

**COMPARACIÓN DEL PERFIL PROTEICO DE VENENOS DE
SERPIENTES DE LOS GÉNEROS *BOTHROPS*, *BOTHROCOPHIAS* Y
CROTALUS PROVENIENTES DEL VALLE DEL CAUCA COLOMBIA
(FUNDACIÓN ZOOLOGICO DE CALI) MEDIANTE EL USO DE
CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA HPLC Y
ELECTROFORESIS.**

Stefano Miguel Scovino Loboguerrero.

Universidad El Bosque

Facultad de Ciencias

Programa de Biología

Bogotá, D.C

2017

**COMPARACIÓN DEL PERFIL PROTEICO DE VENENOS DE
SERPIENTES DE LOS GÉNEROS *BOTHROPS*, *BOTHROCOPHIAS* Y
CROTALUS PROVENIENTES DEL VALLE DEL CAUCA COLOMBIA
(FUNDACIÓN ZOOLOGICO DE CALI) MEDIANTE EL USO DE
CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA HPLC Y
ELECTROFORESIS.**

Stefano Miguel Scovino Loboguerrero.

Directora:

M.Sc Ana Lucía Castiblanco Rodríguez

Universidad Nacional de Colombia

Instituto de Biotecnología

Coodirectora:

M.Sc Silvia Bustamante

Universidad Nacional de Colombia

Instituto de Biotecnología

Universidad El Bosque

Facultad de Ciencias

Programa de Biología

Bogotá, D.C

2017

**COMPARACIÓN DEL PERFIL PROTEICO DE VENENOS DE SERPIENTES DE
LOS GÉNEROS *BOTHROPS*, *BOTHROCOPHIAS* Y *CROTALUS* PROVENIENTES
DEL VALLE DEL CAUCA COLOMBIA (FUNDACIÓN ZOOLOGICO DE CALI)
MEDIANTE EL USO DE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA
HPLC Y ELECTROFORESIS.**

Stefano Miguel Scovino Loboguerrero.

APROBADO:

Ana Lucía Castiblanco Rodríguez
Directora del Trabajo de Grado

Silvia Bustamante Rodríguez
Codirectora del Trabajo de Grado

JURADO:

Jurado 1

JURADO:

Jurado 2

JURADO:

Jurado 3

Nota de Salvedad

"La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, sólo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia".

Agradecimientos

Primero quiero agradecer a mis papás por apoyarme en este camino y por todo el esfuerzo que han hecho por 25 años gracias a ustedes soy quien la persona que soy ahora y he llegado a cumplir esta meta. Segundo a mis familiares tíos, primos y a mi hermano por estar ahí siempre apoyándome en todo lo que hago. A mi directora y codirectora por darme la oportunidad de trabajar en el instituto de biotecnología de la Universidad Nacional, por siempre mostrarme que podía dar más de mí, aprender y mejorar día a día en lo que estaba haciendo, a todos los funcionarios del Instituto de Biotecnología que de alguna manera me ayudaron en la realización de este trabajo.

Al Doctor Carlos Galvis y a la Fundación zoológico de Cali por brindar los venenos de las especies de estudio de este trabajo, Luis Albero Gómez por el apoyo y sugerencias a lo largo de toda la carrera y durante la elaboración d este trabajo, y por último pero no menos importantes a mis amigos Wendy Fajardo, Erika Ángel, Julieth Gallego, Natalia Jiménez, Carolina Benavides, Jerson Cárdenas y Jesús Beltrán por su ayuda y sugerencias durante la elaboración de mi trabajo de grado y por estar en las buenas y malas para apoyarme.

Tabla de contenido

1. Introducción	1
2. Marco Conceptual.....	3
2.1 Antecedentes	3
2.2 Estudio de las proteínas obtenidas de sistemas biológicos.	7
2.3 Cromatografía de proteínas.....	8
2.4 Electroforesis de proteínas.	9
2.5 Cuantificación de proteínas.....	13
2.5.1 Cuantificación de proteínas por Nanodrop®.....	14
2.5.2 Método de Bradford.	14
2.5.3 Método de Lowry.....	15
2.6 Función de la proteína dependiendo de su secuencia y estructura.....	15
2.7 Estructura de las proteínas.....	16
2.8 Propiedades de las proteínas.	18
2.9 Serpientes y venenos.	19
2.10 Sueros antiofídicos.....	21
3. Justificación.....	27
4. Pregunta de Investigación	30
5. Objetivos.	31
5.1 Objetivo General.....	31
5.2 Objetivos Específicos	31
6. Métodos.	32
6.1 Origen de los venenos.	32
6.2 Cuantificación contenido proteico.....	32
6.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida	34
6.4 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	36
7. Resultados y Análisis.....	38

<i>7.1.1 Cuantificación contenido proteico mediante Nanodrop®</i>	38
<i>7.1.2 Método de Bradford</i>	39
<i>7.1.3 Método de Lowry</i>	40
<i>7.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida y Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)</i>	42
8 Conclusiones	68
9 Recomendaciones	68
10. Referencias Bibliográficas	69

Resumen

Los venenos de las serpientes son las secreciones más ricas en enzimas y toxinas presentes en la naturaleza, estos son una mezcla de moléculas tanto orgánicas como inorgánicas, tienen una composición y actividades enzimáticas variables, lo que hace que existan diferencias en los efectos locales y sistémicos causados por el envenenamiento no sólo entre distintas especies de la misma familia, sino también diferencias intraespecíficas entre poblaciones de distintas zonas geográficas, por esto se requiere un tratamiento clínico diferente para cada caso. En el caso de las serpientes de la familia *Viperidae*, en la cual se agrupan los géneros *Bothrops*, *Bothrocophias* y *Crotalus*, las proteínas son las moléculas más estudiadas no sólo por su gran abundancia en el veneno sino también por su alta diversidad en acciones biológicas en el rol que cumplen en el caso de un envenenamiento, estos no sólo son los venenos más complejos, en comparación con los de los venenos de otras familias, sino también contienen las proteínas de mayor peso molecular.

En este trabajo se buscaba comparar los perfiles proteicos de venenos de serpientes de los géneros *Bothrops*, *Bothrocophias* y *Crotalus*, lo cual se llevó a cabo, inicialmente mediante la cuantificación del contenido proteico de los venenos mediante espectrofotometría por los métodos de Bradford, Lowry y una medición directa por Nanodrop®, seguido del análisis de los perfiles proteicos de los venenos por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), utilizando una columna Lichosper 100 RP c18 de dimensiones 250X4 mm y poro de 5µm, y por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS PAGE) para estimar el peso molecular de algunas proteínas observadas en este último método.

Se observó que el veneno de los géneros *Bothrocophias* y *Crotalus* es el que presenta mayor porcentaje de proteína, mientras que la caracterización de los perfiles proteicos mediante cromatografía y electroforesis evidenciaron que las proteínas más representativas

de los venenos de las serpientes pertenecientes a los tres géneros estudiados presentan pesos moleculares de 15 20 y 50KDa, y también se encuentran proteínas altamente polares separadas en los minutos 1.7 y 2.6 y una proteína medianamente polar en el minuto 35 de los cromatogramas.

Abstract

Snake venoms are the richest secretions in enzymes and toxins present in nature, these are a mixture of both organic and inorganic molecules, they have a varying composition and enzymatic activities, which means that there are differences in local and systemic effects caused by poisoning not only among different species of the same family, but also intraspecific differences between populations of different geographical areas, for that reason a different clinical treatment is required for each case. In the snake venom of the *viperidae* family, in which the *Bothrops*, *Bothrocophias* and *Crotalus* genera are grouped together, proteins are the most studied molecules not only for their great abundance in the venom but also for their high diversity in biological actions in the role they play in the case of a poisoning, these are not only the most complex poisons, compared to the poisons of other families, but also contain the higher molecular weight proteins.

In this work, we sought to compare the protein profiles of venom of snakes of the *Bothrops*, *Bothrocophias* and *Crotalus* genera, which was initially carried out by quantification of the protein content of the venoms by spectrophotometry by Bradford, Lowry and a direct measurement by Nanodrop®, followed by the analysis of venom protein profiles by high performance liquid chromatography (HPLC), using a Lichosper 100 RP c18 column of dimensions 250X4 mm and 5µm pore and by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE) to estimate the molecular weight of some proteins observed in the latter method.

It was observed that the venom of *Bothrocophias sp* and *Crotalus sp* present the highest percentage of protein, whereas the characterization of the protein profiles by

chromatography and electrophoresis showed that the most representative proteins of the venoms of the snakes belonging to the three genera studied have molecular weights of 15 20 and 50KDa, and there are also highly polar proteins separated at minutes 1.7 and 2.6 and a medium polar protein at 35 minutes of the chromatograms.

1. Introducción

Los venenos de las serpientes son las secreciones más ricas en enzimas y toxinas presentes en la naturaleza, y están compuestos por una mezcla de moléculas tanto orgánicas como inorgánicas. En Colombia se encuentran 8 familias de serpientes de las cuales 2 de ellas comprenden especies venenosas. Una de estas es la familia *Viperidae* que comprende las víboras con aparato venenífero mejor desarrollado, responsables del mayor número de accidentes, conteniendo dos subfamilias *Viperinae* y *Crotalinae*. En éstas últimas (víboras con fosa termoreceptora distribuidas en América), se agrupan las víboras de Colombia en tres géneros, *Bothrops*, *Bothrocophias* y *Crotalus*. (Rodríguez & Varela, 2014). Los venenos de las serpientes presentan una composición y actividades enzimáticas variables, existiendo así diferentes efectos locales y sistémicos no sólo entre distintas especies de la misma familia, sino también diferencias intraespecíficas entre poblaciones de distintas zonas geográficas, por esto se requiere un tratamiento clínico diferente para cada caso.

En el caso de las serpientes vipéridas, las proteínas son las moléculas más estudiadas no sólo por su gran abundancia en el veneno sino también por su alta diversidad en acciones biológicas en el rol que cumplen en el caso de un envenenamiento. (Mendoza, Vivas, Inga, Arbaiza, & Rodríguez, 2009). Clínicamente, los efectos causados por la mordedura de serpientes venenosas, se clasifican en sistémicos y locales, los envenenamientos por mordeduras de serpientes de la familia *Viperidae*, subfamilia *Crotalinae* son caracterizados por prominentes alteraciones a nivel local; incluyendo hemorragia, edema y necrosis, efectos que pueden resultar en secuelas permanentes, desarrollándose muy rápidamente

después del envenenamiento. Estos no sólo son los venenos más complejos, en comparación con los de los venenos de otras familias, sino también contienen las proteínas de mayor peso molecular (Pirela de Salas, López Jonsthor, & Hernández Rangel, 2006).

Hasta la fecha se reconoce sólo al antiveneno ofídico como el único tratamiento válido clínica y científicamente comprobado contra las mordeduras de serpientes, haciendo que su producción sea llevada a cabo bajo los más rigurosos estándares de calidad. (Mendoza, Vivas, Inga, Arbaiza, & Rodríguez, 2009). Por esta razón es fundamental el estudio de la composición de los venenos de serpiente, partiendo de los análisis cuantitativos, como la caracterización mediante electroforesis y cromatografía del contenido proteico a la par de los estudios de actividades enzimáticas y actividades biológicas en especial para aquellos venenos que son considerados en la producción de sueros antiofídicos o antivenenos ofídicos.

2. Marco Conceptual

2.1 Antecedentes

Los venenos de las serpientes son una mezcla compleja de péptidos, enzimas, azúcares, lípidos, trazas de algunos cationes y proteínas cuya función aún se desconoce. (Markland, 1998) La mayoría de estudios a lo largo del tiempo se han enfocado en describir la actividad enzimática de los componentes de los venenos en especial las proteínas cuya función es fosfolipasa y muy pocos estudios han hecho una descripción completa de la composición proteica de los venenos.

Los primeros esfuerzos científicos en el tema de los venenos de serpientes en América Latina se desarrollaron en Brasil, gracias al trabajo de J.B. de Lacerda y Vital Brazil, hacia fines del siglo XIX y principios del XX Vital Brazil fue un auténtico pionero, ya que a su interés científico por este tema se unió una enorme capacidad de gestión tecnológica que lo llevó a producir los primeros antivenenos (o sueros antiofídicos) en América, pocos años después de la invención de la seroterapia antiofídica en Francia, Vital Brazil describió las actividades fisiopatológicas de los venenos de las principales serpientes brasileñas y demostró claramente la necesidad de producir antivenenos específicos para Sudamérica y posteriormente sentó las bases de la producción en gran escala de los sueros antiofídicos. (Gutiérrez J. , 2002)

Hacia 1970 los principales estudios se enfocaban en la caracterización y separación de las enzimas similares a trombina, un ejemplo de trabajos referentes a este tema son los mencionados por (Aragón Ortiz & GUBENSEK , 1978), que fueron llevados a cabo por Collins y Jones, 1972, Stocker y Barlow, 1973, Markland y Damus, 1971. Estas enzimas han sido aisladas de venenos de varias especies de serpientes y se consideran

inmunológicamente diferentes a enzimas de serpientes estrechamente relacionadas y por ende pueden tener propiedades bastante diferentes. (Aragón Ortiz & GUBENSEK , 1978).

Posteriormente en 1984 se estudia el Mecanismo de acción de miotoxinas aisladas de venenos de serpientes. En este trabajo, Gutiérrez & Cerdas (1984) clasifican las miotoxinas del veneno de las serpientes desde los puntos de vista bioquímico y farmacológico en cuatro grupos:

(1) Fosfolipasas A miotóxicas, afectan inicialmente la integridad de la membrana plasmática, induciéndose un influjo de calcio que culmina con la muerte celular.

(2) Miotoxinas básicas de bajo peso molecular, actúan específicamente en los canales de sodio del sarcolema, induciendo un influjo de sodio que trae como consecuencia despolarización y contracción muscular y vacuolización del retículo sarcoplásmico.

(3) Cardiotoxinas de venenos elápidos, son polipéptidos básicos capaces de desorganizar la estructura de las membranas.

(4) Miotoxinas hemorrágicas, poseen actividad miotóxica, la cual es una consecuencia de la isquemia tisular resultante de la acción hemorrágica de estos componentes. (Gutiérrez & Cerdas, 1984)

En 1996 Kuch y colaboradores llevan a cabo la caracterización bioquímica y biológica de serpientes del Ecuador pertenecientes a los géneros *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Bothrops* y *Lachesis*. Encontrando que todos los venenos exhibieron altas actividades enzimáticas, expresándose en lesiones hemorrágicas y mionecróticas. Sin embargo, hay algunas excepciones notables: el veneno de *Lachesis muta* estaba desprovisto de actividad de

fosfolipasa A, el veneno de *Bothriopsis taeniata* no tenía actividad coagulante y el veneno de *Bothriechis schlegelii* no era hemorrágico y además ligeramente miotóxico. (Kuch, Mebs, Gutiérrez, & Freire, 1996)

Pirela De las Salas López-Jonsthorp y Hernández Rangel en 2006 realizaron la caracterización toxinológica total del veneno de la serpiente cascabel *Crotalus durissus cumanensis* presente en la guajira venezolana. Para este estudio determinaron: dosis letal cincuenta (DL50), actividad hemorrágica, actividad edematizante, actividad hemolítica indirecta, actividad coagulante sobre plasma humano (*in vitro*) y actividad desfibrinante (*in vivo*), según las metodologías establecidas por la Organización Mundial de la Salud. Tras las pruebas, concluyeron que el veneno de esta subespecie es altamente tóxico, de naturaleza neurotóxica, coagulante, poco hemolítico y con características desfibrinantes (*in vivo*); efecto que hasta ahora no había sido reportado para serpientes pertenecientes al género *Crotalus*, lo que sin duda alguna constituye un valioso aporte para el diagnóstico y tratamiento del accidente crotálico. (Pirela De las Salas, López Jonsthorp, & Hernández Rangel, 2006)

Posteriormente en 2009 Núñez y colaboradores caracterizaron el veneno de la serpiente *Bothrops atrox*, analizando muestras de serpientes de Colombia, y la región amazónica de Brasil, Ecuador y Perú, estas muestras fueron caracterizadas mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y electroforesis (SDS PAGE). Los resultados evidenciaron la existencia de dos fenotipos de veneno diferenciados geográficamente. El veneno de Colombia comprende al menos 26 proteínas diferentes pertenecientes a 9 grupos diferentes de toxinas, siendo metaloproteinasas PI y moléculas K49 PLA2 las toxinas más abundantes.

Mientras que los venenos de *B. atrox* brasileño, ecuatoriano y peruano contienen predominantemente metaloproteinasas PIII. (Nuñez , y otros, 2009).

En 2013 Patiño y colaboradores caracterizaron bioquímica y biológicamente dos proteinasas del veneno de la serpiente *Crotalus durissus cumanensis*. Las enzimas analizadas fueron Cdc SI y Cdc SII, estas fueron separadas y purificadas mediante dos métodos cromatográficos, inicialmente por exclusión molecular y luego por cromatografía líquida de alta eficiencia. Estas enzimas presentan masas moleculares similares, la primera es de 28561.4 Da y la segunda 28799.2 Da. A pesar de sus masas moleculares similares estas difieren en su actividad de coagulación *in vitro*, así como en su capacidad para aumentar la permeabilidad vascular en la piel. Por lo anterior, es probable que estas proteinasas jueguen un papel clave en la desfibrilación *in vivo* observada en el envenenamiento por parte de *Crotalus durissus cumanensis*. (Patiño, Pereañez, Gutiérrez, & Rucavado, 2013)

Finalmente Lozano en 2014 realizó la identificación de proteínas con actividad PLA2 en el veneno de la serpiente *Bothrocophias myersi* siendo este estudio uno de los primeros sobre los componentes del veneno de esta serpiente, debido a que esta es una especie rara y no estudiada y sólo se ha reportado un accidente ofídico por esta especie, en el año 2008.

Los resultados de la actividad enzimática sugieren la presencia de PLA2 lítica, por otra parte los cromatogramas mostraron diferencias en los picos de absorbancia (280nm) y sus tiempos de retención; la PLA2 pura mostró un tiempo de retención de 10.318 minutos de su pico más alto, en los cromatogramas de las muestras de las especies *B. myersi*, *B. asper* y *C. durissus*, además de aparecer picos representativos de otras moléculas en la composición

de su veneno, y un pico bastante predominante en un tiempo de retención parecido al de la enzima pura empleada, 10.666, 10.379, 10.221 minutos respectivamente, indicando que este es el tiempo en el cual se podría coleccionar, para aislar la enzima en la muestra de veneno entero. Por otra parte, la electroforesis mostró bandas bien marcadas que coinciden en la posición en el gel, tanto para los tres venenos (*B. myersi*, *B. asper* y *C. durissus*) como para la PLA2 (*C. durissus*) pura y que corresponde a un peso molecular cercano a 14kDa. (Lozano González, 2014)

2.2 Estudio de las proteínas obtenidas de sistemas biológicos.

Dado que la mayoría de fluidos biológicos de células pueden contener miles de diferentes tipos de proteínas, es necesario saber cómo se puede purificar y caracterizar una proteína. La comprensión de la estructura de las proteínas y su función, se ha derivado del estudio de muchas proteínas individuales. Para estudiar una proteína en detalle, el investigador debe ser capaz de separarla de otras proteínas y debe tener las técnicas para determinar sus propiedades. Los métodos necesarios vienen a partir de la química de proteínas, una disciplina tan antigua como la bioquímica en sí que conserva una posición central en la investigación bioquímica.

Una preparación pura es esencial en la determinación de las propiedades de una proteína y su actividad funcional. Los métodos clásicos para separar proteínas se aprovechan de las propiedades que varían de una proteína a la siguiente, incluyendo el tamaño, la carga y las propiedades de unión. Estos se han complementado en las últimas décadas por los métodos que implican la clonación de ADN y la secuenciación del genoma que pueden simplificar el proceso de purificación de proteínas. (Scopes, 1994)

La fuente de una proteína es generalmente tejido o un fluido biológico. El primer paso en cualquier procedimiento de purificación de proteínas es romper, abrir estas células, liberando sus proteínas en una solución llama un extracto crudo. Una vez que el extracto de preparación está listo, se dispone de diversos métodos para la purificación de uno o más de proteínas allí contenidas. Comúnmente, el extracto es sometido a tratamientos que separan las proteínas en diferentes fracciones con base en alguna una propiedad como tamaño o carga, un proceso conocido como fraccionamiento. Las primeras etapas de fraccionamiento en una purificación utilizan diferencias en la solubilidad de proteínas, la cual es una función compleja de pH, temperatura, concentración de sal, etc. (Kornberg, 1990)

2.3 Cromatografía de proteínas.

La cromatografía es un método físico de separación, basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una estacionaria y otra móvil. En la Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase estacionaria. Después se coloca la muestra por la parte superior y se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad, la presión del sistema, y las polaridades de los elementos a separar, así como por medio de un sistema de bombas.

Es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. Las razones son la sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, es ideal para la separación de especies no volátiles o termolábiles y por su gran aplicabilidad a sustancias que son de interés en la industria. Algunos ejemplos son: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides y gran variedad de sustancias inorgánicas. La fase móvil es un líquido y la fase

estacionaria es una columna que puede ser de acero inoxidable. (Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 2007)

Un equipo para HPLC puede ser representado por la siguiente figura



Figura1.representacion equipo para cromatografía líquida de alta eficiencia.

La fase móvil puede ser un disolvente puro o una mezcla de disolventes; algo importante es que deben ser grado HPLC, esto implica un 99% o más de pureza para evitar contaminantes que puedan interferir en la elución de la muestra o bien que contengan algunas pequeñas partículas que puedan tapan la columna; por lo que es necesario filtrarlos antes de que entren a la columna. (Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 2007)

2.4 Electroforesis de proteínas.

La electroforesis constituye parte importante del procedimiento rutinario del análisis de los ácidos nucleicos y proteínas. Y así como el microscopio permite visualizar microorganismos y estructuras similares, la electroforesis permite observar los ácidos nucleicos y las proteínas al final del procedimiento. Estos pasos facilitan la visualización de las moléculas a manera de simples bandas las cuales serán posteriormente analizadas e interpretadas. (García & Vázquez, 1998).

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional.

A escala analítica, los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza. Se pueden conocer también mediante estas técnicas, las características ácido-básicas de las proteínas presentes en un extracto crudo, lo que da la información necesaria si se pretende realizar una separación cromatográfica basada en diferencias de carga. Es útil además para determinar otros parámetros como peso molecular, punto isoelectrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas. (Morales Sánchez & Gallo Ramírez, 2006).

- La velocidad de migración (v) de la partícula es directamente proporcional al producto de su carga efectiva (q) y el gradiente de potencial eléctrico (E) e inversamente proporcional al coeficiente de fricción (f) relativo al tamaño y forma de la molécula, o sea, a la resistencia que le ofrece el medio. $V = q E / f$.
- La movilidad electroforética (Me) es un caso particular de la velocidad de migración de un ion, cuando se aplica un campo eléctrico de 1 V/cm. Su signo es igual al de la carga de la partícula.

Por lo tanto la velocidad de migración electroforética depende de la densidad de carga de la molécula (relación carga / peso), del voltaje aplicado y de la porosidad del gel de electroforesis. El voltaje no se puede incrementar indiscriminadamente porque se genera un excesivo calor. En contraste, al aplicar bajo voltaje puede ocurrir una pobre separación, por causa de la difusión por tiempo muy prolongado de la corrida electroforética.

La mayoría de las biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos) poseen determinada carga eléctrica con grupos aniónicos y catiónicos capaces de disociarse. La

carga neta de la partícula está dada por el pH del medio y puede ser modificada por la interacción con pequeñas moléculas de iones u otras macromoléculas. De lo anterior se deduce que el pH influye sobre la velocidad de migración de las moléculas, en el punto isoeléctrico de la biomolécula, pH al cual su carga neta es 0, esta no migra, mientras que por debajo del punto isoeléctrico tiene carga neta positiva y migra hacia el cátodo, y por encima del punto isoeléctrico tienen carga neta negativa y migra hacia el ánodo.

El resultado de una electroforesis depende de numerosos factores y es necesario conocerlos para lograr la máxima resolución, estos factores son descritos en la figura 2.

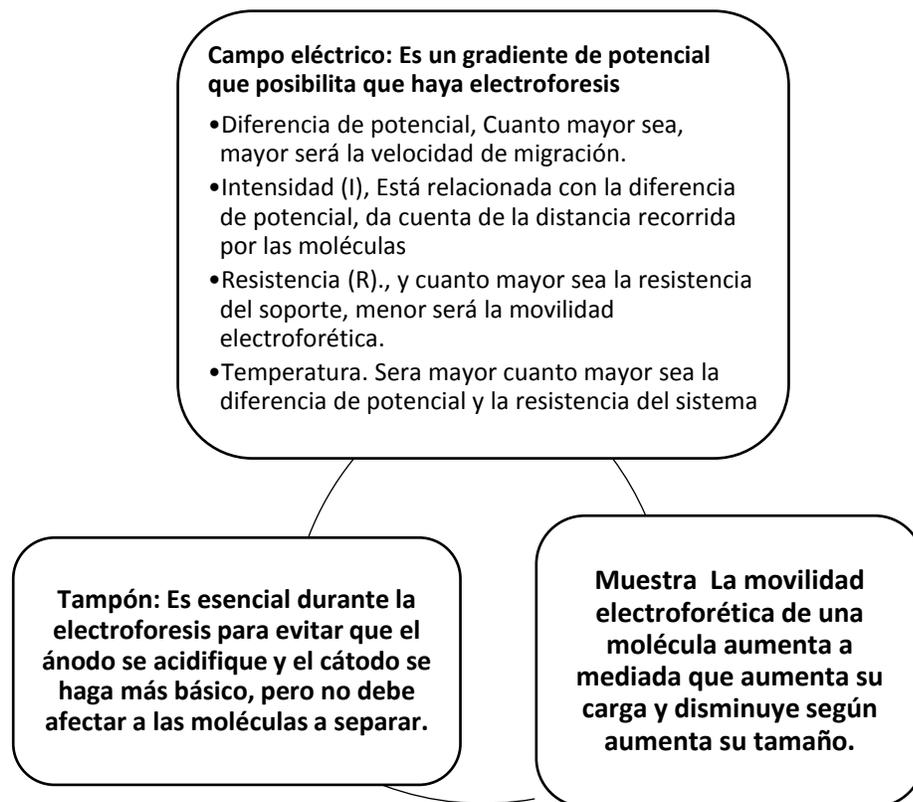


Figura 2. Factores que afectan la electroforesis.

Uno de los métodos electroforéticos es la Electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) este es un método rápido, de bajo costo, y reproducible, para la cuantificación, comparación, y la caracterización de proteínas.

La electroforesis SDS-PAGE, permite el cálculo de parámetros moleculares, pues los complejos SDS-proteína se separan estrictamente según su tamaño molecular. El SDS interacciona con las proteínas formando complejos de características comunes independientemente de las de cada proteína. Las proteínas unen una molécula de SDS por cada dos aminoácidos, lo que implica que las cargas propias de las proteínas quedan enmascaradas o anuladas; asimismo, la molécula de SDS proporciona una carga negativa, por lo que los complejos SDS-proteína están cargados negativamente de forma uniforme (la carga por unidad de masa es prácticamente constante para todos los complejos).

La movilidad electroforética en una electroforesis SDS-PAGE es en función del tamaño y de la carga por unidad de masa, como la carga es constante para todos los complejos SDS-proteína (que, además, tienen la misma forma elipsoide), la movilidad es solamente en función de la masa molecular, es decir, cuanto menor sea la masa molecular de la proteína, mayor será la movilidad de la misma y viceversa. En resumen, la SDS-PAGE es la electroforesis más utilizada para el análisis de proteínas debido a:

- La gran mayoría de las proteínas son solubles en SDS.
- Todos los complejos SDS-proteína tienen carga negativa y migran, por lo tanto, en el mismo sentido.
- Su densidad de carga es muy elevada, por lo que su velocidad de migración también lo es y las electroforesis son muy rápidas.

- La separación depende de un parámetro físico-químico, como es la masa molecular, que se puede calcular.
- Los complejos SDS-proteína se tiñen fácilmente.

Otro de los métodos electroforéticos es la Electroforesis bidimensional, la cual es una sucesión de dos electroforesis distintas (o en distintas condiciones) realizadas sobre una misma muestra. En la primera de ellas (primera dimensión) se separan los componentes de la muestra según un criterio (Punto isoelectrico), y en la segunda (segunda dimensión) según un parámetro distinto del anterior (Tamaño). De esta manera, se combinan dos modos de separación diferentes y se consigue el máximo de resolución posible mediante técnicas electroforéticas. La electroforesis bidimensional puede considerarse como un criterio de pureza positivo debido a su gran poder de resolución, aceptándose que la aparición de una sola mancha indica una muestra homogénea. . (Morales Sánchez & Gallo Ramírez, 2006)

Los diversos usos de estas técnicas son: 1. Análisis de la pureza de proteínas. 2. Determinación del peso molecular de proteínas 3. Verificación de la concentración de proteína 4. Detección de la proteólisis 5. Identificación de proteínas inmunoprecipitadas 6. Primera etapa de inmunotransferencia. 7. Detección de la modificación de proteínas 8. Separación y concentración de antígenos de proteína para la producción de anticuerpos 9. Separación de proteínas marcadas radiactivamente. (Bollag & Edelstein, 1991).

2.5 Cuantificación de proteínas.

Una de las determinaciones más usadas en biotecnología es la cuantificación de proteínas, estimar la concentración de proteínas es necesario no solo en los laboratorios de investigación, sino también en la industria alimenticia, farmacéutica y biotecnológica en

general. Existen muchos métodos para la determinación de proteínas, el uso del método adecuado depende de cinco criterios: 1) La cantidad total de proteína presente en la muestra, 2) La concentración de la proteína, 3) La especificidad del método, 4) La presencia de otras sustancias que pudieran interferir, y 5) La facilidad y reproducibilidad del método. (García & Vázquez, 1998)

Para este estudio, la determinación del contenido proteico de los venenos de las serpientes de los géneros *Bothrops*, *Bothrocophias* y *Crotalus* se realizó mediante espectrofotometría y Nanodrop®. Inicialmente se cuantificó el contenido proteico mediante Nanodrop®, luego por el método de Bradford, y finalmente mediante el método de Lowry.

2.5.1 Cuantificación de proteínas por Nanodrop®.

Este método es simple y requiere de un volumen de muestra extremadamente pequeño ya que los nuevos espectrofotómetros emplean un sistema de retención de muestra durante la medición. Los aminoácidos aromáticos tirosina y triptófano le dan a las proteínas su característico espectro de absorción ultravioleta (UV) a 280nm. Fenilalanina y puentes disulfuro también pueden contribuir a la absorción en esa longitud de onda, aunque ligeramente. La muestra proteica debe encontrarse pura y no contener componentes no proteicos con el mismo espectro de absorción, tales como ácidos nucleicos contaminantes. (Johnson, 2012)

2.5.2 Método de Bradford.

Este método involucra la unión del colorante azul brillante de Coomassie G-250 a las proteínas, provocando un aumento en el máximo de absorción de 465 a 595nm. Está basado en la observación de que el colorante presenta dos formas coloreadas, rojo y azul, el color

rojo pasa a azul cuando el colorante se une a la proteína, la formación del complejo colorante-proteína toma aproximadamente 2 minutos y permanece estable por 1 hora por lo que el procedimiento es rápido y el tiempo para el ensayo no es limitante. (García & Vázquez, 1998). Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre lo que hace al ensayo de Bradford cuatro veces más sensible que el ensayo de Lowry. Este reactivo reacciona con aminoácidos específicos y estructura terciaria de la proteína. (Lemus & Cortez Suárez, 2015).

2.5.3 Método de Lowry.

Es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas. Este método consta de dos fases:

1.-Reacción previa de la proteína en medio alcalino con iones Cu^{2+} , en presencia de tartrato para evitar la precipitación. Se forma un complejo de coordinación entre el cobre y el nitrógeno peptídico.

2.-Reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu para fenoles que se reduce por medio de los grupos fenol presentes en la proteína a un complejo de color azul oscuro, que se mide colorimétricamente. El complejo coloreado, cuya composición es desconocida, presenta dos máximos de absorción a las longitudes de onda de 560 y 650nm. (Rodríguez Del Castillo, 2006).

Este método se utiliza para aumentar la sensibilidad de la reacción del reactivo de Biuret, el complejo proteína- Cu^{2+} se hace reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu, dando

una coloración azul, con un máximo de absorción a 650nm. Esta coloración se atribuye a la reducción del ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico a azul de heteropolimolibdeno de composición no definida, por medio de los residuos tirosilos, triptofanilos, y en menor grado, cisteinilos e histidilos de las proteínas que forman el complejo con el Cu^{2+} . (Lemus & Cortez Suárez, 2015).

2.6 Función de la proteína dependiendo de su secuencia y estructura.

Las proteínas son biomoléculas formadas básicamente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, pueden además contener azufre y en algunos tipos de proteínas, fósforo, hierro, magnesio y cobre entre otros elementos. Se consideran como polímeros de unas pequeñas moléculas que reciben el nombre de aminoácidos y serían, por tanto, las unidades estructurales de las proteínas. Los aminoácidos están unidos mediante enlaces peptídicos, la unión de un bajo número de aminoácidos da lugar a un péptido; si el número de aminoácidos que forma la molécula no es mayor de 10, se denomina oligopéptido, si es superior a 10 se llama polipéptido y si el número es superior a 50 aminoácidos se habla de proteína.

Por tanto, las proteínas son cadenas de aminoácidos que se pliegan adquiriendo una estructura tridimensional que les permite llevar a cabo miles de funciones. Las proteínas están codificadas en el material genético de cada organismo, donde se especifica su secuencia de aminoácidos, y luego son sintetizadas por los ribosomas.

Todas las proteínas poseen una misma estructura química central, que consiste en una cadena lineal de aminoácidos. Es así como, lo que hace distinta a una proteína de otra es la secuencia de aminoácidos de que está hecha, a tal secuencia se conoce como estructura primaria de la proteína. La estructura primaria de una proteína es determinante en la

función que cumplirá después, así las proteínas estructurales (como aquellas que forman los tendones y cartílagos) poseen mayor cantidad de aminoácidos rígidos y que establezcan enlaces químicos fuertes unos con otros para dar dureza a la estructura que forman. (Luque Guillén , 2009)

2.7 Estructura de las proteínas.

1) La estructura primaria: Viene determinada por la secuencia de aminoácidos en la cadena proteica, es decir, el número de aminoácidos presentes y el orden en que están enlazados. Los átomos que componen la cadena principal de la proteína son el N del grupo amino (condensado con el aminoácido precedente), el C= (a partir del cual emerge la cadena lateral) y el C del grupo carboxilo (que se condensa con el aminoácido siguiente). Por lo tanto, la unidad repetitiva básica que aparece en la cadena principal de una proteína es: (-NH-C=CO-).

Conocer la estructura primaria de una proteína no solo es importante para entender su función (ya que ésta depende de la secuencia de aminoácidos y de la forma que adopte), sino también en el estudio de enfermedades genéticas. Es posible que el origen de una enfermedad genética radique en una secuencia anormal.

2) La estructura secundaria de las proteínas: Es el plegamiento que la cadena polipeptídica adopta gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre los átomos que forman el enlace peptídico. Los puentes de hidrógeno se establecen entre los grupos -CO- y -NH- del enlace peptídico (el primero como

aceptor de H, y el segundo como donador de H). De esta forma, la cadena polipeptídica es capaz de adoptar conformaciones de menor energía libre, y por tanto, más estables

3) Estructura terciaria: Se llama estructura terciaria a la disposición tridimensional de todos los átomos que componen la proteína, concepto equiparable al de conformación absoluta en otras moléculas. La estructura terciaria de una proteína es la responsable directa de sus propiedades biológicas, ya que la disposición espacial de los distintos grupos funcionales determina su interacción con los diversos ligandos. Para las proteínas que constan de una sola cadena polipeptídica (carecen de estructura cuaternaria), la estructura terciaria es la máxima información estructural que se puede obtener.

4) La estructura cuaternaria deriva de la conjunción de varias cadenas peptídicas que, asociadas, conforman un multímero, que posee propiedades distintas a la de sus monómeros componentes.

La estructura cuaternaria modula la actividad biológica de la proteína y la separación de las subunidades a menudo conduce a la pérdida de funcionalidad. Las fuerzas que mantienen unidas las distintas cadenas polipeptídicas son, en líneas generales, las mismas que estabilizan la estructura terciaria. Las más abundantes son las interacciones débiles (hidrofóbicas, polares, electrostáticas y puentes de hidrógeno), aunque en algunos casos, como en las inmunoglobulinas, la estructura cuaternaria se mantiene mediante puentes disulfuro. El ensamblaje de los monómeros se realiza de forma espontánea, lo que indica que el oligómero presenta un mínimo de energía libre con respecto a los monómeros. (Luque Guillén , 2009)

2.8 Propiedades de las proteínas.

- Especificidad: La especificidad se refiere a su función; cada una lleva a cabo una determinada función y lo realiza porque posee una determinada estructura primaria y una conformación espacial propia; por lo que un cambio en la estructura de la proteína puede significar una pérdida de la función.
- Desnaturalización: Consiste en la pérdida de la estructura terciaria, por romperse los puentes que forman dicha estructura. Todas las proteínas desnaturalizadas tienen la misma conformación, muy abierta y con una interacción máxima con el disolvente, por lo que una proteína soluble en agua cuando se desnaturaliza se hace insoluble en agua y precipita. (Luque Guillén , 2009)

2.9 Serpientes y venenos.

En la actualidad se conocen cerca de 3000 especies de serpientes a nivel mundial, en Colombia se han identificado cerca de 224 de las cuales 43 son venenosas. Por su forma de vida las serpientes se clasifican en: excavadoras, terrestres, acuáticas y arborícolas; se considera que el 15% de las terrestres son venenosas. Las serpientes venenosas en Colombia pertenecen a los géneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis*, *Micrurus* y *Pelamis*; los accidentes por envenenamiento ofídico son causados principalmente por los géneros *Bothrops* (90%), *Crotalus* y *Micrurus*. (Patiño C, 2002)

Los venenos de las serpientes son las secreciones más ricas en enzimas y toxinas presentes en la naturaleza, están compuestos por una mezcla de moléculas tanto orgánicas como inorgánicas. En el caso de las serpientes vipéridas, las proteínas son las moléculas más estudiadas no sólo por su gran abundancia en el veneno sino también por su alta diversidad en acciones biológicas en el rol que cumplen en un envenenamiento. Los

venenos de las serpientes presentan una composición y actividades enzimáticas variables, existiendo así diferentes efectos locales y sistémicos no sólo entre distintas especies de la misma familia, sino también diferencias intraespecíficas entre poblaciones de distintas zonas geográficas, por esto se requiere un tratamiento clínico diferente para cada caso. Los envenenamientos por mordeduras de serpientes de la familia *Viperidae*, subfamilia *Crotalinae* son caracterizados por prominentes alteraciones a nivel local; incluyendo hemorragia, edema y necrosis, efectos que pueden resultar en secuelas permanentes, desarrollándose muy rápidamente después del envenenamiento. Estos no sólo son los venenos más complejos, en comparación con los de los venenos de otras familias, sino también contienen las proteínas de mayor peso molecular (Pirela de Salas, López Jonsthor, & Hernández Rangel, 2006).

El accidente ofídico es la lesión resultante de la mordedura de una serpiente, en el caso de ofidios venenosos se puede producir inoculación de veneno constituyéndose además en ofidiotoxicosis. Anualmente en el mundo se presentan alrededor de 5.400.000 accidentes ofídicos, de los cuales en el 50% se produce envenenamiento, y en 2,5%, la muerte.

Para Latinoamérica se estiman 150.000 accidentes ofídicos, y la muerte de 5.000 personas por esta causa. En Colombia, el accidente ofídico no estaba contemplado como un evento de notificación obligatoria hasta octubre de 2004, fecha a partir de la cual se estableció como evento de interés en salud pública y hasta el año 2007 se obtuvo una notificación de casos consistente. (Grupo de Enfermedades Transmisibles, Equipo de zoonosis, 2014)

Para el año 2016 el Instituto Nacional de Salud (INS) informó que el comportamiento del accidente ofídico mantuvo los niveles pues en 2014 se presentaron 4.232 casos y durante el

año 2015 se notificaron un total de 4.201 casos. Los departamentos de Antioquia, Córdoba, Bolívar, Norte de Santander, Cesar, Meta, Chocó, Santander, Caquetá y Arauca, notificaron el 61,4 % de estos. (RESOLUCIÓN NÚMERO 00001478, 2016)

En cuanto a las características de los venenos, el producido por serpientes del género *Bothrops* es proteolítico, coagulante, vasculotóxico y nefrotóxico, puede llevar a un cuadro de coagulación intravascular diseminada (CID) no inhibida por heparina y contiene enzimas que producen necrosis hemorrágica, y también produce colapso circulatorio por inducir liberación de bradisinina e histamina.

Por otro lado el veneno producido por las serpientes del género *Crotalus* es coagulante, neurotóxico, miotóxico, nefrotóxico y vasculotóxico, posee acción neurotóxica que bloquea la transmisión presináptica neuromuscular y tiene acción hemolítica mediada por fosfolipasa. (Múnera Bohórquez, 2011).

Finalmente, para el caso del género *Bothrocophias*, se sabe que se encuentra restringido a la porción noroeste de América del Sur y se cuenta con muy poca información acerca de la composición del veneno. Los informes de envenenamiento por mordeduras de serpientes del género *Bothrocophias* incluyen signos y síntomas locales tales como dolor intenso, hinchazón y necrosis, mientras que los efectos sistémicos incluyen coagulopatías, hemorragias, hematuria, trombosi y choque hipovolémico. (Salazar, y otros, 2014).

Hasta la fecha se reconoce sólo al antiveneno ofídico como el único tratamiento válido clínica y científicamente comprobado contra las mordeduras de serpientes, haciendo que su producción sea llevada a cabo siguiendo los más rigurosos estándares de calidad.

2.10 Sueros antiofídicos.

Los sueros antiofídicos son productos de origen biológico que se consiguen a partir de la inyección de pequeñas dosis de veneno de la o las serpientes de las que se desea conseguir el suero, en animales como cabras, ovejas o équidos, principalmente caballos, quienes naturalmente son capaces de sobrevivir a el veneno y generar defensas. Luego de un tiempo específico donde el animal produce los anticuerpos necesarios, se les retira plasma y se filtra con el fin de obtener las inmunoglobulinas específicas lo más puras posible. Durante el proceso de elaboración, se decide si se desea fabricar un antiveneno específico para cada género (monovalente) o que sea efectivo para múltiples géneros (polivalente). Hoy en día no se ha demostrado un beneficio superior al usar sueros antiofídicos monovalentes, es por esto que en general se utiliza la presentación polivalente, lo más común es suero antiofídico polivalente liofilizado con inmunoglobina equina efectiva contra el envenenamiento causado por las mordeduras de serpientes de la familia *Viperidae* de los géneros *Bothrops* (talla x), *Crotalus* (cascabel) y *Lachesis* (verrugoso) (Hurtado, Urán, & Villa, 2013)

El suero polivalente se produce mediante la inmunización activa de caballos adultos sanos con una mezcla de partes iguales de los venenos de las serpientes de las que se desea conseguir el suero, El esquema de inmunización para caballos que no han sido inoculados con veneno se basa en inoculaciones subcutáneas de estos venenos, en cantidades crecientes, mezclados con coadyuvantes de Freund o alginato de sodio, con intervalos de 10 días entre las dosis, durante cuatro meses, mientras que para caballos que ya han sido inmunizados y sangrados previamente, una sola dosis de refuerzo de 30 o 50 mg es suficiente para inducir una nueva respuesta inmune. La respuesta inmune llega a su punto más alto entre 100 y 130 días después de iniciada la inmunización, descendiendo luego.

Esto implica que se debe seguir detenidamente el desarrollo del título de anticuerpos neutralizantes para detectar su momento óptimo y efectuar la sangría. Una vez que se demuestra que un grupo de caballos ha desarrollado un título satisfactorio de anticuerpos neutralizantes, se efectúa la sangría de producción. Este título mínimo aceptable es de 3 mg de veneno de *Bothrops asper* neutralizados por 1 ml de suero. El fraccionamiento posterior del plasma equino se lleva a cabo mediante precipitación de las inmunoglobulinas por adición de sulfato de amonio. Una vez producido el suero, se efectúa un control de calidad siguiendo estipulaciones internacionales. (Gutiérrez, y otros, 2009)

En Colombia las condiciones necesarias para producir los sueros antiofídicos están dadas por el “Decreto 1375 DE 2014” del Ministerio de Salud y Protección Social. Los requisitos sanitarios para la fabricación de sueros antiofídicos en el país son:

- Cumplir con las especificaciones de calidad establecidas en las farmacopeas oficialmente aceptadas en el país.
- Tener un sistema de calidad que comprenda los procedimientos actualizados para el manejo de los procesos para el almacenamiento de materias primas, materiales y productos terminados, producción, control de calidad y garantía de la calidad.
- Contar con instalaciones y equipos necesarios para realizar los procesos de fabricación, envase y acondicionamiento de los productos terminados.
- Realizar los correspondientes análisis fisicoquímicos, microbiológicos y biológicos.

- Contar con personal calificado y suficiente para la fabricación y el control de calidad del producto terminado.
- Presentar para la respectiva liberación de lotes, el protocolo resumido de producción, de conformidad con el procedimiento definido por el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, INVIMA
- Implementar un seguimiento activo de las reacciones adversas que se puedan presentar por el uso de los sueros antiofídicos (DECRETO NÚMERO 1375 , 2014)

Sin embargo el Ministerio de Salud y Protección Social mediante el Decreto número 821 del 16 de mayo de 2017 establece el reglamento técnico de emergencia para la obtención del registro sanitario de antivenenos y se adopta la Guía de Buenas Prácticas de Manufactura para su fabricación, en el cual y según el numeral 23. Control de calidad, indaga sobre los procedimientos específicos de los lotes de veneno (numeral 23.21) con la pregunta ¿Cuentan con los procedimientos y registran los controles de calidad específicos a los lotes de veneno como: concentración de proteína, evaluación de la actividad bioquímica, actividad biológica, perfiles de corrida SDS-PAGE o perfiles de cromatográficos de tamaño o exclusión molecular, entre otros? (DECRETO NÚMERO 821, 2017)

Internacionalmente los parámetros para tener en cuenta para la elaboración de los antivenenos son dados por la Organización Mundial de la Salud en el libro “WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins” (Organización Mundial de la Salud, 2010), de acuerdo a esta los

venenos utilizados para la fabricación de antivenenos deben ser representativos de la población de serpientes que viven en la zona donde se va a usar el antiveneno. Para tener en cuenta la variabilidad en la composición del veneno de una especie individual, es imperativo que el veneno de un número adecuado de serpientes (generalmente no menos de 20-50 especímenes) de la misma ubicación geográfica debe ser recogido en conjunto. Una preparación similar puede utilizarse como un estándar nacional de venenos para la evaluación de la potencia de los antivenenos y para realizar pruebas preclínicas de antivenenos, con el fin de verificar que el antiveneno es adecuado para tratar envenenamientos en la región de manera eficiente.

Los productores de veneno deben seguir rigurosamente las recomendaciones que se enumeran a continuación y proporcionar evidencia de cumplimiento en:

- Origen geográfico y tamaño (y por lo tanto la edad aproximada) de cada serpiente individual utilizada para la producción de veneno.
- Detalles taxonómicos de cada serpiente utilizada.
- Aplicación correcta de los documentos de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas (CITES) en el caso de especies amenazadas.
- Medidas cautelares para evitar la recogida de venenos de serpientes enfermas.
- Identificación individual de serpientes que contribuyen a cada lote de veneno.
- Trazabilidad de cada lote de veneno.

También se recomienda encarecidamente cumplir con lo siguiente:

- Rápida congelación del veneno después de la recolección.
- Liofilización del veneno para almacenamiento a largo plazo.
- Confirmación de la similitud lote a lote de veneno del mismo origen.

Además del certificado que menciona el nombre científico de las especies de serpientes (y subespecies, si las hubiere), el origen geográfico y el número de animales utilizados para preparar el lote, así como la fecha de recolección del veneno, se debe obtener información bioquímica y biológica adicional para cada lote de veneno como evidencia de consistencia. Esta información incluye análisis de:

Características bioquímicas del veneno:

- Concentración de proteínas.
- Imágenes de electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (en condiciones reductoras y no reductoras).
- Perfiles cromatográficos de exclusión de tamaños (por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)).

Actividades enzimáticas y toxicológicas de los venenos:

- Dosis letal media, LD50.

Si el productor de venenos no puede realizar estas determinaciones, puede ser subcontratado o, alternativamente, dependiendo del acuerdo, el fabricante de antivenenos puede realizar ensayos relevantes para confirmar el cumplimiento de las especificaciones como parte del sistema de control de calidad. (Organización Mundial de la Salud, 2010).

3. Justificación.

El accidente ofídico es la lesión resultante de la mordedura de una serpiente, en el caso de ofidios venenosos se puede producir inoculación de veneno constituyéndose además en ofidiotoxicosis. Anualmente en el mundo se presentan alrededor de 5.400.000 accidentes ofídicos, de los cuales en el 50% se produce envenenamiento, y en 2,5%, la muerte. Para Latinoamérica se estiman 150.000 accidentes ofídicos, y la muerte de 5.000 personas por esta causa. En Colombia, el accidente ofídico no estaba contemplado como un evento de notificación obligatoria hasta octubre de 2004, fecha a partir de la cual se estableció como evento de interés en salud pública y hasta el año 2007 se obtuvo una notificación de casos consistente. (Grupo de Enfermedades Transmisibles, Equipo de zoonosis, 2014).

El Ministerio de Salud y Protección Social ha identificado problemas de desabastecimiento y de disponibilidad de sueros antiofídicos y antilonómicos frente a las necesidades del país, en particular en zonas apartadas o de difícil acceso y con dificultades de comunicación y, en razón a la situación presentada, esa entidad expidió las Resoluciones 1300, 1301 Y 1302 de fecha 14 de abril de 2014, por medio de las cuales declaró, por el término de doce (12) meses, la emergencia nacional (emergencia sanitaria). (DECRETO NÚMERO 1375 , 2014)

Para el año 2016 el Instituto Nacional de Salud — INS informó que el comportamiento del accidente ofídico mantuvo los niveles pues en 2014 se presentaron 4.232 casos y durante el año 2015 se notificaron un total de 4.201 casos. Los departamentos de Antioquia, Córdoba, Bolívar, Norte de Santander, Cesar, Meta, Chocó, Santander, Caquetá y Arauca, notificaron el 61,4 % de estos. Con respecto a las defunciones por esta causa, en el año 2015, se notificaron 31 muertes que representan una tasa de mortalidad de 0,6 casos por

1.000.000 de habitantes y una letalidad de 0,7 por 1.000.000 habitantes. (RESOLUCIÓN NÚMERO 00001478, 2016)

Los venenos de las serpientes presentan una composición y actividades enzimáticas variables, existiendo así diferencias importantes en las actividades enzimáticas y en los efectos locales y sistémicos no sólo entre distintas especies de la misma familia, sino también diferencias intraespecíficas entre poblaciones de distintas zonas geográficas, como consecuencia, los venenos de las diferentes especies y entre individuos de la misma especie, pero de distintas poblaciones, producen distintos efectos locales y sistémicos, por lo que se requiere un tratamiento clínico diferente para cada caso. (Pirela de Salas, López Jonsthon, & Hernández Rangel, 2006).

Esta variación intraspecífica e individual del veneno se ha estudiado a través del tiempo para una variedad de especies de serpientes debido a su gran relevancia desde el punto de vista médico y biológico. Sin embargo, los mecanismos que guían la evolución del veneno de la serpiente y los factores que determinan su composición siguen siendo un tema de debate y continúan en gran parte desconocidos.

Clínicamente, los efectos causados por la mordedura de serpientes venenosas, se clasifican en sistémicos y locales, los envenenamientos por mordeduras de serpientes de la familia *Viperidae*, subfamilia *Crotalinae* son caracterizados por prominentes alteraciones a nivel local; incluyendo hemorragia, edema y necrosis, efectos que pueden resultar en secuelas permanentes, desarrollándose muy rápidamente después del envenenamiento. Los venenos de esta familia son los más complejos, y presentan las proteínas de mayor peso molecular. De acuerdo con la OMS el antiveneno es el único tratamiento desarrollado bajo los criterios científicos para atender de manera segura y eficaz un accidente ofídico, por

ende se requiere del cumplimiento de las normas de Buenas Practica de Manufactura (BPM), exigidas por la industria farmacéutica. (Pirela de Salas, López Jonsthon, & Hernández Rangel, 2006).

La introducción de un nuevo antiveneno para su uso en el tratamiento del envenenamiento ofídico requiere de una validación preclínica, la cual involucra, entre otros análisis, una demostración de su eficacia neutralizante. La eficacia de un antiveneno se ha establecido mediante la prueba de neutralización de la actividad letal de los venenos, también denominada prueba de potencia. Sin embargo, estudios efectuados por diversos grupos durante las últimas décadas han demostrado que una evaluación más completa y rigurosa de la capacidad neutralizante de los antivenenos debe basarse en el análisis de la neutralización no sólo de la letalidad, sino además de otras actividades toxicológicas y una caracterización e identificación de las principales proteínas relevantes que participan en la fisiopatología de estos envenenamientos. (Instituto Clodomiro Picado, 2007).

Para la solución de la problemática esbozada es fundamental el estudio de la composición de los venenos de serpiente, que son una mezcla compleja de péptidos, enzimas, proteínas sin actividad enzimática, azúcares, lípidos y trazas de algunos cationes. Debido a esto, los análisis cuantitativos y de caracterización molecular mediante métodos cromatográficos y electroforéticos del contenido proteico, a la par de los estudios de actividades enzimáticas y actividades biológicas, son fundamentales para aquellos venenos que son considerados en la elaboración de sueros antiofídicos o antivenenos ofídicos, como materia prima (Mendoza, Vivas, Inga, Arbaiza, & Rodríguez, 2009). Y a la vez este tipo de estudios que caracterizan la variedad de componentes de los venenos estimulan las investigaciones dirigidas a la búsqueda de agentes terapéuticos y moléculas modelo en los

venenos, que puedan ser usadas en un futuro cercano como fármacos para el tratamiento de diversas patologías.

4. Pregunta de Investigación

¿Qué diferencias hay entre los perfiles proteicos de los venenos de serpientes de los géneros *Bothrops*, *Bothrocophias* y *Crotalus* provenientes del valle del cauca Colombia (fundación zoológico de Cali)?

5. Objetivos.

5.1 Objetivo General

- Comparar el perfil proteico de venenos de serpientes de los géneros *Bothrops*, *Bothrocophias* y *Crotalus* provenientes del valle del cauca Colombia (fundación zoológico de Cali) mediante el uso de cromatografía líquida de alta eficiencia, HPLC y electroforesis.

5.2 Objetivos Específicos

- Determinar el contenido proteico de venenos de serpientes de los géneros *Bothrops*, *Bothrocophias* y *Crotalus* por cromatografía líquida de alta eficiencia, HPLC y electroforesis.
- Analizar los perfiles proteicos de venenos de serpientes de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* por cromatografía líquida de alta eficiencia, HPLC y electroforesis.
- Comparar el perfil proteico contenido en venenos de serpientes de los géneros *Bothrops*, *Bothrocophias* y *Crotalus*.
- Estimar el peso molecular de algunas proteínas de venenos de serpientes de los géneros *Bothrops*, *Bothrocophias* y *Crotalus*.

6. Métodos.

6.1 Origen de los venenos.

Los venenos utilizados en los experimentos de este trabajo provienen de 5 individuos de la Fundación Zoológico de Cali, correspondientes a los géneros *Bothrops sp* (un individuo, Macho), *Bothrocophias sp* (dos individuos, Hembras), y *Crotalus sp* (dos individuos Hembras) todos provenientes en el departamento del Valle del Cauca, Colombia.

Las muestras de los venenos puros se pesaron, luego se liofilizaron y se disolvieron en un volumen total de 1 ml de agua HPLC estéril y se conservaron a -80°C hasta su procesamiento.

6.2 Cuantificación contenido proteico

La determinación del contenido proteico de los venenos de las serpientes se realizó mediante espectrofotometría en el equipo Thermo Scientific Evolution 201 (Figura 3) y Nanodrop®, en el equipo **Thermo Scientific NanoDrop® 2000C Spectrophotometer** (Figura 4). Inicialmente se cuantificó el contenido proteico mediante cuantificación directa a 280nm, empleando el equipo Nanodrop®, el cual realiza una calibración interna y una corrección a (280/260), obteniendo así una lectura directa de la concentración, la ventaja tecnológica del equipo está en función de emplear micro volúmenes de muestra, mediante las propiedades de la tensión superficial de gota formada.

Luego se emplearon métodos colorimétrico como son los métodos de Bradford, según lo establecido en el protocolo “Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit” de Thermo Scientific y el método de Lowry siguiendo el protocolo del Laboratorio de Enzimas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional. Para el cálculo de las concentraciones proteicas mediante los métodos de Bradford y Lowry se construyó una

curva de calibración correspondiente a cada método a partir de soluciones seriales de un patrón de albumina sérica bovina (BSA) (“Albumin Standard 23209 Thermo Scientific”), mientras que para la cuantificación proteica mediante Nanodrop® esta se hizo por medición directa de la absorbancia a 280nm.



Figura 3. Thermo Scientific Evolution 201 UV-Visible Spectrophotometer.



Figura 4. Thermo Scientific NanoDrop® 2000C Spectrophotometer.

Para el método de Lowry se preparó el reactivo correspondiente el cual está formado por 3 soluciones. La solución A con un volumen total de 500mL se preparó con Sodio potasio tartrato 4H₂O 700mM (Carlo Erba), Carbonato de sodio 0,81M (Merck) e Hidróxido de sodio 1M (Carlo Erba), esto se mezcló y se aforó a un volumen de 500ml. La solución B se

preparó con Sodio potasio tartrato 70mM (Carlo Erba), Carbonato de sodio 0,81M (Merck), Sulfato de cobre 5H₂O 40mM (Merck), agua destilada e Hidróxido de sodio 1N, la mezcla se agitó y aforó a volumen de 500mL (Figura5). Por último la solución C se preparó justo en el momento de medir la absorbancia de las muestras y patrones de BSA, esta consta de una dilución de reactivo de Folin ciocalteu en una relación de 1 volumen de reactivo por 15 volúmenes de agua.

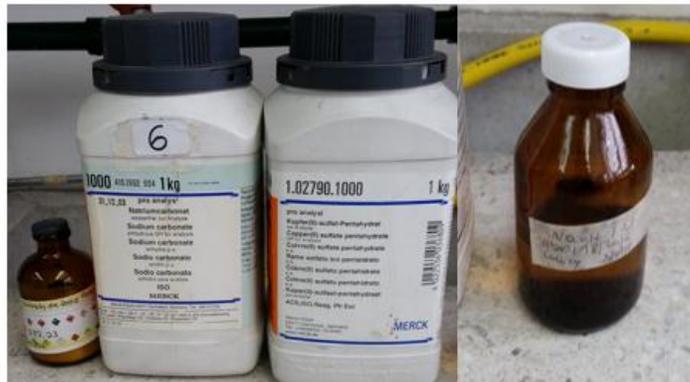


Figura 5. Reactivos para preparar reactivo de Lowry (sodio potasio tartrato, Carbonato de sodio, Sulfato de cobre, Hidróxido de sodio.

6.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida

La caracterización de los perfiles proteicos y la estimación de los pesos moleculares de las proteínas se realizó por el método de electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones denaturantes según el protocolo del libro “Protein Methods” (Bolog & Edelstein, 1991).

Inicialmente se prepararon las siguientes soluciones Stock necesarias para luego realizar las soluciones de trabajo.

- Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% (w/v)
- Solución TRIS-HCL 2M (pH 8,8)

- Solución TRIS-HCL 1M (pH 6,8)
- Glicerol al 50% (v/v)
- Azul de bromofenol 1% (w/v)

A partir de las soluciones stock se prepararon estas soluciones de trabajo:

- Solución A, Acrilamida-Bisacrilamida 30% (w/v)
- Solución B, Buffer gel de separación
- Solución C, Buffer gel de concentración.
- Buffer de electroforesis
- Buffer para preparar las muestras
- Persulfato de amonio 10%
- Solución de tinte azul brillante de coomassie
- Solución desteñido

Teniendo tanto las soluciones stock como las soluciones de trabajo se prepararon los geles de concentración y separación para las 6 muestras de los venenos.

Se prepararon los geles de separación al 8 y al 15% con base a la información bibliográfica en la cámara electroforética, los geles de separación al 8% contienen 2,7mL de solución A, 2,5mL de solución B, 4,8mL de agua HPLC, 50 μ L de persulfato de amonio al 10% y 10 μ L de TEMED, mientras que los del 15% se prepararon con 5mL de solución A, 2,5mL de solución B, 2,5mL de agua HPLC, 50 μ L de persulfato de amonio al 10% y 10 μ L de TEMED para ambos geles el tiempo de polimerización fue de 30 minutos, posteriormente se adicionó la solución del gel de concentración al 5% la cual se preparó

con 2,3mL de agua HPLC, 0,67mL de solución A, 1mL de solución C, 30 μ L de persulfato de amonio al 10% y 10 μ L de TEMED, y se dejó polimerizar por 30 minutos.

Para analizar muestras se tomaron 10 μ L y se le adicionaron 5 μ L de buffer carga, los 15 μ L de la mezcla de cada muestra y 5 μ L del marcador de peso molecular se sirvieron en los pozos del gel de concentración. Finalmente se estableció un flujo continuo de 100v en la fuente de poder y se realizó la corrida electroforética por una hora.

Tras la corrida electroforética se retiraron los geles de los vidrios que conformaban la cámara electroforética se tiñeron con la solución de tñido, la cual está compuesta por metanol, ácido acético glacial, agua y el colorante Coomassie blue R 250, esta solución se dejó actuar por 20 minutos, pasado este tiempo se descartó la solución de tñido y se adicionó la solución de desteñido la cual está compuesta por metanol, ácido acético glacial y agua, esta solución se dejó por 40 minutos en agitación, y por último se tomó registro fotográfico con el digitalizador de geles (“BIO RAD Gel Doc xr+”)



Figura 6. Digitalizador de geles BIO RAD Gel Doc xr+

6.4 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para la caracterización de los perfiles cromatográficos se siguió lo planteado por (Nuñez , y otros, 2009), y (Calvete, y otros, 2011). Se utilizó una columna Lichosper 100 RP C18, de dimensiones 250X4 mm y poro de 5 μ m. Y el cromatógrafo “UFLC SHIMADZU” (Figura 7).

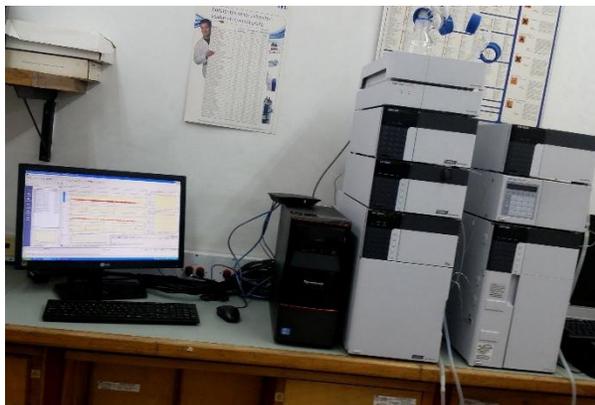
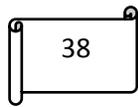


Figura 7. Equipo Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Inicialmente se preparó la fase móvil la cual está formada por ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% y acetonitrilo al 100%. Luego se llevó a cabo el acondicionamiento de la columna durante una hora a un flujo de 0,2mL/min, tiempo en el cual se pasó de las concentraciones iniciales de acetonitrilo (50%), TFA (0%) y agua (50%), a las concentraciones finales acetonitrilo (50%), TFA (50%) y agua (0%). Seguido a esto se dejó estabilizar la columna por 44 minutos según lo establecido en el manual de la misma y finalmente se realizó el corrido de las muestras teniendo en cuenta la rampa de corrido establecida por (Nuñez , y otros, 2009) y (Calvete, y otros, 2011) la cual consta en un gradiente lineal de 0,1% de TFA en agua (solución A) y acetonitrilo (solución B) (5% de B durante 10 min, seguido de 5-15% de B durante 20 min, 15 a 45% de B durante 120 min, y 45 a 70% de B durante 20 min.



7. Resultados y Análisis.

La caracterización proteica de las cinco muestras de venenos de las serpientes de los géneros *Bothrops*, *Bothrocophias* y *Crotalus* se llevó a cabo con un volumen total de 1mL para cada muestra, a partir del cual se realizó la estandarización de cada método y posteriormente se obtuvieron los resultados finales de cada prueba. Al tener tan poco volumen de muestra y con concentraciones que iban desde los 22 hasta los 111mg/mL era necesario manipular con mucho cuidado y lo menos posible las muestras para evitar su degradación.

7.1 Cuantificación contenido proteico

Para la cuantificación del contenido proteico inicialmente se pesaron las muestras en seco tras ser liofilizadas, luego se disolvieron en 1mL de agua HPLC estéril para tener una concentración inicial. (Tabla 1) Posteriormente se realizó la cuantificación mediante Nanodrop® y espectrofotometría.

Muestra	Peso seco (mg)	Concentración (mg/mL)
<i>Bothrocophias sp</i>	111.4	111.4
<i>Bothrocophias sp</i>	105.9	105.9
<i>Crotalus sp</i>	78.1	78.1
<i>Crotalus sp</i>	22.1	22.1
<i>Bothrops sp</i>	71.4	71.4

Tabla 1. Valores peso en seco y concentración inicial de las muestras de veneno

7.1.1 Cuantificación contenido proteico mediante Nanodrop®.

La cuantificación proteica mediante Nanodrop® se hizo por medición directa de la absorbancia a 280nm. A partir de alícuotas de 2µL de cada muestra de veneno. En la tabla 2 se observan los resultados de la cuantificación del contenido proteico mediante Nanodrop.

Muestra	Proteína µg/mL	mg proteína	% Proteína
<i>Crotalus sp 1</i>	7266.8	56.68	72.57
<i>Bothrocophias sp 2</i>	9730.6	103.14	97.40
<i>Bothrocophias sp 1</i>	2979.8	33.08	29.69
<i>Bothrops sp</i>	612.8	4.41	6.18
<i>Crotalus sp 2</i>	1136.7	2.50	11.32

Tabla. 2 Valores cuantificación proteica mediante Nanodrop®.

7.1.2 Método de Bradford.

La cuantificación de proteínas mediante este método se realizó según lo establecido en el protocolo “Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit” de Thermo Scientific. Inicialmente se realizaron diluciones del patrón de BSA con una concentración de 2mg/ml utilizando solución salina como disolvente, para obtener concentraciones en un rango de 125 a 2000µg/mL, tal y como se muestra en la tabla 3. La curva de estandarización para este método (Figura 8), se obtuvo a partir de la medición de la absorbancia de cada una de las diluciones anteriormente mencionadas y con base a la curva de estandarización se realizó la cuantificación del contenido proteico de los venenos de las 5 muestras como se observa en la tabla 4.

Dilución	[BSA] µg /ml	BSA (µL)	Agua destilada (µL)
A	2000	300	0
B	1500	375	125
C	1000	325	325
D	750	175µL dilución B	175
E	500	325µL dilución C	325
F	250	325µL dilución E	325
G	125	325µL dilución F	325

Tabla 3. Preparación de diluciones estándar de BSA [2mg/mL], ensayo de Bradford.

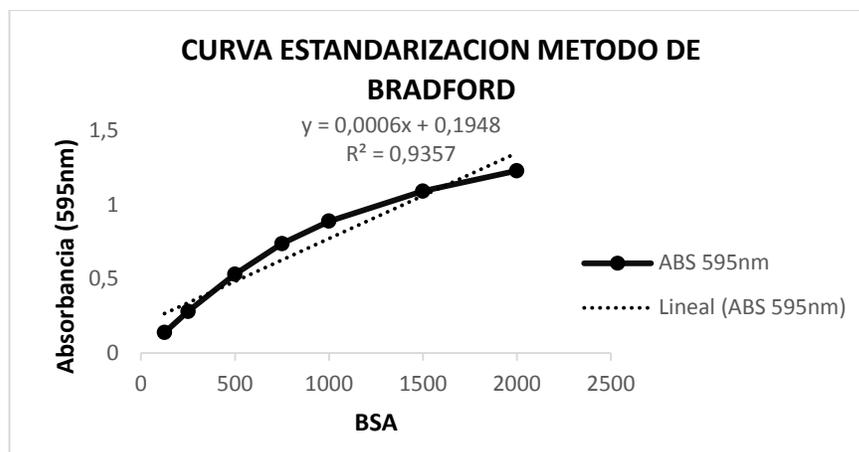


Figura 8. Curva estandarización Método de Bradford

Muestra	Proteína $\mu\text{g/mL}$	mg proteína	Proteína %
<i>Crotalus sp 1</i>	2284.33	1.75	2.24
<i>Bothrocophias sp 2</i>	2385.17	1.82	1.72
<i>Bothrocophias sp 1</i>	2072.67	1.59	1.42
<i>Bothrops sp</i>	438.50	0.34	0.47
<i>Crotalus sp 2</i>	214.33	0.16	0.74

Tabla. 4 Valores cuantificación proteica mediante el método de Bradford.

7.1.3 Método de Lowry

La cuantificación de proteínas mediante este método se realizó según el protocolo del Laboratorio de Enzimas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional. Se realizaron diluciones del patrón de BSA con una concentración de 2mg/ml para obtener concentraciones en un rango de 0,05mg/mL hasta 0,3mg/mL, las cuales se observan en la tabla 5. La curva de estandarización para el método de Lowry (Figura 8), se obtuvo a partir de la medición de la absorbancia de cada una de las diluciones presentes en la tabla 5, y a partir de los resultados de la curva de estandarización se realizó la cuantificación del contenido proteico de los venenos de las 5 muestras como se observa en la tabla 6.

Dilución	[BSA] mg/ml	BSA (μL)	Agua destilada (μL)
A	0,05	25	475
B	0,1	50	450
C	0,15	75	425
D	0,2	100	400
E	0,3	150	350

Tabla 5. Preparación de diluciones estándar de BSA [2mg/mL] ensayo de Lowry

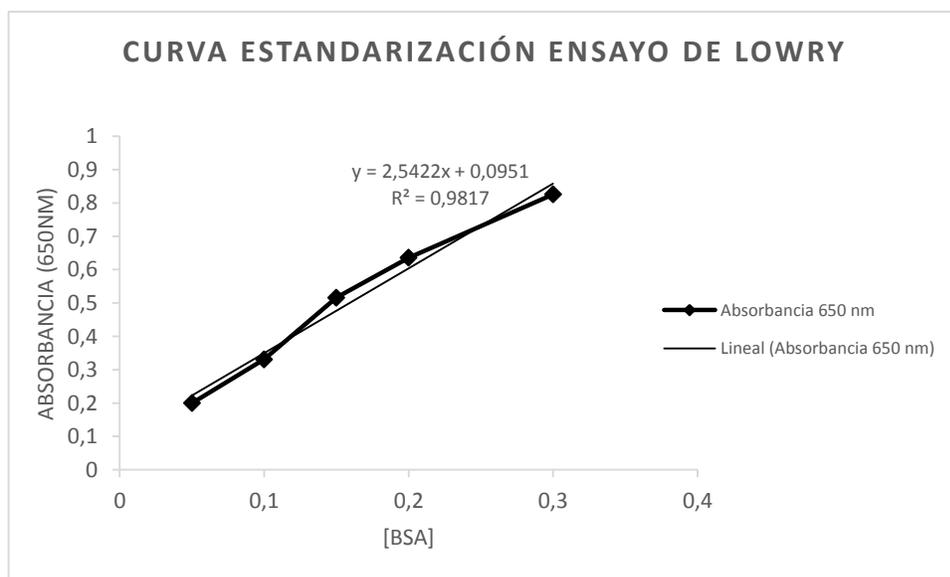


Figura 9. Curva de estandarización Método de Lowry.

Muestra	Proteína μg/mL	mg proteína	Proteína %
<i>Crotalus sp 1</i>	518.02	0.65	0.83
<i>Bothrocophias sp 2</i>	708.99	0.89	0.84
<i>Bothrocophias sp 1</i>	411.22	0.51	0.46
<i>Bothrops sp</i>	25.33	0.03	0.04
<i>Crotalus sp 2</i>	48.74	0.06	0.28

Tabla. 6 Valores cuantificación proteica mediante el método de Lowry.

Los datos obtenidos tras la cuantificación del contenido proteico presentan una tendencia similar tanto para el método de Lowry como para la cuantificación mediante Nanodrop®, siendo la muestra 2 de *Bothrocophias sp* la que tiene un mayor porcentaje de proteínas con un 97.40% para la cuantificación por Nanodrop® (Tabla 2) y 0,84% para el método de Lowry (Tabla 6), seguida de la muestra 1 de *Crotalus sp* que presentó un contenido proteico del 72.57% para Nanodrop® (Tabla 2) y 0.83% para el método de Lowry (Tabla 6). Mientras que para el método de Bradford se invirtió el comportamiento la muestra 1 de *Crotalus sp* fue la que presentó mayor contenido proteico con un 2.24% seguido de la muestra 2 de *Bothrocophias sp* con 1,72%.

La muestra de *Bothrops sp* fue la que evidenció menor contenido proteico para los tres métodos con valores de 6.18% para Nanodrop® (Tabla 2), 0.47% para el método de Bradford (Tabla 4), y 0.04% para el método de Lowry.

Sin embargo hay que resaltar que estos tres métodos no son comparables debido a que cada uno reacciona con diferentes grupos funcionales de ciertos aminoácidos y por ende la sensibilidad y precisión al momento de cuantificar las proteínas varía en cada uno de los métodos.

7.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida y Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La estandarización de la electroforesis se realizó con muestras de venenos de los géneros *Bothrops*, *Bothrocophias* y *Crotalus*, según el protocolo del libro “Protein Methods” (Bolag & Edelstein, 1991). Inicialmente se corrió un gel al 8% (Figura 10) con muestras de

Bothrops y *Crotalus* y por último un gel del 15% (Figura 11) con las muestras de veneno de los 3 géneros a analizar.

Posterior a la estandarización se corrieron nuevamente el gel del 8% (Figura 12) y por último el del 15% (Figura 13).

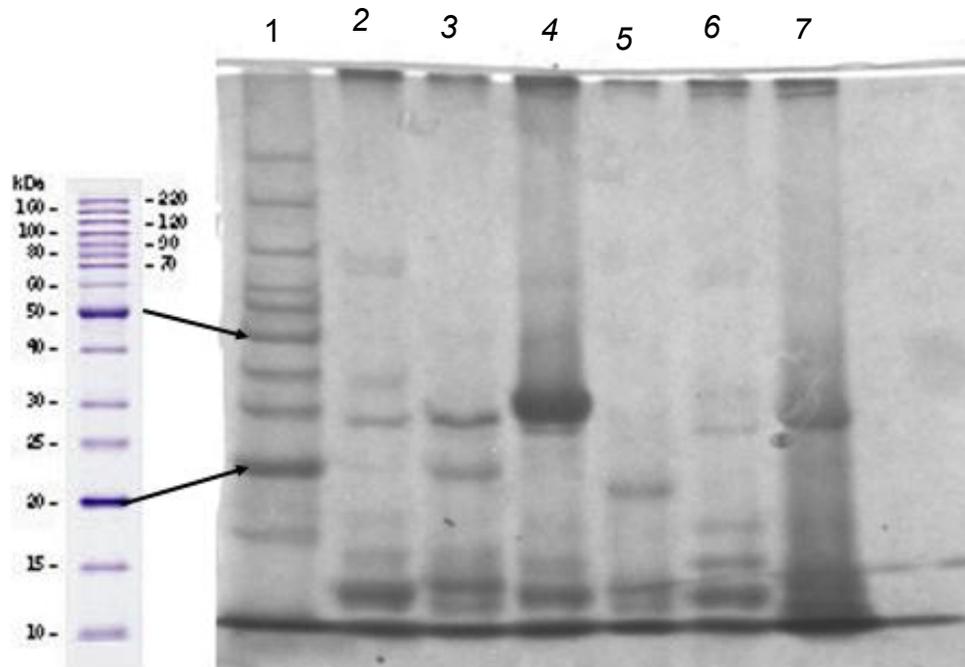


Figura 10. Estandarización Perfil electroforético (SDS-PAGE, Gel de poliacrilamida al 8%.) de los venenos de serpientes *Bothrops sp* y *Crotalus sp*. Pozo 1 marcador de peso Molecular. Pozos 2, 4 y 6 muestras de veneno de *Bothrops sp*. Pozos 3, 5 y 7 muestras de veneno de *Crotalus sp*.

Para el gel de estandarización del 8% (Figura 10), la mayoría de las proteínas presentaron pesos moleculares entre 20 y 50 KDa. La muestra de *Crotalus sp* correspondiente al pozo 2 presentó 7 bandas de las cuales 4 tuvieron pesos moleculares entre los 20 y 50KDa, una por arriba de este rango y dos por debajo de los 20 KDa, mientras que la muestra del pozo 6

también correspondiente a *Crotalus sp* solo presentó 4 bandas y de estas solo una tuvo un peso molecular mayor a lo 20KDa.

En relación a las muestras de *Bothrops sp* la muestra del pozo 3 presentó 3 bandas la primera con un peso molecular menor a 15 KDa y las otras dos con pesos moleculares de 20 y 30KDa correspondientemente.

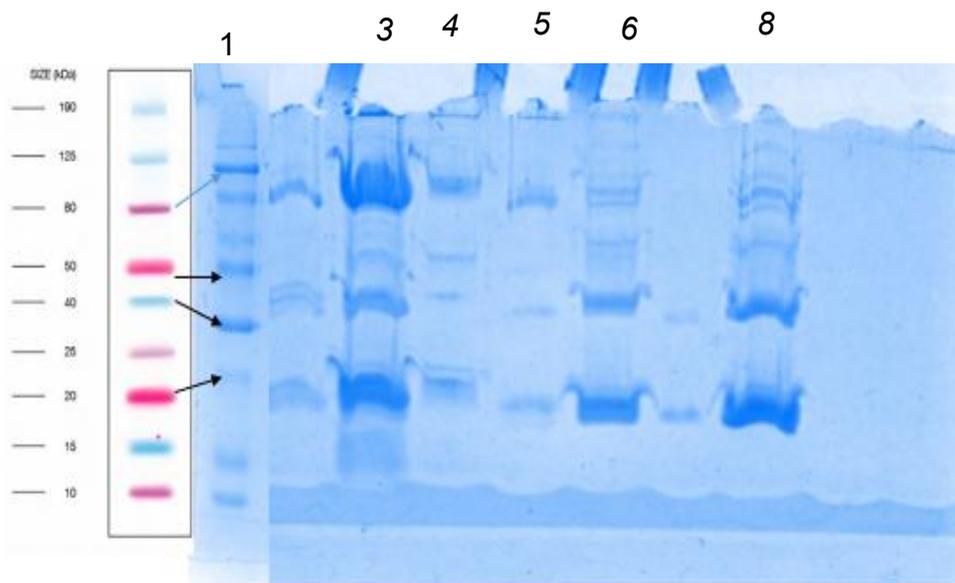


Figura 11. Estandarización Perfil electroforético (SDS-PAGE, Gel de poliacrilamida al 15%.) de los venenos de serpientes *Bothrops sp*, *Bothrocophias sp* y *Crotalus sp*. Pozo 1 marcador de peso Molecular. Pozo 3 y 4 muestras de veneno de *Bothrocophias sp*, pozo 5 muestra de veneno de *Bothrops sp* pozos 6 y 8 muestras de veneno de *Crotalus sp*.

De igual forma para el gel de estandarización del 15% (Figura 11), la mayoría de las proteínas presentaron pesos moleculares entre 20 y 50 KDa. Las muestras de *Bothrocophias sp* correspondientes a los pozos 3 y 4 presentaron 4 bandas de las cuales 3

tuvieron pesos moleculares entre los 20 y 50KDa, y una banda presentó peso molecular por arriba de este rango entre los 70 y 80KDa.

En relación a la muestra de *Bothrops sp* presentó 3 bandas las dos primeras con pesos moleculares de 20 y 50 KDa correspondientemente y la última con un peso molecular entre los 70 y 80KDa.

Por último las muestras de *Crotalus sp* correspondientes a los pozos 6y 8 presentaron las mismas 4 bandas de las muestras de *Bothrocophias sp*, las tres primeras bandas con pesos moleculares entre los 20 y 50KDa y la última con un peso molecular entre los 70 y 80KDa.

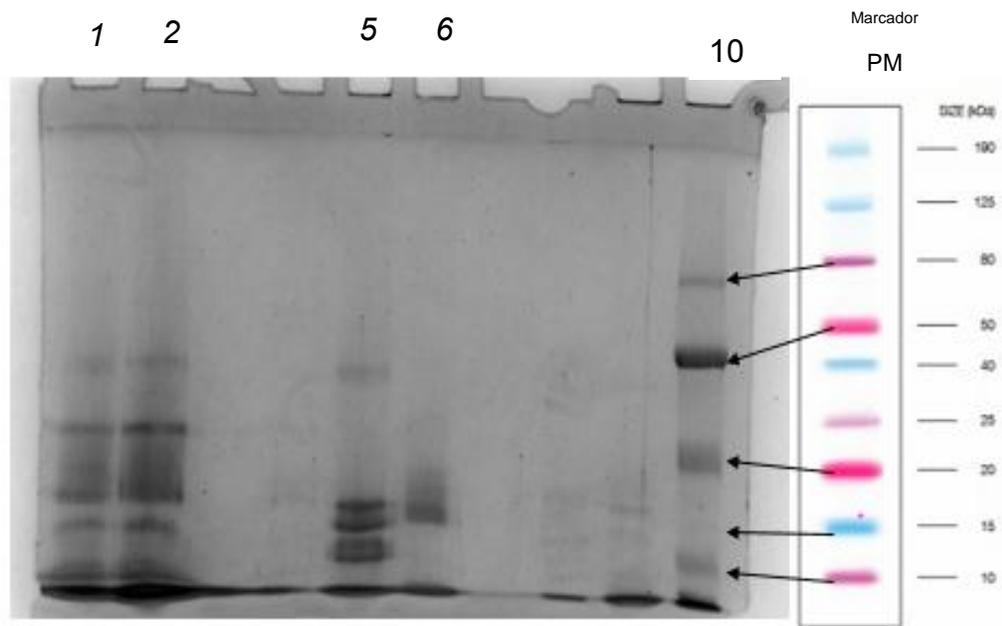


Figura 12. Perfil electroforético (SDS-PAGE, Gel de poliacrilamida al 8%.) de los venenos de serpientes *Bothrops sp*, *Bothrocophias sp* y *Crotalus sp*. Pozos 1 y 2 muestras de veneno de *Bothrocophias sp*, pozo 5 muestra de veneno de *Crotalus sp* pozo 6 muestra de veneno de *Bothrops sp*, pozo 10 Marcador de peso Molecular

Para la electroforesis con el gel de separación del 8% (Figura 12), se obtuvieron proteínas entre los 10 y los 50KDa, la mayoría de estas agrupadas entre los 10 y los 25KDa. En el caso de la muestra de *Bothrocophias sp* correspondientes al pozo 1 se evidenciaron cinco bandas de las cuales cuatro están entre los 15 y 25KDa, una de estas bandas solo se encontró en esta muestra y presentó un peso molecular de 20KDa, mientras que la quinta banda presentó un peso molecular de 50KDa. La muestra de *Crotalus sp* presentó 5 bandas la primera con peso molecular de 10KDa, posteriormente 3 bandas con pesos moleculares de 10 a 15KDa, 15 KDa y de 15 a 20KDa correspondientemente y por último la quinta banda presentó un peso molecular de 50KDa. Mientras que la muestra de *Bothrops sp* solo presentó una banda con un peso molecular entre los 15 y 20KDa. En común las cinco muestras analizadas presentaron bandas con peso molecular de 15 y 50KDa.

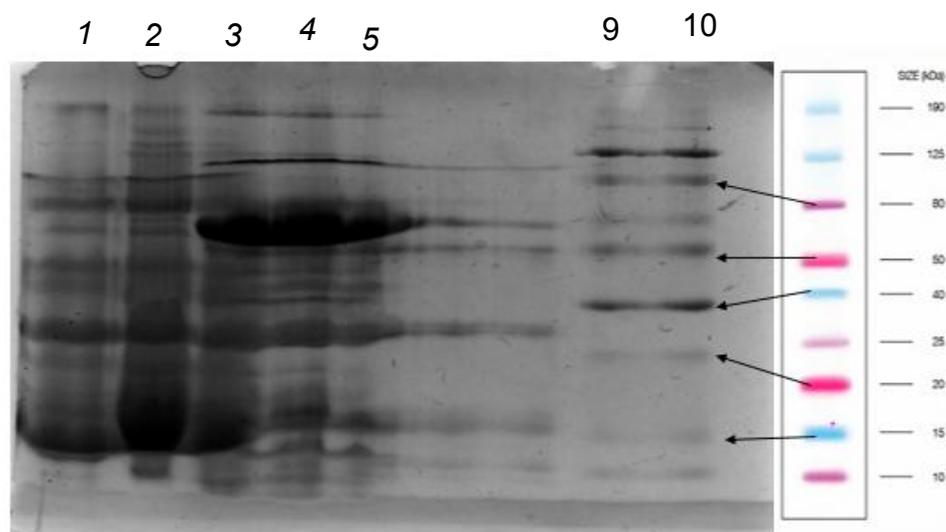


Figura 13. Perfil electroforético (SDS-PAGE, Gel de poliacrilamida al 15%.) de los venenos de serpientes *Bothrops sp*, *Bothrocophias sp* y *Crotalus sp*. Pozos 1 y 2 muestras de veneno de *Bothrocophias sp*, pozo 3y 4 muestras de veneno de *Crotalus sp*, pozo 5 muestra de veneno de *Bothrops sp*, pozos 9 y 10 marcador de peso Molecular.

Por último para la electroforesis con el gel de separación del 15% (Figura 13), se obtuvieron proteínas entre los 15 y los 190KDa, la mayoría de estas agrupadas entre los 15 y los 50KDa. Siendo comunes para las 5 muestras analizadas las bandas de los pesos moleculares 20, 25 y 40 KDa Para las muestras de *Bothrocophias sp* se evidenciaron siete bandas en común para las dos muestras analizadas, estas se encuentran en la región comprendida entre los 15 y los 80KDa Sin embargo en la muestra de *Bothrocophias sp* correspondiente al pozo 2 se evidenciaron 4 bandas con pesos moleculares entre los 125 y los 190KDa mientras que para la muestra del pozo 1 solo se separó una banda con peso molecular similar a las de la muestra del pozo 2.

Para las muestras de *Crotalus sp* se separaron proteínas con pesos moleculares entre 15 y 50KDa, evidenciando 7 bandas, de las cuales la banda con peso molecular de 15KDa solo se observó en la muestra del pozo 4, mientras que las otras 6 bandas se encuentran en las 2 muestras, las tres primeras bandas presentaron pesos moleculares de 20, 25 y 40KDa correspondientemente y las siguientes se agrupan en la región entre los 40 y 50KDa.

Por último la muestra de *Bothrops sp* presentó seis bandas, las tres primeras con peso molecular de 15, 25 y 40KDa correspondientemente y las tres últimas con peso molecular entre los 40 y 50KDa.

El otro método que se utilizó para la separación e identificación de las proteínas fue la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Inicialmente se realizó la estandarización de este método analizando los perfiles de 3 muestras de venenos de los géneros *Lachesis*, *Bothrops* y *Crotalus* por medio de cromatografía líquida (HPLC), utilizando una columna Lichosper 100 RP c18, de dimensiones 250X4 mm y poro de 5um el corrido de las muestras se llevó a cabo teniendo en cuenta la rampa de corrido establecida por (Núñez , y

otros, 2009) y (Calvete, y otros, 2011) Posteriormente teniendo en cuenta la estandarización del método se analizaron los perfiles de 5 muestras de venenos correspondientes 2 al género *Bothrocophias sp*, 2 muestras a *Crotalus sp*, y una a *Bothrops sp*.

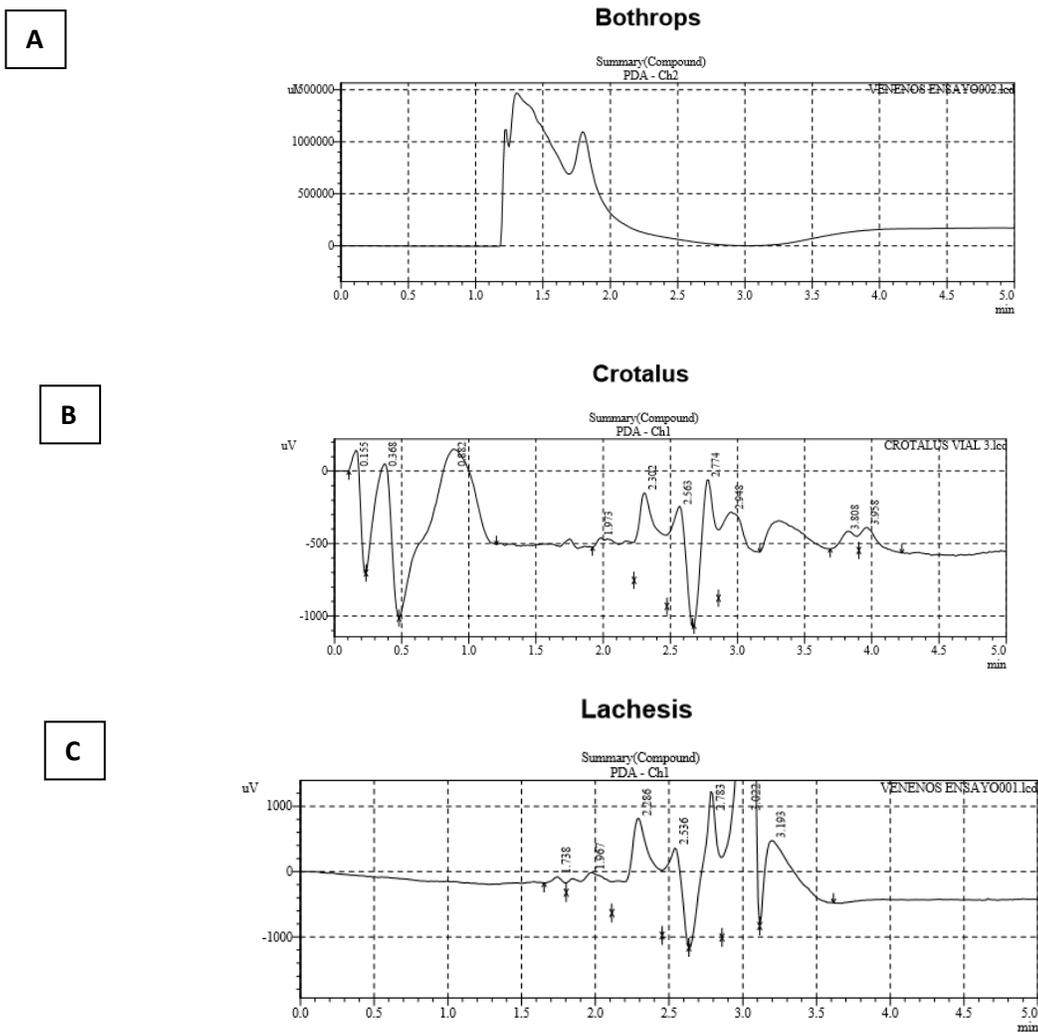


Figura 14. Cromatograma Fragmento 0-5. A. Muestra *Bothrops sp*. B. Muestra *Crotalus sp*. C. Muestra *Lachesis sp*

En la fracción de 0-5 minutos fue en la que se obtuvo un mayor número de picos indicando una mayor concentración proteica en las 3 muestras (Figura 14), sin embargo en la muestra correspondiente a *Bothrops sp* no hay una total separación de los picos

obtenidos, mientras que para las muestras de *Crotalus sp* y *Lachesis sp* los picos obtenidos entre los minutos 2 y 4 presentan un comportamiento similar aunque en la muestra de *Lachesis sp* el pico que va de 2,7 a 3,1 minutos presenta la mayor altura. Y también se resalta que entre el minuto 0 a 1 hay grupo de picos que solo se presentan en la muestra de *Crotalus sp*. (Figura 14).

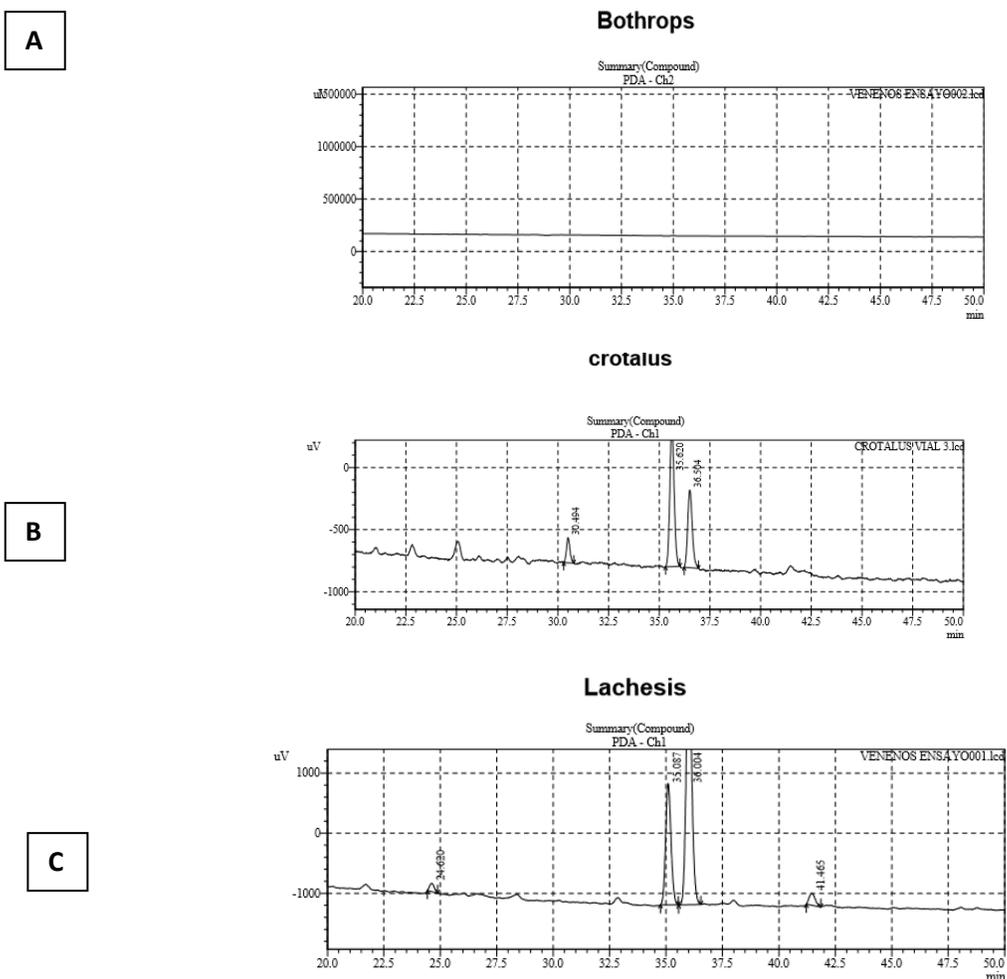
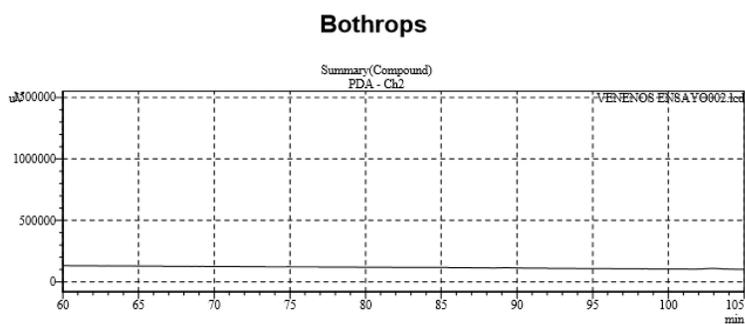


Figura 15. Cromatograma Fragmento 20-50 A. Muestra *Bothrops sp*. B. Muestra *Crotalus sp*. C. Muestra *Lachesis sp*.

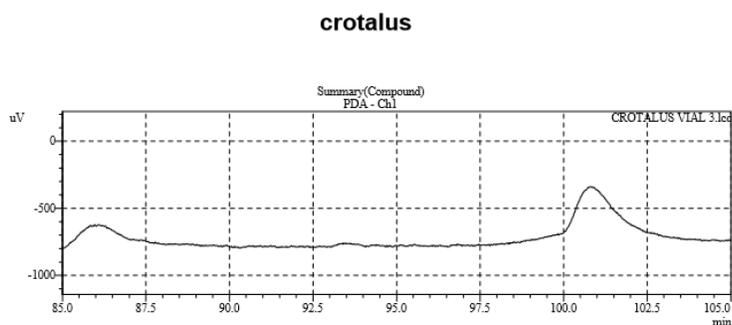
En la fracción comprendida entre 20-50 minutos solo se obtuvieron picos en las muestras de *Crotalus sp* y *Lachesis sp* principalmente los que se encuentran entre los minutos 34 y

37 los cuales presentan la mayor concentración proteica para esta fracción. Y en el caso de la muestra de *Crotalus sp* hay un pico en el minuto 30 que solo se ve en esta muestra (Figura 15).

A



B



C

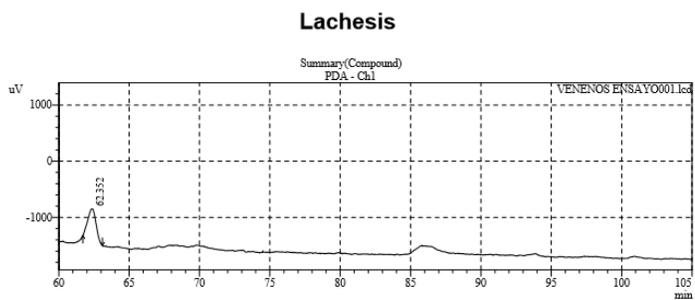
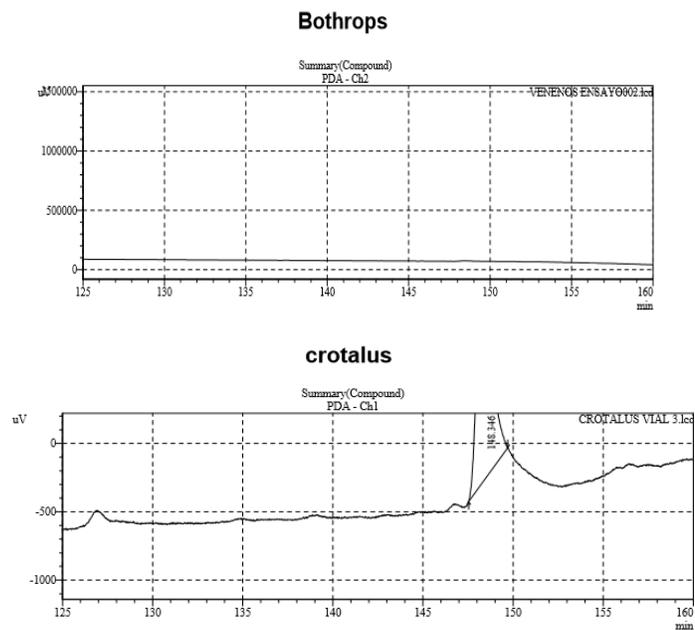


Figura 16. Cromatograma Fragmento 60-105. A. Muestra *Bothrops sp.* B. Muestra *Crotalus sp.* C. Muestra *Lachesis sp.*

Para la fracción entre el minuto 60 al 105 se obtuvieron dos picos para las muestras de *Crotalus sp* y *Lachesis sp*. De estos cuatro picos solo uno está bien definido y es de *Lachesis sp* entre el minuto 60 y 65, mientras que el pico que se observa en esta muestra entre el minuto 85 y 90 no está bien definido al igual que los picos de la muestra de *Crotalus sp* que se obtuvieron en los mismos rangos de tiempo (Figura 16).

A

B



C

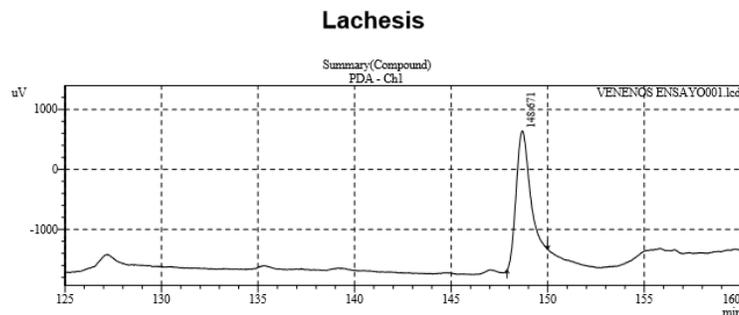


Figura 17. Cromatograma Fragmento 125-160min. A. Muestra *Bothrops sp.* B. Muestra *Crotalus sp.* C. Muestra *Lachesis sp.*

En la última fracción de 125-160 minutos se obtuvieron dos picos bien definidos que presentan alta concentración proteica estos se encuentran entre el minuto 148 a 153 en especial el de la muestra de *Crotalus sp* que presenta la mayor área y altura de los dos picos obtenidos. También se pueden ver dos picos en estas mismas muestras entre el minuto 125 y 130 pero estos no están tan diferenciados y presentan una baja concentración proteica. (Figura 17).

Posteriormente teniendo en cuenta la estandarización del método se analizaron los perfiles de 5 muestras de venenos correspondientes 2 al género *Bothrocophias sp*, 2 muestras a *Crotalus sp*, y una a *Bothrops sp*.

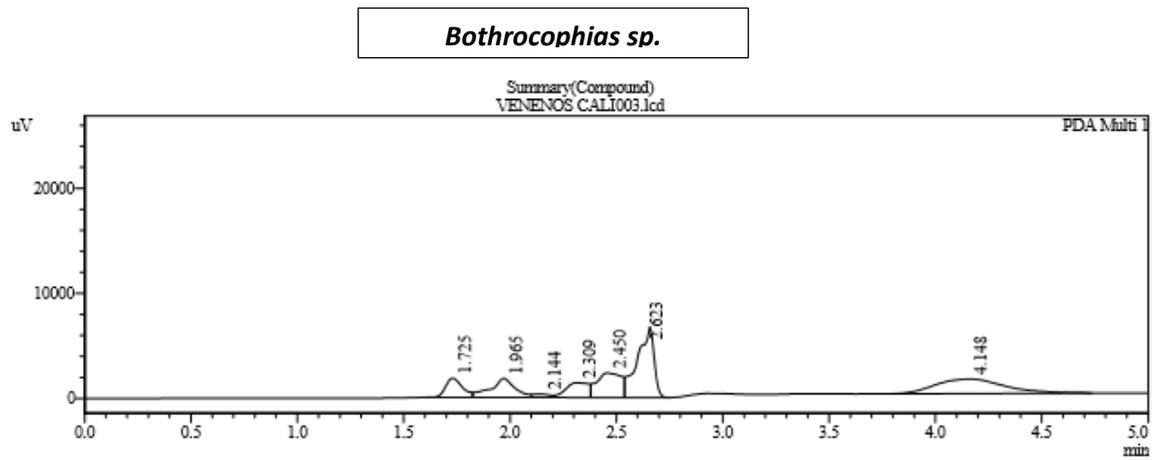


Figura 18. Cromatograma veneno *Bothrocophias sp.* Muestra 1 Fragmento 0-5 minutos.

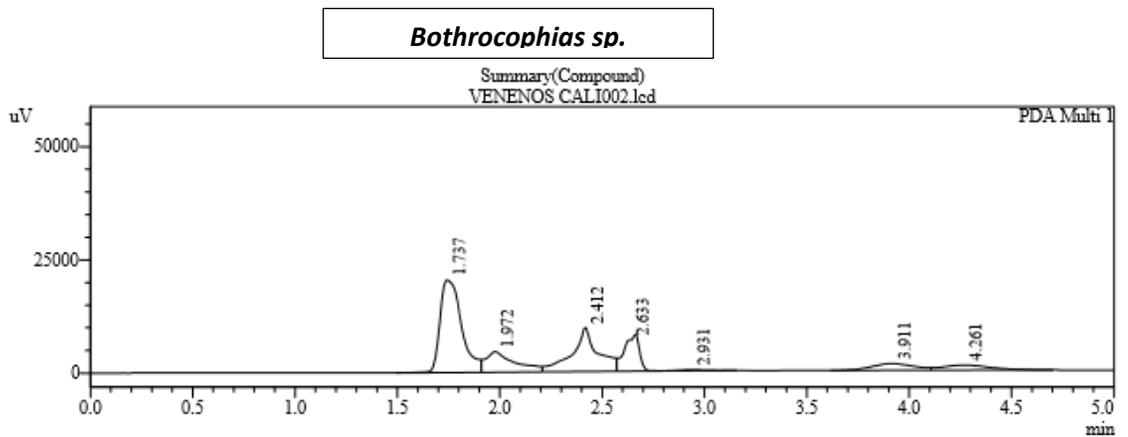


Figura 19. Cromatograma veneno *Bothrocophias sp.* Muestra 2 Fragmento 0-5 minutos.

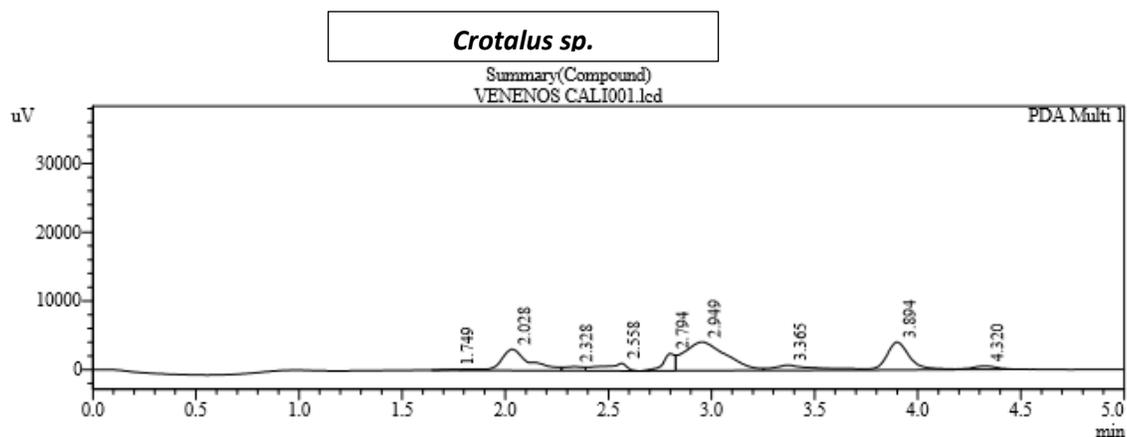


Figura 20. Cromatograma veneno *Crotalus sp.* Muestra 1 Fragmento 0-5 minutos.

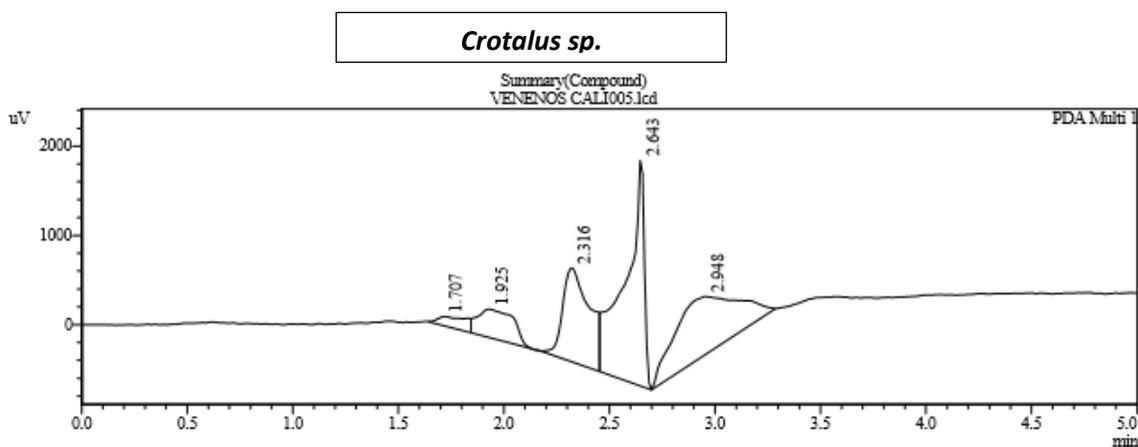


Figura 21. Cromatograma veneno *Crotalus sp.* Muestra 2 Fragmento 0-5 minutos.

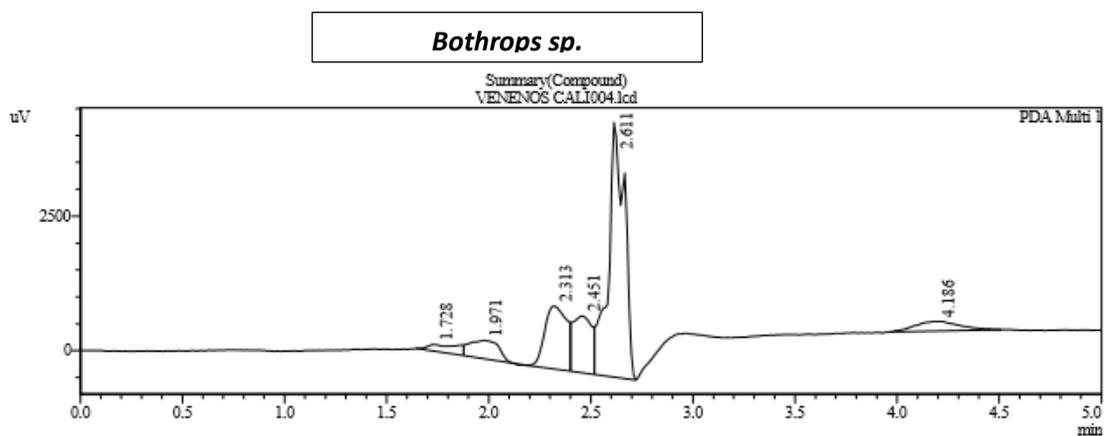


Figura 22. Cromatograma veneno *Bothrops sp.* Fragmento 0-5 minutos.

En la fracción de 0-5 minutos se obtuvo un bajo número de picos indicando una menor concentración proteica en las cinco muestras, tanto para las dos muestras de *Bothrocophias sp* y la primer muestra de *Crotalus sp* (Figuras 18 a 20), los picos obtenidos entre los minutos 1.5 y 4 presentan un comportamiento similar con picos poco marcados y de baja concentración, aunque en la muestra 2 de *Bothrocophias sp* el pico que va del minuto 1.6 al 1.9 esta marcado en relación a las otras dos muestras de comportamiento similar. Sin embargo en las muestras correspondientes a *Bothrops sp* y la segunda muestra de *Crotalus sp* no hay una total separación de los picos obtenidos, se resalta que entre el minuto 2.5 al 2.7 se encuentran los picos de mayor concentración tanto en la muestra 2 de *Crotalus sp* siendo este el mayor de las 5 muestras para esta primera fracción (Figura 21), seguido del obtenido para *Bothrops sp* (Figura 22).

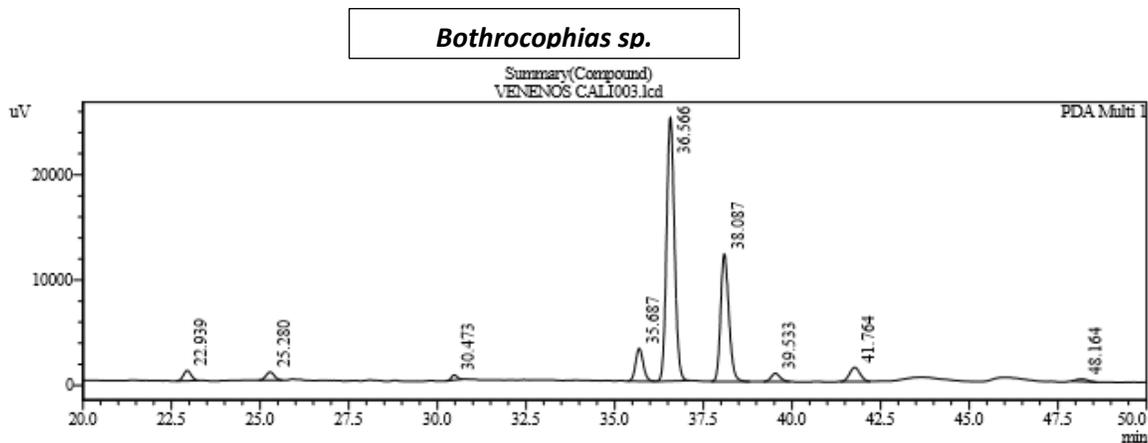


Figura 23. Cromatograma veneno *Bothrocophias sp.* Muestra 1 Fragmento 20-50 minutos

Bothrocophias sp.

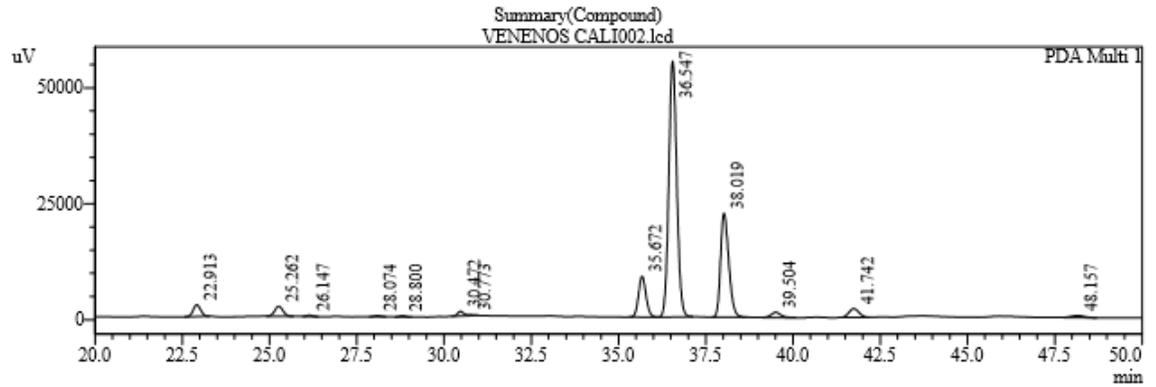


Figura 24. Cromatograma veneno *Bothrocophias sp.* Muestra 2 Fragmento 20-50

Minutos.

Crotalus sp.

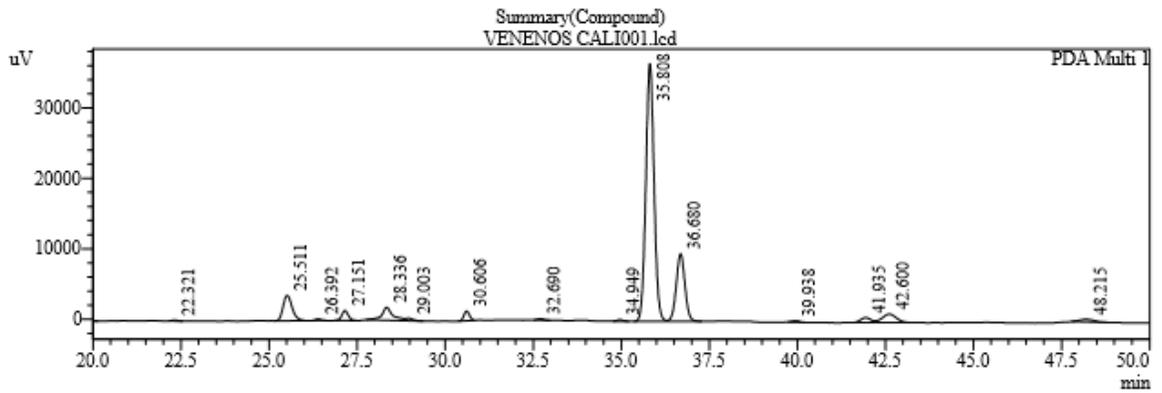


Figura 25. Cromatograma veneno *Crotalus sp.* Muestra 1 Fragmento 20-50 minutos.

Crotalus sp.

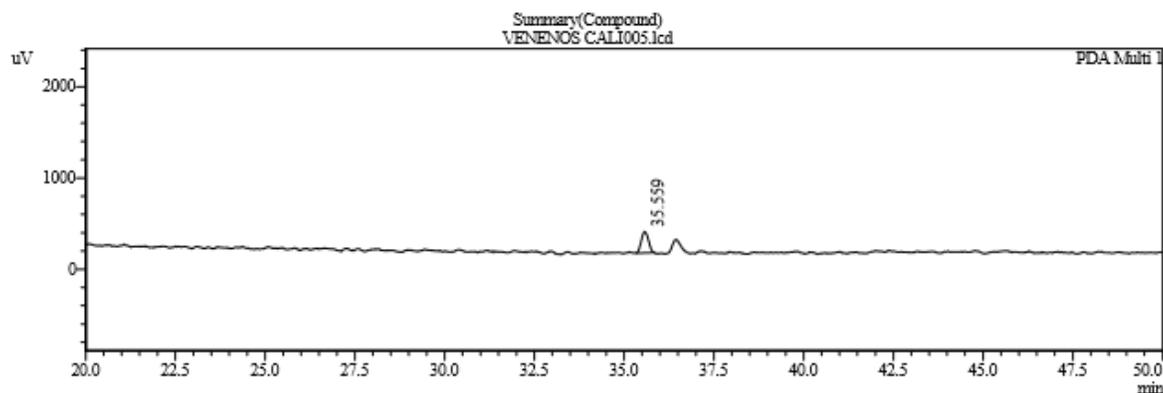


Figura 26. Cromatograma veneno *Crotalus sp.* Muestra 2 Fragmento 20-50 minutos.

Bothrops sp.

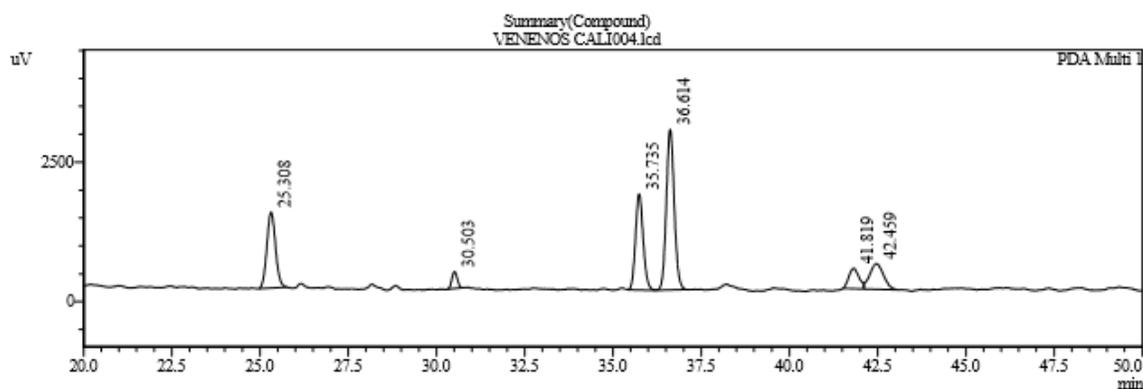


Figura 27. Cromatograma veneno *Bothrops sp.* Fragmento 20-50 minutos

En la fracción comprendida entre 20-50 minutos se obtuvieron picos en las 5 muestras analizadas principalmente los picos se encontraron entre los minutos 35 al 40 los cuales presentan la mayor concentración proteica para esta fracción (Figuras 23 a 27), sin embargo en la muestra 2 de *Crotalus sp* (figura 26), los picos obtenidos entre estos minutos son los únicos presentes en esta muestra para esta fracción, están poco definidos y son de baja concentración en relación a las otras 4 muestras. Y en el caso de la muestra de *Bothrops sp*

hay un pico en el minuto 25.5 (Figura 27), que está totalmente diferenciado en comparación a las muestra de *Bothrocophias sp* y la muestra 1 de *Crotalus sp* en las cuales este pico no se diferencia bien (Figuras 23 a 25).

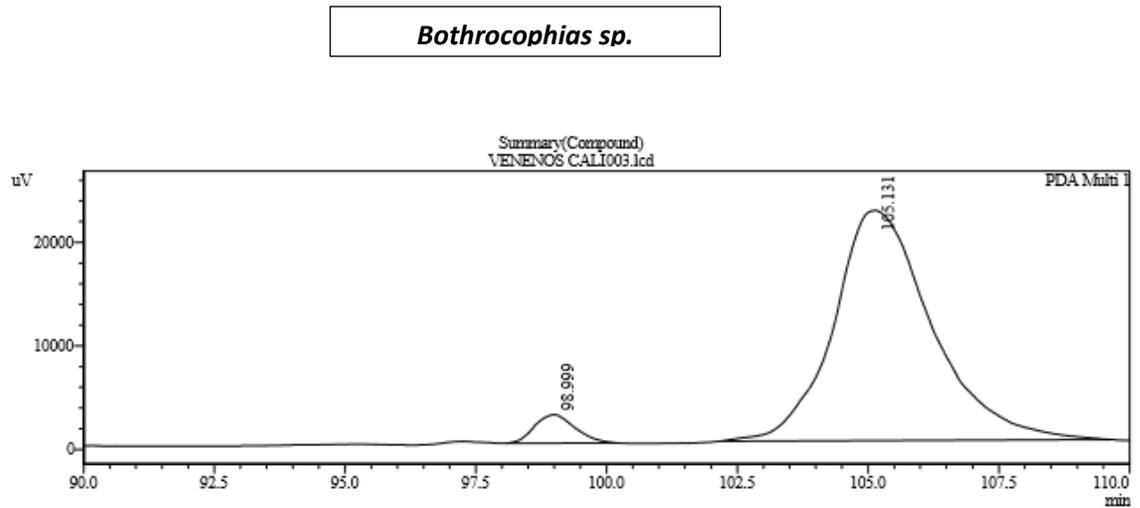


Figura 28. Cromatograma veneno *Bothrocophias sp.* Muestra 1 Fragmento 90-110 minutos

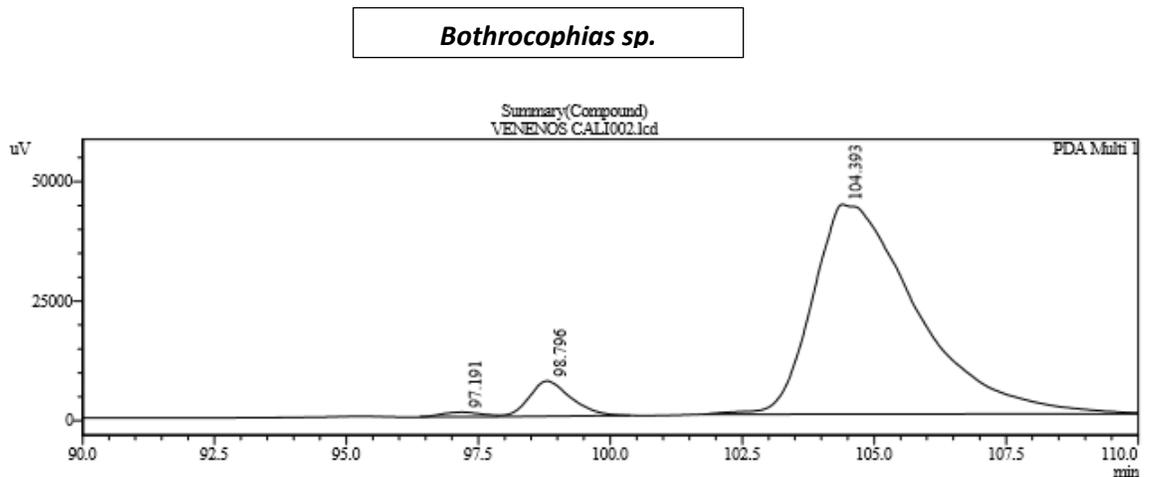


Figura 29. Cromatograma veneno *Bothrocophias sp.* Muestra 2 Fragmento 90-110 minutos.

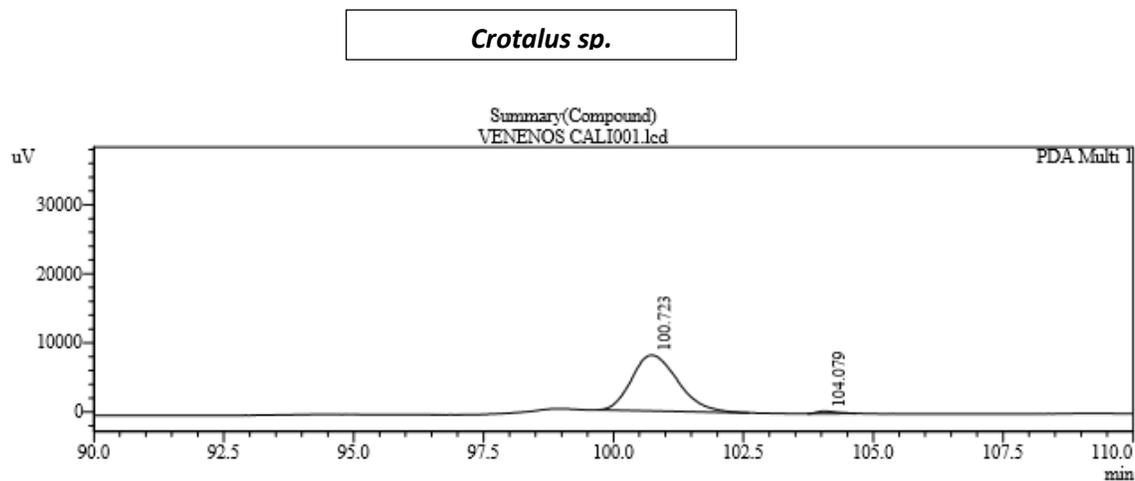


Figura 30. Cromatograma veneno *Crotalus sp.* Muestra 1 Fragmento 90-110

minutos

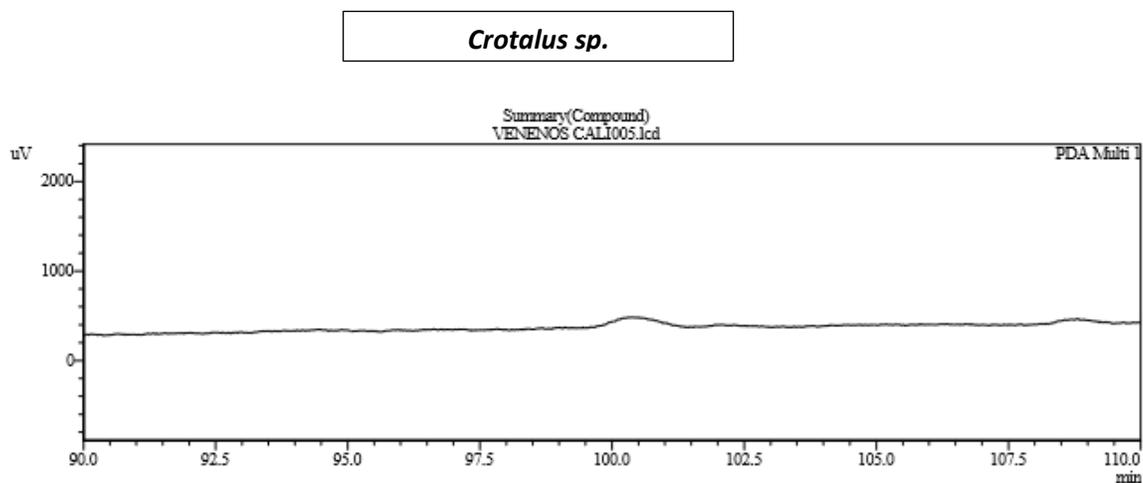


Figura 31. Cromatograma veneno *Crotalus sp.* Muestra 2 Fragmento 90-110

minutos.

Bothrops sp.

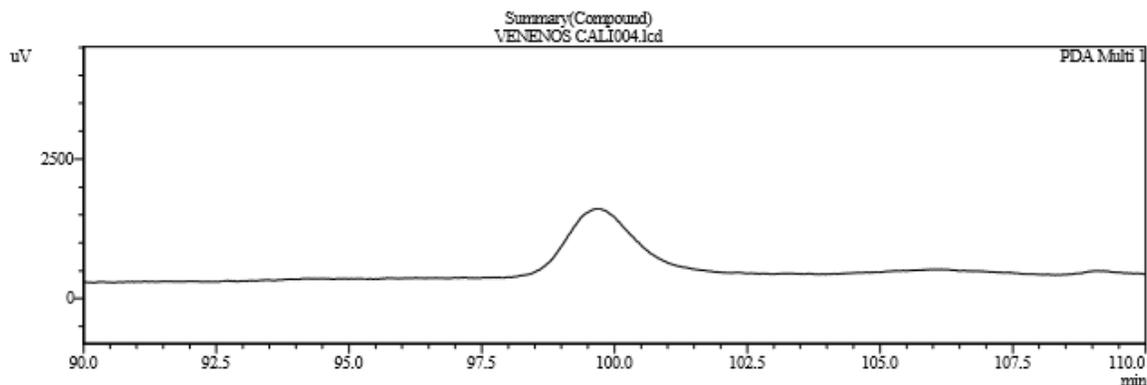


Figura 32. Cromatograma veneno *Bothrops sp.* Fragmento 90-110 minutos

Para la fracción entre el minuto 90 al 110 se obtuvieron dos picos para las muestras de *Bothrocophias sp* (Figuras 28 y 29). El primero de estos picos se observó ente el minuto 98 y el minuto 100, este pico también se obtuvo para la muestra de *Bothrops sp* pero este presenta una concentración muy baja en relación a los picos correspondientes a las muestras de *Bothrocophias sp*, mientras que los otros picos son los de mayor concentración y solo se obtuvieron en las muestras de *Bothrocophias sp* entre los minutos 102 y 108 (Figuras 28 y 29). En cuanto a las muestras de *Crotalus sp* solo se observó un pico presente en la muestra 1 (Figura 30) entre los minutos 100 y 102.

Bothrocophias sp.

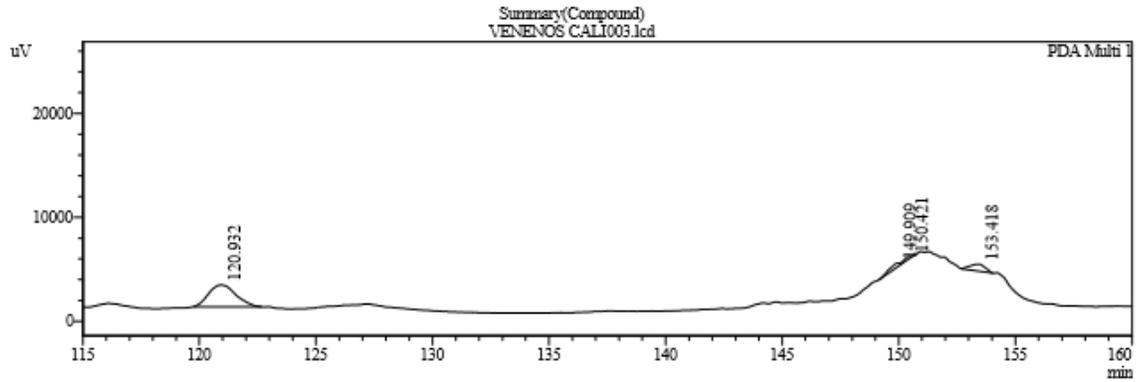


Figura 33. Cromatograma veneno *Bothrocophias sp.* Muestra 1 Fragmento 115-160 minutos

Bothrocophias sp.

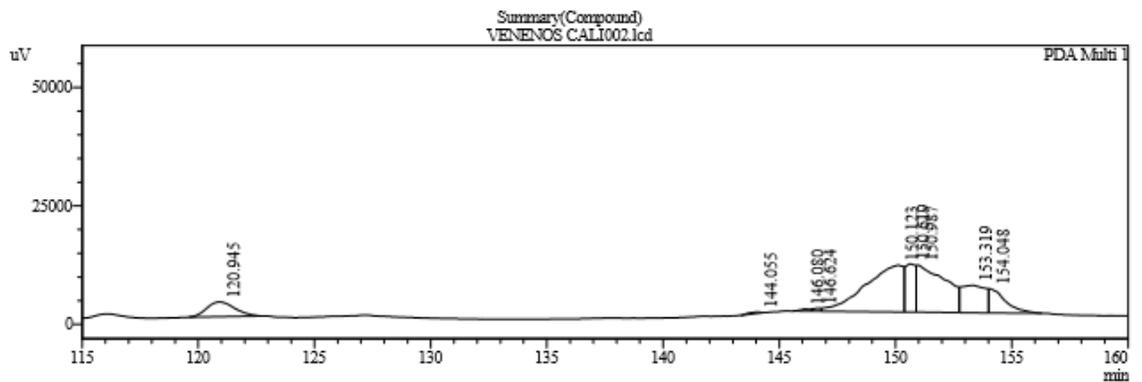


Figura 34. Cromatograma veneno *Bothrocophias sp.* Muestra 2 Fragmento 115-160 minutos.

Crotalus sp.

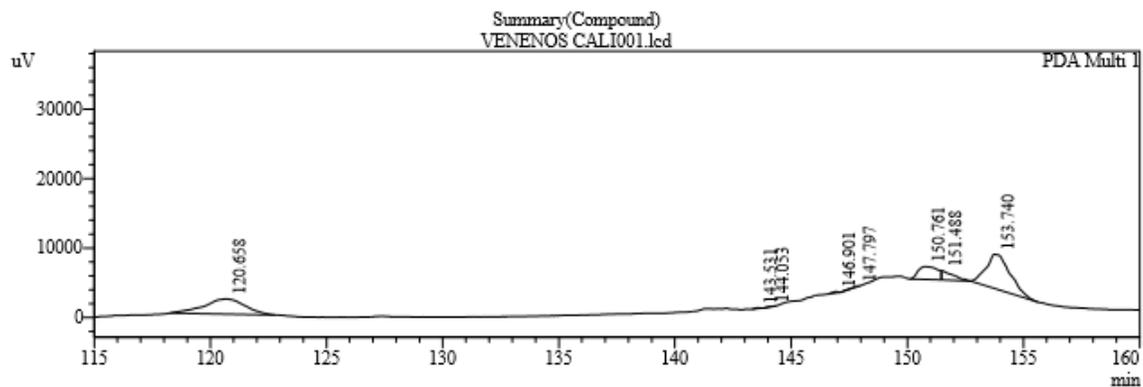


Figura 35. Cromatograma veneno *Crotalus sp.* Muestra 1 Fragmento 115-160 minutos.

Crotalus sp.

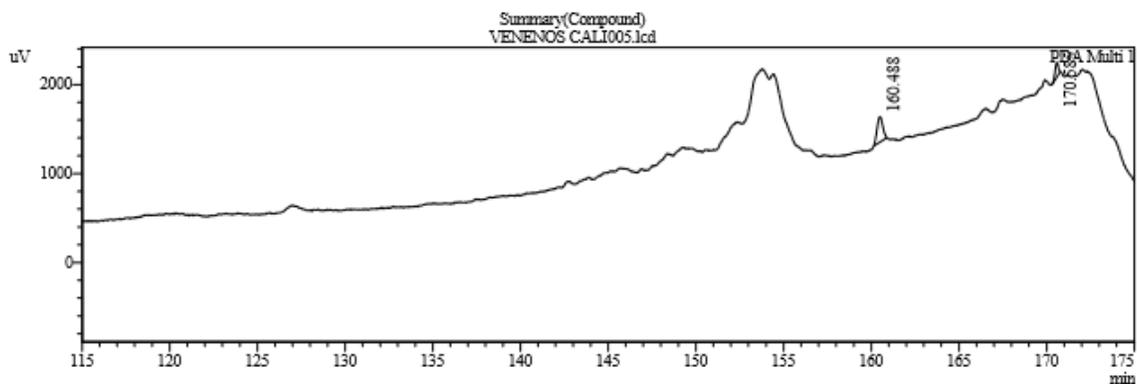


Figura 36. Cromatograma veneno *Crotalus sp.* Muestra 2 Fragmento 115-175 minutos.

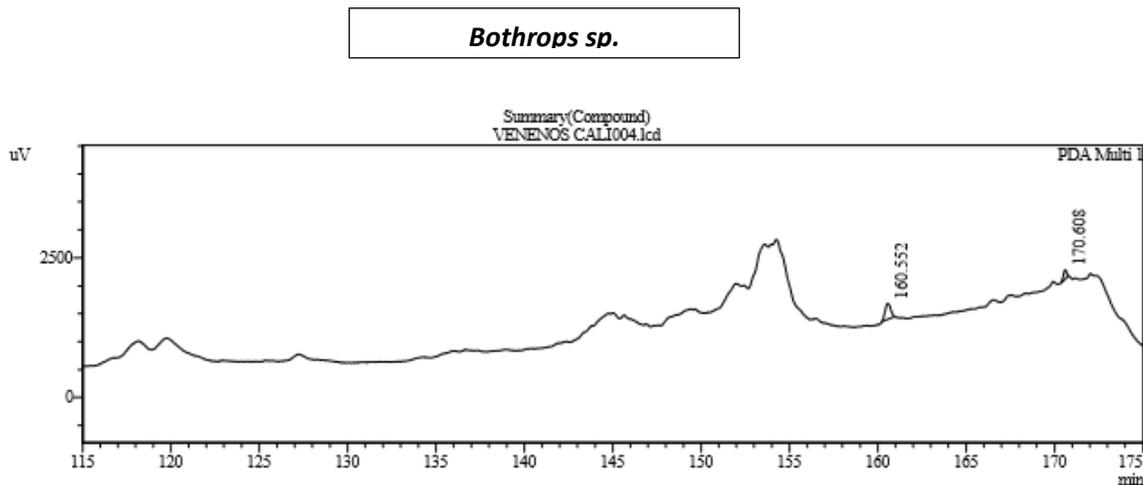


Figura 37. Cromatograma veneno *Bothrops sp.* Fragmento 115-175 minutos.

En la última fracción de 115-175 minutos se obtuvieron tres picos bien definidos en comparación a lo demás presentes en los cromatogramas, estos picos presentan baja concentración proteica y se encuentran entre el minuto 117 y 123 en las muestras de *Bothrocophias sp* (Figuras 33y 34), y en la muestra 1 de *Crotalus sp* que presenta la mayor área y altura de los tres picos obtenidos (Figura 35). También se pueden ver picos en las 5 muestras ente el minuto 150 y 160 pero estos no están tan diferenciados y presentan una concentración proteica aún más baja que los picos anteriormente mencionados. (Figuras 33 a 37).

La caracterización de los venenos de las serpientes de los géneros *Bothrocophias sp*, *Bothrops sp* y *Crotalus sp* se realizó a partir del veneno puro sin ser previamente fraccionado tanto para la cromatografía como para la electroforesis obteniendo los perfiles tanto cromatográficos como electroforéticos del total del veneno de cada una de las muestras.

Para las cuatro corridas electroforéticas la mayoría de bandas que se obtuvieron presentan pesos moleculares entre los 15 y 50KDa, estos resultados son similares a los obtenidos en los trabajos realizados por Núñez y colaboradores en 2009, en el cual la mayoría de las bandas obtenidas para el veneno de *Bothrops atrox* van de los 31 a los 55KDa (Núñez , y otros, 2009), los resultados también concuerdan con lo obtenido por Calvete y colaboradores en 2011 para los venenos de *Bothrops atrox* de Colombia (Magdalena Medio) para este veneno la mayoría de bandas tienen pesos moleculares entre los 14.4 y los 31KDa, mientras que para el veneno de *Bothrops atrox* de Venezuela los pesos moleculares de la mayoría de bandas se encuentran entre los 31 y 55KDa (Calvete, y otros, 2011). Del mismo los resultados obtenidos se asemejan a lo reportado por Castro y colaboradores en 2013 para el veneno de *Crotalus simus culminatus*, para este veneno la mayoría de las proteínas separadas presentaron pesos moleculares entre 16 y 47KDa.

Por último las proteínas separadas que presentaron pesos moleculares entre los 14 y 16KDa coinciden con los resultados obtenidos por Lozano en 2014, quién obtuvo bandas en posiciones similares correspondientes a los venenos de *Crotalus durissus*, *Bothrops asper*, y *Bothrocophias myersi*, estas bandas coinciden con el marcador de peso molecular de 14kDa evidenciando la presencia de PLA2 en los venenos de ese trabajo (Lozano González, 2014), lo anterior sugiere la presencia de esta enzima en los venenos de los tres géneros de serpientes analizados , sin embargo para confirmar la presencia de estas enzimas es necesario realizar la medición de actividades biológicas obteniendo así una caracterización completa de los diferentes componentes de los venenos.

Por otra parte en los perfiles cromatográficos en las fracciones 0-5 minutos y del minuto 20 al 50 fueron las que mayor número de picos presentaron con 34 y 44 respectivamente,

mientras que la fracción del minuto 115 al 175 presentó 25 picos de concentración. Hay que tener en cuenta que al trabajar con el veneno puro la separación de las proteínas es más compleja y por ende no se obtiene una óptima resolución de los picos de concentración.

Teniendo en cuenta la rampa de corrida para los cromatogramas, las proteínas separadas en las fracciones del minuto 0 al 5 y entre los minutos 20 al 50 son más polares ya que estas son más afines por la fase móvil en la que hay un mayor porcentaje de agua que de acetonitrilo, teniendo un 5% de acetonitrilo para la fracción de 0a 5 minutos y del 10 al 18% para la fracción de 20 a 50 minutos. Mientras que en la fracción del minuto 115 al 175 las proteínas separadas son menos polares y por ende más afines a la porción de la fase móvil que presenta un porcentaje entre el 40 y 70% de acetonitrilo en comparación a las otras dos fracciones.

En los cromatogramas de las dos muestras de *Bothrocophias sp* se encuentran una serie de picos similares para las 4 fracciones analizadas, en la fracción de 0 a 5 minutos específicamente entre el minuto 1.7 y 2.7 siendo el pico del minuto 1.737 de la muestra 2 de *Bothrocophias sp* el de mayor concentración, entre el minuto 4 y 4.5 también hay un pico en común para las muestras de este género. De igual forma en la fracción comprendida del minuto 20 al 50 hay 9 picos comunes para las muestras de *Bothrocophias sp*, estos corresponden a los minutos 23, 25, 30, 35.5 y 36 a 37 el cual es el de mayor concentración, seguido del pico obtenido en el minuto 38, y los otros 3 picos se encontraron en los minutos 39, 41 y 48 respectivamente. En la fracción del minuto 90 al minuto 110 se obtuvieron 2 picos comunes para este género y uno que solo se presentó en la muestra 1, los picos comunes se encuentran entre el minuto 98 y el minuto 100 el primero y el segundo entre el minuto 102 al 110, siendo este el de mayor concentración en especial para la muestra 1 de

Bothrocophias sp, mientras que solo en la muestra 2 se observó un pico de baja concentración al minuto 97. La última fracción va desde el minuto 115 al 160, en esta se observa un pico común para las dos muestras de *Bothrocophias sp* presente en el minuto 120, mientras que en los minutos 144 a 160 se observan una serie de picos en las dos muestras pero la resolución de estos no es óptima.

Los cromatogramas de las muestras de veneno de *Crotalus sp* para la fracción del minuto 0 al 5 evidenciaron entre el minuto 1.7 al 3 hay una serie de picos similares para ambas muestras siendo los picos del minuto 2 y 2.9 los de mayor concentración para la muestra 1 y los del minutos 2.3 y 2.6 los de mayor concentración para la segunda muestra, mientras que en el minuto 3.9 se obtuvo un pico que solo está presente en la muestra 1. Para la fracción entre los minutos 20 y 50 solo se encontró un pico común para las dos muestras en el minuto 35 y el cual es de mayor concentración para la muestra 1, en esta muestra hay un total de 15 picos mientras que en la muestra 2 solo se observan dos picos. En la fracción del minuto 90 al 110 solo se observaron picos de concentración para la muestra 1 estos corresponden al minuto 100 y 104 de los cuales el del minuto 100 es el de mayor concentración. En la última fracción comprendida entre los minutos 115 a 175 no se obtuvieron picos en común para las dos muestras de *Crotalus sp*, en el cromatograma de la muestra 1 se obtuvieron picos desde el minuto 120 hasta el minuto 154, siendo este último el de mayor concentración para ambas muestras, mientras que en el cromatograma de la muestra 2 los picos se encontraron a partir del minuto 160 hasta el 170.

Por último en los cromatogramas para la muestra de *Bothrops sp*, en la fracción de 0 a 5 minutos se obtuvieron 6 picos siendo el presente en el minuto 2,6 el de mayor concentración para esta fracción, entre el minuto 20 y 50 se pudieron observar 6 picos

siendo el de mayor concentración el del minuto 36, en la fracción del minuto 90 al 110 solo se obtuvo un pico en el minuto 100, y finalmente en la fracción de los 115 a los 175 minutos se evidenciaron 2 picos uno en el minuto 160 y que es el de mayor concentración y el último en el minuto 170.

Los picos comunes para las 5 muestras correspondientes a los 3 géneros se encuentran en los minutos 1.7 y 2.6 para la fracción de 0 a 5 minutos, siendo el correspondiente al minuto 2, 6 de la muestra 2 de *Crotalus sp* el de mayor concentración para las 5 muestras, con respecto a la fracción del minuto 20 al 50, hay un pico en común para las 5 muestras que se observó al minuto 35 de todos los cromatogramas, de estos cinco picos el evidenciado en la muestra 1 de *Crotalus sp* es el de mayor concentración, para las 2 muestras de *Bothrocophias sp*, la muestra 1 de *Crotalus sp* y la muestra de *Bothrops sp* hay un pico común en el minuto 36 el cual es de mayor concentración para las muestras de *Bothrocophias sp*.

Por otro lado en la fracción del minuto 90 al 110 se observaron picos comunes en el minuto 100 para la muestra de *Bothrops sp* y la muestra 1 de *Crotalus sp* mientras que un pico similar se observa en el minuto 98 de los cromatogramas de las muestras de *Bothrocophias sp*, al igual que en el minuto 105 hay un pico común para las 2 muestras de *Bothrocophias sp* y la muestra 1 de *Crotalus sp* de los cuales es el correspondiente a la muestra 1 de *Bothrocophias sp* es el de mayor concentración para esta fracción analizada. Por último entre los minutos 115 y 175 de los cromatogramas se obtuvieron picos comunes en los minutos 120 y 155 para las muestras de *Bothrocophias sp* y la muestra 1 de *Crotalus sp* siendo esta última muestra la que presenta el pico con mayor concentración de las 3, al igual se obtuvieron picos comunes para la muestra de *Bothrops sp* y la muestra 2 de

Crotalus sp en los minutos 160 y 170 de los cuales el de la muestra 2 de *Crotalus sp* es el de mayor concentración mientras que los picos del minuto 170 no presentan una resolución óptima.

8. Conclusiones

- La muestra 2 del género *Bothrocophias* es la que presenta mayor porcentaje de proteína.
- El veneno proveniente de las serpientes del género *Bothrocophias* es el que presentó proteínas con mayor peso molecular evidenciadas en la electroforesis con bandas de hasta 190KDa.
- Las proteínas más representativas de los venenos de las serpientes pertenecientes a la familia *Viperidae* presentan pesos moleculares de 15 20 y 50KDa, y también se encuentran proteínas altamente polares separadas en los minutos 1.7 y 2.6 y una proteína medianamente polar en el minuto 35 de los cromatogramas analizados, de manera que se requiere los ensayos de actividades biológicas con el fin de establecer como criterio de control de calidad de la materia prima (venenos), para la producción de sueros antiofídicos.

9. Recomendaciones

- Realizar el fraccionamiento de las proteínas mediante cromatografía de exclusión de masas y coleccionar fracciones de importancia para analizar mediante electroforesis para tener una caracterización bioquímica más específica de las proteínas presentes en los venenos.

- Realizar pruebas de actividades biológicas para los venenos teniendo así una caracterización tanto bioquímica como biológica de los venenos, de manera que se establezca la correlación entre estas variables.
- Tener mucho cuidado y utilizar los elementos de seguridad y de trabajo adecuados para la correcta manipulación de las muestras.

10. Referencias Bibliográficas.

- Aragón Ortiz, F., & Gubensek, F. (1978). Characterization of thrombin - like proteinase from bothrops asper venom. *Toxins*, 107–111.
- Bolag, D., & Edelstein, S. (1991). *Protein Methods*. New York: Wiley-Liss.
- Calvete, J., Sanz, L., Pérez, A., Borges, A., Vargas, A., Lomonte, B., Moura Da Silva, A. (2011). Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. *Journal of Proteomics*, 510-527.
- Castro, E., Lomonte, B., Gutiérrez, M., & Alagn, A. (2013). Intraespecies variation in the venom of the rattlesnake *Crotalus simus* from México: Different expression of crotoxin results in highly variable toxicity in the venoms of three subspecies. *Journal of Proteomics*, 103-121.
- Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. (2007). *Técnicas Cromatográficas*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- García, H., & Vázquez, R. (1998). *Cuantificación de proteínas: Una revisión*. Instituto de Biotecnología UNAM.
- Grupo de Enfermedades Transmisibles, Equipo de zoonosis. (2014). *Protocolo en salud pública: Accidente Ofídico*. Instituto Nacional de Salud.
- Gutiérrez, J. (2002). Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Revista de Biología Tropical*.
- Gutiérrez, J., & Cerdas, L. (1984). Mecanismo de acción de miotoxinas aisladas de venenos de serpientes. *Revista de Biología Tropical*, 213-221.
- Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., Rojas, G., Gené, J., Chaves, F., Estrada, R., Robles, A. (2009). El suero antiofídico polivalente producido en Costa Rica, estabilidad y capacidad neutralizante. *Instituto Coldomiro Picado*.
- Hurtado, O., Urán, J., & Villa, J. (2013). Protocolo de atención prehospitalaria para el manejo integral del accidente ofídico bothrópico en Colombia. Universidad CES.
- Johnson, M. (29 de 2 de 2012). *Cuantificación de Proteínas*. Obtenido de Labome: <http://www.labome.es/method/Protein-Quantitation.html>

- Kornberg, A. (1990). Why Purify Enzymes? *Methods in enzymology*, 1-5.
- Kuch, U., Mebs, D., Gutiérrez, J., & Freire, A. (1996). Biochemical and biological characterization of ecuadorian pitviper venoms (genera *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Bothrops* and *Lachesis*). *Toxicon*, 714-717.
- Lemus, M., & Cortez Suárez, L. A. (2015). *Bioquímica General: Fundamentos y Análisis de Laboratorio*. Machala: Ediciones utmach.
- Lozano González, T. (2014). Identificación de proteínas con actividad PLA2 en el veneno de la serpiente *Bothrocophias myersi*. Universidad ICESI.
- Luque Guillén, M. V. (3 de junio de 2009). Estructura y Propiedades de las Proteínas. Obtenido de Universidad de Valencia: http://www.uv.es/tunon/pdf_doc/proteinas_09.pdf
- Markland, F. (1998). Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*, 1749–1800.
- Mendoza, J., Vivas, D., Inga, R., Arbaiza, E., & Rodríguez, E. y. (2009). Patrones electroforéticos de los venenos de serpientes peruanas de los géneros *Bothrops* y *Lachesis*. *Revista de la Sociedad Química*.
- Ministerio de Salud y Protección Social, (22 de julio de 2014). DECRETO NÚMERO 1375.
- Ministerio de Salud y Protección Social, (16 de mayo de 2017). DECRETO NÚMERO 821.
- Morales Sánchez, D., & Gallo Ramírez, L. E. (2006). Plataformas de proteómica. Curso: “Métodos Físico-Químicos en Biotecnología”. Cuernavaca Morelos: Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Múnera Bohórquez, G. (2011). Manejo del accidente ofídico. *Revista Colombiana de Ortopedia y Traumatología*.
- Núñez, V., Cid, P., Sanz, L., De La Torre, P., Angulo, Y., Lomonte, B., Calvete, J. (2009). Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards pedomorphism. *Journal of Proteomics*, 5 7– 78.
- Organización Mundial de la Salud. (2010). WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins.
- Patiño C, B. S. (2002). Serpientes venenosas. Grupo de Estudio de Animales.
- Patiño, A., Pereañez, J., Gutiérrez, J., & Rucavado, A. (2013). Biochemical and Biological characterization of two serine proteinases from Colombian *Crotalus durissus cumanensis* snake venom. *Toxicon*, 32-43.
- Pirela De las Salas, R., López Jonsthor, J., & Hernández Rangel, J. (2006). Caracterización toxinológica total del veneno de la serpiente cascabel *Crotalus durissus cumanensis* (*Viperidae*), presente en la localidad de Porshoure, Guajira Venezolana. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 232-238.
- Resolución número 00001478 (Ministerio de Salud y Protección Social 22 de abril de 2016).

- Rodríguez Del Castillo, A. (2006). Determinación de proteínas por el método de Lowry, San Cristóbal de La Laguna, Universidad de la Laguna.
- Rodríguez, C., & Varela, N. (2014). Guía para el manejo y cuidado de ofidios. Memorias de la Conferencia Interna en medicina y Aprovechamiento de Fauna Silvestre Exótica y no Convencional.
- Salazar, D., Mora, D., Fernandez, M., Loaiza, A., Gibbs, L., & Lomonte, B. (2014). Proteomic and toxicological profiling of the venom of *Bothrocophias campbelli*, a pitviper species from Ecuador and Colombia. *Toxicon*, 15-25.
- Scopes, R. (1994). *Protein Purification: Principles and Practice*. New York: Springer-Verlag.