



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Identificación molecular y caracterización *in silico*
de las proteínas desintegrinas del veneno de cuatro
especies ofídicas de importancia clínica**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Genetista
Biotecnóloga

AUTOR

Tania Alessandra BRONCANO GUTIÉRREZ

ASESORES

Dan Erick VIVAS RUIZ

Daniel Alcibiades TORREJÓN MALDONADO (Coasesor)

Lima, Perú

2024



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Broncano, T. (2024). *Identificación molecular y caracterización in silico de las proteínas desintegrinas del veneno de cuatro especies ofídicas de importancia clínica*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Tania Alessandra Broncano Gutierrez
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	73961473
URL de ORCID	https://orcid.org/0009-0006-3822-4140
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Dan Erick Vivas Ruiz
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	41951131
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-4417-2026
Datos de coasesor	
Nombres y apellidos	Daniel Alcibiades Torrejón Maldonado
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	76450835
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-9385-6921
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Fanny Elizabeth Lazo Manrique
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07186191
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Miguel Angel Neira Gonzales

Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09640619
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Zeballos Alva Jorge Antonio
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07544388
Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.2.2. Principios Bioactivos
Grupo de investigación	Grupo de investigación de Toxinas de Origen Animal y sus Antivenenos - TOXIVEN
Agencia de financiamiento	Perú. Programa Nacional de Investigación Científica y Estudios Avanzados (Contrato N° 079-2021-FONDECYT) Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM (Subvención: PINTERDIS B2110007i).
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. País: Perú Departamento: Lima Distrito: Cercado de Lima Latitud: -12.056423 Longitud: -77.084333
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2022 - 2023
URL de disciplinas OCDE	Bioquímica, Biología molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.00



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGA
GENETISTA BIOTECNÓLOGA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN PRESENCIAL DE TESIS)**

Siendo las 10:07 horas del 6 de marzo de 2024, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** de **TANIA ALESSANDRA BRONCANO GUTIÉRREZ**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20230106774, la titulando expuso su Tesis: **IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN *IN SILICO* DE LAS PROTEÍNAS DESINTEGRINAS DEL VENENO DE CUATRO ESPECIES OFÍDICAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota ..20..., calificativo: ..aprobado con máximos honores

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** a **TANIA ALESSANDRA BRONCANO GUTIÉRREZ** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo grado, conforme a ley.

Siendo las 11:07 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 6 de marzo de 2024.

Mg. FANNY ELIZABETH LAZO MANRIQUE
(PRESIDENTA)

Dr. DAN ERICK VIVAS RUIZ
(ASESOR)

Blgo. MIGUEL ANGEL NEIRA GONZALES
(MIEMBRO)

Blgo. JORGE ANTONIO ZEBALLOS ALVA
(MIEMBRO)



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Vicerrectorado de Investigación y Posgrado



CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo Dr. **DAN ERICK VIVAS RUIZ** en mi condición de docente Operador del Programa Informático de Similitudes de la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas y Asesor de la tesis cuyo título es IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN *IN SILICO* DE LAS PROTEÍNAS DESINTEGRINAS DEL VENENO DE CUATRO ESPECIES OFÍDICAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA, presentado por la Bachiller **TANIA ALESSANDRA BRONCANO GUTIÉRREZ** para optar al Título Profesional de BIÓLOGA GENETISTA BIOTECNÓLOGA.

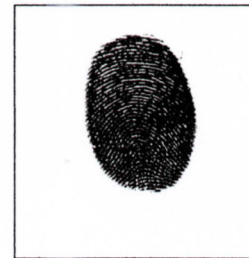
CERTIFICO: que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de **12 %** de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional**.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del título correspondiente.

Firma del Asesor:

DNI: 41951131

Nombres y apellidos: DAN ERICK VIVAS RUIZ



DEDICATORIA

Dedicado a mis padres, Rafael y Nancy, y
a mi hermana Gretta, quienes han sido mi mayor
motivación para mi formación profesional.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a diversos actores que han sido fundamentales en el desarrollo de esta tesis. En primer lugar, al Grupo de Investigación en Toxinas de Origen Animal y sus Antivenenos (TOXIVEN) y a mis profesores, quienes han contribuido significativamente a mi desarrollo académico.

Al Dr. Dan Vivas por su excepcional orientación y apoyo durante la tesis. Su experiencia y dedicación han sido fundamentales para el desarrollo de esta investigación. Asimismo, agradezco su inspiración y guía constante.

Al Dr. Armando Yarlequé, agradezco la oportunidad de formar parte de este distinguido grupo de investigación. Su liderazgo, sabiduría y apoyo han sido pilares fundamentales en mi crecimiento académico y profesional. La invaluable experiencia adquirida bajo su dirección ha sido un privilegio.

A la Dra. Fanny Lazo, Coordinadora del Grupo de Investigación TOXIVEN, mi gratitud por su apoyo incondicional, generosidad al compartir sus vastos conocimientos y orientación invaluable, así como también gestionar el financiamiento de parte de esta tesis.

Un reconocimiento especial a mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biología Molecular, entre ellos Juan Cabrejos, Angie Regalado, Raul Rivas, Alex Proleón, Jordano Espinoza, Alejandro Roque, Anthony Salcedo, Alexander Llontop, Kelly Marrecos y Paola Rosas. Agradezco su compañía y el ambiente ameno y colaborativo que han construido para la investigación. Quiero destacar la valiosa orientación del Mg. Daniel Torrejón, quien contribuyó significativamente al desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
ÍNDICE DE ANEXOS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Víboras peruanas de importancia clínica	3
2.2. El veneno ofídico.....	6
2.3. Proteínas no enzimáticas.....	9
2.4. Desintegrinas ofídicas e integrinas.....	9
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	13
3.1. Hipótesis.....	13
3.2. Objetivos	13
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
4.1. MATERIALES.....	14
4.2. MÉTODOS.....	16
V. RESULTADOS.....	24
5.1. Aislamiento del ARN total.....	24
5.2. Síntesis de ADNc.....	25
5.3. Diseño de cebadores	26
5.4. Amplificación del ADNc.....	26
5.5. Secuenciación del ADN	27
5.6. Alineamiento múltiple y clasificación de las desintegrinas	29
5.7. Predicción de propiedades fisicoquímicas	30
5.8. Predicción de interacciones proteína-proteína	32
5.9. Predicción de estructuras secundarias y terciarias	34
5.10. Modelamiento de la estructura tridimensional.....	35
VI. DISCUSIÓN.....	39
6.1. Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc del veneno ofídico.....	39
6.2. Diseño de cebadores y amplificación de ADNc.....	42
6.3. Secuenciación de ADN	43
6.4. Alineamiento múltiple y clasificación de las desintegrinas	44

6.5. Predicción de propiedades fisicoquímicas	45
6.6. Interacciones proteína-proteína	47
6.7. Predicción de estructuras secundarias y terciarias	48
VII. CONCLUSIONES.....	50
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
IX. ANEXOS.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Amplificación del gen de la desintegrina de PII-metaloproteinasa obtenida a partir de veneno liofilizado.	27
Figura 2.	Secuencias de aminoácidos codificantes y nucleótidos de desintegrinas escindidas de metaloproteinasa de tipo II en <i>Bothrops atrox</i> , <i>Bothrops pictus</i> , <i>Bothrops barnetti</i> y <i>Bothrops brazili</i> .	28
Figura 3.	Alineamiento múltiple de desintegrinas.	29
Figura 4.	Firmas de secuencias del grupo 4 de las desintegrinas de especies del género <i>Bothrops</i> .	30
Figura 5.	Escalas de hidrofobicidad en las secuencias de desintegrinas del género <i>Bothrops</i> .	32
Figura 6.	Representación de la red de interacción entre las proteínas que exhiben similitud con las desintegrinas del género <i>Bothrops</i> .	34
Figura 7.	Estructuras secundarias de desintegrinas del género <i>Bothrops</i> .	34
Figura 8.	Modelos tridimensionales por homología refinados de desintegrinas	37
Figura 9.	Modelos tridimensionales por <i>ab initio</i> refinados de desintegrinas	37
Figura 10.	Patrones de disulfuro en las secuencias de las desintegrinas de especies del género <i>Bothrops</i> clasificadas dentro del grupo 4 (AF BE DJ GI HM KN).	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Código GenBank y organismo de procedencia del ARNm de metaloproteinasa tipo II.	18
Tabla 2.	Cuantificación del ARN total de <i>Bothrops atrox</i> , <i>Bothrops pictus</i> , <i>Bothrops barnetti</i> y <i>Bothrops brazili</i> a partir de veneno liofilizado.	24
Tabla 3.	Rendimiento del ARN total de <i>Bothrops atrox</i> , <i>Bothrops pictus</i> , <i>Bothrops barnetti</i> y <i>Bothrops brazili</i> a partir de veneno liofilizado.	24
Tabla 4.	Cuantificación del ADNc de <i>Bothrops atrox</i> , <i>Bothrops pictus</i> , <i>Bothrops barnetti</i> y <i>Bothrops brazili</i> .	25
Tabla 5.	Rendimiento del ADNc de <i>Bothrops atrox</i> , <i>Bothrops pictus</i> , <i>Bothrops barnetti</i> y <i>Bothrops brazili</i> .	26
Tabla 6.	Pares de cebadores para la amplificación de desintegrinas de metaloproteinasa tipo II.	26
Tabla 7.	Predicción de parámetros fisicoquímicos de desintegrinas.	31
Tabla 8.	Predicción de dominios conservados en las desintegrinas de <i>Bothrops</i> .	35
Tabla 9.	Predicción de puentes disulfuro con el programa PROSITE en las desintegrinas de <i>Bothrops</i> .	35
Tabla 10.	Tabla 10. Posición de los puentes disulfuro en los modelos teóricos de desintegrina.	38
Tabla 11.	Parámetros de validación de los modelos predichos por los programas SWISS-MODEL y trRosetta después de ser refinados por el servidor GalaxyWEB.	38

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Código del Protein Data Bank (PDB) de las secuencias en el alineamiento múltiple.	68
Anexo 2.	Parámetros de calidad de las plantillas usadas para el modelamiento por homología de desintegrinas de <i>Bothrops</i> .	68
Anexo 3.	Resultados del alineamiento con el programa BLASTn de las secuencias nucleotídicas de desintegrinas en <i>Bothrops atrox</i> , <i>Bothrops pictus</i> , <i>Bothrops barnetti</i> y <i>Bothrops brazili</i> .	69
Anexo 4.	Resultados del alineamiento con el programa BLASTp de las secuencias aminoacídicas de desintegrinas en <i>Bothrops atrox</i> , <i>Bothrops pictus</i> , <i>Bothrops barnetti</i> y <i>Bothrops brazili</i> .	70
Anexo 5.	Firmas de las secuencias de los grupos de desintegrinas agrupadas conforme a la clasificación de Vasconcelos et al., 2021.	71
Anexo 6.	Proteínas centrales que participan en la construcción de la red de interacción proteína-proteína.	71
Anexo 7.	Proteínas asociadas que participan en la construcción de la red de interacción proteína-proteína.	72
Anexo 8.	Estructuras secundarias de las desintegrinas del género <i>Bothrops</i> .	73
Anexo 9.	Parámetros de validación de los modelos predichos por los programas SWISS-MODEL y trRosetta antes de ser refinados.	74

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	:	Grados Celsius
2-propanol	:	Alcohol isopropílico
ADNc	:	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADN	:	Ácido desoxirribonucleico
ARN	:	Ácido Ribonucleico
dNTP	:	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DTT	:	Ditiotreitol
GC	:	Contenido de Guanina y Citosina
kDa	:	Kilodalton
KTS	:	Secuencia lisina-treonina-serina
µL y mL	:	Microlitro y mililitro
ng, µg y mg	:	Nanogramo, microgramo y miligramo
ORF+1	:	Marco de Lectura Abierto +1
pb	:	Pares de bases
PCR	:	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
pH	:	Potencial de hidrógeno
pI	:	Punto isoeléctrico.
P-II SVMP	:	Precursor proteolítico de metaloproteinasas de tipo II
RGD	:	Secuencia arginina-glicina-ácido aspártico.
RNAsas	:	Ribonucleasas.
rpm	:	Revoluciones por minuto.
S-S	:	Enlaces disulfuro
SVMP	:	Metaloproteinasas de veneno de serpiente.
UV	:	Ultravioleta.

RESUMEN

Las desintegrinas son una familia de proteínas pequeñas no enzimáticas generadas mediante la escisión proteolítica de la metaloproteinasa de veneno de serpiente tipo II. Estas desintegrinas desempeñan un papel crucial en diversos procesos biológicos, como la adhesión celular, migración, apoptosis, inhibición de la agregación plaquetaria y angiogénesis. En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo identificar y caracterizar molecularmente las desintegrinas presentes en el veneno de las especies de serpientes *Bothrops atrox*, *Bothrops pictus*, *Bothrops barnetti* y *Bothrops brazili*. El proceso abarcó el aislamiento de ARN, su conversión a ADNc, amplificación y análisis de secuencias mediante electroforesis y secuenciación. La obtención de secuencias de aminoácidos se realizó a través del programa Translate Tool - ExPASy, seguido de un alineamiento múltiple con Clustal Omega. Se predijeron propiedades fisicoquímicas y estructura secundaria mediante ProtpPparam y PRABI, respectivamente, y se determinó la estructura tridimensional.

Los resultados revelaron la presencia de desintegrinas en las cuatro especies analizadas, con secuencias aminoacídicas de aproximadamente 200 pb. Cabe destacar que la desintegrina de *B. pictus* mostró un inserto de tres aminoácidos cerca de la región N-terminal, también presentes en los dominios similares a desintegrinas de metaloproteinasas tipo III, sugiriendo el origen de la desintegrina de *B. pictus* a partir de la duplicación de un dominio similar a desintegrina. El peso molecular aproximado de las desintegrinas fue de 7.5 kDa. En cuanto a la estructura secundaria, se observaron predominantemente plegamientos azarosos (~ 90 %), con 6 puentes disulfuro en la estructura tridimensional, compartiendo la misma ubicación que las desintegrinas del grupo 4. Además, los motivos de unión a integrinas (RGD) se localizaron dentro de bucles. En conclusión, las cuatro especies analizadas expresan desintegrinas en su veneno, mostrando homología en estructura primaria, secundaria y tridimensional con otras desintegrinas reportadas en la base de datos.

Palabras clave

Desintegrinas, integrinas, motivo RGD, *Bothrops*, veneno de serpiente, identificación molecular

ABSTRACT

The disintegrins are a family of small non-enzymatic proteins generated by the proteolytic cleavage of snake venom metalloproteinase type II. These disintegrins play a crucial role in various biological processes, such as cell adhesion, migration, apoptosis, inhibition of platelet aggregation and angiogenesis. In this context, the present study aimed to identify and molecularly characterize the disintegrins present in the venom of the snake species *B. atrox*, *B. pictus*, *B. barnetti* and *B. brazili*. The process encompassed the isolation of RNA, its conversion to cDNA, amplification and sequence analysis through electrophoresis and sequencing. Obtaining amino acid sequences was carried out through the Translate Tool - ExPASy program, followed by a multiple alignment with Clustal Omega. Physicochemical properties and secondary structure were predicted by ProtpPparam and PRABI, respectively, and the three-dimensional structure was determined.

The results revealed the presence of disintegrins in the four species analyzed, with amino acid sequences of approximately 200 bp. Notably, the *B. pictus* disintegrin showed an insert of three amino acids near the N-terminal region, also present in the disintegrin-like domains of type III metalloproteinases, suggesting the origin of the *B. pictus* disintegrin from duplication of a disintegrin-like domain. The approximate molecular weight of the disintegrins was 7.5 kDa. Regarding the secondary structure, predominantly random foldings were observed (~ 90%), with 6 disulfide bridges in the three-dimensional structure, sharing the same location as the group 4 disintegrins. In addition, the integrin-binding motifs (RGD) were located within loops. In conclusion, the four species analyzed express disintegrins in their venom, showing homology in primary, secondary and three-dimensional structure with other disintegrins reported in the database.

Keywords

Disintegrins, integrins, RGD motif, *Bothrops*, snake venom, molecular identification

I. INTRODUCCIÓN

El término ofidismo hace referencia al síndrome provocado por la inoculación de veneno producto de una mordedura de alguna serpiente venenosa (Maguiña Vargas et al., 1998). El envenenamiento por mordedura de serpiente se considera una enfermedad tropical desatendida que afecta principalmente a las personas que viven en países y regiones donde los ingresos son bajos o medianos y con sistemas de salud débiles, también en comunidades tropicales remotas, poco desarrolladas y políticamente marginadas (World Health Organization, 2022). Se estima que entre 1.8 y 2.7 millones de personas son víctimas de envenenamiento por mordedura de serpientes por año (World Health Organization, 2023), resultando en discapacidad física y psicológica que imposibilita a las víctimas de asistir a su ambiente laboral periódica o permanentemente, y en los casos más graves, pueden provocar amputaciones y otras discapacidades e incluso la muerte (Waidyanatha et al., 2019).

Las serpientes venenosas inoculan su veneno secretado por glándulas salivales modificadas a través de sus colmillos. Estas serpientes se encuentran distribuidas en todo el mundo formando parte de 4 familias: Elapidae, Colubridae, Viperidae, y Atractaspididae (Gopal et al., 2023). Entre el grupo de serpientes que generan mayor incidencia de envenenamientos se encuentra la familia Viperidae causando a sus víctimas severos daños locales y sistémicos (Yarlequé et al., 2012). En el Perú, las serpientes del género *Bothrops* (familia Viperidae) son las que exhiben mayor riesgo de causar accidentes ofídicos ya sea en personas o animales domésticos (Esteva-Costa et al., 2016). Este riesgo está enraizado en la amplia distribución de estas serpientes en diversos hábitats del país, aumentando la probabilidad de encuentros con seres humanos y animales domésticos (Forero et al., 2004). El veneno producido por estas serpientes, conocido como veneno bothrópico, ha sido objeto de un intenso escrutinio científico debido a los potentes componentes biológicamente activos que contiene, estos han estimulado la exploración de aplicaciones terapéuticas y farmacológicas, ampliando el alcance de la investigación sobre venenos ofídicos (Teodoro et al., 2022; Paulchamy, 2010; Almeida et al., 2023). En este contexto, las desintegrinas, una clase de proteínas no enzimáticas presentes en los venenos ofídicos, ha cautivado la atención de la comunidad científica debido a su diversidad funcional y efectos biológicos multifacéticos. Aunque originalmente fueron

identificadas por su capacidad de inhibir la agregación plaquetaria, las desintegrinas han demostrado influir en una amplia gama de procesos biológicos, desde la adhesión celular hasta la señalización intracelular y la modulación inmunológica. Además, su habilidad para modular la angiogénesis (proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos), ha estimulado un creciente interés en su potencial aplicación en terapias relacionadas con la angiogénesis patológica y enfermedades vasculares.

En este contexto, en la presente tesis se propuso llevar a cabo un análisis exhaustivo de las desintegrinas presentes en el veneno de diversas especies del género *Bothrops*, especies que representan un desafío médico constante en muchas regiones. A través de técnicas de identificación molecular y caracterización *in silico*, se ha ahondado en la estructura tridimensional, la función bioquímica y la evolución de estas proteínas. Finalmente, mediante análisis bioinformáticos, se espera no solo comprender mejor la función de estas moléculas, sino también su potencial utilidad en terapias específicas y el diseño de nuevos fármacos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Víboras peruanas de importancia clínica

Las víboras son serpientes venenosas que pertenecen a la familia Viperidae. En la actualidad esta familia, se constituye en cuatro subfamilias: víboras (subfamilia Crotalinae), víboras verdaderas (subfamilia Viperinae), víboras de Fea (subfamilia Azemiopinae) y víboras nocturnas (subfamilia Causinae) (Bruchim, 2010). La familia Viperidae es conocida por incluir una amplia variedad de serpientes venenosas distribuidas en casi todo el mundo (Alencar et al., 2016); además, es la familia de serpientes más relevante desde una perspectiva médica, ya que provoca un alto número de accidentes y su veneno actúa de manera inmediata (Wellmann & Guerra-Centeno, 2020). En el Perú, las serpientes de la familia Viperidae están detrás de la mayoría de las 1500-2500 mordeduras de serpientes estimadas anualmente, lo que se traduce en una tasa de mortalidad no inferior a 0.043 por cada 100.000 habitantes (Lomonte et al., 2020).

La importancia clínica de la familia Viperidae en el Perú se extiende a dos subfamilias claves (Crotalinae y Viperinae) y se destaca debido a la presencia significativa de serpientes venenosas pertenecientes a esta familia en el territorio peruano. La diversidad de especies de serpientes de la familia Viperidae, que incluye géneros notables como *Bothrops*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothriechis*, *Crotalus* y *Lachesis*, se encuentra distribuida a lo largo y ancho de diversos ecosistemas en el país (Zamora et al., 2010). Asimismo, las mordeduras de serpientes Viperidae afectan principalmente el sistema hemostático y circulatorio, provocando síntomas a nivel local como dolor intenso, hinchazón, sangrado y en casos graves, necrosis tisular (Reid & Theakston, 1983). Estas mordeduras pueden desencadenar complicaciones sistémicas como coagulopatías, daño renal y hemorragias incontrolables. Además, el veneno puede causar miotoxicidad, nefrotoxicidad y manifestaciones locales graves, incluyendo mionecrosis y dermonecrosis. Las complicaciones a largo plazo involucran trombocitopenia, anomalías renales y degradación tisular persistente (Sunitha et al., 2015).

2.1.1. El género *Bothrops*

El género *Bothrops*, comúnmente conocido como “jergón, "pico de loro" o "jararacas", es un grupo de serpientes venenosas que engloba un total de 45 especies de víboras de la subfamilia Crotalinae, se encuentran en toda América Central y América del Sur, siendo responsable de la mayoría de los casos de ofidismo de la región (Carrasco et al., 2019; Rodrigues, 2018; Rojas et al., 2005). Este género presenta una serie de características distintivas como su morfología, con cuerpos robustos, pero más delgado que el Género *Crotalus* (cascabeles) y una cola corta que puede volverse prensil en especies arbóreas, a menudo con la punta de color rojo; además de tener una cabeza en forma de corazón o flecha con un hocico punteado en la parte superior, lo que justifica su nombre común “serpiente con cabeza de lanza” (Abuys, 1988). Estas víboras se adaptan a una variedad de hábitats, desde bosques tropicales húmedos hasta áreas de cultivo, siendo comunes en zonas boscosas y selváticas (Rojas et al., 2005). Son en su mayoría serpientes terrestres, nocturnas y crepusculares, también son activas durante el amanecer y el atardecer, y suelen tener un comportamiento solitario (Martins et al., 2001; Bruni et al., 2021; Dozoretz et al., 2021; Stuginski et al., 2012; Stazonelli et al., 2018).

El veneno bothrópico es conocido por ser hemotóxico, con una compleja combinación de componentes tóxicos, en su mayoría de naturaleza proteica enzimática y no enzimática como las: metaloproteinasas (SVMP), serino proteinasas (SVSP), L-aminoácidos oxidasas (L-AAO), fosfolipasas clásicas A₂ (PLA₂), homólogos de PLA₂ (PLA₂-like) y desintegrinas. Esta amalgama de componentes tiene el potencial de desencadenar una serie de efectos adversos en las víctimas, incluyendo coagulopatías, hemorragias, mionecrosis y otras patologías diversas (Torrejón et al., 2023).

Dentro del género *Bothrops*, existen varias especies de importancia clínica en el Perú, algunas de ellas son *Bothrops atrox* (jergón de la selva), *Bothrops pictus* (Jergón de costa), *Bothrops brazili* (Jergón shushupe) y *Bothrops barnetti* (Sancarranca) (Mendoza et al., 2009; Kohlhoff et al., 2012). La especie *Bothrops atrox* destaca en el territorio peruano por ser la causante de cerca del 70% de los accidentes ofídicos. Esta especie se encuentra en una amplia gama de hábitats, desde las estribaciones de la selva baja hasta la ceja de selva en el oeste de los Andes, a altitudes que oscilan

entre los 600 y 1500 metros sobre el nivel del mar (Jaimes & Marcas-Cáceres, 2019). La intoxicación por mordedura de *Bothrops atrox* en humanos se manifiesta con efectos locales, como inflamación, sangrado en la zona cercana a la mordedura y necrosis del tejido circundante. Además, se observan efectos sistémicos que incluyen alteraciones en la coagulación sanguínea y diversos tipos de hemorragias que pueden ocurrir a cierta distancia del lugar de la mordedura. Estas perturbaciones en la capacidad de coagulación de la sangre y la formación de coágulos se deben principalmente a la acción de enzimas proteolíticas, especialmente las metaloproteinasas y serino proteinasas (Guércio et al., 2006).

Por otra parte, *Bothrops pictus*, conocida comúnmente como el "Jergón de costa", es una especie en peligro de extinción que habita las colinas semiáridas de los valles occidentales de Perú, que se extienden desde los departamentos de La Libertad hasta Arequipa, a altitudes de hasta 2300 metros sobre el nivel del mar. Desde un punto de vista morfológico, presenta un color terroso y gris claro, con una longitud que varía entre 40 y 90 centímetros, y su vientre puede mostrar tonalidades que van desde el blanco crema hasta un tono pálido, además de contar con una lengua de color negro (Lévano & Fernández, 2004). Es importante destacar que *Bothrops pictus* es la especie más común en la región costera, siendo responsable de la mayoría de los accidentes ofídicos en esta zona debido a las características geográficas propicias, como las vastas extensiones de zonas semidesérticas, valles escasos y las "lomas" habitadas por comunidades humanas (Henriquez-Camacho et al., 1998).

En cuanto a la especie *Bothrops brazili*, que es comúnmente llamada "Jergón Shushupe", es una serpiente que habita en todo el continente sudamericano, principalmente en países como Colombia, Ecuador, Guyana, Perú, Surinam, Guayana Francesa y Brasil. En el territorio peruano, *B. brazili* se encuentra en la región de la selva, principalmente en los departamentos de Amazonas, Madre de Dios, Loreto y Ucayali, a altitudes que alcanzan los 600 metros sobre el nivel del mar (Rodrigues et al., 2020). Esta serpiente se destaca por tener un cuerpo robusto de tonalidades que van desde el marrón al pardo, con un vientre de color crema a rosado. Además, exhibe diseños triangulares oscuros en su piel y puede alcanzar una longitud de hasta 1.3 metros (Ministerio de salud, 2005). Una de las características más notables de *Bothrops brazili* es su habilidad para producir una cantidad notablemente mayor de veneno en comparación con otras serpientes de la familia Viperidae. Se estima que

puede inyectar hasta 4 mL de veneno en una sola mordedura. Un caso de envenenamiento provocado por esta víbora conlleva graves consecuencias, tanto por los componentes tóxicos presentes en su veneno como por la cantidad que puede ser introducida en el organismo (Isla et al., 2003).

En lo que concierne a *Bothrops barnetti*, también conocida como la víbora de punta de lanza de Barnett, es de tamaño mediano, endémica del Perú y principalmente se encuentra en los matorrales tropicales áridos a semiáridos del desierto en la costa norte de Perú. Su dorso presenta un color marrón claro con patrones de barras romboides asimétricas y alternadas en tonos que varían entre marrón y negro a lo largo de su cuerpo. Asimismo, la especie *Bothrops barnetti* está asociada con casos de mordeduras de serpientes en seres humanos, especialmente en áreas rurales, donde los agricultores, pastores y niños son los grupos más vulnerables a este tipo de accidentes (Calero et al., 2019; Sanchez et al., 2016) cabe recalcar que esta especie, es la única que se puede encontrar en las tres regiones naturales de Perú.

2.2. El veneno ofídico

El veneno ofídico es una secreción altamente especializada producida por las glándulas venenosas de serpientes (Amorim et al., 2017). Su composición varía significativamente entre las especies, adaptándose a las estrategias de caza y defensa de cada serpiente (Casewell et al., 2014). Los venenos de las serpientes pueden tener compuestos inorgánicos y biomoléculas, los cuales pueden poseer actividades fisiológicas y farmacológicas (Diniz-Sousa et al., 2023). Entre los compuestos inorgánicos se pueden incluir iones metálicos tales como calcio, potasio, hierro, cobalto, cobre y magnesio; sales y otros elementos químicos (Carvalho et al., 2013). Aunque su concentración puede ser menor en comparación con las biomoléculas, desempeñan un papel importante en la funcionalidad del veneno y en sus efectos sobre las presas (Diniz-Sousa et al., 2023). Por otro lado, las biomoléculas incluyen una variedad de proteínas, péptidos, lípidos y carbohidratos que actúan en conjunto para desencadenar efectos tóxicos (Rengifo & Rodríguez, 2004).

2.2.1. Proteínas ofídicas

Las proteínas son uno de los componentes principales del veneno de las serpientes y pueden ser tanto enzimáticas como no enzimáticas, que se organizan en diversas

categorías en función de su estructura y su rol biológico específico (Munawar et al., 2018). Las proteínas enzimáticas presentes en el veneno de las serpientes son moléculas que actúan como catalizadores biológicos, acelerando reacciones químicas específicas en el veneno o en el cuerpo de la presa (Dos Santos et al., 2011; Ahmed et al., 2012; Izidoro et al., 2014). Estas enzimas desempeñan un papel fundamental en la toxicidad del veneno al participar en la degradación de tejidos, la modulación de la coagulación sanguínea y la interrupción de la comunicación nerviosa (Iwanaga & Suzuki, 1979). Dentro de las enzimas más comunes halladas en el veneno de serpiente se encuentran las acetilcolinesterasas, las L-aminoácido oxidasas, las serinoproteasas, las metaloproteinasas y las fosfolipasas A₂ (Kang et al., 2011).

Las proteínas no enzimáticas presentes en el veneno de las serpientes son moléculas que, a diferencia de las enzimas, no actúan como catalizadores de reacciones químicas; en cambio, cumplen diversas funciones, como la unión a receptores específicos celulares o la modulación de la respuesta inmune de la presa (McLane et al., 1998; Fischer & Hugli, 1997). Estas proteínas no enzimáticas son esenciales para la interacción específica del veneno con las víctimas y para la eficacia de sus efectos tóxicos (McCleary & Kini, 2013; Sajevic et al., 2011). En los venenos de serpientes, se han identificado varias familias de estas proteínas no enzimáticas. Entre ellas se encuentran las proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISP) o helveprinas, snaclecs (lectinas de tipo C y proteínas relacionadas como las desintegrinas), inhibidores de proteinasa, factores de crecimiento nervioso, péptidos potenciadores de bradicinina, péptidos natriuréticos, toxinas de tres dedos, sarafotoxinas, factores del veneno de cobra, factores de crecimiento endotelial vascular, vesprinas, waprins y veficolinas (Vanuopadath et al., 2018; Mohamed et al., 2019).

2.2.2. Lípidos

La mayor parte de la investigación sobre el veneno de serpientes se ha enfocado en el análisis de las proteínas, es decir, las toxinas, con una atención limitada a otras partes del veneno. Un área que ha sido pasada por alto hasta el momento es la de los elementos lipídicos; sin embargo, los lípidos, a pesar de constituir una fracción relativamente minoritaria en el veneno de las serpientes en comparación con las proteínas y péptidos, pueden desempeñar un papel de relevancia en la toxicidad del veneno y en su interacción con las presas (Bolt, 2021). Un estudio realizado por

Kabara y Fischer (1969) proporciona una ilustración clara de este fenómeno. En su investigación con el veneno de la serpiente *Naja naja*, la eliminación de la fracción lipídica condujo a una notable disminución de la letalidad del veneno, reduciéndose en un rango de 40 a 50%. Este efecto se atribuye a que, al perder su fracción lipídica, el veneno se vuelve menos soluble en lípidos y experimenta dificultades significativas para atravesar de manera eficiente la bicapa lipídica que conforman las membranas celulares.

Los lípidos se encuentran en diversas formas en el veneno de las serpientes, abarcando triglicéridos, fosfolípidos, esfingolípidos y otros lípidos de naturaleza estructural y funcional (Cooke, 1986). Recientemente, la aplicación de enfoques de lipidómica ha permitido una caracterización más detallada de la composición lipídica en el veneno de serpientes. Por ejemplo, en el estudio de Acunha et al. (2021), se identificaron varias clases de lípidos en el veneno de *Crotalus durissus terrificus* y *Bothrops moojeni*. Estas clases de lípidos comprenden fosfatidilcolinas (PC), lisofosfatidilcolinas (Lyso-PCs), fosfatidiletanolaminas (PE), lisofosfatidiletanolaminas (Lyso-PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), ceramidas (Cer) y esfingomiélin (SM).

2.2.3. Carbohidratos en el veneno de las serpientes

Los carbohidratos presentes en el veneno de las serpientes son una categoría de componentes químicos que pueden desempeñar diversos roles en el veneno de las serpientes, incluyendo la contribución a la estabilidad de la estructura, la integridad y la actividad funcional de ciertas proteínas presentes en el veneno (Andrade-Silva et al., 2016). Uno de los roles destacados de los carbohidratos en el veneno de serpientes es su participación en la estructura tridimensional de las proteínas venenosas otorgándoles una variedad estructural propia de las proteínas (Brás-Costa et al., 2023). En este sentido, las glicoproteínas, que son proteínas unidas a cadenas de azúcares, pueden formar parte de la estructura de muchas toxinas del veneno de las serpientes, llegando a representar entre el 3% y el 90% de su composición. (DeKok & Rawitch, 1969; Hayes & Wellner, 1969; Lee, 1979; Raw et al., 1991; Stocker, 1990; Alves et al., 2008).

2.3. Proteínas no enzimáticas

Estas proteínas, a diferencia de sus contrapartes enzimáticas, no desempeñan un papel directo en la digestión de presas, pero su función es igualmente esencial. Estas proteínas exhiben una sorprendente gama de estrategias para garantizar la inmovilización eficaz de sus presas y maximizar la eficiencia en la caza producto de las adaptaciones evolutivas. (McCleary & Kini, 2013). Por ejemplo, las desintegrinas son una de las proteínas más notables en este contexto. Al interferir con la adhesión celular y evitar la formación de coágulos sanguíneos en la herida de la presa, estas proteínas facilitan la dispersión del veneno y garantizan que los efectos tóxicos se propaguen sistémicamente (Kuo et al., 2019). Por otro lado, las miotoxinas peptídicas son un ejemplo de cómo las serpientes venenosas han desarrollado proteínas que atacan directamente el tejido muscular de la presa afectando la membrana plasmática de las células musculares (Urdaneta et al., 2004). Esto resulta en una debilidad muscular o parálisis que disminuye significativamente la capacidad de la presa para escapar o defenderse, lo que beneficia a la serpiente (Mackessy & Saviola, 2016).

Las lectinas tipo C, por su parte, actúan interfiriendo con las funciones celulares al unirse específicamente a carbohidratos en la superficie celular de la presa (Eble, 2019). Esto puede conducir a una interrupción de las comunicaciones celulares normales y a la agregación plaquetaria en la sangre, contribuyendo así a su inmovilización (Shin & Morita, 1998). Otra clase de proteínas no enzimáticas presentes en el veneno ofídico son las proteínas secretoras ricas en cisteína, o CRISP por sus siglas en inglés. Estas proteínas son expresadas generalmente en los espermatoцитos y también se encuentran en los gránulos de neutrófilos en mamíferos, y tienen roles relacionados con el desarrollo de los espermatozoides y la protección del organismo huésped (Matsunaga et al., 2009); sin embargo, también se han recuperado estas mismas proteínas en el veneno de algunas serpientes, en el cual tienen la función de desencadenar respuestas inflamatorias en la presa, lo que puede contribuir tanto a su inmovilización como al proceso de digestión (Suntravat et al., 2019).

2.4. Desintegrinas ofídicas e integrinas

Las desintegrinas son una familia de proteínas pequeñas, no enzimáticas, ricas en cisteína y enlaces disulfuros que se originan en el veneno de serpientes a través de

la escisión proteolítica del precursor P-II SVMP (Oyama & Takahashi, 2017). Esta proteína se halla en los venenos de cuatro familias de serpientes: Viperidae, Atractaspididae, Elapidae y Colubridae (McLane et al., 2004; Kamiguti et al., 1998), siendo más prevalentes en vipéridos y crotálicos (Clement et al., 2023). Además, están involucradas en los mecanismos de adhesión celular (interrumpiendo la interacción célula-célula y célula matriz extracelular), la migración, la apoptosis, la inhibición de la agregación plaquetaria y la angiogénesis (Lazarovici et al., 2019; Saviola et al., 2013).

Las desintegrinas usualmente se clasifican de acuerdo con su tamaño y el número de puentes de enlace disulfuro (S-S) dividiéndose en cinco grupos. Las desintegrinas cortas tienen entre 41 y 51 aminoácidos con cuatro puentes S-S, las desintegrinas medianas cuentan con alrededor de 70 aminoácidos y seis puentes S-S, las desintegrinas largas constan de aproximadamente 84 aminoácidos y siete puentes S-S. El cuarto grupo de desintegrinas está formado por dominios similares a desintegrinas derivados de PIII-SVMP, estas desintegrinas están formadas por un dominio desintegrina N-terminal de aproximadamente 100 aminoácidos y 8 enlaces disulfuro, junto con un dominio C-terminal rico en cisteína de 110-120 residuos con 6 enlaces disulfuro. El quinto grupo abarca desintegrinas homo y heterodiméricas, donde las desintegrinas diméricas constan de subunidades de aproximadamente 67 residuos con cuatro enlaces disulfuro en cada cadena y dos enlaces de cisteína entre cadenas (Calvete et al., 2005).

Otro criterio de clasificación de las desintegrinas se basa en sus motivos de unión a integrinas, lo que da lugar a tres familias principales: RGD, MLD y R/KTS. (Rivas-Mercado & Garza-Ocañas, 2017). Además, las desintegrinas también se pueden clasificar según su acción inhibitoria, dependiendo de la integrina a la que bloquean. El primer grupo abarca las desintegrinas que interactúan con integrinas dependientes del motivo RGD, que incluyen la mayoría de desintegrinas monoméricas con motivos RGD, así como KGD, MVD, MGD y WGD. El segundo grupo está compuesto por desintegrinas de unión a integrinas de leucocitos que presentan el motivo MLD y se relacionan con integrinas $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$ y $\alpha 9\beta 1$. Por último, el tercer grupo consiste en desintegrinas con el motivo KTS, que son poderosos y selectivos inhibidores de las integrinas $\alpha 1\beta 1$, que son receptores específicos para el colágeno tipo IV (Vivas-Ruiz et al., 2012).

Por otro lado, las integrinas son receptores citoadhesivos que comprenden una superfamilia de moléculas heterodiméricas transmembrana localizándose en las superficies celulares; por ejemplo, la glucoproteína IIb/IIIa (fibrinógeno plaquetario), los receptores de vitronectina y fibronectina (Hynes, 1987). Estos receptores participan activamente en la adhesión y migración celular al acoplarse con las proteínas de la matriz extracelular circundante; además de formar parte en la interacción célula-célula. (Hynes, 1992). En este contexto, uno de los mecanismos más estudiados de las desintegrinas es su afinidad extremadamente alta con las integrinas, bloqueando de esta manera la posibilidad de las integrinas presentes en las plaquetas y otras células de unirse a sus ligandos (Gould et al., 1990).

La unión de una desintegrina a una integrina se fundamenta en la interacción entre las regiones extracelulares de ambas proteínas, la desintegrina contiene una secuencia altamente conservada conocida como el motivo RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), que es reconocido y se une al sitio de unión de la integrina (Scarborough et al., 1993). El sitio de reconocimiento del ligando de la integrina está formada por una cavidad o bolsillo en la subunidad alfa y beta de esta proteína (Loftus et al., 1996), este bolsillo es específico para reconocer el motivo RGD presente en la desintegrina (McLane et al., 1996). Sin embargo, es importante tener en cuenta que existen diferentes desintegrinas que se unen a diferentes tipos de integrinas. Por lo tanto, la unión específica entre una desintegrina y una integrina dependerá de las secuencias y estructuras particulares de ambas proteínas dada la diversidad de proteínas desintegrinas con especificidad por varias integrinas de la superficie celular.

Si bien es cierto que las desintegrinas llevan este nombre por contener el motivo RGD en su secuencia primaria de aminoácidos, que es capaz de unirse a las integrina (Gould et al., 1990), hay algunas desintegrinas que carecen de esta secuencia específica, en este caso, las desintegrinas "RGD negativas" o "independientes de RGD" utilizan sitios o mecanismos de unión alternativos para interactuar con las integrinas (Oliveira et al., 2018); por ejemplo, las desintegrinas heterodiméricas con tripéptido KTS (viperistatina, lebestatina y jerdostatina) y RTS (jerdostatina) bloquean específicamente la interacción de la integrina alfa beta con los colágenos IV y I *in vitro* y la angiogénesis *in vivo* (Calvete et al., 2007).

Poco es conocido acerca de las desintegrinas presentes en las especies del Género Bothrops presente en el Perú y que son clínicamente relevantes. En el 2012, se realizó el primer estudio proteómico del veneno de especies del Perú, tales como *B. pictus*, *B. barnetti* y *B. atrox* (Kohlhoff et al., 2012). En este estudio se reporta la presencia de proteínas desintegrinas o similares a desintegrinas en los venenos estudiados, no obstante, mayor caracterización no se ha realizado.

Por ello y por todo lo expuesto anteriormente, es que en la presente tesis, se da el primer abordaje, desde el punto de vista molecular, de la presencia de estas proteínas no enzimáticas en cuatro especies del género Bothrops que habitan en el Perú.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

Dado que a nivel proteómico se ha identificado la presencia de desintegrinas en el veneno de serpientes del Género *Bothrops*, entonces es posible la identificación y caracterización molecular de estas proteínas en los venenos de *Bothrops atrox*, *Bothrops pictus*, *Bothrops brazili* y *Bothrops barnetti* que habitan en el Perú

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo general

Determinar las características moleculares y estructurales de las proteínas desintegrinas presentes en el veneno de las especies *Bothrops atrox*, *Bothrops pictus*, *Bothrops brazili* y *Bothrops barnetti*.

3.2.2. Objetivo específicos

- Obtener las secuencias nucleotídicas de las desintegrinas de *Bothrops atrox*, *Bothrops pictus*, *Bothrops brazili* y *Bothrops barnetti*.
- Determinar las características moleculares *in silico* de las desintegrinas de *Bothrops atrox*, *Bothrops pictus*, *Bothrops brazili* y *Bothrops barnetti*.
- Establecer las estructuras tridimensionales de las proteínas desintegrinas de *Bothrops atrox*, *Bothrops pictus*, *Bothrops brazili* y *Bothrops barnetti*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

4.1.1. Material biológico

A. Veneno de serpiente

La investigación incluyó ejemplares adultos y jóvenes de *Bothrops atrox* (2 especímenes) de la región de Ucayali, *Bothrops pictus* (2 especímenes) de la región de Lima, *Bothrops brazili* (1 espécimen) de la región de Madre de Dios, y *Bothrops barnetti* (1 espécimen) de la región de Trujillo, mantenidos en cautiverio en el Serpentario “Oswaldo Meneses” del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). El veneno se colectó por presión manual sobre músculos compresores de la glándula venenosa y se trasladó a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL libres de RNAsas y con TRIzol (1:1), los cuales fueron almacenados en un sistema de refrigeración para su transporte al Laboratorio de Biología Molecular (LBM) de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) de la UNMSM para su posterior liofilización. El manejo de serpientes para la extracción del veneno, se realizó de acuerdo a lo establecido por el comité de Bioética de FCB-UNMSM (Código N°: 014-2022-CBE-FCB-UNMSM).

4.1.2. Materiales de laboratorio

A. Soluciones amortiguadoras y reactivos

- AgaPure™ Agarose LE (Canvax)
- Agua de grado molecular libre de nucleasas
- GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium)
- GeneRuler 100 bp (Thermo Scientific)
- Tampón TBE UltraPure™ 10X (Invitrogen)
- TRIzol (Invitrogen)

B. Enzimas

- Phusion Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific)
- RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor (Invitrogen)
- SuperScript™ III RT (Invitrogen)

C. Kits comerciales

- DNA Clean & Concentrator®-5 (Zymo Research)
- Phusion™ Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific)
- Qubit RNA HS Assay kit (Invitrogen)
- Qubit ssDNA HS Assay kit (Invitrogen)
- SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen)
- Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

D. Equipos

- Agitador Vortex (Kossodo)
- Balanza analítica (Addam)
- Bloque térmico (Labnet International)
- Cabina PCR (CRUMA)
- Cámara digital modelo PowerShot G15 (Canon).
- Cámara Mini Horizontal Electrophoresis Systems (VWR®)
- Espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific)
- Fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen)
- Fuente de poder MP-300v (Clever Scientific)
- Microcentrifuga Minispin Plus (Eppendorf)
- Termociclador Turbocycler 2.0 (Biotech)
- Transiluminador UV Clear View (Clever Scientific)

E. Herramientas bioinformáticas

- BioEdit 7.2
- BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)
- BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>)
- Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)
- Conserved Domains Database (CDD) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)
- GalaxyWEB (<https://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE>)
- GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>)
- MEGA-X

- NetNGlyc-1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/>)
- OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>)
- PDBsum (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/Generate.html>)
- PHD SECONDARY STRUCTURE PREDICTION METHOD - PRABI (https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_phd.html)
- PROSITE (<https://prosite.expasy.org/>)
- Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>)
- ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)
- ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>)
- PyMOL 2.5.5.
- STRING versión 12.0 (<https://string-db.org/>)
- SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive#sequence>)
- Translate tool - ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>)
- trRosetta (<https://yanglab.qd.sdu.edu.cn/trRosetta/>)

4.2. MÉTODOS

4.2.1 Aislamiento del ARN total

El ARN extracelular se purificó a partir del veneno liofilizado utilizando el reactivo comercial TRIzol (Invitrogen), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante con algunas modificaciones al protocolo. El proceso se llevó a cabo mediante la ejecución de los siguientes pasos: Se homogenizó el veneno liofilizado en TRIzol para su lisis a relación de 1 mL de TRIzol por 10 ng de veneno liofilizado y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente para asegurar la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas, a cada tubo se le adicionó 200 µL de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 s para mezclar completamente los componentes. Posteriormente se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12 000 rpm por 15 min a temperatura ambiente, se transfirió la fase acuosa que contiene el ARN a un nuevo tubo microcentrífuga de 1.5 mL conteniendo 500 µL de 2-propanol. Para la homogeneización se mezcló por inversión, luego se incubó por 5 min a temperatura ambiente, finalmente se centrifugó a 12 000 rpm por 5 min, eliminándose

el sobrenadante y el pellet (conteniendo el ARN) fue lavado con 1 mL de etanol al 75%. Se agitó brevemente con ayuda de un vortex volviéndose a centrifugar a 12 000 rpm por 5 min. Después el sobrenadante fue removido y el pellet se dejó secar a temperatura ambiente por 10 min. Por último, el pellet fue resuspendido en 16 µL de agua de grado molecular libre de nucleasas e incubado a 55 °C por 10 min para facilitar la resuspensión. Finalmente, se almacenó a -80 °C.

4.2.2 Síntesis de ADNc

Se empleó el kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) para llevar a cabo la transformación del ARN purificado en ADNc, de acuerdo con el protocolo del fabricante. El volumen de reacción fue de 20 µL, primero en cada tubo de microcentrífuga libre de nucleasas se agregó 5 µL de oligo(dT) 50 µM, 1 µL de dNTP Mix 10 mM, 10 a 25 ng de ARN total y agua de grado molecular libre de nucleasas hasta completar los 13 µL, la reacción se llevó a una temperatura de 65 °C durante 5 min y 4°C por 1 min. Posteriormente, se añadió a cada tubo 4 µL de 5X First-Strand Buffer, 1 µl de DTT 0.1 M, 1 µL de RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor (40 U/µl) y 1 µL de SuperScript™ III RT (200 U/µL) se mezcló pipeteando suavemente y para culminar se incubó a 50°C por 60 min y se inactivó la reacción a 70°C durante 15 min. Los productos fueron almacenados a -20 °C.

Se utilizó el fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen) y el espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific) para cuantificar tanto el ARN como el ADNc, siguiendo las instrucciones del fabricante y empleando los kits de alta sensibilidad específicos para cada secuencia nucleotídica Qubit RNA HS Assay y Qubit ssDNA HS Assay.

4.2.3. Diseño de cebadores

El diseño de los cebadores consistió en el alineamiento múltiple de las secuencias de ARNm de la familia de desintegrinas de PII-metaloproteinasa. Para obtener estas secuencias primero se seleccionaron ARNm de secuencias que incluyan los segmentos codificantes y no codificantes de PII-metaloproteinasa presentes en el veneno de serpientes del género Bothrops obtenidas de la base de datos GenBank (Benson et al., 2012) (Tabla 1). Posteriormente mediante Conserved Domains Database (CDD) (Marchler-Bauer & Bryant, 2004) del NCBI se delimitó las secuencias que pertenecen a la familia de desintegrinas, después se alinearon las nuevas

secuencias empleando el programa MEGA-X (Kumar et al., 2018) mediante el algoritmo Clustal W. Luego, se diseñaron los cebadores específicos para los ADNc que codifican las desintegrinas de PII-metaloproteinasas en base al alineamiento múltiple realizado, eligiendo las regiones altamente conservadas y en el caso del cebador *reverse* también se consideró que pertenezca a la región externa de las secuencias codificantes de desintegrinas, con el propósito de garantizar que la secuenciación de las regiones amplificadas no pierda su calidad en el extremo 3'. Finalmente, se analizaron los cebadores *forward* y *reverse* mediante la herramienta Oligo Analyzer Tool de IDT SciTools (Owczarzy et al., 2008) y se seleccionaron dichos cebadores teniendo en cuenta los valores ideales para la longitud del cebador, el porcentaje de GC y la temperatura de fusión. En cuanto a la síntesis de los cebadores, esta fue llevada a cabo por el servicio de Custom DNA Oligos Synthesis de Thermo Fisher Scientific.

Tabla 1. Código GenBank y organismo de procedencia del ARNm de PII-metaloproteinasas.

Especie	Código GenBank
<i>Bothrops insularis</i>	AY736107.1
<i>Bothrops jararaca</i>	AF345931.1
<i>Bothrops jararacussu</i>	AY258153.1
<i>Bothrops neuwiedi</i>	HM443642.1
<i>Bothrops neuwiedi</i>	HM443639.1
<i>Bothrops neuwiedi</i>	HM443641.1
<i>Bothrops neuwiedi</i>	HM443637.1
<i>Bothrops neuwiedi</i>	HM443640.1
<i>Bothrops neuwiedi</i>	HM443638.1

4.2.4. Amplificación de ADNc

Se amplificó el ADNc codificante de la desintegrina mediante el uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final convencional (termociclador Turbocycler 2.0, Biotec). Se usó Phusion™ Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) según las indicaciones del fabricante. Esta polimerasa tiene la capacidad de replicar con alta precisión disminuyendo

drásticamente los errores o mutaciones durante el proceso de amplificación. La composición de la mezcla de amplificación para un volumen de 20 μL incluye lo siguiente: 0.2 μL de Phusion Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) a una concentración de 2 U/ μL , 4 μL de Phusion HF Buffer 5X, 0.4 μL de dNTPs 10 mM, 0.5 μL de cebador *forward* 10 μM , 0.5 μL de cebador *reverse* 10 μM , aproximadamente 10 ng de muestra de ADNc y se completó con agua grado molecular hasta llegar a 20 μL . Las condiciones de amplificación en el termociclador se programaron de la siguiente manera: denaturación inicial de 98 °C por 30 s; 35 ciclos de denaturación de 98 °C por 10 s, alineamiento de 59 °C por 30 s y elongación de 72 °C por 10 s; y un ciclo de elongación final de 72 °C por 10 s.

4.2.5. Electroforesis en gel de agarosa en bajo punto de fusión

Se realizó análisis de electroforesis en geles de agarosa al 0.8% con AgaPure™ Agarose LE (Canvax), que tiene el punto de fusión más bajo, también se empleó el Tampón TBE UltraPure™ 10X (Invitrogen) a una concentración de 1X para evaluar el tamaño de los fragmentos generados mediante PCR. El marcador de peso molecular utilizado fue GeneRuler 100 bp (Thermo Scientific), el buffer de carga incluía al colorante GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) 10,000 X. En cada carril se colocó 15 μL de muestra y 2 μL del buffer de carga. Las muestras se corrieron a 90 V durante 65 min empleando una cámara VWR® Mini Horizontal Electrophoresis Systems y una fuente de poder modelo MP-300v (Clever Scientific), las bandas fueron visualizadas en un transiluminador UV Clear View (Clever Scientific) acoplado a un sistema microDOC (Clever Scientific) y las imágenes se capturaron con una cámara digital modelo PowerShot G15 (Canon).

4.2.6. Purificación de los productos amplificados

Se purificaron los productos amplificados antes de la secuenciación para optimizar la eficiencia asegurando que se consigan resultados precisos y de alta calidad. La purificación se efectuó con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), los pasos que se siguieron se describen a continuación: Tras llevarse a cabo la electroforesis, se extrajo la banda de ADN del gel colocándolo en un tubo centrífuga de 1.5 mL, pesando previamente el tubo. Nuevamente se volvió a pesar el tubo esta vez con la banda del gel, se agregó 10 μL de Membrane Binding Solution por cada 10 mg de gel, se homogeniza la mezcla con vortex y se incubó a 55 °C por

aproximadamente 10 min hasta que el gel se disolvió por completo. El gel disuelto se transfirió a una minicolumna SV insertada en un tubo de recolección, se centrifugó por 1 min a 12 000 rpm, se desechó el contenido del tubo de recolección y se volvió a colocar la minicolumna, se añadió 700 μ L de Membrane Wash Solution, posteriormente se centrifugó a 12 000 rpm por 1 min, de nuevo se descartó el contenido en el tubo recolector, se insertó el tubo de minicolumna SV y se repitió el paso anterior usando 500 μ L de Membrane Wash Solution y 5 min de centrifugación a 12 000 rpm, para permitir la evaporación de los restos de etanol, se volvió a centrifugar por 1 min con la tapa abierta. En el paso de elución, se trasladó la minicolumna a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, se agregó a la minicolumna 50 μ L de agua libre de nucleasas y se incubó a temperatura ambiente por 1 min, para finalizar, se centrifugó a 12 000 rpm por 1 min y se guardó el tubo de microcentrífuga a -20 °C.

4.2.7. Concentración de los productos amplificados

Con el objetivo de lograr una adecuada concentración (10 - 15 ng/ μ L) para la secuenciación de las muestras amplificadas; los fragmentos purificados conseguidos mediante la PCR fueron sometidos a un proceso de concentración utilizando el kit comercial DNA Clean & Concentrator®-5 (Zymo Research) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. En un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, se agregaron 5 volúmenes de DNA Binding Buffer por cada volumen de ADN. Posteriormente, se mezcló brevemente por vortex para obtener una homogeneización adecuada y la mezcla fue transferida a una columna Zymo-Spin™ ubicada en un tubo de recolección, luego se centrifugó a 12 000 rpm por 30 s a temperatura ambiente y se descartó el contenido del tubo de recolección. Se añadieron 200 μ L de DNA Wash Buffer a la columna, se centrifugó nuevamente a 12 000 rpm durante 30 s a temperatura ambiente. Este paso de lavado se repitió una vez más, después se añadió 6 μ L de DNA Elution Buffer colocando este reactivo directamente a la matriz de la columna. Finalmente, la muestra se incubó a temperatura ambiente durante 1 min. Seguidamente, se transfirió la columna a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se centrifugó a 12 000 rpm por 30 s para eluir el ADN concentrado. Para determinar la concentración final de cada muestra se cuantificó usando el fluorómetro Qubit 2.0 con el kit de ensayo Qubit HS DNA.

4.2.8. Secuenciación de ADN

La secuencia nucleotídica del ADN concentrado fue determinada por solicitud del servicio Ez-Seq a la compañía MacroGen Inc (Corea del Sur). Para esto, se utilizó un secuenciador automatizado ABI 3730XL. Posteriormente, las secuencias generadas fueron analizadas y editadas mediante la herramienta bioinformática ClustalW del programa BioEdit 7.2. (Hall, 1999). La identificación en base a su semejanza de dichas secuencias editadas con otras secuencias fue realizada mediante un proceso de alineamiento múltiple con la base de datos del GenBank utilizando el algoritmo BLASTn (McGinnis & Madden, 2004). Además, con el programa Translate tool - ExPASy se tradujo la secuencia nucleotídica a una secuencia aminoacídica. La secuencia aminoacídica deducida fue sometida a análisis utilizando el programa BLASTp (McGinnis & Madden, 2004).

4.2.9. Alineamiento múltiple y clasificación de las desintegrinas

Se realizó un alineamiento múltiple utilizando la herramienta en línea Clustal Omega (Sievers & Higgins, 2014), con el formato de salida configurado como ClustalW. Este proceso incluyó las secuencias de aminoácidos deducidas de las desintegrinas pertenecientes a las cuatro especies de *Bothrops*, junto con otras secuencias de desintegrinas obtenidas de la base de datos Protein Data Bank (PDB) (Burley et al., 2017) como base de datos fuente. Las secuencias del alineamiento se organizaron de acuerdo con la clasificación basada en tamaño y el número de puentes disulfuro, como se detalla en el Anexo 1. Además, las desintegrinas de las especies de estudio (*B. atrox*, *B. pictus*, *B. barnetti* y *B. brazili*) también se clasificaron según Vasconcelos et al., 2021, quienes emplearon un método de clasificación considerando un patrón de puentes disulfuro (S-S) y firmas de secuencia particulares, para así poder analizar de manera estructural a las desintegrinas.

4.2.10. Predicción de propiedades fisicoquímicas

Se hizo uso de la herramienta en línea ProtParam (Gasteiger et al., 2005) y las secuencias proteicas deducidas de desintegrinas para predecir las características como el punto isoeléctrico (pI), la masa molecular, el índice alifático y el índice de hidrofobicidad (GRAVY). Asimismo, ProtScale (Gasteiger et al., 2005) se utilizó para analizar el índice de hidrofobicidad, identificando las áreas hidrofóbicas e hidrofílicas

de la proteína según la escala de Kyte & Doolittle; además de observar el puntaje asignado a cada residuo analizado, lo que proporciona información sobre su naturaleza hidrofóbica o hidrofílica. Ambas herramientas se hicieron disponibles en el servidor ExPASy Proteomic Tools.

4.2.11. Predicción de interacciones proteína-proteína

Se empleó el programa STRING versión 12.0 (Szklarczyk et al., 2023), una plataforma que funciona como una base de datos biológica en línea, que proporcionó información sobre interacciones entre proteínas, tanto confirmadas como proyectadas, para predecir las posibles interacciones en las que podrían estar involucradas las desintegrinas objeto de estudio. Se llevó a cabo una búsqueda utilizando las secuencias de aminoácidos de cada desintegrina, seleccionando *Homo sapiens* como organismo de referencia y estableciendo un umbral de confianza de 0.45 para todas las interacciones de proteínas.

4.2.12. Predicción de estructuras secundarias y terciarias

Se utilizó el servidor del Pôle Rhône-Alpes de bioinformatique (PRABI) para predecir las estructuras secundarias usando el algoritmo PHD (Rost et al., 1994). Adicionalmente, se emplearon las herramientas NetNGlyc-1.0 (Gupta & Brunak, 2001) para predecir los motivos de N-glicosilación en la secuencia aminoacídica. Por otro lado, se llevó a cabo la búsqueda de dominios conservados en la secuencia aminoacídica utilizando PROSITE (Sigrist et al., 2002) y Conserved Domains Database (CDD) (Marchler-Bauer & Bryant, 2004) para poder indicar a qué familia pertenecen las desintegrinas obtenidas.

4.2.13. Modelamiento estructural de las desintegrinas

Para predecir las estructuras tridimensionales, se emplearon dos programas de modelado. El primero fue SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018), un sistema de modelado de homología de estructuras de proteínas completamente automatizado, accesible a través del servidor web ExPASy. En este enfoque, se seleccionaron plantillas de estructuras cristalizadas que no solo cumplieran con estándares de calidad apropiados (Anexo 2), sino que también pertenecían al mismo grupo de clasificación de las desintegrinas de *Bothrops*, predicho en el alineamiento múltiple y en el análisis de las firmas de secuencias. El segundo programa utilizado fue trRosetta (Du et al.,

2021), que genera la estructura de la proteína mediante cálculos de minimización directa de energía. En este caso, se optó por la opción de crear un modelo tridimensional sin el uso de plantillas, conocido como enfoque "ab initio". Se llevó a cabo la mejora de las estructuras modeladas utilizando el programa GalaxyWEB (Ko et al., 2012). En el caso de los modelos generados por SWISS-MODEL, se emplearon las mismas plantillas utilizadas en el modelamiento por homología como estructura de referencia para el refinamiento del modelo.

La calidad de los modelos se verificó mediante el empleo del programa PDBsum (Laskowski, 2001) de EMBL-EBI antes y después de refinar las estructuras modeladas usando GalaxyWEB. PDBsum produce gráficos de Ramachandran y analiza la geometría general de la estructura tridimensional, así como la conformación de residuo por residuo. Finalmente, las estructuras tridimensionales se visualizaron y ajustaron para permitir la observación de los puentes disulfuro y el motivo RGD utilizando el software PyMOL, en su versión 2.5.5.

V. RESULTADOS

5.1. Aislamiento del ARN total

Se logró aislar el ARN a partir de veneno liofilizado de *Bothrops atrox*, *Bothrops pictus*, *Bothrops barnetti* y *Bothrops brazili* usando el método de TRIZOL para posteriormente proceder con la conversión a ADNc. Para determinar la cantidad del ARN obtenido, se utilizó la fluorimetría y la espectrofotometría mediante el equipo Qubit 2.0 y Nanodrop Lite, respectivamente. Como se puede observar en la Tabla 2, se logró obtener una cantidad significativa de ARN con un nivel de pureza adecuado. Los resultados de la cuantificación mediante espectrofotometría muestran una cantidad buena de ARN y una pureza que cumple con los estándares requeridos; sin embargo, los resultados por fluorimetría mostraron que las cantidades presentes estaban por debajo del rango de sensibilidad para ser detectado por el kit Qubit RNA HS Assay (<0.02 ng/μL). Asimismo, en la Tabla 3, se presenta los resultados de los rendimientos logrados en cada especie.

Tabla 2. Cuantificación del ARN total de *B. atrox*, *B. pictus*, *B. barnetti* y *B. brazili* a partir de veneno liofilizado.

Especie	Cantidad de veneno (mg)	Cuantificación (ng/μL)	Pureza A260/A280
<i>B. atrox</i>	10	84.3	2.0
<i>B. pictus</i>	10	70.7	1.99
<i>B. barnetti</i>	10	95.2	2.02
<i>B. brazili</i>	10	71.2	2.2

Tabla 3. Rendimiento del ARN total por especie a partir de veneno liofilizado.

Especie	Rendimiento (μg ARN / mg veneno)
<i>B. atrox</i>	0.13 (2.00)*
<i>B. pictus</i>	0.11 (1.99)*

<i>B. barnetti</i>	0.15 (2.02)*
<i>B. brazili</i>	0.11 (2.2)*

* Relación A260/280

5.2. Síntesis de ADNc

El proceso de conversión del ARN a ADNc mediante el uso de la enzima SuperScript™ III Reverse Transcriptase fue realizado de manera exitosa. Se llevó a cabo la síntesis de dos tubos de ADNc por especie, cada uno con un volumen de 20 µL, a partir un tubo inicial que contenía 7 µL de ARN. Este procedimiento permitió obtener una cantidad y rendimiento adecuado, proporcionando un ADNc con una pureza apropiada para su posterior empleo en la amplificación. La Tabla 4 muestra las cuantificaciones del ADNc realizadas en los 8 tubos (dos por cada especie), mediante fluorimetría (Qubit). Por otro lado, en la Tabla 5 se presentan los resultados de los rendimientos del ADNc obtenidos en cada especie.

Tabla 4. Cuantificación del ADNc obtenido por especie.

Especie	Cantidad del ARN (ng)	Cuantificación (ng/µL)
<i>B. atrox</i>	590.1	16.3
<i>B. atrox</i>	590.1	20.6
<i>B. pictus</i>	494.9	12.2
<i>B. pictus</i>	494.9	12.3
<i>B. barnetti</i>	666.4	16.1
<i>B. barnetti</i>	666.4	12.9
<i>B. brazili</i>	498.4	14.6
<i>B. brazili</i>	498.4	10.3

Tabla 5. Rendimiento del ADNc por especie.

Especie	Rendimiento ($\mu\text{g ADNc} / \mu\text{g ARN}$)
<i>B. atrox</i>	0.63 \pm 0.07
<i>B. pictus</i>	0.50 \pm 0.002
<i>B. barnetti</i>	0.44 \pm 0.05
<i>B. brazili</i>	0.50 \pm 0.09

5.3. Diseño de cebadores

Las secuencias de los cebadores *forward* y *reverse* sintetizados por el servicio de Custom DNA Oligos Synthesis se proporcionan en la Tabla 6. A fin de obtener la secuencia completa y precisa de los fragmentos de interés, el cebador *reverse* se ubicó en la región no codificante para lograr una mayor fidelidad en la secuenciación del extremo 3' de la desintegrina. El cebador *forward* tiene una longitud de 18 pb, la composición de sus bases es de 50.0% GC, su temperatura de fusión es de 50.9 °C. Con respecto al cebador *reverse*, este presenta 20 pb con un 45% GC y una temperatura de fusión de 51.4 °C. Asimismo, ambos cebadores otorgan una diferencia de temperatura de fusión de 0.5 °C y presentan en sus extremos 3' al menos dos nucleótidos de guanina o citosina.

Tabla 6. Parejas de cebadores para la amplificación de desintegrinas de PII-metaloproteinasas.

Sentido	Secuencia
<i>Forward</i>	5' - GAAGAATGTGACTGTGGC - 3'
<i>Reverse</i>	5' - CATTCCATCTCCATTGTTGG - 3'

5.4. Amplificación del ADNc

Los ADNc fueron amplificados por la PCR convencional con los cebadores diseñados y la polimerasa Phusion™ Hot Start II High-Fidelity, el producto de amplificación se

observa en las bandas originadas en la electroforesis de agarosa al 0.8% con aproximadamente 200 pb de longitud (Figura 1).

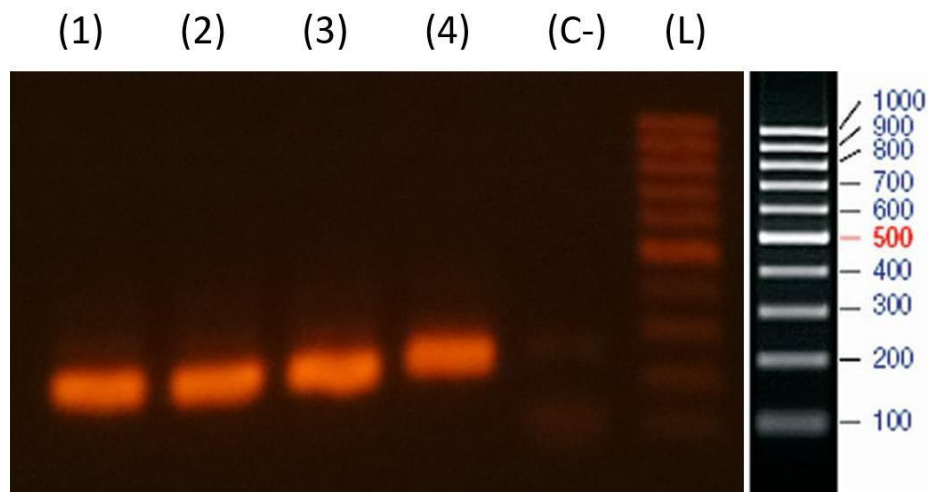


Figura 1. Amplificación del gen de la desintegrina de PII-metaloproteínasa obtenidas a partir de veneno liofilizado. Carril 1, 2, 3 y 4, productos de la PCR a partir del ADNc total de *B. atrox*, *B. pictus*, *B. barnetti* y *B. brazili*, respectivamente. Carril C -: control negativo. Carril L: GeneRuler 100 pb DNA Ladder.

5.5. Secuenciación del ADN

Los fragmentos de ADN amplificados mediante la PCR fueron purificados y concentrados antes de su secuenciación; cada muestra se secuenció utilizando los cebadores *forward* y *reverse* correspondientes. Se consiguieron secuencias de 213 pb en *B. atrox* y *B. Barnetti*; mientras que, *B. pictus* presentó 222 pb y *B. brazili* de 204 pb. Al realizar la comparación por separado de las secuencias de cada especie con otras presentes en la base de datos del GenBank mediante el programa BLASTn, se pudo identificar que tienen un porcentaje de identidad mayores al 90 % con los genes de metaloproteínasa y desintegrina ofídicas, en su mayoría, del género *Bothrops* (Anexo 3).

Haciendo uso del programa Translate tool - ExPASy se logró determinar la secuencia de aminoácidos correspondiente a cada proteína (Figura 2), teniendo 70 aminoácidos en la proteína desintegrina de *B. atrox* y *B. Barnetti*, 73 aminoácidos en *B. pictus* y 67 aminoácidos en *B. brazili*. Dentro de los 6 marcos de lectura posibles que arroja el programa se eligió el ORF+1 en las desintegrinas de las 4 especies, el cual abarcaba toda la secuencia nucleotídica. El análisis de alineamiento utilizando la herramienta BLASTp (Anexo 4) reveló que las secuencias de aminoácidos deducidas de *B. atrox*,

B. pictus, *B. barnetti* y *B. brazili* presentan un alto grado de conservación con las desintegrinas y metaloproteinasas de otras serpientes que en su mayoría son del género *Bothrops*, alcanzando más del 80 % en los porcentajes de identidad.

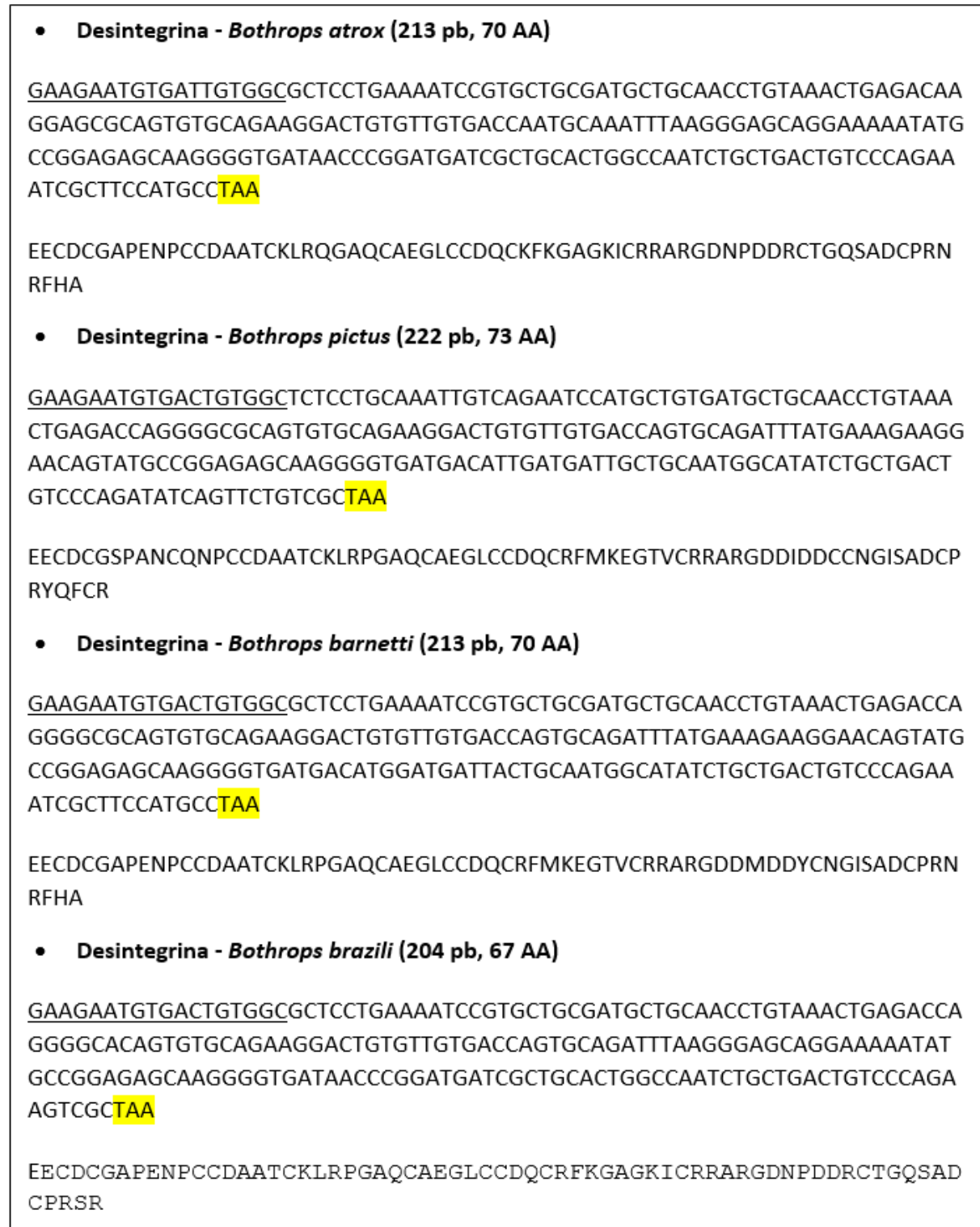


Figura 2. Secuencias de aminoácidos codificantes y nucleótidos de desintegrinas escindidas de metaloproteinasas de tipo II en *Bothrops atrox*, *Bothrops pictus*, *Bothrops barnetti* y *Bothrops brazili*. Los

sitios de acoplamiento del cebador *forward* están subrayados y el codón de terminación de cada secuencia nucleotídica está resaltado.

5.6. Alineamiento múltiple y clasificación de las desintegrinas

El análisis de alineamiento múltiple de desintegrinas encontradas en el veneno de serpientes del género *Bothrops* y de otros géneros (Figura 3) pone de manifiesto una región conservada que corresponde al motivo RGD (arginina-aspartato-glicina), conocido por su papel en el reconocimiento de los receptores de integrina; sin embargo, no todas las desintegrinas utilizadas en el alineamiento poseen este motivo, ya que algunas desintegrinas presentan otros motivos de unión a integrinas, como RTS, KTS, KDD y MSE. Además, al clasificar las desintegrinas en función a la longitud de la secuencia de aminoácidos, se observa que las desintegrinas de *B. atrox*, *B. pictus*, *B. barnetti* y *B. brazili* pertenecen al grupo de desintegrinas medianas. Curiosamente, en la desintegrina de la especie *Bothrops pictus*, se encuentra una adición de tres aminoácidos en comparación con las secuencias de desintegrinas medianas alineadas de otras especies. En lo que respecta a la clasificación de las desintegrinas basada en las firmas de secuencias específicas (Anexo 5), todas las desintegrinas estudiadas fueron categorizadas dentro del grupo 4 (Figura 4).

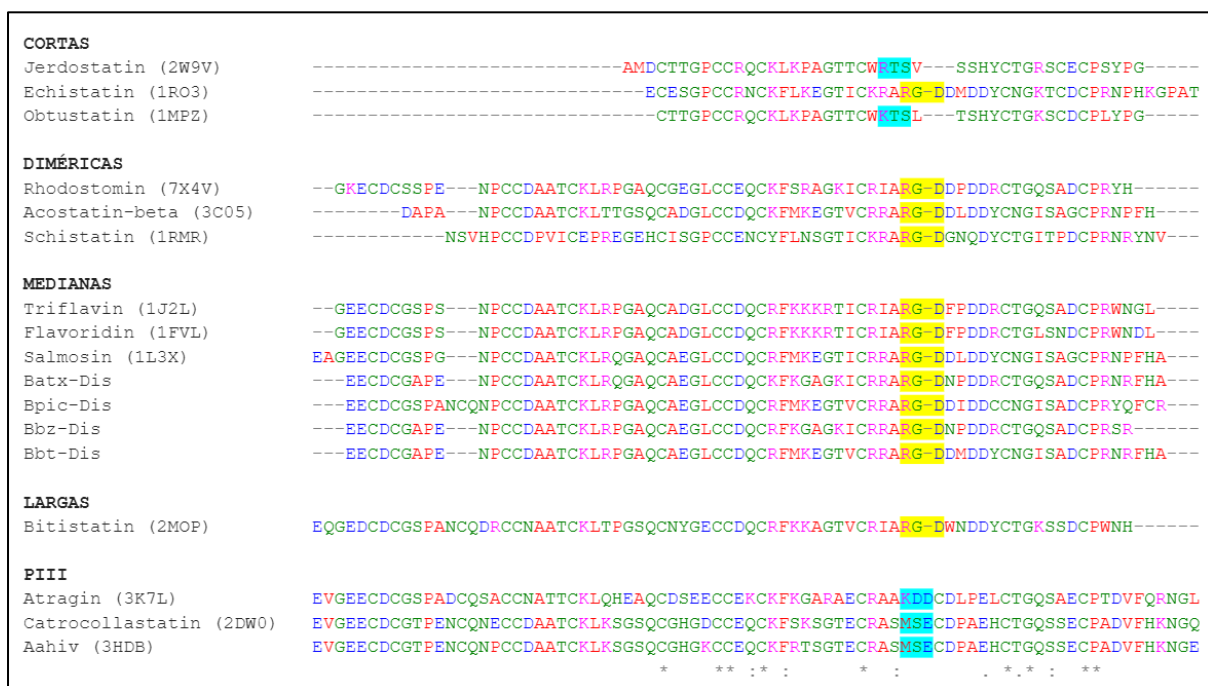


Figura 3. Alineamiento múltiple de desintegrinas. El símbolo (*) representa posiciones conservadas, (:) denota conservación entre grupos de propiedades fuertemente similares (puntuación >0,5 en la

matriz Gonnet PAM 250) y (.) muestra conservación entre grupos de propiedades débilmente similares (puntuación ≤ 0.5 en la matriz Gonnet PAM 250). Los colores reflejan la naturaleza química de los aminoácidos: azul-ácido; verde-polar sin carga; magenta- básico; y rojo-apolar. Los motivos RGD están sombreados en amarillo y los motivos no RGD están sombreados en celeste. Se proporcionan los códigos de acceso de Protein Data Bank. Abreviación: Batx-Dis (Desintegrina de *B. atrox*), Bpic-Dis (Desintegrina de *B. pictus*), Bbz-Dis (Desintegrina de *B. brazili*) y Bbt-Dis (Desintegrina de *B. barnetti*).

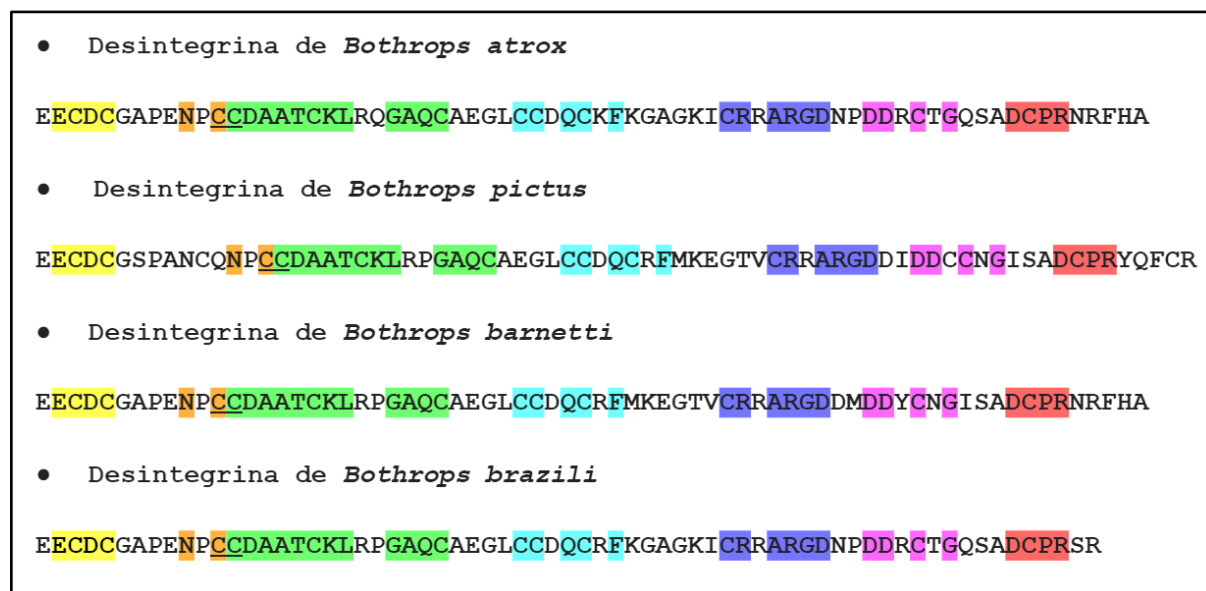


Figura 4. Firmas de secuencias del grupo 4 de las desintegrinas de especies del género *Bothrops*, según la clasificación de Vasconcelos et al., 2021. Cada color corresponde a una firma de secuencia específica: amarillo para GxECDC, naranja para NxCC, verde para CCDAATCKLxxGAQC, celeste para CCxQCxF, púrpura para CRxARGD, magenta para DDxCxG y rojo para DCPR, donde "x" indica variaciones en el residuo de aminoácido. Las regiones subrayadas indican residuos compartidos por dos de estas firmas.

5.7. Predicción de propiedades fisicoquímicas

Se realizó un análisis fisicoquímico de las desintegrinas inferidas en cada especie, esta evaluación se llevó a cabo utilizando la herramienta Protparam, y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7. Las desintegrinas examinadas tienen una masa molecular de 7.14 a 7.95 kDa y un punto isoeléctrico (pI) de 4.69 a 6.76, teniendo una tendencia a ser neutras o ligeramente ácidas en un rango de pH fisiológico. En relación con el índice de inestabilidad, el cual proporciona una estimación de la estabilidad de la proteína *in vitro*, los datos obtenidos muestran que las desintegrinas tienen valores de 35.63 a 50.87. Por otro lado, el índice alifático que determina el volumen relativo ocupado por las cadenas laterales alifática, arroja valores de 29.40

a 34.93 y el promedio general de hidropatía (GRAVY) oscila entre los valores de -0.869 a -0.555 indicando una tendencia hidrofílica. La figura 5 ilustra la disposición de la hidrofobicidad e hidrofiliidad relativa de los residuos de aminoácidos, tal como se obtuvo mediante el análisis realizado con el programa ProtScale. En esta representación, se observa claramente que los aminoácidos hidrofílicos se encuentran en las inmediaciones de la posición 50 de las desintegrinas, donde se ubica el motivo de unión a la integrina RGD. Por otra parte, las zonas más hidrofóbicas se identifican en los residuos de la primera mitad de las secuencias.

Tabla 7. Predicción de parámetros fisicoquímicos de las desintegrinas halladas en las 4 especies estudiadas.

Parámetros	<i>B. atrox</i>	<i>B. pictus</i>	<i>B. barnetti</i>	<i>B. brazili</i>
Masa molecular (kDa)	7.53	7.95	7.65	7.14
Punto isoeléctrico (pI)	6.76	4.69	4.75	6.40
Índice de inestabilidad	41.85	35.63	37.12	50.87
Índice alifático	29.57	34.93	32.29	29.40
Promedio general de hidropatía (GRAVY)	-0.869	-0.555	-0.681	-0.869

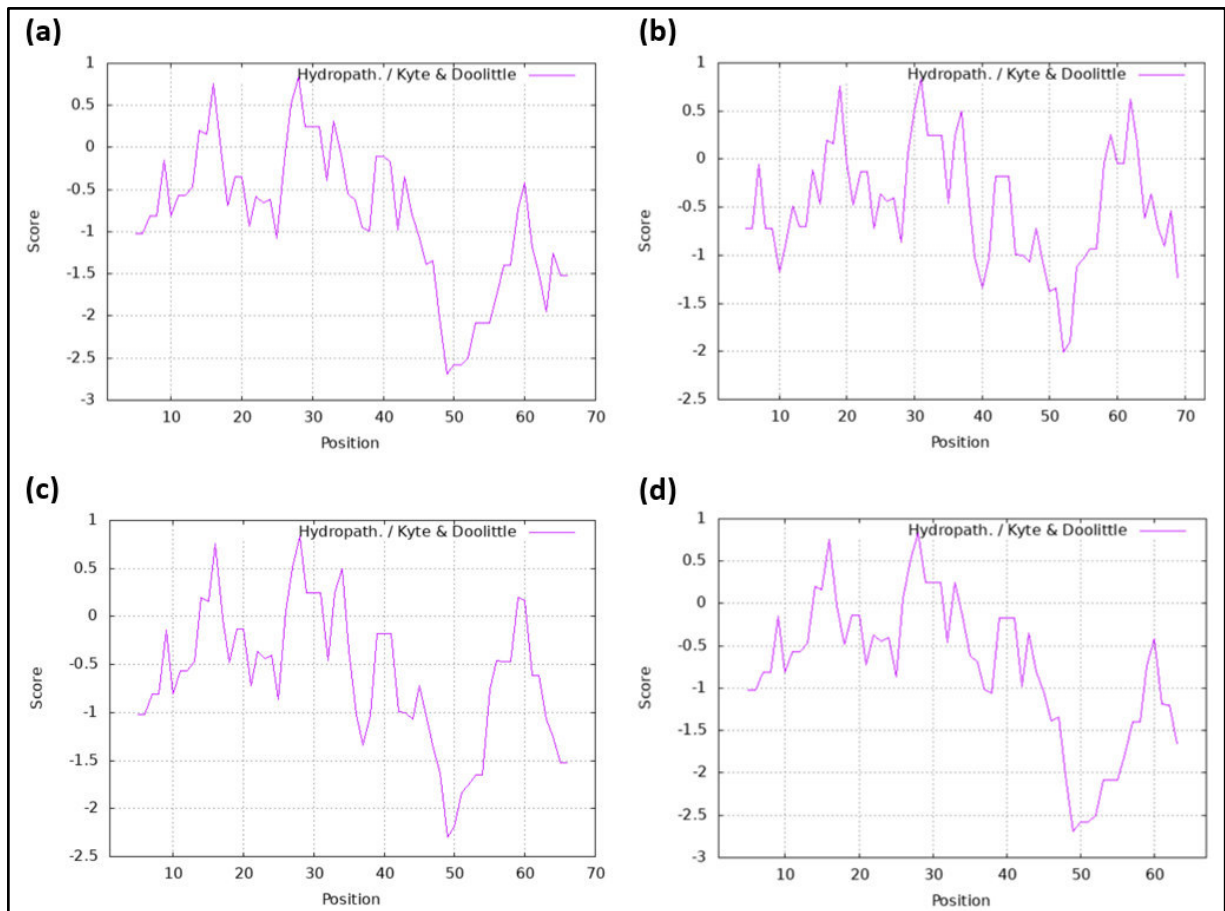


Figura 5. Escalas de hidrofobicidad en las secuencias de desintegrinas del género *Bothrops*. se presentan las desintegrinas de *B. atrox* (a), *B. pictus* (b), *B. barnetti* (c) y *B. brazili* (d), con sus perfiles de hidrofobicidad predichos mediante la herramienta ProtScale y la escala de Kyte & Doolittle.

5.8. Predicción de interacciones proteína-proteína

Con el propósito de anticipar posibles conexiones entre las desintegrinas y otras proteínas, se utilizaron las secuencias de aminoácidos deducidas de las desintegrinas junto con la herramienta STRING versión 12.0. Esto permitió la construcción de una red de interacciones que incluye las proteínas con mayor similitud en las secuencias de aminoácidos de las desintegrinas utilizadas y valores de "e-value" más bajos. En este contexto, se identificaron las siguientes asociaciones: ADAM8 en relación a la desintegrina de *B. atrox*, ADAM19 en el caso de la desintegrina de *B. pictus*, y ADAM33 para las desintegrinas de *B. barnetti* y *B. brazili* (consultar Anexo 6 para más detalles). Gracias a esta estrategia, se logró identificar potenciales asociaciones entre las desintegrinas y las proteínas presentes en *Homo sapiens sapiens*, como se muestra en la Figura 6 y se detalla en el Anexo 7. Es importante señalar que un puntaje más alto en las interacciones predichas entre las proteínas indica una mayor

probabilidad de validez. En este sentido, se destaca la posible vinculación de ADAM8 con la proteína ribosómica mitocondrial L13 (MRPL13), sugiriendo una relación en funciones celulares esenciales como la diferenciación celular y la apoptosis. Además, se plantea la interacción entre ADAM19 y la proteína 2A que contiene dominios SH3 y PX (SH3PXD2A) como un mecanismo potencial para coordinar procesos celulares relacionados con la dinámica de la matriz extracelular y la movilidad celular. Por otro lado, la propuesta de interacción entre ADAM33 y la proteína de dedo PHD 11 (PHF11) sugiere una conexión en la regulación de eventos celulares, particularmente en respuestas inmunológicas y la expresión de citoquinas específicas.

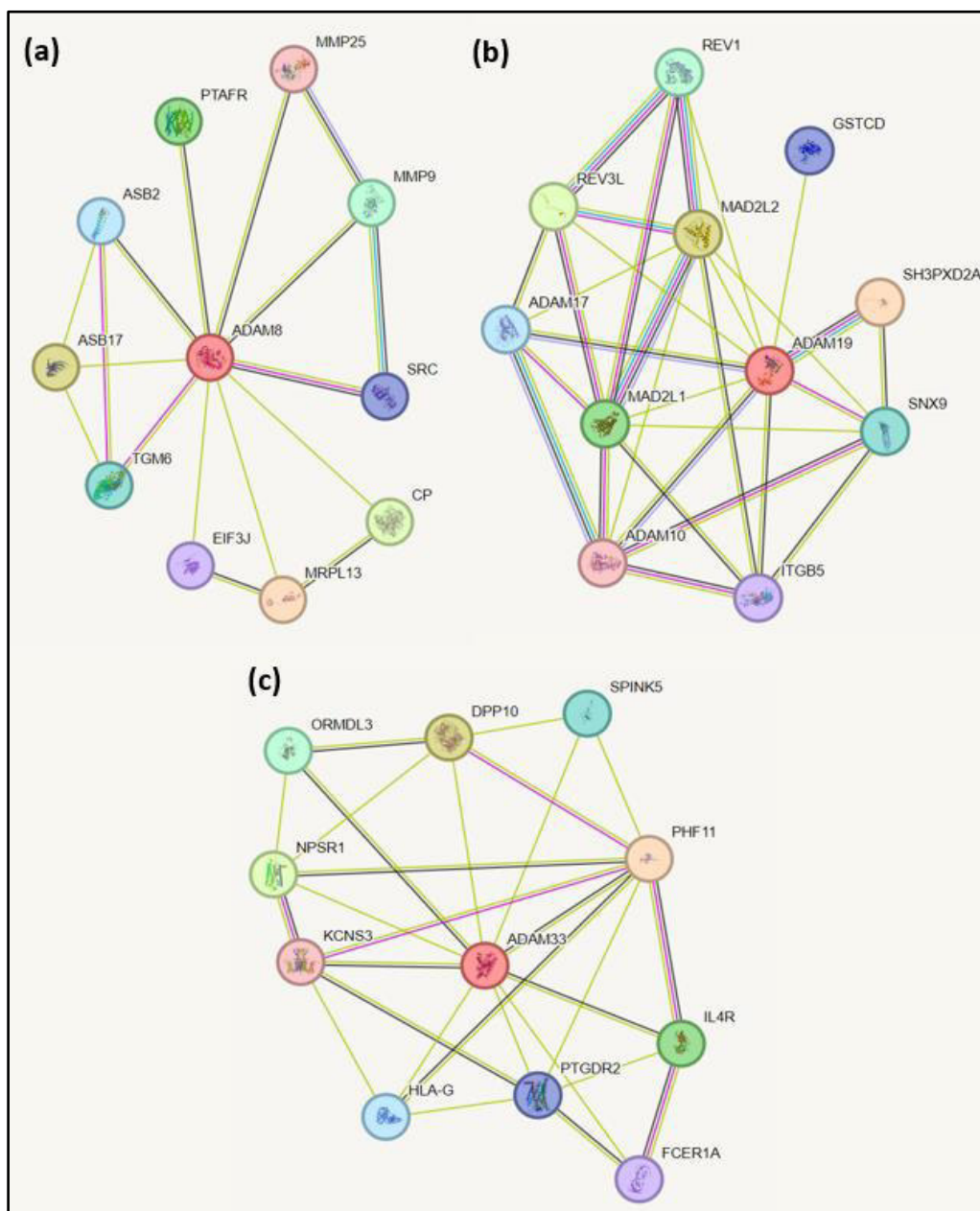


Figura 6. Representación de la red de interacción entre las proteínas que exhiben similitud con las desintegrinas del género *Bothrops*. Las redes de interacciones de las desintegrinas de *B. atrox* (ADAM8 en a), *B. pictus* (ADAM19 en b), *B. barnetti* y *B. brazili* (ADAM33 en c) fueron generadas utilizando el algoritmo de la herramienta Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING). Los círculos en la figura representan las proteínas, y las líneas señalan las interacciones entre ellas. La codificación de colores de las líneas denota el tipo de asociación proteína-proteína: verde para evidencia bibliográfica, negro para coexpresión, rosa para confirmación experimental, púrpura para homología de proteínas y celeste para datos de bases de datos seleccionadas.

5.9. Predicción de estructuras secundarias y terciarias

Utilizando la metodología PHD implementada en el programa PRABI, se realizó la predicción de las estructuras secundarias (Figura 7 y Anexo 8), en las cuales solo se detectó plegamientos aleatorios (más del 90 % de la estructura proteica) y cadenas extendidas (menos del 10 % de la estructura proteica).

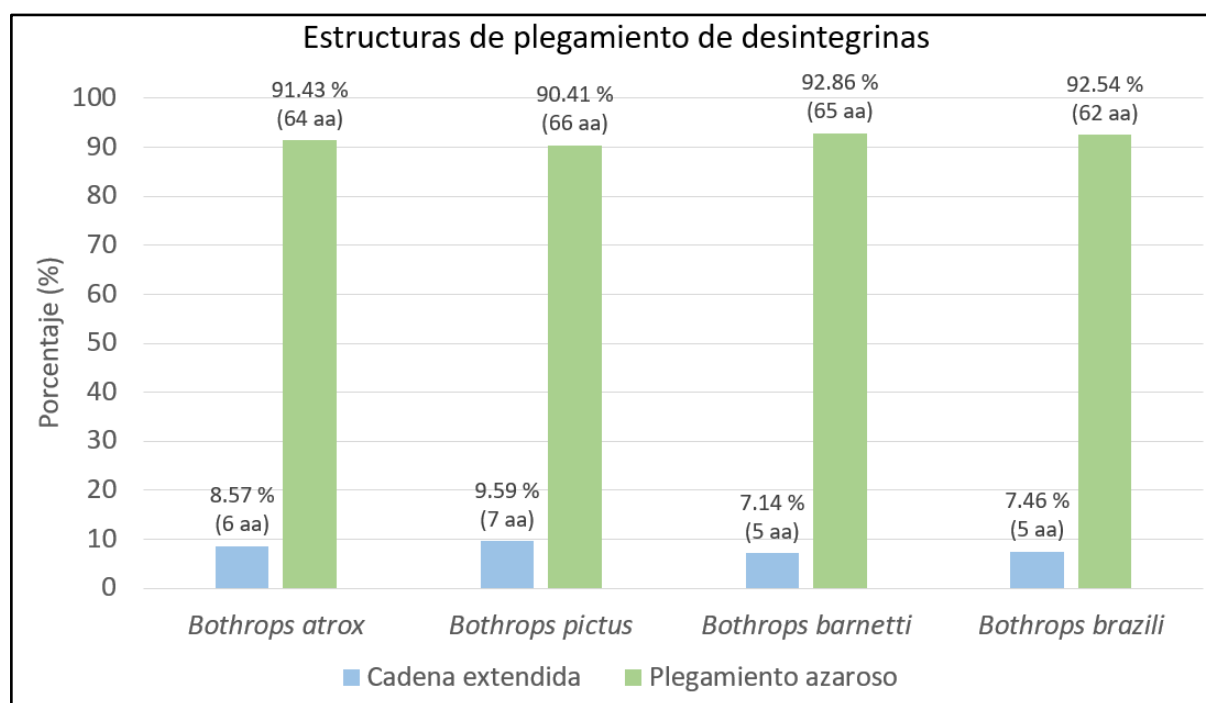


Figura 7. Estructuras secundarias de desintegrinas del género *Bothrops*.

En lo que respecta a la búsqueda de sitios de glicosilación en las cuatro desintegrinas, se empleó el programa NetNGlyc-1.0; sin embargo, no se identificó ningún sitio de N-glicosilación en las 4 secuencias evaluadas. Por otro lado, al analizar las desintegrinas utilizando las herramientas de búsqueda de dominios conservados, PROSITE y Conserved Domains Database (CDD), se predice la presencia de un único dominio conservado que abarca toda o casi toda la secuencia de aminoácidos de las especies 4 especies evaluadas. Este dominio es el dominio desintegrina, que se encuentra en las metaloproteinasas de tipo

II (Tabla 8). Adicionalmente, el programa PROSITE también reconoce un puente disulfuro en cada una de las secuencias, pero ningún sitio activo (Tabla 9).

Tabla 8. Predicción de dominios conservados en las desintegrinas de Bothrops.

Dominio	Programa	Posición del dominio conservado			
		<i>B. atrox</i>	<i>B. pictus</i>	<i>B. barnetti</i>	<i>B. brazili</i>
Desintegrina	PROSITE	1 - 70	1 - 73	1 - 70	1 - 67
Desintegrina	Conserved Domains Database	1 - 68	1 - 68	1 - 68	1 - 65

Tabla 9. Predicción de puentes disulfuro con el programa PROSITE en las desintegrinas de Bothrops.

Posición de puentes disulfuro			
<i>B. atrox</i>	<i>B. pictus</i>	<i>B. barnetti</i>	<i>B. brazili</i>
44 - 63	47 - 66	44 - 63	44 - 63

5.10. Modelamiento de la estructura tridimensional

Las estructuras tridimensionales revelan que todas las desintegrinas diseñadas presentan regiones desordenadas, lo que les confiere conformaciones flexibles y variables (Figura 8 y Figura 9). Además, se observa que los motivos RGD están ubicados en bucles cercanos a la región C-terminal. También se destacan los puentes disulfuro, donde los modelos tridimensionales predichos por SWISS-MODEL muestran la presencia de 6 puentes, mostrando el mismo patrón de enlaces disulfuro que el grupo 4 de la clasificación de desintegrinas que se basa en patrones de S-S (Figura 10); mientras que, los modelos generados por trRosetta muestran 5 puentes disulfuro en su mayoría, con la excepción de la desintegrina de *B. pictus*. En la mayoría de los casos, la posición de los puentes disulfuro coinciden en los modelos predichos por ambas herramientas (Tabla 10). En cuanto a los valores de GMQE y QMEANDisCo Global obtenidos en SWISS-MODEL, estos presentaron valores

cercanos a 1, lo cual se considera como buenos indicadores de calidad del modelo. Además, en relación con el porcentaje de identidad entre las plantillas utilizadas y las desintegrinas estudiadas, en todos los casos se supera el umbral del 70% (Anexo 2).

Por otra parte, los resultados de validación indican que los modelos generados mediante el enfoque de homología utilizando el programa SWISS-MODEL exhiben una mayor calidad, con un rango de porcentajes que varían desde 77.6% hasta 88.5% en las regiones más favorecidas. Además, el factor G en todos los modelos teóricos muestra valores superiores a -0.5, lo que sugiere que estos modelos poseen propiedades que son consistentes con una conformación de probabilidad no significativamente baja (Anexo 9), no obstante, los resultados obtenidos no alcanzaron el estándar óptimo, ya que los modelos de alta calidad generalmente muestran un porcentaje superior al 90% en las regiones más relevantes. Por lo tanto, se procedió a refinar las estructuras teóricas utilizando el servidor GalaxyWEB con el objetivo de mejorar la calidad de los modelos, logrando porcentajes superiores al 90% en las regiones más favorecidas y valores positivos en el factor G en los modelos predichos por homología y valores más adecuados en los modelos predichos por *ab initio*. (Tabla 11).

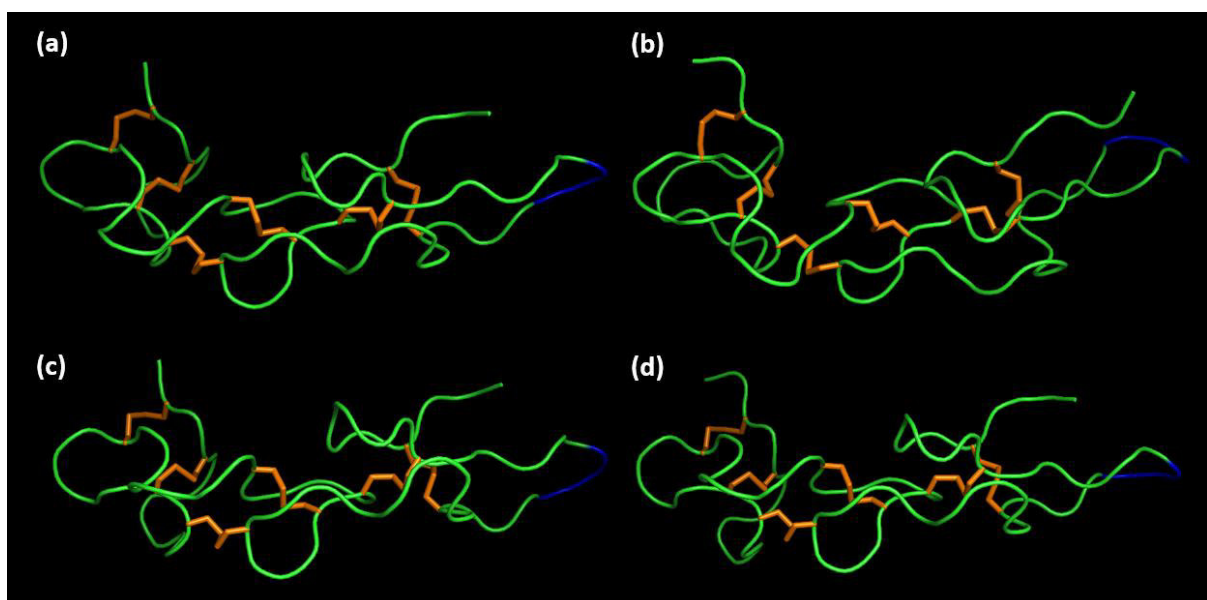


Figura 8. Modelos tridimensionales por homología refinados de desintegrinas. Se presentan las desintegrinas específicas de *B. atrox* (a), *B. pictus* (b), *B. barnetti* (c) y *B. brazili* (d). En esta representación, los puentes disulfuro se destacan en un tono naranja; mientras que, los motivos RGD están resaltados con color azul.

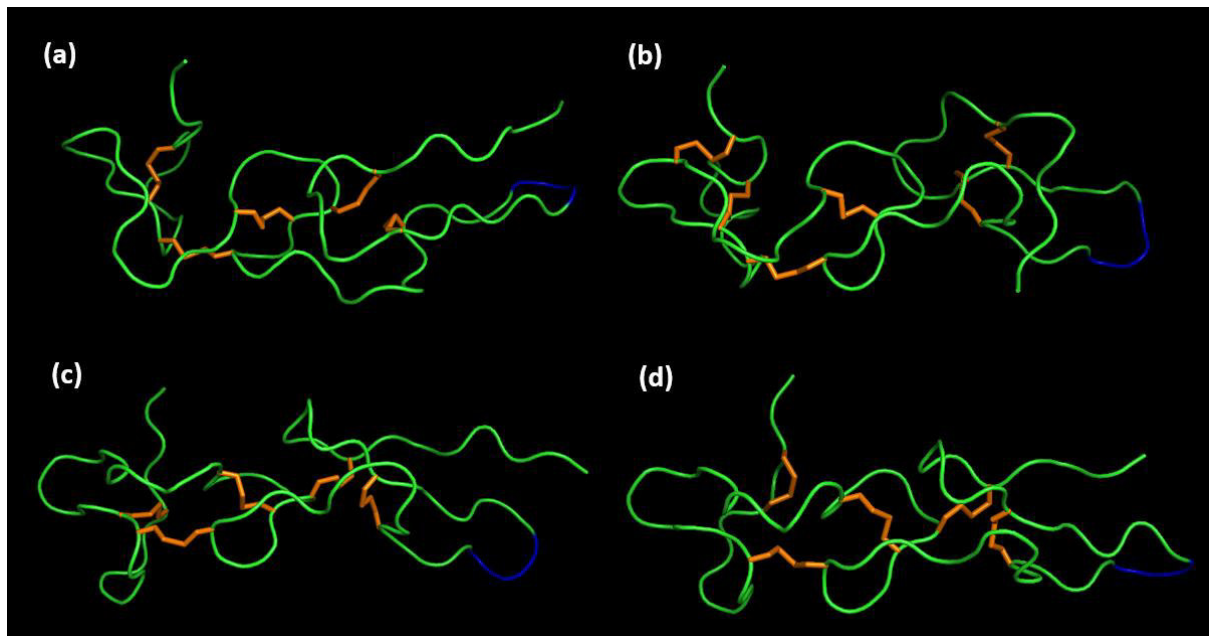


Figura 9. Modelos tridimensionales por *ab initio* refinados de desintegrinas. Se presentan las desintegrinas específicas de *B. atrox* (a), *B. pictus* (b), *B. barnetti* (c) y *B. brazili* (d). En esta representación, los puentes disulfuro se destacan en un tono naranja; mientras que, los motivos RGD están resaltados con color azul.

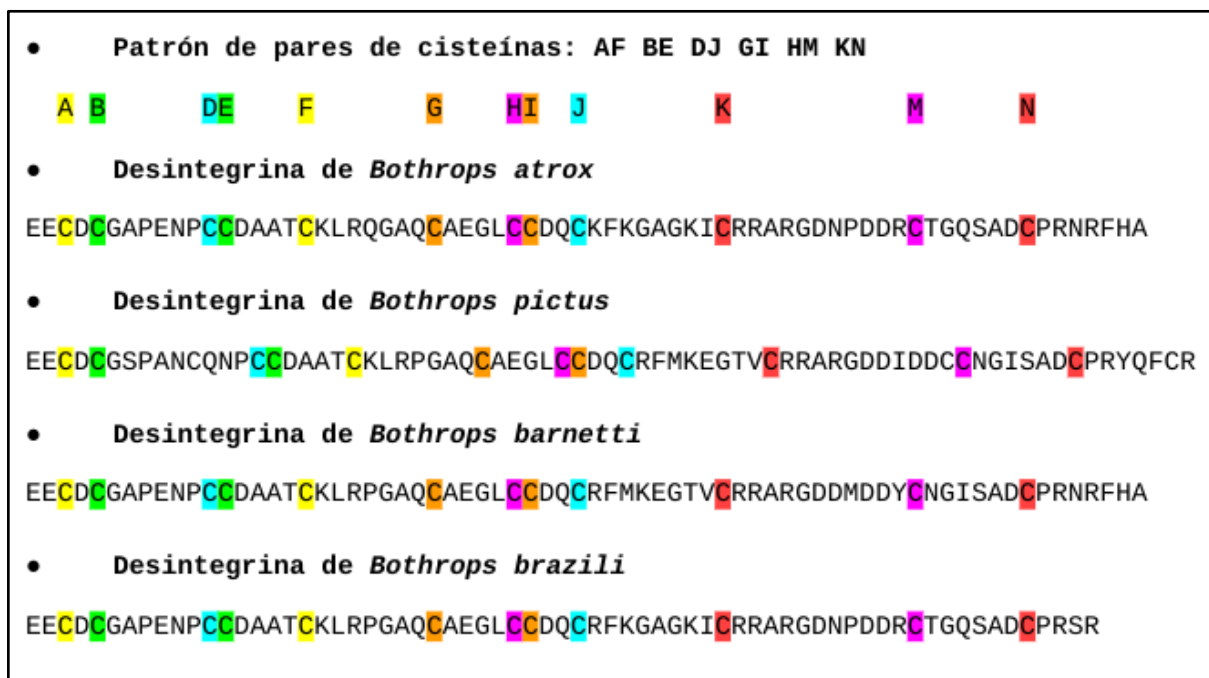


Figura 10. Patrones de disulfuro en las secuencias de las desintegrinas de especies del género *Bothrops* clasificadas dentro del grupo 4 (AF BE DJ GI HM KN). Utilizando la clasificación de Vasconcelos et al., 2021, según los modelos tridimensionales generados mediante el servidor SWISS-MODEL. Cada par de cisteína que forme un enlace disulfuro se representan mediante colores distintos.

Tabla 10. Posición de los puentes disulfuro en los modelos teóricos de desintegrina.

Modelos teóricos de desintegrinas generados por homología				
	<i>B. atrox</i>	<i>B. pictus</i>	<i>B. barnetti</i>	<i>B. brazili</i>
Posición de los puentes disulfuro	3 - 18	3 - 21	3 - 18	3 - 18
	5 - 13	5 - 16	5 - 13	5 - 13
	12 - 35	15 - 38	12 - 35	12 - 35
	26 - 32	29 - 35	26 - 32	26 - 32
	31 - 56	34 - 59	31 - 56	31 - 56
	44 - 63	47 - 66	44 - 63	44 - 63
Modelos teóricos de desintegrinas generados por <i>ab initio</i>				
	<i>B. atrox</i>	<i>B. pictus</i>	<i>B. barnetti</i>	<i>B. brazili</i>
Posición de los puentes disulfuro	5 - 13	3 - 21	5 - 13	3 - 5
	12 - 35	5 - 16	12 - 35	12 - 35
	26 - 32	15 - 38	26 - 32	26 - 32
	31 - 63	29 - 35	31 - 63	31 - 63
	44 - 56	47 - 59	44 - 56	44 - 56
		58 - 66		

Tabla 11. Parámetros de validación de los modelos predichos por los programas SWISS-MODEL y trRosetta después de ser refinados por el servidor GalaxyWEB.

Modelos teóricos de desintegrinas generados por homología				
	<i>B. atrox</i>	<i>B. pictus</i>	<i>B. barnetti</i>	<i>B. brazili</i>
Región más favorecida	92.3 %	94.8 %	94.3 %	94.2 %
Media general del factor G	0.06	0.06	0.10	0.14
Modelos teóricos de desintegrinas generados por <i>ab initio</i>				
	<i>B. atrox</i>	<i>B. pictus</i>	<i>B. barnetti</i>	<i>B. brazili</i>
Región más favorecida	82.5 %	85.2 %	86.2 %	86.8%
Media general del factor G	- 0.07	0.00	0.01	- 0.07

VI. DISCUSIÓN

6.1. Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc del veneno ofídico

La investigación molecular dirigida al análisis de proteínas y enzimas en el veneno de serpientes se inicia con la extracción de ARN y la subsiguiente síntesis de ADNc. Este proceso implica el uso de las glándulas venenosas para identificar los transcritos responsables de codificar las proteínas presentes en el veneno (Torrejón et al., 2023). Aunque las glándulas venenosas son esenciales para crear bibliotecas de ADNc, especialmente al catalogar toxinas, incluyendo aquellas presentes en bajas concentraciones (Brahma et al., 2015), su uso enfrenta obstáculos significativos. La obtención de estas glándulas implica el sacrificio de las serpientes, restringiendo la investigación a especies disponibles y excluyendo aquellas protegidas por leyes nacionales e internacionales (Whiteley et al., 2016).

Una alternativa son los organoides de glándulas venenosas, que sirven como plataformas para producir toxinas de serpientes de manera funcional; sin embargo, la generación de estos organoides aún requiere el uso inicial de glándulas venenosas para extraer y cultivar las células. Además, la variabilidad en la producción de toxinas entre las células implica la necesidad de múltiples cultivos para obtener la gama completa de toxinas (Vogt, 2020). Otra opción es utilizar veneno fresco, extraído manualmente para evitar el sacrificio de serpientes (Jia et al., 2019); no obstante, el veneno fresco solo es adecuado para el aislamiento de ARN durante un breve período. A pesar de los intentos de preservación con TRIzol, el ARN se degrada después de 48 horas a 4-19 °C o después de 8 horas a 37 °C (Whiteley et al., 2016).

Para prolongar el uso del veneno después de su extracción durante un período más extenso, es posible liofilizar el veneno fresco, lo que contribuye inicialmente a prevenir la degradación de sus componentes, incluyendo el ARN total (Currier et al., 2012). El veneno liofilizado se puede almacenar a -20 °C por un periodo de 20 hasta 30 años y aún mantener su ARN sin degradar (Torrejón, 2021; Modahl & Mackessy, 2016). Por ello, el presente estudio empleó veneno liofilizado de especímenes del Perú de *Bothrops atrox*, *Bothrops pictus*, *Bothrops barnetti* y *Bothrops brazili* para aislar ARN total utilizando TRIzol y evaluar su eficacia de conversión a ADNc.

Los resultados de las evaluaciones llevaron a los siguientes análisis: En términos de cuantificación, los resultados de la cuantificación del ARN por espectrofotometría con NanoDrop Lite revelaron que se logró aislar el ARN a una concentración de 71.2 a 95.2 ng/μL, dependiendo de la especie. Estos hallazgos son comparables a los informados por Modahl & Mackessy (2016), quienes emplearon el mismo método de aislamiento (TRIzol) a partir de veneno liofilizado de cascabeles. En sus estudios, se obtuvo una concentración de 69 ng/μL, ligeramente inferior a la que se logró en nuestro aislamiento. Esta discrepancia podría atribuirse al hecho de que en su metodología se emplearon 2 mg de veneno liofilizado, en contraste con los 10 mg utilizados en nuestro protocolo. Otro estudio similar fue realizado por Quispe et al., 2019, donde se extrajo ARN total con TRIzol a una concentración de 77 ng/μL a partir de 40 mg de veneno liofilizado de *Bothrops atrox*, una concentración de ARN total más cercana a la obtenida en nuestro estudio.

En la cuantificación por fluorometría de ARN total realizada con Qubit 2.0, no se lograron obtener cantidades cuantificables, dado que los valores se situaron por debajo del límite de sensibilidad de esta plataforma (inferiores a 0.02 ng/μL), a diferencia de los resultados obtenidos mediante espectrofotometría. Esta diferencia entre los resultados de ambas plataformas de cuantificación se atribuye a la distinción más significativa entre el uso de Qubit y NanoDrop, que radica en la precisión de los ensayos de Qubit. Estos proporcionan información notablemente más confiable que NanoDrop (Masago et al., 2021). Esto se debe a que el kit de ensayo Qubit HS RNA (Invitrogen) es altamente selectivo con respecto al tipo de ácido nucleico por utilizar colorantes fluorescentes que se unen específicamente distinguiendo de manera precisa entre el ADN y el ARN. Además, tolera contaminantes comunes como sales y detergentes, evitando que afecten las lecturas de Qubit y garantizando lecturas de concentración de ARN más cercanas a la realidad (Ulges et al., 2017).

La pureza del ARN aislado se evaluó mediante la relación de absorción de luz a 260 y 280 nm (A260/A280) proporcionada por NanoDrop, y se obtuvieron valores que oscilan entre 1.99 y 2.2. Estos resultados indican que las muestras son de alta calidad, con una baja contaminación proteica, ya que los valores se sitúan muy cercanos a 2.0 (Poovakka et al., 2018); sin embargo, la discrepancia en los resultados de cuantificación de ARN entre Qubit y NanoDrop también se atribuye al método de espectrofotometría utilizado por NanoDrop. Este se basa en la capacidad de los

ácidos nucleicos para absorber selectivamente la luz en la longitud de onda de 260 nm, permitiendo la medición de su concentración en la muestra. Aunque incluso una pequeña cantidad residual de ADN, proteínas u otros contaminantes que absorben la luz ultravioleta alrededor de 260 nm, puede provocar una sobreestimación de la concentración total de ARN (Deben et al., 2013).

El rendimiento del aislamiento de ARN total se determinó mediante la relación μg ARN/mg de veneno, una métrica que cuantifica la cantidad de ARN recuperado en proporción a la masa inicial del veneno, establecida en 10 mg para las cuatro especies de *Bothrops* evaluadas. Esta medida, al tener en cuenta la cantidad específica de veneno liofilizado utilizado en cada aislamiento, elimina cualquier incertidumbre respecto a la influencia de esta variable en el valor final, a diferencia de lo que ocurre en la medida de concentración. Los resultados revelaron un rango de rendimiento de ARN total de 0.11 a 0.15, en marcado contraste con los valores promedio de rendimiento de ARN total obtenidos por Torrejón (2021) a partir del aislamiento con TRIzol de veneno liofilizado de especímenes del género *Bothrops*, que varían entre 0.005 y 0.007. La discrepancia en los rendimientos podría deberse al tiempo de almacenamiento del veneno liofilizado empleado. En el presente estudio, se utilizaron venenos liofilizados con un periodo de almacenamiento inferior a dos meses. En contraste, el trabajo de Torrejón señala el uso de venenos liofilizados que datan de entre los años 1990 y 2000, abarcando un periodo de hasta 30 años, lo cual podría influir en el rendimiento del ARN.

Por otra parte, la calidad de una biblioteca de ADN complementario (ADNc) está intrínsecamente ligada a la integridad del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y a la precisión con la que se puede llevar a cabo la transcripción inversa al ADNc (Krug y Berger, 1987). En este sentido, se optó por la enzima SuperScript™ III Reverse Transcriptase para la síntesis del ADNc, ya que dicha enzima exhibe una mayor especificidad y rendimientos superiores en comparación con otras transcriptasas inversas disponibles (Kotewicz et al., 1985; Gerard et al., 1986). Adicionalmente, se incorporó el uso de oligo(dT) en el proceso, ya que la transcriptasa inversa requiere un cebador que se hibride con el ARNm antes de la síntesis del ADNc. El oligo(dT) se une a la cola 3'-poli(A) del ARNm, facilitando así que la enzima inicie la síntesis del ADNc (Adilakshmi et al., 2000).

Con respecto a las concentraciones derivadas de la síntesis de ADNc, evaluadas mediante fluorimetría con Qubit, estas variaron entre 10.3 y 20.6 ng/μL. Este rango se tradujo en un rendimiento de ADNc (μg de ADNc obtenido por cada μg de ARN utilizado) que fluctuó aproximadamente entre 4.4 y 6.3 ng de ADNc por cada 10 ng de ARN total. En contraste con estos hallazgos, Currier et al., 2012, informaron rendimientos de 12.3 μg de ADNc a partir de 10 ng de ARNm aislado de veneno liofilizado de *Bitis arietans* (equivalente a 22.74 μg de ADNc obtenidos a partir de 18.5 ng de ARNm). Esta disparidad se atribuye al hecho de que en dicho estudio se aisló ARNm puro, mientras que nuestros rendimientos consideran el ARN total. En consecuencia, el ARNm utilizado en la síntesis de ADNc, ya cuantificado como parte del ARN total, exhibe una proporción más baja frente al ARN ribosómico y al ARN de transferencia, lo que conlleva a una disminución en el valor del rendimiento de ADNc.

6.2. Diseño de cebadores y amplificación de ADNc

La tarea crítica de diseñar cebadores para la amplificación de desintegrinas exige una atención meticulosa a diversos aspectos, con el objetivo de asegurar la especificidad y eficiencia del proceso (Hyndman & Mitsuhashi, 2003). En nuestro enfoque específico, llevamos a cabo un alineamiento múltiple de PII-metaloproteinasa a partir de diversos especímenes del género *Bothrops*. Este análisis nos permitió identificar la región que traduciría a la desintegrina, siendo esta la base para la selección de cebadores situados en las regiones altamente conservadas. Además, se adoptó una estrategia clave al seleccionar la región no codificante externa a la desintegrina para el cebador *reverse*, con el objetivo específico de garantizar la calidad en el proceso de secuenciación. Esta táctica específica facilitó la exitosa amplificación de las desintegrinas de *B. atrox*, *B. pictus*, *B. barnetti* y *B. brazili*, utilizando Phusion Hot Start II DNA Polymerase. En la electroforesis de los productos amplificados, se visualizaron solo bandas de aproximadamente 200 pb, coincidiendo con las longitudes esperadas según las posiciones de los cebadores en las secuencias utilizadas en los alineamientos múltiples. Esta concordancia indica una mayor confianza en que la amplificación se logró de manera específica para las desintegrinas, excluyendo la presencia de bandas inespecíficas o subproductos no deseados.

6.3. Secuenciación de ADN

La secuenciación del ADN proporciona resultados fundamentales que permiten una comprensión más profunda de la composición genética de estas proteínas, además de predecir una gama de fenómenos bioquímicos o moleculares (Shendure et al., 2017). En este sentido, se determinó el tamaño de la muestra en pares de bases que arrojaron longitudes de entre 204 a 222 pb, lo cual concuerda con los análisis de electroforesis que mostraban bandas de aproximadamente 200 pb. En relación con la predicción de la traducción de la secuencia nucleotídica a la secuencia de aminoácidos, este procedimiento resulta esencial para comprender la composición proteica y la posible función de estas moléculas. En el análisis, se utilizó el programa Translate Tool del servidor ExPASy, seleccionando el ORF+1 para abarcar toda la secuencia nucleotídica. Este enfoque reveló que las secuencias de aminoácidos que componen a las desintegrinas estudiadas constan de 67 a 73 aminoácidos. Estos valores sugieren que estas desintegrinas podrían clasificarse dentro del grupo de desintegrinas medianas, dado que cuentan con aproximadamente 70 aminoácidos según la clasificación basada en su tamaño. No obstante, para tener una mayor certeza en esta clasificación, era necesario analizar la cantidad de puentes disulfuros presentes (Calvete et al., 2005).

Por otra parte, las búsquedas realizadas con BLASTn y BLASTp posibilitaron la comparación de las secuencias de desintegrinas obtenidas con aquellas que se encuentran en la base de datos genéticas, revelando similitudes significativas. Los resultados de estas búsquedas indicaron que las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de las desintegrinas obtenidas comparten un significativo porcentaje de identidad con genes y proteínas, respectivamente, tanto de metaloproteinasas como de desintegrinas presentes en el veneno de serpientes, principalmente del género *Bothrops*. Estos resultados se explican por el hecho de que el porcentaje de identidad dentro del alineamiento se calcula evaluando el grado de similitud dentro de la región alineada, sin tener en cuenta la longitud total del alineamiento. En otras palabras, se refiere al número de residuos idénticos en la región alineada como un porcentaje de la longitud total de la secuencia de consulta (Brenner et al., 1998). En consecuencia, al considerar que las desintegrinas forman parte de las secuencias de metaloproteinasas, se obtuvieron los resultados mencionados.

6.4. Alineamiento múltiple y clasificación de las desintegrinas

En el análisis de alineamiento múltiple de las secuencias de desintegrinas, se destaca una mayor similitud en el alineamiento de las desintegrinas medianas, respaldando su clasificación en el grupo de tamaño mediano basándose exclusivamente en la longitud de sus secuencias de aminoácidos. Además, se observa la conservación del motivo RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) en las cuatro desintegrinas analizadas. Este motivo exhibe una ubicación constante en las desintegrinas de *B. atrox*, *B. barnetti* y *B. brazili*, situándose en las posiciones R48, G49 y D50; sin embargo, en la desintegrina de *B. pictus*, el motivo RGD ocupa una posición diferente (R51, G52 y D53). Esta variación se atribuye a la inserción de tres aminoácidos (NCQ), una característica única que no está presente en las otras secuencias de desintegrinas medianas. No obstante, se observa que estos aminoácidos adicionales son compartidos con las desintegrinas largas y con motivos similares a desintegrinas de la metaloproteinasa de tipo III.

La existencia del motivo RGD conservado sugiere que las desintegrinas bajo análisis poseen una propensión a unirse a las integrinas. En este contexto, muchas investigaciones han revelado que los residuos de aminoácidos que rodean la secuencia RGD desempeñan un papel crucial en modular la especificidad de la interacción con las integrinas. Por ejemplo, las desintegrinas de *Trimeresurus elegans*, que presentan un residuo de alanina consecutivo a la región N-terminal del motivo RGD, al igual que las desintegrinas examinadas en este estudio, exhibieron una marcada actividad inhibitoria frente a la adhesión de plaquetas dependiente de $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ sobre fibronectinas (Rahman et al., 1998). Esto implica que las desintegrinas en cuestión podrían demostrar una afinidad particularmente elevada hacia las integrinas, especialmente a las integrinas plaquetarias $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$.

La existencia de los tres aminoácidos específicos en la desintegrina de *B. pictus*, pero ausentes en las demás desintegrinas medianas podría explicarse a través de la hipótesis predominante acerca del origen de las metaloproteinasas de tipo II (Kini y Evans, 1992). Según esta teoría ampliamente aceptada, se sugiere que estas proteínas surgieron a partir de la duplicación del dominio similar a desintegrina presente en la metaloproteinasa tipo III. La transición del dominio similar a desintegrina al dominio desintegrina habría tenido lugar mediante la pérdida

progresiva de enlaces disulfuro y la subsiguiente reducción de su tamaño. Este proceso dio origen a las distintas categorías de desintegrinas, incluyendo las largas, medianas, diméricas y cortas. Por lo tanto, es plausible que la secuencia de tres aminoácidos (NCQ) esté presente en la desintegrina mediana de *B. pictus*, a pesar de que se observe predominantemente en las desintegrinas largas y en aquellas similares a desintegrinas. Otros estudios han revelado situaciones similares. Por ejemplo, la desintegrina graminelisina, clasificada como una desintegrina mediana, presenta un enlace disulfuro Cys13-Cys16, característico de las proteínas similares a desintegrinas. Esto sugiere que también podría representar un paso intermedio en la evolución de las desintegrinas de tamaño mediano (Wu et al., 2001).

Por otra parte, la clasificación de las desintegrinas propuesta por Vasconcelos et al., 2021, se fundamenta en las características estructurales de estas proteínas. Para establecer este sistema de clasificación consideraron el patrón de plegamiento y enlaces disulfuro de las desintegrinas. Esta elección se basa en la conservación de los residuos de cisteína y el patrón de enlaces disulfuro dentro de la subfamilia de desintegrinas porque así se mantiene la conformación activa de estas proteínas. Considerando únicamente las firmas de secuencias, es evidente que las secuencias de desintegrinas analizadas exhiben las características distintivas del grupo 4 de desintegrinas según esta clasificación. Este grupo se destaca por la presencia de muchas secuencias de aminoácidos conservadas en la porción N-terminal. No obstante, es crucial también examinar el patrón de enlaces disulfuro, ya que este aspecto constituye otra característica distintiva que define a este grupo.

6.5. Predicción de propiedades fisicoquímicas

Los resultados de los análisis fisicoquímicos revelan que la masa molecular de las desintegrinas varía en el rango de 7.14 a 7.95 kDa. Estos hallazgos concuerdan con investigaciones anteriores, como las que se han realizado en desintegrinas medianas de *Bothrops asper*, *Crotalus simus*, *Atropoides mexicanus* y *Cerrophidion sasai*, que han sido evaluadas con SDS-PAGE y reportan un peso de 8 kDa (Angulo et al., 2014). Otro ejemplo notable es la desintegrina saxatilina, cuya masa molecular de 7.7 kDa fue determinada mediante MALDI-TOF (Hong et al., 2002); así como la desintegrina colombistatina, que presenta un peso de 7.778 kDa según los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas (Sánchez et al., 2009). En relación con el punto

isoeléctrico (pI), los resultados obtenidos muestran un intervalo comprendido entre 4.69 y 6.76. Esto sugiere que estas desintegrinas tienden a ser neutras o ligeramente ácidas en condiciones de pH fisiológico; sin embargo, es importante señalar que las desintegrinas no se caracterizan por tener un rango específico de punto isoeléctrico, ya que se han documentado valores diversos, como 4.1 en la desintegrina recombinante Leucurogina (Higuchi et al., 2011), y también existen estudios que indican valores de 8.36 en la desintegrina de *Cerastes cerastes* (Ameziani et al., 2020).

La estabilidad de una proteína se determina mediante el índice de inestabilidad. Cuando el índice de inestabilidad es menor que 40, se predice que la proteína es estable; por otro lado, un valor superior a 40 sugiere que la proteína podría ser inestable (Guruprasad et al., 1990). Los resultados revelan que las desintegrinas de *Bothrops pictus* y *Bothrops barnetti* se consideran estables, ya que su índice de inestabilidad es inferior a 40. En contraste, las desintegrinas de *Bothrops atrox* y *Bothrops brazili* se predicen como inestables, dado que su índice de inestabilidad supera el valor umbral de 40.

Otro parámetro analizado es el índice alifático, el cual representa el volumen relativo de cadenas laterales alifáticas (alanina, valina, isoleucina y leucina) en la secuencia de aminoácidos de la proteína analizada (Tan et al., 2020). En este caso, se obtuvieron valores positivos, lo cual denota que hay termoestabilidad en dichas proteínas. En cuanto al promedio general de hidropatía (GRAVY), que varía entre -0.869 y -0.555, los valores negativos sugieren una tendencia hidrofílica (Kyte & Doolittle, 1982). Además, al examinar la distribución de la hidrofiliidad, se destaca que los residuos localizados en o cerca del motivo RGD muestran una notable hidrofiliidad, lo que contribuye a que, en promedio (GRAVY), la proteína sea considerada como hidrofílica. Esto contrasta con el resto de los residuos, los cuales presentan valores que los clasificarían como hidrofóbicos. Según la propuesta de Almeida et al., 2021, sugiere que proteínas como las desintegrinas se estabilizan a través de estos grupos de superficies hidrofóbicas, actuando como unidades de plegado independientes.

6.6. Interacciones proteína-proteína

La exploración de posibles conexiones entre las desintegrinas y otras proteínas consistió en emplear las secuencias de aminoácidos de desintegrinas junto con la herramienta STRING para construir una red de interacciones potenciales con otras proteínas en el organismo humano. Se identificaron asociaciones específicas, como ADAM8 con la desintegrina de *B. atrox*, ADAM19 con la de *B. pictus*, y ADAM33 con las de *B. barnetti* y *B. brazili*. Las interacciones predichas revelaron puntajes más altos en casos como MRPL con ADAM8, SH3PXD2A con ADAM19 y PHF11 con ADAM33, indicando una mayor probabilidad de validez en estas asociaciones

Las proteínas ADAM, que incluyen ADAM8, ADAM19 y ADAM33, conforman una familia de metaloproteinasas que poseen un dominio desintegrina, mostrando similitudes estructurales con las desintegrinas presentes en el veneno de serpientes. Estas proteínas desempeñan funciones tanto proteolíticas como adhesivas y pueden estar involucradas en procesos de fusión celular (Novak, 2004). Por su lado, la proteína ribosómica mitocondrial L13 (MRPL13) codifica la proteína de la subunidad grande ribosómica mitocondrial 39S y se localiza en el cromosoma humano 6 (Cai et al., 2021). Además, participa en procesos biológicos como la diferenciación celular, la transmisión de información celular y la apoptosis (Tao et al., 2020). En este contexto, la posible interacción entre las proteínas ADAM8 y MRPL13 podría estar vinculada a sus funciones en procesos celulares clave. Además, la proteína de andamiaje SH3PXD2A es esencial para la formación de podosomas e invadopodios en células no transformadas y cancerosas, estructuras que regulan migración, invasión celular, adhesión y liberación de factores de crecimiento (Li & Jacks, 2017). La interacción entre ADAM19 y SH3PXD2A podría contribuir a coordinar procesos celulares relacionados con la dinámica de la matriz extracelular y la movilidad celular.

Por otro lado, PHF11 ejerce control sobre la actividad transcripcional en células T y B mediante variantes de empalme, además desempeña un papel regulador en la expresión de genes asociados con citoquinas de tipo Th1 (Gao et al., 2019). En este sentido, la interacción entre ADAM33 y PHF11 podría contribuir a una regulación coordinada de eventos celulares, especialmente aquellos relacionados con respuestas inmunológicas y la expresión de citoquinas específicas.

6.7. Predicción de estructuras secundarias y terciarias

En los resultados de las estructuras secundarias teóricas de las desintegrinas, se observa una prevalencia de plegamientos azarosos en aproximadamente un 90%. Esto implica configuraciones conformacionales no específicas. Estos hallazgos concuerdan con los mencionados por Fujii et al., 2003, que indican que las desintegrinas, como saboridina, echistatina, kistrina y albolabrina, cuyas estructuras fueron determinadas mediante resonancia magnética nuclear (RMN), tampoco muestran una estructura secundaria regular. Esta falta de regularidad estructural podría atribuirse a la necesidad intrínseca de las desintegrinas de interactuar con receptores en la superficie de las células objetivo, como las integrinas. Para cumplir sus funciones específicas, las desintegrinas requieren flexibilidad conformacional, permitiéndoles adaptarse eficientemente a diversas condiciones y contextos en los que llevan a cabo sus interacciones biológicas.

En el ámbito de las modificaciones postraduccionales, la N-glicosilación destaca al conferir variabilidad a ciertas proteínas del veneno (Zelanis et al., 2011). Para explorar esta característica, se llevaron a cabo predicciones de sitios de N-glicosilación en las cuatro desintegrinas, revelando la ausencia de tales sitios predichos. Este resultado concuerda con los informes anteriores de Moura-da-Silva et al., 2011, quienes indican que la desintegrina mediana escindida de BnMP-II tampoco presenta sitios de N-glicosilación. En cuanto a los resultados de la búsqueda de dominios conservados predichos por PROSITE y Conserved Domains Database, se obtuvo que el dominio desintegrina abarca prácticamente toda la secuencia aminoacídica de las desintegrinas empleadas. Esto se debe a que estas proteínas son producto de la escisión proteolítica del dominio desintegrina de la metaloproteinasa de tipo II (Oyama & Takahashi, 2017).

6.8. Análisis basado en la estructura tridimensional

Los modelos tridimensionales fueron construidos mediante enfoques de homología y *ab initio*. Los modelos generados por homología exhibieron valores superiores de calidad de modelado tanto antes como después del refinamiento con GalaxyWEB, en comparación con los modelos generados por *ab initio*. Posterior al refinamiento, los modelos *ab initio* aún presentaban un porcentaje menor al óptimo (90%) en las regiones más favorecidas, además de presentar 5 de los 6 puentes disulfuros,

excepto en la desintegrina de *B. pictus*, que teóricamente debería tener por ser parte de las desintegrinas de tamaño mediano. Este fenómeno se atribuye a que las plantillas utilizadas por homología superan el 70% de identidad, indicando que, al tener un porcentaje mayor al 40% de identidad, la plantilla seleccionada es homóloga a la desintegrina que se desea modelar. Por ende, se considera que estas desintegrinas adoptarán estructuras similares (Kumar, & Sharma, 2023).

En todas las estructuras 3D de desintegrinas creadas, se evidencia la presencia de regiones desordenadas, respaldando los resultados de la predicción de las estructuras secundarias. Además, se destaca que los motivos RGD se encuentran ubicados en bucles cercanos a la región C-terminal. La posición característica del motivo RGD en la desintegrina es destacada en esta proteína, como fue señalado por Fernandez et al., 2005. En su modelado de botrostatina, una desintegrina de *Bothrops jararaca*, se observó que el motivo RGD quedaba expuesto a la solución a través de un bucle cercano al dominio C-terminal, formando una estructura semejante a un dedo. La cercanía del bucle RGD y los residuos C-terminales sugiere que estos últimos podrían desempeñar un papel crucial en la capacidad de las desintegrinas para interactuar con sus ligandos. Otro estudio señala que el bucle que engloba la secuencia RGD y la región C-terminal se caracteriza por su definición poco clara, lo que posiblemente contribuye a la alta movilidad observada en las desintegrinas (Fujii et al., 2003).

En las estructuras modeladas, se aprecian los puentes disulfuros formados. En las estructuras 3D generadas por homología, se identifican 6 puentes disulfuro utilizando todas las cisteínas presentes en la secuencia. Sin embargo, en la desintegrina de *B. pictus*, se observan 6 puentes disulfuro y dos cisteínas adicionales que no participan en la formación de dichos puentes, ya que una de ellas pertenece a la región de tres aminoácidos (NCQ), compartida con las desintegrinas largas y similares a desintegrina. Con esta información, se confirma con mayor seguridad que las cuatro desintegrinas pertenecen al grupo de desintegrinas de tamaño mediano, según la clasificación basada en su tamaño y el número de puentes de enlace disulfuro (Calvete et al., 2005). Además, se pueden clasificar dentro del grupo 4, según la clasificación propuesta por Vasconcelos et al., 2021, basándonos ya no solo en las firmas de secuencias sino también en los patrones de disulfuro (AF BE DJ GI HM KN).

VII. CONCLUSIONES

- Se logró obtener las secuencias nucleotídicas de las desintegrinas de *Bothrops atrox*, *Bothrops pictus*, *Bothrops brazili* y *Bothrops barnetti*, revelando tamaños cercanos a 200 pb, lo que se traduce en aproximadamente 70 aminoácidos agrupándose en desintegrinas de tamaño mediano.
- La caracterización molecular de las desintegrinas, reveló una masa molecular variable entre 7.14 y 7.95 kDa, con más del 90% de la estructura proteica mostrando plegamientos aleatorios.
- Se identificaron las características estructurales de las desintegrinas de *Bothrops atrox*, *Bothrops pictus*, *Bothrops brazili* y *Bothrops barnetti*, evidenciando que su motivo de unión a integrina (RGD) está ubicado en bucles cercanos a la región C-terminal.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abuys, T. (1988). The snakes of Surinam, Part XXI (end) Family Viperidae. Subfamily Crotalinae (the genus Bothrops). *Litt. Serp*, 8(2), 73-88.

Acunha, T., Nardini, V., & Faccioli, L. H. (2021). A lipidomics approach reveals new insights into *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops moojeni* snake venoms. *Archives of Toxicology*, 95(1), 345-353.

Adilakshmi, T., Ayling, P. D., & Ratledge, C. (2000). Polyadenylation in mycobacteria: evidence for oligo (dT)-primed cDNA synthesis. *Microbiology*, 146(3), 633-638.

Ahmed, M., Latif, N., Khan, R. A., Ahmad, A., Rocha, J. B. T., Mazzanti, C. M. & Schetinger, M. R. C. (2012). Enzymatic and biochemical characterization of *Bungarus sindanus* snake venom acetylcholinesterase. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 18, 236-243.

Alencar, L. R., Quental, T. B., Graziotin, F. G., Alfaro, M. L., Martins, M., Venzon, M., & Zaher, H. (2016). Diversification in vipers: Phylogenetic relationships, time of divergence and shifts in speciation rates. *Molecular phylogenetics and evolution*, 105, 50-62.

Almeida, F. C., Sanches, K., Pinheiro-Aguiar, R., Almeida, V. S., & Caruso, I. P. (2021). Protein surface interactions—theoretical and experimental studies. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 706002.

Almeida, J. R., Gomes, A., Mendes, B., Aguiar, L., Ferreira, M., Brioschi, M. B. C., & Gomes, P. (2023). Unlocking the potential of snake venom-based molecules against the malaria, Chagas disease, and leishmaniasis triad. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124745.

Alves, R. M., Antonucci, G. A., Paiva, H. H., Cintra, A. C. O., Franco, J. J., Mendonça-Franqueiro, E. P & Sampaio, S. V. (2008). Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 151(4), 542-550.

Ameziani, M., Chérifi, F., Kiheli, H., Saoud, S., Hariti, G., Kellou-Taïri, S., & Laraba-Djebari, F. (2020). Isolation and functional identification of an antiplatelet RGD-containing disintegrin from *Cerastes cerastes* venom. *The Protein Journal*, 39, 574-590.

Amorim, F. G., Morandi-Filho, R., Fujimura, P. T., Ueira-Vieira, C., & Sampaio, S. V. (2017). New findings from the first transcriptome of the *Bothrops moojeni* snake venom gland. *Toxicon*, 140, 105-117.

Andrade-Silva, D., Zelanis, A., Kitano, E. S., Junqueira-de-Azevedo, I. L., Reis, M. S., Lopes, A. S., & Serrano, S. M. (2016). Proteomic and glycoproteomic profilings reveal that post-translational modifications of toxins contribute to venom phenotype in snakes. *Journal of proteome research*, 15(8), 2658-2675.

Angulo, Y., Castro, A., Lomonte, B., Rucavado, A., Fernández, J., Calvete, J. J., & Gutiérrez, J. M. (2014). Isolation and characterization of four medium-size disintegrins from the venoms of Central American viperid snakes of the genera *Atropoides*, *Bothrops*, *Cerrophidion* and *Crotalus*. *Biochimie*, 107, 376-384.

Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2012). GenBank. *Nucleic acids research*, 41(D1), D36-D42.

Bolt, H. M. (2021). New aspects in snake venom toxicology. *Archives of Toxicology*, 95(6), 1865-1866.

Brahma, R. K., McCleary, R. J., Kini, R. M., & Doley, R. (2015). Venom gland transcriptomics for identifying, cataloging, and characterizing venom proteins in snakes. *Toxicon*, 93, 1-10.

Brás-Costa, C., Chaves, A. F. A., Trevisan-Silva, D., Menezes, M. C., Rocha, M. M., Cajado-Carvalho, D. & Serrano, S. M. (2023). Sialic acid-containing glycans play a role in the activity of snake venom proteases. *Biochimie*, 204, 140-153.

Brenner, S. E., Chothia, C., & Hubbard, T. J. (1998). Assessing sequence comparison methods with reliable structurally identified distant evolutionary relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(11), 6073-6078.

- Bruchim, Y. (2010). Viper snakebites. *Isr J Vet Med*, 65(2), 39-41.
- Bruni, M. D. L. Á., Cabrera, M. R., & de Roodt, A. R. (2021). Frecuencia de hallazgo y procedencia de *Bothrops ammodytoides* (Reptilia: Viperidae) en registros del Instituto Nacional de Producción de Biológicos "Dr. Carlos G. Malbrán".
- Burley, S. K., Berman, H. M., Kleywegt, G. J., Markley, J. L., Nakamura, H., & Velankar, S. (2017). Protein Data Bank (PDB): the single global macromolecular structure archive. *Protein crystallography: methods and protocols*, 627-641.
- Cai, M., Li, H., Chen, R., & Zhou, X. (2021). MRPL13 promotes tumor cell proliferation, migration and EMT process in breast cancer through the PI3K-AKT-mTOR pathway. *Cancer Management and Research*, 2009-2024.
- Calero, K., Barrionuevo, R., Ugaz, A., Calero, M., & Peña, R. (2019). Taxonomía de serpientes en el Noroeste del Perú. *Manglar*, 15(2), 135-139.
- Calvete, J. J., Marcinkiewicz, C., & Sanz, L. (2007). KTS and RTS-disintegrins: anti-angiogenic viper venom peptides specifically targeting the $\alpha 1\beta 1$ integrin. *Current pharmaceutical design*, 13(28), 2853-2859.
- Calvete, J. J., Marcinkiewicz, C., Monleón, D., Esteve, V., Celda, B., Juárez, P., & Sanz, L. (2005). Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon*, 45(8), 1063-1074.
- Carrasco, P. A., Grazziotin, F. G., Farfan, R. S. C., Koch, C., Ochoa, J. A., Scrocchi Manfrini, G. J., & Chaparro, J. C. (2019). A new species of *Bothrops* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae) from Pampas del Heath, southeastern Peru, with comments on the systematics of the *Bothrops neuwiedi* species group.
- Carvalho, B. M. A., Santos, J. D. L., Xavier, B. M., Almeida, J. R., Resende, L. M., Martins, W., & Marchi-Salvador, D. P. (2013). Snake venom PLA 2 s inhibitors isolated from Brazilian plants: synthetic and natural molecules. *BioMed Research International*, 2013.
- Casewell, N. R., Wagstaff, S. C., Wüster, W., Cook, D. A., Bolton, F. M., King, S. I., & Harrison, R. A. (2014). Medically important differences in snake venom

composition are dictated by distinct postgenomic mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(25), 9205-9210.

Clement, H., Corrales-García, L. L., Rivas-Mercado, E., Garza-Ocañas, L., & Corzo, G. (2023). cDNA Cloning, Heterologous Expression, Cytotoxicity, and Inhibitory Effects of a Disintegrin from *Bothrops ammodytoides* Venom. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 29(4), 54.

Cooke, M. E. (1986). *Characterization of the fatty acids in the lipids of snake venoms* (Doctoral dissertation, Oklahoma State University).

Currier, R. B., Calvete, J. J., Sanz, L., Harrison, R. A., Rowley, P. D., & Wagstaff, S. C. (2012). Unusual stability of messenger RNA in snake venom reveals gene expression dynamics of venom replenishment.

Deben, C., Zwaenepoel, K., Boeckx, C., Wouters, A., Pauwels, P., Peeters, M., & Deschoolmeester, V. (2013). Expression analysis on archival material revisited: isolation and quantification of RNA extracted from FFPE samples. *Diagnostic Molecular Pathology*, 22(1), 59-64.

DeKok, A., & Rawitch, A. B. (1969). L-Amino acid oxidase. II. Dissociation and characterization of its subunits. *Biochemistry*, 8(4), 1405-1411.

Diniz-Sousa, R., Silva, C. C., Pereira, S. S., da Silva, S. L., Fernandes, P. A., Teixeira, L. M., & Soares, A. M. (2023). Therapeutic applications of snake venoms: An invaluable potential of new drug candidates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124357.

Dos Santos, J. I., Cintra-Francischinelli, M., Borges, R. J., Fernandes, C. A., Pizzo, P., Cintra, A. C. & Fontes, M. R. (2011). Structural, functional, and bioinformatics studies reveal a new snake venom homologue phospholipase A₂ class. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 79(1), 61-78.

Dozoretz, D., Goñi, F. M., & Damín, C. F. (2021). Variaciones de caracteres morfológicos dentro de la especie *Bothrops alternatus*. *Acta toxicológica argentina*, 29(1), 5-7.

Du, Z., Su, H., Wang, W., Ye, L., Wei, H., Peng, Z., & Yang, J. (2021). The trRosetta server for fast and accurate protein structure prediction. *Nature protocols*, *16*(12), 5634-5651.

Eble, J. A. (2019). Structurally robust and functionally highly versatile—C-type lectin (-related) proteins in snake venoms. *Toxins*, *11*(3), 136.

Estevao-Costa, M. I., Gontijo, S. S., Correia, B. L., Yarleque, A., Vivas-Ruiz, D., Rodrigues, E., & Sanchez, E. F. (2016). Neutralization of toxicological activities of medically-relevant *Bothrops* snake venoms and relevant toxins by two polyvalent bothropic antivenoms produced in Peru and Brazil. *Toxicon*, *122*, 67-77.

Fernandez, J. H., Silva, C. A., Assakura, M. T., Camargo, A. C., & Serrano, S. M. (2005). Molecular cloning, functional expression, and molecular modeling of bothrostatin, a new highly active disintegrin from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemical and biophysical research communications*, *329*(2), 457-464.

Fischer, W. H., & Hugli, T. E. (1997). Regulation of B cell functions by C3a and C3a (desArg): suppression of TNF-alpha, IL-6, and the polyclonal immune response. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *159*(9), 4279-4286.

Forero, M. V., Vargas, C. M., Samame, M. M. C., Caro, J. D. M., Sacio, H. A., & Herencia, E. G. (2004). Ofidismo en la provincia de Chanchamayo, Junín: Revisión de 170 casos consecutivos en el Hospital de Apoyo de La Merced. *Revista Médica Herediana*, *15*(2), 82-82.

Fujii, Y., Okuda, D., Fujimoto, Z., Horii, K., Morita, T., & Mizuno, H. (2003). Crystal structure of trimestatin, a disintegrin containing a cell adhesion recognition motif RGD. *Journal of molecular biology*, *332*(5), 1115-1122.

Gao, J., Li, W., Willis-Owen, S. A., Jiang, L., Ma, Y., Tian, X., & Zhang, Y. (2009). Polymorphisms of PHF11 and DPP10 are associated with asthma and related traits in a Chinese population. *Respiration*, *79*(1), 17-24.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S. E., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). *Protein identification and analysis tools on the ExPASy server* (pp. 571-607). Humana press.

Gerard, G. F., D'alessio, J. M., Kotewicz, M. L., & Noon, M. C. (1986). Influence on stability in *Escherichia coli* of the carboxy-terminal structure of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *Dna*, 5(4), 271-279.

Gopal, G., Muralidar, S., Prakash, D., Kamalakkannan, A., Indhuprakash, S. T., Thirumalai, D., & Ambi, S. V. (2023). The concept of Big Four: Road map from snakebite epidemiology to antivenom efficacy. *International journal of biological macromolecules*, 124771.

Gould, R. J., Polokoff, M. A., Friedman, P. A., Huang, T. F., Holt, J. C., Cook, J. J., & Niewiarowski, S. (1990). Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 195(2), 168-171.

Guércio, R. A., Shevchenko, A., Shevchenko, A., López-Lozano, J. L., Paba, J., Sousa, M. V., & Ricart, C. A. (2006). Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome science*, 4, 1-14.

Gupta, R., & Brunak, S. (2001). Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. In *Biocomputing 2002* (pp. 310-322).

Guruprasad, K., Reddy, B. B., & Pandit, M. W. (1990). Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering, Design and Selection*, 4(2), 155-161.

Hall, T. A. (1999, January). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98).

Hayes, M. B., & Wellner, D. (1969). Microheterogeneity of L-amino acid oxidase: Separation of multiple components by polyacrylamide gel electrofocusing. *Journal of Biological Chemistry*, 244(24), 6636-6644.

Henriquez-Camacho, C., maguiña Vargas, C., Gotuzzo, E., & Legua, P. (1998). Ofidismo por *Bothrops pictus* en el Hospital Nacional Cayetano Heredia: Estudio prospectivo de 23 casos. *Folia Dermatológica Peruana*, 9(1-2).

Higuchi, D. A., Almeida, M. C., Barros, C. C., Sanchez, E. F., Pesquero, P. R., Lang, E. A. S., & Pesquero, J. L. (2011). Leucurogin, a new recombinant disintegrin cloned from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) with potent activity upon platelet aggregation and tumor growth. *Toxicon*, 58(1), 123-129.

Hong, S. Y., Sohn, Y. D., Chung, K. H., & Kim, D. S. (2002). Structural and functional significance of disulfide bonds in saxatilin, a 7.7 kDa disintegrin. *Biochemical and biophysical research communications*, 293(1), 530-536.

Hyndman, D. L., & Mitsushashi, M. (2003). PCR primer design. *PCR protocols*, 81-88.

Hynes, R. O. (1987). Integrins: a family of cell surface receptors. *cell*, 48(4), 549-554.

Hynes, R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69(1), 11-25.

Isla, M., Malaga, O., & Yarlequé, A. (2003). Características bioquímicas y acción biológica de una hemorragina del veneno de *Bothrops brazili*. In *Anales de la Facultad de Medicina* (Vol. 64, No. 3, pp. 159-166). UNMSM. Facultad de Medicina.

Iwanaga, S., & Suzuki, T. (1979). Enzymes in snake venom. In *Snake venoms* (pp. 61-158). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Izidoro, L. F. M., Sobrinho, J. C., Mendes, M. M., Costa, T. R., Grabner, A. N., Rodrigues, V. M. & Soares, A. M. (2014). Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. *BioMed Research International*, 2014.

Jaimes, J. E. R., & Marcas-Cáceres, G. (2019). Accidente ofídico fatal por *Bothrops atrox* en un niño de Ucayali, Perú. *Revista CES Medicina*, 33(3), 248-253.

Jia, Y., Olvera, P., Rangel, F., Mendez, B., & Reddy, S. (2019). Rapid identification of phospholipase A₂ transcripts from snake venoms. *Toxins*, 11(2), 69.

Kabara, J. J., & Fischer, G. H. (1969). Chemical composition of *Naja naja*: extractable lipids. *Toxicon*, 7(3), 223-227.

Kamiguti, A. S., Zuzel, M., & Theakston, R. D. G. (1998). Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31, 853-862.

Kang, T. S., Georgieva, D., Genov, N., Murakami, M. T., Sinha, M., Kumar, R. P & Kini, R. M. (2011). Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. *The FEBS journal*, 278(23), 4544-4576.

Kini, R. M., & Evans, H. J. (1992). Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. *Toxicon*, 30(3), 265-293.

Ko, J., Park, H., Heo, L., & Seok, C. (2012). GalaxyWEB server for protein structure prediction and refinement. *Nucleic acids research*, 40(W1), W294-W297.

Kohlhoff, M., Borges, M. H., Yarleque, A., Cabezas, C., Richardson, M., & Sanchez, E. F. (2012). Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*. *Journal of proteomics*, 75(7), 2181-2195.

Kotewicz, M. L., D'Alessio, J. M., Driftmier, K. M., Blodgett, K. P., & Gerard, G. F. (1985). Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*. *Gene*, 35(3), 249-258.

Krug, M. S., & Berger, S. L. (1987). First-strand cDNA synthesis primed with oligo (dT). *Methods in enzymology*, 152.

Kumar, R., & Sharma, A. (2023). Computational strategies and tools for protein tertiary structure prediction. In *Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship* (pp. 225-242). Academic Press.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547.

Kuo, Y. J., Chung, C. H., & Huang, T. F. (2019). From discovery of snake venom disintegrins to a safer therapeutic antithrombotic agent. *Toxins*, 11(7), 372.

Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology*, 157(1), 105-132.

Laskowski, R. A. (2001). PDBsum: summaries and analyses of PDB structures. *Nucleic acids research*, 29(1), 221-222.

Lazarovici, P., Marcinkiewicz, C., & Lelkes, P. I. (2019). From snake venom's disintegrins and C-type lectins to anti-platelet drugs. *Toxins*, 11(5), 303.

Lee, C. Y. (1979). Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 52, 75-84.

Lévano Saravia, J. D., & Fernández Vera, R. (2004). Diagnóstico y tratamiento de los accidentes por animales ponzoñosos. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. ISBN 9972.857.33.6.

Li, C. M. C., & Jacks, T. (2017). SH3PXD2A (SH3 and PX domains 2A). Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology 6: 326-330.

Loftus, J. C., Halloran, C. E., Ginsberg, M. H., Feigen, L. P., Zablocki, J. A., & Smith, J. W. (1996). The Amino-terminal One-third of α IIb Defines the Ligand Recognition Specificity of Integrin α IIb β 3 (*). *Journal of Biological Chemistry*, 271(4), 2033-2039.

Lomonte, B., Díaz, C., Chaves, F., Fernández, J., Ruiz, M., Salas, M., & Sasa, M. (2020). Comparative characterization of Viperidae snake venoms from Perú reveals two compositional patterns of phospholipase A₂ expression. *Toxicon*: X, 7, 100044.

Mackessy, S. P., & Saviola, A. J. (2016). Understanding biological roles of venoms among the Caenophidia: The importance of rear-fanged snakes.

Maguiña Vargas, C., Henríquez, C., Ilquimiche, L., Mostorino, R., Gotuzzo Herencia, E., Legua, P., & Seas Ramos, C. (1998). Ofidismo por *Bothrops pictus* en el Hospital Nacional Cayetano Heredia: Estudio prospectivo de 23 casos. *Folia dermatol. peru*, 41-8.

Marchler-Bauer, A., & Bryant, S. H. (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic acids research*, 32(suppl_2), W327-W331.

Martins, M., Araujo, M. S., Sawaya, R. J., & Nunes, R. (2001). Diversity and evolution of macrohabitat use, body size and morphology in a monophyletic group of Neotropical pitvipers (*Bothrops*). *Journal of Zoology*, 254(4), 529-538.

Masago, K., Fujita, S., Oya, Y., Takahashi, Y., Matsushita, H., Sasaki, E., & Kuroda, H. (2021). Comparison between fluorimetry (Qubit) and spectrophotometry (NanoDrop) in the quantification of DNA and RNA extracted from frozen and FFPE tissues from lung cancer patients: A real-world use of genomic tests. *Medicina*, 57(12), 1375.

Matsunaga, Y., Yamazaki, Y., Hyodo, F., Sugiyama, Y., Nozaki, M., & Morita, T. (2009). Structural divergence of cysteine-rich secretory proteins in snake venoms. *Journal of biochemistry*, 145(3), 365-375.

McCleary, R. J., & Kini, R. M. (2013). Non-enzymatic proteins from snake venoms: a gold mine of pharmacological tools and drug leads. *Toxicon*, 62, 56-74.

McGinnis, S., & Madden, T. L. (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic acids research*, 32(suppl_2), W20-W25.

McLane, M. A., Marcinkiewicz, C., Vijay-Kumar, S., Wierzbicka-Patynowski, I., & Niewiarowski, S. (1998). Viper venom disintegrins and related molecules. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 219(2), 109-119.

McLane, M. A., Sanchez, E. E., Wong, A., Paquette-Straub, C., & Perez, J. C. (2004). Disintegrins. *Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders*, 4(4), 327-355.

McLane, M. A., Vijay-Kumar, S., Marcinkiewicz, C., Calvete, J. J., & Niewiarowski, S. (1996). Importance of the structure of the RGD-containing loop in the disintegrins echistatin and eristostatin for recognition of $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ and $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrins. *FEBS letters*, 391(1-2), 139-143.

Mendoza, J., Vivas, D., Inga, R., Arbaiza, E., Rodríguez, E., & Yarlequé, A. (2009). Patrones electroforéticos de los venenos de serpientes peruanas de los géneros *Bothrops* y *Lachesis*. *Revista de la Sociedad química del Perú*, 75(2), 235-242.

Ministerio de salud. (2005). Norma Técnica sobre Prevención y Tratamiento de Accidentes por Animales Ponzofiosos. Dirección General de Salud de las Personas. ISBN 9972-851-25-7.

Modahl, C. M., & Mackessy, S. P. (2016). Full-length venom protein cDNA sequences from venom-derived mRNA: exploring compositional variation and adaptive multigene evolution. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(6), e0004587.

Mohamed Abd El-Aziz, T., Soares, A. G., & Stockand, J. D. (2019). Snake venoms in drug discovery: Valuable therapeutic tools for life saving. *Toxins*, *11*(10), 564.

Moura-da-Silva, A. M., Furlan, M. S., Caporrino, M. C., Grego, K. F., Portes-Junior, J. A., Clissa, P. B., & Magalhães, G. S. (2011). Diversity of metalloproteinases in Bothrops neuwiedi snake venom transcripts: evidences for recombination between different classes of SVMPs. *BMC genetics*, *12*(1), 1-14.

Mukherjee, A. K., Kalita, B., Dutta, S., Patra, A., Maiti, C. R., & Punde, D. (2021). Snake envenomation: Therapy and challenges in India. In *Handbook of venoms and toxins of reptiles* (pp. 581-592). CRC Press.

Munawar, A., Ali, S. A., Akrem, A., & Betzel, C. (2018). Snake venom peptides: Tools of biodiscovery. *Toxins*, *10*(11), 474.

Novak, U. (2004). ADAM proteins in the brain. *Journal of Clinical Neuroscience*, *11*(3), 227-235.

Oliveira, I. S. D., Manzini, R. V., Ferreira, I. G., Cardoso, I. A., Bordon, K. D. C. F., Machado, A. R. T. & Arantes, E. C. (2018). Cell migration inhibition activity of a non-RGD disintegrin from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, *24*.

Owczarzy, R., Tataurov, A. V., Wu, Y., Manthey, J. A., McQuisten, K. A., Almbrazi, H. G., & Peek, A. S. (2008). IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic acids research*, *36*(suppl_2), W163-W169.

Oyama, E., & Takahashi, H. (2017). Structures and functions of snake venom metalloproteinases (SVMP) from *Protobothrops* venom collected in Japan. *Molecules*, 22(8), 1305.

Paulchamy, C. (2010). Pharmacological perspectives of snake venoms from Viperidae family. *The Internet Journal of Pharmacology*, 8(2), 32.

Poovakka, S. K., Ramadas, D., Ramadas, G., & VG, D. R. (2018). Quality affecting factors of RNA—its assessment and influence on PCR Reactions. *Int. J. Sci. Res. in Biological Sciences Vol, 5, 6*.

Quispe, E., Torrejón, D., Bautista, L., Sandoval, G., Rodríguez, E., Lazo, F., & Yarlequé, A. (2019). Purificación y algunas propiedades bioquímicas y moleculares de una nueva fosfolipasa A₂ no miotóxica del veneno de la serpiente *Bothrops atrox*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 85(4), 505-517.

Rahman, S., Aitken, A., Flynn, G., Formstone, C., & Savidge, G. F. (1998). Modulation of RGD sequence motifs regulates disintegrin recognition of α IIb β 3 and α 5 β 1 integrin complexes. *Biochemical Journal*, 335(2), 247-257.

Raw, I., Guidolin, R., Higashi, H. G., Kelem, E. M. A., & Tu, A. T. (1991). Reptile Venoms and Toxins, Handbook of Natural Toxins.

Reid, H. A., & Theakston, R. D. G. (1983). The management of snake bite. *Bulletin of the World Health Organization*, 61(6), 885.

Rengifo González, C., & Rodríguez Acosta, A. (2004). Serpientes, veneno y tratamiento médico en Venezuela. In *Serpientes, veneno y tratamiento médico en Venezuela* (pp. 80-80).

Rivas-Mercado, E. A., & Garza-Ocañas, L. (2017). Disintegrins obtained from snake venom and their pharmacological potential. *Medicina Universitaria*, 19(74), 32-37.

Rodrigues, C. R. (2018). Perfil proteômico, atividades biológicas e análise antigênica do veneno da serpente peruana *Bothriopsis bilineata smaragdina* (Loro Machaco). (Tesis de maestría). Universidade Federal de Minas Gerais

Rodrigues, C. R., Molina, D. A. M., de Assis, T. C. S., Liberato, C., Melo-Braga, M. N., Ferreyra, C. B., & Chávez-Olórtegui, C. (2020). Proteomic and toxinological characterization of Peruvian pitviper *Bothrops brazili* ("jergón shushupe"), venom. *Toxicon*, *184*, 19-27.

Rojas, E., Quesada, L., Arce, V., Lomonte, B., Rojas, G., & Gutierrez, J. M. (2005). Neutralization of four Peruvian *Bothrops* sp. snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Perú and Costa Rica: preclinical assessment. *Acta tropica*, *93*(1), 85-95.

Rost, B., Sander, C., & Schneider, R. (1994). PHD-an automatic mail server for protein secondary structure prediction. *Bioinformatics*, *10*(1), 53-60.

Sajevic, T., Leonardi, A., & Križaj, I. (2011). Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon*, *57*(5), 627-645.

Sánchez, E. E. (2004). Desintegrinas en Veneno de Serpientes: un nuevo enfoque en el tratamiento de las enfermedades Cardiovasculares, Cáncer, Diabetes. *Revista de la Facultad de Medicina*, *27*(1), 10-14.

Sánchez, E. E., Rodríguez-Acosta, A., Palomar, R., Lucena, S. E., Bashir, S., Soto, J. G., & Pérez, J. C. (2009). Colombistatin: a disintegrin isolated from the venom of the South American snake (*Bothrops colombiensis*) that effectively inhibits platelet aggregation and SK-Mel-28 cell adhesion. *Archives of toxicology*, *83*, 271-279.

Sanchez, E. F., Richardson, M., Gremski, L. H., Veiga, S. S., Yarleque, A., Niland, S., & Eble, J. A. (2016). A novel fibrinolytic metalloproteinase, barnettlysin-I from *Bothrops barnetti* (Barnett's pitviper) snake venom with anti-platelet properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *1860*(3), 542-556.

Saviola, A. J., Chiszar, D., Busch, C., & Mackessy, S. P. (2013). Molecular basis for prey relocation in viperid snakes. *Bmc Biology*, *11*, 1-10.

Scarborough, R. M., Rose, J. W., Naughton, M. A., Phillips, D. R., Nannizzi, L., Arfsten, A. & Charo, I. F. (1993). Characterization of the integrin specificities of disintegrins isolated from American pit viper venoms. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(2), 1058-1065.

Shendure, J., Balasubramanian, S., Church, G. M., Gilbert, W., Rogers, J., Schloss, J. A., & Waterston, R. H. (2017). DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*, 550(7676), 345-353.

Shin, Y., & Morita, T. (1998). Rhodocytin, a functional novel platelet agonist belonging to the heterodimeric C-type lectin family, induces platelet aggregation independently of glycoprotein Ib. *Biochemical and biophysical research communications*, 245(3), 741-745.

Sievers, F., & Higgins, D. G. (2014). Clustal omega. *Current protocols in bioinformatics*, 48(1), 3-13.

Sigrist, C. J., Cerutti, L., Hulo, N., Gattiker, A., Falquet, L., Pagni, M., & Bucher, P. (2002). PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Briefings in bioinformatics*, 3(3), 265-274.

Stazzonelli, J. C., Cabrera, M. P., & Scrocchi, G. J. (2018). *Bothrops diporus*: Yarará, Yarará chica.

Stocker, K. F. (1990). Medical use of snake venom proteins. p. 1-272, CRC Press, Boca Raton, FL.

Stuginski, D. R., Sant'Anna, S. S., Fernandes, W., & Abe, A. S. (2012). Circadian pattern of *Bothrops moojeni* in captivity (Serpentes: Viperidae). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 18, 97-102.

Sunitha, K., Hemshekhar, M., Thushara, R. M., Santhosh, M. S., Sundaram, M. S., Kemparaju, K., & Girish, K. S. (2015). Inflammation and oxidative stress in viper bite: an insight within and beyond. *Toxicon*, 98, 89-97.

Suntravat, M., Cromer, W. E., Marquez, J., Galan, J. A., Zawieja, D. C., Davies, P., & Sánchez, E. E. (2019). The isolation and characterization of a new snake venom cysteine-rich secretory protein (svCRiSP) from the venom of the Southern Pacific rattlesnake and its effect on vascular permeability. *Toxicon*, 165, 22-30.

Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., & von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: protein–protein association

networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic acids research*, 51(D1), D638-D646.

Tan, C. H., Liew, J. L., Navanesan, S., Sim, K. S., Tan, N. H., & Tan, K. Y. (2020). Cytotoxic and anticancer properties of the *Malaysian mangrove* pit viper (*Trimeresurus purpureomaculatus*) venom and its disintegrin (purpureomaculin). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 26.

Tao, Z., Suo, H., Zhang, L., Jin, Z., Wang, Z., Wang, D., & Chen, B. (2020). MRPL13 is a prognostic cancer biomarker and correlates with immune infiltrates in breast cancer. *OncoTargets and therapy*, 12255-12268.

Teodoro, A., Goncalves, F. J., Oliveira, H., & Marques, S. (2022). Venom of Viperidae: A Perspective of its Antibacterial and Antitumor Potential. *Current Drug Targets*, 23(2), 126-144.

Torrejón Maldonado, D. A. (2021). Caracterización molecular y clonación de la fosfolipasa A₂ homóloga de los venenos de *Bothrops pictus*, *Bothrops brazili* y *Bothrops atrox*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.

Torrejón, D., Cárdenas, J., Juárez, D., Espinoza, J., Proleón, A., Agurto-Arteaga, A., & Yarlequé, A. (2023). Comparison of Four Methods of RNA Extraction and cDNA Synthesis from The Venom of Peruvian Snakes of the Genus *Bothrops* of Clinical Importance. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 11161.

Ulges, A., Schmitt, E., Bopp, T., & Klein, M. (2017). Messenger RNA Sequencing of Rare Cell Populations in the Lung and Lung-Draining Lymph Nodes. *Inflammation: Methods and Protocols*, 199-219.

Urdaneta, A. H., Bolaños, F., & Gutiérrez, J. M. (2004). Feeding behavior and venom toxicity of coral snake *Micrurus nigrocinctus* (Serpentes: Elapidae) on its natural prey in captivity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 138(4), 485-492.

Vanuopadath, M., Sajeev, N., Murali, A. R., Sudish, N., Kangosseri, N., Sebastian, I. R., & Nair, S. S. (2018). Mass spectrometry-assisted venom profiling of *Hypnale hypnale* found in the Western Ghats of India incorporating de novo

sequencing approaches. *International journal of biological macromolecules*, 118, 1736-1746.

Vasconcelos, A. A., Estrada, J. C., David, V., Wermelinger, L. S., Almeida, F. C., & Zingali, R. B. (2021). Structure-function relationship of the disintegrin family: Sequence signature and integrin interaction. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 783301.

Vivas-Ruiz, D., Inga, R., & Yarlequé, A. (2012). Uso potencial de componentes del veneno de serpiente en el tratamiento del cáncer. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 29, 396-401.

Vogt, N. (2020). Venomous organoids. *Nat Methods* 17, 360.

Waidyanatha, S., Silva, A., Siribaddana, S., & Isbister, G. K. (2019). Long-term effects of snake envenoming. *Toxins*, 11(4), 193.

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research*, 46(W1), W296-W303.

Wellmann, I. A., & Guerra-Centeno, D. (2020). Envenenamientos por mordedura de serpiente en Guatemala: revisión de literatura. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 7(2), 251-264.

Whiteley, G., Logan, R. A., Leung, K. Y. D., Newberry, F. J., Rowley, P. D., Dunbar, J. P., & Harrison, R. A. (2016). Stabilising the Integrity of Snake Venom mRNA Stored under Tropical Field Conditions Expands Research Horizons. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(6), e0004615.

World Health Organization. (2022). Snakebite envenoming. Fecha de consulta: 15 de mayo de 2023.

Wu, W. B., Chang, S. C., Liao, M. Y., & Huang, T. F. (2001). Purification, molecular cloning and mechanism of action of graminelysin I, a snake-venom-derived metalloproteinase that induces apoptosis of human endothelial cells. *Biochemical Journal*, 357(3), 719-728.

Yarlequé, M., Ortiz, C., Morante, Y., & Armando, Y. (2012). Estudio comparativo de algunas propiedades bioquímicas de venenos de serpientes de diferentes regiones del mundo. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 78(1), 27-36.

Zamora, M. B. N., Suárez, W. H. S., & Mas, E. A. V. (2010). Las serpientes venenosas de importancia en la salud pública del Perú. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*, 11(7), 1-17.

Zelanis, A., Tashima, A. K., Pinto, A. F., Paes Leme, A. F., Stuginski, D. R., Furtado, M. F., & Serrano, S. M. (2011). *Bothrops jararaca* venom proteome rearrangement upon neonate to adult transition. *Proteomics*, 11(21), 4218-4228.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Código del Protein Data Bank (PDB) de las secuencias en el alineamiento múltiple.

Desintegrina	Longitud (aa)	Tipo de desintegrina	Especie	ID del PDB
Jerdostatin	44	Corta	<i>Protobothrops jerdonii</i>	2W9V
Echistatin	49	Corta	<i>Echis carinatus</i>	1RO3
Obtustatin	41	Corta	<i>Macrovipera lebetina obtusa</i>	1MPZ
Rhodostomin	68	Dimérica	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	7X4V
Acostatin-beta	64	Dimérica	<i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>	3C05
Schistatin	64	Dimérica	<i>Echis carinatus</i>	1RMR
Triflavin	70	Mediana	<i>Protobothrops flavoviridis</i>	1J2L
Flavoridin	70	Mediana	<i>Protobothrops flavoviridis</i>	1FVL
Salmosin	73	Mediana	<i>Gloydus brevicaudus</i>	1L3X
Bitistatin	83	Larga	<i>Bitis arietans</i>	2MOP
Catrocollastatin	419	PIII	<i>Crotalus atrox</i>	2DW0
Atragin	422	PIII	<i>Naja atra</i>	3K7L
Aahiv	417	PIII	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	3HDB

Anexo 2. Parámetros de calidad de las plantillas usadas para el modelamiento por homología de desintegrinas de *Bothrops*.

	ID del PDB de plantillas	GMQE	QMEANDisCo Global	Identidad
Desintegrina de <i>B. atrox</i>	4RQG	0.73	0.72 ± 0.11	81.82 %
Desintegrina de <i>B. pictus</i>	1J2L	0.70	0.67 ± 0.11	77.94 %
Desintegrina de <i>B. barnetti</i>	4RQG	0.66	0.66 ± 0.11	71.21 %

Desintegrina de <i>B. brazili</i>	1J2L	0.76	0.71 ± 0.11	84.85 %
--	------	------	-------------	---------

Anexo 3. Resultados del alineamiento con el programa BLASTn de las secuencias nucleotídicas de desintegrinas en *Bothrops atrox*, *Bothrops pictus*, *Bothrops barnetti* y *Bothrops brazili*.

Gen de interés	ARNm del templado	Especie del templado	Puntaje	Cobertura	E-value	Identidad	Accesión
<i>Bothrops atrox</i>	MP_Ila SVMP precursor	<i>Bothrops neuwiedi</i>	366	100 %	8e-97	97.65 %	HM443642.1
	Metaloproteinasa BOJUMET III	<i>Bothrops jararacussu</i>	366	100 %	8e-97	97.65 %	AY258153.1
	Insularinasa A	<i>Bothrops insularis</i>	366	100 %	8e-97	97.66 %	AY736107.1
	Metaloproteinasa tipo II	<i>Bothrops asper</i>	355	100 %	2e-93	96.71 %	DQ247725.1
	Jararacina	<i>Bothrops jararaca</i>	355	100 %	2e-93	96.71 %	DQ375442.1
<i>Bothrops pictus</i>	Metaloproteinasa PIIb	<i>Bothriechis lateralis</i>	309	91 %	1e-79	94.09 %	KU885992.1
	MP_Ilb2 SVMP precursor	<i>Bothrops neuwiedi</i>	305	99 %	2e-78	91.44 %	HM443638.1
	MP_Ilb1 SVMP precursor	<i>Bothrops neuwiedi</i>	305	99 %	2e-78	91.44 %	HM443637.1
	MP_Ilx3 SVMP precursor	<i>Bothrops neuwiedi</i>	294	99 %	4e-75	90.54 %	HM443641.1
	Jerdonitina	<i>Protobothrops jerdonii</i>	291	93 %	5e-74	91.83 %	AY364231.1
<i>Bothrops barnetti</i>	Desintegrina Jarastatina	<i>Bothrops jararaca</i>	366	100 %	8e-97	97.65 %	DQ375441.1
	DisBa-01	<i>Bothrops alternatus</i>	361	100 %	4e-95	97.18 %	AY259516.1
	Saxatilina	<i>Gloydus halys</i>	361	100 %	4e-95	97.18 %	AY005480.1
	Precursor de bothrostatina	<i>Bothrops jararaca</i>	361	100 %	4e-95	97.18 %	AF345931.1
	Mt-d	<i>Gloydus halys</i>	355	98 %	2e-93	97.14 %	AF051789.1
<i>Bothrops brazili</i>	MP_Ila SVMP precursor	<i>Bothrops neuwiedi</i>	363	99 %	1e-95	99.01 %	HM443642.1
	Metaloproteinasa BOJUMET III	<i>Bothrops jararacussu</i>	363	99 %	1e-95	99.01 %	AY258153.1

Metaloproteinasas tipo II	<i>Bothrops asper</i>	357	99 %	5e-94	98.51 %	AY736107.1
Metaloproteinasas tipo II	<i>Bothrops asper</i>	351	99 %	2e-92	98.02 %	DQ247725.1
Desintegrinas Jararacina	<i>Bothrops jararaca</i>	351	99 %	2e-92	98.02 %	DQ375442.1

Anexo 4. Resultados del alineamiento con el programa BLASTp de las secuencias aminoacídicas de desintegrinas en *Bothrops atrox*, *Bothrops pictus*, *Bothrops barnetti* y *Bothrops brazili*.

Gen de interés	ARNm del templado	Especie del templado	Puntaje	Cobertura	E-value	Identidad	Accesión
<i>Bothrops atrox</i>	Metaloproteinasas BOJUMET III	<i>Bothrops jararacussu</i>	143	100 %	1e-40	97.14 %	AAP78953.1
	MP_Ila SVMP precursor	<i>Bothrops neuwiedi</i>	145	100 %	1e-40	97.14 %	ADO21511.1
	Desintegrinas bothrasperin	<i>Bothrops asper</i>	148	100 %	3e-40	95.71 %	Q072L5.1
	Metaloproteinasas tipo II 4a	<i>Crotalus horridus</i>	146	100 %	1e-39	90.00 %	QIV64746.1
	Metaloproteinasas tipo II 4b	<i>Crotalus horridus</i>	146	100 %	1e-39	90.00 %	QIS79137.1
<i>Bothrops pictus</i>	MP_Ilx3 SVMP precursor	<i>Bothrops neuwiedi</i>	125	98 %	4e-33	81.94 %	ADO21510.1
	Metaloproteinasas PIIb	<i>Bothriechis lateralis</i>	127	91 %	1e-32	88.06 %	AOF79100.1
	MP_Ilb2 SVMP precursor	<i>Bothrops neuwiedi</i>	124	98 %	2e-32	81.94 %	ADO21507.1
	Desintegrinas Jarastatina	<i>Bothrops jararaca</i>	117	97 %	2e-32	85.92 %	Q0NZX5.1
	MP_Ilb1 SVMP precursor	<i>Bothrops neuwiedi</i>	124	98 %	2e-32	81.94 %	ADO21506.1
<i>Bothrops barnetti</i>	Desintegrinas Jarastatina	<i>Bothrops jararaca</i>	134	100 %	6e-39	94.29 %	Q0NZX5.1
	Desintegrinas Saxatilina	<i>Gloydus halys</i>	131	100 %	4e-38	92.86 %	Q9DGH6.1
	Desintegrinas Ussurina	<i>Gloydus ussuriensis</i>	142	100 %	4e-38	90.00 %	Q7SZD9.1
	Desintegrinas Halystatina	<i>Gloydus halys</i>	132	100 %	5e-38	91.43 %	Q90221.1
	SVMP precursor	<i>Bothrops jararaca</i>	142	100 %	5e-38	94.29 %	KAG5858135.1
<i>Bothrops brazili</i>	Metaloproteinasas BOJUMET III	<i>Bothrops jararacussu</i>	139	100 %	6e-39	98.51	AAP78953.1

MP_IIa SVMP precursor	<i>Bothrops neuwiedi</i>	140	100 %	6e-39	98.51	ADO21511.1
Metaloproteinasa tipo II 4b	<i>Crotalus horridus</i>	141	100 %	7e-38	91.04 %	QIS79137.1
Metaloproteinasa tipo II 4a	<i>Crotalus horridus</i>	141	100 %	7e-38	91.04 %	QIV64746.1
Desintegrina bothrasperin	<i>Bothrops asper</i>	139	100 %	3e-37	97.01 %	Q072L5.1

Anexo 5. Firmas de las secuencias de los grupos de desintegrinas agrupadas conforme a la clasificación de Vasconcelos et al., 2021.

Firma de las secuencia	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7A	G7B
GxECDC	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-
CCDAATCKLxxG AQC	-	-	-	✓	✓	-	-	-
GPCCR	-	-	-	-	-	-	✓	✓
CRxARGD	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-
CCxQCxF	-	✓	✓	✓	-	-	-	-
DDxCxG	-	-	-	✓	✓	-	-	-
DCPR	-	-	-	✓	-	✓	-	✓
NxCC	-	-	-	✓	✓	✓	-	-

* x representa la variación en el residuo de aminoácido.

Anexo 6. Proteínas centrales que participan en la construcción de la red de interacción proteína-proteína.

	Proteína central	Organismo	Identidad	Puntuación de bits	e-value
Desintegrina de <i>B. atrox</i>	ADAM8	<i>Homo sapiens</i>	45.8%	72.4	1.3e-13
Desintegrina de <i>B. pictus</i>	ADAM19	<i>Homo sapiens</i>	54.4%	85.9	1.2e-17

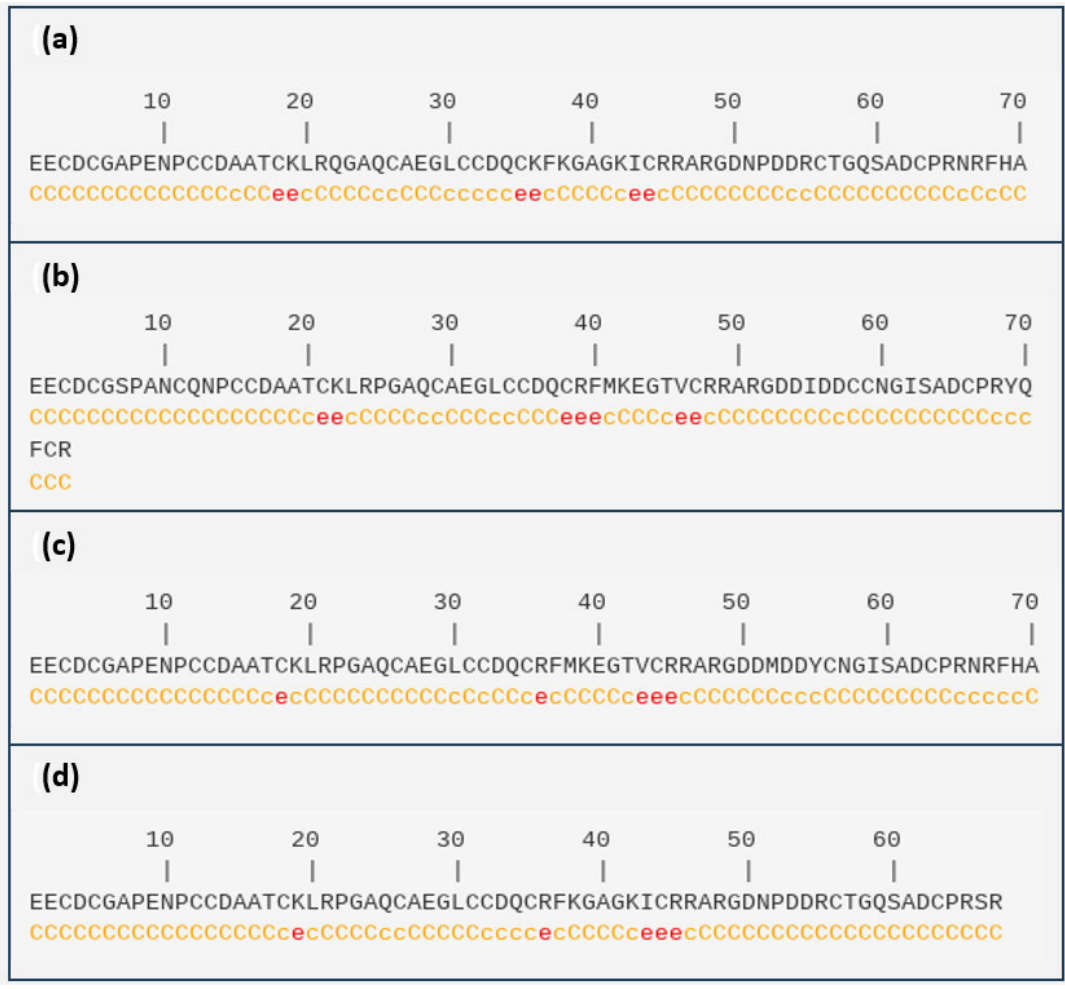
Desintegrina de <i>B. barnetti</i>	ADAM33	<i>Homo sapiens</i>	50.0%	72.0	1.7e-13
Desintegrina de <i>B. brazili</i>	ADAM33	<i>Homo sapiens</i>	52.9%	69.3	1e-12

Anexo 7. Proteínas asociadas que participan en la construcción de la red de interacción proteína-proteína.

	Proteína central	Proteína asociada	Puntaje
Desintegrina de <i>B. atrox</i>	ADAM8	Proteína ribosómica mitocondrial L13 (MRPL13)	0.825
		Repetición de Ankyrin y proteína 17 de la caja SOCS (ASB17)	0.724
		Ceruloplasmina (CP)	0.692
		Receptor del factor activador de plaquetas (PTAFR)	0.572
		Metaloproteinasa-9 de matriz (MMP9)	0.560
		Proteína-glutamina gamma-glutamilttransferasa 6 (TGM6)	0.556
		Repetición de Ankyrin y proteína 2 de la caja SOCS (ASB2)	0.555
		Protooncogén tirosina-proteína quinasa Src (SRC)	0.509
		Subunidad J del factor 3 de iniciación de la traducción eucariótica (EIF3J)	0.497
		Metaloproteinasa-25 de matriz (MMP25)	0.466
Desintegrina de <i>B. pictus</i>	ADAM19	Proteína 2A que contiene dominios SH3 y PX (SH3PXD2A)	0.799
		Proteína MAD2B del punto de control del ensamblaje del huso mitótico (MAD2L2)	0.760
		Subunidad catalítica zeta de la ADN polimerasa (REV3L)	0.672
		Proteína MAD2A del punto de control del ensamblaje del huso mitótico (MAD2L1)	0.669
		Proteína reparadora del ADN REV1 (REV1)	0.633

		Clasificación de nexin-9 (SNX9)	0.620
		Proteína 17 que contiene dominio de desintegrina y metaloproteinasa (ADAM17)	0.590
		Contiene dominio C-terminal de glutatión S-transferasa (GSTCD)	0.584
		Integrina beta-5 (ITGB5)	0.575
		Proteína 10 que contiene dominio de desintegrina y metaloproteinasa (ADAM10)	0.566
Desintegrina de <i>B. barnetti</i> y de <i>B. brazili</i>	ADAM33	Proteína de dedo PHD 11 (PHF11)	0.905
		Dipeptidil peptidasa 10 inactiva (DPP10)	0.787
		Receptor del neuropéptido S (NPSR1)	0.698
		Subunidad alfa del receptor de interleucina-4 soluble (IL4R)	0.645
		Proteína 3 similar a ORM1 (ORMDL3)	0.640
		Inhibidor de serina proteasa Kazal tipo 5 (SPINK5)	0.620
		Antígeno de histocompatibilidad HLA clase I soluble, cadena alfa G (HLA-G)	0.580
		Receptor 2 de prostaglandina D2 (PTGDR2)	0.558
		Subunidad alfa del receptor épsilon de inmunoglobulina de alta afinidad (FCER1A)	0.513
		Miembro 3 de la subfamilia S de canales dependientes de voltaje de potasio (KCNS3)	0.510

Anexo 8. Estructuras secundarias de las desintegrinas del género *Bothrops*. Las estructuras secundarias de desintegrinas de *Bothrops atrox* (a), *Bothrops pictus* (b), *Bothrops barnetti* (c) y *Bothrops brazili* (d) fueron predichas mediante el servidor PRABI. Las regiones con estructuras tipo Cc se caracterizan por un plegamiento aleatorio, mientras que las regiones etiquetadas como Ee corresponden a las denominadas cadenas extendidas.



Anexo 9. Parámetros de validación de los modelos predichos por los programas SWISS-MODEL y trRosetta antes de ser refinados.

Modelos teóricos de desintegrinas generados por homología				
	<i>B. atrox</i>	<i>B. pictus</i>	<i>B. barnetti</i>	<i>B. brazili</i>
Región más favorecida	88.5 %	77.6 %	88.7 %	84.6 %
Media general del factor G	- 0.24	- 0.11	- 0.18	- 0.06
Modelos teóricos de desintegrinas generados por <i>ab initio</i>				
	<i>B. atrox</i>	<i>B. pictus</i>	<i>B. barnetti</i>	<i>B. brazili</i>
Región más favorecida	70.2 %	75.4 %	79.3 %	79.2 %
Media general del factor G	- 0.04	- 0.05	0.01	- 0.08