Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Profesional de Ciencias Biológicas

Caracterización bioquímica e inmunológica comparativa de los venenos de *Bothrops sanctaecrucis* y *Bothrops atrox*, evaluación de su actividad miotóxica y caracterización de sus miotoxinas purificadas

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo con Mención en Zoología

AUTOR

Alexander LLONTOP MENDEZ

ASESOR

Armando YARLEQUÉ CHOCAS

Lima, Perú

2026



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

Llontop, A. (2026). *Caracterización bioquímica e inmunológica comparativa de los venenos de Bothrops sanctaecrucis y Bothrops atrox, evaluación de su actividad miotóxica y caracterización de sus miotoxinas purificadas*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Alexander Llontop Mendez
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	73472290
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-1903-4687
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Armando Yarlequé Chocas
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07649561
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-8038-2162
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Carmen Amelia Pantigoso Flores
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08565770
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Patricia Gloria Woll Toso
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10587728
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Oscar Diego Evangelista Vargas
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	46626302
Datos de investigación	

Línea de investigación	Principios bioactivos B.10.0.12
Grupo de investigación	Grupo de investigación en toxinas de origen animal y sus antivenenos - TOXIVEN
Agencia de financiamiento	PROCIENCIA, bajo el proyecto titulado "Efecto del homólogo de fosfolipasa A2 miotóxica BaMtx de *Bothrops atrox* en la expresión génica: Comprendiendo la capacidad antitumoral y miotóxica" con CONTRATO No PE501087970-2024PROCIENCIA
Ubicación geográfica de la investigación	Lima - Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) (12.0560° S, 77.0844° W)
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2023-2026
URL de disciplinas OCDE	Bioquímica, Biología Molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03

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 BIÓLOGO CON MENCIÓN EN ZOOLOGÍA (MODALIDAD: SUSTENTACIÓN PRESENCIAL DE TESIS)

Siendo las 10:19 horas del 10 de noviembre de 2026, 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 Biólogo con mención en Zoología** de **ALEXANDER LLONTOP MENDEZ.**

Luego de dar lectura y conformidad al expediente **N.º UNMSM-20260070509**, el titulando expuso su tesis: **CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA E INMUNOLÓGICA COMPARATIVA DE LOS VENENOS DE *Bothrops sanctaecrucis* y *Bothrops atrox*, EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD MIOTÓXICA Y CARACTERIZACIÓN DE SUS MIOTOXINAS PURIFICADAS,** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota ..19..., calificativo: ...Aprobado con máximal honores...

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo con mención en Zoología** a **ALEXANDER LLONTOP MENDEZ** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 11:40 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 10 de noviembre de 2026.

CARMEN AMELIA PANTIGOSO FLORES
(PRESIDENTA)

ARMANDO YARLEQUE CHOCAS
(ASESOR)

PATRICIA GLORIA WOLL TOSO
(MIEMBRO)

OSCAR DIEGO EVANGELISTA VARGAS
(MIEMBRO)

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE
SAN MARCOS
Universidad del Perú, Decana de América

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Armando Yarleque Chocas en mi condición de asesor acreditado con el Dictamen de la EP N° 000047-2026-EPCB-FCB/UNMSM de la tesis, cuyo título es, Caracterización bioquímica e inmunológica comparativa de los venenos de *Bothrops sanctaecrucis* y *Bothrops atrox*, evaluación de su actividad miotóxica y caracterización de sus miotoxinas purificadas

presentado por el (a) bachiller Alexander Llontop Mendez para optar el título profesional de Biólogo con mención en Zoología,

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 la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el 8% 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 profesional de Biologo con mención en Zoología.

Lima, 3 de noviembre de 2026

Firma del Asesor

Nombres y Apellidos del asesor: Armando Yarleque Chocas

DNI: 07649561

* Según corresponda: bachiller, magíster, doctor; título profesional o título de segunda especialidad

La vigencia del presente certificado corresponde a un período de noventa (90) días desde la fecha de su emisión; siempre que no haya observaciones en el texto durante el proceso de revisión por el jurado informante o surja alguna contingencia.

La presente tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, gracias al apoyo financiero proporcionado por PROCIENCIA, bajo el proyecto titulado "Efecto del homólogo de fosfolipasa A2 miotóxica BaMtx de *Bothrops atrox* en la expresión génica: Comprendiendo la capacidad antitumoral y miotóxica" con CONTRATO No PE501087970-2024-PROCIENCIA

Asimismo, agradecimiento especial al Proyecto PUCARARA, a través de sus investigadores Beatriz Nieto Ariza y Huber Villca Corani, así también a Toni Bonaso de la Reserva Privada Patrimonio Natural - Potrerillos del Güenda por el valioso apoyo brindado en el desarrollo de esta investigación. Su colaboración fue fundamental al proporcionar el veneno de ejemplares de *Bothrops sanctaecrucis* necesario para los análisis realizados.

DEDICATORIA

A mis padres Carlos y Flora, quienes desde un inicio me brindaron su apoyo en cada paso que di y en cada decisión que tomé. A ellos les debo todo lo que soy ahora y todo lo que podré lograr en un futuro, gracias a su soporte incondicional les dedico este pequeño fruto de mi vida académica.

A mis hermanas Nerida y Camila, quienes desde siempre han estado para mí en todo momento, mostrando su empatía y apoyo constante, gracias a ellas, esta pequeña parte de mi vida se pudo realizar.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Armando Yarleque Chocas, jefe del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por haberme dado la oportunidad de formar parte del laboratorio, por todas las facilidades brindadas, consejos y apoyo constante durante mi permanencia a lo largo de los años y durante el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Dan Erick Vivas Ruiz por el apoyo y guía durante el tiempo que llevo en el laboratorio, por los consejos personales y académicos que me ayudaron a ser mejor persona y crecer como investigador, asimismo por motivarme a través del ejemplo de seguir en este camino de la ciencia.

A la Dra. Fanny Lazo por los consejos y el apoyo brindado durante el desarrollo de esta tesis y a la Mg. Edith Rodríguez por enseñarme la importancia del orden y disciplina durante la investigación.

Al Mg. Daniel Torrejón por el apoyo y todas sus enseñanzas brindadas cuando recién ingresé al laboratorio, así como también a todos mis compañeros, Mg. Alex Proleón, Jordano Espinoza, Raul Rivas, Juan Cabrejos, Alejandro Roque, Tania Broncano, Angie Regalado, Victor Otarola e Ivan Rodriguez, que formaron parte de mi crecimiento personal y académico durante el desarrollo de esta tesis. Mención especial para mi amigo y colega Antony Salcedo quien fue un soporte muy importante desde que comencé la etapa universitaria hasta ahora.

Por último, a todos los profesores con los cuales compartí y me brindaron sus enseñanzas durante mi formación académica en la carrera de Ciencias Biológicas; y a todos mis compañeros y amigos de la Base 19 que me apoyaron y formaron parte de este largo camino.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN 1
II. ANTECEDENTES 8
III. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN 12
3.1 OBJETIVO GENERAL 12
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 12
IV. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS 13
4.1 HIPÓTESIS NULA (H0) 13
4.2 HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H1) 13
V. MATERIALES Y MÉTODOS 13
5.1. Material biológico 13
5.1.1. Venenos 13
5.1.2. Antivenenos 14
5.1.3. Animales de experimentación 15
5.2. Reactivos, materiales y equipos principales 16
5.2.1. Reactivos y materiales 16
5.2.2. Equipos 19
5.3. Caracterización bioquímica de los venenos 20
5.3.1. Cuantificación de proteínas 20
5.3.1.1. Absorbancia a 280 nm 20
5.3.1.2. Bradford 21
5.3.1.3. BCA 21
5.3.2. Perfil electroforético mediante SDS-PAGE 22
5.3.3. Actividades enzimáticas 23
5.3.3.1. Actividad protelítica 23
5.3.3.2. Actividad amidolítica 23
5.3.3.3. Actividad fosfolipasa A2 24
5.3.3.4. Actividad hialuronidasa 25
5.4. Neutralización de las actividades enzimáticas 26
5.5. Purificación de las miotoxinas 26
5.5.1. Cromatografía de intercambio catiónico 26
5.6. Caracterización de las miotoxinas purificadas 27
5.6.1. Cuantificación proteica 27
5.6.2. Evaluación electroforética (SDS-PAGE) y estimación de la masa molecular aparente 28
5.6.3. Determinación de la masa molecular mediante espectrometría de masas MALDI-TOF 28
5.6.4. Determinación de la actividad fosfolipasa A2 29
5.6.5. Determinación de la actividad miotóxica 30
5.7. Caracterización inmunológica 31
5.7.1. ELISA indirecto 31
5.8. Análisis de datos y tratamiento estadístico 33
VI. RESULTADOS 34

6.1. Caracterización bioquímica de los venenos de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis* 34
6.1.1. Cuantificación proteica 34
6.1.2. Perfil electroforético mediante SDS-PAGE 35
6.1.3. Actividad proteolítica y su neutralización 36
6.1.4. Actividad amidolítica y su neutralización 37
6.1.5. Actividad fosfolipasa A2 y su neutralización 38
6.1.6. Actividad hialuronidasa y su neutralización 39
6.2. Purificación de las miotoxinas 41
6.2.1. Perfil cromatográfico de *B. atrox* 41
6.2.2. Perfil cromatográfico de *B. sanctaecrucis* 42
6.2.3. Rendimiento del proceso de purificación 43
6.3. Caracterización de las miotoxinas purificadas 45
6.3.1. Perfil electroforético de BaMtx y BsMtx mediante SDS-PAGE 45
6.3.2. Determinación de la masa molecular de BsMtx mediante MALDI-TOF46
6.3.3. Actividad fosfolipasa A2 de BaMtx y BsMtx 46
6.3.4. Actividad miotóxica de los venenos y las miotoxinas purificadas 47
6.4. Caracterización inmunológica 49
6.4.1. Reactividad mediante ELISA indirecto 49
VII. DISCUSIÓN 51
VIII. CONCLUCIONES 79
IX. RECOMENDACIONES 80
X. REFERENCIAS 81

ABREVIATURAS

PLA_2	: Phospholipase A_2
CM-Sephadex C-25	: Carboximetil-Sephadex C-25
INS	: Instituto Nacional de Salud
INLASA	: Instituto Nacional de Laboratorio de Salud
CK-NAC	: Creatina quinasa N-Acetilcisteína
Tris	: Tris (hidroximetil) amino metano
TEMED	: N N N' N' - tetrametietilendiamino
PSA	: Persulfato de Amonio
PBS	: Phosphate Buffered Saline
OPD	: Diclorohidrato de o-fenilendiamina
UV-VIS	: Ultravioleta-Visible
µg, mg	: microgramo, miligramo
µL, mL	: microlitro, mililitro
kDa	: kilodalton
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
pH	: Potencial de hidrógeno
pI	: Punto Isoeléctrico
IU/L	: Unidades internacionales por litro
rpm	: Revoluciones por minuto
g	: gravedades (fuerza centrífuga relativa)
MALDI-TOF	: Desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada a tiempo de vuelo
RP-HPLC	: Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa

RESUMEN

El veneno de *Bothrops atrox* ha sido ampliamente estudiado, mientras que la información sobre *Bothrops sanctaecrucis* y sus componentes miotóxicos sigue siendo limitada. Este estudio tuvo como objetivo comparar ambos venenos a nivel bioquímico e inmunológico, evaluar la neutralización de sus principales actividades enzimáticas por los antivenenos polivalentes del INS e INLASA y caracterizar sus miotoxinas purificadas. Para ello, se determinaron la concentración proteica, los perfiles electroforéticos y las actividades proteolítica, amidolítica, fosfolipasa A_2 e hialuronidasa. En cuanto a las miotoxinas, BaMtx y BsMtx se obtuvieron mediante cromatografía de intercambio catiónico en CM-Sephadex C-25 y se caracterizaron por SDS-PAGE, actividad PLA_2 y miotoxicidad; además, BsMtx fue analizada mediante MALDI-TOF. El reconocimiento inmunológico se evaluó por ELISA indirecto.

Los venenos mostraron diferencias claras en sus perfiles bioquímicos. *B. sanctaecrucis* presentó mayor actividad proteolítica, mientras que *B. atrox* mostró mayores actividades amidolítica, PLA_2 e hialuronidasa. La neutralización por INS e INLASA también varió según la actividad evaluada: fue mayor para la actividad amidolítica de *B. atrox* y limitada para las actividades proteolítica e hialuronidasa. BsMtx presentó una masa molecular aproximada de 13.77 kDa, baja actividad PLA_2 y marcada actividad miotóxica, un conjunto de características compatible con una miotoxina homóloga de PLA_2. La miotoxicidad fue dependiente de la dosis; *B. sanctaecrucis* produjo una mayor respuesta que *B. atrox* a 100 µg, mientras que BsMtx generó una mayor liberación de CK que BaMtx a 25 y 75 µg. Ambos antivenenos reconocieron los venenos y las miotoxinas purificadas, aunque BsMtx presentó los títulos de reconocimiento más bajos. Estos resultados muestran diferencias bioquímicas, funcionales e inmunológicas entre ambas especies y aportan nueva información sobre el veneno y los componentes miotóxicos de *B. sanctaecrucis*.

Palabras claves: Bothrops sanctaecrucis; Bothrops atrox; BaMtx; BsMtx; fosfolipasa A_2; antivenenos; miotoxicidad; reconocimiento inmunológico.

ABSTRACT

The venom of *Bothrops atrox* has been extensively studied, whereas information on *Bothrops sanctaecrucis* and its myotoxic components remains limited. This study aimed to compare the venoms of both species at the biochemical and immunological levels, evaluate the neutralization of their main enzymatic activities by the polyvalent antivenoms produced by INS and INLASA, and characterize their purified myotoxins. For this purpose, protein concentration, electrophoretic profiles, and proteolytic, amidolytic, phospholipase A_2, and hyaluronidase activities were determined. The myotoxins BaMtx and BsMtx were obtained by cation-exchange chromatography on CM-Sephadex C-25 and were characterized by SDS-PAGE, PLA_2 activity, and myotoxicity; in addition, BsMtx was analyzed by MALDI-TOF. Immunological recognition was evaluated by indirect ELISA.

The venoms showed clear differences in their biochemical profiles. *B. sanctaecrucis* exhibited higher proteolytic activity, whereas *B. atrox* showed higher amidolytic, PLA_2, and hyaluronidase activities. Neutralization by INS and INLASA also varied according to the activity assessed: it was greater for the amidolytic activity of *B. atrox* and limited for proteolytic and hyaluronidase activities. BsMtx had an approximate molecular mass of 13.77 kDa, low PLA_2 activity, and marked myotoxic activity, a set of characteristics consistent with a PLA_2 homologue myotoxin. Myotoxicity was dose-dependent; *B. sanctaecrucis* produced a greater response than *B. atrox* at 100 µg, whereas BsMtx induced greater CK release than BaMtx at 25 and 75 µg. Both antivenoms recognized the venoms and the purified myotoxins, although BsMtx showed the lowest recognition titers. These results demonstrate biochemical, functional, and immunological differences between the two species and provide new information on the venom and myotoxic components of *B. sanctaecrucis*.

Keywords: *Bothrops sanctaecrucis*; *Bothrops atrox*; BaMtx; BsMtx; phospholipase A_2; antivenoms; myotoxicity; immunological recognition.

I. INTRODUCCIÓN

El envenenamiento por mordedura de serpientes, también conocido como ofidismo, está considerado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad tropical desatendida, debido a que más del 95% de casos ocurren en regiones tropicales y subtropicales en países en vía de desarrollo, afectando principalmente a poblaciones rurales de ingresos bajos y medianos (Chippaux, 2017b). Según datos epidemiológicos, la incidencia a nivel mundial ocurre entre 4.5 - 5.4 millones de mordeduras de serpientes al año, de los cuales entre 1.8 - 2.7 millones resultan en casos ofídicos, entre 81 000 – 138 000 terminan en muerte y cerca de 300 000 sobrevivientes terminan con secuelas permanentes, entre ellas discapacidad física y amputaciones, lo cual refleja negativamente el impacto sanitario y socioeconómico de esta enfermedad (OMS, 2023; Iliyasu et al., 2023; Afroz et al., 2024). Las actividades ocupacionales, ambientales y socioeconómicas son factores que incrementan el riesgo de mordedura de serpientes, en ese contexto, los trabajadores agrícolas y ganaderos, que desarrollan actividades en áreas próximas al hábitat de serpientes venenosas y que tienen un conocimiento insuficiente de medidas preventivas son más propensos al ofidismo (Afroz et al., 2024). Asimismo, la magnitud real del problema se encuentra subestimada debido a que la información disponible está basada únicamente en los casos reportados en centros de salud, por lo que no reflejan necesariamente la realidad de esta enfermedad, debido a que una proporción importante de las víctimas optan por tratamientos tradicionales en lugar de recibir atención médica especializada, ya que el costo de tratamiento sobrepasa sus ingresos, resultando en un mayor grado de severidad en la patología del ofidismo (Chippaux, 2017b).

El estudio del veneno de serpientes, históricamente, tuvo una evolución progresiva desde interpretaciones empíricas y especulativas hacia un enfoque experimental. Durante los siglos XVI y XVII Van Helmont y Moise Charas propusieron y defendieron que la toxicidad del veneno se debe al estado de irritación del animal. Posteriormente, Francesco Redi demostró experimentalmente que la toxicidad del veneno no dependía del estado anímico del ofidio sino de una sustancia material producida en glándulas específicas y que su letalidad se mantenía incluso tras la muerte del animal. Finalmente, los estudios de Felice Fontana relacionados a la experimentación sistémica con venenos permitieron establecer las bases científicas de la toxinología moderna (Boquet, 1979). El posterior desarrollo de métodos bioquímicos, moleculares e inmunológicos permitió dar el paso de los estudios descriptivos de los efectos tóxicos a la identificación y caracterización de los componentes responsables, revelando la elevada complejidad y variabilidad de los venenos de serpientes.

En la actualidad se han clasificado más de 4000 especies descritas de serpientes a nivel mundial (Uetz et al., 2026), de las cuales, las más peligrosas y de importancia médica se agrupan en cuatro familias: Viperidae, Elapidae, Lamphrophiidae y algunas especies de la familia Colubridae (Gutiérrez et al., 2017). La familia Viperidae (Oppel, 1811), morfológicamente caracterizada por su dentición solenoglifa en la que presentan un par de colmillos huecos y móviles en la región anterior de la mandíbula, eficiente para la inyección de veneno (Campbell y Lamar, 2004), es uno de los linajes de serpientes más relevantes debido a que es el responsable de la mayoría de los casos de ofidismo en América Latina y el Caribe (Gutiérrez, 2011). Dentro de esta familia destaca el género *Bothrops* Wagler, 1824, por su amplia distribución neotropical y la presencia de numerosas especies de relevancia médica, responsables de la mayoría de casos de

ofidismo registrados desde América Central hasta Sudamérica (Chippaux, 2017a; Guerra-Duarte et al., 2025). Dentro de este género, *Bothrops atrox* y *Bothrops sanctaecrucis* representan dos especies de interés para las áreas andino-amazónicas, aunque representan marcadas diferencias en su distribución geográfica y el grado de conocimiento disponible sobre sus venenos. *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758) comúnmente conocida en el Perú como jergón de la selva, es una especie ampliamente distribuida en la cuenca amazónica de Sudamérica, con características ecológicas muy marcadas entre las que destaca su comportamiento agresivo y su capacidad para ocupar ambientes naturales y áreas intervenidas, sumado a su contacto frecuente con la población humana de la región contribuyen a que sea responsable de una gran proporción de accidentes ofídicos en su área de distribución (Monteiro et al., 2020). Debido a su relevancia epidemiológica, su veneno ha sido ampliamente estudiado desde perspectivas bioquímicas, proteómicas y funcionales, consolidándose como una de las especies botrópicas mejor caracterizadas de la región. En contraste, *Bothrops sanctaecrucis* Hoge, 1966, es una especie endémica de Bolivia, siendo registrada principalmente en regiones de los departamentos de Beni, Cochabamba, Santa Cruz y La Paz (Harvey et al., 2005; Murillo et al., 2020) y a pesar de pertenecer a un género de elevada importancia médica, los estudios disponibles sobre su veneno y sus toxinas son considerablemente escasos, en comparación con *B. atrox*. Esta disparidad en el grado de información disponible para ambas especies resulta relevante desde una perspectiva toxinológica. Mientras que *B. atrox* ha sido objeto de incontables estudios en relación a la composición y caracterización funcional de su veneno y toxinas individuales purificadas, el conocimiento de *B. sanctaecrucis* continúa siendo limitado. En ese sentido, *B. atrox* constituye un punto de referencia idóneo para comparar y profundizar en los estudios del veneno y sus familias proteicas de *B. sanctaecrucis*.

El veneno de serpientes es una secreción biológica compleja, compuesta de moléculas bioactivas, principalmente proteínas y péptidos (>90%), entre las que se encuentran enzimas y proteínas no enzimáticas agrupadas en familias proteicas que por su abundancia y relevancia clínica (basado en el perfil proteómico del género *Bothrops*) destacan las metaloproteinasas del veneno de serpientes (SVMP) en un 45%, las fosfolipasas A_2 (PLA_2) en un 16%, serinoproteasas del veneno de serpientes (SVSP) en un 10% y L-aminoácido oxidasas (L-AAO) en un 6%, todas ellas responsables de las principales manifestaciones fisiopatológicas en la víctima ante el envenenamiento. No obstante, se observa una marcada variación en la composición del veneno a nivel interespecífico e intraespecífico, así como también por factores ontogénicos, geográficos y ecológicos, lo cual incrementa sustancialmente la complejidad del veneno y su importancia de estudio (Oliveira et al., 2022). En *B. atrox* se ha reportado una marcada representación de SVMP, SVSP y PLA_2, aunque con variaciones en su abundancia relativa entre diferentes poblaciones (Kohlhoff et al., 2012; Sousa et al., 2021). En contraste, el único reporte del estudio del veneno de *B. sanctaecrucis* evidencia mayor participación de SVMP y SVSP (Lobo-López et al., 2025).

La diversidad molecular de estos venenos se traduce en una marcada manifestación fisiopatológica ante un caso de ofidismo, en la que se abordan dos vertientes complementarias: daño local y daño sistémico. El daño local (daño en el área de inoculación), puede manifestarse como dolor, edema, inflamación, hemorragia y necrosis tisular. Las SVMP son responsables directas del daño microvascular debido a su capacidad de degradar componentes de la membrana basal, lo que favorece la pérdida de la integridad de los capilares y la extravasación sanguínea. A su vez, las PLA_2 miotóxicas y proteínas homólogas Lys49-PLA_2 desempeñan un papel central en el daño

del tejido muscular. Asimismo, dicho daño local se ve magnificado por la acción de las hialuronidasas, puesto que degradan el ácido hialurónico reduciendo la viscosidad tisular, de tal manera que permite que otras toxinas alcancen tejidos más profundos o lleguen a la circulación sistémica (Gutiérrez et al., 2017; De França y Tambourgi, 2023). La diseminación de las toxinas a través de la circulación sanguínea y linfática permite que estas alcancen órganos alejados del área de mordedura, generando daño sistémico, donde las SVMP y SVSP son capaces de interactuar con las proteínas del sistema de coagulación, produciendo alteraciones de la hemostasia y aumentando considerablemente el riesgo de hemorragias; mientras que el daño muscular, generado por las PLA_2 miotóxicas, causa la liberación de componentes intracelulares como la mioglobina, que cuando llegan al riñón pueden contribuir al desarrollo de lesión renal aguda (Gutiérrez et al., 2017).

El único tratamiento efectivo contra el envenenamiento por mordedura de serpientes es el suero antiofídico (antiveneno), producto heterólogo compuesto por anticuerpos obtenidos de la sangre de animales previamente inmunizados, generalmente equinos, con uno o varios venenos seleccionados. Estos anticuerpos son capaces de reconocer y neutralizar las distintas toxinas presentes en el veneno. No obstante, su eficacia depende de factores como la composición de los venenos empleados durante la inmunización, la similitud antigénica con el veneno responsable del accidente y la capacidad de los anticuerpos para reconocer toxinas clínicamente relevantes. De todas las manifestaciones fisiopatológicas reportadas, el daño tisular local continúa siendo un desafío para estos antivenenos, puesto que la velocidad de acción de las SVMP hemorrágicas y PLA_2 miotóxicas generan rápidamente daño microvascular y muscular, incluso antes de que los anticuerpos alcancen concentraciones suficientes en el tejido

afectado (Gutiérrez et al., 2017). Desde esta perspectiva, resulta indispensable evaluar la capacidad de reconocimiento inmunológico y neutralización de los antivenenos contra los componentes y las principales actividades bioquímicas y biológicas de los venenos.

Las fosfolipasas A_2 (PLA_2) del veneno de serpientes, principales responsables del daño muscular en el ofidismo, son una familia de proteínas secretadas, dependientes de calcio, de bajo peso molecular y con una gran diversidad estructural y funcional. Según diferencias estructurales, se subdividen en los grupos I y II. El grupo I predominante en la familia Elapidae, mientras que el grupo II, característico de la familia Viperidae, este último contiene dos isoformas, las PLA_2 catalíticamente activas y las homólogas de PLA_2 cuya actividad enzimática es reducida o ausente (Khan y Ilies, 2023). Las PLA_2 catalíticamente activas reciben su nombre porque son capaces de hidrolizar el enlace éster en la posición sn-2 de los fosfolípidos de membrana liberando ácido araquidónico y lisofosfolípidos, esto debido a que estructuralmente en su sitio activo conservan el residuo aspartato (Asp) en la posición 49 el cual permite utilizar el calcio como cofactor para poder llevar a cabo esta actividad, es por ello que este grupo de enzimas también son llamadas Asp49-PLA_2, asimismo, algunas de estas proteínas presentan actividad miotóxica contribuyendo a la alteración de la integridad de las fibras musculares y al potencial desarrollo de mionecrosis (Kang et al., 2011; Lomonte y Rangel, 2012). Por el contrario, las homólogas de PLA_2, llamadas así porque estructuralmente el Asp ha sido reemplazado por la lisina (Lys) en la posición 49 (homólogas Lys49-PLA_2), presentan una reducción o ausencia de la actividad enzimática, no obstante, conservan una marcada capacidad miotóxica debido a su plasticidad conformacional en su forma dimérica, en la que alterna entre un estado compacto y un estado extendido, similar a una bisagra, este último estado permite la exposición del loop C-terminal catiónico e

hidrofóbico con la bicapa lipídica de la membrana causando desestabilización, permeabilización, influjo de calcio y finalmente necrosis de la fibra muscular (Lima et al., 2026). Por lo tanto, la actividad fosfolipásica y la miotoxicidad no son propiedades interdependientes, algunas Asp49-PLA_2 catalíticamente activas pueden presentar escasa actividad miotóxica, mientras que determinados homólogos Lys49-PLA_2 pueden producir un considerable daño muscular a pesar de no presentar actividad catalítica. Esta paradójica actividad de las Lys49 ha motivado el esfuerzo por la purificación e identificación de más miotoxinas de especies del género *Bothrops* como la Miotoxina II de *Bothrops asper* (Lomonte y Gutiérrez, 1989), Miotoxina I de *Bothrops atrox* colombiana (Núñez et al., 2004) y Bothropstoxin-I de *Bothrops jararacussu* (Cintra et al., 1993). Con respecto a las publicaciones peruanas de *B. atrox*, Huatuco et al. (2004) aislaron y caracterizaron parcialmente a una miotoxina básica con actividad miotóxica, fosfolipásica, edematizante y anticoagulante, mientras que Quispe et al. (2019) reportaron una Asp49-PLA_2 ácida catalíticamente activa con actividad miotóxica ausente. Posteriormente, Proleón et al. (2022) caracterizaron a BaMtx, un homólogo de Lys49-PLA_2 con escasa actividad fosfolipásica pero marcada actividad miotóxica. Todos estos estudios muestran la gran diversidad estructural y funcional de las miotoxinas botrópicas por lo que su caracterización integra áreas bioquímicas, inmunológicas, moleculares y biológicas.

A pesar del vasto conocimiento disponible sobre el veneno de *B. atrox* y sus principales familias proteicas, la información toxinológica de *B. sanctaecrucis* continúa siendo limitada, principalmente en relación con la caracterización de sus componentes miotóxicos. Esta brecha de conocimiento justifica el estudio comparativo de ambas especies, empleando a *B. atrox* como punto de referencia por su amplia información

reportada. En este contexto, la presente investigación tuvo como propósito la caracterización bioquímica e inmunológica del veneno de *B. sanctaecrucis* y su miotoxina purificada, comparándolo con su congénere *B. atrox*, en relación a sus principales actividades enzimáticas, su neutralización y reconocimiento por antivenenos polivalentes.

II. ANTECEDENTES

Diversos estudios han demostrado que la composición y las actividades biológicas de los venenos del género *Bothrops* presentan una marcada variabilidad intra e interespecífica.

Uno de los factores determinantes de esta variabilidad es la ontogenia como se ha demostrado en individuos de especies de *B. asper* y *B. atrox* de Colombia, donde el veneno de neonatos y juveniles muestran una mayor letalidad, actividad edematizante y coagulante, mientras que los adultos, una mayor actividad hemolítica, esto demostró que la edad es un factor determinante de la variabilidad funcional del veneno lo cual es relevante cuando se quiere comparar la actividad biológica y la respuesta frente a antivenenos (Saldarriaga et al., 2003). Este patrón también ha sido demostrado en ejemplares peruanos de *B. atrox* por Málaga et al. (2014), quienes evaluaron que la composición proteica, las actividades enzimáticas y biológicas varían con la edad. Este trabajo confirmó que la ontogenia influye determinantemente en los cambios funcionales de poblaciones peruanas de *B. atrox*, lo que constituye un antecedente importante para interpretar las diferencias observadas en la actividad bioquímica del veneno de esta especie. Además de la ontogenia, la distribución geográfica también es un determinante crítico de dicha heterogeneidad. En ese sentido Ortiz et al. (2012),

analizaron el veneno de *B. atrox* procedente de tres regiones geográficas del Perú (Amazonas, Junín y Ucayali) y encontraron variaciones en sus principales actividades enzimáticas, demostrando que el origen poblacional es un factor importante en la variación del perfil bioquímico del veneno. Este antecedente es particularmente relevante ya que evidencia la variación intraespecífica de las actividades enzimáticas en función a la localización geográfica, lo cual debe considerarse al realizar análisis comparativos de venenos y su respuesta frente a antivenenos. Otro aspecto importante que varía a nivel interespecífico es la variabilidad proteómica, lo cual fue demostrado por Kohlhoff et al. (2012) quienes caracterizaron y compararon el proteoma de tres especies de Viperidae de alta relevancia médica en el Perú: *Bothrops atrox, Bothrops barnetti y Bothrops pictus.* Los autores dilucidaron divergencias significativas en la abundancia relativa y la composición de sus principales familias proteicas, demostrando que, a pesar de su proximidad filogenética, cada veneno posee un perfil proteómico distinto. Esta marcada variabilidad que se observa en los venenos de serpientes, refleja un impacto negativo en la inmunoterapia, dado que el suero antiofídico se produce por la inmunización de animales con un pool de venenos específicos, la divergencia en la composición proteómica, puede derivar a una pobre reactividad cruzada y con ello la capacidad del antiveneno para neutralizar el daño local y sistémico se vería comprometida, por lo que estos hallazgos sustentan la necesidad de caracterizar individualmente los venenos de especies poco estudiadas y evaluar si los antivenenos disponibles son capaces de reconocerlos y neutralizarlos frente a dicha diversidad.

En contraste con *B. atrox*, la especie *Bothrops sanctaecrucis*, a pesar de su importancia médica, ha sido históricamente desatendida en términos de investigación toxinológica, por lo que la información sobre la composición y propiedades funcionales del veneno de esta especie es escasa (Freitas-De-Sousa et al., 2024). No obstante, hasta la fecha, hay

un estudio bioquímico que reporta una dominancia de SVMP y SVSP en el veneno de *B. sanctaecrucis*, asociadas con actividades proteolíticas, hemorrágicas y alteraciones de la coagulación (Lobo-López et al., 2025). Sin embargo, aún no se han reportado estudios de purificación y caracterización individual de toxinas, mucho menos de miotoxinas de esta especie, tampoco estudios sobre su reconocimiento inmunológico por antivenenos utilizados en la región. Este vacío de información constituye uno de los principales sustentos para el desarrollo de la presente tesis.

En el Perú, el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, lugar donde se realizó el presente trabajo, cuenta con vasta experiencia en el estudio de veneno de serpientes y caracterización de sus familias proteicas como las PLA_2. El primer reporte fue realizado por Lazo et al. (1998) quienes evaluaron la actividad PLA_2 del veneno de seis serpientes peruanas comparando el método macroscópico basado en el tiempo de retardo de coagulación de una emulsión lipoproteica de yema huevo con un método espectrofotométrico donde se empleó como sustrato fosfatidilcolina, estableciendo herramientas experimentales para la caracterización bioquímica de las PLA_2. Un año más tarde se reportó el primer aislamiento de una fosfolipasa del veneno de la serpiente *Bothrops brazili* (Zeballos et al., 1999), del mismo modo, en el veneno de esta especie Pantigoso et al. (2001) purificaron y caracterizaron con un solo paso cromatográfico, CM-Sephadex C-50 pH 7, una miotoxina carente de actividad enzimática probada en modelo murino. Estos trabajos establecieron protocolos de purificación y caracterización funcional aplicados posteriormente a la investigación de otras serpientes peruanas.

En los años posteriores se fueron reportando PLA_2 de otras especies como la miotoxina básica con actividades fosfolipásica, anticoagulante y edematizante de *B. atrox*,

constituyendo uno de los primeros antecedentes nacionales de caracterización de una miotoxina de esta especie (Huatuco et al., 2004); una fosfolipasa A_2 ácida Asp49 catalítica no miotóxica (BaPer-PLA_{2a}) del veneno de *B. atrox* evidenciando que la capacidad de hidrolizar fosfolípidos no está directamente relacionada con la miotoxicidad (Quispe et al., 2019) y finalmente una miotoxina básica (BaMtx) Lys-49 de *B. atrox* (Proleón et al., 2022) ampliando de esta manera el conocimiento sobre los homólogos de PLA_2 en venenos peruanos. En conjunto, estos estudios respaldan y demuestran una vasta experiencia en la purificación y caracterización funcional de las PLA_2 y sus miotoxinas de serpientes peruanas. No obstante, hasta el momento, estos mismos esfuerzos no se han realizado para la miotoxina de *B. sanctaecrucis* y su caracterización toxinológica, lo que sustenta la necesidad del presente estudio.

En conjunto, todos estos reportes a lo largo de los años muestran los grandes esfuerzos a nivel nacional y mundial para una mejor comprensión de la variabilidad, composición y caracterización de las principales familias proteicas del veneno de *B. atrox*, principalmente de las PLA_2. En contraste, el conocimiento del veneno de *B. sanctaecrucis* es prácticamente escaso y hasta la fecha no existe una caracterización equivalente de su miotoxina, ni información sobre su reconocimiento por antivenenos empleados en su región de distribución. Bajo este contexto, resulta necesario el estudio del veneno de *B. sanctaecrucis* y su miotoxina, tomando como punto de referencia comparativa a la especie *B. atrox*, cuyo veneno y miotoxina están ampliamente estudiados.

III. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar comparativamente a nivel bioquímico e inmunológico los venenos y miotoxinas de *Bothrops sanctaecrucis* y *Bothrops atrox.*

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar la concentración proteica, los perfiles proteicos y las principales actividades enzimáticas de los venenos de *B. sanctaecrucis* y *B. atrox.*
- Evaluar la capacidad neutralizante de los antivenenos polivalentes del INS e INLASA frente a las actividades bioquímicas de los venenos de *B. sanctaecrucis* y *B. atrox*.
- Purificar y caracterizar a nivel bioquímico y biológico la miotoxina de *B. sanctaecrucis* empleando como referencia comparativa la miotoxina aislada de *B. atrox.*
- Determinar el reconocimiento inmunológico de los venenos y las miotoxinas purificadas de *B. sanctaecrucis* y *B. atrox* por los antivenenos polivalentes evaluados.

IV. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS

4.1 HIPÓTESIS NULA (H0)

Los venenos de *Bothrops atrox* y *Bothrops sanctaecrucis* presentan perfiles comparables de actividad proteolítica, amidolítica, fosfolipasa A_2 e hialuronidasa y de neutralización por los antivenenos polivalentes del INS e INLASA; además, las miotoxinas purificadas de ambas especies no presentan diferencias estadísticamente significativas en su actividad miotóxica.

4.2 HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H1)

Los venenos de *Bothrops atrox* y *Bothrops sanctaecrucis* presentan perfiles diferenciados de actividad proteolítica, amidolítica, fosfolipasa A_2 e hialuronidasa y de neutralización por los antivenenos polivalentes del INS e INLASA; además, las miotoxinas purificadas de ambas especies presentan diferencias estadísticamente significativas en su actividad miotóxica.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material biológico

5.1.1. Venenos

El veneno de *Bothrops sanctaecrucis* fue proporcionado por miembros del Proyecto Pucarara (Bolivia) obtenido de un pool de veneno de tres ejemplares procedentes de la región del Chapare, Amazonia boliviana. El tamaño aproximado de los ejemplares fue de 1.2 m, sexo no determinado y habían permanecido en cautiverio alrededor de seis años al momento de las extracciones. Dichas extracciones fueron realizadas por Tony Bonasso en la Reserva Privada

Patrimonio Natural Potrerillos del Güedá, Santa Cruz, Bolivia, entre los años 2000 y 2005. Previamente a cada extracción, los individuos permanecieron en ayuno durante dos semanas, y posterior a la extracción el veneno fue colectado en recipientes mantenidos con nitrógeno líquido y sometido a liofilización. El veneno liofilizado se conservó en frascos de vidrio oscuro bajo refrigeración hasta su posterior utilización experimental en agosto del 2024, fecha en la que comenzó la presente tesis.

El veneno de *Bothrops atrox* corresponde a un pool de veneno obtenido de dos ejemplares procedentes de Pucallpa, Ucayali, Perú, que fueron mantenidos en cautiverio en el serpentario Oswaldo Meneses del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos a una temperatura aproximada de 28 °C y una humedad relativa de 76 %. La longitud aproximada de los ejemplares fue de 1 m, sexo no determinado y habían permanecido en cautiverio durante casi una década. Las extracciones fueron realizadas por el biólogo Javier Cárdenas mediante presión manual de las glándulas de veneno y almacenadas temporalmente a -20 °C hasta su liofilización el mismo día de la extracción, una vez liofilizado el veneno fue almacenado a -20 °C hasta su posterior uso.

5.1.2. Antivenenos

Para los ensayos de neutralización y reconocimiento inmunológico se emplearon dos antivenenos de origen equino: el antiveneno antibotrópico polivalente producido por el Instituto Nacional de Salud (INS, Perú) y el antiveneno polivalente botrópico – crotálico producido por el Instituto Nacional de Laboratorio de Salud (INLASA, Bolivia).

El antiveneno antibotrópico polivalente del INS corresponde a una solución inyectable de inmunoglobulinas de origen equino obtenidos a partir del plasma de animales hiperinmunizados con venenos de cinco especies de serpientes: *Bothrops atrox, B. brazili, B. pictus, B. barnetti* y *Bothrocophias hyoprora*. Un vial de 10 mL está estandarizado para neutralizar 25 mg de veneno de *B. atrox*. Por otro lado, el antiveneno polivalente botrópico – crotálico del INLASA corresponde a una solución inyectable de inmunoglobulinas de origen equino empleada para el tratamiento de accidentes botrópicos y crotálicos, donde cada ampolla de 10 mL está estandarizada para neutralizar 15 mg de veneno botrópico y 5 mg de veneno de *Crotalus durissus terrificus,* especies cuyo veneno fue empleado en la hiperinmunización de los equinos.

5.1.3. Animales de experimentación

Para el análisis de la actividad miotóxica se emplearon 68 ratones albinos machos de la cepa BALB/c, adquiridos del Instituto Nacional de Salud (INS, Perú), cuyo rango de peso fue entre los 18 – 20 g y una edad comprendida entre los 3 – 5 meses. Los animales fueron distribuidos en grupos de cuatro individuos y mantenidos bajo condiciones controladas de bioterio, fotoperiodo de 12 horas de luz/oscuridad, niveles de humedad relativa del 60 – 70 % y una temperatura ambiente de 21 °C. Asimismo, todos los procedimientos experimentales con los animales fueron realizados bajo la aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, correspondiente al proyecto con código N°. 116-2024-CBE-FCB-UNMSM.

5.2. Reactivos, materiales y equipos principales

5.2.1. Reactivos y materiales

- **Cuantificación de proteínas**
  - Reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich; lote SLBS2204V).
  - Kit de ensayo de ácido bicinconínico, BCA (Thermo Scientific; lote VK310807).
  - Albúmina sérica bovina (BSA)
- **Ensayos de actividad enzimática y neutralización**
  - Azocaseína (Sigma-Aldrich, A2765-1G)
  - Nα-benzoyl-DL-arginina-p-nitroanilida (BApNA)
  - Ácido 4-nitro-3-octanoiloxibenzoico (NOBA)
  - Ácido hialurónico de Streptococcus zooepidemicus
  - Bromuro de cetiltrimetilamonio (BCTA).
  - Ácido tricloroacético (TCA)
  - Cloruro de calcio ($CaCl_2$) y cloruro de sodio (NaCl).
  - Tris y ácido clorhídrico para la preparación de tampones Tris-HCl
  - Acetato de amonio e hidróxido de sodio (NaOH)
- **Purificación cromatográfica**
  - Resina de intercambio catiónico CM-Sephadex C-25
  - Columna cromatográfica de 0,9 × 14 cm
  - Tris-HCl 50 mM, pH 7,0
  - Cloruro de sodio (NaCl) para la preparación de soluciones de elución de 0,3 M y 0,6 M.
  - Tubos para recolección de fracciones

- **Electroforesis en gel de poliacrilamida en dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)**
    - Acrilamida/bisacrilamida al 30 %.
    - Tris-HCl para la preparación de geles de resolución y apilamiento.
    - Dodecilsulfato de sodio (SDS).
    - Glicina.
    - Glicerol.
    - Azul de bromofenol.
    - N,N,N′,N′-tetrametiletilendiamina (TEMED).
    - Persulfato de amonio (APS/PSA).
    - 2-β-mercaptoetanol, empleado como agente reductor.
    - Azul brillante de Coomassie R-250.
    - Metanol y ácido acético para las soluciones de tinción y decoloración.
    - Marcador preteñido de peso molecular para proteínas de 10–245 kDa (Thermo Scientific).

- **Determinación de actividad miotóxica**
    - Kit diagnóstico CK-NAC (DiaSys) para la determinación de creatina quinasa.
    - Citrato de sodio al 3,8 %.
    - Solución tampón fosfato salino (PBS).
    - Tubos para recolección y procesamiento de muestras sanguíneas.
- **Espectrometría de masa MALDI-TOF**
    - Matriz de α-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA).

- Acetonitrilo.
- Ácido trifluoroacético (TFA).
- Agua de alta pureza para preparación de muestras.
- Mezcla de estándares proteicos para calibración externa (Protein Calibration Standard I).
- Placa MALDI de acero inoxidable.

- **ELISA indirecto**
  - Placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano.
  - Carbonato de sodio y bicarbonato de sodio para la preparación del tampón de recubrimiento, pH 9,6.
  - Solución tampón fosfato salino (PBS).
  - Tween 20.
  - Leche en polvo empleada como agente de bloqueo.
  - Anticuerpo de conejo anti-IgG de equino conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP).
  - Diclorohidrato de o-fenilendiamina (OPD).
  - Peróxido de hidrógeno al 3 %.
  - Fosfato de sodio dibásico y ácido cítrico para la preparación del tampón citrato-fosfato.
- **Western blot**
  - Membranas de nitrocelulosa.
  - Tris, glicina, metanol y SDS para la preparación del tampón de transferencia.
  - PBS y Tween 20 para la preparación de PBS-T.
  - Agente de bloqueo.

- Antiveneno antibotrópico polivalente del INS y antiveneno polivalente botrópico-crotálico de INLASA, empleados como anticuerpos primarios.
- Anticuerpo de conejo anti-IgG de equino conjugado con HRP, empleado como anticuerpo secundario.
- Sistema cromogénico Opti-4CN para la detección de las proteínas inmunorreactivas.

- **Materiales de uso general**
  - Micropipetas automáticas y puntas desechables.
  - Microtubos de polipropileno tipo Eppendorf.
  - Tubos de centrifugación.
  - Cubetas para espectrofotometría.
  - Material volumétrico de laboratorio.
  - Agua destilada o desionizada, según el procedimiento.

5.2.2. Equipos

- Espectrofotómetro UV-Vis
- Lector de microplacas
- Agitador de microplacas
- Centrífuga de laboratorio
- Colector de fracciones automatizado
- Cámara vertical de electroforesis
- Fuente de poder para electroforesis
- Sistema de electrotransferencia para Western blot
- Espectrómetro de masas MALDI-TOF
- Liofilizador

- Balanza analítica
- Baño de temperatura
- Refrigerador y congelador de laboratorio

5.3. Caracterización bioquímica de los venenos

5.3.1. Cuantificación de proteínas

La concentración total de proteínas en las muestras de veneno de *B. atrox y B. sanctaecrucis* se determinó mediante tres métodos: absorbancia a 280 nm, Bradford y ácido bicinconínico (BCA). Se partió de muestras de veneno concentradas y se diluyeron en buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 7 a un factor de dilución determinado para la cuantificación, posterior a ello para estimar la concentración de proteína de las muestras concentradas se multiplicaron por su factor de dilución. Para homogenizar las comparaciones entre métodos los resultados fueron normalizados a una concentración de proteína nominal presente en 1 mg/mL de veneno crudo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado técnico y los resultados se expresaron como concentración proteica (mg/mL), reportándose como media ± desviación estándar.

5.3.1.1. Absorbancia a 280 nm: Para ello se empleó un espectrofotómetro UV-VIS convencional y previo a la lectura de las muestras se empleó como blanco el buffer de trabajo Tris-HCL 0.05 M, ph 7, el mismo que fue utilizado para realizar las diluciones hasta obtener valores de absorbancia dentro del intervalo de lectura del equipo. Para ambos venenos se partió de una concentración de 20 mg/mL de veneno crudo, los cuales fueron diluidos 1:80 para realizar la lectura en el equipo. La concentración proteica se estimó bajo la aproximación de que una unidad de absorbancia a 280 nm corresponde a 1 mg/mL de proteína, ello

debido a que el veneno al estar constituido de una mezcla compleja de proteínas con diferente contenido aminoacídico y otros grupos absorbentes, presenta diferentes coeficientes de absorción. Asimismo, las determinaciones se realizaron por triplicado técnico (Pace et al, 1995).

5.3.1.2. Bradford: Método colorimétrico adaptado en microplaca. Para la ejecución del ensayo se partió de una muestra concentrada a 20 mg/mL de veneno crudo para *B. atrox* y 80 mg/mL para *B. sanctaecrucis*, los cuales fueron diluidos a 1:80 y 1:400 respectivamente para las lecturas correspondientes. Las muestras y los estándares de albúmina sérica bovina (BSA) fueron incubadas con el reactivo Bradford (Sigma-Aldrich) por 40 minutos a temperatura ambiente, al cabo del tiempo, se leyó en un lector de microplaca la absorbancia a 595 nm. La concentración proteica se expresó en las unidades señaladas como resultado de la interpolación a partir de la curva de calibración construida con BSA (Bradford, 1976).

5.3.1.3. BCA: Método colorimétrico adaptado en microplaca. Para ambos venenos se partió de una concentración de 80 mg/mL de veneno crudo, los cuales fueron diluidos 1:400 para realizar la ejecución del protocolo. Las muestras y los estándares de BSA se incubaron con el reactivo de trabajo del kit comercial BCA (Thermo Scientific), cuya preparación fue según las condiciones del fabricante. La incubación fue durante 30 minutos a temperatura ambiente y al cabo del tiempo se midió la absorbancia a 562 nm. La concentración proteica se determinó

mediante interpolación en la curva de calibración construida con BSA, de acuerdo con el principio descrito por Smith et al. (1985).

5.3.2. Perfil electroforético mediante SDS-PAGE

Los perfiles proteicos de los venenos crudos de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis* se evaluaron mediante el método de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), según la metodología descrita por Laemmli (1970). Para ello se prepararon geles de resolución al 12 % y geles de apilamiento al 4 %, asimismo, las muestras se analizaron bajo condiciones reductoras y no reductoras. Para las condiciones reductoras se cargó 20 µg de proteína con buffer de carga conteniendo 2-β-mercaptoetanol como agente reductor, mientras que para las condiciones no reductoras la misma cantidad de proteína fue preparada con buffer de carga sin agente reductor. Posterior a ello, ambas muestras fueron calentadas a 95 °C por 5 minutos antes de aplicarlas al gel. La corrida electroforética se llevó a cabo en una cámara vertical, a un voltaje constante de 100 V durante aproximadamente 2 horas, empleando un marcador preteñido de peso molecular de 10 – 245 kDa (Thermo Scientific) como referencia. Una vez finalizada la corrida, los geles se tiñeron con una solución de azul brillante de Coomassie R-250 al 0,05 % durante 20 minutos y posteriormente se procedió a decolorarlos con solución decolorante (metanol, ácido acético glacial y agua destilada) hasta obtener una visualización clara de las bandas proteicas, cuyo peso molecular aparente se estimó por comparación con el marcador de peso molecular.

5.3.3. Actividades enzimáticas

5.3.3.1. Actividad proteolítica: Se determinó mediante un ensayo colorimétrico en microplaca empleando como sustrato azocaseína, basado en el método de Takahashi y Ohsaka (1970) y el ensayo azocaseinolítico descrito por Gomes et al. (2015). En cada pocillo se agregaron 60 µL de azocaseína (1.5 mg/mL), 153 µL de buffer Tris-HCl 20 mM con $CaCl_2$ 5 mM (pH 7.5) y 10 µL de la muestra de veneno a una concentración de 1 mg/mL. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 37 °C y la reacción se detuvo con 37 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 20 %, se dejó reposar por 20 minutos y al cabo del tiempo el contenido se transfirió a tubos Eppendorf para centrifugarlo a 5000 × g durante 15 minutos. Finalmente, el sobrenadante se transfirió nuevamente a una microplaca y se leyó la absorbancia a 405 nm.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado técnico y la actividad proteolítica específica se expresó como unidades de absorbancia por minuto por miligramo de proteína (A_{405}/min/mg de proteína).

5.3.3.2. Actividad amidolítica: Se realizó en microplaca empleando como sustrato cromogénico Nα-benzoyl-DL-arginina-p-nitroanilida (BApNA) basado en el principio descrito por Erlanger et al. (1961), y adaptado a formato de microplaca para las condiciones experimentales del presente estudio. En cada pocillo se agregaron 150 µL de buffer Tris-HCl 0.05 M (pH 8.1), 90 µL de sustrato BApNA a una concentración

final de 9×10^{-4} M y 20 µL de la muestra de veneno a una concentración de 2 mg/ml. La mezcla se incubó a 37 °C durante 15 minutos y al cabo del tiempo, se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas, longitud de onda absorbida por la p-nitroanilina liberada durante la hidrólisis del BApNA.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado técnico y la actividad amidolítica específica se expresó como unidades de absorbancia a 405 nm por minuto por miligramo de proteína (A_{405}/min/mg de proteína).

5.3.3.3. Actividad fosfolipasa A_2: Se realizó mediante un ensayo colorimétrico en microplaca empleando como sustrato sintético 4-nitro-3-octanoiloxi benzoico ácido (NOBA), de acuerdo con el ensayo adaptado a microplaca descrito por Beghini et al. (2000), adaptado a las condiciones experimentales del presente estudio. Para ello en cada pocillo se colocaron 200 µL de buffer Tris-HCl 10 mM conteniendo $CaCl_2$ 10 mM y NaCl 100 mM (pH 8.0), 20 µL de sustrato NOBA a 3 mM y 40 µL de la muestra de veneno a una concentración de 1 mg/mL. La mezcla se incubó a 37 °C y, después de 1 hora, se midió la absorbancia a 405 nm y 600 nm en un lector de microplacas, la resta de estas dos lecturas ($A_{405} - A_{600}$) reflejó la absorbancia corregida, donde la lectura a 600 nm permitió corregir la contribución de la turbidez y absorbancia inespecífica de la muestra.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado técnico y la actividad PLA_2 específica se expresó como unidades de absorbancia corregida ($A_{405–600}$) por minuto por miligramo de proteína.

5.3.3.4. Actividad hialuronidasa: Se determinó mediante un ensayo turbidimétrico en microplaca basado en la degradación del ácido hialurónico y la formación de un complejo insoluble entre el sustrato no degradado y el bromuro de cetiltrimetilamonio (BCTA), basado en el principio descrito por Di Ferrante (1956). En cada pocillo de una microplaca se agregaron 20 µL de ácido hialurónico de *Streptococcus zooepidemicus* (0.3 mg/mL), 150 µL de buffer acetato de amonio 0.05 M (pH 5.0) que contenía NaCl 0.15 M y 10 µL de la muestra de veneno a una concentración de 2 mg/mL. La mezcla se incubó durante 15 minutos a 37 °C y finalizado el tiempo se añadió 80 µL de BCTA al 2.5 % disuelto en NaOH al 2 %, se dejó reposar por 20 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 400 nm en un lector de microplacas. Como control de turbidez máxima se colocó en el pocillo de la microplaca una mezcla que contenía ácido hialurónico y todos los reactivos ya mencionados, excepto veneno. La absorbancia obtenida para este control se consideró como el 100 % de la turbidez inicial del sustrato. Todos los ensayos se realizaron por triplicado técnico y la actividad hialuronidasa se expresó en Unidades Di Ferrante (UDF), donde una UDF se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir al 50% la turbidez inicial de una solución de ácido hialurónico bajo las condiciones del ensayo. La actividad específica se calculó dividiendo las UDF obtenidas por miligramo de proteína utilizada y se expresó como UDF/mg de proteína (Di Ferrante, 1956).

5.4. Neutralización de las actividades enzimáticas

Se determinó la capacidad neutralizante de los antivenenos frente a las actividades enzimáticas ya descritas de los venenos de *Bothrops atrox* y *Bothrops sanctaecrucis* mediante una preincubación veneno-antiveneno. Para cada actividad se utilizó una única dilución de los antivenenos INS e INLASA correspondiente a 1:160 cuyo volumen añadido fue equivalente al volumen de veneno utilizado en cada protocolo, manteniendo de esta manera una relación volumétrica 1:1. De tal manera que, si el ensayo empleó 10 µL de veneno, previamente se adicionó y preincubó con 10 µL de antiveneno en la dilución indicada. Las preincubaciones se realizaron durante 30 minutos a 37 °C, finalizado el tiempo, se realizó cada actividad enzimática siguiendo las mismas condiciones experimentales descritas para cada ensayo proteolítico, amidolítico, fosfolipasa A_2 e hialuronidasa. Como control de actividad se empleó veneno sin antiveneno, sometido a las mismas condiciones de preincubación. Finalmente, la capacidad neutralizante se expresó como porcentaje de neutralización respecto a la actividad de veneno sin antiveneno.

5.5. Purificación de las miotoxinas

5.5.1. Cromatografía de intercambio catiónico

El fraccionamiento de ambos venenos en estudio se realizó mediante cromatografía de intercambio catiónico, tomando como referencia el procedimiento descrito por Núñez et al. (2004) y adaptado a las condiciones experimentales del presente estudio. Para ello se pesó 80 mg de cada veneno liofilizado y se disolvió en 1 ml de buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 7, se centrifugó a 4000 rpm por 15 min y el sobrenadante se aplicó en una columna de CM-Sephadex C-25 de 0.9 x 14 cm, previamente equilibrada con tres volúmenes de columna del mismo buffer. El flujo de la corrida cromatográfica fue de 10

mL/hora recolectándose 1 mL por fracción y el proceso de elución se realizó secuencialmente en tres etapas: una fase isocrática con buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 7, seguida de dos fases con NaCl a 0.3 M y 0.6 M en ese orden, ambos preparados en el mismo buffer de trabajo. En cada etapa se colectó un volumen aproximado de 50 mL, obteniendo de esa manera alrededor de 50 fracciones por volumen de elución. El contenido proteico de cada fracción se monitoreó mediante absorbancia a 280 nm y según el protocolo de referencia, solo se seleccionaron y agruparon las fracciones correspondientes al pico eluido con 0.6 M de NaCl. Estas fracciones se concentraron utilizando dispositivos de ultrafiltración Amicon Ultra con un límite de corte molecular de 10 kDa (Merck Millipore), mientras que la eliminación progresiva de NaCl se realizó mediante un proceso de diafiltración en la que con estos mismos equipos Amicon Ultra se realizaron cuatro ciclos sucesivos de concentración y reposición del volumen con el mismo buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 7.0, sin NaCl, hasta reducir al mínimo la concentración de sal antes de los análisis posteriores. La muestra concentrada y desalinizada resultante fue posteriormente analizada por SDS-PAGE, ensayos funcionales, espectrometría de masas MALDI-TOF y ensayos de reconocimiento inmunológico con el fin de caracterizar y sustentar su correspondencia con la toxina de interés.

5.6. Caracterización de las miotoxinas purificadas

5.6.1. Cuantificación proteica

El contenido proteico de las muestras concentradas y desalinizadas de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis*, correspondientes a las fracciones seleccionadas del pico obtenido en el volumen de elución con 0.6 M de NaCl fue cuantificado mediante

el método de Bradford, siguiendo el procedimiento previamente descrito en la sección 5.3.1.2. Se realizaron triplicados técnicos y los resultados se expresaron como concentración proteica (mg/mL), reportándose como media ± desviación estándar.

5.6.2. Evaluación electroforética (SDS-PAGE) y estimación de la masa molecular aparente

Las muestras purificadas y concentradas de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis* se evaluaron mediante SDS-PAGE siguiendo las condiciones descritas previamente en la sección 5.3.2. Para cada muestra se emplearon 9 µg de proteína y se analizaron ambas condiciones reductoras y no reductoras con la finalidad de evaluar la pureza y posibles diferencias en el patrón de migración asociados con la reducción de los enlaces disulfuro, asimismo, este análisis permitió estimar la masa molecular aparente de la o las bandas obtenidas mediante comparación con el marcador de peso molecular previamente descrito.

5.6.3. Determinación de la masa molecular mediante espectrometría de masas MALDI-TOF

El peso molecular de la proteína presente en la muestra purificada y concentrada de *Bothrops sanctaecrucis* se determinó mediante espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF), empleando un espectrómetro MALDI-TOF microflex LB (Bruker Daltonics). El análisis se realizó en el Laboratorio de Referencia Nacional de Bacteriología Clínica del Instituto Nacional de Salud (INS), sede Jesús María, Lima, Perú. Para el análisis se utilizó 1 µL de la muestra, previamente desalinizada y diluida en agua destilada a una

concentración de 2 mg/mL, sobre una placa MALDI de acero inoxidable y se dejó secar a temperatura ambiente. A continuación, sobre la muestra seca se adicionó 1 µL de solución matriz saturada de α-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) preparada en una mezcla de acetonitrilo:agua:ácido trifluoroacético (50:49.9:0.1 % v/v/v) y se dejó secar a temperatura ambiente hasta la cocristalización de la muestra con la matriz. Los espectros de masas se adquirieron en modo lineal positivo, con un rango de detección de 2000 – 20 000 m/z. La calibración externa se efectuó utilizando una mezcla de estándares proteicos (Protein Calibration Standard I). Las condiciones instrumentales empleadas fueron un voltaje de aceleración de 19.9 kV, una frecuencia de repetición del láser de 60 Hz, tiempo de extracción retardada (delayed extraction) de 110 ns. Los espectros obtenidos fueron *procesados* y analizados mediante el software flexAnalysis (Bruker Daltonics) y la masa molecular de la proteína purificada se determinó a partir de las señales moleculares observadas en el espectro.

5.6.4. Determinación de la actividad fosfolipasa A2

La actividad fosfolipasa A2 de las muestras concentradas obtenidas de la purificación de los venenos de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis* se determinó mediante el ensayo colorimétrico con el sustrato sintético NOBA, siguiendo el procedimiento previamente descrito en la sección 5.3.3.3. Para este análisis se utilizó 6.3 µg de proteína de cada muestra y se registraron las absorbancias a 405 y 600 nm cada 10 minutos por un lapso de 1 hora para observar el incremento de la actividad con el paso de los minutos. El ensayo se realizó por triplicado

técnico y la actividad PLA_2 específica se expresó como unidades de absorbancia corregida ($A_{405–600}$) por minuto por miligramo de proteína.

5.6.5. Determinación de la actividad miotóxica

La actividad miotóxica de los venenos crudos y las muestras purificadas de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis* se evaluó indirectamente mediante la determinación de la actividad plasmática de creatina quinasa (CK) utilizando el kit diagnóstico CK-NAC de DiaSys. Para ello, se utilizaron 68 ratones albinos machos de la cepa BALB/c distribuidos en 17 grupos experimentales de 4 individuos cada uno. En el ensayo se analizaron cuatro muestras: los dos venenos en estudio y sus respectivas muestras purificadas y concentradas obtenidas del proceso cromatográfico y para cada muestra se ensayaron distintas dosis de 25, 50, 75 y 100 µg de proteína, constituyendo 16 grupos experimentales. Estas dosis se seleccionaron con la finalidad de evaluar la respuesta miotóxica con cantidades crecientes de exposición y determinar posibles diferencias dosis-dependientes entre las muestras, tomando como referencia protocolos previos donde se evaluó la miotoxicidad de venenos botrópicos mediante CK plasmática en ratones (Gutiérrez et al., 1980). Asimismo, como control negativo se administró 0.1 mL de solución buffer fosfato salino (PBS). Cada ratón recibió una inyección intramuscular de 0.1 mL en el músculo gastrocnemio de la pata posterior derecha, transcurrido el tiempo establecido después de la inoculación (3 horas), se obtuvo aproximadamente 0.4 mL de sangre mediante punción del seno venoso submandibular, la sangre se mezcló inmediatamente con 40 µL de citrato de sodio al 3.8 % empleado como anticoagulante y se centrifugó a 3000 rpm

durante 10 minutos para separar el plasma. Posteriormente, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical.

Para la medición enzimática de la creatina quinasa (CK), se incubaron 40 µL de plasma citratado con 1 mL del reactivo del kit CK-NAC y se registró la absorbancia a 340 nm, cada minuto durante 7 minutos a 37 °C, según los lineamientos del kit. La actividad de CK se expresó en Unidades Internacionales por litro (UI/L), donde una unidad se define como la cantidad de enzima capaz de fosforilar 1 µmol de creatina por minuto a 37 °C, dichas unidades fueron empleadas como indicador indirecto del daño muscular inducido por los venenos y sus muestras purificadas.

5.7. Caracterización inmunológica

5.7.1. ELISA indirecto

El reconocimiento inmunológico de los venenos en estudio, así como sus respectivas muestras purificadas por los antivenenos INS e INLASA se analizó mediante ELISA indirecto, basado en el principio descrito por Engvall y Perlman (1971). Adicionalmente, se determinó el título de reconocimiento de los antivenenos frente a cada antígeno evaluado mediante el método de interpolación lineal en escala logarítmica, según lo descrito por Alzamora et al. (2002). Para ello las placas de poliestireno de 96 pocillos (Flat Bottom without Lid) se sensibilizaron agregando 100 µL por pocillo de una solución de veneno (0.01 µg/µL) o muestra purificada (0.001 µg/µL), equivalentes a 1 µg y 0.1 µg por pocillo, respectivamente, preparadas en buffer de incubación e inmediatamente las placas se incubaron durante toda la noche (overnight) a 4 °C. Al día siguiente se realizaron tres lavados con solución de lavado (PBS-T

0,01 % Tween-20). Los sitios de unión no ocupados en cada pocillo se bloquearon con 200 µl de leche en polvo al 3 % disuelta en PBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente y al cabo del tiempo se realizaron tres lavados. Luego se añadieron los antivenenos INS o INLASA, empleados como anticuerpos primarios, a una dilución de 1:10.000 diluidos en buffer de incubación (Leche en polvo 0.1%, PBS-T 0.05%). Luego se añadieron 200 µL de cada suero diluido y se realizaron diluciones seriadas de factor 2 en buffer de incubación. La incubación de las placas fue durante 1 hora a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo se realizaron seis lavados con solución de lavado y se añadió 100 µL por pocillo del anticuerpo secundario [Anticuerpo de conejo anti-IgG de equino conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP)], diluido 1:8.000 en buffer de incubación, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron seis lavados adicionales a las placas y se agregó 200 µL por pocillo de la solución cromogénica [una pastilla de o-fenilendiamina (OPD, 10 mg) en 25 mL de buffer citrato-fosfato (pH 5,0) y 100 µl de agua oxigenada al 3 %]. La reacción se desarrolló durante 30 minutos a temperatura ambiente y la absorbancia se leyó a 492 nm en un lector de microplacas.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado técnico y el título de reconocimiento se calculó como la dilución inversa del antiveneno correspondiente al 50% de la absorbancia máxima alcanzada para cada antígeno (Alzamora et al., 2002).

5.8. Análisis de datos y tratamiento estadístico

Los ensayos de cuantificación proteica, actividad enzimática, neutralización y ELISA indirecto se realizaron mediante réplicas técnicas, por lo que los datos fueron analizados de manera descriptiva y no se realizó estadística inferencial.

Con respecto al análisis de la actividad miotóxica, los datos obtenidos de los venenos en estudio y sus respectivas muestras purificadas se analizaron por separado mediante un ANOVA de dos vías, cuyos factores considerados fueron: la especie (*B. atrox y B. sanctaecrucis)* y la dosis administrada (25, 50, 75 y 100 µg). El supuesto de normalidad de los residuos del modelo se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk, donde los valores de $p > 0.05$ se consideraron como ausencia de evidencia suficiente para rechazar la normalidad y los valores de W cercanos a 1 se consideraron como mayor compatibilidad con una distribución normal. Luego que se verificó el supuesto de normalidad, se interpretaron los resultados del ANOVA y se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Šídák y se consideraron estadísticamente significativas las diferencias con valores de $p < 0.05$.

El análisis estadístico y la elaboración de los gráficos se realizaron mediante GraphPad Prism versión 8.

VI. RESULTADOS

6.1. Caracterización bioquímica de los venenos de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis*

6.1.1. Cuantificación proteica

La concentración de proteína de los venenos en estudio se determinó mediante tres métodos de cuantificación: Absorbancia a 280 nm (Abs280), Bradford y Ácido Bicinconínico (BCA). Los valores obtenidos fueron normalizados a una concentración nominal de 1 mg/mL de veneno y se expresaron como la media ± desviación estándar de tres réplicas técnicas.

Para la especie *B. atrox* la concentración proteica estimada por Abs280, Bradford y BCA fue de 1.272 ± 0.007 mg/mL, 0.871 ± 0.133 mg/mL y 0.732 ± 0.012 mg/mL, respectivamente. Mientras que, para la especie *B. sanctaecrucis* fue de 1.157 ± 0.019 mg/mL, 0.920 ± 0.104 mg/mL y 0.568 ± 0.006 mg/mL, siguiendo el mismo orden (Figura 1; Tabla 1).

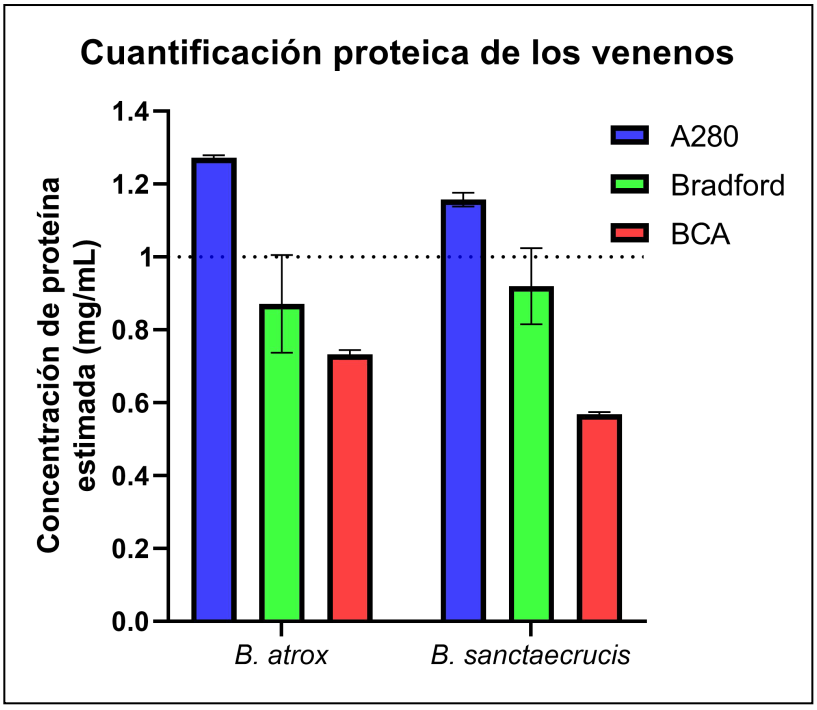


Figura 1. Gráfico de barras comparativo de la concentración proteica de los venenos de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis* determinada por tres métodos diferentes: Absorbancia a 280 nm (A280), Bradford y Ácido Bicinconínico (BCA). Los valores fueron normalizados a una concentración nominal de 1mg/mL de veneno y se expresan como la media ± desviación estándar de tres réplicas técnicas. La linea punteada representa la concentración nominal de referencia de 1 mg/mL.

Concentración proteica de los venenos de *B. atrox y B. sanctaecrucis* determinada mediante tres métodos de cuantificación

Veneno	A280 (mg/mL)	Bradford (mg/mL)	BCA (mg/mL)
B. atrox	1.272 ± 0.007	0.871 ± 0.133	0.732 ± 0.012
B. sanctaecrucis	1.157 ± 0.019	0.920 ± 0.104	0.568 ± 0.006

Tabla 1. Concentración proteica de los venenos en estudio, determinada por los métodos A280nm, Bradford y BCA. Los valores fueron normalizados a una concentración nominal de 1mg/mL de veneno y se expresan como la media ± desviación estándar de tres réplicas técnicas. La linea punteada representa la concentración nominal de referencia de 1 mg/mL.

6.1.2. Perfil electroforético mediante SDS-PAGE

Los perfiles electroforéticos de los venenos en estudio mostraron patrones de migración diferenciales, según la especie y las condiciones evaluadas, cuyas bandas proteicas están distribuidas en diferentes rangos de masa molecular aparente.

A condiciones no reductoras, el veneno de *B. atrox* mostró bandas de mayor intensidad en la regiones aproximadas de 20-30 kDa y de 35-50 kDa, mientras que en *B. sanctaecrucis* las bandas más intensas estuvieron principalmente en el rango de 20-30 kDa.

Bajo condiciones reductoras, los perfiles mostraron cambios en el patrón de migración de ambos venenos. Con respecto a *B. atrox*, se distinguieron dos bandas de mayor intensidad de aproximadamente 23 kDa y 50 kDa acompañadas de bandas menos intensas en el rango de 25-45 kDa. Para *B. sanctaecrucis* se observó una única banda predominante alrededor de 23 kDa, acompañada de múltiples bandas de menor intensidad a lo largo de un rango de 25-65 kDa (Figura 2).

Perfil electroforético de los venenos de *B. atrox y B. sanctaecrucis* bajo condiciones reductoras y no reductoras

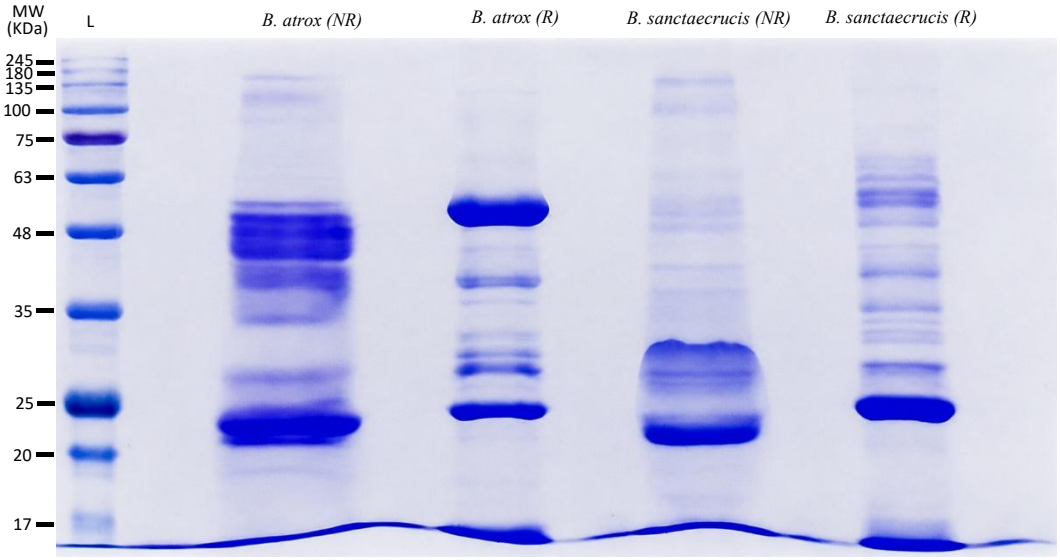


Figura 2. Perfil electroforético de los venenos de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis* mediante SDS-PAGE (12 %). Se cargaron 20 µg de proteína por veneno que fueron analizados bajo condiciones no reductoras (NR) y reductoras (R). L: Ladder, fue empleado como referencia para la estimación de la masa molecular aparente de las bandas proteicas.

6.1.3. Actividad proteolítica y su neutralización

La actividad proteolítica específica de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis* se determinó mediante ensayo colorimétrico basado en la hidrólisis del sustrato Azocaseína. La especie *B. atrox* presentó una actividad específica de 0.5978 ± 0.0608, mientras que para *B. sanctaecrucis* el valor fue de 0.6544 ± 0.0204, ambos en unidades de A_{405}/min/mg de proteína. Con respecto a los ensayos de neutralización, el antiveneno antibotrópico polivalente del INS (αBt-INS) redujo la actividad proteolítica en 2.04 % para *B. atrox* y en 1.19% para *B. sanctaecrucis*. Mientras que, el antiveneno polivalente botrópico – crotálico del INLASA (αB/C-INLASA) mostró reducciones del 1.49 % y 0.017 %, respectivamente (Figura 3; Tabla 2).

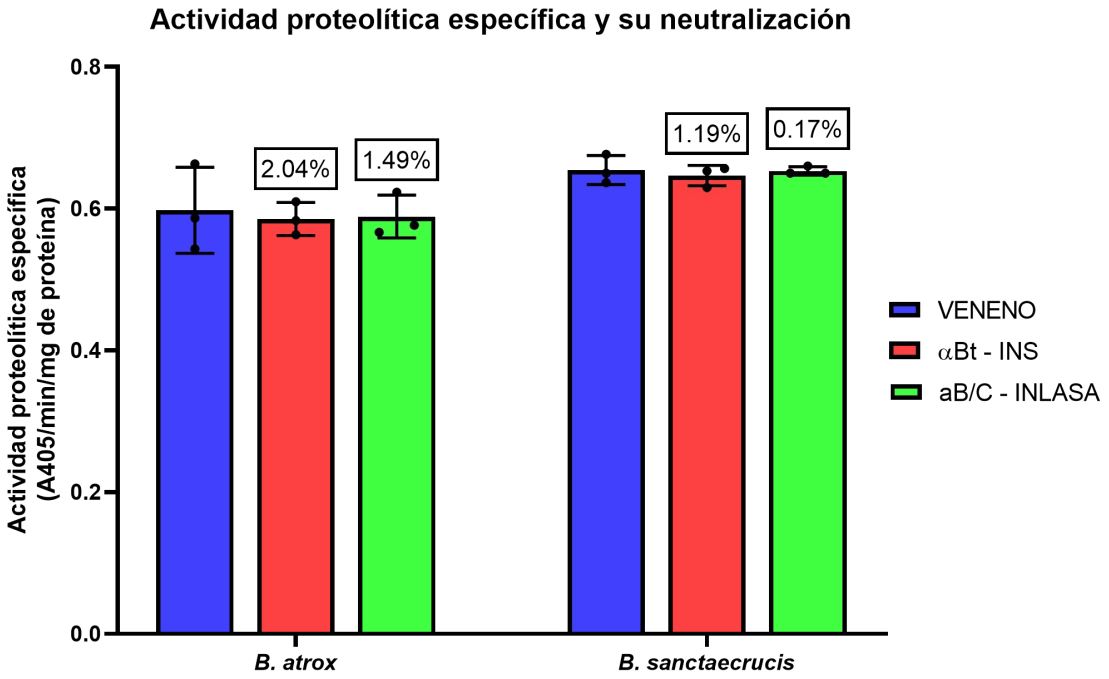


Figura 3. Gráfico de barras comparativo de las actividades proteolíticas específicas de los venenos de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis* y su neutralización por los antivenenos antibotrópico del INS (αBt-INS) y botrópico-crotálico del INLASA (αB/C-INLASA). Los resultados se expresaron como unidades de A_{405}/min/mg de proteína, donde las barras representa la media y las barras de error la desviación estándar de tres réplicas técnicas; los puntos corresponden a las determinaciones individuales. Los porcentajes de neutralización presentes sobre las barras representan la capacidad neutralizante de la actividad proteolítica respecto al veneno sin antiveneno.

6.1.4. Actividad amidolítica y su neutralización

La actividad amidolítica específica de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis* se determinó mediante ensayo colorimétrico basado en la liberación de p-nitroanilina durante la hidrólisis del sustrato BApNA. *B. atrox* presentó una actividad específica de 0.3978 ± 0.0170, mientras que para *B. sanctaecrucis* el valor fue de 0.3417 ± 0.0453, ambos en unidades de A_{405}/min/mg de proteína. Con respecto a los ensayos de neutralización, el antiveneno antibotrópico polivalente del INS (αBt-INS) redujo la actividad amidolítica en 29.19 % para *B. atrox* y en 6.34 % para *B. sanctaecrucis*. Mientras que, el antiveneno polivalente botrópico – crotálico del INLASA (αB/C-INLASA) mostró reducciones del 32.96 % y 6.03 %, respectivamente (Figura 4; Tabla 2).

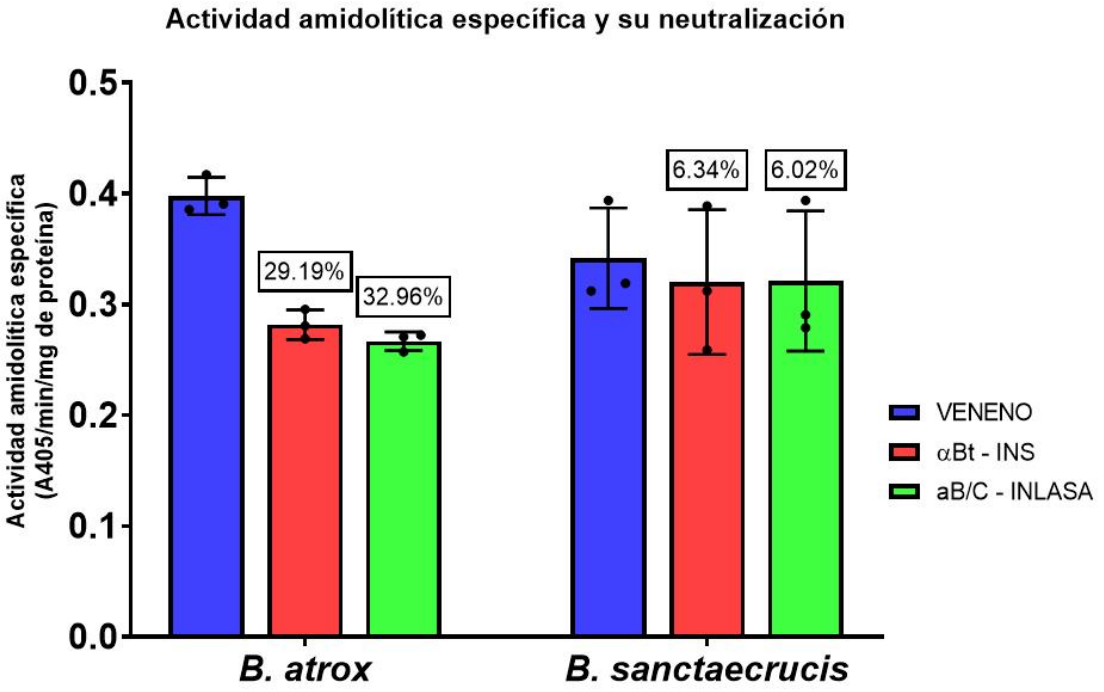


Figura 4. Gráfico de barras comparativo de las actividades amidolíticas específicas de los venenos de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis* y su neutralización por los antivenenos antibotrópico del INS (αBt-INS) y botrópico-crotálico del INLASA (αB/C-INLASA). Los resultados se expresaron como unidades de A_{405}/min/mg de proteína, donde las barras representa la media y las barras de error la desviación estándar de tres réplicas técnicas; los puntos corresponden a las determinaciones individuales. Los porcentajes de neutralización presentes sobre las barras representan la capacidad neutralizante de la actividad amidolítica respecto al veneno sin antiveneno.

6.1.5. Actividad fosfolipasa A2 y su neutralización

La actividad fosfolipasa A_2 específica de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis* se determinó empleando el sustrato NOBA. *B. atrox* presentó una actividad específica de 0.1075 ± 0.0052, mientras que para *B. sanctaecrucis* el valor fue de 0.0446 ± 0.0023, ambos en unidades de $A_{405-600}$/min/mg de proteína. Con respecto a los ensayos de neutralización, el antiveneno antibotrópico polivalente del INS (αBt- INS) redujo la actividad fosfolipasa A_2 en 11.24 % para *B. atrox* y en 11.53 % para *B. sanctaecrucis*. Mientras que, el antiveneno polivalente botrópico – crotálico del INLASA (αB/C-INLASA) mostró reducciones del 10.34 % y16.51 %, respectivamente (Figura 5; Tabla 2).

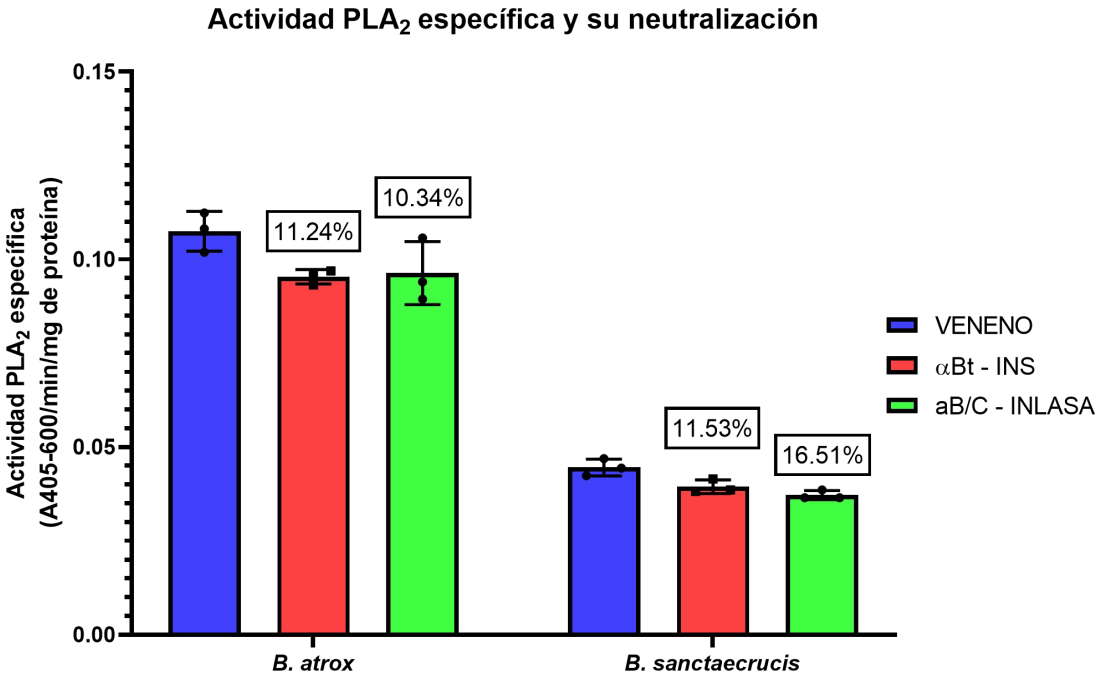


Figura 5. Gráfico de barras comparativo de las actividades fosfolipasa A_2 específicas de los venenos de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis* y su neutralización por los antivenenos antibotrópico del INS (αBt-INS) y botrópico-crotálico del INLASA (αB/C-INLASA). Los resultados se expresaron como unidades de $A_{405–600}$/min/mg de proteína, donde las barras representa la media y las barras de error la desviación estándar de tres réplicas técnicas; los puntos corresponden a las determinaciones individuales. Los porcentajes de neutralización presentes sobre las barras representan la capacidad neutralizante de la actividad fosfolipasa A_2 respecto al veneno sin antiveneno.

6.1.6. Actividad hialuronidasa y su neutralización

La actividad hialuronidasa específica de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis* se determinó mediante ensayo turbidimétrico empleando como sustrato Ácido Hialurónico. *B. atrox* presentó una actividad específica de 83.01 ± 4.26, mientras que para *B. sanctaecrucis* el valor fue de 31.85 ± 4.70, ambos en unidades de UDF/mg de proteína. Con respecto a los ensayos de neutralización, el antiveneno antibotrópico polivalente del INS (αBt-INS) redujo la actividad hialuronidasa en 7.72 % para *B. atrox* y en 0.28 % para *B. sanctaecrucis*.

Mientras que, el antiveneno polivalente botrópico – crotálico del INLASA (αB/C-INLASA) mostró reducciones del 6.75 % y 0.28 %, respectivamente (Figura 6; Tabla 2).

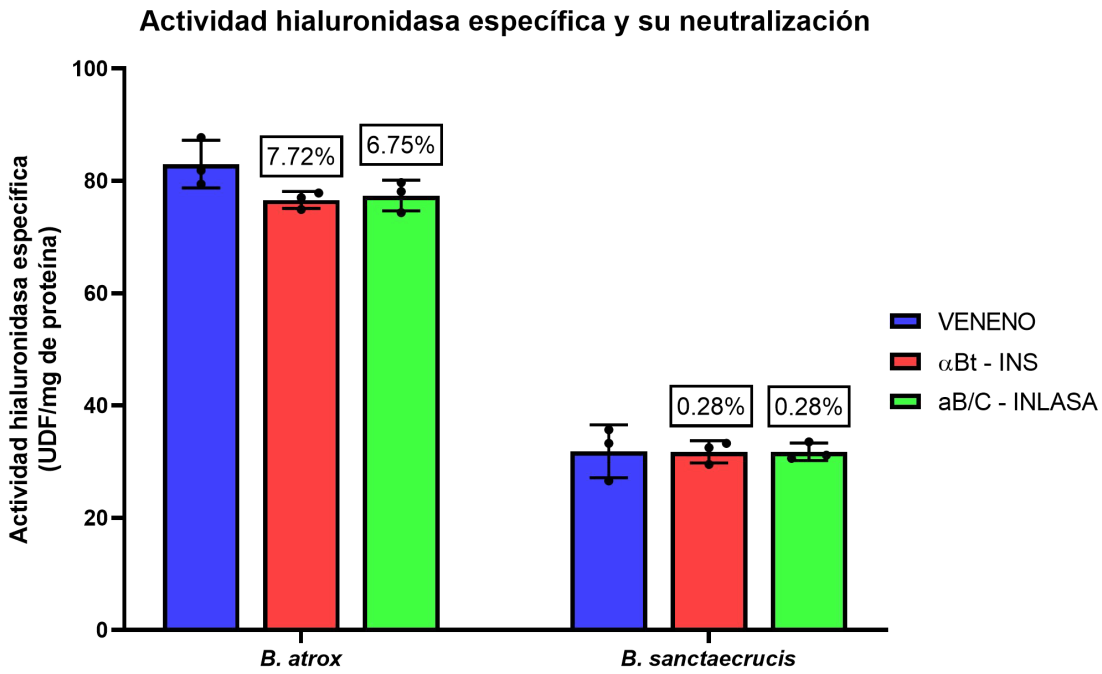


Figura 6. Gráfico de barras comparativo de las actividades hialuronidasa específicas de los venenos de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis* y su neutralización por los antivenenos antibotrópico del INS (αBt-INS) y botrópico-crotálico del INLASA (αB/C-INLASA). Los resultados se expresaron como UDF/mg de proteína, donde las barras representa la media y las barras de error la desviación estándar de tres réplicas técnicas; los puntos corresponden a las determinaciones individuales. Los porcentajes de neutralización presentes sobre las barras representan la capacidad neutralizante de la actividad hialuronidasa respecto al veneno sin antiveneno.

En resumen, los resultados de las actividades específicas obtenidos de los venenos de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis*, así como sus porcentajes de neutralización por los antivenenos αBt-INS y αB/C-INLASA se observan en la Tabla 2.

Actividades bioquímicas específicas y su neutralización de los venenos de *B. atrox y B. sanctaecrucis*

Especie	Ensayo	Actividad específica (media ± DE)	Neutralización αBt-INS (%)	Neutralización αB/C-INLASA (%)
B. atrox	Proteolítica	0.5978 ± 0.0608	2.04	1.49
	Amidolítica	0.3978 ± 0.0170	29.19	32.96
	PLA_2	0.1075 ± 0.0052	11.24	10.34
	Hialuronidasa	83.01 ± 4.26	7.72	6.75
B. sanctaecrucis	Proteolítica	0.6544 ± 0.0204	1.19	0.17
	Amidolítica	0.3417 ± 0.0453	6.34	6.02
	PLA_2	0.0446 ± 0.0023	11.53	16.51
	Hialuronidasa	31.85 ± 4.70	0.28	0.28

Tabla 2. Actividades bioquímicas específicas de los venenos en estudio y sus porcentajes de neutralización por los antivenenos αBt-INS y αB/C-INLASA. Los valores de las actividades específicas se expresan como la media ± desviación estándar de tres réplicas técnicas, escritas en sus unidades correspondientes. Los porcentajes de neutralización se calcularon respecto a la actividad del veneno sin antiveneno.

6.2. Purificación de las miotoxinas

6.2.1. Perfil cromatográfico de *B. atrox*

El fraccionamiento del veneno de *B. atrox* se realizó mediante cromatografía de intercambio catiónico, empleando una columna de CM-Sephadex C-25. El cromatograma mostró tres picos principales (P1, P2 y P3) obtenidos en los volúmenes isocrático, con NaCl 0.3 M y con NaCl 0.6 M, respectivamente. Las fracciones correspondientes a P3 fueron agrupadas, concentradas y desalinizada para los análisis posteriores de caracterización (Figura 7).

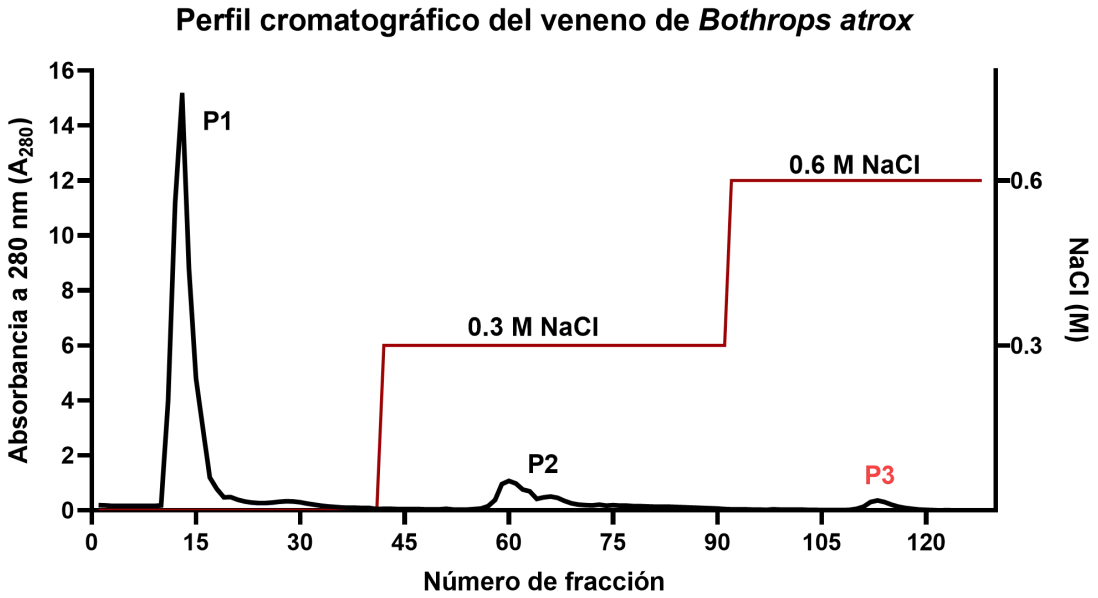


Figura 7. Cromatograma del veneno de *Bothrops atrox* obtenido mediante cromatografía de intercambio catiónico en CM-Sephadex C-25. El buffer empleado para la corrida fue Tris HCl 0.05 M, pH 7, donde se colectaron tres volúmenes: isocrático, 0.3 y 0.6 M de NaCl. El contenido proteico de las fracciones fue monitoreado mediante absorbancia a 280 nm identificándose finalmente tres picos, de los cuales el tercero (P3), eluido con 0.6 M de NaCl fueron agrupados, concentrados y desalinizados para análisis posteriores.

6.2.2. Perfil cromatográfico de *B. sanctaecrucis*

El fraccionamiento del veneno de *B. sanctaecrucis* se realizó mediante cromatografía de intercambio catiónico, empleando una columna de CM-Sephadex C-25. El cromatograma mostró tres picos principales (P1, P2 y P3) obtenidos en los volúmenes isocrático, con NaCl 0.3 M y con NaCl 0.6 M, respectivamente. Las fracciones corerspondientes a P3 fueron agrupadas, concentradas y desalinizadas para los análisis posteriores de caracterización (Figura 8).

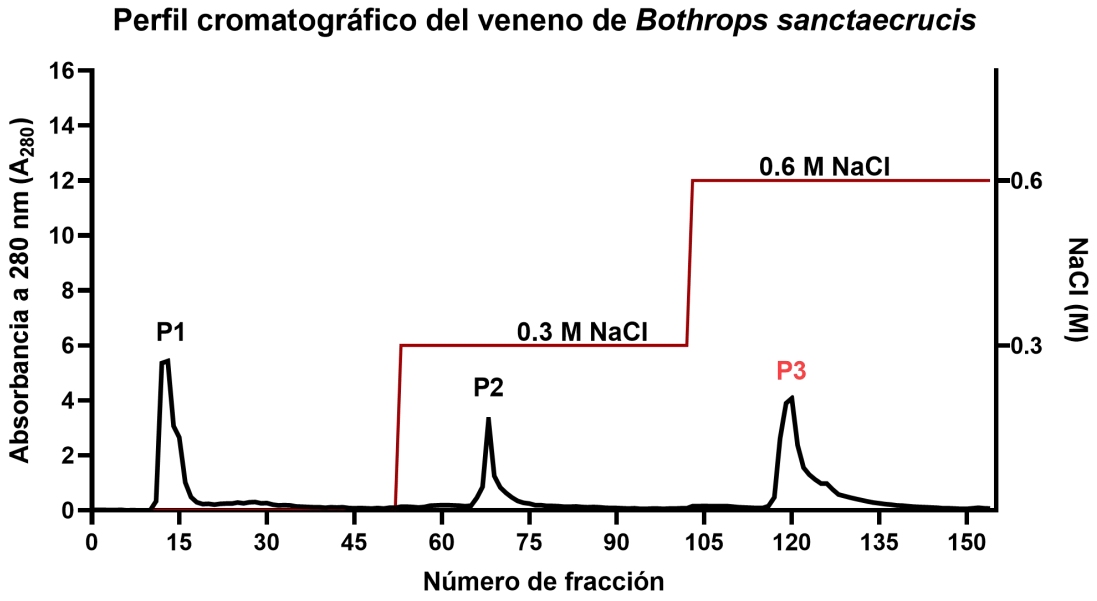


Figura 8. Cromatograma del veneno de *Bothrops sanctaecrucis* obtenido mediante cromatografía de intercambio catiónico en CM-Sephadex C-25. El buffer empleado para la corrida fue Tris HCl 0.05 M, pH 7, donde se colectaron tres volumenes: isocrático, 0.3 y 0.6 M de NaCl. El contenido proteico de las fracciones fue monitoreado mediante absorbancia a 280 nm identificandose finalmente tres picos, de los cuales el tercero (P3), eluido con 0.6 M de NaCl fueron agrupados, concentrados y desalinizados para análisis posteriores.

6.2.3. Rendimiento del proceso de purificación

Las muestras purificadas, concentradas y desalinizadas correspondientes al pico 3 (P3) obtenidas a partir de los venenos de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis* fueron denominadas BaMtx y BsMtx, respectivamente, para los análisis posteriores de caracterización.

Con respecto a *B. atrox*, por la columna de CM-Sephadex C-25 se pasó 80 mg de veneno, el cual según el método de Bradford contenía 69.7 mg de proteína total y tras el proceso de purificación se recuperaron 0.7 mg de proteína en la muestra BaMtx, lo cual representó una recuperación de la muestra del 1 %. Asimismo, ocurrió un aumento de la actividad específica, de 4622 U/mg para el veneno a 5406 U/mg para BaMtx, obteniéndose una actividad total de 321975 U

y 3893 U, respectivamente. Por lo que el rendimiento basado en la actividad miotóxica (75 μg) fue de 1.21 % y el factor de purificación de 1.17.

Para *B. sanctaecrucis*, a la columna de CM-Sephadex C-25 también se le adicionó 80 mg de veneno, correspondientes a 73.6 mg de proteína total, según el mismo método de cuantificación que para *B. atrox* y al término del proceso de purificación se recuperaron 20.7 mg de proteína de la muestra BsMtx, equivalente a una recuperación proteica de 28.13 %. La actividad específica del veneno y de BsMtx fue de 5159 U/mg y 6614 U/mg, respectivamente, mientras que la actividad total fue de 379566 U y 136900 U, siguiendo el mismo orden. A partir de estos valores, el rendimiento basado en la actividad miotóxica (75 μg) fue de 36.07 % y el factor de purificación de 1.28 (Tabla 3).

Tabla de purificación de las miotoxinas BaMtx y BsMtx de los venenos de *B. atrox y B. sanctaecrucis*

Muestra	Vol. (mL)	[Prot.] (mg/mL)	Prot. total (mg)	Act. específica (U/mg)	Actividad total (U)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
B. atrox	1	69.7	69.7	4622	321975	100	1
BaMtx	1.2	0.6	0.7	5406	3893	1.21	1.17
B. sanctaecrucis	1	73.6	73.6	5159	379566	100	1
BsMtx	1.5	13.8	20.7	6614	136900	36.07	1.28

Tabla 3. Tabla de purificación de BaMtx y BsMtx obtenidas a partir de los venenos de *B. atrox y B. sanctaecrucis*, respectivamente, basado en su actividad miotóxica con 75 μg de proteína. La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford.

6.3. Caracterización de las miotoxinas purificadas

6.3.1. Perfil electroforético de BaMtx y BsMtx mediante SDS-PAGE

Tanto BaMtx como BsMtx fueron analizados por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y no reductoras, obteniendo sus respectivos perfiles electroforéticos. En condiciones no reductoras, BaMtx presentó una banda predominante alrededor de 20-25 kDa, mientras que BsMtx mostró un perfil difuso contenido en un rango aproximado de 20-30 kDa. Bajo condiciones reductoras, BaMtx presentó una banda predominante entre 11-15 kDa aproximadamente, mientras que BsMtx mostró dos bandas principales, una alrededor de 25 kDa y otra a los 13 kDa aproximadamente (Figura 9).

Perfil electroforético de las miotoxinas purificadas bajo condiciones reductoras y no reductoras

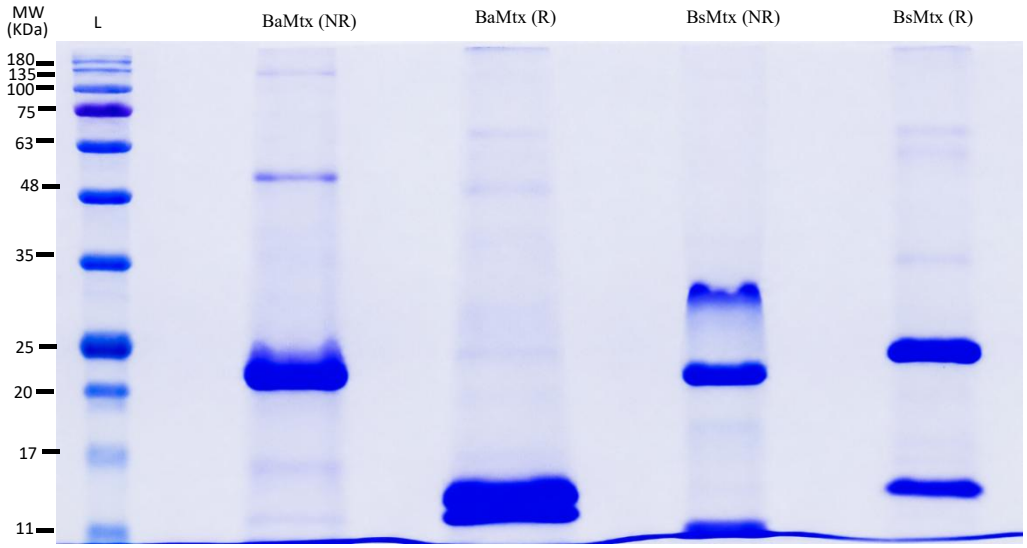


Figura 9. Perfil electroforético de BaMtx y BsMtx mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras (R) y no reductoras (NR). Se cargaron 9 µg de cada muestra y se empleó un marcador de peso molecular (L) como referencia para estimar la masa molecular aparente de las bandas proteicas.

6.3.2. Determinación de la masa molecular de BsMtx mediante MALDI-TOF

El análisis de BsMtx se realizó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF en modo lineal positivo, donde el espectro obtenido presentó señales en m/z 4592.866, 6887.975 y 13768.096, de las cuales las señales de mayor intensidad fueron m/z 6887.975 y 13768.096. La señal presente en m/z 13768.096 correspondió a una masa molecular aproximada de 13.77 kDa para BsMtx (Figura 10).

Espectrometría de masas MALDI-TOF de BsMtx

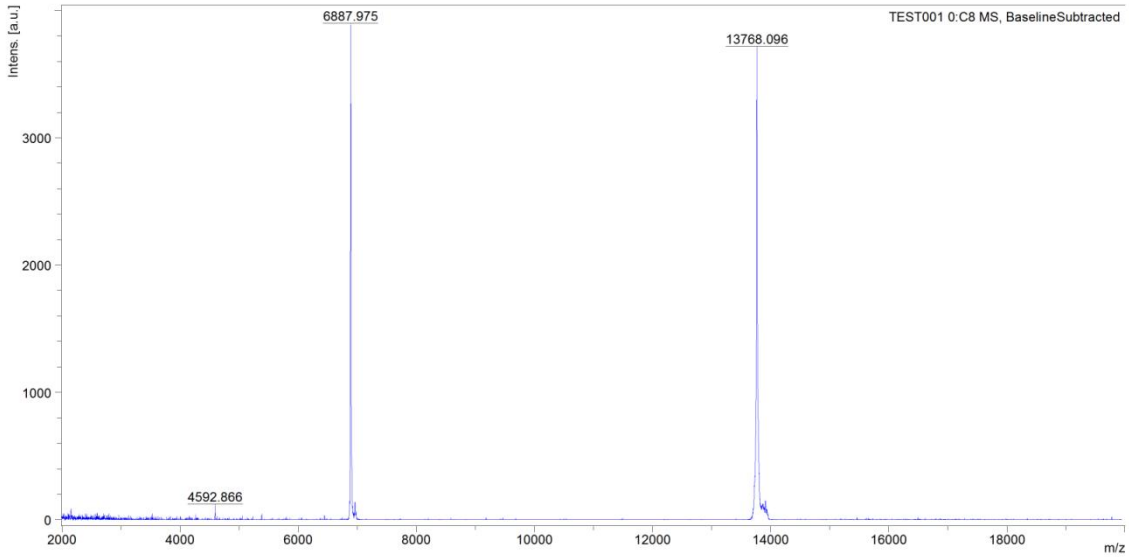


Figura 10. Espectro de masas MALDI-TOF de la muestra purificada BsMtx de *Bothrops sanctaecrucis*, obtenido en modo lineal positivo. Se muestran tres señales en m/z 4592.866, 6887.975 y 13768.096.

6.3.3. Actividad fosfolipasa A2 de BaMtx y BsMtx

La actividad fosfolipasa A_2 específica de BaMtx y BsMtx se evaluó durante un intervalo de 60 minutos de reacción con lecturas cada 10 minutos empleando el sustrato NOBA y se comparó con la actividad de los venenos correspondientes.

En la especie *B. atrox*, tanto el veneno como BaMtx mostraron un incremento progresivo de la actividad PLA_2 a lo largo del tiempo evaluado, no obstante, los

valores del veneno se mantuvieron por encima de los registrados para BaMtx durante el tiempo de reacción analizado. Mientras que para *B. sanctaecrucis* el veneno también presentó un incremento progresivo de la actividad durante el tiempo evaluado, sin embargo, BsMtx mostró valores con escasa variación a lo largo del tiempo (Figura 11).

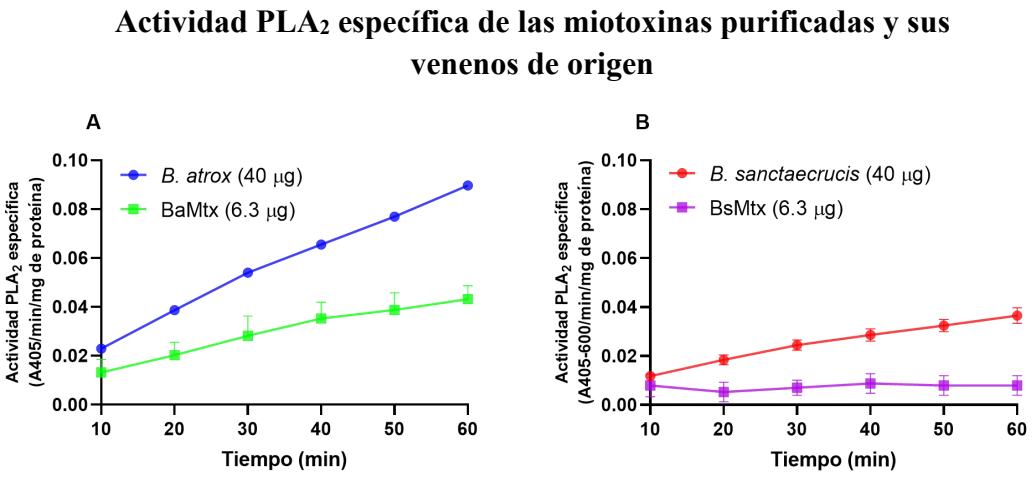


Figura 11. Actividad fosfolipasa A2 específica de BaMtx y BsMtx comparado con sus venenos correspondientes durante un tiempo de reacción de 60 minutos. (A) Veneno de B. atrox (40 µg) y BaMtx (6.3 µg). (B) Veneno de B. sanctaecrucis (40 µg) y BsMtx (6.3 µg). Los valores representan la media ± desviación estándar de tres réplicas técnicas y la actividad PLA_2 específica se expresó como $A_{405-600}$/min/mg de proteína.

6.3.4. Actividad miotóxica de los venenos y las miotoxinas purificadas

La actividad miotóxica de los venenos de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis*, así como de sus respectivas muestras purificadas: BaMtx y BsMtx, se determinó mediante la actividad plasmática de creatina quinasa (CK) después de la administración de 25, 50, 75 y 100 µg de proteína.

Con respecto a los venenos, el ANOVA de dos vías mostró que la dosis tiene un efecto significativo sobre la actividad de CK [$F(3,8) = 97.37$; $p < 0.0001$], así como también la especie [$F(1,8) = 9,433$; $p = 0,0153$]. Asimismo, se observó una interacción significativa entre la dosis y la especie [$F(3,8) = 8,272$; $p = 0,0078$].

En cuanto a las comparaciones múltiples de Sidak no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre *B. atrox* y *B. sanctaecrucis* a 25, 50 y 75 µg, pero a 100 µg B. sanctaecrucis presentó una actividad de CK superior a la registrada para B. atrox ($p = 0.0018$) (Figura 12-A).

Para las muestras purificadas: BaMtx y BsMtx, el ANOVA de dos vías mostró que tanto la dosis [$F(3,8) = 101.8$; $p < 0.0001$] como el tipo de muestra [$F(1,8) = 42.32$; $p < 0.0002$], tienen un efecto significativo sobre la actividad CK, además de una interacción significativa entre ambos factores [$F(3,8) = 4.531$; $p < 0.0389$]. Al realizar las comparaciones múltiples de Sidak, BsMtx presentó una actividad de CK superior a BaMtx a 25 µg ($p = 0.0488$) y 75 µg ($p = 0.001$). Por otro lado, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas muestras a 50 µg ($p = 0.5146$) ni a 100 µg ($p = 0.2815$) (Figura 12-B)

El supuesto de normalidad de los residuos fue compatible con una distribución normal tanto para los venenos ($W = 0.940$; $p = 0.351$) como para las muestras purificadas ($W = 0.955$; $p = 0.566$).

Actividad miotóxica de las miotoxinas purificadas y sus venenos de origen

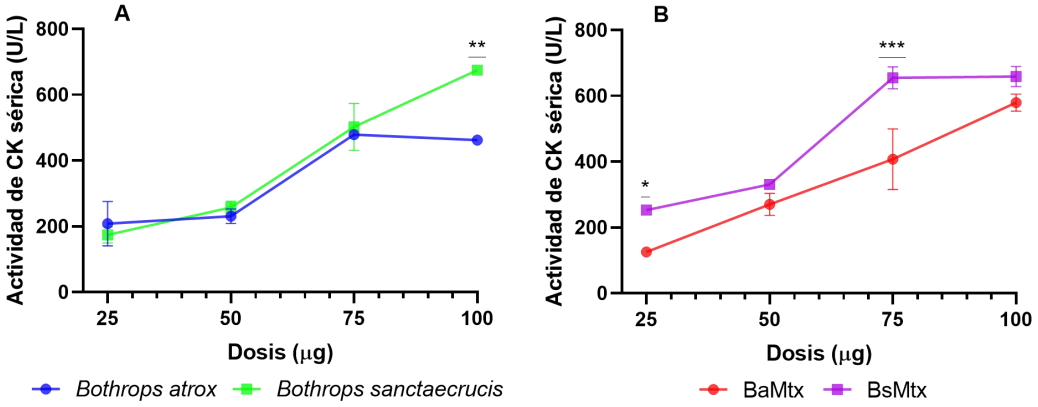


Figura 12. Actividad miotóxica de los venenos y muestras purificadas de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis*, determinado mediante la actividad plasmática de creatina quinasa (CK) después de la administración de dosis crecientes (25, 50, 75 y 100 µg). (A) Comparación entre los venenos de B. atrox y B. sanctaecrucis. (B) Comparación entre BaMtx y BsMtx. Los puntos representan la media y las barras de error la desviación estándar. La comparaciones entre grupos para cada dosis se realizaron mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Sidak. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***).

6.4. Caracterización inmunológica

6.4.1. Reactividad mediante ELISA indirecto

Mediante el ensayo de ELISA indirecto se evaluó la reactividad inmunológica de los antivenenos αBt-INS y αB/C-INLASA frente a cuatro antígenos: los venenos de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis*, y sus respectivas muestras purificadas BaMtx y BsMtx. Para todos los antígenos se observó una disminución progresiva de la absorbancia conforme aumentó la dilución de los antivenenos.

Con respecto a los títulos de reactividad, el antiveneno αBt-INS mostró valores de 1:57 874, 1:70 007, 1:44 733 y 1:23 854 para *B. atrox, B. sanctaecrucis*, BaMtx y BsMtx, respectivamente. Mientras que para el antiveneno αB/C-INLASA los títulos fueron de 1:22 027, 1:27 919, 1:32 022 y 1:17 766, siguiendo el mismo orden. De todos los antígenos analizados BsMtx registró los menores valores de absorbancia así como también el menor valor de titulación cuando se le enfrentó con el αB/C-INLASA (Figura 13; Tabla 4).

Reactividad inmunológica de los antivenenos INS e INLASA frente a los venenos y miotoxinas de *B. atrox y B. sanctaecrucis*

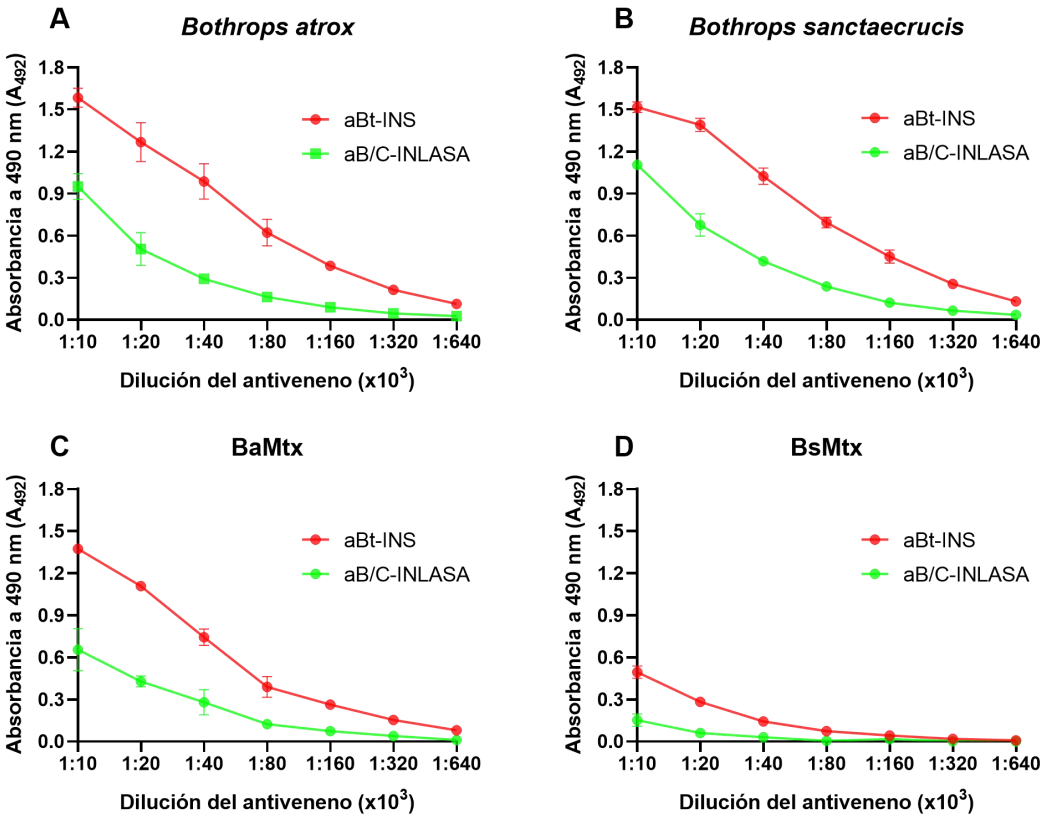


Figura 13. Reactividad inmunológica de los antivenenos αBt-INS y αB/C-INLASA frente los cuatro antígenos analizados mediante ELISA indirecto. Las curvas representan la absorbancia corregida obtenida frente a diluciones seriadas de los antivenenos. (A) Veneno de *B. atrox*, (B) Veneno de *B. sanctaecrucis*, (C) BaMtx y (D) BsMtx. Los puntos representan la media y las barras de error la desviación estándar de tres réplicas técnicas.

Títulos de reconocimiento de los antivenenos INS e INLASA frente a los venenos y miotoxinas en estudio

Antígeno	αBt-INS	αB/C-INLASA
B. atrox	1:57 874	1:22 027
B. sanctaecrucis	1:70 007	1:27 919
BaMtx	1:44 733	1:32 022
BsMtx	1:23 854	1:17 766

Tabla 4. Títulos de reactividad de los antivenenos αBt-INS y αB/C-INLASA frente a los venenos de *B. atrox y B. sanctaecrucis* y sus muestras purificadas BaMtx y BsMtx. Los valores se expresaron como el recíproco de la dilución del antiveneno correspondiente al 50 % de la absorbancia máxima corregida de cada curva y la dilución se estimó mediante interpolación lineal en escala logarítmica.

VII. DISCUSIÓN

La variabilidad inter e intraespecífica constituye una característica ampliamente reconocida de los venenos botrópicos y responde a factores genéticos, ontogénicos, geográficos, ecológicos y alimentarios. Esta heterogeneidad afecta tanto la composición proteica como la actividad funcional y contribuye a la diversidad de manifestaciones observadas durante el ofidismo (Calvete et al., 2011; Sousa et al., 2021; De Godoy et al., 2024). Los resultados de la presente tesis se sitúan dentro de este contexto, al mostrar diferencias bioquímicas, biológicas e inmunológicas entre los venenos y las miotoxinas de *Bothrops atrox* y *Bothrops sanctaecrucis*. Debido a la amplia información disponible sobre *B. atrox*, esta especie se empleó como referencia para contrastar las características de *B. sanctaecrucis*, cuyo veneno continúa escasamente estudiado y cuenta con pocos antecedentes de caracterización funcional (Lobo-López et al., 2025). En este sentido, el presente trabajo aporta información sobre las propiedades bioquímicas del veneno de *B. sanctaecrucis*, el aislamiento de un componente miotóxico y su reconocimiento por antivenenos empleados en la región.

1. Cuantificación proteica de los venenos

La heterogeneidad característica de los venenos botrópicos, conlleva a un gran desafío al momento de su cuantificación proteica puesto que además de proteínas, los venenos contienen componentes no proteicos y otros interferentes que pueden alterar el método de cuantificación empleado, por lo que para la determinación de la composición proteica global es necesario el uso de diferentes métodos (Pace et al., 1995; Noble y Bailey, 2009). En el presente estudio se emplearon tres métodos de cuantificación, donde el método de absorbancia a 280 nm dio las mayores estimaciones de concentración proteica, seguida por Bradford y luego BCA, los valores normalizados para cada método de cuantificación con su respectivo veneno se muestran en la tabla 1.

El método de absorbancia a 280 nm está basado en la absorción intrínseca de los residuos aromáticos, principalmente triptófano y tirosina, de cada proteína (Pace et al., 1995). Este método mostró las concentraciones más elevadas para ambos venenos, con un valor ligeramente superior en *B. atrox* (1.272 mg/mL) respecto a *B. sanctaecrucis* (1.157 mg/mL). La mayor concentración obtenida para *B. atrox* podría sugerir una mayor abundancia relativa de proteínas ricas en residuos aromáticos, lo cual es consistente con estudios proteómicos que reportan una alta proporción de metaloproteasas, serinoproteasas y fosfolipasas A_2 en venenos del género *Bothrops*, proteínas que contienen residuos aromáticos implicados en estabilidad estructural y actividad catalítica (Calvete, 2013; Tasoulis y Isbister, 2017). No obstante, debido a la presencia de componentes no proteicos que absorben en el rango UV este método tiende a sobreestimar la concentración proteica real, por lo tanto, dichos valores deben tomarse como estimaciones máximas del contenido proteico (Noble y Bailey, 2009).

En contraste, el método de Bradford mostró valores intermedios para ambos venenos, pero con una concentración ligeramente mayor para *B. sanctaecrucis* (0.920 mg/mL) que para *B. atrox* (0.871 mg/mL). Este método está basado en la unión del colorante Azul Brillante de Coomassie G-250 a residuos básicos (arginina, lisina, histidina) y aromáticos (Bradford, 1976), por lo que estos resultados diferenciales entre ambas especies podrían deberse a variaciones en su composición proteica global, principalmente relacionadas con toxinas con una abundancia relativa rica en residuos básicos. No obstante, la diferencia con respecto a los otros métodos se podría atribuir a sus limitaciones inherentes como su alta sensibilidad a detergentes, sales y otros componentes presentes en el veneno (Pace et al., 1995).

Con respecto al ensayo BCA, los resultados fueron los más bajos para ambos venenos, siendo *B. atrox* (0.732 mg/mL) mayor que *B. sanctaecrucis* (0.568 mg/mL). Este

método está basado en la reducción de Cu^{2+} a Cu^{+} por los enlaces peptídicos y ciertos residuos aminoacídicos como cisteína, tirosina y triptófano bajo condiciones alcalinas seguida de la formación de un complejo coloreado con ácido bicinconínico, cuya intensidad está relacionada principalmente a la cantidad de enlaces peptídicos y residuos aminoacídicos mencionados (Smith et al., 1985; Noble y Bailey, 2009).

Las diferentes concentraciones proteicas obtenidas con los tres métodos concuerdan con la literatura reportada en venenos de serpientes, por ejemplo Yarlequé et al. (2012), utilizaron la absorbancia a 280 nm, el método de Lowry y Bradford para la determinación del contenido proteico en venenos de diversas especies de serpientes de vipéridos y elápidos, evidenciando discrepancias en las concentraciones de los venenos de las serpientes en estudio. Bocian et al. (2020) emplearon 5 métodos diferentes de cuantificación dentro de los cuales está Bradford y BCA para determinar el contenido proteico del veneno de las especies *Naja ashei y Agkistrodon contortrix*. Un trabajo reportado más actualmente, donde French et al. (2026) emplearon Bradford, BCA, Quibit y Abs 280 nm para determinar el contenido proteico de diversos elápidos y vipéridos africanos, encontrando diferencias en la concentración proteica de los venenos estudiados según el método de cuantificación empleado. Estos antecedentes respaldan los resultados obtenidos en el presente estudio, reflejando así que las diferencias obtenidas se deben a las particularidades analíticas de cada método frente a una matriz proteica heterogénea, y no necesariamente una inconsistencia experimental.

2. Perfiles electroforéticos de los venenos

Los resultados heterogéneos obtenidos por los métodos de cuantificación proteica se ven reflejados también en los perfiles electroforéticos de los venenos de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis*. En ambos casos se observaron múltiples bandas distribuidas en distintos rangos de peso molecular, pero con intensidad diferente, lo cual es congruente con el

patrón común en los venenos botrópicos, cuya composición está formada por un número relativamente limitado de familias proteicas, pero con numerosas isoformas y variantes estructurales. Esta naturaleza multiproteica del género *Bothrops* está gobernada principalmente por familias como las SVMP, SVSP, PLA_2 y L-AAO, además de otros componentes en menor proporción (Calvete, 2017; Tasoulis e Isbister, 2017; Oliveira et al., 2022).

Para la especie *B. atrox*, las bandas de mayor intensidad se concentraron principalmente alrededor de 20-30 kDa y 35-50 kDa en condiciones no reductoras, mientras que a condiciones reductoras, destacaron bandas cercanas a 23 y 50 kDa, junto con otras bandas de menor intensidad. Este patrón está relacionado con la complejidad proteómica descrita por Kohlhoff et al. (2012) para poblaciones peruanas de esta especie, quienes mediante RP-HPLC, SDS-PAGE y espectrometría de masas, identificaron alrededor de 20-25 componentes pertenecientes a seis o siete familias proteicas en su veneno, dentro de estas familias, las SVMP de clases P-I y P-III fueron señaladas como las más abundantes, seguidas por las PLA_2, SVSP, desintegrinas y lectinas tipo C. Otros trabajos también han demostrado que la proporción de estas familias puede variar considerablemente incluso entre individuos de la misma población, principalmente en el caso de las SVMP, SVSP y PLA_2 (Calvete et al., 2011; Sousa et al., 2021). Por lo tanto, el perfil obtenido en este estudio refleja la diversidad proteica descrita para *B. atrox*, sin embargo, la identidad de cada banda no puede establecerse únicamente a partir de su migración electroforética.

Con respecto al veneno de *B. sanctaecrucis*, su perfil electroforético mostró una mayor concentración de bandas aproximadamente en la región de 20-30 kDa a condiciones no reductoras, mientras que a condiciones reductoras se observó una banda predominante alrededor de 23 kDa, acompañada de varias bandas de menor intensidad distribuidas a

lo largo de entre 25-65 kDa. Este comportamiento coincide parcialmente con lo reportado por Lobo-López et al. (2025) quienes describieron que esta especie tiene un perfil electroforético con bandas predominantes entre 10-37 kDa. La similitud parcial entre ambos perfiles respalda el predominio de componentes de bajo e intermedio peso molecular en *B. sanctaecrucis*, mientras que las diferencias podrían explicarse por el origen geográfico y biológico de las muestras, las condiciones experimentales utilizadas y la variabilidad natural propia de los venenos.

Los cambios observados en el patrón de las bandas de los perfiles electroforéticos al comparar las condiciones reductoras y no reductoras también permiten hacer algunas consideraciones sobre la organización estructural de las proteínas presentes. El agente reductor, 2-β-mercaptoetanol, se encarga de romper los enlaces disulfuro intra e intercatenarios, por lo que puede modificar la migración de proteínas cuyas subunidades se encuentran unidas mediante estos enlaces covalentes (Laemmli, 1970; Allore y Barber, 1984). En ambos venenos se observó una redistribución del patrón de bandas después del tratamiento con el agente reductor, lo que sugiere que parte de los componentes presentan una movilidad influida por su organización estructural y por la presencia de estos enlaces disulfuro. No obstante el patrón electroforético, por sí mismo, no nos proporciona la identidad de cada proteína, sino únicamente su peso molecular aproximado y su comportamiento migratorio, por lo que no se puede confirmar a qué familia pertenece cada banda puesto que varias familias de toxinas también comparten rangos de peso molecular similares.

Los diferentes perfiles electroforéticos de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis* son congruentes con la complejidad proteica típica del género *Bothrops*, lo cual se explica por la variabilidad interespecífica ampliamente reportada en este género, debido a factores

geográficos, ontogénicos y ecológicos (Alape-Girón et al., 2008; Calvete et al., 2011; Ortiz et al., 2012; Sousa et al., 2021; De Godoy et al., 2024).

3. Actividades enzimáticas y su neutralización

La variabilidad observada en los perfiles electroforéticos también se reflejó a nivel funcional, donde los venenos de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis* mostraron diferencias en sus actividades proteolítica, amidolítica, fosfolipasa A_2 e hialuronidasa, lo que pone en evidencia que la composición molecular de ambos venenos se traduce también en comportamientos bioquímicos distintos. Este tipo de variación es común dentro del género *Bothrops* y puede estar relacionado con diferencias en la abundancia relativa de determinadas familias de toxinas, la presencia de distintas isoformas y sus propiedades catalíticas (Casewell et al., 2020; Sousa et al., 2021; Sousa et al., 2022). Entre las principales familias involucradas se encuentran las SVMP, las SVSP, las PLA_2 y las hialuronidasas. La variación funcional entre especies, poblaciones e incluso individuos ha sido ampliamente documentada y puede estar influida por factores geográficos, ontogénicos y ecológicos (Calvete et al., 2011; Ortiz et al., 2012; Sousa et al., 2021; De Godoy et al., 2024). Más recientemente, Torrejón et al. (2026), compararon 24 venenos de Viperidae, encontrando diferencias marcadas entre especies tanto en sus perfiles funcionales como en el grado de inhibición producido por antivenenos peruanos, mostrando que la respuesta depende de la combinación específica entre veneno, actividad evaluada y antiveneno.

En la actividad proteolítica sobre azocaseína, ambas especies mostraron valores relativamente cercanos, aunque *B. sanctaecrucis* presentó una actividad ligeramente mayor (0.6544 ± 0.0204 A_{405}/min/mg) que *B. atrox* (0.5978 ± 0.0608 A_{405}/min/mg). Para venenos botrópicos, esta actividad suele estar asociada principalmente con las SVMP, una de las familias más abundantes y funcionalmente relevantes, puesto que

participan directamente en la degradación de proteínas de la matriz extracelular y de la membrana basal vascular, favoreciendo el daño microvascular, la hemorragia y la lesión tisular (Gutiérrez et al., 2016; Escalante et al., 2011). Sin embargo, debido a que la azocaseína es un sustrato proteico inespecífico, el resultado obtenido debe entenderse como una medida general de proteólisis y no como una estimación exclusiva de la actividad de las SVMP. La elevada actividad proteolítica de *B. sanctaecrucis* es consistente con lo descrito por Lobo-López et al. (2025), quienes observaron una marcada degradación de diferentes sustratos proteicos en esta especie como azocaseína, gelatina, fibrinógeno humano, fibrina y el sustrato cromogénico S-2238. Por su parte, para *B. atrox*, se ha reportado una alta representación de SVMP, particularmente de las clases P-I y P-III, aunque su abundancia puede variar de manera considerable entre poblaciones e individuos (Calvete et al., 2011; Kohlhoff et al., 2012; Sousa et al., 2021). En ese contexto, la similitud observada entre ambos venenos podría indicar que, pese a diferencias en su composición molecular, pueden alcanzar niveles comparables de actividad proteolítica frente a un sustrato inespecífico. A diferencia de la actividad basal, la neutralización de la proteólisis fue muy baja. El antiveneno INS redujo la actividad en 2.04 % para *B. atrox* y 1.19 % para *B. sanctaecrucis*, mientras que INLASA presentó valores de reducción de 1.49 % y 0.17 %, respectivamente, lo que evidenció que la actividad proteolítica permaneció funcionalmente activa. Esto contrasta con estudios en los que se ha observado una inhibición más marcada de determinadas actividades proteolíticas. Torrejón et al. (2026), por ejemplo, encontraron que el antiveneno antibotrópico peruano podía inhibir con distinta eficacia varias actividades funcionales en un conjunto amplio de venenos viperinos. No obstante, Gutiérrez (2018) señala que la eficacia preclínica de un antiveneno no debe asumirse como uniforme, ya que puede variar de forma importante entre distintas actividades tóxicas de un mismo veneno.

Asimismo, la neutralización está condicionada por varios aspectos del diseño experimental, entre ellos la relación antígeno-anticuerpo, la cantidad de veneno, el sustrato utilizado, el tiempo de preincubación y la concentración del antiveneno. Además, la azocaseína mide proteólisis global, mientras que otros ensayos pueden evaluar sustratos o actividades más específicas. Por ello, estos porcentajes deben interpretarse dentro de las condiciones experimentales empleadas y no como una medida absoluta de la capacidad neutralizante de los antivenenos.

La actividad amidolítica presentó valores muy similares tanto para *B. atrox* (0.3978 ± 0.0170 A_{405}/min/mg) como para *B. sanctaecrucis* (0.3417 ± 0.0453 A_{405}/min/mg). El sustrato cromogénico empleado, BApNA, es susceptible a proteasas con actividad tipo tripsina y, en venenos botrópicos, su hidrólisis se relaciona principalmente a la acción de SVSP (Romanazzi et al., 2025). Estas enzimas intervienen en distintos procesos del sistema hemostático, actuando sobre fibrinógeno, factores de coagulación, plasminógeno y componentes del sistema calicreína-cininas. Como consecuencia, contribuyen a varias de las alteraciones coagulopáticas asociadas al envenenamiento (Serrano y Maroun, 2005; Matsui et al., 2000). En *B. atrox*, además, Ortiz et al. (2012) demostraron que la actividad amidolítica puede variar de acuerdo con el origen geográfico de las muestras, lo que refuerza la considerable plasticidad funcional de este veneno. La neutralización de la actividad amidolítica fue claramente mayor en *B. atrox*. El INS redujo la actividad en 29.19 % y el INLASA en 32.96 %, mientras que para *B. sanctaecrucis* los valores fueron de 6.34 % y 6.03 %, respectivamente. Esto indica que, bajo las condiciones evaluadas, los componentes responsables de la hidrólisis de BApNA en *B. atrox* fueron más susceptibles a la inhibición por ambos antivenenos. Sin embargo, el ensayo no permite establecer si esta diferencia se debe a una mayor afinidad de los anticuerpos, a diferencias en la abundancia de SVSP o a una distinta

accesibilidad de los epítopos funcionales. La neutralización incompleta de las serinoproteasas ya ha sido observada en otros venenos botrópicos. Kuniyoshi et al. (2017), trabajando con *B. jararaca*, encontraron que el antiveneno botrópico del Instituto Butantan neutralizaba con mayor eficacia determinadas actividades atribuidas a metaloproteasas, mientras que algunas actividades relacionadas con serinoproteasas permanecían parcialmente activas. Esto demuestra que distintas clases de proteasas pueden responder de manera diferente frente a un mismo antiveneno. En el caso de *B. sanctaecrucis*, la menor inhibición amidolítica podría estar relacionada con diferencias antigénicas o funcionales en sus SVSP, aunque para demostrarlo sería óptimo estudios con las enzimas purificadas.

En cuanto a la actividad fosfolipasa A_2 los resultados mostraron diferencias muy marcadas entre ambos venenos. *B. atrox* presentó 0.1075 ± 0.0052 $A_{405–600}$/min/mg, mientras que *B. sanctaecrucis* alcanzó 0.0446 ± 0.0023 $A_{405–600}$/min/mg. Las PLA_2 constituyen una familia muy diversa dentro de los venenos de Viperidae e incluyen tanto isoformas catalíticamente activas, llamadas Asp49-PLA_2, como proteínas homólogas de PLA_2 con actividad enzimática reducida o ausente, Lys49-PLA_2. Por esta razón, una mayor actividad catalítica no necesariamente implica una mayor capacidad miotóxica, ya que ambos procesos pueden depender de mecanismos diferentes (Gutiérrez y Lomonte, 2012; Lomonte y Rangel, 2012; Sousa et al., 2022). La menor actividad PLA_2 observada en *B. sanctaecrucis* coincide con lo reportado por Lobo-López et al. (2025), quienes también describieron una actividad fosfolipásica relativamente baja en esta especie. Por lo contrario, para *B. atrox*, se ha documentado una mayor diversidad de PLA_2, con variaciones importantes entre poblaciones e individuos. Esta diferencia adquiere especial interés al considerar posteriormente las propiedades de BaMtx y BsMtx, ya que en este estudio la actividad catalítica y la

miotoxicidad no siguieron necesariamente el mismo patrón. Asimismo, se observó una neutralización parcial de la actividad PLA_2, con valores similares para ambos venenos. El INS redujo esta actividad en 11.24 % para *B. atrox* y 11.53 % para *B. sanctaecrucis*, mientras que INLASA alcanzó reducciones de 10.34 % y 16.51 %, respectivamente. Aunque estos porcentajes muestran una inhibición limitada bajo las condiciones empleadas, otros trabajos han demostrado que la actividad PLA_2 puede neutralizarse de manera más eficiente cuando existe una mejor correspondencia antigénica y una relación veneno-antiveneno adecuada. Estevao-Costa et al. (2016), por ejemplo, demostraron neutralización cruzada de distintas actividades tóxicas de venenos de *Bothrops* por antivenenos producidos en Perú y Brasil, lo que muestra que los productos polivalentes pueden neutralizar toxinas heterólogas cuando existe suficiente conservación antigénica.

La actividad hialuronidasa presentó igualmente una diferencia marcada entre los dos venenos. *B. atrox* alcanzó 83.01 ± 4.26 UDF/mg, mientras que *B. sanctaecrucis* registró 31.85 ± 4.70 UDF/mg. Las hialuronidasas son una familia proteica encargada de degradar el ácido hialurónico de la matriz extracelular reduciendo la viscosidad del tejido conectivo, facilitando así la difusión local de otros componentes del veneno. Por este motivo suelen denominarse “factores de difusión” (Kemparaju y Girish, 2005; De França y Tambourgi, 2023). Para el veneno de *B. atrox*, Vivas-Ruiz et al. (2019) lograron caracterizar bioquímica y molecularmente una hialuronidasa funcional (Hyal-Ba), mientras que Lobo-López et al. (2025) también detectaron esta actividad en *B. sanctaecrucis*, aunque en menor magnitud. Esto coincide con el patrón observado en el presente estudio. Con respecto a la inhibición de la actividad hialuronidasa fue nuevamente muy baja. El antiveneno del INS produjo reducciones de 7.72 % en *B. atrox* y 0.28 % en *B. sanctaecrucis*, mientras que INLASA alcanzó 6.75 % y 0.28 %,

respectivamente. Una posible explicación sería una menor representación de anticuerpos capaces de interferir funcionalmente con estas enzimas o diferencias antigénicas entre las hialuronidasas presentes en los venenos estudiados y aquellas utilizadas durante la inmunización de los caballos. Sin embargo, esta posibilidad debe considerarse solo como una hipótesis, ya que en este trabajo no se cuantificaron anticuerpos específicos frente a hialuronidasas. Gutiérrez (2018) destaca precisamente que la evaluación de los antivenenos debe abarcar diferentes actividades tóxicas, porque un mismo producto puede mostrar niveles de eficacia muy distintos dependiendo del componente evaluado.

Al comparar todos los ensayos de neutralización, se observa que la respuesta estuvo claramente condicionada por el tipo de actividad. En *B. atrox*, la mayor reducción se registró en la actividad amidolítica, seguida por PLA_2, hialuronidasa y proteolítica, mientras que para *B. sanctaecrucis*, la mayor inhibición correspondió a PLA_2, seguida por la actividad amidolítica, mientras que la actividad proteolítica y hialuronidasa prácticamente se mantuvieron estables. Las diferencias entre INS e INLASA fueron pequeñas en varias de las pruebas y no siguieron un patrón uniforme que permita atribuir una mayor capacidad neutralizante global a alguno de los antivenenos. Esto coincide con lo señalado por Torrejón et al. (2026), quienes demostraron que la eficacia funcional de los antivenenos peruanos depende tanto del veneno como de la actividad evaluada.

4. Purificación de BaMtx y BsMtx

La purificación de las miotoxinas de *Bothrops atrox* y *Bothrops sanctaecrucis* mediante cromatografía de intercambio catiónico con una columna de CM-Sephadex C-25 mostró un comportamiento bastante similar en cuanto a su retención en la matriz y su posterior elución con 0.6 M de NaCl. Este comportamiento es compatible con la naturaleza básica descrita para muchas miotoxinas botrópicas pertenecientes a la familia de las

fosfolipasas A_2 del grupo II, especialmente los homólogos Lys49-PLA_2. Estas proteínas suelen presentar puntos isoeléctricos elevados y una superficie rica en residuos básicos, características que favorecen su unión a matrices de intercambio catiónico a pH neutro, destacando así al intercambio catiónico como una de las estrategias más utilizadas para aislar este tipo de proteínas (Ownby et al., 1999).

La resina CM-Sephadex C-25 se caracteriza por poseer grupos carboximetilo con carga negativa, por lo que retiene preferentemente proteínas con carga neta positiva a pH 7.0, las cuales para poder ser eluidas, se debe aumentar la fuerza iónica del medio, en este caso con NaCl, para debilitar así las interacciones electrostáticas entre las proteínas y la matriz. En este estudio, tanto BaMtx como BsMtx requirieron 0.6 M de NaCl para su recuperación, lo que sugiere una interacción relativamente fuerte con el intercambiador catiónico. Un comportamiento muy parecido fue descrito por Huatuco et al. (2004), quienes purificaron una miotoxina de *B. atrox* peruano mediante CM-Sephadex C-50 a pH 7.0. En ese trabajo, la miotoxina también fue eluida con 0.6 M de NaCl, reflejando así un carácter básico de la proteína. Del mismo modo, Núñez et al. (2004) obtuvieron un resultado comparable al purificar la miotoxina I de *B. atrox* colombiano usando CM-Sephadex C-25 a pH 7.0 y un gradiente de KCl de hasta 0.75 M, en este caso la miotoxina I apareció en uno de los últimos picos cromatográficos, presentó actividad miotóxica y no mostró actividad PLA_2 detectable, para posteriormente ser identificada como un homólogo Lys49-PLA_2. Más adelante, Proleón et al. (2022) aislaron BaMtx a partir de veneno peruano de *B. atrox* empleando también CM-Sephadex C-25 y confirmaron que se trataba de una homóloga Lys49-PLA_2 con elevada miotoxicidad y escasa actividad fosfolipásica. Estos antecedentes respaldan el uso del intercambio catiónico para aislar componentes miotóxicos de *B. atrox* y sirven además como referencia para interpretar el comportamiento cromatográfico observado en BsMtx. Por

otro lado, este tipo de separación no es exclusivo de *B. atrox*. Lomonte y Gutiérrez (1989) purificaron la miotoxina II de *B. asper* mediante CM-Sephadex C-25, mientras que Soares et al. (1998) aislaron mediante intercambio catiónico con CM-Sepharosa una miotoxina (MjTX-I) Lys49 de *B. moojeni*, la cual presentó un punto isoeléctrico de 8.2 y fue recuperada entre las fracciones de mayor retención. Mientras que para *B. brazili*, Pantigoso et al. (2001) también lograron aislar en un solo paso cromatográfico una miotoxina básica utilizando CM-Sephadex C-50 a pH 7.0. En conjunto, estos trabajos muestran que una fuerte retención en matrices carboximetil es un rasgo recurrente entre muchas miotoxinas botrópicas de carácter básico.

Aunque BaMtx y BsMtx mostraron un comportamiento cromatográfico parecido, la cantidad de proteína recuperada fue muy diferente. A partir de 69.7 mg de proteína total de *B. atrox* se obtuvieron 0.7 mg de BaMtx, equivalente al 1.0 %. En cambio, de 73.6 mg de proteína de *B. sanctaecrucis* se recuperaron 20.7 mg de BsMtx, correspondientes al 28.13 %. Esta diferencia es considerable y muestra que el procedimiento permitió recuperar mucho más material proteico en la miotoxina de *B. sanctaecrucis*. No obstante, estos porcentajes deben considerarse directamente dentro del marco de los protocolos empleados en la presente tesis para la purificación, puesto que la recuperación final depende de varios factores, entre ellos la proporción inicial de la proteína purificada, su afinidad por la resina, la resolución de la separación, las pérdidas durante el fraccionamiento y posibles pasos posteriores, la concentración y la diafiltración, además de la posible coelución de otras proteínas con propiedades fisicoquímicas semejantes (Milne, 2023; Angelo y Lenhoff, 2016). Esta precisión es importante al comparar los resultados con estudios previos. Huatuco et al. (2004) estimaron que una miotoxina purificada de *B. atrox* representaba aproximadamente el 4.4 % de la proteína total del veneno, mientras que Pantigoso et al. (2001) reportaron un

valor cercano al 25 % para una miotoxina de *B. brazili.* La menor recuperación de BaMtx frente a algunos antecedentes también podría estar relacionada con la variabilidad natural del veneno de *B. atrox*. Asimismo, se ha demostrado que su composición cambia según el origen geográfico, el individuo y la etapa ontogénica, incluyendo diferencias en la proporción de PLA_2 y homólogos de PLA_2 (Calvete et al., 2011; Sousa et al., 2021; Sousa et al., 2022). Por ello, una recuperación de 1.0 % en este estudio no necesariamente contradice valores mayores descritos previamente. Además, aspectos técnicos como las dimensiones de la columna, el flujo, la cantidad de muestra aplicada, el esquema de elución y los pasos posteriores de concentración pueden modificar de forma importante el rendimiento final. El caso de BsMtx resulta especialmente interesante porque estos resultados representan la primera purificación de una toxina a partir del veneno de *B. sanctaecrucis*. Lobo-López et al. (2025) caracterizaron bioquímicamente el veneno crudo de esta especie y mostraron un perfil funcional complejo, pero el estudio de componentes miotóxicos aislados sigue reflejando un vacio de información. En ese contexto, la recuperación de una fracción con marcada actividad miotóxica en el pico fuertemente retenido por CM-Sephadex C-25 aporta evidencia de la presencia de un componente básico con propiedades compatibles con las miotoxinas botrópicas. Aun así, ni el comportamiento cromatográfico ni la actividad biológica son suficientes para clasificar por sí solos a BsMtx como una Lys49-PLA_2. Para establecerlo con mayor certeza sería necesaria una confirmación estructural, por ejemplo mediante secuenciación, identificación del residuo 49 o análisis proteómico dirigido.

La tabla de purificación (Tabla 3) también permite evaluar el proceso desde el punto de vista funcional. En BaMtx, la actividad específica aumentó de 4622 a 5406 U/mg, lo que corresponde a un factor de purificación de 1.17. En BsMtx, el incremento fue de

5159 a 6614 U/mg, con un factor de 1.28. En ambos casos, el aumento de la actividad específica indica que las fracciones recuperadas quedaron enriquecidas en componentes asociados con la miotoxicidad. No obstante el factor de purificación no debe tomarse de manera aislada como evidencia de homogeneidad molecular, sino interpretarse junto con los análisis electroforéticos y espectrométricos.

La diferencia entre ambos procesos de purificación fue aún más clara al analizar el rendimiento de actividad. BaMtx conservó aproximadamente el 1.21 % de la actividad miotóxica inicial, mientras que BsMtx retuvo el 36.07 %. Este parámetro expresa qué proporción de la actividad biológica presente al inicio del procedimiento se mantiene al final de la purificación. Así, el valor obtenido para BsMtx indica que una fracción importante de la actividad miotóxica del veneno de *B. sanctaecrucis* quedó concentrada en el material eluido con 0.6 M de NaCl. En BsMtx, la recuperación proteica y el rendimiento funcional siguieron una tendencia coherente: se recuperó el 28.13 % de la proteína inicial y el 36.07 % de la actividad miotóxica, acompañado de un incremento de 1.28 veces en la actividad específica. Mientras que para BaMtx, tanto la recuperación proteica como la recuperación de actividad fueron cercanas al 1 %, aunque la actividad específica aumentó. Esto indica que en ambos casos se obtuvieron una fracción funcionalmente enriquecida con miotoxina.

Los resultados cromatográficos muestran, por tanto, que la CM-Sephadex C-25 permitió concentrar componentes miotóxicos básicos de ambos venenos mediante un único paso de intercambio catiónico, en línea con lo descrito previamente para miotoxinas de *B. atrox, B. asper, B. moojeni y B. brazili* (Lomonte y Gutiérrez, 1989; Soares et al., 1998; Huatuco et al., 2004; Núñez et al., 2004; Proleón et al., 2022). Sin embargo, la marcada diferencia en la recuperación de BaMtx y BsMtx refleja la ampliamente reportada variabilidad interespecífica entre especies del género *Bothrops*.

5. Análsis electroforético de BaMtx y BsMtx y MALDI-TOF de BsMtx

El análisis electroforético por SDS-PAGE de las miotoxinas purificadas mostró diferencias claras entre BaMtx y BsMtx. En condiciones no reductoras, BaMtx presentó una banda predominante de aproximadamente 20–25 kDa, mientras que después del tratamiento reductor migró principalmente como una banda de 11–15 kDa. En el caso de BsMtx sin agente reductor se observó una banda difusa entre 20 y 30 kDa, mientras que bajo condiciones reductoras aparecieron dos bandas principales, una cercana a 25 kDa y otra alrededor de 13 kDa. Aunque ambos contienen componentes con masas compatibles con las fosfolipasas A_2 presentes en venenos viperinos, su comportamiento electroforético no fue idéntico. El patrón de BaMtx coincide con lo reportado por Proleón et al. (2022) para una miotoxina Lys49 aislada de veneno peruano de *B. atrox*. En ese estudio, la proteína migró alrededor de 24 kDa en condiciones no reductoras y cerca de 13 kDa después de la reducción y su secuencia permitió identificarla como un homólogo Lys49-PLA_2 de 122 residuos, con una masa molecular de 13 821.834 Da determinada por espectrometría de masas. De forma similar, Núñez et al. (2004) caracterizaron una miotoxina I de *B. atrox* colombiano con una masa de subunidad de 13 826 Da, comportamiento homodimérico y un punto isoeléctrico de 8.9. Estos antecedentes muestran que proteínas de esta familia pueden presentarse como dímeros, aun cuando la masa de cada subunidad se encuentre alrededor de 14 kDa.

La diferencia de movilidad entre las condiciones reductoras y no reductoras podría relacionarse con la ruptura de puentes disulfuro entre subunidades. No obstante, estudios estructurales han demostrado que algunas Lys49-PLA_2 pueden formar dímeros estables sin necesidad de enlaces disulfuro intermoleculares. Matsui et al. (2019), al estudiar una Lys49-PLA_2 de *Protobothrops flavoviridis*, observaron mediante distintas técnicas biofísicas que estas proteínas pueden oligomerizar en presencia de SDS y

generar especies con una masa aparente mayor que la correspondiente al monómero. Por ello, la banda de aproximadamente 20–25 kDa observada para BaMtx en condiciones no reductoras es consistente con un comportamiento dimérico descrito para ciertas PLA_2. En cuanto al patrón de BsMtx la banda cercana a 13 kDa observada bajo condiciones reductoras se encuentra dentro del rango esperado para muchas PLA_2 del grupo II de Viperidae, mientras que la persistencia de la segunda banda alrededor de 25 kDa podría tratarse de la forma dimérica que no se disoció completamente en las condiciones empleadas o tal vez por una migración electroforética anómala asociada a la interacción con SDS descrita por Matsui et al. (2019).

En el análisis por MALDI-TOF de BsMtx se observaron señales principales a m/z 13 768.096, 6887.975 y 4592.866, donde la señal de mayor masa corresponde aproximadamente a 13.77 kDa, valor que se encuentra dentro del intervalo característico de numerosas PLA_2 y homólogas de PLA_2 de venenos botrópicos. Las señales de 6887.975 y 4592.866 pueden interpretarse, respectivamente, como especies doble y triplemente cargadas de una molécula con una masa cercana a 13.77 kDa, por lo que estas tres señales corresponderían a distintas formas ionizadas de una misma especie molecular, lo que concuerda con la banda de aproximadamente 13 kDa observada en el SDS-PAGE bajo condiciones reductoras.

La masa obtenida para BsMtx es además muy cercana a la descrita para otras miotoxinas del género *Bothrops*. Núñez et al. (2004) reportaron 13 826 Da para la miotoxina I de *B. atrox*, mientras que Proleón et al. (2022) determinaron una masa de 13 821.834 Da para BaMtx. La proximidad entre estos valores y los 13 768 Da registrados para BsMtx respalda que se encuentra dentro del rango de masa típico de las PLA_2 del grupo II. Sin embargo, la masa molecular por sí sola no permite distinguir entre una Asp49-PLA_2 o Lys49-PLA_2, ya que varias isoformas pueden presentar valores

muy similares. Para definir esa identidad sería necesario contar con información de secuencia, particularmente sobre el residuo localizado en la posición 49, o realizar un análisis proteómico de péptidos.

La presencia simultánea de una señal cercana a 13.77 kDa en MALDI-TOF y de una banda adicional alrededor de 25 kDa en el SDS-PAGE no representa necesariamente una contradicción. Ambas técnicas miden propiedades diferentes. El SDS-PAGE proporciona una estimación de masa aparente basada en la movilidad de la proteína en el gel y en su interacción con SDS, mientras que MALDI-TOF determina de manera más directa la relación masa/carga de las especies ionizadas. Cuando una proteína presenta tendencia a oligomerizar o un comportamiento electroforético atípico, puede migrar en el gel con una masa aparente mayor sin que exista una especie estable de esa misma masa en el análisis por espectrometría, asimismo, el espectrofotómetro de masas empleado, solo trabaja con un rango de detección 2000-20 000 Da, por lo que la banda de aproximadamente 25 kDa presente en el SDS-PAGE no podría haber sido detectada por el equipo.

6. Actividad PLA_2 y miotoxicidad de BaMtx y BsMtx

La caracterización funcional de las miotoxinas purificadas mostró que la actividad fosfolipasa A_2 y la miotoxicidad no siguieron necesariamente el mismo patrón. Los venenos crudos de ambas especies presentaron un aumento progresivo de la actividad PLA_2, mientras que BaMtx mostró una actividad mucho menor que el veneno de *B. atrox*, BsMtx, por su parte, presentó una actividad fosfolipásica reducida y con poca variación durante el periodo evaluado. Esta diferencia entre actividad catalítica y daño muscular resulta especialmente relevante porque las PLA_2 miotóxicas de venenos viperinos comprenden tanto isoformas Asp49 catalíticamente activas como homólogos Lys49-PLA_2, que han perdido o presentan una capacidad muy limitada para hidrolizar

fosfolípidos, pero mantienen una marcada acción miotóxica mediante mecanismos independientes de la catálisis (Gutiérrez y Lomonte, 2012; Lomonte y Rangel, 2012).

Con respecto a BaMtx, su comportamiento coincide con lo descrito por Proleón et al. (2022) quienes identificaron la miotoxina aislada del veneno peruano de *B. atrox* como un homólogo Lys49-PLA_2 de 122 aminoácidos, con escasa actividad fosfolipásica y una marcada capacidad para producir daño muscular. Por lo tanto, la baja actividad PLA_2 y elevada actividad miotóxica registrada nuevamente para BaMtx en este estudio es, por tanto, coherente con su caracterización molecular previa y constituye un referente útil para interpretar los resultados obtenidos con BsMtx. Bajo este contexto, para BsMtx, la baja actividad fosfolipásica llama especialmente la atención porque contrasta con su elevada capacidad para producir daño muscular. Esta separación entre catálisis y miotoxicidad es una característica bien conocida de las homólogas PLA_2 no catalíticas. En las Asp49-PLA_2, el residuo Asp49 participa en la coordinación del Ca^{2+} necesario para la hidrólisis de los fosfolípidos y cuando este residuo es sustituido por lisina, como ocurre en las Lys49, la geometría del sitio de unión al calcio se altera y la capacidad catalítica disminuye drásticamente o desaparece. A pesar de ello, estas proteínas mantienen regiones capaces de interactuar directamente con las membranas y alterar su integridad. Por esta razón, la pérdida de actividad enzimática no supone necesariamente una pérdida de miotoxicidad (Lomonte y Rangel, 2012; Khan e Ilies, 2023).

La actividad miotóxica, evaluada mediante la liberación plasmática de creatina quinasa (CK), confirmó que tanto los venenos crudos como las fracciones purificadas fueron capaces de producir daño muscular de manera dependiente de la dosis. La CK se utiliza ampliamente como marcador indirecto de miotoxicidad porque la alteración del sarcolema permite la salida rápida de esta enzima desde la fibra muscular hacia la circulación. Gutiérrez et al. (1980) observaron que la concentración plasmática de CK

aumenta rápidamente después de la inoculación de veneno de *Bothrops asper* y alcanza valores elevados durante las primeras horas, en paralelo con el desarrollo temprano de mionecrosis. Estudios posteriores con miotoxinas purificadas también relacionaron esta liberación de CK con el aumento de la permeabilidad del sarcolema y el posterior daño necrótico de la fibra muscular (Gutiérrez et al., 1984).

En los venenos crudos, el análisis de varianza mostró efectos significativos de la dosis, de la especie y de la interacción entre ambos factores. Sin embargo, las comparaciones múltiples permitieron matizar esta diferencia. Solo a 100 µg se encontró una separación estadísticamente significativa entre *B. atrox y B. sanctaecrucis*, siendo este último el que produjo una mayor liberación de CK ($p = 0.0018$), mientras que a 25, 50 y 75 µg no se detectaron diferencias significativas. Por lo tanto, según el análisis estadístico, se puede afirmar que *B. sanctaecrucis* presenta mayor actividad miotóxica que *B. atrox* únicamente a una dosis de 100 µg. Esta mayor respuesta de *B. sanctaecrucis* podría estar relacionada con diferencias en la composición y proporción de sus componentes miotóxicos, así como con la interacción sinérgica entre distintas familias de toxinas presentes en el veneno, puesto que al ser mezclas complejas sus componentes no necesariamente actúan de manera independiente, lo que ayuda a explicar por qué la miotoxicidad de un veneno completo no puede predecirse únicamente a partir de su actividad PLA_2 global ni del comportamiento de una toxina aislada (Mora-Obando et al., 2014).

Las miotoxinas purificadas también mostraron un efecto significativo de la dosis, del tipo de muestra y de la interacción entre ambos factores. Las comparaciones de Sidak indicaron que BsMtx produjo niveles de CK significativamente mayores que BaMtx a 25 µg ($p = 0.0488$) y 75 µg ($p = 0.001$). En cambio, no se observaron diferencias significativas a 50 µg ($p = 0.5146$) ni a 100 µg ($p = 0.2815$). Esto demuestra que ambas

miotoxinas presentan diferencias funcionales, aunque estas no se mantienen de forma uniforme a lo largo de toda la curva dosis-respuesta, sino únicamente a dosis de 25 y 75 µg, donde BsMtx produjo una mayor respuesta miotóxica que BaMtx, según los análisis estadísticos, mientras que, la falta de diferencia significativa entre ambas miotoxinas a 100 µg podría deberse a que el sistema se aproxima a una respuesta máxima, de modo que aumentar la cantidad de toxina ya no produce un incremento proporcional en la liberación plasmática de CK.

Desde el punto de vista del mecanismo de acción, la marcada miotoxicidad de BsMtx a pesar de su escasa actividad PLA_2 es compatible con un proceso de daño de membrana que no depende principalmente de la hidrólisis enzimática. En las miotoxinas Lys49, distintas regiones catiónicas e hidrofóbicas, localizadas sobre todo hacia el extremo C-terminal, pueden interactuar directamente con la membrana de la fibra muscular, lo que altera la integridad del sarcolema y favorece una entrada masiva de Ca^{2+}. Este aumento del calcio intracelular desencadena posteriormente alteraciones mitocondriales, activación de proteasas dependientes de calcio y otras vías degradativas que terminan provocando necrosis de la fibra muscular (Lomonte y Gutiérrez, 2011; Lomonte y Rangel, 2012). Los estudios estructurales realizados en los últimos años han permitido precisar mejor este mecanismo. Gomes et al. (2020) propusieron que la actividad de las homólogas PLA_2 depende de cambios conformacionales capaces de exponer regiones implicadas en la interacción con membranas. Más recientemente, Lima et al. (2026), utilizando Bothropstoxin-I como modelo de Lys49-PLA_2, mostraron que estas proteínas pueden adoptar distintas configuraciones diméricas. Sus simulaciones indicaron que una conformación extendida facilita la interacción simultánea de regiones C-terminales con la bicapa lipídica. En ese sentido, la participación del loop C-terminal, de superficies hidrofóbicas de la proteína y de los propios fosfolípidos contribuiría a estabilizar la

interacción y favorecer la perturbación de la membrana. Estos hallazgos refuerzan la idea de que la miotoxicidad de las homólogas de PLA_2 puede depender en gran medida de sus propiedades estructurales y de su capacidad de interactuar con membranas, más que de la hidrólisis de fosfolípidos.

Los resultados obtenidos para BsMtx como una masa molecular cercana a 13.77 kDa mediante MALDI-TOF, una actividad PLA_2 reducida y una marcada elevación de CK en el modelo murino encajan de manera interesante con el modelo de homólogo Lys49-PLA_2 del género *Bothrops*. Sin embargo, todavía no se puede afirmar que se trate de una isoforma Lys49, ya que para ello sería necesario identificar el residuo de la posición 49 mediante secuenciación aminoacídica, análisis de péptidos por espectrometría de masas u otra estrategia molecular para establecer su clasificación.

Los resultados de BaMtx y BsMtx muestran así que no existe una relación necesariamente lineal entre actividad PLA_2 y miotoxicidad. BaMtx constituye un buen ejemplo de esta discrepancia, ya que Proleón et al. (2022) demostraron molecularmente que se trata de una homóloga Lys49-PLA_2 con pobre actividad fosfolipásica y una marcada acción miotóxica. BsMtx mostró un comportamiento funcional parecido, aunque con diferencias en la magnitud del daño muscular y sin contar todavía con evidencia molecular que permita conocer el residuo presente en la posición 49.

7. Reconocimiento inmunológico por ELISA

La evaluación mediante ELISA indirecto mostró que los antivenenos polivalentes del INS e INLASA reconocieron tanto los venenos crudos *de Bothrops atrox y Bothrops sanctaecrucis* como sus respectivas miotoxinas purificadas, aunque con diferencias claras en la intensidad de reconocimiento. Este tipo de reconocimiento cruzado es frecuente entre venenos botrópicos y está relacionado con la conservación estructural y antigénica de varias familias de toxinas presentes dentro del género. Aun así, la cantidad

relativa de cada componente y su composición específica pueden variar considerablemente entre especies e incluso entre poblaciones (Gutiérrez, 2018). Furtado et al. (2010) demostraron que los antivenenos botrópicos reconocen de manera cruzada distintos venenos amazónicos de *Bothrops*, aunque la magnitud del reconocimiento no es necesariamente la misma en todos los casos.

En este estudio, el antiveneno INS alcanzó títulos de 1:57 874 frente al veneno de *B. atrox* y de 1:70 007 frente al de *B. sanctaecrucis* e INLASA, por su parte, presentó títulos de 1:22 027 y 1:27 919, respectivamente. El hecho de que ambos productos reconozcan los dos venenos indica que existen determinantes antigénicos compartidos entre sus componentes proteicos, lo que coincide con trabajos previos que han mostrado una amplia reactividad cruzada dentro de las especies botrópicas. Rojas et al. (2005), al comparar antivenenos producidos en Perú y Costa Rica frente a varios venenos peruanos de *Bothrops*, observaron una extensa reactividad inmunológica cruzada incluso entre venenos de distinto origen geográfico. De forma similar, Estevao-Costa et al. (2016) demostraron que antivenenos polivalentes producidos en Perú y Brasil podían reconocer y neutralizar venenos de especies que no necesariamente formaban parte de las mezclas utilizadas durante la inmunización.

El reconocimiento de *B. sanctaecrucis* resulta especialmente interesante porque esta especie ha sido mucho menos estudiada desde el punto de vista inmunológico que *B. atrox*. En el caso del INS, la mezcla utilizada para la inmunización incluye venenos de *B. atrox, B. brazili, B. pictus, B. barnetti y Bothrocophias hyoprora*, pero no de *B. sanctaecrucis*. Es por ello que el título elevado obtenido frente a este último veneno constituye evidencia de reactividad cruzada frente a un antígeno heterólogo. Este reconocimiento cruzado indica que el veneno de *B. sanctaecrucis* comparte determinantes antigénicos con algunas de las especies utilizadas en la mezcla de

inmunización. Esto coincide con lo descrito para varias familias de toxinas del género *Bothrops*, como las SVMP, SVSP y PLA_2, cuyos componentes pueden ser reconocidos de manera cruzada entre especies. Sin embargo, la intensidad de este reconocimiento no es uniforme y puede variar de forma considerable entre familias proteicas e incluso entre toxinas individuales (Furtado et al., 2010; Sousa et al., 2013).

La variabilidad del reconocimiento inmunológico dentro de un mismo género ya ha sido demostrada en otros estudios. Furtado et al. (2010) encontraron diferencias tanto en la composición proteica como en el perfil de reconocimiento de dos poblaciones amazónicas de *B. atrox*, lo que demuestra que la variación antigénica puede presentarse incluso dentro de una misma especie. Más recientemente, Torrejón et al. (2026), al evaluar 24 venenos de Viperidae frente a antivenenos peruanos, observaron una amplia reactividad dentro de *Bothrops*, pero un menor reconocimiento frente a taxones más distantes, lo que evidencia que la cercanía taxonómica favorece la conservación de determinantes antigénicos.

El comportamiento de las miotoxinas frente al análisis ELISA fue distinto al observado con los venenos completos. El INS presentó un título de 1:44 733 frente a BaMtx y de 1:23 854 frente a BsMtx, mientras que INLASA alcanzó 1:32 022 y 1:17 766, respectivamente. Para ambos antivenenos, BsMtx presentó el título más bajo entre los cuatro antígenos evaluados. Esto no significa necesariamente que sea menos inmunogénica, ya que en este estudio no se analizó su capacidad para inducir una respuesta inmune, sino únicamente cuánto la reconocen los anticuerpos presentes en los antivenenos comerciales. Una posible explicación es que BsMtx presente diferencias antigénicas respecto de las PLA_2 u homólogas de PLA_2 presentes en los venenos empleados en el proceso de inmunización para producir ambos productos. Esta posibilidad resulta compatible con la elevada diversidad molecular descrita para las

fosfolipasas A_2 de venenos de serpientes, cuyos genes forman parte de familias multigénicas que han experimentado duplicación y diversificación, dando lugar a numerosas isoformas con diferencias de secuencia, estructura y función, además, la evolución de estas proteínas no sigue un patrón uniforme, sino que puede variar entre linajes y contextos ecológicos, permitiendo que proteínas de una misma familia conserven una arquitectura general semejante y, al mismo tiempo, difieran en regiones expuestas de su superficie (Lynch, 2007; Suranse et al., 2022). Estas diferencias moleculares pueden influir directamente en el reconocimiento por anticuerpos. Sousa et al. (2022), al caracterizar distintas PLA_2 de *B. atrox*, mostraron que incluso isoformas procedentes de una misma especie pueden presentar perfiles inmunológicos diferentes frente a antivenenos, lo que refleja que pertenecer a una misma familia proteica no garantiza un reconocimiento equivalente. De manera más específica, Lomonte (2012), mediante mapeo con péptidos sintéticos de la miotoxina II de *B. asper*, un homólogo Lys49-PLA_2, identificó varias regiones lineales de la secuencia capaces de ser reconocidas por anticuerpos. Este hallazgo muestra que la interacción inmunológica depende de regiones antigénicas concretas y que cambios en estas zonas podrían modificar el grado de reconocimiento. Desde una perspectiva evolutiva, esta posible divergencia antigénica de BsMtx también es coherente con la dinámica evolutiva de las PLA_2 de veneno. Estas proteínas han experimentado procesos de duplicación génica, diversificación funcional y distintos regímenes de selección, lo que ha favorecido la aparición de isoformas con propiedades particulares en diferentes linajes (Lynch, 2007; Suranse et al., 2022). En el caso de *B. sanctaecrucis*, al ser una especie endémica su historia evolutiva propia podría haber favorecido la acumulación de diferencias respecto de toxinas presentes en otras especies de *Bothrops*. Aun así, la distribución geográfica de la especie no basta para explicar el menor reconocimiento observado ni permite

afirmar que exista una pérdida evolutiva de epítopos. Para evaluar esta posibilidad sería necesario conocer la secuencia aminoacídica de BsMtx, compararla filogenética y estructuralmente con otras miotoxinas botrópicas y realizar estudios específicos de mapeo de epítopos.

La diferencia observada entre el reconocimiento del veneno completo y el de las miotoxinas purificadas es esperable, puesto que los antivenenos polivalentes, en general, se producen frente a mezclas complejas que contienen muchas familias proteicas y numerosas isoformas. Por ello, la gran cantidad de anticuerpos que se producen está dirigida contra una gran diversidad de epítopos, es por ello que cuando el ELISA utiliza una sola toxina como antígeno, únicamente una parte de esa población de anticuerpos puede reconocerla. BaMtx cuenta, además, con un antecedente directo. Proleón et al. (2022) demostraron que esta Lys49-PLA_2 es antigénica y que anticuerpos producidos específicamente contra ella pueden reconocer de manera cruzada venenos de *B. brazili y B. pictus*, reflejando así la existencia de cierto grado de conservación antigénica entre miotoxinas botrópicas. En ese contexto, en el presente estudio, el reconocimiento de BaMtx por ambos antivenenos comerciales es coherente con esa conservación. En cambio, el menor título frente a BsMtx podría relacionarse con diferencias en sus epítopos respecto de las proteínas presentes en las mezclas inmunizantes.

Por otro lado, resulta interesante la diferencia marcada entre el grado de reconocimiento e inhibición de las actividades bioquímicas de los venenos de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis* por los antivenenos empleados. En ese sentido la actividad proteolítica y la actividad hialuronidasa, mostraron porcentajes de neutralización muy bajos mientras que el grado de reconocimiento por los antivenenos mediante el ensayo ELISA fue alto. Esto demuestra que una señal elevada de ELISA no necesariamente se traduce en una inhibición proporcional de la función. Una posible explicación es que los anticuerpos se

unan a regiones de la toxina que no interfieren con el sitio catalítico, con la unión al sustrato o con otros dominios esenciales para su actividad biológica. Los estudios antivenómicos han mostrado que una proteína puede ser reconocida con alta intensidad sin que eso garantice una neutralización equivalente de su toxicidad. Estevao-Costa et al. (2016) realizaron ensayos donde combinó reactividad inmunológica con ensayos de neutralización y demostró que la neutralización cruzada depende de la capacidad de los anticuerpos para interferir funcionalmente con toxinas relevantes y no solo de su capacidad para unirse al veneno.

Al comparar los títulos obtenidos entre los antivenenos empleados, se observó que el antiveneno del INS tuvo mayor señal de reconocimiento que el INLASA para los cuatro antígenos evaluados. Sin embargo, a partir de esta información no se puede inferir que el antiveneno del INS tenga una eficacia terapéutica superior, puesto que ambos antivenenos difieren en las mezclas de inmunización utilizadas, en su formulación, concentración de inmunoglobulinas y procesos de producción. Además, el ELISA mide principalmente capacidad de unión frente al antígeno inmovilizado y para comparar eficacia entre antivenenos se requieren ensayos funcionales idealmente en modelo murino (Gutiérrez, 2018).

Los resultados de ELISA muestran, por tanto, que tanto INS como INLASA presentan una amplia reactividad frente a los dos venenos botrópicos estudiados, incluido *B. sanctaecrucis*, para el cual todavía existe poca información inmunológica. Al mismo tiempo, la menor reactividad frente a las miotoxinas, y en especial frente a BsMtx, deja claro que el reconocimiento de toxinas individuales puede diferir considerablemente del observado frente al veneno completo. La comparación con los ensayos de neutralización enzimática refuerza además una idea central: reconocimiento antigénico y neutralización funcional son fenómenos relacionados, pero no equivalentes.

En términos generales, *B. atrox* y *B. sanctaecrucis* mostraron diferencias en sus perfiles proteicos, actividades enzimáticas, respuesta frente a los antivenenos y capacidad miotóxica. La purificación y caracterización de BsMtx permitió identificar una fracción con una especie predominante de aproximadamente 13.77 kDa, baja actividad PLA_2 y marcada miotoxicidad, un perfil compatible con una miotoxina homóloga de PLA_2, aunque su identidad molecular todavía requiere confirmación mediante estudios de secuencia y estructura. El reconocimiento de ambos venenos y de sus miotoxinas por INS e INLASA confirmó la existencia de reactividad cruzada, mientras que la baja neutralización de algunas actividades dejó claro que la unión de anticuerpos no siempre se traduce en inhibición funcional. Estos hallazgos amplían la información disponible sobre *B. sanctaecrucis* y ofrecen una base para futuros estudios sobre la composición, función y neutralización de sus toxinas.

VIII. CONCLUSIONES

1. Los venenos de *Bothrops atrox* y *Bothrops sanctaecrucis* mostraron diferencias tanto en los patrones electroforéticos como en las actividades enzimáticas. Bajo las condiciones evaluadas, *B. sanctaecrucis* presentó mayor actividad proteolítica, mientras que *B. atrox* mostró mayores actividades amidolítica, fosfolipasa A_2 e hialuronidasa.

2. La neutralización de las actividades bioquímicas del veneno de *B. sanctaecrucis* por los antivenenos INS e INLASA fue reducida, siendo la actividad fosfolipasa A_2 donde se observó mayor neutralización, por el contrario, en las actividades proteolítica y hialuronidasa la neutralización fue mínima.

3. La cromatografía de intercambio catiónico permitió obtener las miotoxinas BaMtx y BsMtx. BsMtx presentó una masa molecular predominante cercana a 13.77 kDa, baja actividad fosfolipasa A_2 y marcada actividad miotóxica, un conjunto de características compatible con una miotoxina homóloga de PLA_2. Sin embargo, para determinar su identidad molecular definitiva son necesarios estudios adicionales de secuencia.

4. La actividad miotóxica mostró un comportamiento dependiente de la dosis. El veneno de *B. sanctaecrucis* produjo una mayor liberación de CK que *B. atrox* a 100 µg, mientras que BsMtx superó a BaMtx a 25 y 75 µg. Además, la baja actividad PLA_2 de BsMtx junto con su marcada miotoxicidad confirma que ambas propiedades no necesariamente siguen una relación directa.

5. Los antivenenos INS e INLASA reconocieron los venenos de *B. atrox* y *B. sanctaecrucis*, y sus respectivas miotoxinas: BaMtx y BsMtx, lo que evidencia reactividad inmunológica cruzada frente a los antígenos evaluados. No obstante, BsMtx presentó el menor título de reconocimiento con ambos productos.

IX. RECOMENDACIONES

1. Realizar la caracterización molecular de BsMtx mediante secuenciación de aminoácidos para confirmar su identidad y determinar el residuo presente en la posición 49 y así establecer si corresponde a una Asp49-PLA_2 o Lys49-PLA_2.

2. Complementar el estudio de BsMtx con técnicas adicionales de evaluación de pureza y estructura, como RP-HPLC y espectrometría de masas de alta resolución. Esto permitiría esclarecer el origen de la banda adicional observada en SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y determinar si corresponde a heterogeneidad residual, oligomerización o a la presencia de otra especie proteica.

3. Evaluar mediante ensayos biológicos en modelo murino la neutralización de la actividad miotóxica de BaMtx y BsMtx por los antivenenos INS e INLASA, ya que el reconocimiento observado mediante ELISA no permite establecer por sí solo si estos antivenenos son capaces de prevenir el daño muscular inducido por ambas toxinas.

4. Ampliar los ensayos de neutralización de las actividades enzimáticas utilizando distintas relaciones veneno-antiveneno y diseños que permitan estimar parámetros de potencia o dosis efectiva. Esto ayudaría a caracterizar con mayor precisión la capacidad neutralizante de INS e INLASA y facilitaría la comparación con otros estudios preclínicos.

5. Realizar estudios con un mayor número de muestras de *Bothrops sanctaecrucis* procedentes de distintas localidades, edades y sexos, con el fin de evaluar la variabilidad intraespecífica de su veneno y determinar si las características bioquímicas, miotóxicas e inmunológicas observadas en este trabajo son representativas de la especie.

X. REFERENCIAS

Afroz, A., Siddiquea, B. N., Chowdhury, H. A., Jackson, T. N., & Watt, A. D. (2024). Snakebite envenoming: A systematic review and meta-analysis of global morbidity and mortality. PLoS Neglected Tropical Diseases, 18(4), e0012080. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012080

Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M., & Calvete, J. J. (2008). Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations. Journal Of Proteome Research, 7(8), 3556-3571. https://doi.org/10.1021/pr800332p

Allore, R. J., & Barber, B. H. (1984). A recommendation for visualizing disulfide bonding by one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Analytical Biochemistry, 137(2), 523–527. https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90121-0

Alzamora, L., Colona, E., & Vizcarra, M. (2002). Manual de prácticas de inmunoserología. Primera edición. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas.

Angelo, J. M., & Lenhoff, A. M. (2016). Determinants of protein elution rates from preparative ion-exchange adsorbents. Journal of Chromatography A, 1440, 94–104. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.048

Beghini, D. G., Toyama, M. H., Hyslop, S., Sodek, L., Novello, J. C., & Marangoni, S. (2000). Enzymatic characterization of a novel phospholipase A_2 from *Crotalus durissus* cascavella rattlesnake (maracambóia) venom. Journal of Protein Chemistry, 19, 603–607. https://doi.org/10.1023/A:1007123329817

Bocian, A., Sławek, S., Jaromin, M., Hus, K. K., Buczkowicz, J., Łysiak, D., Petrílla, V., Petrillova, M., & Legáth, J. (2020). Comparison of methods for measuring protein concentration in venom samples. Animals, 10(3), 448. https://doi.org/10.3390/ani10030448

Boquet, P. (1979). History of snake venom research. Handbook of Experimental Pharmacology (pp.3-14). https://doi.org/10.1007/978-3-642-66913-2_1

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72(1–2), 248–254. https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999

Calvete, J. J. (2013). Snake venomics: From the inventory of toxins to biology. Toxicon, 75, 44-62. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.03.020

Calvete, J. J. (2017). Venomics: integrative venom proteomics and beyond. Biochemical Journal, 474(5), 611-634. https://doi.org/10.1042/bcj20160577

Calvete, J. J., Sanz, L., Pérez, A., Borges, A., Vargas, A. M., Lomonte, B., Angulo, Y., Gutiérrez, J. M., Chalkidis, H. M., Mourão, R. H., Furtado, M. F. D., & Moura-Da-Silva, A. M. (2011). Snake population venomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. Journal Of Proteomics, 74(4), 510-527. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.01.003

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

Casewell, N. R., Jackson, T. N. W., Laustsen, A. H., & Sunagar, K. (2020). Causes and consequences of snake venom variation. Trends in Pharmacological Sciences, 41(8), 570–581. https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.05.006

Chippaux, J. (2017a). Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. PLoS Neglected Tropical Diseases, 11(6), e0005662. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005662

Chippaux, J. P. (2017b). Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 23, 38. https://doi.org/10.1186/s40409-017-0127-6

Cintra, A. C. O., Marangoni, S., Oliveira, B., & Giglio, J. R. (1993). Bothropstoxin-I: Amino acid sequence and function. Journal Of Protein Chemistry, 12(1), 57-64. https://doi.org/10.1007/bf01024915

Cytiva. (2021). Ion exchange chromatography: Principles and methods (Handbook). Cytiva Life Sciences.

De França, F. S., & Tambourgi, D. V. (2023). Hyaluronan breakdown by snake venom hyaluronidases: From toxins delivery to immunopathology. Frontiers In Immunology, 14, 1125899. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1125899

De Godoy, T. A., De Lima, E. o. V., Silveira, G. P. M., Rodrigues, F. S., Sant'anna, S. S., Hatakeyama, D. M., Grego, K. F., & Tanaka-Azevedo, A. M. (2024). Analysis of the genus *Bothrops* snake venom: An inter and intraspecific comparative study. Heliyon, 10(17), e37262. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e37262

Di Ferrante, N. (1956). Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. Journal of Biological Chemistry, 220(1), 303–306. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)65354-2

Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry, 8(9), 871–874. 10.1016/0019-2791(71)90454-X

Erlanger, B. F., Kokowsky, N., & Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archives of Biochemistry and Biophysics, 95, 271–278. https://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90145-x

Escalante, T., Rucavado, A., Fox, J. W., & Gutiérrez, J. M. (2011). Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. Journal of Proteomics, 74(9), 1781–1794. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.03.026

Estevao-Costa, M. I., Gontijo, S. S., Correia, B. L., Yarleque, A., Vivas-Ruiz, D., Rodrigues, E., Chávez-Olórtegui, C., Oliveira, L. S., & 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. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.09.010

Freitas-De-Sousa, L. A., Colombini, M., Souza, V. C., Silva, J. P. C., Mota-Da-Silva, A., Almeida, M. R. N., Machado, R. A., Fonseca, W. L., Sartim, M. A., Sachett, J., Serrano, S. M. T., Junqueira-De-Azevedo, I. L. M., Grazziotin, F. G., Monteiro, W. M., Bernarde, P. S., & Moura-Da-Silva, A. M. (2024). Venom composition of neglected bothropoid snakes from the Amazon rainforest: Ecological and

toxinological implications. Toxins, 16(2), 83. https://doi.org/10.3390/toxins16020083

French, S., Da Silva, R., Have, M. T., Crittenden, E., Rowley, P., Cullen, I. C., Holland, Z., Wilkinson, M. C., & Modahl, C. M. (2026). Quantifying venom in African snakes: Insights into protein content, yield and body size associations. Toxicon X, 30, 100245. https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2026.100245

Furtado, M. F. D., Cardoso, S. T., Soares, O. E., Pereira, A. P., Fernandes, D. S., Tambourgi, D. V., & Sant'Anna, O. A. (2010). Antigenic cross-reactivity and immunogenicity of *Bothrops* venoms from snakes of the Amazon region. Toxicon, 55(4), 881–887. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.12.014

Gomes, A. A. S., Cardoso, F. F., Souza, M. F., Oliveira, C. L. P., Perahia, D., Magro, A. J., & Fontes, M. R. M. (2020). The allosteric activation mechanism of a phospholipase A_2-like toxin from *Bothrops jararacuss*u venom: a dynamic description. Scientific Reports, 10(1), 16252. https://doi.org/10.1038/s41598-020-73134-9

Gomes, M. S. R., Naves de Souza, D. L., Guimarães, D. O., Lopes, D. S., Mamede, C. C., Gimenes, S. N. C., & Rodrigues, V. M. (2015). Biochemical and functional characterization of Bothropoidin: The first haemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops pauloensis* snake venom. Journal of Biochemistry, 157(3), 137–149. https://doi.org/10.1093/jb/mvu058

Guerra-Duarte, C., De Sousa, V. P., De Oliveira-Sousa, G., & Mol, M. P. G. (2025). Use of snake antivenom in the Region of the Americas: a systematic review. Bulletin Of The World Health Organization, 103(12), 785-798. https://doi.org/10.2471/blt.24.291941

Gutiérrez, J. M. (2011). Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional. Boletín de Malariología y Salud Ambiental, 51(1), 1–16. https://hdl.handle.net/10669/29555

Gutiérrez, J. M. (2018). Preclinical assessment of the neutralizing efficacy of snake antivenoms in Latin America and the Caribbean: A review. Toxicon, 146, 138–150. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.02.053

Gutiérrez, J. M., & Lomonte, B. (2012). Phospholipases A_2: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. Toxicon, 62, 27-39. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.006

Gutiérrez, J. M., Arroyo, O., & Bolaños, R. (1980). Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. Toxicon, 18(5–6), 603–610. https://doi.org/10.1016/0041-0101(80)90087-2

Gutiérrez, J. M., Calvete, J. J., Habib, A. G., Harrison, R. A., Williams, D. J., & Warrell, D. A. (2017). Snakebite envenoming. Nature Reviews Disease Primers, 3, 17063. https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.63

Gutiérrez, J. M., Escalante, T., Rucavado, A., Herrera, C., & Fox, J. W. (2016). A comprehensive view of the structural and functional alterations of extracellular matrix by snake venom metalloproteinases (SVMPs): Novel perspectives on the pathophysiology of envenoming. Toxins, 8(10), 304. https://doi.org/10.3390/toxins8100304

Gutiérrez, J., Ownby, C. L., & Odell, G. V. (1984). Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of Bothrops asper. Experimental And Molecular Pathology, 40(3), 367-379. https://doi.org/10.1016/0014-4800(84)90054-6

Harvey, M. B., Aparicio, J., & Gonzales, L. (2005). Revision of the venomous snakes of Bolivia. II: The pitvipers (Serpentes: Viperidae). Annals of Carnegie Museum, 74(1), 1–37. https://doi.org/10.2992/0097-4463(2005)74[1:ROTVSO]2.0.CO;2

Huatuco, S., Escobar, E., & Yarlequé, A. (2004). Aislamiento y caracterización parcial de una miotoxina del veneno de la serpiente Bothrops atrox (Ophidia: Viperidae). Revista Peruana de Biología, 11(1), 79–86. https://doi.org/10.15381/rpb.v11i1.2436

Iliyasu, G., Dayyab, F. M., Michael, G. C., Hamza, M., Habib, M. A., Gutiérrez, J. M., & Habib, A. G. (2023). Case fatality rate and burden of snakebite envenoming in children – A systematic review and meta-analysis. Toxicon, 234, 107299. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2023.107299

Kang, T. S., Georgieva, D., Genov, N., Murakami, M. T., Sinha, M., Kumar, R. P., Kaur, P., Kumar, S., Dey, S., Sharma, S., Vrielink, A., Betzel, C., Takeda, S.,

Arni, R. K., Singh, T. P., & Kini, R. M. (2011). Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. FEBS Journal, 278(23), 4544-4576. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08115.x

Kemparaju, K., & Girish, K. S. (2005). Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. Cell Biochemistry And Function, 24(1), 7-12. https://doi.org/10.1002/cbf.1261

Khan, S. A., & Ilies, M. A. (2023). The Phospholipase A_2 Superfamily: Structure, Isozymes, Catalysis, Physiologic and Pathologic Roles. International Journal Of Molecular Sciences, 24(2), 1353. https://doi.org/10.3390/ijms24021353

Kohlhoff, M., Borges, M. H., Yarlequé, 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. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.01.020

Kuniyoshi, A. K., Kodama, R. T., Moraes, L. H. F., Duzzi, B., Iwai, L. K., Lima, I. F., Cajado-Carvalho, D., & Portaro, F. V. (2017). In vitro cleavage of bioactive peptides by peptidases from *Bothrops jararaca* venom and its neutralization by bothropic antivenom produced by Butantan Institute: Major contribution of serine peptidases. Toxicon, 137, 114–119. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.07.020

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227(5259), 680–685. https://doi.org/10.1038/227680a0

Lazo, F., Rodríguez, E., & Yarlequé, A. (1998). Evaluación comparativa de dos métodos para determinar la actividad de fosfolipasa A en venenos de serpientes. Revista Peruana de Biología, 5(2), 098-102. https://doi.org/10.15381/rpb.v5i2.8325

Lima, D. C. A., Santos, V. F. D., Rassi, B., Ward, R. J., & Soares, T. A. (2026). The many dimeric faces of Lys49 PLA_2 -like proteins: Conformational plasticity and membrane binding drive functional dimer states. Protein Science, 35(2), e70449. https://doi.org/10.1002/pro.70449

Lobo-López, K., Martínez, M. E., Gritti, M. A., & Peichoto, M. E. (2025). Biochemical characterization of the venom of the Bolivian endemic pit viper Bothrops

sanctaecrucis. Toxicon X, 25, 100216. https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2025.100216

Lomonte, B. (2012). Identification of linear B-cell epitopes on myotoxin II, a Lys49 phospholipase A_2 homologue from *Bothrops asper* snake venom. Toxicon, 60(5), 782–790. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.05.028

Lomonte, B., & Gutiérrez, J. (1989). A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). Toxicon, 27(7), 725-733. https://doi.org/10.1016/0041-0101(89)90039-1

Lomonte, B., & Gutiérrez, J. M. (2011). Phospholipases A_2 from viperidae snake venoms: how do they induce skeletal muscle damage?. Acta Chim. Slov, 58, 647-659.

Lomonte, B., & Rangel, J. (2012). Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A_2 to non-enzymatic membrane disruptors. Toxicon, 60(4), 520–530. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.02.007

Lynch, V. J. (2007). Inventing an arsenal: Adaptive evolution and neofunctionalization of snake venom phospholipase A_2 genes. BMC Evolutionary Biology, 7, 2. https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-2

Málaga, O., Pantigoso, C., Morante, Y., Heredia, V., Cárdenas, J., & Yarlequé, A. (2014). Variaciones en la composición proteica, actividades enzimáticas y biológicas del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (vipereidae) en relación con la edad. Revista Peruana de Biología, 7(2), 161-170. https://doi.org/10.15381/rpb.v7i2.6820

Matsui, T., Fujimura, Y., & Titani, K. (2000). Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. Biochimica et Biophysica Acta, 1477(1–2), 146–156. https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00268-X

Matsui, T., Kamata, S., Ishii, K., Maruno, T., Ghanem, N., Uchiyama, S., Kato, K., Suzuki, A., Oda-Ueda, N., Ogawa, T., & Tanaka, Y. (2019). SDS-induced oligomerization of Lys49-phospholipase A2 from snake venom. Scientific Reports, 9(1), 2330. https://doi.org/10.1038/s41598-019-38861-8

Milne, J.J. (2023). Scale-Up of Protein Purification: Downstream Processing Issues. Methods in Molecular Biology (Vol. 2699, pp.61-75) https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3362-5_5

Monteiro, W. M., Contreras-Bernal, J. C., Bisneto, P. F., Sachett, J., Da Silva, I. M., Lacerda, M., Da Costa, A. G., Val, F., Brasileiro, L., Sartim, M. A., Silva-De-Oliveira, S., Bernarde, P. S., Kaefer, I. L., Grazziotin, F. G., Wen, F. H., & Moura-Da-Silva, A. M. (2020). *Bothrops atrox*, the most important snake involved in human envenomings in the amazon: How venomics contributes to the knowledge of snake biology and clinical toxinology. Toxicon X, 6, 100037. https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2020.100037

Mora-Obando, D., Fernández, J., Montecucco, C., Gutiérrez, J. M., & Lomonte, B. (2014). Synergism between Basic Asp49 and Lys49 Phospholipase A2 Myotoxins of Viperid Snake Venom In Vitro and In Vivo. PLoS ONE, 9(10), e109846. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109846

Murillo, P. G., Martín, I. A., & Antón, P. G. (2020). Registro adicional de *Bothrops sanctaecrucis* (Serpentes: Viperidae) en la provincia Chapare, Bolivia. Boletín de la Asociación Herpetológica Española, 31(1), 59–61.

Noble, J. E., & Bailey, M. J. (2009). Quantitation of protein. Methods in enzymology, 463, 73-95.

Núñez, V., Arce, V., Gutiérrez, J. M., & Lomonte, B. (2004). Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A_2 homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*. Toxicon, 44(1), 91–101. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.04.013

Oliveira, A. L., Viegas, M. F., Da Silva, S. L., Soares, A. M., Ramos, M. J., & Fernandes, P. A. (2022). The chemistry of snake venom and its medicinal potential. Nature Reviews Chemistry, 6(7), 451–469. https://doi.org/10.1038/s41570-022-00393-7

Organización Mundial de la Salud. (2023). Snakebite envenoming. World Health Organization. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming

Ortiz, C., Lazo, F., Bellido, C., Gonzales, E., & Yarlequé, A. (2012). Variación de la actividad enzimática del veneno de *Bothrops atrox* 'jergón' de tres regiones geográficas del Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, 29(2), 198–205. https://doi.org/10.17843/rpmesp.2012.292.341

Ownby, C. L., Selistre de Araujo, H. S., White, S. P., & Fletcher, J. E. (1999). Lysine 49 phospholipase A2 proteins. Toxicon, 37(3), 411–445. https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00188-3

Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., & Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. Protein Science, 4(11), 2411–2423. https://doi.org/10.1002/pro.5560041120

Pantigoso, C., Escobar, E., & Yarlequé, A. (2001). Aislamiento y caracterización de una miotoxina del veneno de la serpiente *Bothrops brazili* Hoge, 1953 (Ophidia: Viperidae). Revista Peruana de Biología, 8(2), 136-148. https://doi.org/10.15381/rpb.v8i2.6716

Proleón, A., Torrejón, D., Urra, F. A., Lazo, F., López-Torres, C., Fuentes-Retamal, S., Quispe, E., Bautista, L., Agurto, A., Gavilan, R. G., Sandoval, G. A., Rodríguez, E., Sánchez, E. F., Yarlequé, A., & Vivas-Ruiz, D. E. (2022). Functional, immunological characterization, and anticancer activity of BaMtx: A new Lys49-PLA_2 homologue isolated from the venom of Peruvian *Bothrops atrox* snake (Serpentes: Viperidae). International Journal of Biological Macromolecules, 206, 990–1002. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.111

Quispe, E., Torrejón, D., Bautista, L., Sandoval, G., Rodríguez, E., Lazo, F., Vivas-Ruiz, D. E., & 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. https://doi.org/10.37761/rsqp.v85i4.263

Rojas, E., Quesada, L., Arce, V., Lomonte, B., Rojas, G., & Gutiérrez, 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. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.09.008

Romanazzi, M., Filardi, E. T. M., Pires, G. M. M., Cerveja, M. F., Melo-Dos-Santos, G., Oliveira, I. S., Ferreira, I. G., Cerni, F. A., Santos-Filho, N. A., Monteiro, W. M.,

Almeida, J. R., Vaiyapuri, S., & Pucca, M. B. (2025). The Versatility of Serine Proteases from Brazilian Bothrops Venom: Their Roles in Snakebites and Drug Discovery. Biomolecules, 15(2), 154. https://doi.org/10.3390/biom15020154

Saldarriaga, M. M., Otero, R., Núñez, V., Toro, M. F., Díaz, A., & Gutiérrez, J. M. (2003). Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. Toxicon, 42(4), 405–411. https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00171-5

Serrano, S. M. T., & Maroun, R. C. (2005). Snake venom serine proteinases: Sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. Toxicon, 45(8), 1115–1132. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.020

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical Biochemistry, 150(1), 76–85. https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7

Soares, A., Rodrigues, V., Homsi-Brandeburgo, M., Toyama, M., Lombardi, Arni, R., & Giglio, J. (1998). A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: Biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. Toxicon, 36(3), 503-514. https://doi.org/10.1016/s0041-0101(97)00133-5

Sousa, L. F., Freitas, A. P., Cardoso, B. L., Del-Rei, T. H. M., Mendes, V. A., Oréfice, D. P., Rocha, M. M. T., Prezoto, B. C., & Moura-Da-Silva, A. M. (2022). Diversity of Phospholipases A2 from *Bothrops atrox* Snake Venom: Adaptive Advantages for Snakes Compromising Treatments for Snakebite Patients. Toxins, 14(8), 543. https://doi.org/10.3390/toxins14080543

Sousa, L. F., Holding, M. L., Del-Rei, T. H. M., Rocha, M. M. T., Mourão, R. H. V., Chalkidis, H. M., Prezoto, B., Gibbs, H. L., & Moura-Da-Silva, A. M. (2021). Individual Variability in *Bothrops atrox* Snakes Collected from Different Habitats in the Brazilian Amazon: New Findings on Venom Composition and Functionality. Toxins, 13(11), 814. https://doi.org/10.3390/toxins13110814

Sousa, L. F., Nicolau, C. A., Peixoto, P. S., Bernardoni, J. L., Oliveira, S. S., Portes-Junior, J. A., Mourão, R. H. V., Lima-dos-Santos, I., Sano-Martins, I. S., Chalkidis, H. M., Valente, R. H., & Moura-da-Silva, A. M. (2013). Comparison

of phylogeny, venom composition and neutralization by antivenom in diverse species of Bothrops complex. PLoS Neglected Tropical Diseases, 7(9), e2442. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002442

Suranse, V., Jackson, T. N. W., & Sunagar, K. (2022). Contextual constraints: Dynamic evolution of snake venom phospholipase A2. Toxins, 14(6), 420. https://doi.org/10.3390/toxins14060420

Takahashi, T., & Ohsaka, A. (1970). Purification and characterization of a proteinase in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*: Complete separation of the enzyme from hemorrhagic activity. Biochimica et Biophysica Acta, 198(2), 293–307. https://doi.org/10.1016/0005-2744(70)90062-8

Tasoulis, T., & Isbister, G. (2017). A Review and Database of Snake Venom Proteomes. Toxins, 9(9), 290. https://doi.org/10.3390/toxins9090290

Torrejón, D., Llontop, A., Proleón, A., Lazo, F., Urra, F. A., Yarlequé, A., & Vivas-Ruiz, D. E. (2026). Functional and immunological variability of Viperid venoms across continents and cross-neutralization by Peruvian antivenoms. Biochimie, 240, 88–99. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2025.10.013

Uetz, P., Freed, P., & Hošek, J. (Eds.). (2026). The Reptile Database. http://www.reptile-database.org

Vivas-Ruiz, D. E., Gonzalez-Kozlova, E. E., Delgadillo, J., Palermo, P. M., Sandoval, G. A., Lazo, F., Rodríguez, E., Chávez-Olórtegui, C., Yarlequé, A., & Sanchez, E. F. (2019). Biochemical and molecular characterization of the hyaluronidase from *Bothrops atrox* Peruvian snake venom. Biochimie, 162, 33-45. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.03.022

Yarlequé, M., Ortiz, C., Morante, Y., & Yarlequé., A. (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.

Zeballos, J., Escobar, E., & Yarlequé, A. (1999). Aislamiento y algunas propiedades de una fosfolipasa del veneno de la serpiente *Bothrops brazili*. Boletín de la Sociedad Química del Perú, 65(1), 1-9. https://hdl.handle.net/20.500.14330/PER01000158201