

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Comparación de la composición proteica del veneno de *Bothrops jararaca*
de la Mata Atlántica de Brasil y *Bothrops asper* proveniente del Occidente
del Ecuador**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias
Biológicas**

Genética y bioinformática

Joseph Ahrim Espin Angulo

Quito, 2023

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del estudiante Joseph Ahrim Espin Angulo ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas, por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra. Doris Jimena Vela Peralta

Directora de la Disertación

Quito, 12 de junio de 2023

DEDICATORIA

A mi madre, Mishell Angulo.

Por su esfuerzo, sacrificio y apoyo constante. Gracias por darme el regalo de la educación.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a toda mi familia por su apoyo incondicional y por estar siempre pendientes de mí.

A mis abuelos Mariana Álvarez y Romel Angulo, por preocuparse y darme ánimo cada día.

A Doris Vela, que supo guiarme en aquellos momentos en los que dudaba y que me brindó mucha información acerca del mundo de las proteínas.

A Franco Cabrera, por compartirme sus conocimientos en bioinformática y por darme una mano cuando lo necesitaba.

A todos mis compañeros del curso que me acompañaron en la carrera, en especial a Gabriela Carrera cuya amistad aprecio mucho, ya que estuvo apoyándome en los buenos y malos momentos.

A mis lectores Omar Torres y Romain Guyot, que me brindaron parte de su tiempo en la revisión del presente trabajo.

A todos los investigadores que han proporcionado información de libre acceso, la cual fue fundamental para este trabajo de titulación.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN:.....	3
4. OBJETIVOS.....	8
4.1. OBJETIVO GENERAL	8
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
5. MATERIALES Y MÉTODOS:.....	9
5.1. Obtención de información:.....	9
5.2. BLAST.....	9
5.3. Alineamiento y familias proteicas más representativas	10
6. RESULTADOS	11
6.1. BLAST realizado a través de la terminal de Linux.....	11
6.2. Alineamiento para cada proteína desde el programa Jalview	13
6.3. Recopilación de todas las proteínas obtenidas	17
7. DISCUSIÓN.....	18
8. CONCLUSIÓN.....	24
9. BIBLIOGRAFÍA:.....	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alineamiento de la conotoxina con respecto al contig de <i>Bothrops asper</i>	14
Figura 2. Alineamiento de la arilsulfatasa con respecto al contig de <i>Bothrops jararaca</i> y <i>Bothrops asper</i>	14
Figura 3. Alineamiento de la arilsulfatasa-I con respecto al contig de <i>Bothrops jararaca</i> y <i>Bothrops asper</i>	14
Figura 4. Alineamiento de la neurotoxina SNTX-3 con respecto al contig de <i>Bothrops jararaca</i>	15
Figura 5. Alineamiento de la fosfolipasa A2 con respecto al contig de <i>Bothrops jararaca</i> y <i>Bothrops asper</i>	15
Figura 6. Alineamiento de la esfingomielinasa D con respecto al contig de <i>Bothrops jararaca</i> y <i>Bothrops asper</i>	16
Figura 7. Alineamiento de la toxina CfTX-A con respecto a las proteínas obtenidas de Pfam a partir de la secuencia de <i>Chironex fleckeri</i>	16
Figura 8. Alineamiento del veneno alérgeno 5 con respecto al contig de <i>Bothrops jararaca</i> y <i>Bothrops asper</i>	16

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Proteínas de diferentes especies que se buscarán en el transcriptoma de la glándula de veneno de <i>Bothrops jararaca</i> y <i>Bothrops asper</i>	11
Tabla 2: Porcentaje de identidad y e-value de cada proteína luego de realizar el BLAST local en <i>Bothrops jararaca</i> y <i>Bothrops asper</i>	12
Tabla 3: Resumen de la presencia de las proteínas en el transcriptoma de <i>Bothrops jararaca</i> y <i>Bothrops asper</i>	13
Tabla 4. Recopilación de todas las proteínas obtenidas a partir de los alineamientos en <i>Bothrops jararaca</i> y <i>Bothrops asper</i>	17

1. RESUMEN

Las serpientes de la familia Viperidae se han destacado por presentar uno de los venenos más complejos de estudiar debido a la presencia de diferentes familias proteicas las cuales pueden tener varias isoformas. Las especies de vipéridos que causan más accidentes ofídicos cada año son *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca*, pertenecientes a la región del Occidente del Ecuador y a la Mata Atlántica de Brasil, respectivamente. Se ha observado que las condiciones ambientales, el sexo, la edad y alimentación, pueden generar variabilidades en la composición del veneno de las serpientes. Sin embargo, existen proteínas que se encuentran compartidas como las metaloproteinasas, serino proteasas, fosfolipasas, desintegrinas, lectinas tipo C y miotoxinas. El veneno de *B. jararaca* es ampliamente estudiado por sus usos farmacológicos, por lo que se ha identificado alrededor de 288 proteínas, mientras que en *B. asper* solo se han evidenciado 25 proteínas, debido a la falta de estudios relacionados a esta especie. Por ende, para llenar este vacío de conocimiento se evaluó la presencia o ausencia de las familias proteicas de la fosfolipasa A2, esfingomielinasa D, conotoxinas, toxinas tipo A (CfTX-A), alergeno 5, arilsulfatasa y las toxinas de tres dedos en el transcrito de la glándula venenosa de *B. jararaca* y *B. asper*. Debido al tamaño de los archivos se requirió del uso de herramientas y paquetes bioinformáticos. A lo largo de esta investigación se encontraron que varias proteínas están presentes en los transcriptomas de ambas especies, no obstante, proteínas como las conotoxinas estaban solo en *B. asper* y las neurotoxinas se encontraban solo en *B. jararaca*. Por lo cual se concluyó que el análisis proteico del veneno de las serpientes u otros organismos es un reto, ya que estos pueden provocar un mismo efecto, pero a través de diferentes vías y proteínas. Por tanto, si se llega a estudiar más afondo la composición proteica del veneno se podrán tomar medidas de prevención y generar tratamientos más efectivos.

Palabras clave: herramientas bioinformáticas, conotoxinas, toxinas de tres dedos, *Bothrops asper*, *Bothrops jararaca*.

2. ABSTRACT

Snakes of the family Viperidae have been noted for presenting one of the most complex venoms to study due to the presence of different protein families which may have several isoforms. The viperid species that cause more ophidian accidents each year are *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca*, belonging to the western region of Ecuador and the Atlantic Forest of Brazil, respectively. It has been observed that environmental conditions, sex, age and diet can generate variability in the composition of snake venom. However, there are shared proteins such as metalloproteinases, serine proteases, phospholipases, disintegrins, C-type lectins and myotoxins. The venom of *B. jararaca* is widely studied for its pharmacological uses, so about 288 proteins have been identified, while in *B. asper* only 25 proteins have been evidenced, due to the lack of studies related to this species. Therefore, to fill this knowledge gap, the presence or absence of the protein families of phospholipase A2, sphingomyelinase D, conotoxins, type A toxins (CfTX-A), allergen 5, arylsulfatase and three-finger toxins in the poison gland transcript of *B. jararaca* and *B. asper* was evaluated. Due to the size of the files, the use of bioinformatics tools and packages was required. Throughout this research it was found that several proteins are present in the transcriptomes of both species, however, proteins such as conotoxins were found only in *B. asper* and neurotoxins were found only in *B. jararaca*. Therefore, it was concluded that the protein analysis of snake venom or other organisms is a challenge, since they can provoke the same effect, but through different pathways and proteins. Therefore, if the protein composition of venom is studied in more depth, it will be possible to take preventive measures and generate more effective treatments.

Keywords: bioinformatics tools, conotoxins, three-finger toxins, *Bothrops asper*, *Bothrops jararaca*.

3. INTRODUCCIÓN:

Las serpientes venenosas se caracterizan por tener colmillos frontales tubulares y retráctiles, ofreciéndoles una capacidad de morder e inocular una serie de compuestos tóxicos capaces de inmovilizar y matar a sus presas (Cundall, 2002), las serpientes con este tipo de colmillos pertenecen a las familias de Atractaspidae, Elapidae y Viperidae (Vonk et al., 2008). Esta última familia tiene en su veneno uno de los proteomas más complejos y difíciles de comprender, debido a la naturaleza de sus componentes y a los diferentes tejidos y sistemas que pueden alterar, siendo el sistema circulatorio el más afectado (Leme et al., 2009). El tipo de veneno de las serpientes puede variar, sin embargo, las familias Viperidae y Crotalidae presentan venenos ricos en proteínas que actúan sobre la hemostasia, provocando en sus presas diversos efectos antiplaquetarios (Antunes et al., 2010).

Los venenos, contienen una mezcla de diferentes familias proteicas, y a su vez dentro de cada una existen toxinas las cuales pueden variar en sus isoformas, razón por la cual el estudio del veneno de serpientes se vuelve complejo (Olivera et al., 2022). Tasoulis e Isbister, (2017) mencionan que las serpientes con colmillos frontales presentan homologías en sus glándulas de veneno, esto abre la posibilidad de encontrar proteínas similares en diferentes vipéridos. Sin embargo, las condiciones ambientales, el sexo, la edad y alimentación, generan variabilidades en la composición del veneno de las serpientes, aunque estas pertenezcan al mismo género o especie (Olivera et al., 2022; Arnaud et al, 2019).

Actualmente se conoce que el veneno de los vipéridos del género *Bothrops* está conformado entre un 90% a 95% de su peso seco en proteínas, de las cuales, la mayor parte son enzimas hidrolíticas, tales como acetilcolinesterasas, ADPasas, fosfolipasas, hialuronidasas, metaloproteasas, serino proteasas, entre otras, de igual forma tiene proteínas no enzimáticas como desintegrinas, lectinas tipo C, miotoxinas, factores de crecimiento endotelial, vascular y nervioso, péptidos potenciadores de bradiquinina, cistatinas e inhibidores de proteasas tipo Kunitz (Pineda y Rodríguez, 2018).

En este estudio se emplearán los transcriptomas de las glándulas venenosas y proteínas que están en las bases de datos de libre acceso (NCBI y UniProt), de dos especies de serpientes siendo estas *Bothrops jararaca* (Wied-Neuwied, 1824) y *Bothrops asper* (Garman, 1884). En Brasil las serpientes del género *Bothrops* son las principales responsables de accidentes ofídicos debido a su amplia distribución geográfica, en el estado de Sao Paulo destaca *Bothrops jararaca* responsable de más del 90% de

mordeduras (Serrano et al., 2014). Esta serpiente es una de las más abundantes y representativas de América del Sur, siendo su veneno uno de los más estudiados dentro de los vipéridos, aportando significativamente en la producción de fármacos antihipertensivos (Almeida et al., 2021). No obstante, las mordeduras de *B. jararaca* son un grave problema para la salud ya que generan edemas, equimosis, ampollas y necrosis, así como el sangrado continuo y la incoagulabilidad de la sangre, dichos efectos han generado intriga en los científicos con respecto a su funcionamiento (Antunes et al., 2010). Sin embargo, los constantes estudios transcriptómicos y proteómicos han demostrado que la letalidad del veneno de las serpientes está dada por la acción combinada de enzimas liberadoras de bradicinina, serinas proteasas, entre otras (Antunes et al., 2010).

Nicolau y colaboradores, (2017) analizaron el veneno de *Bothrops jararaca* de una forma más detallada, puesto que se enfocaron en los peptidomas y proteomas (proteo-peptidoma), identificando 46 clases de familias proteicas, entre estas: las metaloproteinasas incluyendo las desintegrinas (SVMP), las serinas proteinasas, la lectina tipo C y la fosfolipasa A2. Dicha investigación tuvo un resultado alentador, ya que dentro de estas familias proteicas se lograron identificar 288 proteínas. Estos hallazgos fundamentan la idea de que *B. jararaca* y otros vipéridos del mismo orden, presenta una amplia gama de variantes proteicas posiblemente por modificaciones postraduccionales, provocando que la diversidad proteica llegue a ser mayor a la esperada.

Por otro lado, *Bothrops asper* es la responsable de la mayoría de accidentes ofídicos en el Ecuador, siendo esta especie la causante del 77, 13% de mordeduras en las zonas rurales del Guayas y Los Ríos (Vélez et al., 2019). Esta serpiente se distribuye por México, América central y América del Sur; su veneno se caracteriza por generar edemas, ampollas, hemorragias, daño de los vasos linfáticos y necrosis de la piel y los músculos, siendo esta una de las razones para realizar estudios en la identificación de las toxinas responsables de dichos efectos (Herrera et al., 2016).

A partir del veneno de *Bothrops asper* se han aislado ocho familias proteicas: metaloproteinasa, serina proteinasa, lectina tipo C, L-aminoácido oxidasa, desintegrina, fragmento DC, proteína secretoria rica en cisteína y fosfolipasa A2 (Alape-Girón et al, 2009). Pero, a diferencia de la primera especie, el número de proteínas identificadas son menos, siendo tan solo alrededor de 25 proteínas (Angulo y Lomonte, 2009). Además, se ha estimado que el veneno de *B. asper* está compuesto por:

metaloproteínasa (41-44%), desintegrina (1-2%), fosfolipasa A2 (29-45%), serina proteínasa (4-18%) y lectina tipo C (0,5%) (Angulo y Lomonte, 2009).

La arilsulfatasa (AS) es una familia de proteínas enzimáticas que se encuentra en varios tejidos y fluidos, se clasifican en A, B y C, las dos últimas pueden desulfatar glicosaminoglicanos (Makita & Taniguchi, 1985), son componentes importantes del cartílago y forman parte de la matriz extracelular de todos los órganos (Fрати, 2012). A su vez, esta enzima se encarga de regular la actividad metabólica de los procesos sulfatados como en las hormonas y en los neurotransmisores (Nok et al., 2003). Cabe recalcar que existen muchos estudios del funcionamiento de esta proteína enzimática en mamíferos, sin embargo, las investigaciones en reptiles son escasas debido a la diversidad de componentes que presentan en sus venenos lo que dificulta su análisis, no obstante, debido a las características y funciones de la arilsulfatasa es posible que contribuya a las características tóxicas del veneno de las serpientes (Nok et al., 2003).

La familia proteica de las toxinas de tres dedos (3FTx) están relacionadas con la letalidad de los venenos de varias especies de serpientes que pertenecen a la familia Elapidae e Hydrophiidae, dicha familia proteica incluye a neurotoxinas postsinápticas, cardiotoxinas, citotoxinas, inhibidores de la acción plaquetaria y bloqueadores de canales iónicos, dentro de este grupo las neurotoxinas son las más abundantes y actúan directamente con el sistema nervioso central y periférico (Roly, 2014).

La fosfolipasa A2 (PLA2) forma parte de las familias proteicas más abundantes dentro del veneno de las serpientes, extendiéndose entre miembros de la familia Viperidae, Elapidae e Hydrophiidae, en el caso de los vipéridos se encontró que su veneno está compuesto entre un 32% a 59,8% de PLA2 (Xiao et al., 2017). Los efectos de dicha proteína están relacionados a procesos antiplaquetarios, hemorrágicos, miotóxicos, hemolíticos, convulsivos, cardiotoxicos, presinápticas y postsinápticas y formando edemas (Pierre et al., 2005). Las alteraciones miotóxicas por PLA2 son los más estudiados debido a que generan un desequilibrio en la homeostasis del calcio (Ca^{2+}), desencadenando una necrosis muscular esquelética aguda (Xiao et al., 2017).

La familia proteica de la esfingomielinasa D (SM-D) también llamada fosfolipasa D presenta diversas actividades tóxicas en relación a la agregación plaquetaria, en la hiperpermeabilidad endotelial que promueve las hemorragias y en las respuestas

proinflamatorias que incrementa la inflamación intravascular (Gomes et al., 2011). Los estudios de SM-D se centran principalmente en los venenos de *Loxosceles*, puesto que su veneno en su mayoría está compuesto por esta proteína la cual es responsable de la destrucción de tejidos, insuficiencia renal, hemólisis y coagulación intravascular (Da Silva et al., 2020). Por otro lado, las serpientes dentro de su arsenal proteico pueden generar los mismos síntomas debido a la acción de sus toxinas neurotóxicas, hemolíticas y citotóxicas, esta última se caracteriza por inducir la necrosis muscular, sin embargo, esto solo sucede en cierto tipo de serpientes como por ejemplo en la familia Viperidae, a diferencia de familias como Colubridae y Elapidae, que destacan por su veneno neurotóxico (Dunbar et al., 2019).

Las conotoxinas son proteínas que pertenecen a la superfamilia de conotoxinas T, generalmente se encuentran en los moluscos marinos del género *Conus*, estas toxinas se caracterizan por ser ricas en enlaces disulfuro y son empleadas para inhibir el sistema nervioso y generar una parálisis inmediata, se estima que existen alrededor de 100.000 tipos diferentes de conotoxinas, de las cuales la gran mayoría aún no se han descubierto (Ruiz et al., 2018). La eficacia de esta neurotoxina se debe a que actúa sobre una amplia gama de mecanismos como en los canales de calcio y de sodio, en receptores nicotínicos de acetilcolina, en transportadores de noradrenalina, en el receptor NMDA y en el receptor de neurotensina (Daly y Craick, 2009). La mayoría de muertes causadas por esta toxina están relacionadas principalmente a su actividad analgésica que provoca una muerte “indolora” al inhibir los procesos neuromusculares (Duggan y Tuck, 2015). En el caso de las serpientes también han desarrollado sofisticadas armas biológicas para sobrevivir, siendo las víboras del género *Bothrops* aquellas con una elevada capacidad de inmovilización ya que pueden paralizar e inducir fallos en el sistema circulatorio de sus presas (Serrano et al., 2014).

Las medusas al igual que las serpientes del presente estudio generan los mismos efectos en sus presas, como el dolor cutáneo, necrosis, inflamación, hipotensión y problemas cardiovasculares. En Australia la medusa que más picaduras causa es *Chironex fleckeri* (Southcott, 1956) cuyo veneno pertenece a la familia de toxinas cnidarias que incluyen CfTX-1, CfTX-2, CfTX-A y CfTX-B, las dos últimas son conocidas como toxinas A y B (Brinkman et al., 2014). Los estudios de Carter y colaboradores (2010), demostraron que tanto la toxina A como la toxina B son citotóxicas, las cuales

provocan alteraciones del citoesqueleto de actina y promueven el deterioro de las células epiteliales del intestino.

Finalmente, los antígenos 5 (Ag5), son proteínas propias del veneno de himenópteros (hormigas, abejas y avispas) las cuales al picar desencadenan graves problemas de anafilaxia, cuyos síntomas son: erupciones cutáneas, vómitos, dificultad para respirar y shock (McLendon y Sternard, 2023). La proteína Ag5 pertenece a la superfamilia CAP, las cuales son ricas en cisteína, antígeno 5 y en proteínas relacionadas a la patogénesis. A su vez, dicha proteína abunda en el veneno de especies de la superfamilia *Vespoidea*, pero también existen hallazgos en plantas, sin embargo, su función sigue sin estar clara (Blank et al., 2020).

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Comparar la composición proteica del veneno de *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper*

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Recopilar información proteica de *B. jararaca* y *B. asper* que están en los repositorios de bases de datos (NCBI/UniProt).
2. Aplicar herramientas bioinformáticas para el análisis proteico.
3. Identificar las familias proteicas fosfolipasa A2, esfingomielinasa D, conotoxinas, toxinas tipo A (CfTX-A), alergeno 5, arilsulfatasa y las toxinas de tres dedos en el veneno de las dos especies.
4. Efectuar una comparación que permita determinar semejanzas y diferencias que presentan la composición proteica de los venenos en las dos especies.

5. MATERIALES Y MÉTODOS:

5.1. Obtención de información:

En primer lugar, se emplearon los principales repositorios de bases de datos NCBI y EMBL, para obtener las secuencias proteicas de cada familia a estudiar, siendo estas: fosfolipasa A2, esfingomielinasa D, conotoxinas, toxinas tipo A (CfTX-A), antígenos 5, arilsulfatasa y las toxinas de tres dedos, de diferentes especies como: *Novipirellula aureliae* (Kallscheuer, 2020), *Ophiophagus hannah* (Cantor, 1836), *Oxyuranus scutellatus* (Peters, 1867), *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849), *Conus ebraeus* (Linnaeus, 1758), *Chironex fleckeri* (Southcott, 1956) y *Vespula germanica* (Fabricius, 1793), (Tabla 1).

Para obtener los datos de los transcriptomas de la glándula venenosa de *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper* se usó el apartado de SRA del NCBI, siendo sus códigos de acceso SRR12800503 y SRR12915695, respectivamente. Los transcriptomas analizados fueron secuenciados por Illumina, paired end según los datos incluidos en el NCBI. Cabe mencionar que se usó específicamente el transcriptoma de la glándula venenosa y no el transcriptoma total porque uno de los objetivos de la investigación es identificar qué proteínas están dentro del veneno de *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper*, caso contrario si se usaba el transcrito total existía la posibilidad de encontrar las proteínas escogidas en otros tejidos como en los músculos o en el hígado.

Para poder usar los datos provenientes del SRA se requería descargar el paquete de Linux "SRA-Toolkit" el cual permite abrir los transcriptomas y transformarlos a formato Fasta (GitHub, 2022).

5.2. BLAST

Una vez descargada la información de los transcriptomas en formato fasta, se procedió a realizar una base de datos local empleando el comando `makeblastdb -in SRR12800503 -dbtype nucl` para los datos de *Bothrops jararaca* y para los datos de *Bothrops asper* se empleó el mismo comando, pero cambiando el código de acceso por SRR12915695.

Con dicha base de datos ya era posible realizar un BLAST enfocado directamente a la presencia o ausencia de las proteínas que previamente fueron descargadas en formato fasta, dentro del transcriptoma de las dos especies a analizar. Para ello se empleó `tblastn -query proteína.fasta -db base_de_datos -out nombre_salida`. Los contigs arrojados por el BLAST fueron escogidos de acuerdo al e-value más bajo el cual

describe qué tan similar es la secuencia query (proteína) frente a la secuencia subject (transcriptoma) (Tabla 2).

Los paquetes de Linux tienen la ventaja de analizar grandes cantidades de datos, siendo vital en esta investigación, ya que el transcriptoma de *Bothrops jararaca* consta de 4.7 Giga bases y *Bothrops asper* cuenta con 3.99 Giga bases. A su vez, para evitar que los paquetes descargados se solapen y generen fallos se realizó el análisis del BLAST en un ambiente creado en Conda, con la ayuda del comando `conda create -n blast`.

5.3. Alineamiento y familias proteicas más representativas

Posteriormente, con los contigs obtenidos a partir del BLAST local se llevó a cabo un alineamiento múltiple, el cual se realizó para cada familia proteica. Dicho alineamiento fue ejecutado desde la terminal empleando el programa `muscle`, así mismo, los resultados obtenidos fueron observados desde la interfaz gráfica “Jalview” que ayuda a visualizar y analizar los datos de una forma más eficiente.

Finalmente, se trabajó con el sitio web de Pfam, el cual permite identificar los dominios conservados de cada secuencia proteica, siendo en este caso los contigs obtenidos del BLAST local del transcriptoma de *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca*.

6. RESULTADOS

6.1. BLAST realizado a través de la terminal de Linux

En el presente estudio se emplearon proteínas provenientes de la glándula secretora de veneno de diferentes especies, entre ellas están: cobras (*Ophiophagus hannah*, *Oxyuranus scutellatus*), moluscos (*Conus ebraeus*), arácnidos (*Loxosceles laeta*), medusas (*Chironex fleckeri*) y bacterias (*Novipirellula aureliae*). Los datos fueron recopilados del repositorio de libre acceso NCBI, cuyos códigos de acceso y familias proteicas se encuentran detallados en la tabla 1.

Tabla 1: Proteínas de diferentes especies que se buscarán en el transcriptoma de la glándula de veneno de *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper*.

Proteína	Familia proteica	Número de acceso	Especie
Arilsulfatasa	Arilsulfatasa	TWU36542.1	<i>Novipirellula aureliae</i>
Arilsulfatasa-I	Arilsulfatasa	ETE71984.1	<i>Ophiophagus hannah</i>
Neurotoxina SNTX-3	Toxinas de tres dedos	A8HDK2.1	<i>Oxyuranus scutellatus</i>
Fosfolipasa A2 homóloga a la cadena gamma de taipoxina	Fosfolipasa A2	P00616.2	<i>Oxyuranus scutellatus</i>
Esfingomielinasa D	Fosfolipasa D	ABD15448.1	<i>Loxosceles laeta</i>
Conotoxina	Conotoxina T	AGK23263.1	<i>Conus ebraeus</i>
Toxina CfTX-A	Jellyfish toxin	T1PRE3.1	<i>Chironex fleckeri</i>
Veneno alérgeno 5	CRISP	P35784.1	<i>Vespula germanica</i>

Tabla 2: Porcentaje de identidad y e-value de cada proteína luego de realizar el BLAST local en *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper*.

Proteína	% De identidad con <i>B. jararaca</i>	% De identidad con <i>B. asper</i>	E-value	
			<i>B. jararaca</i>	<i>B. asper</i>
Arilsulfatasa	53	58	<i>B. jararaca</i>	1e-11
			<i>B. asper</i>	4e-11
Arilsulfatasa-I	100	72	<i>B. jararaca</i>	2e-26
			<i>B. asper</i>	3e-16
Neurotoxina SNTX-3	36	0	<i>B. jararaca</i>	9,1
			<i>B. asper</i>	0
Fosfolipasa A2 homóloga a la cadena gamma de taipoxina	65	67	<i>B. jararaca</i>	9e-15
			<i>B. asper</i>	3e-16
Esfingomielinasa D	41	52	<i>B. jararaca</i>	5,3
			<i>B. asper</i>	5,6
Conotoxina	0	52	<i>B. jararaca</i>	0
			<i>B. asper</i>	2,4
Toxina CfTX-A	0	0	<i>B. jararaca</i>	0
			<i>B. asper</i>	0
Veneno alérgeno 5	49	49	<i>B. jararaca</i>	2e-04
			<i>B. asper</i>	5e-04

Los contigs obtenidos luego de hacer el BLAST fueron escogidos dependiendo del e-value, ya que cuanto menor sea este valor, más significativo será el alineamiento. Sin embargo, se descubrió que no todas las proteínas empleadas están presentes en la glándula de veneno de *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper* por lo que se obtuvo un e-value de cero, como es el caso de la toxina CfTX-A proveniente de *Chironex fleckeri*, también conocida como avispa de mar o medusa de caja australiana (UniProt, 2023). Lo mismo sucede para la conotoxina y la neurotoxina SNTX-3, que están ausentes en *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper*, respectivamente.

La siguiente tabla demuestra como cada proteína está dividida en diferentes gráficos los cuales presentan dominios conservados obtenidos a través de la página web de Pfam.

Tabla 3: Resumen de la presencia de las proteínas en el transcriptoma de *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper*

Proteína	Procedencia de la proteína	Figura	Transcriptoma
Conotoxina	<i>Conus ebraeus</i>	1	<i>B. asper</i>
Arilsulfatasa	<i>Novipirellula aureliae</i>	2	<i>B. jararaca</i>
			<i>B. asper</i>
Arilsulfatasa-I	<i>Ophiophagus hannah</i>	3	<i>B. jararaca</i>
			<i>B. asper</i>
Neurotoxina SNTX-3	<i>Oxyuranus scutellatus</i>	4	<i>B. jararaca</i>
Fosfolipasa A2	<i>Oxyuranus scutellatus</i>	5	<i>B. jararaca</i>
			<i>B. asper</i>
Esfingomielinasa D	<i>Loxosceles laeta</i>	6	<i>B. jararaca</i>
			<i>B. asper</i>
Toxina CfTX-A	<i>Chironex fleckeri</i>	7	Proteína ausente
Veneno alérgico 5	<i>Vespula germánica</i>	8	<i>B. jararaca</i>
			<i>B. asper</i>

6.2. Alineamiento para cada proteína desde el programa Jalview

En la figura 1 se observa que *Bothrops asper* comparte ciertas proteínas con la conotoxina de *Conus ebraeus* (caracol marino), dichas similitudes permiten relacionar el contig de *B. asper* con la secuencia proteica de la chi-conotoxina y la conotoxina T. Cabe mencionar que la secuencia de *B. asper* que se emplea en este alineamiento no demostró ningún dominio conservado al analizarlo en la página de Pfam.

Conotoxin_T71-58	MRCFPVFVILLLLIASAPSVDPARPKTKDGMPLASFH	NATRNLQILCCKHTPACCTGK
chi_Conotoxin Pfam PF16981/1-55	MRCFPVFVILLLLIASAPSVDPARPKTKDGMPLASFH	NATRNLQILCCKHTPACC---
Conus ebraeus AGK23263.1/1-58	MRCFPVFVILLLLIASAPSVDPARPKTKDGMPLASFH	NATRNLQILCCKHTPACCTGK
Bothrops asper SRR12915695.12809435.2/1-20	-----	NWKENLQIFSFKHSPECTG--

Figura 1. Alineamiento de la conotoxina con respecto al contig de *Bothrops asper*.

En la figura 2 se muestra como la secuencia proteica de *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca* comparten varias proteínas con la bacteria *Novipirellula aureliae*, siendo estas: SGNH hidrolasa, GDSL, acetilhidrolasa, sulfatasa, G6S, arilsulfatasa y alcalina fosfatasa. Por otro lado, el análisis de Pfam encontró que tanto *B. asper* como *B. jararaca* solo se relacionan con la superfamilia de SGNH hidrolasa.

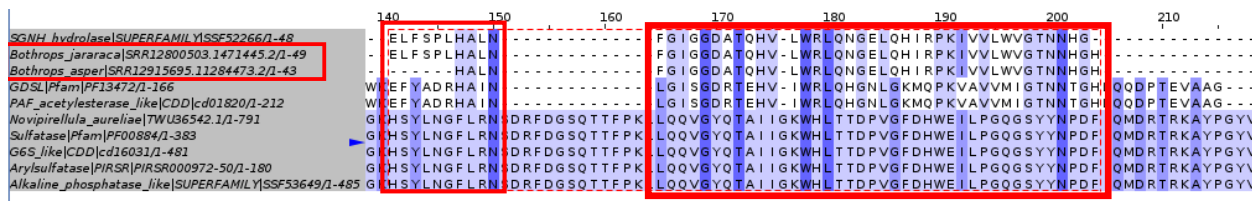


Figura 2. Alineamiento de la arilsulfatasa con respecto al contig de *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper*.

En la figura 3 se observa que las secuencias de *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca* comparten una gran cantidad de aminoácidos con respecto a las proteínas obtenidas de Pfam y con la secuencia de arilsulfatasa-I de *Ophiophagus Hannah* (cobra real). En el alineamiento, la secuencia de *B. asper* y *B. jararaca* se relacionan con la familia proteica arilsulfatasa B, con el dominio N-sulfatasa y con la superfamilia de la fosfatasa alcalina. Es importante mencionar que se encontraron sitios conservados de sulfatasa en *B. jararaca* mientras que en *B. asper* no se encontró ninguno.

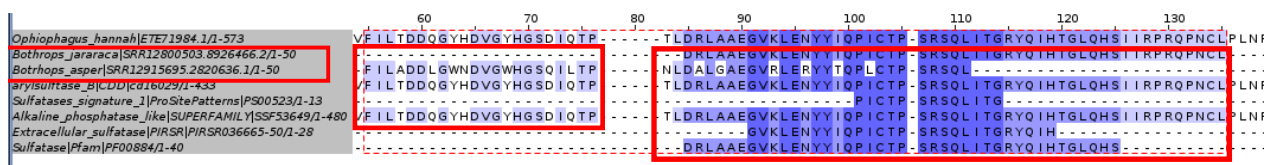


Figura 3. Alineamiento de la arilsulfatasa-I con respecto al contig de *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper*.

La figura 4 corresponde a las proteínas obtenidas de Pfam en donde la secuencia de *Oxyuranus scutellatus* (taipán de la costa) hizo match con la superfamilia de snake toxin, que está presente en venenos neurotóxicos y citotóxicos. Sin embargo, se esperaba que la secuencia de *O. scutellatus* esté relacionada con más proteínas de la familia de tres dedos (SNTX-3). Además, cuando se empleó la secuencia de *Bothrops jararaca* en Pfam no se encontró ningún dominio o sitio conservado.

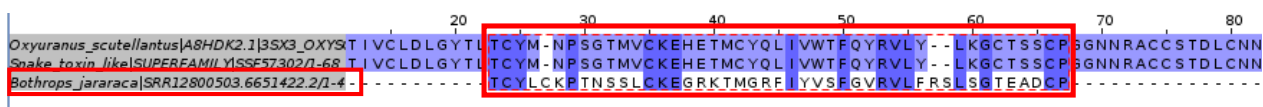


Figura 4. Alineamiento de la neurotoxina SNTX-3 con respecto al contig de *Bothrops jararaca*.

En la figura 5 se observa como las secuencias de *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca* comparten varias proteínas, las cuales fueron obtenidas de Pfam a través de la secuencia de la fosfolipasa A2 de *Oxyuranus scutellatus*. Las proteínas que se relacionan con *B. asper* son: la superfamilia de la Fosfolipasa A2, el dominio fosfolipasa, CDD y el sitio activo de la histidina. En cuanto a *B. jararaca*, las proteínas relacionadas son: la superfamilia de la Fosfolipasa A2, el dominio fosfolipasa, CDD y el sitio activo del ácido aspártico (cuadro amarillo).

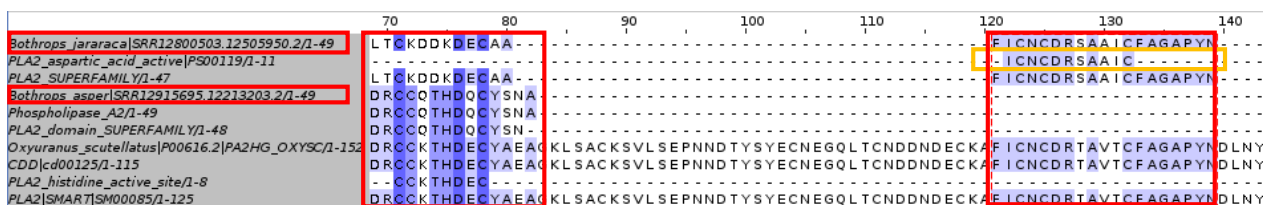


Figura 5. Alineamiento de la fosfolipasa A2 con respecto al contig de *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper*.

En este alineamiento se puede notar que las secuencias proteicas de *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper* tienen mucha similitud con respecto a las familias proteicas obtenidas de Pfam. Se encontró que la secuencia proteica de *Loxosceles laeta* (viuda negra) se relaciona con la superfamilia de la fosfolipasa-C y las fosfodiesterasas. Por otro lado, el análisis de la secuencia proteica de *B. jararaca* y *B. asper* no mostraron ningún dominio conservado.

La figura 6 demuestra que las secuencias proteicas de *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper* tienen ciertas similitudes con las secuencias proteicas de la fosfolipasa C y las fosfodiesterasas. De la misma manera, se observa que comparten proteínas con la secuencia CDD que es un dominio tipo fosfodiesterasa (GDPD) presente en las esfingomielinasas D. Gracias al alineamiento se pudo notar que a diferencia de *B. asper*, *B. jararaca* presenta un cambio en las proteínas pasando de histidina (H) a prolina (P).

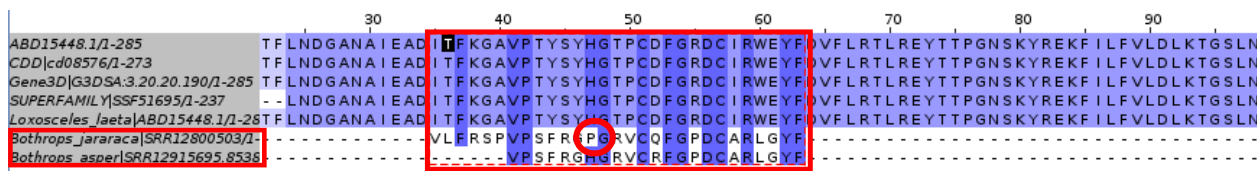


Figura 6. Alineamiento de la esfingomielinasa D con respecto al contig de *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper*.

En la figura 7 se presenta solo la secuencia de la toxina CfTX-A de *Chironex fleckeri* (medusa de caja) y sus respectivas predicciones de dominios citoplasmáticos y dominios de señal N, C y H, obtenidos de Pfam. El resultado del presente alineamiento demuestra que solo una pequeña sección de la secuencia de *C. fleckeri* es compartida (cuadro rojo).

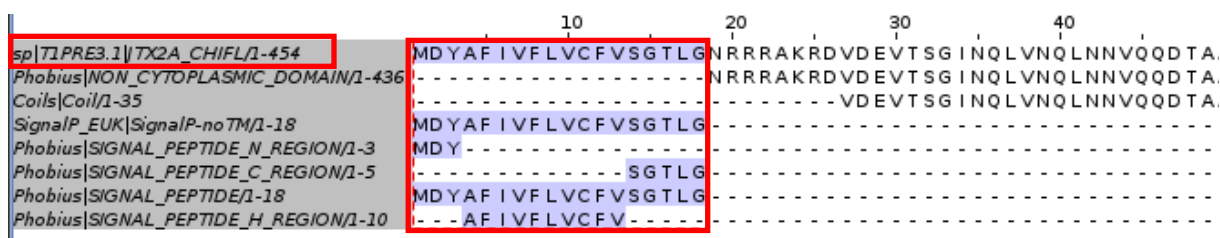


Figura 7. Alineamiento de la toxina CfTX-A con respecto a las proteínas obtenidas de Pfam a partir de la secuencia de *Chironex fleckeri*.

Finalmente, en la figura 8 se observa que las secuencias de *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper* tienen muchas similitudes con respecto a las proteínas obtenidas de Pfam el cual estaba en base del Ag5 de *Vespula germanica* también conocida como avispa alemana. Dichas similitudes son en las proteínas CRISP, Ag5, la superfamilia CAP y el dominio CDD.

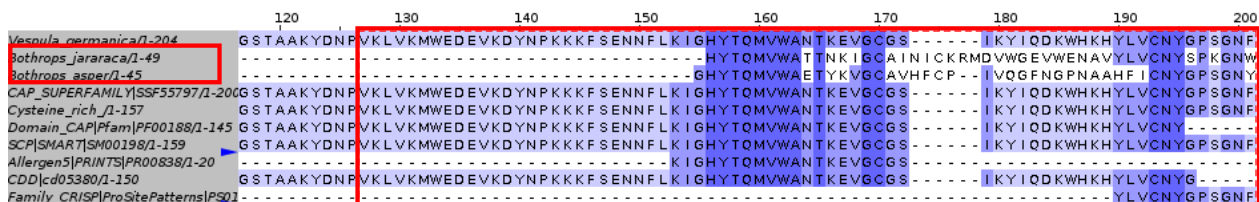


Figura 8. Alineamiento del veneno alérgeno 5 con respecto al contig de *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper*.

6.3. Recopilación de todas las proteínas obtenidas

Durante la búsqueda de cada una de las proteínas en el transcriptoma de la glándula de veneno de *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper*, se obtuvieron contigs que fueron empleados en la página web de Pfam. En algunas proteínas los resultados arrojados fueron: dominios conservados, superfamilias y sitios activos, los cuales se muestran en la tabla 4. Cabe mencionar que los dominios citoplasmáticos y de señal relacionados a la toxina CfTX-A no se encontraron en el transcriptoma de *B. jararaca* y *B. asper*.

Tabla 4. Recopilación de todas las proteínas obtenidas a partir de los alineamientos en *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper*.

Proteína base	Dominios proteicos y sitios activos identificados	Transcriptoma analizado
Conotoxina	Chi-conotoxin Conotoxina-T	<i>B. asper</i>
Arilsulfatasa	SGNH GDSL Acetilhidrolasa Sulfatasa G6S Arilsulfatasa Alcalina fosfatasa	<i>B. asper</i> <i>B. jararaca</i>
Arilsulfatasa-I	Arilsulfatasa B Dominio N-sulfatasa Fosfatasa alcalina	<i>B. asper</i> <i>B. jararaca</i>
Fosfolipasa A2	Fosfolipasa A2 Dominio fosfolipasa CDD Sitio activo de histidina	<i>B. asper</i>
	Fosfolipasa A2 Dominio fosfolipasa CDD Sitio activo del ácido aspártico	<i>B. jararaca</i>
Esfingomielinasa D	Fosfolipasa C Fosfodiesterasa CDD	<i>B. asper</i> <i>B. jararaca</i>
Toxina CfTX-A	Dominios citoplasmáticos Dominios de señal N, C y H	Proteína ausente
Veneno alérgeno 5	CRISP CDD CAP Ag5	<i>B. asper</i> <i>B. jararaca</i>
Neurotoxina SNTX-3	Snake-toxin	<i>B. jararaca</i>

7. DISCUSIÓN

Se identificaron un total de 22 proteínas en los transcriptomas de la glándula venenosa de *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper* (Tabla 4). No obstante, dentro de los alineamientos previamente hechos no se encontró ninguna relación de la toxina tipo A (CfTX-A) de *Chironex fleckeri* con respecto al transcrito de *B. jararaca* y *B. asper*. Esta especie destaca por producir un veneno extremadamente potente, afectando principalmente el sistema cardiovascular y promoviendo la actividad hemolítica en sus presas (Brinkman et al., 2014). Sus toxinas han sido empleadas en análisis bioinformáticos, lo que ha permitido conocer de mejor forma su estructura y función, la cual se detallará más adelante (Brinkman et al., 2014).

En el presente estudio se reportó la presencia de la conotoxina en el transcriptoma de *Bothrops asper*, dicha proteína es capaz de inhibir el sistema nervioso y generar una parálisis inmediata (Ruiz et al., 2018). Se identificaron dos proteínas relacionadas a esta toxina siendo la chi-conotoxin y la superfamilia de conotoxinas-T. Esta última se caracteriza por tener una longitud entre 10 y 17 aminoácidos siendo esto evidente en la figura 1, además, las conotoxinas-T se divide en dos grupos, las conotoxinas T-1 y las conotoxinas T-2 que están relacionadas con la chi-conotoxin (Liu et al., 2007). Los efectos de estas toxinas se vinculan con problemas neuromusculares que conllevan a una parálisis y en algunos casos la muerte, esto se da porque actúan en las vías adrenérgicas las cuales son importantes en la transmisión sináptica del sistema nervioso central y periférico (Alonso et al., 2003; Gilsbach et al., 2011).

La investigación de Babenko y colaboradores (2020), reveló que el veneno de *Azemipos feae* de la familia Viperidae, presenta una mayor acción en coagulopatías y en menor cantidad provoca neurotoxicidad que es dada por la acción de la fosfolipasa A2. Dentro de dicha investigación se evidenció la presencia de neurotoxinas de tres dedos (3FTx) que son capaces de inhibir los receptores nicotínicos de la acetilcolina, encargados de la protección del sistema nervioso (Miwa et al., 2011; Babenko et al., 2020). Cabe mencionar que este tipo de inhibición también se produce en las alfa-conotoxinas que inducen la parálisis (Alonso et al., 2003). Por otro lado, en *Bothrops asper* las fosfolipasas no poseen un efecto neurotóxico como en *Azemipos feae*, de hecho, se ha demostrado que estas presentan una acción miotóxica relacionada a la muerte celular y a la contracción del tejido muscular y cardíaco (Kaiser et al., 1990; Gutiérrez y Cerdas, 1984).

Es así que se estima que la conotoxina identificada en el transcrito de *Bothrops asper*, participa en los efectos de parálisis muscular y en los trastornos cardiovasculares mas

no en efectos neurotóxicos. Esto se debe a que las conotoxinas son capaces de inhibir los canales iónicos produciendo complicaciones en el sistema nervioso, problemas respiratorios, cardiacos e inmunológicos, los cuales también se presentan en el envenenamiento por *B. asper* (Tosti et al., 2022).

A diferencia de *Bothrops asper* en *Bothrops jararaca* se logró identificar la familia de las toxinas de tres dedos (3FTx) también conocida como “*Snake toxin-like superfamily*” (figura 4). Estas proteínas son abundantes en serpientes de la familia Elapidae, llegando a tener secuencias con más de 500 aminoácidos; además, las toxinas 3FTx destacan por actuar en venenos neurotóxicos y citotóxicos (Utkin, 2013). Dentro de esta familia las alfa-neurotoxinas son las más estudiadas y se las han identificado en venenos de serpientes como *Oxyuranus scutellatus* y *Pseudonaja textiles*, en las cuales se ha visto que las toxinas 3FTx generan un efecto inhibitor en los receptores nicotínicos de acetilcolina de las neuronas y en las fibras musculares (St Pierre et al., 2007).

Los efectos provocados por el envenenamiento de *Bothrops jararaca* están relacionados con la insuficiencia renal, shock, coagulopatías, hemorragias, edemas y necrosis (Clissa et al., 2001). Sin embargo, no se han reportado efectos neurotóxicos por parte de esta especie, pese a que en estudios proteómicos se haya identificado la presencia de 3FTx, aunque en cantidades muy pequeñas siendo de alrededor del 1% (Terra et al., 2009). Esto se ve claramente contrastado con el veneno de las cobras del género *Naja*, que junto a proteínas como 3FTx y alfa-neurotoxinas, tienen efectos neurotóxicos y parálisis muscular, pero, no desencadenan una necrosis (Dyba et al., 2021; Kalam et al., 2011). La posible razón de la proteína 3FTx en el transcriptoma de *B. jararaca* podría estar relacionada al efecto citotóxico que esta puede llegar a tener, ya que las citotoxinas actúan comúnmente en el músculo esquelético generando problemas de necrosis, edemas y ampollas graves, dichos síntomas son evidentes en el envenenamiento por *B. jararaca* (Royte y Sawarkar, 2023; Kalam et al., 2011).

Dentro del transcriptoma de *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper* se constató la presencia de la familia proteica enzimática arilsulfatasa (AS) (Figura 2 y 3), la cual tiene la capacidad de desulfatar biomoléculas tales como los glicosaminoglicanos presentes en el cartílago, células del tejido cardiovascular y en la matriz extracelular de todos los órganos (Fрати, 2012; Makita y Taniguchi, 1985).

Los mecanismos de sulfatación generalmente actúan en la regulación hormonal, en los procesos de neurotransmisión y en la estructura de los glicosaminoglicanos, los cuales al actuar en conjunto pueden formar parte de sistemas más complejos como en la formación de glicocálix que se encarga de separar las células endoteliales del torrente

sanguíneo (Nok et al., 2003; Munari 2012). Sin embargo, la presencia de AS puede promover daños al endotelio vascular permitiendo la filtración de líquidos y sustancias externas como proteínas (Munari 2012). Por lo tanto, se estima que este efecto de la AS, pueda ser uno de los mecanismos de como los diferentes compuestos proteicos del veneno de las serpientes entran y se distribuyen a varios tejidos de sus presas. Cabe mencionar que los estudios de AS en reptiles son muy escasos, puesto que los análisis se han centrado más en moluscos y mamíferos (Nok et al., 2003).

En la investigación de Nok y colaboradores (2003), se analizó el funcionamiento de la arilsulfatasa en el veneno de *Naja nigricollis*, demostrando que la arilsulfatasa al igual que otras proteínas enzimáticas, permanece estable en temperaturas de entre 37 °C y 50 °C. Dicha estabilidad es crucial en el veneno de las serpientes ya que les permite mantener su toxicidad en las víctimas. Es así que dentro del veneno de *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper* la AS tendría efectos en la degradación de tendones, ligamentos, afectaciones en la aorta y disminución de mucina (Nok et al., 2003). Este último efecto es muy común en bacterias, puesto que participa en la degradación de la mucosa intestinal y pulmonar (Cespo et al., 2013). Esto aclararía el resultado de la figura 2, puesto que se encontraron proteínas similares entre la secuencia proteica de la bacteria *Novipirellula aureliae* y los contigs de *B. jararaca* y *B. asper*.

La fosfolipasa A2 (PLA2), forma parte de las familias proteicas más abundantes dentro del veneno de las serpientes y se la ha visto participe en varios efectos fisiológicos como los neurotóxicos, miotóxicos, citotóxicos, anticoagulante, en edemas y en la inhibición plaquetaria, a su vez, su secuencia es de 122 aminoácidos estabilizados con siete enlaces disulfuro (Soares et al., 2003; Clement et al., 2012). Los estudios en PLA2 se han centrado en su capacidad de interactuar con los glicerofosfolípidos para sintetizar ácidos grasos libres y poliinsaturados, como por ejemplo el ácido araquidónico, que se lo ha identificado en los procesos de inflamación y daño celular (Peggion y Tonello, 2021; Gásquez, 1995).

La literatura citada menciona que la PLA2 se divide en tres grupos (I, II y III), según su actividad y disposición de los enlaces disulfuro (Lomonte y Rangel, 2012). Se ha identificado el grupo I en todas las serpientes de la familia Elapidae debido a que estructuralmente son similares a las secreciones pancreáticas (Soares y Giglio, 2003). Por otro lado, el grupo II se encuentra en las serpientes de la familia Viperidae, como las especies empleadas en el presente estudio (*Bothrops jararaca* y *Bothrops asper*), cuya estructura se parece a las secreciones inflamatorias (Soares y Giglio, 2003). Finalmente, el grupo III se presenta en los venenos de abejas, medusas, escorpiones y

algunos reptiles como lagartijas, siendo su estructura muy diferente a la del grupo I y II (Soares y Giglio, 2003).

Sin embargo, pese a que *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper* presentan PLA2-II, se han encontrado diferencias en sus sitios activos (figura 5). En primer lugar, en *B. jararaca* se evidencio el sitio activo del ácido aspártico que se encuentra en la posición 49 (Asp49), dicho compuesto es parte esencial de la actividad enzimática del veneno, promoviendo su letalidad miotóxica (Soares y Giglio, 2003). Por otra parte, en *B. asper* se denoto la presencia del sitio activo de histidina, no obstante, es normal encontrarse con este tipo de cambios en el veneno de las víboras ya que por lo general se reemplaza el Asp49 por aminoácidos como: lisina (Lys), histidina (His), serina (Ser), asparagina (Asp) o arginina (Arg) (Ghazaryan et al., 2015).

Pese a estos cambios la letalidad del veneno no se ve comprometida, dicho de otro modo, al perder el residuo Asp49 por una histidina o lisina, el resto de proteínas de la PLA2 no pueden unirse al calcio por lo cual pierden su actividad degradativa, sin embargo, los efectos miotóxicos y citotóxicos todavía siguen activos y esto se debe a que se genera un mecanismo alternativo que no necesite hidrolizar los fosfolípidos (Díaz y Gutiérrez, 1997). No obstante, la investigación de Díaz y Gutiérrez (1997), demostraron que al inhibir completamente el Asp49 e impedir que otro aminoácido ocupe su lugar, la actividad miotóxica del veneno de *Bothrops asper* se elimina completamente.

Otro tipo de fosfolipasa identificada en los alineamientos, es la esfingomielinasa D (SM-D) o fosfolipasa D (figura 6), capaz de sintetizar ácido fosfatídico a partir del ácido fosfórico (Condrea y Vries, 1965), provocando efectos muy parecidos a los ya previamente vistos en los vipéridos, ya que por lo general este tipo de proteínas son responsables de la destrucción de tejidos, hemorragias, insuficiencia renal, inflamación intravascular y agregación plaquetaria (Gomes et al., 2011; Da Silva et al., 2020).

Una gran cantidad de investigaciones de SM-D se centran en los venenos de *Loxosceles*, debido a que su veneno en su mayoría está compuesto por esta proteína, los análisis han permitieron constatar que los factores de propagación y la fosfolipasa C, al actuar en conjunto pueden modificar la matriz extracelular y romper las células, para debilitar los tejidos y favorecer la inoculación del veneno (Gremski et al., 2020; Condrea y Vries, 1965). Uno de estos factores son las hialuronidasas que están presentes en varios animales entre ellos serpientes, abejas, escorpiones y arañas (Appel et al., 2008). En el caso de las serpientes las hialuronidasas son enzimas capaces de degradar el ácido hialurónico y glicosaminoglicanos del tejido conectivo de los vasos sanguíneos, lo que promueve la difusión de toxinas, al igual que en los

venenos de *Loxosceles* (Kemparaju y Girish, 2005). Por lo tanto, la presencia de esta proteína dentro del transcriptoma de *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper* es de gran ayuda para generar efectos locales (mionecrosis, hemorragias o edemas) y sistémicos (neurotoxicidad, citotoxicidad, etc) (Girish et al., 2002; Kemparaju y Girish, 2005).

La diversidad de componentes en los venenos ha generado intriga y complicaciones al momento de su análisis y en la creación de fármacos para contrarrestar sus efectos, de este modo, uno de los retos que se ha vuelto difícil de abordar en el veneno de las serpientes, son las reacciones alérgicas que se desencadenan luego de una picadura. Las avispas y otros himenópteros son los organismos más estudiados en cuanto a compuestos alergénicos, que por lo general terminan produciendo anafilaxia, edemas, trastornos cardiovasculares y en casos tardíos generan insuficiencia renal aguda, hemólisis y coagulopatías (Yoon et al., 2020). Entre los alérgenos están la arginina quinasa, fosfolipasa A1 y A2, hialuronidasa, antígeno 5 (Ag5), proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) y proteínas ricas en cisteína (CRISP), algunas de las secuencias de estas proteínas se las puede ver en la figura 8 (Yoon et al., 2020).

Los compuestos CRISP, PR y Ag5, conforman la superfamilia de proteínas CAP que se distribuye en una gran cantidad de organismos, desde bacterias hasta eucariotas (Tadokoro et al., 2020). En los venenos de insectos como hormigas y avispas es muy común encontrar las proteínas Ag5, cuya función es inhibir la coagulación al momento de alimentarse, como por ejemplo en los insectos que se alimentan de sangre (Tadokoro et al., 2020). En el caso de las serpientes, análisis proteómicos demostraron la ausencia de Ag5, no obstante, con CRISP se observó una cantidad de entre el 0,05% y 10% en el veneno de los vipéridos y elápidos (Tasoulis y Isbister, 2017). Debido a que estas proteínas forman parte de la misma superfamilia, tanto Ag5 como CRISP guardan ciertas relaciones, como en sus dominios conservados (CDD) (figura 8) o a nivel funcional, ya que ambos se encargan de la inhibición del canal iónico y promueven los efectos miotóxicos (Tadokoro et al., 2020). Por lo tanto, se hace alusión que la presencia de estas proteínas en la glándula venenosa de *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca*, intensificarían su toxicidad y generarían problemas de anafilaxia en sus víctimas. Sin embargo, debido a que se encuentran en concentraciones muy pequeñas su funcionamiento aún no se comprende por completo.

Finalmente, dentro de las proteínas a buscar en el transcriptoma de la glándula venenosa de *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper*, la proteína CfTX-A de *Chironex fleckeri*, fue la única que no presentó ninguna relación. Sin embargo, al analizar la secuencia en Pfam se evidenciaron dominios de señal N, C y H (figura 7).

En Australia los casos de envenenamiento por medusas son muy comunes, con una proporción de 10.000 personas afectadas por año, su mecanismo de acción involucra células especializadas llamadas cnidocitos que solo pueden ser usados una vez, ya que, al liberar las toxinas dichas células se destruyen (Mariottini y Pane, 2010). La composición proteica del veneno de las medusas incluye histaminas, hialuronidasas, fibrolisinas, fosfolipasas, cininas y catecolaminas (Silfen et al., 2003). Sus efectos tóxicos fueron analizados al estudiar el veneno de *Chironex fleckeri*, en donde se observó afectaciones en los canales de sodio y calcio, cardiopatías, neuropatías y en ocasiones vasoespasmos (Burnett et al., 1998).

Las toxinas cnidarias se agrupan en CfTX-Bt, CfTX-A y CfTX-B, las dos últimas también conocidas como toxinas A y B (Brinkman et al., 2014). El estudio de Brinkman y colaboradores (2014), clasificó a las toxinas CfTX-A y CfTX-B en un solo grupo llamado toxinas Tipo II. Dicho grupo se caracteriza por tener secuencias cortas de dominios, conformados por cinco o siete aminoácidos, un ejemplo de ello es el dominio N-terminal, encargado de la activación y correcto plegamiento de las proteínas (Brinkman et al., 2014). Otro tipo de dominio es el C-terminal, que se lo atribuye a la especificidad de las toxinas (CfTX) para unirse a diferentes grupos carboxilos, sin embargo, su funcionamiento sigue sin estar claro (Brinkman et al., 2014). La ausencia de esta proteína en el transcriptoma de *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper*, se debe completamente a que CfTX-A y CfTX-B, son proteínas propias del veneno de *Chironex fleckeri* y no están compartidas, a diferencia de las fosfolipasas, lectinas o metaloproteinasas.

Por otra parte, investigaciones proteómicas del veneno de la medusa *Nemopilema nomurai*, presento altos contenidos de metaloproteasas, fosfolipasas, toxinas formadoras de poros, neurotoxinas y lectinas, las cuales son muy comunes en el veneno de los vipéridos (Yu et al., 2021). Por lo general en el veneno de las serpientes las metaloproteinasas y fosfolipasas A2, desencadenan problemas inflamatorios, daño tisular y vascular; no obstante, las mismas proteínas en *Nemopilema nomurai* son responsables de la destrucción de glóbulos rojos o actividad hemolítica (Yu et al., 2021). Esto demuestra que, las especies, aunque conserven las mismas proteínas, los sitios de acción pueden cambiar generando diferentes efectos tóxicos y diferentes síntomas.

8. CONCLUSIÓN

La composición proteica del veneno de *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper*, pese a ser uno de los más estudiados dentro de su género, aún tienen vacíos por cubrir. A lo largo de la investigación se notó que en los estudios proteómicos de estas especies se deja de lado a aquellas proteínas que se encuentran en una menor proporción. Sin embargo, este tipo de proteínas deben ser analizadas con un mejor enfoque, ya que se ha visto que cada uno de estos compuestos han desarrollado diferentes vías de acción, generando graves problemas fisiológicos que en ocasiones pueden ser irreversibles, como es el caso de la necrosis en la cual es necesaria la amputación, pero, si se identifican las proteínas relacionadas con dicho efecto, es posible tomar medidas de prevención y generar tratamientos más efectivos.

A primera vista los daños que producen *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper* son muy similares, ya que se centran en afectar el sistema vascular y muscular, para que el veneno se disemine por todo el cuerpo. No obstante, cuando las proteínas implicadas se las analiza de forma individual, estas difieren a nivel estructural, como en el caso de la fosfolipasa A2, previamente vista.

El estudio del complejo proteico del veneno de las serpientes u otros organismos es un reto, que por lo general requieren análisis moleculares que en ocasiones conllevan tiempo y gastos. No obstante, en este estudio se han empleado herramientas bioinformáticas y datos disponibles en repositorios de libre acceso, los cuales permitieron hallar nuevas relaciones proteicas en los transcriptomas de las glándulas venenosas de *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper*. Por ende, se sugiere el impulso de la bioinformática en este tipo de análisis, ya que brinda la posibilidad de trabajar con una gran cantidad de datos y emplearlos para análisis más profundos, los cuales en un futuro podrán ayudar a generar fármacos personalizados y más eficientes.

9. BIBLIOGRAFÍA:

- Antunes, T. C., Yamashita, K. M., Barbaro, K. C., Saiki, M., & Santoro, M. L. (2010). Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon*, 56(8), 1443-1458.
- Alonso, D., Khalil, Z., Satkunanathan, N., & Livett, B. (2003). Drugs From the Sea: Conotoxins as Drug Leads for Neuropathic Pain and Other Neurological Conditions. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 3(7), 785–787. doi:10.2174/1389557033487746
- Alape-Girón, A., Flores-Díaz, M., Sanz, L., Madrigal, M., Escolano, J., Sasa, M., & Calvete, J. J. (2009). Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: Perspectives and applications. *Toxicon*, 54(7), 938–948. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.06.011
- Angulo, Y., & Lomonte, B. (2009). Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon*, 54(7), 949–957. doi: 10.1016/j.toxicon.2008.12.014
- Arnaud, G., Saucedo, A. C., Park, B., Fumero, S., & Pozas-ocampo, F. (2019). Comprendiendo el veneno de las serpientes de cascabel: componentes, efectos y uso potencial. *Áreas Naturales Protegidas Scripta*, 2019. Vol. 5 (2): 39-56. doi: <https://doi.org/10.18242/anpscripta.2019.05.05.02.0003>
- Almeida, D. D., Viala, V. L., Nachtigall, P. G., Broe, M., Gibbs, H. L., Serrano, S. M. D. T., ... & Junqueira-de-Azevedo, I. L. (2021). Tracking the recruitment and evolution of snake toxins using the evolutionary context provided by the *Bothrops jararaca* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(20), e2015159118.
- Appel, M. H., da Silveira, R. B., Chaim, O. M., Paludo, K. S., Silva, D. T., Chaves, D. M., ... Veiga, S. S. (2008). Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1780(2), 167–178. doi:10.1016/j.bbagen.2007.11.007
- Brinkman, D. L., Konstantakopoulos, N., McInerney, B. V., Mulvenna, J., Seymour, J. E., Isbister, G. K., & Hodgson, W. C. (2014). *Chironex fleckeri* (box jellyfish) venom proteins: expansion of a cnidarian toxin family that elicits variable cytolytic and cardiovascular effects. *The Journal of biological chemistry*, 289(8), 4798–4812.
- Babenko, V. V., Ziganshin, R. H., Weise, C., Dyachenko, I., Shaykhutdinova, E., Murashev, A. N., Zhmak, M., et al. (2020). Novel Bradykinin-Potentiating Peptides and Three-Finger Toxins from Viper Venom: Combined NGS Venom Gland Transcriptomics and Quantitative Venom Proteomics of the Azemiops feae Viper. *Biomedicines*, 8(8), 249. MDPI AG. Doi: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines8080249>
- Blank, S., Bazon, M. L., Grosch, J., Schmidt-Weber, C. B., Brochetto-Braga, M. R., Bilò, M. B., & Jakob, T. (2020). Antigen 5 Allergens of Hymenoptera Venoms and Their Role in Diagnosis and Therapy of Venom Allergy. *Current allergy and asthma reports*, 20(10), 58.

- Burnett, J.W., Weinrich, D., Williamson, J.A. et al. Autonomic neurotoxicity of jellyfish and marine animal venoms. *Clinical Autonomic Research* 8, 125–130 (1998). <https://doi.org/10.1007/BF02267823>
- Carter, G. P., Rood, J. I., & Lyras, D. (2010). The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile*-associated disease: Past and present perspectives. *Gut microbes*, 1(1), 58–64.
- Cundall, D. A. V. I. D. (2002). Envenomation strategies, head form, and feeding ecology in vipers. *Biology of the Vipers*, 149-162. http://eaglemountainpublishing.s3.amazonaws.com/PDF/Biology%20of%20the%20Vipers/CH%2009_cundall_.pdf
- Crespo, A., García, L., Sibila, O., & Plaza, V. (2013). Papel de las mucinas en la hipersecreción mucosa bronquial del asma. *REVISTA ESPAÑOLA DE ASMA*, 4(3), 131-136.
- Clissa, P. B., Laing, G. D., Theakston, R. D. G., Mota, I., Taylor, M. J., & Moura-da-Silva, A. M. (2001). The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. *Toxicon*, 39(10), 1567–1573. doi:10.1016/s0041-0101(01)00131-3
- Clement, H., de Oliveira, V. C., Zamudio, F. Z., Lago, N. R., Valdez-Cruz, N. A., Valle, M. B., ... & de Roodt, A. R. (2012). Isolation, amino acid sequence and biological characterization of an “aspartic-49” phospholipase A2 from *Bothrops (Rhinocerothis) ammodytoides* venom. *Toxicon*, 60(7), 1314-1323.
- Condrea, E., & de Vries, A. (1965). Venom phospholipase A: A review. *Toxicon*, 2(4), 261–273. doi:10.1016/0041-0101(65)90024-3
- Dyba, B., Rudolphi-Szydło, E., Barbasz, A., Czyżowska, A., Hus, K. K., Petrilla, V., Petrillová, M., Legáth, J., & Bocian, A. (2021). Effects of 3FTx Protein Fraction from *Naja ashei* Venom on the Model and Native Membranes: Recognition and Implications for the Mechanisms of Toxicity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(8), 2164. <https://doi.org/10.3390/molecules26082164>
- Da Silva, M. S., Lopes, P. H., Elias, M. C., & Tambourgi, D. V. (2020). Cytotoxic and genotoxic effects on human keratinocytes triggered by sphingomyelinase D from *Loxosceles* venom. *Archives of Toxicology*. doi:10.1007/s00204-020-02830-2
- Dunbar, J. P., Sulpice, R., & Dugon, M. M. (2019). The kiss of (cell) death: can venom induced immune response contribute to dermal necrosis following arthropod envenomations? *Clinical Toxicology*, 57(8), 677–685. doi:10.1080/15563650.2019.1578367
- Daly, N. L., & Craik, D. J. (2009). Structural studies of conotoxins. *IUBMB Life*, 61(2), 144–150. doi:10.1002/iub.158
- Duggan, P., & Tuck, K. (2015). Bioactive Mimetics of Conotoxins and other Venom Peptides. *Toxins*, 7(10), 4175–4198. doi:10.3390/toxins7104175
- Díaz-Oreiro, C., & Gutiérrez, J. (1997). Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A2 isolated from *Bothrops asper* and

Bothrops godmani snake venoms: Effects on enzymatic and pharmacological properties. *Toxicon*, 35(2), 241–252. doi:10.1016/s0041-0101(96)00128-6

- Frati-Munari, A. C. (2012). Glicosaminoglicanos en las enfermedades vasculares. *Revista Mexicana de angiología*, 40(3), 89-99.
<https://www.medigraphic.com/pdfs/revmexang/an-2012/an123b.pdf>
- Gomes, M. T. R., Guimarães, G., Frézard, F., Kalapothakis, E., Minozzo, J. C., Chaim, O. M., ... Chávez-Olórtegui, C. (2011). Determination of sphingomyelinase-D activity of *Loxosceles* venoms in sphingomyelin/cholesterol liposomes containing horseradish peroxidase. *Toxicon*, 57(4), 574–579. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.01.001
- GitHub. (2022). NCBI SRA Toolkit. <https://github.com/ncbi/sra-tools/wiki/01.-Downloading-SRA-Toolkit>
- Gilsbach, R., Albarrán-Juárez, J., & Hein, L. (2011). Pre- versus Postsynaptic Signaling by α 2-Adrenoceptors. *Current Topics in Membranes*, 139–160. doi:10.1016/b978-0-12-384921-2.00007-0
- Gutiérrez, J. M., & Cerdas, L. (1984). Mecanismo de acción de miotoxinas aisladas de venenos de serpientes. *Revista de Biología Tropical*, 32(2), 213-221.
- Ghazaryan, N. A., Ghulikyan, L., Kishmiryan, A., Andreeva, T. V., Utkin, Y. N., Tsetlin, V. I., ... & Ayvazyan, N. M. (2015). Phospholipases A2 from Viperidae snakes: Differences in membranotropic activity between enzymatically active toxin and its inactive isoforms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1848(2), 463-468.
- Gásquez, M. (1995). Acido araquidónico y radicales libres: su relación con el proceso inflamatorio. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 14(1), 0-0.
- Girish, K. S., Jagadeesha, D. K., Rajeev, K. B., & Kemparaju, K. (2002). Molecular and Cellular Biochemistry, 240(1/2), 105–110. doi:10.1023/a:1020651607164
- Gremski, L. H., Da Justa, H. C., Da Silva, T. P., Polli, N. L. C., Antunes, B. C., Minozzo, J. C., ... & Veiga, S. S. (2020). Forty years of the description of brown spider venom phospholipases-D. *Toxins*, 12(3), 164.
- Herrera, C., Macêdo, J. K., Feoli, A., Escalante, T., Rucavado, A., Gutiérrez, J. M., & Fox, J. W. (2016). Muscle Tissue Damage Induced by the Venom of *Bothrops asper*: Identification of Early and Late Pathological Events through Proteomic Analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(4), e0004599. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004599>
- Kaiser, I. I., Gutierrez, J. M., Plummer, D., Aird, S. D., & Odell, G. V. (1990). The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 278(2), 319–325. doi:10.1016/0003-9861(90)90266-2
- Kalam, Y., Isbister, G. K., Mirschin, P., Hodgson, W. C., & Konstantakopoulos, N. (2011). Validation of a cell-based assay to differentiate between the cytotoxic effects of elapid snake venoms. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 63(2), 137–142. doi:10.1016/j.vascn.2010.09.001

- Kemparaju, K., & Girish, K. S. (2005). Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. *Cell Biochemistry and Function*, 24(1), 7–12. doi:10.1002/cbf.1261
- Leme, A. F. P., Kitano, E. S., Furtado, M. F., Valente, R. H., Camargo, A. C. M., Ho, P. L., ... Serrano, S. M. T. (2009). *Analysis of the subproteomes of proteinases and heparin-binding toxins of eight Bothrops venoms*. *PROTEOMICS*, 9(3), 733–745. 10.1002/pmic.200800484
- Liu, J., Wu, Q., Pi, C., Zhao, Y., Zhou, M., Wang, L., ... Xu, A. (2007). Isolation and characterization of a T-superfamily conotoxin from *Conus litteratus* with targeting tetrodotoxin-sensitive sodium channels. *Peptides*, 28(12), 2313–2319. doi: 10.1016/j.peptides.2007.09.006
- Lobo-Ruiz, A., & Tulla-Puche, J. (2018). Synthetic approaches of naturally and rationally designed peptides and peptidomimetics. *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering*, 23–49. doi:10.1016/b978-0-08-100736-5.00002-8
- Lomonte, B., & Rangel, J. (2012). Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A2 to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicon*, 60(4), 520–530. doi:10.1016/j.toxicon.2012.02.007
- McLendon, K & Sternard, B. (2023). Anaphylaxis. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482124/>
- Miwa, J. M., Freedman, R., & Lester, H. A. (2011). Neural systems governed by nicotinic acetylcholine receptors: emerging hypotheses. *Neuron*, 70(1), 20–33. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.03.014>
- Makita, A., & Taniguchi, N. (1985). Glycosphingolipids * *Sialic acid-containing glycosphingolipids (the gangliosides) are discussed in a separate chapter (see Chapter 3). *New Comprehensive Biochemistry*, 1–99. doi:10.1016/s0167-7306(08)60020-4
- Mariottini, G. L., & Pane, L. (2010). Mediterranean Jellyfish Venoms: A Review on Scyphomedusae. *Marine Drugs*, 8(4), 1122–1152. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md8041122>
- Nok, A. J., Abubakar, M. S., Auda, A., & Balogun, E. (2003). Aryl sulfatase from *Naja nigricolis* venom: Characterization and possible contribution in the pathology of snake poisoning. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17(1), 59–66. doi:10.1002/jbt.10061
- Nicolau, C. A., Carvalho, P. C., Junqueira-de-Azevedo, I. L. M., Teixeira-Ferreira, A., Junqueira, M., Perales, J., Valente, R. H. (2017). An in-depth snake venom proteoepitome characterization: Benchmarking *Bothrops jararaca*. *Journal of Proteomics*, 151, 214–231. doi: 10.1016/j.jprot.2016.06.029
- Oliveira, A. L., Viegas, M. F., da Silva, S. L., Soares, A. M., Ramos, M. J., & Fernandes, P. A. (2022). The chemistry of snake venom and its medicinal potential. *Nature reviews. Chemistry*, 6(7), 451–469. <https://doi.org/10.1038/s41570-022-00393-7>
- Pineda, M. E., & Rodríguez-Acosta, A. (2018). The impressive universe of the venoms, their biochemical, haemostatic and toxic variability in Porthidium and Bothrops (Serpentes: Viperidae) snakes. *SABER*, 30, 265-283.
- Pierre, L. S., Woods, R., Earl, S., Masci, P. P., & Lavin, M. F. (2005). Identification and analysis of venom gland-specific genes from the coastal taipan (*Oxyuranus*

- scutellatus) and related species. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(22), 2679–2693. doi:10.1007/s00018-005-5384-9
- Peggion, C., & Tonello, F. (2021). Short Linear Motifs Characterizing Snake Venom and Mammalian Phospholipases A2. *Toxins*, 13(4), 290. <https://doi.org/10.3390/toxins13040290>
- Roly, Z. Y., Islam, M. M., & Reza, M. A. (2014). A comparative in silico characterization of functional and physicochemical properties of 3FTx (three finger toxin) proteins from four venomous snakes. *Bioinformatics*, 10(5), 281–287. <https://doi.org/10.6026/97320630010281>
- Royte, L., & Sawarkar, A. (2023). Snake bite - cytotoxic effects of snake venom: a rare clinical image. *The Pan African medical journal*, 44, 61. <https://doi.org/10.11604/pamj.2023.44.61.37759>
- Serrano, S. M. T., Oliveira, A. K., Menezes, M. C., & Zelanis, A. (2014). *The proteinase-rich proteome of Bothrops jararacavenom*. *Toxin Reviews*, 33(4), 169–184. doi:10.3109/15569543.2014.922581
- St Pierre, L., Fischer, H., Adams, D. J., Schenning, M., Lavidis, N., de Jersey, J., ... Lavin, M. F. (2007). Distinct activities of novel neurotoxins from Australian venomous snakes for nicotinic acetylcholine receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(21), 2829–2840. doi:10.1007/s00018-007-7352-z
- Soares, A. M., & Giglio, J. R. (2003). Chemical modifications of phospholipases A2 from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. *Toxicon*, 42(8), 855-868.
- Silfen, R., Vilan, A., Wohl, I., & Leviav, A. (2003). Mediterranean jellyfish (*Rhopilema nomadica*) sting. *Burns*, 29(8), 868–870. doi:10.1016/s0305-4179(03)00162-1
- Terra, R. M. S., Pinto, A. F. M., Guimarães, J. A., & Fox, J. W. (2009). Proteomic profiling of snake venom metalloproteinases (SVMPs): Insights into venom induced pathology. *Toxicon*, 54(6), 836–844. doi:10.1016/j.toxicon.2009.06.010
- Tasoulis, T., & Isbister, G. K. (2017). A Review and Database of Snake Venom Proteomes. *Toxins*, 9(9), 290. <https://doi.org/10.3390/toxins9090290>
- Tosti, E., Boni, R., & Gallo, A. (2022). Pathophysiological Responses to Conotoxin Modulation of Voltage-Gated Ion Currents. *Marine Drugs*, 20(5), 282. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md20050282>
- Tadokoro, T., M. Modahl, C., Maenaka, K., & Aoki-Shioi, N. (2020). Cysteine-Rich Secretory Proteins (CRISPs) from Venomous Snakes: An Overview of the Functional Diversity in a Large and Underappreciated Superfamily. *Toxins*, 12(3), 175. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins12030175>
- UniProt. (2023). Taxonomy - Chironex fleckeri (species). [https://www.uniprot.org/taxonomy/45396#:~:text=Chironex%20fleckeri%20\(Aust%20box%20jellyfish\)%20%7C%20Taxonomy%20%7C%20UniProt](https://www.uniprot.org/taxonomy/45396#:~:text=Chironex%20fleckeri%20(Aust%20box%20jellyfish)%20%7C%20Taxonomy%20%7C%20UniProt)
- Utkin, Y. N. (2013). Three-finger toxins, a deadly weapon of elapid venom – Milestones of discovery. *Toxicon*, 62, 50–55. doi:10.1016/j.toxicon.2012.09.007

- Vonk, F. J., Admiraal, J. F., Jackson, K., Reshef, R., de Bakker, M. A. G., Vanderschoot, K., ... Richardson, M. K. (2008). *Evolutionary origin and development of snake fangs*. *Nature*, 454(7204), 630–633. doi:10.1038/nature07178
- Vélez Alarcón, L., Real Cotto, J., Idrovo Castro, K., Alvarado Franco, H., Jaramillo Feijó, L., & Ordóñez Sánchez, J. (2019). Caracterización del accidente por mordedura de serpiente atendidos en unidades de Salud, Zona 5, Ecuador. *INSPIPILIP*, 1-16.
- Xiao, H., Pan, H., Liao, K., Yang, M., & Huang, C. (2017). Snake Venom PLA2, a Promising Target for Broad-Spectrum Antivenom Drug Development. *BioMed research international*, 2017, 6592820.
- Yu, C., Yue, Y., Yin, X., Li, R., Yu, H., & Li, P. (2021). Identifying and revealing the geographical variation in *Nemopilema nomurai* venom metalloprotease and phospholipase A2 activities. *Chemosphere*, 266, 129164.
- Yoon, K. A., Kim, K., Kim, W. J., Bang, W. Y., Ahn, N. H., Bae, C. H., ... & Lee, S. H. (2020). Characterization of venom components and their phylogenetic properties in some aculeate bumblebees and wasps. *Toxins*, 12(1), 47.