir cambios químicos en el ambiente, esta característica junto con una buena visión (excepto aquellas de comportamiento fosorial), les permiten tener hábitos diurnos y nocturnos (Dunn, 1944). Son organismos ectotermos y por ende, necesitan de una serie de comportamientos para poder regular su temperatura corporal. Son estos comportamientos de regulación térmica los que a su vez generan patrones de actividad diario en ellas (Mattison, 2007). En su mayoría son ovíparas, pero también, existen serpientes vivíparas.

Dentro de la ecología, juegan un papel importante como reguladores biológicos de sus hábitats, al alimentarse de una gran diversidad de organismos y habitar múltiples ecosistemas (Dunn, 1944). Una de las características a las que se le adjudica dicha versatilidad, está relacionada con la capacidad de movimiento relativo de sus mandíbulas y la facilidad que este le ofrece para tragar presas de diferentes tamaños (Pough *et al.*, 2008).

4.1.1. Familia Viperidae

La familia Viperidae está constituida por 3 subfamilias (*Azemiopinae*, *Viperinae* y *Crotalinae*), que poseen 34 géneros diferentes, a los que pertenecen 356 especies a nivel mundial (Uetz & Hošek, 2019). Morfológicamente, se caracterizan por poseer cabezas anchas de forma triangular, escamas quilladas, pupilas verticales, un par de fosetas loreales o termorreceptoras, y dentición solenoglifa con colmillos móviles en la parte anterior de la mandíbula superior (Figura 1), colmillos que están conectados con una glándula que se extienden a lo largo del maxilar superior, encargada de producir y secretar esta mezcla tóxica llamada veneno (Canseco-Márquez &

Gutiérrez-Mayén, 2010). Este tipo de dentición es prueba de la evolución de las serpientes para habitar mayor cantidad de hábitats y alimentarse de un mayor número de animales.

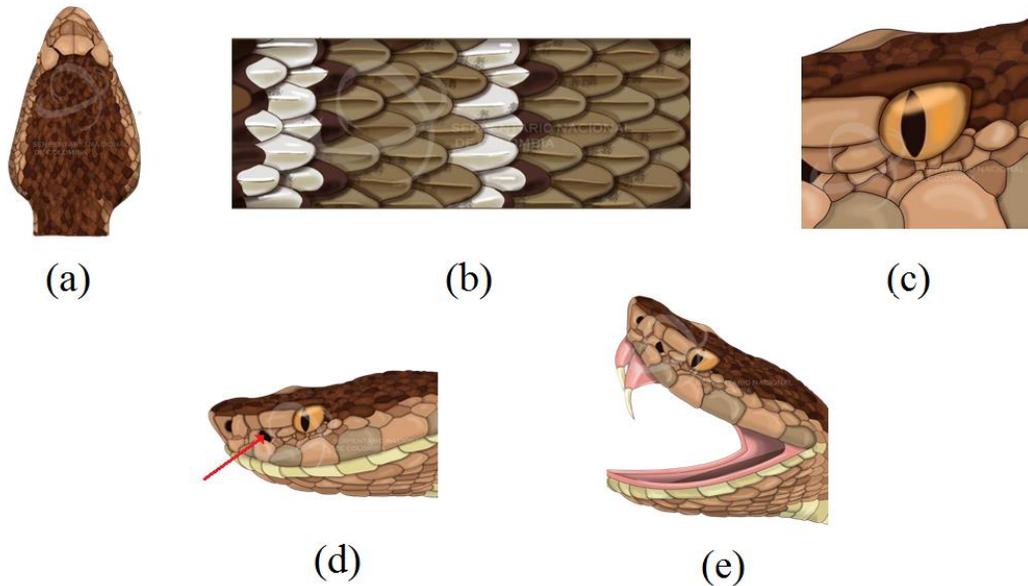


Figura 1. Características morfológicas de los vipéridos.

a. Cabeza ancha en forma triangular; **b.** Escamas quilladas; **c.** Pupila vertical; **d.** Fosetas loreales o termorreceptoras; **e.** Colmillos Solenoglifos. Extraído de Serpentario Nacional de Colombia.

Este grupo está integrado por serpientes altamente venenosas, cuyo veneno es un conglomerado de enzimas que desnaturalizan proteínas y poseen características principalmente hemolíticas, lo que lo hace letal para un buen número de sus presas.

4.1.2. Género *Lachesis*

Al género *Lachesis* (Daudin, 1803), pertenecen cuatro especies *L. stenophrys*, *L. melanocephala*, *L.acrochorda* y *L. muta*, esta última cuenta con dos subespecies *L. muta muta* y *L. muta rhombeata*, todas de hábitos nocturnos. Es el grupo en el que también se encuentra la especie objeto de estudio (Figura 3). Este género es conocido por albergar los vipéridos más grandes del mundo (Campbell & Lammar, 2004) y contemplan una compleja explicación de su variación morfológica, variabilidad que fue resuelta por Ripa en 1999, basado en estudios de ADN mitocondrial (Zamudio & Greene, 1997) corroboradas y complementadas en estudios posteriores que terminan de describir morfológicamente el género (Campbell & Lammar, 2004; Fernandes *et al.*, 2004). Dentro de los

caracteres morfológicos más destacados están: las escamas dorsales con formas casi piramidales, escamas subcaudales distales divididas dos veces y el principal caracter por el que reciben uno de sus nombres comunes “verrugosos” debido a la presencia de tubérculos (Fernandes *et al.*, 2004). Se distribuyen en la parte central y sur del continente americano, desde el sur de Nicaragua hasta el bosque atlántico de Brasil (Figura 2).

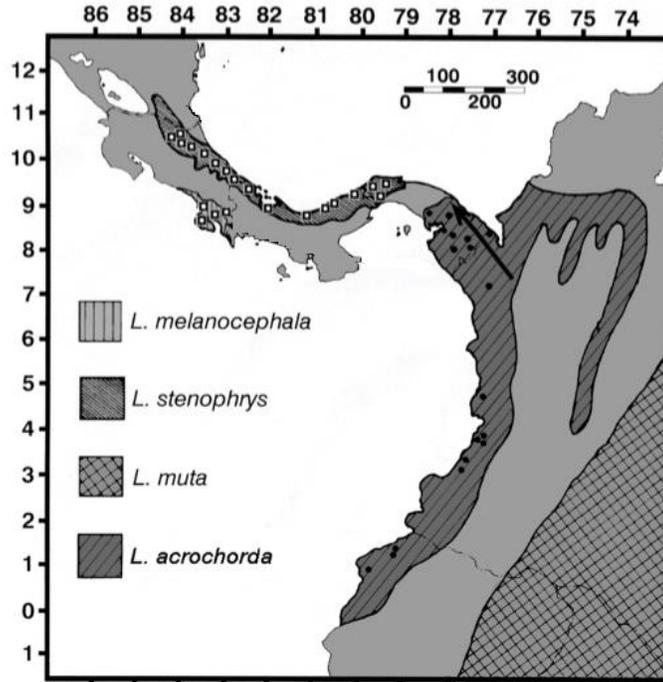


Figura 2. Distribución geográfica del género *Lachesis*. Extraído de Ripa, 1999.

El veneno, se caracteriza por tener actividades miocitotóxicas, proteolítica, hemorrágica y posible actividad neurotóxica. Sin embargo, el reporte clínico de mordedura por esta especie es escaso, debido a dos razones. La primera, es que su toxicidad es tan alta que el tiempo de vida de una persona mordida por una serpiente de este género y que no recibe tratamiento, es reducido, no supera las 24 horas, aunque se han reportado casos donde es cuestión de minutos. Sus síntomas principales son náuseas, vómitos, cólico abdominal, diarrea, sudoración, hipotensión, bradicardia y shock, posiblemente de origen autofarmacológico o autonómico, acompañado de hemorragias internas y necrosis celular (Campbell & Lammar, 2004). Y la segunda, es la dificultad de acceso a un tratamiento oportuno por mordedura, al ser los hábitats de este espécimen lugares muy alejados de poblaciones humanas (Campos *et al.*, 1988; Gutiérrez *et al.*, 1990; Campbell & Lammar, 2004) .

4.1.3. *Lachesis acrochorda* (*Bothrops acrochordus* García, 1896)



Figura 3. *Lachesis acrochorda*. Fotografía tomada por Cristian González-Acosta

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Clase: Reptilia

Orden: Squamata

Suborden: Serpentes

Familia: Viperidae

Género: *Lachesis*

Inicialmente llamada *Bothrops acrochordus* (García, 1896), el epíteto específico *acrochordus* proviene del griego “akrochordon” que significa “verruca”, tomando como referencia la forma elevada de las escamas de su dorso. Es considerada la serpiente venenosa más grande de América del Sur y el vipérido más grande a nivel mundial, llegando a medir hasta 3.5 metros. Son serpientes ovíparas con cuidado parental de sus posturas. Se encuentra distribuida desde Panamá, pasando por el pacífico colombiano, extendiéndose por la costa atlántica noroccidental del país, los valles de los ríos Cauca y Magdalena dentro de los departamentos de Caldas y Antioquia, hasta el valle de río Daule en Ecuador (Figura 4), en altitudes que oscilan desde los cero metros hasta los 1600 metros sobre el nivel del mar, aunque los reportes más frecuentes se dan entre los 500 y 1000 metros. (Campbell & Lammar, 2004). La ocurrencia de avistamiento de esta especie es baja, debido a que los lugares donde habita son zonas de bosques primarios con una intervención humana reducida o nula.



Figura 4. Distribución geográfica de *Lachesis acrochorda*.

Con relación a las otras 3 especies de su género, esta se diferencia de las demás por tener manchas dorsales irregulares, no en forma de diamante; a mitad del cuerpo con espacios internos pálidos de color castaño oscuro a los lados de las manchas, visible más oscuros que la coloración base; superficie ventral de la cola mayormente de grandes motas o barras, algunas veces extendiéndose casi hasta la línea media ventral (Campbell & Lammar, 2004).

4.2 Componentes del veneno de serpiente y su modo de acción

Los venenos de serpientes, son secreciones producidas por glándulas maxilares especializadas, cuya función no solo es la producción, sino también el proteger a la misma serpiente de la acción de los componentes del mismo veneno (Mackessy & Baxter, 2006). Estos productos secretados por las glándulas están compuestos principalmente por diferentes péptidos y proteínas que cuentan con alta actividad enzimática y corresponden entre un 70% y un 90% del veneno. El porcentaje restante pertenece a toxinas carentes de actividad enzimática, inhibidores de enzimáticos y componentes orgánicos e inorgánicos de bajo peso molecular (Klaassen & Watkins, 2015). Sin embargo, en la composición del veneno no existen solo elementos necesariamente tóxicos, puesto que también existen un número de componentes que tienen alto potencial para terapias o tratamientos de patologías como trombosis y coagulación (Sánchez *et al.*, 2015).

De manera general, las enzimas del veneno de las serpientes actúan de diversas maneras: (1) generando daño en los tejidos y capilar local por acción de las proteinasas, fosfolipasas, hialuronidasas y ésteres de arginina hidrolasas; (2) sobre el plasma sanguíneo, con acción coagulante y anticoagulante debido a diversas proteinasas y fosfolipasas A; (3) produciendo hipotensión aguda y dolor por la liberación de péptidos vasoactivos liberados por quinogenasas; finalmente, existen otras enzimas como las 5-nucleotidasas, fosfodiesterasas, colinesterasas y L-aminoácido oxidasas que son relacionadas con elementos de toxicidad que son componentes de dicho veneno (Chen-Yuan, 1979).

Los avances en la ciencia moderna han permitido el desarrollo de una serie de objetivos en la investigación de venenos de serpientes: (1) conocer la composición bioquímica; (2) entender los mecanismos de acción de estos componentes y su posible uso y (3) desarrollar antídotos que sirvan de tratamiento para los envenenamientos con animales de este tipo (Lomonte & Calvete, 2017). Adicional a ello, una estrategia denominada “toxicovenómica” que combina el aislamiento e identificación de los componentes proteicos de venenos, con los ensayos funcionales de los mismos, ha potenciado el uso de estas herramientas y magnificado los resultados, convirtiendo estos estudios en avances que agregan información de suma importancia biológica y médica (Lomonte & Calvete, 2017). Estudios que son cada vez más abundantes junto con técnicas de proteómica y transcriptómica han generado una rápida identificación y cuantificación de diferentes familias de proteínas de los venenos de las serpientes (Tasoulis & Isbister, 2017).

Aproximadamente un 90% de la composición del veneno total de las serpientes, lo dominan cuatro familias de proteínas: fosfolipasas A₂ (PLA₂), metaloproteasas (SVMP), proteasas serínicas (SVSP) y toxinas de tres dedos (3FTx). Otras seis familias proteicas que se encuentran en una menor proporción son: proteínas secretorias ricas en cisteína (CRiSP), L-amino oxidasas acidas (LAAO), péptidos tipo Kunitz (KUN), Lectinas tipo-C (CTL), desintegrinas (DIS) y péptidos natriuréticos (NP). Finalmente, existen otras 63 familias de proteínas, cuya abundancia en la mayoría de las serpientes es muy baja, siendo inferior al 5%, dentro de las que se destacan las acetil colinesterasas, hialuronidasa, 5' nucleotidasas, fosfodiesterasa y fosfolipasa B (Tasoulis & Isbister, 2017).

Específicamente hablando de las familias de serpientes, sus venenos están constituidos mayoritariamente por ocho familias de proteínas para Elapidae (Figura 5(a), Tabla 1). Para la familia Viperidae, se han reportado los datos para sus dos subfamilias así: 10 familias proteicas para Crotalinae (Figura 5(c), Tabla 2) y 11 familias proteicas para Viperinae (Figura 5(b), Tabla 3).

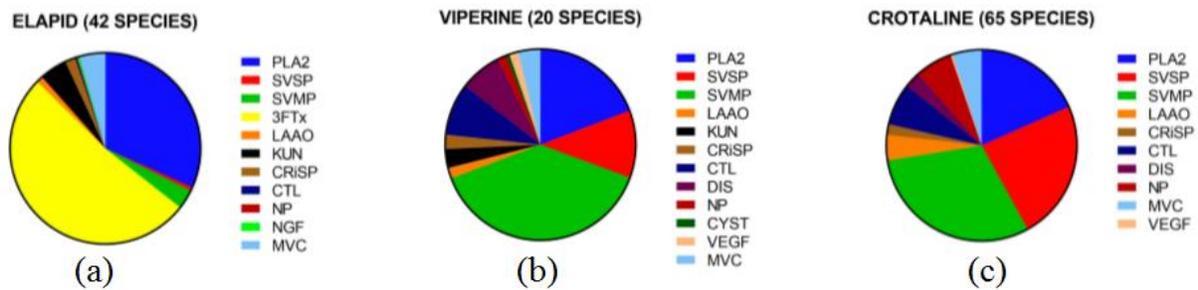


Figura 5. *Proporciones relativas de las familias proteicas.* Elapidos (a); Viperinos (b); Crotalinos (c), promediadas a partir del número de especímenes que se muestra entre paréntesis. Extraída de Tasoulis & Isbister, 2017.

Tabla 1. Composición del veneno de los Elápidos. Modificada de Tasoulis & Isbister, 2017

Especie	PLA₂	SVSP	SVMP	LAO	3FT	KUN	CRiSP	NP	%WV	3FT + PLA₂
<i>Austrelaps labialis</i>	33.0		3.0		45.0	9.0	8.0		98.0	78.0
<i>Drysdalia coronoides</i>					86.4	9.2	2.8		98.4	86.4
<i>Micropechis ikaheka</i>	80.0	<0.1	7.6	0.4	9.2	0.7	1.8		99.8	89.2
<i>Notechis scutatus</i>	74.5	5.9			5.6	6.9	0.3	2.0	93.2	80.1
<i>Oxyuranus scutellatus</i>	68-80	<5.0	5-9		0-9	<10	<1.0	1.0	>90	68-89
<i>Pseudechis papuanus</i>	90.2		2.8	1.6	3.1		2.3		100.0	93.3
<i>Toxicocalamus longissimus</i>	6.5		1.4		92.1				100.0	98.6
<i>Aipysurus laevis</i>	71.2				25.3		2.5		99.0	96.0
<i>Hydrophis cyanocintus</i>	18.9				81.1				100.0	100.0
<i>H. platurus</i>	32.9		0.9		49.9		9.1		92.8	82.8
<i>H. schistosus</i>	27.5		0.5	0.2	70.5		1.3		100.0	98.0
<i>Laticauda colubrina</i>	33.3				66.1		0.1		99.5	99.4
<i>Bungarus caeruleus (Sri Lanka)</i>	64.5		1.3		19.0	4.4	5.5		94.7	83.5
<i>B. candidus Malaya</i>	25.2	3.9	4.9	5.8	30.1	12.6	3.9	1.0	86.4	55.6
<i>B. fasciatus Vietnam</i>	66.8		3.5	7.0	1.3	1.8	0.4		80.8	68.1
<i>B. fasciatus Malaya</i>	44.2	5-8	4.7	5.8	17.4	9.3	1.2		88.4	61.6
<i>Dendroaspis angusticeps</i>			6.7		69.2	16.3	2.0		94.2	69.2
<i>D. polylepis</i>			3.2		31.0	61.1		2.9	95.3	31.0
<i>Naja haje</i>	4.0		9.0	1.0	60.0	1.9	10.0		85.9	64.0
<i>N. melanoleuca</i>	12.9		9.7		57.1	3.8	7.6		91.1	70.0
<i>N. katiensis</i>	29.0		3.3		67.1		0.2		99.6	96.1
<i>N. mossambica</i>	27.1		2.6		69.3				99.0	96.4
<i>N. nigricollis</i>	21.9		2.4		73.2		0.2		97.7	95.1
<i>N. nubiae</i>	26.4		2.6		70.9				99.9	97.3
<i>N. pallida</i>	30.1		1.6		67.7				99.4	97.8
<i>N. atra China</i>	12.2		1.6		84.3		1.8		99.9	96.5
<i>N. atra Taiwan</i>	14-17		2-2.6	0.2	76-80		2.2-2.4		>93	90-97
<i>N. kaouthia China</i>	26.9		1.1		56.6		5.4		90.0	83.5

Continuación Tabla 1. Composición del veneno de los Elápidos. Modificada de Tasoulis & Isbister, 2017

Especie	PLA₂	SVSP	SVMP	LAO	3FT	KUN	CRiSP	NP	%WV	3FT + PLA₂
<i>N. kaouthia</i> Malaya	23.5		3.3	1.1	63.7	0.5	4.3		96.4	87.2
<i>N. kaouthia</i> Thailand	12.2		2.6	1.0	78.3		2.3	0.2	96.4	90.5
<i>N. kaouthia</i> Vietnam	17.4		1.6	0.5	76.4		0.8		96.7	93.8
<i>N. naja</i> Eastern India	11.4	0.3	1.0	0.8	63.8	0.4	2.1	2.0	79.8	75.2
<i>N. naja</i> North-west India	21.4		0.9		74.0		2.5		98.8	95.4
<i>N. naja</i> Sri Lanka	14.0		0.9		80.5		3.7		99.1	94.5
<i>N. sputatrix</i>	31.2	0.4	1.3	0.1	64.2	0.2			97.0	95.4
<i>Ophiophagus hannah</i>	2.8		11.9	0.5	64.5	3.3	6.5	0.2	89.5	67.3
<i>Micrurus alleni</i>	10.9		1.2	3.0	77.3				92.4	88.2
<i>M. altirostris</i>	13.7		0.9	1.2	79.5	2.1	0.1		97.5	93.2
<i>M. clarki</i>	36.5	1.0	1.6	3.8	48.2	0.9			92.0	84.7
<i>M. corallinus</i>	11.9	0.8	2.9	2.3	81.7				99.6	93.6
<i>M. dumerelii</i>	52.0	1.9	1.8	3.1	28.1	9.0			95.9	80.1
<i>M. fulvius</i>	64.9		2.9		25.1	2.2			95.1	90.0
<i>M. mipartitus</i>	29.0	1.3	1.6	4.0	61.1	1.9			98.9	90.1
<i>M. mosquitensis</i>	55.6	0.5	2.6	2.8	22.5	9.8			93.8	78.1
<i>M. multifasciatus</i>	8.2		3.6	3.2	83.0	1.9			99.9	91.2
<i>M. nigrocinctus</i>	48.0	0.7	4.3	2.3	38.0				93.3	86.0
<i>M. tschudii</i>	4.1			0.7	95.2	1.6			100.0	99.3

Tabla 2. Composición del veneno de los Crotalinos. Modificada de Tasoulis & Isbister, 2017

Especie	PLA₂	SVSP	SVMP	LAAO	CRISP	CTL/ SNACLEC	DIS	NP	DEF	MPI	%W/V
<i>Calloselasma rhodostoma</i>	4.4	14.9	41.2	7.0	2.5	26.3					96.3
<i>Crypteiytrops purpureomaculatus</i>	8.0	12.0	35.0	10.0	6.0	19.0		2.0			92.0
<i>Gloydus brevicaudus</i>	25.0	3.7	64.4	0.9	1.1	0.2	4.6				99.9
<i>G. intermedium</i>	9.9	36.2	2.6	13.1	6.2	0.8		25.3			94.1
<i>Ovophis okinavensis</i>	0.65	93.1	4.2	0.62		0.47					99.0
<i>Protobothrops elegans</i>	77.1	10.4	8.0	0.5	0.1	0.2					96.3
<i>Protobothrops flavoviridis</i>	55.5	11.8	17.3	3.1	2.0	0.9		2.6			93.2
<i>P. mucrosquamatus</i>	22.5	10.4	43.0	2.0	0.8	3.9	0.8	3.6			87.0
<i>Viridovipera stejnegeri</i>	24.5	11.0	43.1	3.3	6.0	1.5	2.2	1.2			92.8
<i>Agkistrodon bilineatus (3 subsp)</i>	34.3-42	7.6-16.9	24.5-30.8	2.6-1.9	0-5.6	0.4-1.4	2.2-3.1	4.6-8.7			76.7+
<i>A. c. contortrix</i>	50.7	5.85	25.0	4.0	2.0	0.8					88.35
<i>A. piscivorus (3 subsp)</i>	33.6-46	10.1-13.9	21-33.1	0.8-1.5	2-3.5	0.8-3.2	2.2-4.9	5.7-5.9			76.2
<i>Atropoides nummifer</i>	36.5	22.0	18.2	9.1	1.9	1.3	2.5	8.6			100.0
<i>A. picadoi</i>	9.5	13.5	66.4	2.2	4.8	1.8	<0.1	1.8			100.0
<i>Bothriechis aurifer</i>		7.3	35.1	9.5	10.7	16.4	1.4	13.4		3.2	97.0
<i>B. bicolor</i>	35.2	19.1	8.5	10.8	1.0	4.4	7.6	3.6		4.6	94.8
<i>B. marchi</i>	14.3	10.1	34.2	1.1	2.8	4.2	6.5	10.6		8.5	83.8
<i>B. lateralis</i>	8.7	11.3	55.1	6.1	6.5			11.1			98.8
<i>B. nigroviridis</i>	38.3	18.4		0.5	2.1			37.0			96.3
<i>B. schlegdii</i>	43.8	5.8	17.7	8.9	2.1			13.4			91.7
<i>B. supraciliaris</i>	13.4	15.2	6.8	5.9	4.3		1.6	21.9			69.1
<i>B. thalassinus</i>		12.1	39.6	4.3	5.1	11.5	2.0	10.6		9.9	95.1
<i>Bothrocophias campbelli</i>	43.1	21.3	15.8	5.7	0.9	6.4	0.3	3.9			97.4
<i>B. colombiensis</i>	44.3	<1.0	42.1	5.7	0.1		5.6	0.8			99.5
<i>Bothropoides diporus</i>	24.1	7.2	34.2	7.4		2.9	1.4	15.9		2.6	95.7
<i>B. erythromelaus (5 poblaciones)</i>	10.1-15.1	4-9.7	32.5-59.9		0.4	8.4-21.6	3.4-8.9	9.3-14.5			68+
<i>B. insularis</i>	10.0	12.5	30.0	1.3	1.3	31.3		11.3			97.7
<i>B. jaracara (sur-este)</i>	3.7	13.7	35.6	7.2	2.4	9.6	7.0	16.4			95.6
<i>B. jaracara (sur)</i>	20.2	28.6	10.3	8.0	2.6	9.4	0.2	22.6			100.0
<i>B. neuwiedi</i>	8.4	8.8	49.9	16.7	2.0	8.6					94.4

Continuación Tabla 2. Composición del veneno de los Crotalinos. Modificada de Tasoulis & Isbister, 2017

Especie	PLA₂	SVSP	SVMP	LAO	CRiSP	CTL/ SNACLEC	DIS	NP	DEF	MPi	%W/V
<i>B. pauloensis</i>	31.9	10.5	38.1	2.8	2.2	0.6	1.3	12.4			99.8
<i>Bothrops asper (Costa caribe)</i>	28.8	18.2	41.0	9.2	0.1	0.5	2.1				99.9
<i>B. asper (Costa pacífica)</i>	45.5	4.4	44.0	4.6	0.1	0.5	1.4				100.0
<i>B. atwx (Oeste para Brasil)</i>	5.7-7.5	9.7-14.1	46.5-54	8.7-9.4	3.7-4.3	10.2-13.1					84.5+
<i>B. atrox (Colombia)</i>	24.1	10.9	48.5	4.7	2.6	7.1	1.7	0.3			99.9
<i>B. atrox (Venezuela)</i>	7.7-8.5	2.3	85.0	1.2-1.5	2.8-3.8						99+
<i>B. atrox (Peru)</i>	11.0	11.1	58.2	10.5	2.4	3.6	3.2				100.0
<i>B. ayerbi</i>	0.7	9.3	53.7	3.3	1.1	10.1	2.3	8.3			88.8
<i>B. barnetti</i>	6.4	6.7	74.1	0.8	3.1	3.3	5.5				99.9
<i>B. caribbaeus</i>	12.8	4.7	68.6	8.4	2.6		1.7				98.8
<i>B. jararacussu</i>	25.7	12.3	26.2	15.0	2.2	9.7					91.1
<i>B. lanceolatus</i>	8.6	14.4	74.2	2.8		<0.1					100.0
<i>B. pictus</i>	14.1	7.7	68.0			1.1	8.9				99.8
<i>B. pirajai</i>	40.2	7.1	20.7	5.2		9.2	1.4	5.6			89.4
<i>B. punctatus</i>	9.3	5.4	41.5	3.1	1.2	16.7	3.8	10.7			91.7
<i>Cerrophidion godmani</i>	23.4	19.1	32.8	5.0	4.2	0.5	7.5	5.7			98.2
<i>C. sasai</i>	23.4	19.1	32.8	5.0	4.2	0.5	7.5	5.7			98.2
<i>Crotalus adamanteus</i>	7.8	20.0	24.4	5.3	1.3	22.2			16.8		97.8
<i>C. atrox</i>	7.3	19.8	49.7	8.0	4.3	3.4	6.2	3.0			100.0
<i>C. basiliscus</i>	14.0	11.0	68.0					2.0		4.0	99.0
<i>C. culminatus</i>	8.3	10.1	35.5	2.7	1.9	13.0		1.6	24.4		97.5
<i>C. durissus cascavella</i>	90.9	1.2	<0.1	<0.1	0.9	<0.1	0.2				93.4
<i>C. d. collilineatus</i>	72.0	1.9	0.4	0.5	1.8	<0.1	0.5		20.8		98.0
<i>C. d. terrificus</i>	48.5	25.3	3.9								77.7
<i>C. horridus</i>	22.8	58.2	0.1	1.1	0.8	0.22			0.2		82.3
<i>C. simus simus</i>	22.4	30.4	27.4	5.7	1.0	0.6	1.5	6.5			95.5
<i>C. tigris</i>		26.8	66.2		1.9		0.2				95.1
<i>C. tzabacan</i>	11.1	5.4	18.5	0.5		35.2		4.2	23.5		98.4
<i>C. viridis</i>	7.7-10.2	26.8	10.9-11.4	1.9-2.5	2.1-3.9	1.8-3.3	0.1	6.5-8.2	35.6-38	0.1	93.5+
<i>Sistrurus catenatus (3 subsp.)</i>	31.3-31.9	18.2-24.4	40.6-48.6	1.6-4.2	0.8-10.7		0.9-4.2				93.4+

Continuación Tabla 2. Composición del veneno de los Crotalinos. Modificada de Tasoulis & Isbister, 2017

Especie	PLA₂	SVSP	SVMP	LAAO	CRiSP	CTL/ SNACLEC	DIS	NP	DEF	MPi	%W/V
<i>S. miliarius</i>	32.5	17.1	36.1	2.1	2.9		7.7				98.4
<i>Lachesis acrochorda</i>	2.3	35.1	23.2	9.6	0.9	6.9		21.5			99.5
<i>L. melanocephala</i>	13.4	21.0	18.9	3.6		7.5		30.2			94.6
<i>L. muta muta</i>	8.7	31.2	31.9	2.7	1.8	7.9		14.7			98.9
<i>L. m. rhombeata</i>	10.8	26.5	29.5	5.0	1.4	2.7		28.0			99.4
<i>L. stenophrys</i>	14.1	21.2	30.6	2.7		3.6		27.1			99.3
<i>Porthidium lansbergii</i>	16.2	4.5	35.5	3.6	1.4	6.7	12.9	12.4			93.2
<i>P. nasutum</i>	11.6	9.6	52.1	3.0	1.3	10.4	9.9	1.9			99.8
<i>P. ophryomegus</i>	13.5	7.3	45.0	3.3	0.6	8.0	16.7	4.2			98.6
<i>Rhinocerothis alternatus</i>	2.0	5.8	52.2	14.9	2.5	14.8					92.2
<i>R. cotiara</i>	0.6	13.0	51.0	19.6	2.9	4.7					91.8
<i>R. fonescai</i>	30.1	4.1	42.5	1.9	2.4	9.8	4.4				95.2

Tabla 3. Composición del veneno de los Viperinos. Modificada de Tasoulis & Isbister, 2017

Especie	PLA₂	SVSP	SVMP	LAAO	CRiSP	CTL/ SNACLE	DIS	NP	KUN	VEGF	CYS	%W/V
<i>Bitis arietans</i>	4.3	19.5	38.5			13.2	17.8		4.2		1.7	99.2
<i>B. caudalis</i>	59.8	15.1	11.5	1.7	1.2	4.9	2.3		3.2			99.7
<i>B. gabonica</i>	11.4	26.4	22.9	1.3	2.0	14.3	3.4	2.8	3.0	1.0	9.8	98.3
<i>B. nasicornis</i>	20.1	21.9	40.9	3.2	1.3	4.2	3.5				4.2	99.3
<i>B. rhinoceros</i>	4.8	23.9	30.8	2.2	1.2	14.1	8.5	0.3	7.5		5.3	98.6
<i>Cerastes cerastes (Morocco)</i>	19.1	6.9	63.1		0.7	1.7	8.5					100.0
<i>C. cerastes (Tunisia)</i>	16.6	13.2	55.9	6.2		3.2	4.9					100.0
<i>Daboia russelii (Pakistan)</i>	32.8	3.2	21.8	0.6	2.6	6.4	0.4		28.4	1.5		97.7
<i>D. russelii (West India)</i>	32.5	8.0	24.8	0.3	6.8	1.8	4.9		12.5	1.8		93.4
<i>D. russelii (Sri lanka)</i>	35.0	16.0	6.9	5.2	2.0	22.4			4.6			92.1
<i>Echis carinatus sochureki</i>	8.0	4.6	56.6	1.2	2.0	16.5	7.7			0.4		97.0
<i>E. coloratus</i>	5.7	3.6	61.4	3.9	5.7	9.5	5.8			0.3		96.0
<i>E. ocellatus</i>	8.5	1.7	72.4	1.4	0.3	6.5				2.7		93.5
<i>E. pyrantidium leakeyi</i>	21.6	1.4	48.9	2.8		24.3				0.3		99.3
<i>Macrovipera lebetina (Tunisia)</i>	5.0	5.5	63.1			3.2	15.1		3.1	3.3		98.3
<i>M. l. obtusa</i>	14.6	14.9	32.1	1.7	2.6	14.8	113.0	5.3				97.3
<i>M. mauritanica</i>	5.5	8.3	45.4			8.1	13.8	4.5	2.5	4.9		93.0
<i>Vipera anatolica</i>	8.1	1.6	41.5		15.9	1.1	2.0		0.3			70.5*
<i>V. berus</i>	10.0	31.0	19.0	2.0	8.0	2.0	1.0	11.0				84*
<i>V' kaznakovi</i>	41.0	11.0	16.0	4.0	10.0	12.0	0.5			4.0		94.5
<i>V. nikolskti</i>	65.0	19.0	0.7	0.1	0.7	4.0				8.0		97.4
<i>V. orlovi</i>	24.0	24.0	15.0	5.0	12.0	11.0	0.6		0.2	4.0		91.7
<i>V. raddei</i>	23.8	8.4	31.6	0.2	7.4	9.6	9.7	6.0	0.9	2.4		100.0
<i>V. renardii</i>	44.0	8.0	12.0	4.0	8.0	3.0	13.0		0.8	3.0		95.8

4.3 Toxinas aisladas de *Lachesis acrochorda*

En la actualidad, la mayoría del conocimiento que se ha recopilado con relación a los venenos de serpientes se ha hecho aislando toxinas en particular y posteriormente analizando sus características estructurales y mecánicas. La realidad es que estos estudios se encuentran sesgados hacia las toxinas que más abundan en los venenos de las especies más comunes de importancia médica, pero dejan a un lado aquellas que son más escasas, más difíciles recolectar y mantener cautivas (Lomonte & Calvete, 2017). Este es el caso de *Lachesis acrochorda*, aunque hay un número grande de técnicas estandarizadas para el aislamiento y purificación de proteínas de serpientes, los estudios con esta especie son reducidos, a tal nivel, que actualmente solo existen dos proteínas reportadas que han sido aisladas del veneno de esta especie (Núñez Rangel *et al.*, 2012) y solo hasta el 2012 se publicó el primer análisis de proteómica del veneno (Madrigal *et al.*, 2012).

En el trabajo realizado por Núñez Rangel y colaboradores en el 2012, se usó el Ensayo Inmunoabsorbante Ligado a Enzimas (ELISA) para detectar el veneno de la especie *Lachesis acrochorda*. Al comparar este veneno con el de *Bothrops asper*, una de las especies que mayor número de envenenamientos por mordedura causa cada año en Latinoamérica. Una de las fracciones del veneno no mostró reactividad cruzada, esta se aisló usando el mismo anticuerpo obtenido en la prueba ELISA y posteriormente se identificaron dos proteínas, una lectina con especificidad por galactosa y una metaloproteinasa.

Por otro lado, el estudio realizado por Madrigal y colaboradores el mismo año, explica los cambios ontogénicos en la composición del veneno de *Lachesis melanocephala* y caracterizan los proteomas de *Lachesis stenophrys* y *Lachesis acrochorda*, comparándolo con un estudio previo realizado con *Lachesis muta muta*. Lo que demuestra la existencia de una alta similitud en la composición del veneno de las cuatro especies, explicándolo en algo que denominan el “síndrome *Lachesis*” debido a la alta conservación en la composición general del veneno de las especies del género *Lachesis*.

Tasoulis y Isbister en el 2017 realizaron un trabajo que se basó en reunir la mayor cantidad de análisis de proteómica reportados en la última década, con la finalidad de permitir un acceso rápido a la información y poder evaluar así las tendencias evolutivas, variaciones geográficas y las implicaciones médicas de los venenos de las serpientes al condensar todos estos datos en su trabajo. Con relación al género *Lachesis*, se observaron datos de su composición muy acorde a lo dicho por Madrigal y colaboradores, que aunque posee variaciones, explica la alta conservación en la composición de su veneno (Tabla 4).

Tabla 4. Composición del veneno del género *Lachesis*. Modificada de Tasoulis & Isbister, 2017

Especie	PLA₂	SVSP	SVMP	LAAO	CRiSP	CTL/ SNACLEC	DIS	NP	DEF	MPi	%W/V
<i>Lachesis acrochorda</i>	2.3	35.1	23.2	9.6	0.9	6.9		21.5			99.5
<i>L. melanocephala</i>	13.4	21.0	18.9	3.6		7.5		30.2			94.6
<i>L. muta muta</i>	8.7	31.2	31.9	2.7	1.8	7.9		14.7			98.9
<i>L. m. rhombeata</i>	10.8	26.5	29.5	5.0	1.4	2.7		28.0			99.4
<i>L. stenophrys</i>	14.1	21.2	30.6	2.7		3.6		27.1			99.3

A pesar de la existencia de estos datos, no hay reportes en la base de datos de información funcional sobre proteínas (UniProtKB) que soporten realmente la secuencia, estructura y por consiguiente identificación plena de proteínas del veneno de la especie. Aquí la importancia de este trabajo, donde se pretende aislar, identificar y caracterizar fosfolipasas A₂ del veneno de *Lachesis acrochorda*.

4.4 Enzimas

Las enzimas son denominadas biocatalizadores, debido a que aceleran las reacciones biológicas que existen dentro de los organismos vivos, pero también pueden extraerse de las células para llevar a cabo diversos procesos, que pueden ser usados con fines comerciales, terapéuticos y medicinales (Robinson, 2015). Estructuralmente la gran mayoría de las enzimas son proteínas elaboradas por las diferentes células de organismos vivos, para cumplir funciones específicas de catálisis, sin embargo, también existen moléculas de ARN que poseen actividad catalítica denominadas ribozimas.

Pueden ser clasificadas en seis categorías: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, ligasas e isomerasas, según el tipo de reacción en las que intervienen o catalizan (Robinson, 2015). Es importante decir que muchas de las reacciones bioquímicas donde intervienen no solo necesitan de ellas, sino también de componentes no proteicos conocidos como cofactores, para poder realizar la catálisis. Estos cofactores pueden ser moléculas orgánicas, en este caso se les llamaría coenzimas o también pueden ser moléculas inorgánicas, que por lo general son iones metálicos como hierro, manganeso, cobalto, cobre o zinc (Blanco & Blanco, 2017). En las enzimas, este cofactor puede actuar de tres diferentes maneras: a) como centro catalítico primario; b) como grupo puente para unir la enzima y el sustrato; c) como agente de estabilización de la actividad enzimática.

En los venenos, el papel de las enzimas es de vital importancia, debido a la función fisiológica que estas poseen en el organismo al que se está siendo inoculado o introducido dicho veneno, sea por uso como un mecanismo de defensa o por depredación.

4.4.1 Fosfolipasas A₂ (PLA₂)

EC 3 – Hidrolasas EC

3.1 - Actúan sobre enlaces éster EC

3.1.1 – Hidrolasas de éster carboxilado EC

3.1.1.4 - Fosfolipasas A₂

Pertenecen a la familia de las fosfolipasas, superfamilia de las lipasas y megafamilia de las hidrolasas. Están comprendidas por una superfamilia de enzimas que hidrolizan glicerofosfolípidos exactamente en la posición dos (Figura 6), clasificadas con la nomenclatura propuesta por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (UIBMB) como EC 3.1.1.4. (Alfonso & García, 2009). Estas enzimas poseen un alto número de puentes disulfuro, característica que las hace muy estables a cambios de temperatura y pH.

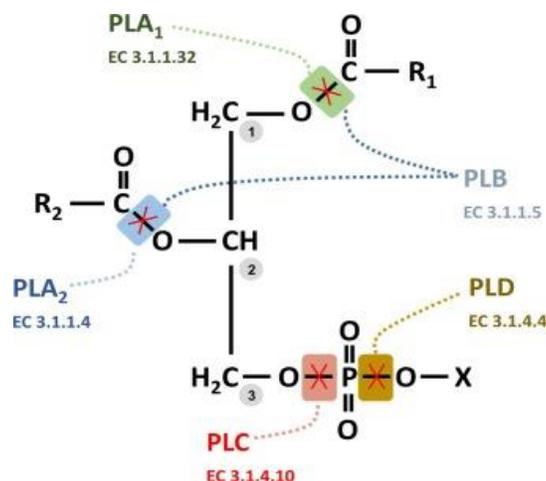


Figura 6. Representación del mecanismo de acción por ataque hidrolítico de varios tipos de fosfolipasas A₁, A₂, B, C y D. Extraído y modificado de Flammersfeld *et al.*, 2018.

Schaloske y Dennis en el 2006 establecieron el sistema de numeración sistemática para este grupo, abarcando la totalidad de las enzimas conocidas hasta esa fecha en cuanto a virus, bacterias, hongos, reptiles y mamíferos. Donde utilizan números romanos para dieciséis grupos, con diversos subgrupos con letras mayúsculas. Se clasifican según su funcionalidad, localización celular y tisular como: 1) PLA₂ citosólicas de alto peso molecular (Tabla 5); PLA₂ secretorias de bajo peso molecular (Tabla 6); por su dependencia a calcio, enzimas calcio-independientes (Tabla 7); enzimas que degradan los factores activadores plaquetarios o acetil hidrolasas (Tabla 8); y enzima lisosomal calcio independiente (Tabla 9).

Tabla 5. PLA₂ citosólicas. Modificada de Schaloske & Dennis, 2006

Fosfolipasas citosólicas grupo IV (cPLA ₂)				
Grupo	Fuente	Masa molecular (kDa)	Características	Nombres alternativos
IVA	Humano/murino	85	Dominio C2	cPLA ₂ α
IVB	Humano/murino	114	Dominio C2	cPLA ₂ β
IVC	Humano/murino	61	Acilado	cPLA ₂ γ
IVD	Humano/murino	92-93	Dominio C2	cPLA ₂ δ
IVE	Murino	100	Dominio C2	cPLA ₂ ε
IVF	Murino	96	Dominio C2	cPLA ₂ ζ

Tabla 6. PLA₂ secretorias. Modificada de Schaloske & Dennis, 2006

Fosfolipasas A₂ secretorias (s PLA₂)			
Grupo	Fuente	Masa molecular (kDa)	Puentes Disulfuro
IA	Cobras y Kraits	13-15	7
IB	Páncreas humano/porcino	13-15	7
IIA	Serpientes cascabel; sinovial humano	13-15	7
IIB	Víbora de Gabón	13-15	6
IIC	Testículo de rata/murino	15	8
IID	Páncreas/bazo de humano/murino	14-15	7
IIE	Cerebro, corazón y útero de humano/murino	14-15	7
IIF	Embrión/testículos de humano/murino	16-17	6
III	Humano/murino/lagarto/abeja	15-18 55 (humano/murino)	8
V	Corazón/pulmón de humano/murino/macrófago	14	6
IX	Veneno de caracol (conodipina-M)	14	6
X	Bazo/glándula timo/ leucocitos	14	8
XIA	Brotes de arroz verde (PLA ₂ -I)	12.4	6
XIB	Brotes de arroz verde (PLA ₂ -II)	12.9	6
XII	Humano/murino	19	7
XIII	Parvo virus	<10	0
XIV	Hongos simbióticos/bacteria	13-19	2

Tabla 7. PLA₂ calcio-independientes. Modificada de Schaloske & Dennis, 2006

Fosfolipasas A₂ Ca²⁺ independientes Grupo VI (iPLA₂)				
Grupo	Fuente	Masa Molecular (kDa)	Características	Nombres alternativos
VIA-1	Humano/murino	84-85	Repeticiones anquirina 8	i PLA ₂
VIA-2	Humano/murino	88-90	Repeticiones anquirina 7	i PLA ₂ β
VIB	Humano/murino	88-91	Ligada a membrana	i PLA ₂ γ
VIC	Humano/murino	146	Proteína integrada a membrana	i PLA ₂ δ, neuropatía diana esterasa (NTE)
VID	Humano	53	Acilglicerol transacilasa, triacilglicerol upasa	i PLA ₂ ε, adiponutrina
VIE	Humano	57	Acilglicerol transacilasa, triacilglicerol lipasa	i PLA ₂ ζ, TTS-2.2
VIF	Humano	28	Acilglicerol transacilasa, triacilglicerol lipasa	i PLA ₂ , GS2

Tabla 8. PLA₂ enzimas degradantes de factores activadores plaquetarios o acetil hidrolasas.
Modificada de Schaloske & Dennis, 2006

Fosfolipasas A₂ con actividad PAF acetilhidrolasa (PAF-AH) Grupo VII y Grupo VIII				
Grupo	Fuente	Masa Molecular (kDa)	Características	Nombres alternativos
VIIA	Humano, murino, porcino, bovino	45	Secretada, α/β hidrolasa	PLA ₂ asociado a lipoproteína (Lp-PLA ₂), Plasma PAF-AH
VIIIB	Humano, bovino	40	Intracelular, miristoilizada, α/β hidrolasa	PAF-AH II
VIIIA	Humano	26	Intracelular, triada Ser/His/Asp, homodímero o heterodímero con GVIIIB asociados con regularidad (Subunidad β)	PAF-AH Ib (subunidad α 1)
VIIIB	Humano	26	Intracelular, triada Ser/His/Asp, homodímero o heterodímero con GVIIIA asociados con regularidad (Subunidad β)	PAF-AH Ib (subunidad α 2)

Tabla 9. PLA₂ lisosomal calcio-independiente. Modificada de Schaloske & Dennis, 2006

Fosfolipasa A₂ Liposomal grupo XV				
Grupo	Fuente	Masa Molecular (kDa)	Características	Nombres alternativos
XV	Humano, murino, bovino	45 (Desglucosilada)	Triada Ser/His/Asp, glucosilada, Secuencia señal L-Terminal	ACS, PLA ₂ Liposomal (LPLA ₂), LLPL

Las enzimas PLA₂ de veneno de serpiente tienen un peso molecular bajo de 13 – 21 kDa. Se clasifican dentro de los grupos IA, IIB, IIC, III, IX, X, XIA, XIB, XII, XII y XIV, poseen estructuras terciarias muy rígidas debido al alto número de puentes disulfuro, valor que oscila entre cinco y ocho puentes que proveen mayor estabilidad contra una posible proteólisis y resistencia a ser degradadas (Schaloske & Dennis, 2006). Estas enzimas se han caracterizado estructuralmente y se han encontrado actividades farmacológicas como hipotensoras, neurotóxicas, cardiopáticas, hemorrágicas, miotóxicas, hemolíticas, de agregación plaquetaria y convulsionante (Arni & Ward, 1996).

Oliveira y colaboradores en el 2018 encontraron la existencia de 14 residuos altamente conservados y tres conjuntos de residuos coevolucionados en las PLA₂ en serpientes (Figura 7). También, demostraron la variación que existe entre las cargas de los residuos de aminoácidos que no forman parte de estos dominios anteriormente mencionados y que diversifican este grupo de enzimas.

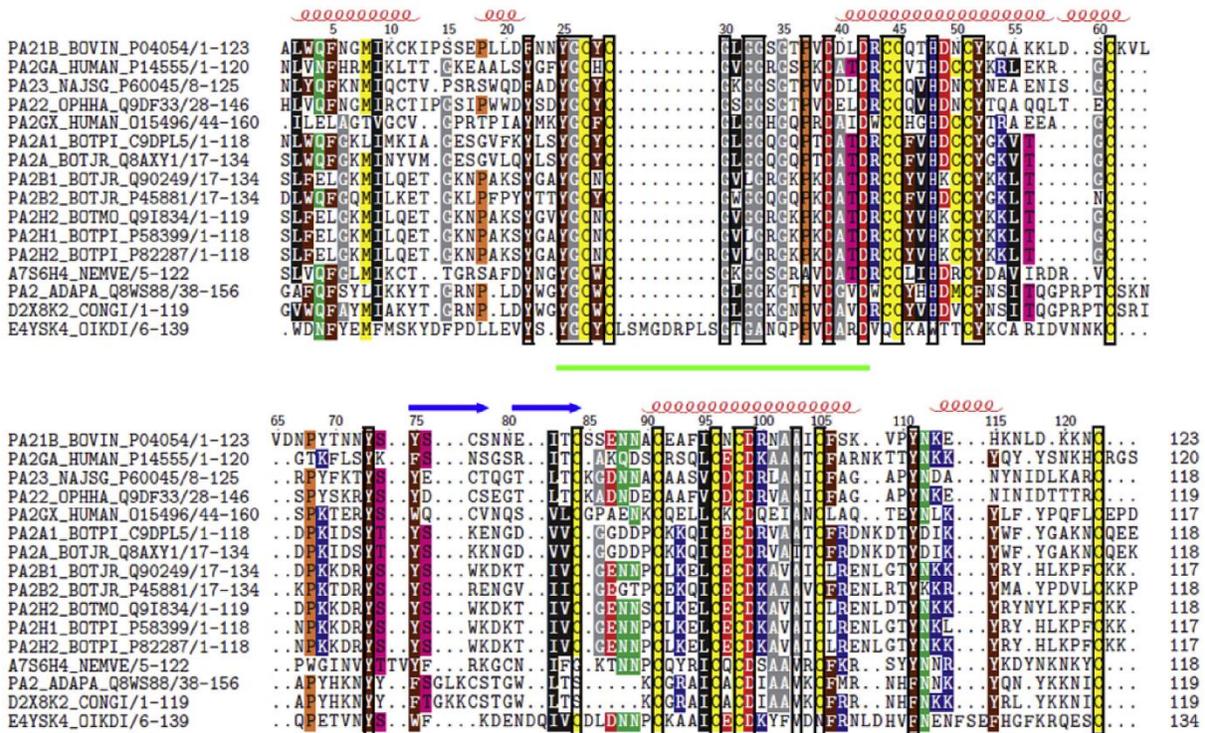


Figura 7. Alineamiento múltiple de secuencias de PLA₂. Modificado de Oliveira *et al.*, 2018

A pesar de esta diversificación, principalmente en sus propiedades farmacológicas, las PLA₂ comparten entre un 40-99% de similitud en sus secuencias de aminoácidos y, por lo tanto, una alta semejanza en su plegamiento tridimensional (Scott, 1997). En su estructura primaria, es posible identificar diferentes regiones importantes que le permiten a la enzima llevar a cabo su actividad catalítica, actividades biológicas, estabilizarse, así como la unión de ligandos (Figura 8).

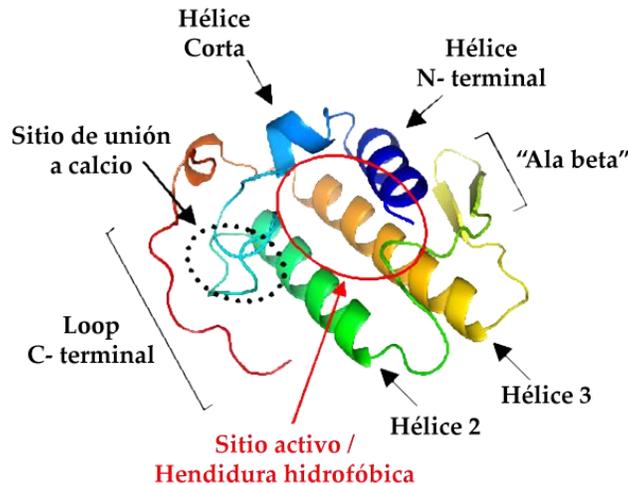


Figura 8. Estructura tridimensional de las PLA₂ del grupo I/II. Modificado de https://sites.ffclrp.usp.br/pbbg/english/research/pla2/pla2_structure.htm

Los residuos de His48, Tyr52 y Asp99 conforman el sitio activo de las PLA₂ encargadas de la hidrólisis de los fosfolípidos (Oliveira *et al.*, 2018). Las cisteínas conservadas forman los puentes disulfuros característicos que le dan la rigidez y estabilidad a la biomolécula. El sitio de unión a Ca²⁺ está ligando al residuo en la posición 49, la presencia de aspartato en esta posición es esencial para la unión del ion a la proteína, en la presencia de otros aminoácidos en esta posición la afinidad por el calcio y por ende la actividad de la molécula decae notoriamente (Arni & Ward, 1996). Otras regiones con actividades de importancia que se han identificado en PLA₂ son: región 80-110 con actividad neurotóxica presináptica (Kini & Iwanaga, 1986); región 115-129 con actividad miotóxica (Lomonte *et al.*, 1994) y la región 54-77 con actividad anticoagulante (Kini & Evans, 1987).

4.4.1.1 Fosfolipasas A₂ del género *Lachesis*

Las PLA₂ en venenos de serpientes, además de su rol en la digestión de la presa, poseen características que se asocian con efectos farmacológicos que interfieren en los procesos fisiológicos normales de sus presas. Estas enzimas pueden ser catalíticamente inactivas, pero biológicamente funcionales (Xiao *et al.*, 2017). En su mayoría son monómeros dependientes de calcio, con estructura terciaria estabilizada con puentes disulfuro. Lo más llamativo es la presencia de isoformas de PLA₂ en un mismo veneno con funciones completamente diferentes, lo que

evidencia el grado de diversidad evolutiva de este grupo de proteínas dentro de los venenos (Damico *et al.*, 2005).

Se han encontrado múltiples isoformas de PLA₂, que presentan altos niveles de homologías estructurales en sus secuencias de aminoácidos, peso molecular y punto isoeléctrico. Del género *Lachesis* se han aislado 16 diferentes PLA₂ (Tabla 10), demostrando la diversidad evolutiva de estas proteínas, algo diferente a lo que Madrigal y colaboradores en el 2012 denominan “Síndrome *Lachesis*” y que hace referencia a la conservación de diferentes componentes proteicos del veneno de las serpientes de este género.

Estas enzimas presentan 2 sitios de importancia: el primero, se denomina sitio catalítico, algo común en todas las enzimas. En el caso de las PLA₂, la parte principal de dicho sitio se encuentra ubicada en la posición 49 y según el aminoácido encontrado en esta ubicación, se puede clasificar como: fosfolipasas enzimáticamente activas e inactivas (o débilmente activas), que se caracterizan por presentar en este sitio un ácido aspártico o una lisina, respectivamente. El segundo de los sitios es el farmacológico o biológico, el cual se puede ubicar en distintas zonas de la estructura y son los encargados de determinar el efecto biológico de dicha enzima sobre su presa (Díaz-Oreiro & Gutiérrez, 1997).

La importancia biotecnológica de las PLA₂ provienen de sus efectos como anti-tumorales, antiparasitarios, bactericidas, anti-malaria (Calderon *et al.*, 2014), aumentando la relevancia de estas enzimas en los ámbitos de salud como posibles agentes terapéuticos para el tratamiento de diferentes padecimientos. Estas características hacen aún más interesante el estudio de este grupo de enzimas de gran abundancia en los venenos de las serpientes y con una amplia diversidad de isoformas con actividades igual de variables, tal como se observa en la Tabla 10 donde se hace alusión únicamente a las enzimas de este grupo aisladas del género *Lachesis*.

Tabla 10. Fosfolipasas A₂ aisladas de los venenos de las serpientes del género *Lachesis*

Espece	Nombre PLA ₂	Grupo	P. molecular (Da)	P. Isoeléctrico	Tipo	Actividad (es) - Observaciones	Autores, año
<i>Lachesis muta</i>	Parcialmente purificada	-	≈ 15,000	4.6 – 6.0	Ácida	Procoagulante, agregación plaquetaria, caseinolítica	Fuly <i>et al.</i> , 1993
<i>Lachesis muta</i>	LM- PLA ₂ - I	Asp-49	17,000	4.7	Ácida	Inhibición de agregación plaquetaria inducida por colágeno, hemolítica, miotóxica	Fuly <i>et al.</i> , 1997
<i>Lachesis muta muta</i>	MQL-1	-	14,100	-	Básica	Parcialmente purificada usando inhibidor de PLA ₂ aislado de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	Fortes-Dias <i>et al.</i> , 1999
<i>Lachesis muta muta</i>	MQL-2	-	23,400	-	Ácida	Parcialmente purificada usando inhibidor de PLA ₂ aislado de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	Fortes-Dias <i>et al.</i> , 1999
<i>Lachesis muta muta</i>	MQL-3	-	16,600	-	Ácida	Parcialmente purificada usando inhibidor de PLA ₂ aislado de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	Fortes-Dias <i>et al.</i> , 1999
<i>Lachesis muta muta</i>	MQL-4	-	23,400	-	Ácida	Parcialmente purificada usando inhibidor de PLA ₂ aislado de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	Fortes-Dias <i>et al.</i> , 1999
<i>Lachesis muta</i>	LM- PLA ₂ - II	Asp-49	18,000	5.4	Ácida	Inhibición de agregación plaquetaria inducida por colágeno y ADP, hemolítica, miotóxica	Fuly <i>et al.</i> , 2002
<i>Lachesis muta muta</i>	LmTX-I	Asp-49	14,245	8.7	Básica	Dependiente de calcio, bloqueo neuromuscular, aumenta la liberación de creatin cinasa, mionecrosis, degeneración de las fibras musculares	Damico <i>et al.</i> , 2005
<i>Lachesis muta muta</i>	LmTX-II	Asp-49	14,186	8.6	Básica	Dependiente de calcio	Damico <i>et al.</i> , 2005
<i>Lachesis stenphrys</i>	LsPA-1	-	13,870	4.95	Ácida	Similitud con las LmTX-I y II al compararlas	De Assis <i>et al.</i> , 2008
<i>Lachesis muta</i>	PLA ₂ BásicaL.muta	Asp-49	13,860	8.316	Básica	Hemolítica, miotóxica, edemática	Inga 2010
<i>Lachesis muta</i>	Lm- PLA ₂ -Perú	Asp-49	13,976	5.66	Ácida	Clonada a partir de transcrito de gen	Jimenez <i>et al.</i> , 2010
<i>Lachesis muta</i>	-	-	17,000	-	-	Aislada mediante un metodo adaptado de hemolisis indirecto, evidenciando actividad de hidrolisis de fosfatidilcolina	Campos <i>et al.</i> , 2012
<i>Lachesis muta rhombeata</i>	LmrTX	Asp-49	14,277	-	Básica	Actividad anticoagulante y antitrombotica	Damico <i>et al.</i> , 2012
<i>Lachesis muta rhombeata</i>	Lmr- PLA ₂	Asp-49	13,975	5.46	Ácida	Inhibición de agregación plaquetaria	Cordeiro <i>et al.</i> , 2015
<i>Lachesis muta muta</i>	LmutTX	Lys-49	13,889	-	-	Actividad antibacterial	Diniz-Sousa <i>et al.</i> , 2018

4.5 Citotoxicidad

Los derivados de moléculas aisladas del veneno de distintos animales han mostrado eficiencia sobre diferentes tipos de enfermedades humanas, como ejemplo la batroxobina y ziconotida son fuertemente usadas para el tratamiento del infarto cerebral agudo y los dolores crónicos intensos respectivamente (Pal *et al.*, 2002). Entre otros padecimientos, el cáncer es una de las causas principales de muerte en todo el mundo y aunque existe tratamiento, es necesario continuar con la investigación en biotecnología para poder encontrar una mayor eficacia en componentes de otro origen (Arruebo *et al.*, 2011). Actualmente existe un gran número de estudios que se encuentran en fases avanzadas de ensayos clínicos, estos estudios describen como la acción de péptidos de venenos pueden inducir efectos citotóxicos y apoptóticos en líneas celulares cancerígenas (Kerkkamp *et al.*, 2018).

En venenos de serpientes se han aislado citotoxinas con una alta importancia biotecnológica. Se han encontrado algunas que pueden alterar el metabolismo celular, actuando sobre receptores celulares específicos, dañando membranas celulares, bloqueando canales iónicos o las mismas vías de transducción de señales que estos involucran (Moga *et al.*, 2018). Dentro de las proteínas que se han reportado como prometedoras anticancerígenas, están incluidas las PLA₂ (citotoxicidad), LAOO (apoptóticas), SVMP (inhibidoras de la proliferación celular), CTL (citotoxicidad), DIS (antiangiogénicas), SVSP (inhibidoras del crecimiento tumoral), péptidos pequeños como la cardiotoxina III (antiangiogénicas) y citotoxinas P4, CT1, CT2, CT3 (Calderon *et al.*, 2014). Dependiendo del objetivo celular de estas toxinas, se relacionan con diferentes tipos de mecanismos, sea toxicológico o farmacológico (Tabla 11).

Tabla 11. Efectos toxicológicos y farmacológicos de las toxinas aisladas de venenos de serpientes y sus aplicaciones actuales. Modificado de Calderon et al., 2014

Efecto Tóxico	Efecto Farmacológico
Lesión celular endotelial Citotoxicidad Neurotoxicidad Hemorragia Miotoxicidad	Antitumoral Antiangiogénica Agentes contra enfermedades vasculares Antimicrobiana Reconocimiento de neuroreceptores

5 Justificación

Las mordeduras de serpientes se han convertido en un problema de salud pública con aproximadamente 150,000 reportes al año en Latinoamérica y 2,700,000 a nivel mundial, llegando a tal nivel que la Organización Mundial para la Salud en el 2017 las posicionó en la categoría A de enfermedades tropicales desatendidas. Pese al gran número de estos casos y de serpientes venenosas que existen a nivel mundial, el estudio bioquímico de los venenos se encuentra sesgado hacia las especies más comunes con alguna importancia médica. Debido a esto, se hace necesario la elaboración de trabajos para conocer los componentes del veneno de las especies que han sido poco estudiadas, posiblemente debido a la dificultad de acceso a sus hábitats, difícil manipulación o manutención. Es entonces esta la oportunidad de emprender el primer trabajo reportado de aislamiento, identificación y caracterización de fosfolipasas A₂ del veneno de *Lachesis acrochorda*.

6 Objetivos

6.1 Objetivo General

Aislar, identificar y caracterizar isoformas de fosfolipasas A₂ del veneno de *Lachesis acrochorda*.

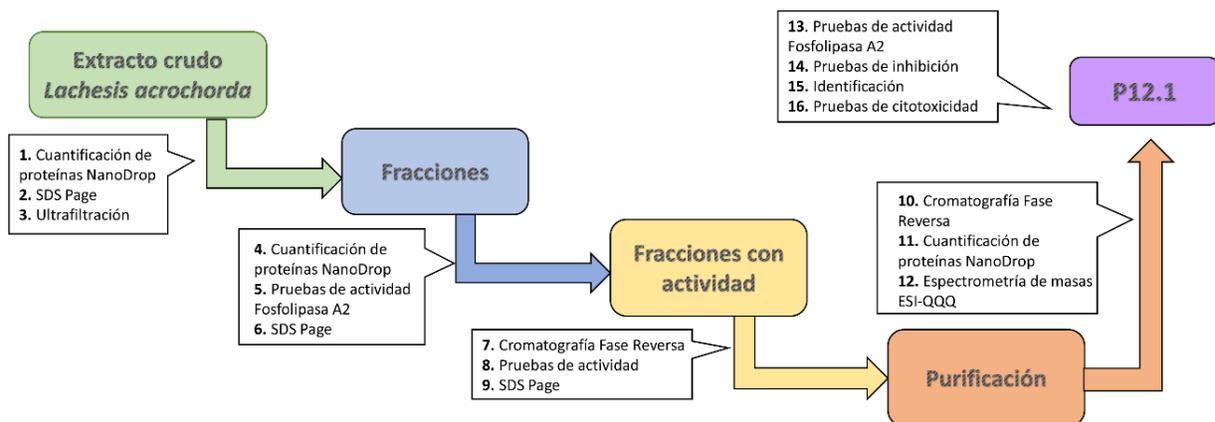
6.2 Objetivos Específicos

- Fraccionar y purificar los componentes del veneno, usando técnicas de ultrafiltración y cromatográfica líquida de alta resolución (HPLC)
- Determinar la actividad enzimática de fosfolipasa A₂ del veneno y las fracciones
- Determinar el peso molecular, punto isoeléctrico y dependencia de iones de las isoformas de PLA₂
- Identificar las isoformas de PLA₂ por espectrometría de masas (MS/MS)
- Evaluar la actividad del extracto y toxinas purificadas sobre líneas cancerígenas humanas.

7 Hipótesis

El veneno de la serpiente *Lachesis acrochorda* contiene isoformas de proteínas con actividad fosfolipasa A₂ similares a las reportadas, capaces de inhibir el crecimiento de líneas cancerosas humanas.

8 Materiales y Métodos



8.1 Extracción del material biológico



Figura 9. Área de estudio. Elaborado por Johana Molina Betancourth

La colecta del material biológico se realizó de una hembra adulta joven, capturado en el 2016 cerca al Río Samaná, en la región del magdalena medio en los límites con los municipios de Norcasia y Samaná del departamento de Caldas y de Sonsón del departamento de Antioquia ($5^{\circ}43'25''$ N - $74^{\circ}49'54''$ W), sobre la vertiente oriental de la cordillera central de Colombia, a una elevación de 264 metros sobre el nivel del mar (Figura 9). Al espécimen con una talla de 2.14 metros se le extrajo 5.7 mL de veneno por ordeño manual. Después del proceso de liofilizado el veneno total obtenido fue de 1.2 gramos.

8.2 Cuantificación de proteínas

Durante cada paso del proceso de purificación se realizó la cuantificación de proteínas mediante el equipo NanoDrop One de la marca Thermo Scientific, en el modo medición de proteínas a 280 nm.

8.3 Electroforesis SDS PAGE

Para conocer el intervalo de peso molecular de las proteínas que componen el veneno de *Lachesis acrochorda*, se realizó una electroforesis en gel al 10% de poliacrilamida del extracto crudo y 12.5% para de las fracciones con actividad de PLA₂ posteriormente separadas.

La técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS PAGE), se emplea para el monitoreo de proteínas durante procesos de purificación y la estimación de la masa molecular de proteínas con relación a un estándar (marcador de peso molecular). Para esta se carga las muestras en un gel polimerizado de acrilamida y bis-acrilamida, haciéndose pasar un campo eléctrico, que permite la migración de las proteínas a través del gel, este movimiento se da gracias a la relación entre masa y carga de cada proteína.

Para la muestra de extracto, la fracción obtenida por ultrafiltración y posterior cromatografía líquida de fase reversa se colocó en tubos plásticos en una proporción 4:1 muestra/amortiguador de carga (B-mercaptoetanol, azul de bromofenol, glicerol, 10% SDS, Tris-HCl pH 6.8) y se calentó a 95 °C por 5 minutos a baño de María. Cuando las muestras estuvieron nuevamente a temperatura ambiente, se cargaron un aproximado de 6 µg de la muestra en el carril correspondiente del gel. Como estándar de medida se usaron 4 µL de Accuruler RGB PLUS (Tris-Glicine 4~20%) con un intervalo de masas moleculares que va entre 11 kDa y 245 kDa. El experimento se corrió a 100 V por un aproximado de 2 horas y media.

8.4 Purificación del veneno

Los métodos de aislamiento y purificación de venenos pueden variar, puesto que dependen de las propiedades químicas y físicas de las moléculas con las que estemos trabajando. Dentro de las técnicas que más utilizan en estos procesos son electroforesis, cromatografía y ultrafiltración. Respecto a estas dos últimas, la ultrafiltración se basa en el proceso de filtración a través de membranas usando un gas de arrastre con el objetivo de separar y concentrar los componentes de una muestra en solución. Mientras que la cromatografía líquida, busca la separación de las moléculas a de una manera diferencial, a medida que estas pasan por una fase estacionaria con ayuda de una fase móvil.

8.4.1 Ultrafiltración

Durante el fraccionamiento del extracto, empleando el equipo de ultrafiltración Amicon8050®, se diluyó 20 mg de proteína en 1 mL y posteriormente se llevó a un volumen final de 50 mL de amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 8.5. Utilizando membranas de 30 kDa y 10 kDa de manera consecutiva para la separación por fracciones del veneno, donde la fracción de interés corresponde a la de 10-30 kDa.

8.4.2 Cromatografía de Fase Reversa

Se usó cromatografía líquida de fase reversa, cuyo principio consiste en la migración de componentes a través de una columna, donde son selectivamente retenidos por una fase estacionaria y eluidos de manera secuencial mediante un cambio de polaridad en la fase móvil. En esta técnica, la fase estacionaria es hidrofóbica y la fase móvil es polar (Esquivel & Leal, 2004). Para ello, se empleó un sistema HPLC Shimadzu SPD-10A, con detector UV/Vis SPD 10A junto con las columnas C18 marca Zorbax RX (4.6 mm x 250 mm, 5 µm) para la separación de la fracción de 10-30 kDa y una columna Zorbax Eclipse XDB (4.6 mm x 250 mm, 5 µm) para la recirculación de las fracciones. Para cada proceso se aplicaron diferentes gradientes de acetonitrilo-agua (0.1% TFA) para la elusión de la muestra, los cuales se pueden observar en la leyenda de cada cromatograma y fueron monitoreadas a 220 y 280 nm.

8.4.3 Pruebas de actividad

Las pruebas de actividad enzimática radiométricas y de fluorescencia permiten demostrar la existencia de una actividad con relación a un tipo específico de sustrato. Esta especificidad del sustrato se observa por medio de un marcaje que es detectado a través de espectrofluorimetría y así confirmar la actividad de la muestra que se esté trabajando.

8.4.3.1 Pruebas de actividad de Fosfolipasa A₂

Para la determinación de actividad de fosfolipasa A₂ de las muestras se usó el EnzChek® Phospholipase A₂ Assay Kit. Método fluorométrico que proporciona un monitoreo sensible y constante en tiempo real de la actividad de Fosfolipasa A₂. Se basa en la detección del aumento de la intensidad de fluorescencia por medio de un análisis radiométrico, que mide la transferencia de

energía de resonancia de fluorescencia independiente del sustrato, antes y después de la escisión producida por las enzimas presentes en el sustrato.

Siguiendo el protocolo establecido por el proveedor, se requiere un volumen total de 100 μL , donde 50 μL son de la muestra o control (diluida en el amortiguador de reacción) y los otros 50 μL del sustrato (mezcla de lípidos). Se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente, protegidas de la luz. Se determina la fluorescencia utilizando un lector de microplacas Synergy HT® con excitación a 450 nm y emisión de fluorescencia a 575 nm. Para el seguimiento de la cinética se hicieron lecturas en intervalos de tiempo durante una hora y el valor de actividad es determinado por punto final.

8.4.3.2 Pruebas inhibición de actividad de Fosfolipasa A₂

Para los ensayos de inhibición se realizó el mismo protocolo de los ensayos de actividad. Sin embargo, de los 50 μL correspondientes a la dilución de la muestra y amortiguador de reacción, fueron incluidos allí 10 μL de los agentes quelantes (EDTA y EGTA) a una concentración de 50 mM. Los correspondientes controles negativos en ausencia de la fracción, pero con el agente fueron realizados, así como el respectivo control positivo de actividad de la fracción. Este experimento se realizó por triplicado.

8.5 ESI - QQQ:

Respecto al análisis por espectrometría de masas de los componentes, se decidió utilizar la ionización por electrospray marca Agilent 6470 con analizador de triple cuadrupolo operado en modo positivo. Cuyo principio de ionización se basa en la introducción de un analito en solución a una cámara en que se controla la velocidad de flujo a través de un capilar, donde es sometida a un potencial eléctrico de entre 3-4 kV/cm. Por su parte el analizador cuadrupolar permite detectar los iones que atraviesan un espacio central entre las barras durante un cambio de voltaje, donde iones con un valor determinado de m/z no colisionan con las barras y así pasan el filtro cuadrupolar a través de un eje Z donde son detectados. El uso de esta técnica tiene como finalidad corroborar la existencia de la molécula con el peso molecular de interés y a su vez conocer el grado de pureza de la muestra.

8.6 Identificación por espectrometría de masas (MS/MS)

Las muestras de proteína se sometieron a digestión con tripsina y posteriormente, los péptidos obtenidos se analizaron por espectrometría de masas nano-LC-MS/MS mediante un muestreador automático Finnigan MicroAS y un sistema de bombeo Surveyor Ms acoplado a un LTQ-Orbitrap de la marca Thermo Fisher Scientific.

Los resultados de MS/MS se analizaron utilizando el software Mascot (Matrix Science, London, UK; versión Mascot in Proteome Discoverer 2.4.0.305). Mascot se configuró para buscar UniProt_Serpentes, asumiendo como enzima de digestión a tripsina. La búsqueda se hizo con una tolerancia en masa de fragmentos de iones de 0.60 Da. Se seleccionó la carbamidometilación de residuos de cisteína como una modificación fija y la oxidación de la metionina se especificó como una modificación variable.

Para la validación de la identificación de los péptidos y proteínas basadas en MS/MS se utilizó Scaffold (Versión Scaffold_5.0.0, Proteome Software Inc., Portland, OR). Se aceptaron las identificaciones de péptidos si podían establecerse con una probabilidad superior al 95.0% mediante el algoritmo Peptide Prophet (Keller *et al.*, 2002) con corrección de masa delta de Scaffold. Así mismo se aceptaron las identificaciones de proteínas si podían establecerse con una probabilidad de 99.0%. Las probabilidades para proteínas se asignaron utilizando el algoritmo Protein Prophet (Nesvizhskii *et al.*, 2003), con una tasa de falsos positivos (FDR) inferior al 0.5%.

8.7 Actividad inhibitoria del crecimiento de líneas celulares de cáncer de humano

El ensayo de sulforodamina B (SRB) se basa en la capacidad de SRB de unirse a componentes proteicos de las células que anteriormente fueron fijadas con ácido tricloroacético (TCA). El SRB, es un colorante aminoxantano de color rosa brillante que posee dos grupos sulfónicos encargados de unirse a los residuos básicos de aminoácidos en condiciones ácidas suaves. La unión del SRB es estequiométrica, la cantidad de colorante presente en las células es directamente proporcional a la masa celular. Esta tinción es muy estable y altamente sensible, con un menor número de interferencias con relación a otros, con una absorbancia a 564 nm.

Para este estudio, se utilizó la técnica estandarizada por el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos propuesta por Skehan y colaboradores en 1990. Las líneas celulares usadas para probar la actividad fueron: U251 de glía de sistema nervioso central, PC-3 de próstata, K562 de leucemia, HCT-15 de colon, MCF-7 de mama y SKLU-1 de pulmón.

Finalmente, el porcentaje de inhibición del crecimiento celular (% IC) se calculó haciendo uso de la ecuación:

$$\%IC = 100 - \left(\frac{DOt - DOb}{DOc - DOb} \right) \times 100$$

Donde:

DOt: promedio de pozos tratados con muestra

DOc: promedio de pozos tratados con DMSO

DOb: promedio de pozos testigo (sin células)

9 Resultados y discusión

9.1 Cuantificación de proteínas extracto total

De 20 mg de extracto crudo disueltos en 1.0 mL de buffer Tris-HCl 20mM pH 8.5, se obtuvo una concentración de 17.58 mg/mL, lo que corresponde al 87.91% de proteína. Para ver el patrón de pesos moleculares aproximados y la complejidad de la muestra se realizó gel de poliacrilamida SDS PAGE (Figura 10) del extracto.

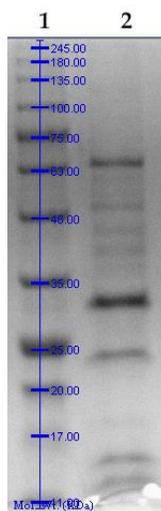


Figura 10. Gel de poliacrilamida SDS PAGE 10%. En el carril 1 se observan los marcadores de masa conocida. En el carril 2 se observan las proteínas presentes en el extracto crudo.

Claramente se observan proteínas cuyo peso molecular oscila entre los 11 kDa hasta un aproximado de 135 kDa, donde el mayor porcentaje de estas proteínas se encuentran por encima de los 20 kDa. De acuerdo con lo reportado con respecto al género *Lachesis* (Tasoulis & Isbister, 2017) donde existe abundancia de proteínas de alto peso molecular como **SVSP**, **SVMP**, **LAAO**, **CRIPS**, **CTL** y menor abundancia para **PLA₂** y diferentes péptidos relacionados con bajos pesos moleculares.

9.2 Ultrafiltración

Tras el paso por ultrafiltración a través de membranas de 30 y 10 kDa de manera consecutiva, se obtuvieron tres fracciones: la fracción con proteínas con masas entre 10 y 30 kDa corresponde al 37.65% de las proteínas presentes en el extracto (6.62 mg). En esta fracción se detectó la mayor actividad de PLA₂ (Figura 11). El 62.35% restante comprende a proteínas cuyas masas son mayores a 30 kDa y las menores a 10 kDa.

9.3 Prueba de actividad de PLA₂ para extracto crudo y fracción 10-30 kDa

Con base en el protocolo establecido por el proveedor para la prueba de actividad de PLA₂, se realizó el ensayo EnzChek® Phospholipase A₂ Assay Kit tanto para el extracto crudo, como para la fracción de interés (Figura 11). El aumento en la fluorescencia que se observa en la gráfica indica la hidrólisis del sustrato. Esto confirma la actividad del extracto crudo y la fracción 10-30 kDa de PLA₂, actividad que se puede ser comparada con el control positivo (PLA₂ de veneno de abeja) y a su vez con la ausencia de dicha actividad en el control negativo (dato no mostrado). El resultado de las pruebas de actividad indica la presencia de PLA₂ (Tabla 12). La masa de estas enzimas oscila entre 13 kDa y 21 kDa para proteínas que forman dímeros.

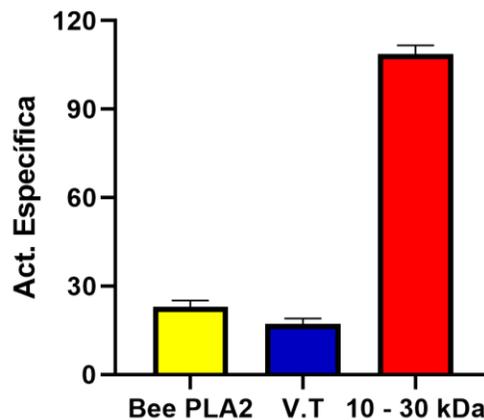


Figura 11. Prueba de actividad PLA₂. El control positivo (PLA₂ de veneno de abeja) se muestra en amarillo, el extracto crudo en azul y la fracción con proteínas con masas entre 10-30 kDa en rojo. Para el ensayo se utilizó el kit - EnzChek® Phospholipase A₂ Assay. Los valores representan la media de las tres réplicas. Se reportan los errores estándar.

9.4 RP-HPLC, SDS-PAGE y prueba de actividad en la fracción 10-30 kDa

Para la purificación de la fracción con actividad de PLA₂ se realizó una cromatografía líquida de fase reversa usando una columna C18. Se obtuvieron 20 fracciones que se presentan en el cromatograma a continuación. Adicional a ello, la fracción se cargó en un gel de electroforesis SDS PAGE al 12.5%, el cual permitió ver proteínas con masas entre los 9 y 35 kDa (Figura 12).

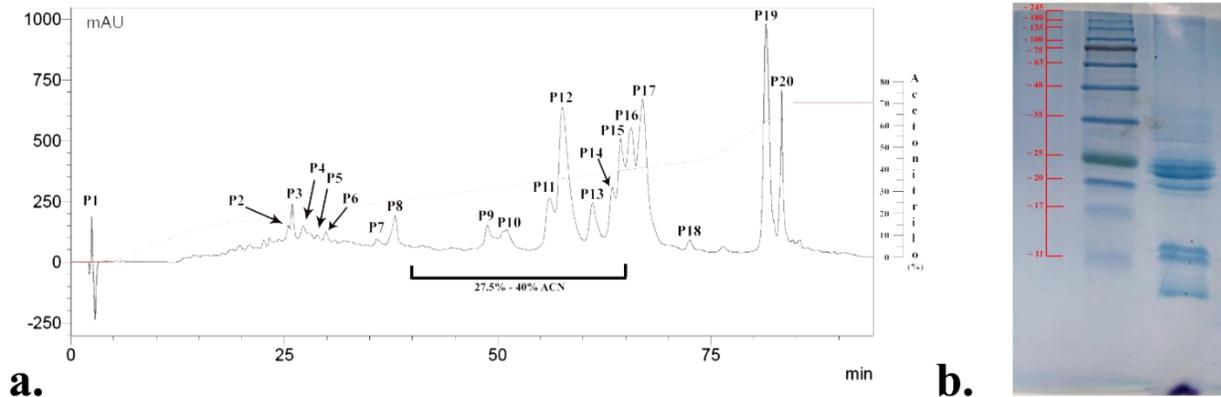


Figura 12. Caracterización cromatográfica y electroforética de la fracción con masas entre 10-30 kDa. **a.** Cromatografía líquida de fase reversa utilizando el gradiente señalado en la imagen con una línea roja, fases móviles mQH₂O + 0.1% TFA y Acetonitrilo + 0.1% TFA, columna C18 marca Zorbax RX (4.6 mm x 250 mm) y un monitoreo a 220 nm. **b.** Gel de electroforesis SDS PAGE 12.5%, el carril 1 corresponde a los estándares de masa conocida y el carril 2 a la fracción de proteínas con masas entre 10 – 30 kDa.

Mackessy en el 2008 utilizó geles SDS PAGE como propuesta para identificar los componentes de los venenos de serpiente. Teniendo en cuenta el análisis electroforético realizado y lo reportado por el autor, se observaron tres grupos de bandas. El primero entre 20–25 kDa podrían corresponder a metaloproteasas y proteasas serínicas del grupo I; el segundo dos bandas cercadas a 13 kDa que corresponderían a PLA₂ y la tercera una banda con un peso molecular >10 kDa que podría corresponder a una desintegrina. Las bandas ~13 kDa están relacionadas a los pesos moleculares reportados en la literatura para las PLA₂ en el género (Tabla 10). Hecho que se confirma con los valores de actividad específica de PLA₂ obtenidos de la fracción (Tabla 12).

En el caso de la fase reversa, Lomonte y Gutierrez en el 2017 sugieren que haciendo seguimiento del protocolo establecido por ellos (mismo usado durante este paso), la elusión de las PLA₂ será entre el 27.5% y el 45% de acetonitrilo (intervalo señalado en el cromatograma). Lo que se pudo constatar tras realizar la prueba de actividad de PLA₂ a las fracciones seleccionadas.

Se determinó que P8, P9, P10, P15, P19 y P20 no poseen de PLA₂; P14 y P16 tiene una actividad baja. Mientras que P11, P12 y P13 mostraron una alta actividad (Figura 13, Tabla 12). La ausencia de esta actividad en las otras fracciones puede corresponder a la existencia de algunas proteínas de mediano y alto peso molecular (proteasas serínicas, L-amino oxidasas ácidas, lectinas tipo C).

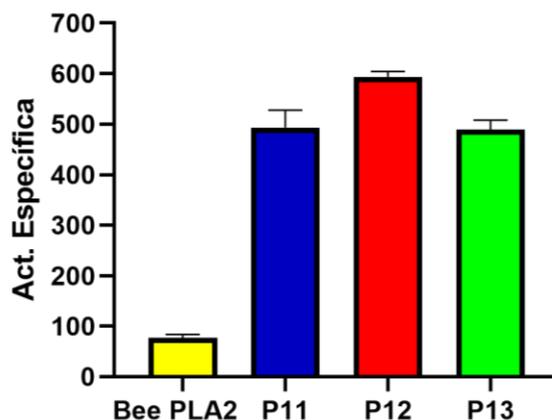


Figura 13. Prueba de actividad PLA₂ P11, P12 y P13. El control positivo (PLA₂ de veneno de abeja) se muestra en amarillo, la fracción P11 en azul, la fracción P12 en rojo y la fracción P13 en verde. Para el ensayo se utilizó el kit - EnzChek® Phospholipase A₂ Assay. Los valores representan la media de las tres réplicas. Se reportan los errores estándar.

En comparación con los valores obtenidos de la prueba de actividad del extracto crudo, con relación a la hidrólisis del sustrato (Tabla 12), se observaron variaciones dentro de los valores de las fracciones, donde se evidencia una elevada actividad en P11, P12 y P13. En conjunto explican la elevada actividad de fosfolipasa de la fracción 10-30 kDa. Algo característico en los venenos de serpientes ya que es común la presencia de múltiples PLA₂s en un mismo veneno con diferentes niveles de actividad catalítica, así como diferentes actividades biológicas y su vez estas se encuentran involucradas en diferentes procesos fisiopatológicos desencadenados por la mordedura del animal, como mecanismo de predación o defensa.

9.5 Recirculación de fracción P12

Posteriormente se decidió trabajar con la fracción P12 al tener el valor más alto de actividad hacia el grupo de interés (Tabla 12). Se realizó un gel SDS PAGE de la fracción para corroborar la existencia de biomoléculas con un peso molecular aproximado de los componentes al de los componentes de interés (Figura 14).

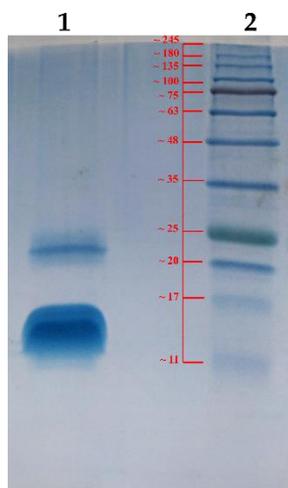


Figura 14. Gel de electroforesis SDS PAGE al 12.5% fracción P12. En el carril 1 se observan los componentes de la fracción P12. En el carril 2 los marcadores de masa conocida.

Los resultados de la carga de la fracción P12 en el gel de electroforesis muestran dos componentes, uno de mediano y otro de bajo peso molecular. Después de ser analizados en el software GelAnalyzer, se obtuvieron los valores aproximados de 24341.02 Daltons para el de mediano peso molecular y 13069.81 Daltons para el de bajo peso molecular. La regresión de los datos obtiene un $R^2 = 0.9359$.

La fracción se sometió a un segundo paso de purificación por fase reversa utilizando otra columna C18 y una modificación en la metodología como se puede observar en la Figura 15, seguido de la corroboración de actividad específica de la fracción.

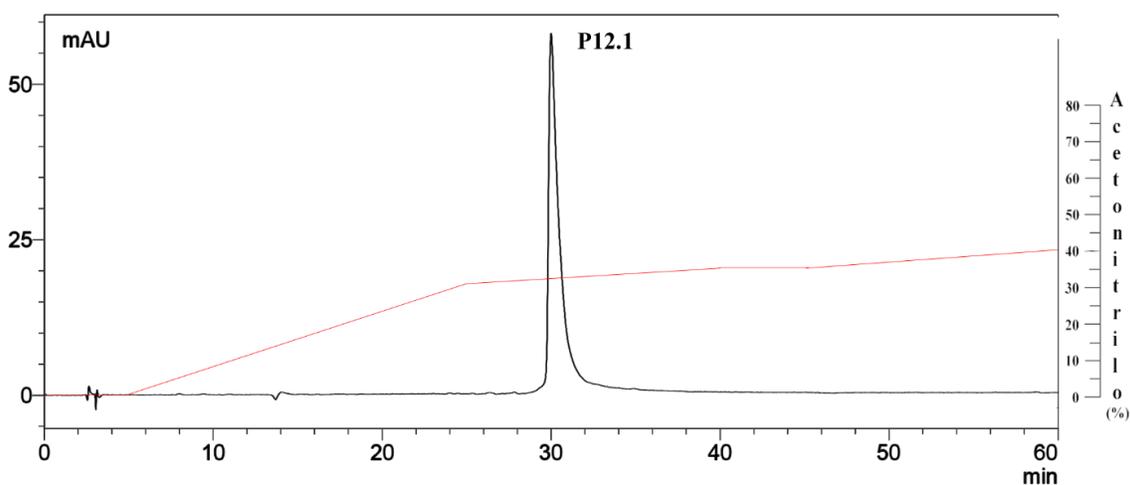


Figura 15. Cromatografía líquida de fase reversa de la fracción P12. Columna Zorbax XDB C18 4.6 x 250 mm con monitoreo a 280 nm, fases móviles mQH₂O +0.1% TFA y ACN +0.1% TFA. El gradiente se observa con una línea roja.

Los resultados de actividad de PLA₂ para la fracción se muestran en la Tabla 12. El incremento en la actividad específica en comparación con las fracciones previas de las cuales fue aislada P12.1, se puede explicar con el aumento en el grado de pureza de la fracción al ir eliminando componentes interferentes a través de los pasos de ultrafiltración y cromatografía, así como la separación de biomoléculas con actividad proteolítica que pudieran estar degradando las PLA₂. Esta explicación se puede observar de manera clara en el proceso de purificación de la fracción, donde un veneno total, con un elevado número de componentes proteicos y no proteicos capaces de interferir y disminuir la fluorescencia en los ensayos de actividad arrojaron valores de actividad específica más bajos que la fracciones después de los tres pasos de purificación.

Tabla 12. Actividad de fluorescencia y actividad específica de PLA₂ del control positivo y las fracciones.

	Actividad de fluorescencia UA= UF/t *	Actividad específica de Fosfolipasa A₂ AE= UA/μg
C(+) PLA₂ V. Abeja	383.3 ± 36.2	23.0 ± 2.2
V.T	259.4 ± 26.7	17.3 ± 1.8
10-30 kDa	1141.1 ± 116.1	102.9 ± 10.5
P11	602.6 ± 62.9	468.8 ± 48.9
P12	831.2 ± 50.5	573.8 ± 34.9
P13	740.8 ± 64.4	272.9 ± 59.3
P12.1	908.0 ± 21.9	583.0 ± 14.1

* Una unidad de actividad se define como la número de fosfolípidos que es capaz de hidrolizar la proteína en un intervalo de tiempo. Esta hidrólisis se mide por la liberación de fluoróforos del sustrato.

Para determinar el grado de pureza y/o complejidad de la fracción P12.1, se realizó un análisis de espectrometría de masas ESI-QQQ (Figura 16). Las masas moleculares determinadas son similares algunas PLA₂ reportadas para el género por diferentes autores (Cordeiro *et al.*, 2015; Damico *et al.*, 2005, 2012; de Assis *et al.*, 2008; Diniz-Sousa *et al.*, 2018; Inga Arellano, 2010; Jimenez *et al.*, 2010). Isoformas de PLA₂ son muy frecuentes en venenos de serpientes, especies como *Naja naja*, *Pseudechis australis* y *Trimeresurus favoviridis*, contienen altos números de las mismas con características bioquímicas y biológicas distintas (Braganca & Sambray, 1967; Ogawa *et al.*, 1992; Takasaki *et al.*, 1990).

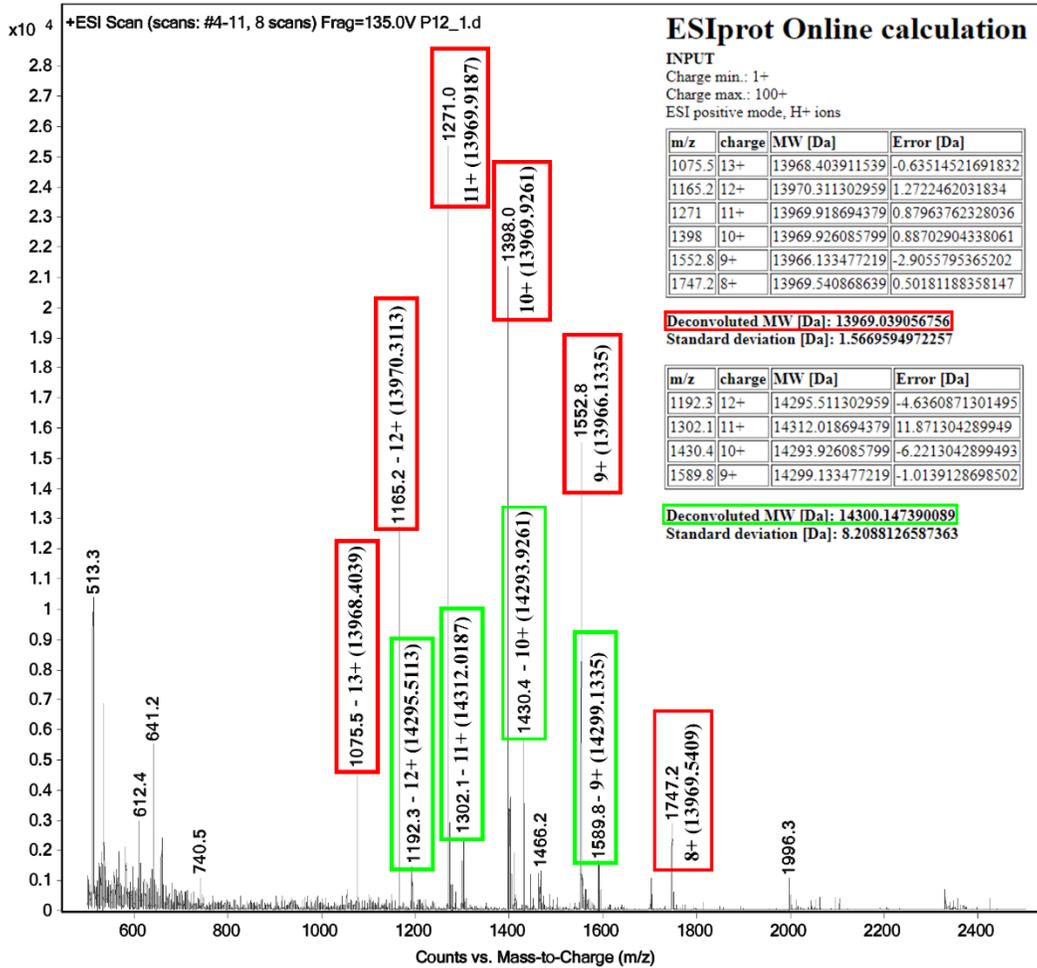


Figura 16. Espectro de masas ESI-QQQ de la fracción P12.1.

En particular para el género *Lachesis*, Fortes-Dias y colaboradores 1999 aislaron cuatro PLA₂ del veneno de *L. muta muta*, lo que concuerda con lo encontrado en la fracción P12.1, donde se observa una fracción en la que existen mínimo dos masas moleculares relacionadas a isoformas de PLA₂ con diferencia de 231 Da, lo que correspondería aproximadamente a dos amino ácidos. Similar a lo encontrado en trabajos previos, donde se caracterizaron varias isoformas con variaciones mínimas en su secuencia de aminoácidos, pero con diferencias en sus actividades (Damico *et al.*, 2005; Fuly *et al.*, 2002; Inga Arellano, 2010).

Al observar las masas moleculares y la complejidad de la fracción, se decidió realizar un gel de poliacrilamida bidimensional (Figura 17).

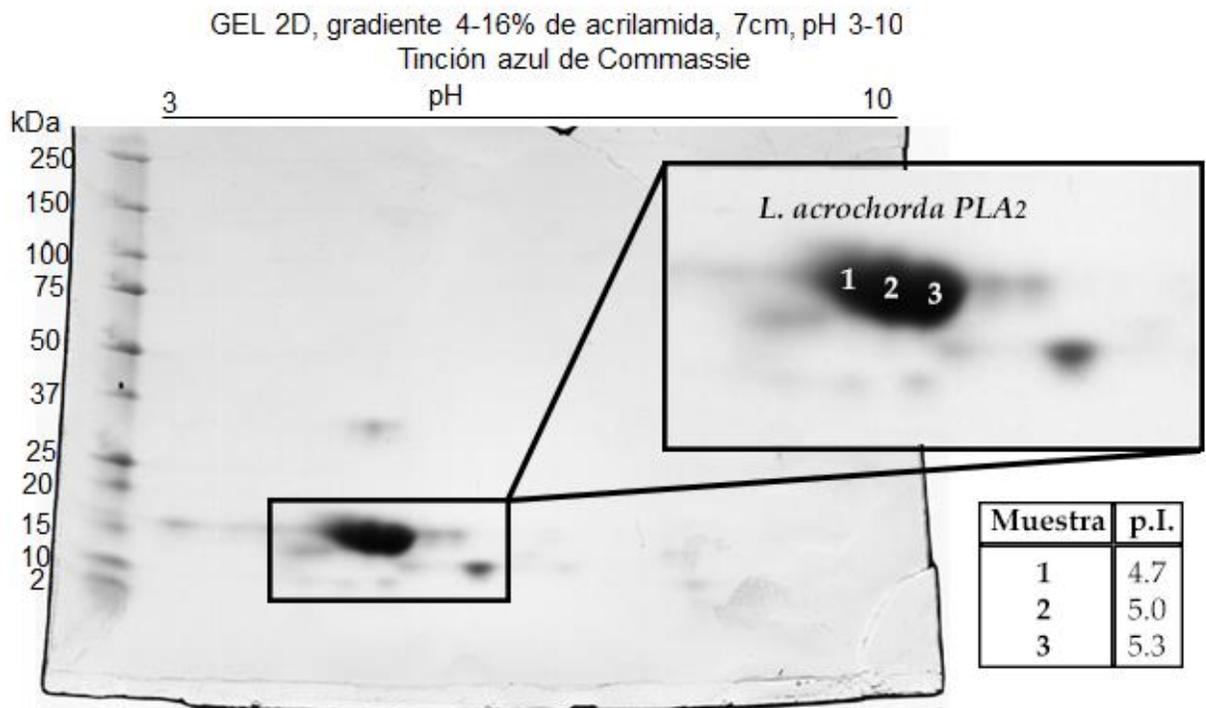


Figura 17. Gel 2D, gradiente 4-16% de acrilamida, 7 cm, pH 3-10. Tinción azul de Coomassie. De izquierda a derecha se observan los marcadores de masas conocidas y los componentes correspondientes a Spot 01, Spot 02 y Spot 03 con sus respectivos puntos isoeléctricos aproximados.

El análisis de los resultados del gel bidimensional nos permitió identificar biomoléculas semejantes a los pesos moleculares observados en la espectrometría de masas (Figura 16), corroborando lo dicho por Kini en el 2003 con relación a los problemas de co-elución que las isoenzimas de PLA₂ suelen presentar en procesos de purificación debido altos niveles de similitud en los pesos moleculares, puntos isoeléctricos e incluso secuencias amino terminales. Como es el caso de los componentes de la fracción, los cuales presentaron pesos moleculares y puntos isoeléctricos similares.

Para el proceso de purificación de la PLA₂ se usaron 3 pasos. La cantidad de proteína, la actividad específica, el grado de pureza y el porcentaje de rendimiento durante cada paso purificación se pueden observar en la Tabla 13.

Tabla 13. Resumen de purificación de la PLA₂.

Muestra	Proteína Total (mg)	Unidades de Actividad (UF final – UF inicial) / Tiempo	Actividad específica (AF/μg de proteína)	Grado de Pureza	Rendimiento (%)
Veneno total	17.582	259.4	17.3	1	100
10 – 30 kDa	6.620	1141.1	102.9	5.9	37.65
P12	0.1722	831.2	573.8	33.2	0.98
P12.1	0.1072	908.0	583.0	33.7	0.61

9.6 Identificación de proteínas

Las componentes del gel bidimensional se cortaron y se sometieron a digestión con tripsina para su identificación por espectrometría de masas (MS/MS). La masa molecular y la secuencia respectiva de los péptidos se presentan en la Tabla 14 para L.acro PLA₂-01, en la Tabla 15 para L.acro PLA₂-02 y en la Tabla 16 para L.acro PLA₂-03.

Utilizando el programa Scaffold 5.0 se comparó los péptidos trípticos obtenidos contra las proteínas reportadas para el suborden Serpentes en la base de datos UniProt y se corroboró que corresponden a PLA₂. Las secuencias de proteínas que mayor cobertura mostraron fueron: una PLA₂ ácida de purificada de *Lachesis stenophrys* por De Assis *et al.*, 2008 para L.acro PLA₂-01 (Tabla 14) y una PLA₂ putativa de *Lachesis muta* clonada por Jimenez *et al.*, 2010 para L.acro PLA₂-02 y 03 (Tabla 15 y 16). Estos resultados confirman lo dicho por Madrigal y colaboradores en el 2012 con relación al “Síndrome Lachesico” y la conservación en la composición de los venenos de las serpientes del género, muy importante ya que esto implicaría que los perfiles farmacológicos de los envenenamientos por mordeduras de estas especies pudieran ser muy similar. Sin embargo, no necesariamente es así y debido a que la variación de unos pocos residuos de aminoácidos en algunas familias proteicas como es el caso de las PLA₂, genera una diversidad enorme de isoformas de estas dentro de los venenos de las especies y por ende variedad en sus actividades. Un claro ejemplo es lo reportado en el mismos estudio, donde en el análisis proteómico del veneno de *L. acrochorda*, identificaron una sola PLA₂ que al compararla con este trabajo comparte un péptido altamente conservado para las PLA₂ con las tres isoformas identificadas (datos no mostrados).

Tabla 14. Alineamiento de la proteína PA2A_LACST con los péptidos trípticos identificados en *Lacro PLA₂-01*. La información de la proteína identificada, así como su correspondiente secuencia y porcentaje de cobertura de los péptidos en esta se observan en la parte superior. Los resultados del análisis de espectrometría de masas (MS/MS) correspondientes a péptidos, sus respectivas masas moleculares y cuentas peptídicas se muestran en la parte inferior.

L.acro PLA₂-01

UniProtKB ID: P84651 (PA2A_LACST)
Proteína: Fosfolipasa A2 ácida
Organismo: *Lachesis stenophrys*
Masa molecular: 13901.9
% de cobertura: 97/122 aminoácidos = 80%

Secuencia + cobertura:
HLLQFGDLID KIAGR SGFWY YGFYGCYCGL
GGR GRPQDAT DRCCFV HDCC Y GKVTGCDPK
KDIYTYSEEN GAIVCGGDNP CKKEICECDR
DAAICFRDNL DTYDNKYWLF PNKYCKEES
PC

Masa molecular	Secuencia derivada de MS/MS	Cuentas peptídicas
1297.70 Da	HLLQFGDLIDK	3
1694.95 Da	HLLQFGDLIDKIAGR	1
1014.48 Da	GRPQDATDR	22
2501.01 Da	GRPQDATDRCCFVHDCCYGK	5
3258.36 Da	GRPQDATDRCCFVHDCCYGKVTGCDPK	4
1504.54 Da	CCFVHDCCYGK	27
2261.88 Da	CCFVHDCCYGKVTGCDPK	2
3246.40 Da	VTGCDPKKDIYTYSEENGAIVCGGDNPCK	1
1108.46 Da	KEICECDR	4
1941.85 Da	KEICECDRDAAICFR	6
1813.75 Da	EICECDRDAAICFR	63
2892.21 Da	EICECDRDAAICFRDNLDTYDNK	4
1929.86 Da	DAAICFRDNLDTYDNK	9
1096.47 Da	DNLDTYDNK	12
1200.44 Da	YCKEESPC	5
Total cuentas peptídicas		168

Tabla 15. Alineamiento de la proteína D3IVZ4_L4CMT con los péptidos trópticos identificados en *L.acro PLA₂-02*. La información de la proteína identificada, así como su correspondiente secuencia y porcentaje de cobertura de los péptidos en esta se observan en la parte superior. Los resultados del análisis de espectrometría de masas (MS/MS) correspondientes a péptidos, sus respectivas masas moleculares y cuentas peptídicas se muestran en la parte inferior.

L.acro PLA₂-02		
UniProtKB ID:	D3IVZ4 (D3IVZ4_L4CMT)	
Proteína:	Fosfolipasa A2	
Organismo	<i>Lachesis muta</i>	
Masa molecular:	13744.8	
% de cobertura:	84/120 aminoácidos = 70%	
Secuencia + cobertura:	<pre> M Q F G D L I N K I A R R N G I L Y Y S F Y G C Y C G L G G R G R P Q D A T D R C C F V H D C C Y G K V T G C N P K N D I Y T Y S E E N G A I V C G G D N P C K K E I C E C D R D A A I C F R D N L D T Y D N K Y W F L P R K Y C K E E S E P C </pre>	
Masa molecular	Secuencia derivada de MS/MS	Cuentas peptídicas
933.49 Da	QFGDLINK	1
1014.49 Da	GRPQDATDR	19
2501.01 Da	GRPQDATDRCCFVHDCYGK	5
1504.54 Da	CCFVHDCYGK	43
2475.03 Da	NDIITYSEENGAIVCGGDNPCK	27
2603.12 Da	NDIITYSEENGAIVCGGDNPCKK	139
1108.47 Da	KEICECDR	2
1941.85 Da	KEICECDRDAAIICFR	6
1813.75 Da	EICECDRDAAIICFR	85
2892.21 Da	EICECDRDAAIICFRDNLDTYDNK	5
1929.85 Da	DAAIICFRDNLDTYDNK	9
1096.47 Da	DNLDTYDNK	12
1328.54 Da	KYCKEESGPC	28
1200.44 Da	YCKEESGPC	11
	Total cuentas peptídicas	392

Tabla 16. Alineamiento de la proteína D3IVZ4_L4CMT con los péptidos trópticos identificados en *L.acro PLA₂-03*. La información de la proteína identificada, así como su correspondiente secuencia y porcentaje de cobertura de los péptidos en esta se observan en la parte superior. Los resultados del análisis de espectrometría de masas (MS/MS) correspondientes a péptidos, sus respectivas masas moleculares y cuentas peptídicas se muestran en la parte inferior.

L.acro PLA₂-03																																																																																																																										
UniProtKB ID:	D3IVZ4 (D3IVZ4_L4CMT)																																																																																																																									
Proteína:	Fosfolipasa A2																																																																																																																									
Organismo	<i>Lachesis muta</i>																																																																																																																									
Masa molecular:	13744.8																																																																																																																									
% de cobertura:	84/120 aminoácidos = 70%																																																																																																																									
Secuencia + cobertura:	<table style="border-collapse: collapse; margin-left: 20px;"> <tr> <td style="padding: 2px;">M</td><td style="padding: 2px;">Q</td><td style="padding: 2px;">F</td><td style="padding: 2px;">G</td><td style="padding: 2px;">D</td><td style="padding: 2px;">L</td><td style="padding: 2px;">I</td><td style="padding: 2px;">N</td><td style="padding: 2px;">K</td><td style="padding: 2px;">I</td><td style="padding: 2px;">A</td><td style="padding: 2px;">R</td><td style="padding: 2px;">R</td><td style="padding: 2px;">N</td><td style="padding: 2px;">G</td><td style="padding: 2px;">I</td><td style="padding: 2px;">L</td><td style="padding: 2px;">Y</td><td style="padding: 2px;">Y</td><td style="padding: 2px;">S</td><td style="padding: 2px;">F</td><td style="padding: 2px;">Y</td><td style="padding: 2px;">G</td><td style="padding: 2px;">C</td><td style="padding: 2px;">Y</td><td style="padding: 2px;">C</td><td style="padding: 2px;">G</td><td style="padding: 2px;">L</td><td style="padding: 2px;">G</td><td style="padding: 2px;">G</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">R</td><td style="padding: 2px;">G</td><td style="padding: 2px;">R</td><td style="padding: 2px;">P</td><td style="padding: 2px;">Q</td><td style="padding: 2px;">D</td><td style="padding: 2px;">A</td><td style="padding: 2px;">T</td><td style="padding: 2px;">D</td><td style="padding: 2px;">R</td><td style="padding: 2px;">C</td><td style="padding: 2px;">C</td><td style="padding: 2px;">F</td><td style="padding: 2px;">V</td><td style="padding: 2px;">H</td><td style="padding: 2px;">D</td><td style="padding: 2px;">C</td><td style="padding: 2px;">C</td><td style="padding: 2px;">Y</td><td style="padding: 2px;">G</td><td style="padding: 2px;">K</td><td style="padding: 2px;">V</td><td style="padding: 2px;">T</td><td style="padding: 2px;">G</td><td style="padding: 2px;">C</td><td style="padding: 2px;">N</td><td style="padding: 2px;">P</td><td style="padding: 2px;">K</td><td style="padding: 2px;">N</td><td style="padding: 2px;">D</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">I</td><td style="padding: 2px;">Y</td><td style="padding: 2px;">T</td><td style="padding: 2px;">Y</td><td style="padding: 2px;">S</td><td style="padding: 2px;">E</td><td style="padding: 2px;">E</td><td style="padding: 2px;">N</td><td style="padding: 2px;">G</td><td style="padding: 2px;">A</td><td style="padding: 2px;">I</td><td style="padding: 2px;">V</td><td style="padding: 2px;">C</td><td style="padding: 2px;">G</td><td style="padding: 2px;">G</td><td style="padding: 2px;">D</td><td style="padding: 2px;">N</td><td style="padding: 2px;">P</td><td style="padding: 2px;">C</td><td style="padding: 2px;">K</td><td style="padding: 2px;">K</td><td style="padding: 2px;">E</td><td style="padding: 2px;">I</td><td style="padding: 2px;">C</td><td style="padding: 2px;">E</td><td style="padding: 2px;">C</td><td style="padding: 2px;">D</td><td style="padding: 2px;">R</td><td style="padding: 2px;">D</td><td style="padding: 2px;">A</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td><td style="padding: 2px;">I</td><td style="padding: 2px;">C</td><td style="padding: 2px;">F</td><td style="padding: 2px;">R</td><td style="padding: 2px;">D</td><td style="padding: 2px;">N</td><td style="padding: 2px;">L</td><td style="padding: 2px;">D</td><td style="padding: 2px;">T</td><td style="padding: 2px;">Y</td><td style="padding: 2px;">D</td><td style="padding: 2px;">N</td><td style="padding: 2px;">K</td><td style="padding: 2px;">Y</td><td style="padding: 2px;">W</td><td style="padding: 2px;">F</td><td style="padding: 2px;">L</td><td style="padding: 2px;">P</td><td style="padding: 2px;">R</td><td style="padding: 2px;">K</td><td style="padding: 2px;">Y</td><td style="padding: 2px;">C</td><td style="padding: 2px;">K</td><td style="padding: 2px;">E</td><td style="padding: 2px;">E</td><td style="padding: 2px;">S</td><td style="padding: 2px;">E</td><td style="padding: 2px;">P</td><td style="padding: 2px;">C</td> </tr> </table>		M	Q	F	G	D	L	I	N	K	I	A	R	R	N	G	I	L	Y	Y	S	F	Y	G	C	Y	C	G	L	G	G	R	G	R	P	Q	D	A	T	D	R	C	C	F	V	H	D	C	C	Y	G	K	V	T	G	C	N	P	K	N	D	I	Y	T	Y	S	E	E	N	G	A	I	V	C	G	G	D	N	P	C	K	K	E	I	C	E	C	D	R	D	A	A	I	C	F	R	D	N	L	D	T	Y	D	N	K	Y	W	F	L	P	R	K	Y	C	K	E	E	S	E	P	C
M	Q	F	G	D	L	I	N	K	I	A	R	R	N	G	I	L	Y	Y	S	F	Y	G	C	Y	C	G	L	G	G																																																																																													
R	G	R	P	Q	D	A	T	D	R	C	C	F	V	H	D	C	C	Y	G	K	V	T	G	C	N	P	K	N	D																																																																																													
I	Y	T	Y	S	E	E	N	G	A	I	V	C	G	G	D	N	P	C	K	K	E	I	C	E	C	D	R	D	A																																																																																													
A	I	C	F	R	D	N	L	D	T	Y	D	N	K	Y	W	F	L	P	R	K	Y	C	K	E	E	S	E	P	C																																																																																													
Masa molecular	Secuencia derivada de MS/MS	Cuentas peptídicas																																																																																																																								
933.49 Da	QFGDLINK	2																																																																																																																								
1014.48 Da	GRPQDATDR	25																																																																																																																								
2501.01 Da	GRPQDATDRCCFVHDCCYGK	10																																																																																																																								
1504.54 Da	CCFVHDCCYGK	47																																																																																																																								
2475.03 Da	NDIYTYSEENGAIVCGGDNPCK	39																																																																																																																								
2603.13 Da	NDIYTYSEENGAIVCGGDNPCKK	152																																																																																																																								
1108.46 Da	KEICECDR	3																																																																																																																								
1941.85 Da	KEICECDRDAAICFR	6																																																																																																																								
1813.76 Da	EICECDRDAAICFR	83																																																																																																																								
2892.21 Da	EICECDRDAAICFRDNLDTYDNK	9																																																																																																																								
1929.85 Da	DAAICFRDNLDTYDNK	10																																																																																																																								
1096.47 Da	DNLDTYDNK	9																																																																																																																								
1328.54 Da	KYCKEESPC	27																																																																																																																								
1200.44 Da	YCKEESPC	9																																																																																																																								
Total cuentas peptídicas		431																																																																																																																								

Las secuencias de los tres componentes se alinearon junto con las PLA₂ ya mencionadas y se encontró que comparten 81 aminoácidos de 122 posibles del total de la secuencia obtenida, lo que corresponde a un 66,4% de similitud. En la Figura 18 se presentan los aminoácidos compartidos en color gris y se observan altos niveles de conservación en aminoácidos involucrados en la estabilidad, actividad enzimática y unión a calcio, no solo en comparación con las dos PLA₂ aquí reportadas, sino también con lo demostrado por Oliveira y colaboradores en el 2018 respecto a las cisteínas formadoras de puentes disulfuro, los residuos de histidina, lisina y aspartato que conforman el sitio activo y el residuo de aspartato principal residuo relacionado con la unión a calcio.

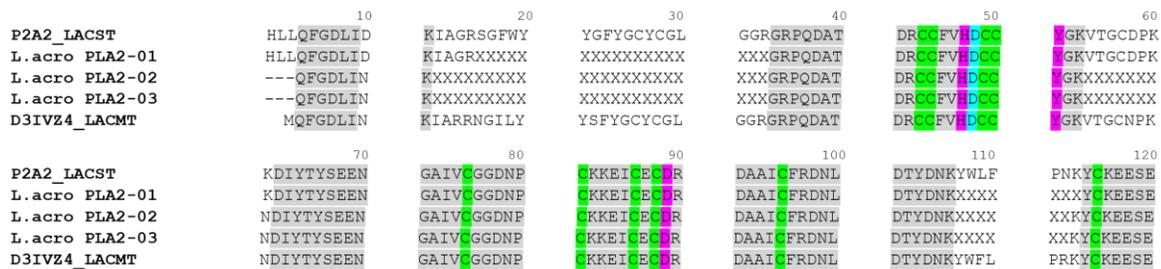


Figura 18. Alineamiento múltiple de las secuencias parciales de *L. acro* PLA₂-01, 02 y 03 con P2A2_LACST y D3IVZ4_LACMT. Los aminoácidos resaltados en gris indican residuos conservados en todas las secuencias, los señalados en verde las cisteínas, en fucsia los que integran el sitio activo y el azul celeste corresponde al aminoácido que une al ligando.

El alineamiento también constató que las tres isoformas de las enzimas corresponden a PLA₂ de tipo Asp49, características por altos niveles de actividad catalítica, lo que da una explicación a los altos niveles de degradación del substrato que presentó la fracción P12.1 en las pruebas de actividad (Tabla 12). Así mismo, el comportamiento ácido de los tres componentes observados en el gel bidimensional (Figura 17), se debe a que en todos los casos la cantidad de aminoácidos ácidos son más del doble que el número de aminoácidos básicos. PLA₂ de este tipo, se caracterizan por no inducir necrosis en musculo esquelético, por bajos niveles de actividad miotóxica y menor capacidad de penetración de la membrana plasmática (Verheij *et al.*, 1980).

9.7 Ensayos de citotoxicidad sobre líneas cancerosas e inhibición de actividad

El objetivo de los ensayos de inhibición del crecimiento de líneas celulares es buscar alteraciones a funciones biológicas en estas a partir del contacto con agentes externos que conlleven a un daño que va a ser detectado. A su vez, el probar la actividad en líneas celulares con patologías cancerígenas permite identificar componentes producidos en otro tipo de organismos que puedan ser usados con fines medicinales.

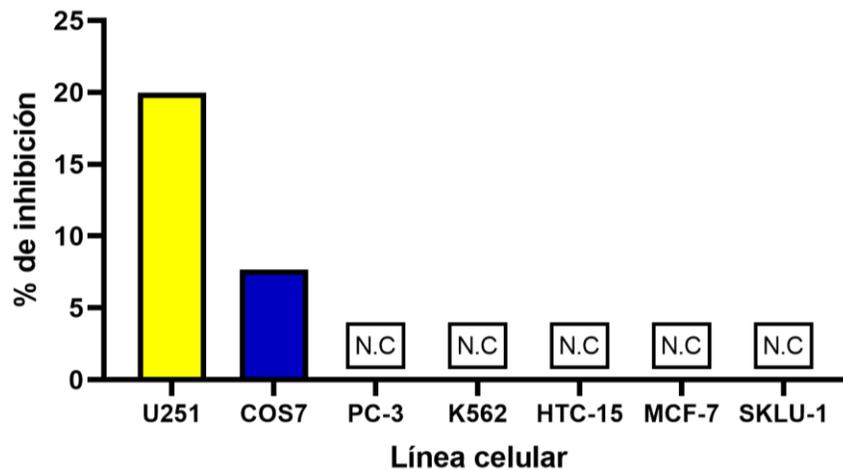


Figura 19. Porcentaje de inhibición de distintas líneas cancerosas.

(U251: glía de sistema nervioso central; COS7: células de riñón de mono, control; PC-3: próstata; K562: leucemia; HTC-15: colon; MCF-7: mama; SKLU-1: pulmón). N.C: No citotóxico.

Para el trabajo, se llevó a cabo un screening con la fracción 10-30 kDa utilizando las seis líneas celulares cancerosas humanas ya mencionadas en la metodología. Donde se encontró un efecto inhibitorio (19.98%) en la línea U251 de cáncer de glía de sistema nervioso central, mientras que las otras líneas cancerosas mostraron resistencia y no hubo inhibición (Figura 19). Este tipo de estudios donde se hace un barrido de la acción de diferentes componentes sobre líneas celulares cancerosas se convierten en una herramienta que ayuda en el reconocimiento de nuevas sustancias terapéuticas provenientes de biotoxinas como lo son los venenos de serpientes con potencial prometedor para combatir el cáncer (Shanbhag, 2015). Trabajos realizados por diferentes investigadores (Shahbazi *et al.*, 2019; Zouari-Kessentini *et al.*, 2009) con extractos totales y fracciones purificadas de venenos de serpiente, han mostrado igualmente efectos sobre células cancerosas que van desde citotoxicidad destruyendo el 60% de células de cáncer de pulmón, hasta inhibición de la adhesión y migración de las mismas.

Así mismo, la fracción P12.1 fue probada sobre la línea U251 sin tener efecto sobre el crecimiento de esta, demostrando al parecer no ser la responsable de la inhibición vista en la fracción anterior. Es importante aclarar que la concentración con la que se probó en esta fracción fue aproximadamente 100 veces menor, debido a que era la cantidad existente de proteína de la fracción por las limitaciones sanitarias. Sin embargo, estudios anteriores con PLA₂ como el realizado por Pinnotti y colaboradores en el 2018 han demostrado una disminución en la viabilidad celular en líneas de cáncer esofágico Kyse 30, Kyse 27 y en células de glioma U373, HCB151 a medida que se aumentan la concentración del compuesto citotóxico. Lo que significaría que evaluar mayores concentraciones de la fracción podría permitir confirmar la inhibición del crecimiento celular por parte de la misma, ya que la composición la membrana de las células U251, ricas en fosfolípidos como fosfatidiletalona, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidilcolina y otros lípidos como la esfingomielina (Toda *et al.*, 2015), hacen de las PLA₂ biomoléculas de interés contra este tipo de células cancerosas por su afinidad por estos sustratos.

Por último, se probó el efecto del EDTA y EGTA sobre la fracción P12.1, estos dos compuestos se caracterizan por ser agentes quelantes de iones como Mg²⁺, Fe²⁺ y Ca²⁺ y al secuestrar estos cationes inhiben enzimas que dependen de estos cofactores. Como resultado, la hidrólisis del sustrato de las fracciones con los agentes quelantes no fue significativa (Tabla 17), mientras que la fracción sin estos mostró una alta degradación del mismo. Lo que permitió confirmar que los componentes tipo PLA₂ presentes en la fracción corresponden a enzimas dependientes de Ca²⁺, ya que, en el momento de incorporar los inhibidores al medio enriquecido por el ion, estos forman complejos de coordinación, limitando la disponibilidad de este e inhibiendo completamente la actividad de las PLA₂. Resultados consistentes con estudios de fosfolipasas de diferentes organismos, donde se confirma que la presencia de Ca²⁺ optimiza la interacción entre la enzima y el sustrato (Yu *et al.*, 1993).

Tabla 17. Efecto de agentes quelantes sobre la actividad de PLA₂ de la fracción P12.1.

	Act. Específica	% de actividad	% de inhibición
P12.1	646.28 ± 9.33	100 ± 0.00	0.00 ± 0.00
P12.1 + EDTA (50 mM)	4.42 ± 0.38	0.68 ± 0.08	99.32 ± 0.08
P12.1 + EGTA (50 mM)	5.09 ± 0.34	0.79 ± 0.07	99.21 ± 0.07

10. Conclusiones

El veneno de *L. acrochorda* es rico en componentes de bajo y mediano peso molecular correspondientes a 10 -25 kDa.

El aprovechamiento de diferentes técnicas para el aislamiento y purificación, el proceso de seguimiento de actividad y la identificación de los compuestos posibilitan el aumento del conocimiento de los componentes de los venenos de especies poco estudiadas, proporcionando herramientas conceptuales para confrontar de una mejor manera la problemática de salud pública en que se ha convertido las mordeduras de serpientes en la región.

Se observó actividad fosfolipásica en la fracción P12.1 purificada 33.7 veces a partir del veneno total. La fracción aislada parece contener tres isoformas de fosfolipasa A₂

La variación en los pesos moleculares y puntos isoeléctricos de los componentes identificados es baja, confirmando diferencias de un reducido número de aminoácidos entre sí. Lo que se expresa en altos niveles de similitud entre las PLA₂ de veneno de la especie.

El veneno de *L. acrochorda* contiene al menos tres fosfolipasas A₂ ácidas con pesos moleculares aproximados a 14 kDa.

Las pruebas de monitoreo de la actividad enzimática durante todo proceso de purificación mostraron la existencia de PLA₂ con altos niveles de actividad catalítica que pudieran ser aprovechados con fines biotecnológicos o terapéuticos.

La actividad fracción 10 – 30 kDa demostró tener inhibición del crecimiento de células cancerosas de glía de sistema nervioso central. Mientras que la fracción P12.1 no tuvo actividad inhibitoria sobre esta misma línea, posiblemente debido a la baja concentración probada.

11. Perspectivas

Este trabajo ha permitido generar un acercamiento a la composición y actividad del veneno de *L. acrochorda*. Sin embargo, dentro de los experimentos propuestos para continuar la investigación está la secuenciación completa de las isoformas de la fracción, la determinación de su estructura secundaria, así como un trabajo bioinformático que permita elucidar regiones con funciones biológicas que puedan tener algún aprovechamiento.

Así mismo, la utilización de nuevas técnicas de purificación para poder separar estas isoformas de la fracción y poder caracterizarlas bioquímica y fisicoquímicamente. Sumado a diferentes bioensayos corroborando los resultados del trabajo bioinformático previamente planteado como otra perspectiva, a fin de aumentar la comprensión y aprovechamiento de la información que los venenos pueden proporcionarnos.

El enriquecimiento de la fracción P12.1 posibilitará la realización de nuevos ensayos sobre las líneas celulares cancerosas en diferentes concentraciones y así poder determinar los componentes responsables de dicha actividad con potenciales usos.

12. Referencias

- Alfonso García, G., & García Cardona, A. (2009). Fosfolipasas A2: grandes familias y mecanismos de acción. *Repertorio de Medicina y Cirugía*, 18(4), 199–209.
- Arni, R. K., & Ward, R. J. (1996). Phospholipase A2 - A structural review. *Toxicon*, 34(8), 827–841. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(96\)00036-0](https://doi.org/10.1016/0041-0101(96)00036-0)
- Arruebo, M., Vilaboa, N., Sáez-Gutierrez, B., Lambea, J., Tres, A., Valladares, M., & González-Fernández, Á. (2011). Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *Cancers*, 3, 3279–3330. <https://doi.org/10.3390/cancers3033279>
- Blanco, A., & Blanco, G. (2017). Enzymes. In *Medical Biochemistry* (p. 805). Academic Press.
- Braganca, B. M., & Sambray, Y. M. (1967). Multiple forms of Cobra Venom Phospholipase A. *Nature*, 216, 1210–1211.
- Calderon, L. A., Sobrinho, J. C., Zaqueo, K. D., Moura, A. A. De, Grabner, A. N., Mazzi, M. V., Marcussi, S., Nomizo, A., Fernandes, C. F. C., Zuliani, J. P., Carvalho, B. M. A., Silva, S. L., Stábeli, R. G., & Soares, A. M. (2014). Antitumoral Activities of Snake Venom Proteins: New Trends in Cancer Therapy. *BioMed Research International*, 1–19.
- Campbell, J. A., & Lammar, W. W. (2004). *The venomous reptiles of the western hemisphere - vol. I* (Primera ed). Comstock Publishing Associates.
- Campos, L. B., Pucca, M. B., Roncolato, E. C., Netto, J. C., & Barbosa, J. E. (2012). Analysis of phospholipase A2, l-amino acid oxidase, and proteinase enzymatic activities of the Lachesis muta rhombeata venom. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 26(8), 308–314. <https://doi.org/10.1002/jbt.21422>
- Canseco Márquez, L., & Gutiérrez Mayén, M. G. (2010). *Anfibios y Reptiles del Valle de Tehuacán-Cuicatlán* (Primera Ed). CONABIO, Fundación para la Reserva de la Biosfera Cuicatlán, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Chen-Yuan, L. (1979). *Snake Venoms*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-66913-2>
- Cordeiro, F. A., Perini, T. G. K., Bregge-Silva, C., Cremonez, C. M., Rodrigues, R. S., Boldrini-França, J., Bordon, K. de C. F., De Souza, D. L. N., Achê, D. C., Rodrigues, V. de M., dos Santos, W. F., Rosa, J. C., & Arantes, E. C. (2015). A New Phospholipase A2 from Lachesis muta rhombeata: Purification, Biochemical and Comparative Characterization with Crotoxin B. *Protein & Peptide Letters*, 22(9), 816–827. <https://doi.org/10.2174/0929866522666150706112431>
- Damico, D. C. S., Lilla, S., de Nucci, G., Ponce-Soto, L. A., Winck, F. V., Novello, J. C., & Marangoni, S. (2005). Biochemical and enzymatic characterization of two basic Asp49 phospholipase A2 isoforms from Lachesis muta muta (Surucucu) venom. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1726(1), 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.05.022>
- Damico, D. C. S., Vassequi-Silva, T., Torres-Huaco, F. D., Nery-Diez, A. C. C., de Souza, R. C. G., Da Silva, S. L., Vicente, C. P., Mendes, C. B., Antunes, E., Werneck, C. C., &

- Marangoni, S. (2012). LmrTX, a basic PLA2 (D49) purified from *Lachesis muta rhombeata* snake venom with enzymatic-related antithrombotic and anticoagulant activity. *Toxicon*, 60(5), 773–781. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.06.010>
- de Assis, E. B., Estevão-Costa, M. I., Valentim, A. do C., Silva-Neto, A., Cotta, G. A., Alvarenga Mudado, M., Richardson, M., & Fortes-Dias, C. L. (2008). Purification and complete primary structure of the first PLA2 from *Lachesis stenophrys* (the Central American Bushmaster) snake venom. *Protein Journal*, 27(5), 327–333. <https://doi.org/10.1007/s10930-008-9141-4>
- Díaz-Oreiro, C., & Gutiérrez, J. M. (1997). Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A2 isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venoms: Effects on enzymatic and pharmacological properties. *Toxicon*, 35(2), 241–252. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(96\)00128-6](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(96)00128-6)
- Diniz-Sousa, R., Caldeira, C. A. S., Kayano, A. M., Paloschi, M. V., Pimenta, D. C., Simões-Silva, R., Ferreira, A. S., Zanchi, F. B., Matos, N. B., Grabner, F. P., Calderon, L. A., Zuliani, J. P., & Soares, A. M. (2018). Identification of the Molecular Determinants of the Antibacterial Activity of LmutTX, a Lys49 Phospholipase A2 Homologue Isolated from *Lachesis muta muta* Snake Venom (Linnaeus, 1766). *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 122(4), 413–423. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12921>
- Emmett R., D. (1944). Los Géneros de Anfibios y reptiles de Colombia, III: Tercera Parte: Reptiles; Orden de las Serpientes. *Caldasia*, 3(12), 155–224.
- Esquivel Soto, E. E., & Leal Guadarrama, L. I. (2004). Métodos fisicoquímicos en Biotecnología: CROMATOGRAFÍA DE FASE REVERSA. *Instituto de Biotecnología*, 50.
- Fernandes, D. S., Franco, F. L., & Fernandes, R. (2004). Systematic Revision of the Genus *Lachesis*. *Herpetologica*, 60(2), 245–260.
- Flammersfeld, A., Lang, C., Flieger, A., & Pradel, G. (2018). Phospholipases during membrane dynamics in malaria parasites. *International Journal of Medical Microbiology*, 308, 129–141. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.09.015>
- Fortes-Dias, C. L., Jannotti, M. L.D., Franco, F. J.L., Magalhães, A., & Diniz, C. R. (1999). Studies on the specificity of CNF, a phospholipase A2 inhibitor isolated from the blood plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). I. Interaction with PLA2 from *Lachesis muta muta* snake venom. In *Toxicon* (Vol. 37, Issue 12, pp. 1747–1759). [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00116-6](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00116-6)
- Fuly, A. L., de Miranda, A. L. P., Zingali, R. B., & Guimarães, J. A. (2002). Purification and characterization of a phospholipase A2 isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom. *Biochemical Pharmacology*, 63(9), 1589–1597. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)00873-0](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)00873-0)
- Fuly, A. L., Francischetti, I. M., Zingali, R. B., & Carlini, C. R. (1993). Partial purification and some physicochemical properties of phospholipases A2 from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta*). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 26(5), 459–463.

- Fuly, A. L., Machado, O. L. T., Alves, E. W., & Carlini, C. R. (1997). Mechanism of inhibitory action on platelet activation of a phospholipase A2 isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. *Thrombosis and Haemostasis*, 78(5), 1372–1380. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1665414>
- Gutiérrez, J. M., Avila, C., Camacho, Z., & Lomonte, B. (1990). Ontogenetic changes in the venom of the snake *Lachesis muta stenophrys* (bushmaster) from Costa Rica. *Toxicon*, 28(4), 419–426. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(90\)90080-Q](https://doi.org/10.1016/0041-0101(90)90080-Q)
- Inga Arellano, R. R. (2010). *Caracterización estructural, biológica y molecular de una isoenzima básica de Fosfolipasa A2 del veneno de la serpiente peruana Lachesis muta (Linnaeus, 1766)*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Jimenez, K. L., Zavaleta, A. I., Izaguirre, V., Yarleque, A., & Inga, R. R. (2010). Clonaje caracterización molecular in silico de un transcrito de fosfolipasa A, aislado del veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 27(4), 2–6. <https://doi.org/10.17843/rpmpesp.2010.274.1524>
- Keller, A., Nesvizhskii, A. I., Kolker, E., & Aebersold, R. (2002). Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Analytical Chemistry*, 74(20), 5383–5392. <https://doi.org/10.1021/ac025747h>
- Kerkkamp, H., Bagowski, C., Kool, J., van Soolingen, B., Vonk, F. J., & Vlecken, D. (2018). Whole snake venoms: Cytotoxic, anti-metastatic and antiangiogenic properties. *Toxicon*, 150, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.05.004>
- Kini, R. M. (2003). Excitement ahead: Structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon*, 42(8), 827–840. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.002>
- Kini, R. M., & Evans, H. J. (1987). Structure-function relationships of phospholipases. The anticoagulant region of phospholipases A2. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(30), 14402–14407. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)47808-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)47808-8)
- Kini, R. M., & Iwanaga, S. (1986). Structure-function relationships of phospholipases I: Prediction of presynaptic neurotoxicity. *Toxicon*, 24(6), 527–541. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(86\)90173-X](https://doi.org/10.1016/0041-0101(86)90173-X)
- Klaassen, C. D., & Watkins, J. B. (2015). *Casarett & Doull's Essentials of Toxicology* (Third). Mc Graw Hill Education.
- Lomonte, B., Moreno, E., Tarkowski, A., Hanson, L. A., & Maccarana, M. (1994). Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. *Journal of Biological Chemistry*, 269(47), 29867–29873. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)43961-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)43961-0)
- Lomonte, Bruno, & Calvete, J. J. (2017). Strategies in “snake venomics” aiming at an integrative view of compositional, functional, and immunological characteristics of venoms. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 23(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0117-8>

- Mackessy, S. P. (2008). Venom composition in rattlesnakes: Trends and biological significance. *The Biology of Rattlesnakes*, 495–510.
- Mackessy, S. P., & Baxter, L. M. (2006). Bioweapons synthesis and storage: The venom gland of front-fanged snakes. *Zoologischer Anzeiger*, 245, 147–159. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2006.01.003>
- Madrigal, M., Sanz, L., Flores-Díaz, M., Sasa, M., Núñez, V., Alape-Girón, A., & Calvete, J. J. (2012). Snake venomomics across genus *Lachesis*. Ontogenetic changes in the venom composition of *Lachesis stenophrys* and comparative proteomics of the venoms of adult *Lachesis melanocephala* and *Lachesis acrochorda*. *Journal of Proteomics*, 77, 280–297. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.09.003>
- Mattison, C. (2007). *The new encyclopedia of snakes*. Princeton University Press.
- Moga, M. A., Dimienescu, O. G., Arvătescu, C. A., Ifteni, P., & Pleș, L. (2018). Anticancer activity of toxins from bee and snake venom—an overview on ovarian cancer. *Molecules*, 23, 1–21. <https://doi.org/10.3390/molecules23030692>
- Nesvizhskii, A. I., Keller, A., Kolker, E., & Aebersold, R. (2003). A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 75(17), 4646–4658. <https://doi.org/10.1021/ac0341261>
- Núñez Rangel, V., Fernández Culma, M., Rey-Suárez, P., & Pereañez, J. A. (2012). Development of a sensitive enzyme immunoassay (ELISA) for specific identification of *Lachesis acrochorda* venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 18(2), 173–179. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992012000200007>
- Ogawa, T., Oda, N., Nakashima, K., Sasaki, H., Hattori, M., Sakaki, Y., Kihara, H., & Ohno, M. (1992). Unusually high conservation of untranslated sequences in cDNAs for *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A2 isozymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(18), 8557–8561. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.18.8557>
- Oliveira, A., Bleicher, L., Schrago, C. G., & Silva Junior, F. P. (2018). Conservation analysis and decomposition of residue correlation networks in the phospholipase A2 superfamily (PLA2s): Insights into the structure-function relationships of snake venom toxins. *Toxicon*, 146, 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.03.013>
- Pal, S. K., Gomes, A., Dasgupta, S. C., & Gomes, A. (2002). Snake venom as therapeutic agents: From toxin to drug development. *Indian Journal of Experimental Biology*, 40, 1353–1358.
- Pinnotti, S., Oliveira, V. A., Pupo, A. V., Henrique, L., Ferreira, G., Reis, R. M., & Ventura, M. (2018). Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom: In vitro cytotoxic activity of a heterodimeric phospholipase A2 on human cancer-derived cell lines. *Toxicon*, 156(October), 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.10.306>
- Pough, F. H., Janis, C. M., & Heiser, J. B. (2008). *Vertebrate Life* (8th Editio). Pearson.
- Ripa, D. (1999). Keys to Understanding the Bushmasters (Genus *Lachesis* Daudin, 1803). *Bulletin of the Chicago Herpetological Society*, 34(3), 45–92.

- Robinson, Peter K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, 59, 1–41. <https://doi.org/10.1042/BSE0590001>
- Sánchez, E. E., Girón, M. E., Guerrero, B., Uzcátegui, N. L., & Rodríguez-Acosta, A. (2015). Caracterización bioquímica y biológica del veneno de la serpiente Neotropical Macagua (*Bothrops Colombiensis*) de la región de Barlovento, estado Miranda, Venezuela. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 67(2), 1–21.
- Schaloske, R. H., & Dennis, E. A. (2006). The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1761, 1246–1259. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2006.07.011>
- Scott, D. L. (1997). Phospholipase A2: structure and catalytic properties. In R. M. Kini (Ed.), *Venom phospholipase A2 enzymes : structure, function, and mechanism* (1st Editio, pp. 97–128). John Wiley.
- Shahbazi, B., Najafabadi, Z. S., Goudarzi, H., Sajadi, M., Tahoori, F., & Bagheri, M. (2019). Cytotoxic effects of *Pseudocerastes persicus* venom and its HPLC fractions on lung cancer cells. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, February 2019, 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0009>
- Shanbhag, V. K. L. (2015). Applications of snake venoms in treatment of cancer. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(4), 275–276. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(15\)30344-0](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(15)30344-0)
- Shibata, H., Chijiwa, T., Oda-Ueda, N., Nakamura, H., Kazuaki, Y., Hattori, S., Matsubara, K., Matsuda, Y., Yamashita, A., Isomoto, A., Mori, K., Tashiro, K., Kuhara, S., Yamasaki, S., Fujie, M., Goto, H., Koyanagi, R., Takeuchi, T., Fukumaki, Y., ... Ogawa, T. (2018). The habu genome reveals accelerated evolution of venom protein genes. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28749-4>
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., & Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1107–1112. <https://doi.org/10.1093/jnci/82.13.1107>
- Takasaki, C., Yutani, F., & Kajiyashiki, T. (1990). Amino acid sequences of eight phospholipases A2 from the venom of Australian king brown snake, *Pseudechis australis*. *Toxicon*, 28(3), 329–339. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(90\)90068-I](https://doi.org/10.1016/0041-0101(90)90068-I)
- Tasoulis, T., & Isbister, G. K. (2017). A review and database of snake venom proteomes. *Toxins*, 9(290), 1–23. <https://doi.org/10.3390/toxins9090290>
- Toda, Y., Takata, K., Nakagawa, Y., Kawakami, H., Fujioka, S., Kobayashi, K., Hattori, Y., Kitamura, Y., Akaji, K., & Ashihara, E. (2015). Effective internalization of U251-MG-secreted exosomes into cancer cells and characterization of their lipid components. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 456(3), 768–773. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.12.015>
- Uetz, P., & Hošek, J. (2019). *The Reptile Data Base*. <http://www.reptile-database.org>
- Verheij, H. M., Boffa, M., Rothen, C., Bryckaert, M., Verger, R., & de Haas, G. H. (1980).

Correlation of Enzymatic Activity and Anticoagulant Properties of Phospholipase A2. *European Journal of Biochemistry*, 112(1), 25–32. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb04982.x>

Xiao, H., Pan, H., Liao, K., Yang, M., & Huang, C. (2017). Snake Venom PLA2, a Promising Target for Broad-Spectrum Antivenom Drug Development. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6592820>

Yu, B.-Z., Berg, O. G., & Jain, M. K. (1993). The Divalent Cation Is Obligatory for the Binding of Ligands to the Catalytic Site of Secreted Phospholipase A2. *Biochemistry*, 32(25), 6485–6492. <https://doi.org/10.1021/bi00076a024>

Zamudio, K. R., & Greene, H. W. (1997). Phylogeography of the bushmaster (*Lachesis muta*: Viperidae): implications for neotropical biogeography, systematics, and conservation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 62, 421–442. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1997.tb01634.x>

Zouari-Kessentini, R., Luis, J., Karray, A., Kallech-Ziri, O., Srairi-Abid, N., Bazaa, A., Loret, E., Bezzine, S., El Ayeb, M., & Marrakchi, N. (2009). Two purified and characterized phospholipases A2 from *Cerastes cerastes* venom, that inhibit cancerous cell adhesion and migration. *Toxicon*, 53(4), 444–453. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.003>