

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE INGENIERÍA
MAESTRÍAS VIRTUALES**

**Generación de modelos hipotéticos de nuevas proteínas identificadas en el
transcriptoma de las glándulas de veneno de *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca***

Biología Computacional

Joseph Ahrim Espín Angulo

Quito, 2024

Aprobación del Director del Trabajo de Titulación

Hoja de evidencia antiplagio (Informe Turnitin)

DEDICATORIA

A mi abuelita, Mariana Álvarez.

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

AGRADECIMIENTOS

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

A mi madre Mishell 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 Romain Guyot, por compartirme sus conocimientos en bioinformática y por darme una mano cuando lo necesitaba.

A mis lectores Daniel Chávez y Francisco Flores, 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.

ÍNDICE GENERAL

1.	RESUMEN.....	10
2.	ABSTRAC.....	11
3.	INTRODUCCIÓN.....	12
4.	METODOLOGÍA	15
4.1.	Obtención de datos.....	15
4.2.	Identificación de dominios y sitios activos.....	15
4.3.	Predicción de la estructura secundaria y terciaria	15
4.4.	Validación de modelos	15
5.	RESULTADOS.....	16
5.1.	Alérgeno 5.....	16
5.1.1.	Dominios y sitios activos.....	16
5.1.2.	Estructura secundaria.....	17
5.1.3.	Estructura terciaria	17
5.1.4.	Validación de modelos.....	19
5.2.	Apolipoforina	21
5.2.1.	Dominios y sitios activos.....	21
5.2.2.	Estructura secundaria.....	22
5.2.3.	Estructura terciaria	23
5.2.4.	Validación de modelos.....	23
5.3.	Arilsulfatasa	26
5.3.1.	Dominios y sitios activos.....	26
5.3.2.	Estructura secundaria.....	28
5.3.3.	Estructura terciaria	28
5.3.4.	Validación de modelos.....	29
5.4.	Botrocetina	33
5.4.1.	Dominios y sitios activos.....	33
5.4.2.	Estructura secundaria.....	33
5.4.3.	Estructura terciaria	34
5.4.4.	Validación de modelos.....	34
5.5.	Dihidropirimidina deshidrogenasa	38
5.5.1.	Dominios y sitios activos.....	38
5.5.2.	Estructura secundaria.....	40
5.5.3.	Estructura terciaria	40
5.5.4.	Validación de modelos.....	42
5.6.	Basparina.....	45
5.6.1.	Dominios y sitios activos.....	45
5.6.2.	Estructura secundaria.....	46

5.6.3.	Estructura terciaria	46
5.6.4.	Validación de modelos.....	47
6.	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	49
6.1.	Alergeno 5.....	49
6.2.	Apolipoforina	50
6.3.	Arilsulfatasa	51
6.4.	Botrocetina	52
6.5.	Dihidropirimidina deshidrogenasa	53
6.6.	Basparina.....	54
7.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	55
8.	REFERENCIAS	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Alineamiento múltiple de secuencias del alérgeno 5..	17
Figura 2. Estructura secundaria del alérgeno 5 predicha por I-TASSER..	17
Figura 3. Estructura terciaria del alérgeno 5 predicha por I-TASSER..	18
Figura 4. Sitios conservados del alérgeno 5.....	18
Figura 5. Gráfico de Ramachandran del alérgeno 5 para el modelo de <i>Bothrops asper</i>	19
Figura 6. Gráfico de Ramachandran del alérgeno 5 para el modelo de <i>Bothrops jararaca</i>	20
Figura 7. Factor-B del alérgeno 5 para cada modelo, proporcionado por I-TASSER..	21
Figura 8. Gráfico ERRAT de la estructura modelada para el alergen 5.....	21
Figura 9. Alineamiento múltiple de secuencias de la apolipoforina.....	22
Figura 10. Estructura secundaria de la apolipoforina predicha por I-TASSER.....	22
Figura 11. Estructura terciaria de la apolipoforina predicha por I-TASSER.....	23
Figura 12. Gráfico de Ramachandran de la apolipoforina para el modelo de <i>Bothrops asper</i> ..	24
Figura 13. Gráfico de Ramachandran de la apolipoforina para el modelo de <i>Bothrops jararaca</i>	25
Figura 14. Factor-B normalizado del factor von Willebrand tipo D para cada modelo, proporcionado por I-TASSER.	26
Figura 15. Gráfico ERRAT de la estructura modelada para el factor von Willebrand tipo D (vWFD).....	26
Figura 16. Alineamiento múltiple de secuencias de la arilsulfatasa.	27
Figura 17. Estructura secundaria de la arilsulfatasa predicha por I-TASSER.	28
Figura 18. Estructura terciaria de la arilsulfatasa predicha por I-TASSER.	29
Figura 19. Sitios conservados de la arilsulfatasa.	29
Figura 20. Gráfico de Ramachandran de la arilsulfatasa para el modelo de <i>Bothrops asper</i>	30
Figura 21. Gráfico de Ramachandran de la arilsulfatasa para el modelo de <i>Bothrops jararaca</i>	31
Figura 22. Factor-B de la arilsulfatasa para cada modelo, proporcionado por I-TASSER.	32
Figura 23. Gráfico ERRAT de la estructura modelada para la arilsulfatasa-I.	32
Figura 24. Alineamiento múltiple de secuencias de la botrocetina..	33
Figura 25. Estructura secundaria de la botrocetina predicha por I-TASSER..	33
Figura 26. Estructura terciaria de la botrocetina predicha por I-TASSER.	34
Figura 27. Gráfico de Ramachandran de la botrocetina para el modelo de <i>Bothrops asper</i>	35
Figura 28. Gráfico de Ramachandran de la botrocetina para el modelo de <i>Bothrops jararaca</i>	36
Figura 29. Factor-B normalizado de la arilsulfatasa para cada modelo, proporcionado por I- TASSER.....	37
Figura 30. Gráfico ERRAT de la estructura modelada para la botrocetina.	37
Figura 31. Alineamiento múltiple de secuencias de la dihidropirimidina deshidrogenasa.	39
Figura 32. Estructura secundaria de la dihidropirimidina deshidrogenasa predicha por I- TASSER.....	40
Figura 33. Estructura terciaria de la dihidropirimidina deshidrogenasa predicha por I-TASSER.	40
Figura 34. Modelos para el dominio dihidroorotato deshidrogenasa (DHOD).	41
Figura 35. Gráfico de Ramachandran de la dihidropirimidina deshidrogenasa para el modelo de <i>Bothrops asper</i>	42
Figura 36. Gráfico de Ramachandran de la dihidropirimidina deshidrogenasa para el modelo de <i>Bothrops jararaca</i>	43
Figura 37. Factor-B normalizado de la dihidropirimidina deshidrogenasa para cada modelo, proporcionado por I-TASSER..	44
Figura 38. Gráfico ERRAT de la estructura modelada para la dihidropirimidina deshidrogenasa.	45

Figura 39. Alineamiento múltiple de secuencias de la basparina.	45
Figura 40. Estructura secundaria de la basparina predicha por I-TASSER.	46
Figura 41. Estructura terciaria de la basparina predicha por I-TASSER.	46
Figura 42. Gráfico de Ramachandran de la basparina para el modelo de <i>Bothrops asper</i>	47
Figura 43. Factor-B normalizado de la basparina en <i>Bothrops asper</i> proporcionado por I-TASSER.	48
Figura 44. Gráfico ERRAT de la estructura modelada para la basparina.	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de proteínas a identificar.	15
Tabla 2. Gradiente de calor de Ramachandran.....	16
Tabla 3. Número de residuos del alérgeno 5 para cada región del gráfico de Ramachandran de <i>Bothrops asper</i>	19
Tabla 4. Número de residuos del alérgeno 5 para cada región del gráfico de Ramachandran de <i>Bothrops jararaca</i>	19
Tabla 5. Número de residuos de la apolipoforina para cada región del gráfico de Ramachandran de <i>Bothrops asper</i>	23
Tabla 6. Número de residuos de la apolipoforina para cada región del gráfico de Ramachandran de <i>Bothrops jararaca</i>	24
Tabla 7. Número de residuos de la arilsulfatasa para cada región del gráfico de Ramachandran de <i>Bothrops asper</i>	29
Tabla 8. Número de residuos de la arilsulfatasa para cada región del gráfico de Ramachandran de <i>Bothrops jararaca</i>	30
Tabla 9. Número de residuos de la botrocetina para cada región del gráfico de Ramachandran de <i>Bothrops asper</i>	34
Tabla 10. Número de residuos de la botrocetina para cada región del gráfico de Ramachandran de <i>Bothrops jararaca</i>	35
Tabla 11. Número de residuos de la dihidropirimidina deshidrogenasa para cada región del gráfico de Ramachandran de <i>Bothrops asper</i>	42
Tabla 12. Número de residuos de la dihidropirimidina deshidrogenasa para cada región del gráfico de Ramachandran de <i>Bothrops jararaca</i>	42
Tabla 13. Número de residuos de la basparina para cada región del gráfico de Ramachandran de <i>Bothrops asper</i>	47

1. RESUMEN

Este estudio se centra en la caracterización de nuevas proteínas presentes en el transcriptoma de la glándula de veneno de *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca*, describiendo por primera vez los sitios conservados de proteínas importantes como el alérgeno 5, la apolipoforina, la arilsulfatasa y el dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH). Estas proteínas tienen funciones críticas en el veneno, desde promover respuestas inflamatorias hasta interferir con procesos de coagulación. Se utilizaron herramientas bioinformáticas como Jalview y CHIMERA para analizar las secuencias y estructuras de estas proteínas, además, se emplearon servidores en línea de I-TASSER y SAVES v6.1 (*Structure Validation Server*) para la predicción y validación de los modelos tridimensionales. Los sitios conservados y dominios se identificaron con Pfam desde InterPro. El análisis de los sitios conservados del alérgeno 5 en las proteínas CRISP de *Bothrops*, mostrando similitudes estructurales con el alérgeno 5 de la glándula de veneno de avispa. En la apolipoforina se observó una alta conservación del dominio vWFD con similitudes estructurales con la hormiga trampa *Odomantus monticola*. Además, se identificaron dominios conservados de arilsulfatasa y botrocetina, destacando su potencial función en la degradación de GAGs y la interacción con el magnesio, respectivamente. La estructura de DHODH mostró similitudes con las versiones humana y bacteriana, aunque con una región N-terminal ausente en las serpientes estudiadas. Este estudio proporciona una caracterización detallada de estas proteínas, sugiriendo roles significativos en la toxicidad del veneno y ofreciendo una base para futuras investigaciones sobre sus aplicaciones terapéuticas y mecanismos de envenenamiento.

Palabras clave: Conservación de dominios, Estructuras tridimensionales, Glándula de veneno, Herramientas bioinformáticas, Toxicidad del veneno.

2. ABSTRACT

This study focuses on the characterization of new proteins present in the transcriptome of the venom gland of *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca*, describing for the first time the conserved sites of important proteins such as allergen 5, apolipoprotein, arylsulfatase, and dihydroorotate dehydrogenase (DHODH). These proteins have critical functions in the venom, ranging from promoting inflammatory responses to interfering with coagulation processes. Bioinformatics tools such as Jalview and CHIMERA were used to analyze the sequences and structures of these proteins, and online servers like I-TASSER and SAVES v6.1 (Structure Validation Server) were employed for the prediction and validation of the three-dimensional models. The conserved sites and domains were identified using Pfam from InterPro. The analysis of the conserved sites of allergen 5 in the CRISP proteins of *Bothrops* showed structural similarities with the allergen 5 of the wasp venom gland. In apolipoprotein, a high conservation of the vWFD domain was observed, with structural similarities to the trap-jaw ant *Odomantus monticola*. Additionally, conserved domains of arylsulfatase and botrocetin were identified, highlighting their potential function in the degradation of GAGs and interaction with magnesium, respectively. The structure of DHODH showed similarities to the human and bacterial versions, although with a missing N-terminal region in the studied snakes. This study provides a detailed characterization of these proteins, suggesting significant roles in venom toxicity and offering a basis for future research on their therapeutic applications and poisoning mechanisms.

Keywords: Bioinformatics tools, Domain conservation, Three-dimensional structures, Venom toxicity, Venom gland.

3. INTRODUCCIÓN

La evolución de las serpientes ha despertado el interés de la comunidad científica debido a sus notables adaptaciones que les han permitido sobrevivir en diferentes entornos (Barua y Mikheyev, 2020). Entre los cambios morfológicos que han experimentado a lo largo del tiempo, se destaca el alargamiento del cuerpo, colmillos retractiles, la dentición maxilar, pérdida de extremidades, desarrollo de quimio y termopercepción, y la evolución de las glándulas de veneno (Jackson, 2003; Almeida et al., 2021). Algunas de estas características se encuentran conservadas en varios linajes de serpientes, sin embargo, el sistema de la glándula de veneno ha experimentado variaciones proteicas significativas bajo constantes presiones selectivas (Almeida et al., 2021; Rao et al., 2022). La madures sexual, el sexo, ecosistema y la alimentación son los principales factores que provocan variaciones en el veneno de las serpientes incluso en aquellas del mismo género, dificultando el desarrollo de antiofídicos (Surm y Moran, 2021; Casewell et al., 2020).

Los venenos son mezclas complejas compuestas principalmente por proteínas enzimáticas, no enzimáticas y pequeños péptidos (Jackson et al., 2016; Post et al., 2020). Los efectos patológicos que generan en sus presas dependen del tipo de veneno, por lo general producen parálisis neuromuscular, hemorragias, coagulopatías, hinchazón y necrosis (Casewell et al., 2020). Las familias de serpientes venenosas más reconocidas son Elapidae, Viperidae y la subfamilia Atractaspidinae (Post et al., 2020; Casewell et al., 2020; Jackson, 2003). Las serpientes vipéridas como las del género *Bothrops* tienen un veneno hemotóxico, mientras que los elápidos como el género *Naja* producen péptidos con efectos neurotóxicos (Vonk et al., 2013; Post et al., 2020).

La aplicación de tecnologías de secuenciación modernas ha permitido profundizar en el estudio molecular de las serpientes. Los proteomas y transcriptomas más estudiados corresponden a las especies: *Bothrops jararaca* (Pereira et al., 2020), *Echis coloratus* (Casewell et al., 2009), *Ophiophagus Hannah* (Tan et al., 2015), *Bothrops moojeni* (Amorim et al., 2017) y *Azemiops feae* (Babenko et al., 2020). Gracias a estas investigaciones se ha podido determinar que gran parte del veneno en vipéridos está conformado por metaloproteasas, serina proteasas y fosfolipasas, mientras que en elápidos sobresale la neurotoxina de tres dedos o 3FTxs y las metaloproteasas (Babenko et al., 2020; Tan et al., 2015).

El género *Bothrops*, reconocido por ser responsable del mayor número de casos de accidentes ofídicos en Centro y Sudamérica, destacando *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca* por su veneno hemolítico (Resiere et al., 2020; Uribe et al., 2021). La mayor parte del veneno de estas especies se conforma por metaloproteinasas, fosfolipasas A2, serina proteinasas, L-aminoácido oxidasas y lectinas tipo C (Mora et al., 2020; Nicolau et al., 2017; Uribe et al., 2021). Dichas proteínas han sido de interés para tratar de solucionar los accidentes ofídicos, por otro lado, las proteínas que se expresan en cantidades más pequeñas han sido relegadas, debido a la dificultad en su purificación y caracterización (Brahma et al., 2015).

Sin embargo, el análisis de las proteínas de menor abundancia es esencial para mejorar la comprensión sobre la composición y funcionamiento del veneno, ya que en las víctimas estas proteínas pueden generar efectos secundarios en diversos sistemas fisiológicos,

incluyendo el bloqueo de canales de iones, perturbaciones en la coagulación de la sangre, fibrinólisis, inflamación, entre otros (Boldrini et al. 2017; Earl et al. 2012).

El transporte de lípidos a través del sistema circulatorio de los animales constituye una función vital que utiliza complejos lipoproteicos especializados (Bogerd et al., 2000). En los insectos se han identificado las apolipoproteínas I-II (apoLp-I y apoLp-II) que se encargan de transportar lípidos entre los diferentes tejidos del cuerpo (Weers y Ryan, 2006). Dentro de la glándula de veneno de algunos insectos como hormigas y avispas, se ha catalogado a la apolipoproteína como una proteína no tóxica (Kazuma et al., 2017). Sin embargo, esta proteína ha despertado interés debido a su similitud con la vitelogenina de vertebrados e invertebrados, la apolipoproteína B humana, la mucina y el factor von Willebrand tipo D (Kutty et al., 1996; Bogerd et al., 2000; Babin et al., 1999). El papel del Factor von Willebrand tipo D en algunos insectos se lo ha relacionado con la coagulación de la hemolinfa (Kutty et al., 1996). Analizar este tipo de factor en la glándula de veneno de *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca* proporcionaría evidencia de nuevas isoformas de esta proteína que son importantes en el funcionamiento del veneno.

La superfamilia CAP es un conjunto de proteínas altamente conservadas que se encuentran tanto en procariontes como en eucariotes, conformado por tres familias: las proteínas ricas en cisteína (CRISP), el antígeno 5 (Ag5) y las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR-1) (Abraham y Chandler, 2017). Esta superfamilia está presente en el veneno de diversas especies, provocando problemas inflamatorios, proteolíticos, efectos en los canales iónicos y en los reguladores inmunitarios (Zhang et al., 2022). La familia Ag5 es ampliamente expresada en el veneno de insectos, mientras que la familia CRISP se encuentra en los venenos de reptiles, tales como las serpientes de las familias Colubridae, Elapidae y Viperidae (Mackessy, 2021). Sin embargo, en el veneno de serpientes, las proteínas CRISP son menos abundantes que las metaloproteinasas y las fosfolipasas A2, como se ha observado en *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca*, donde su expresión es menor al 4% (Kohlhoff et al., 2012; Mora-Obando et al., 2020; Zelanis et al., 2012). Debido a su bajo nivel de expresión, la importancia biológica de esta familia proteica en los venenos no está del todo clara (Mackessy, 2021; Suntravat et al., 2019).

La arilsulfatasa es una familia de proteínas enzimáticas que se encuentra en varios tejidos clasificándose en A, B y C (Makita y Taniguchi, 1985). La arilsulfatasa B y C pueden desulfatar glicosaminoglicanos que forman parte del cartílago, la matriz extracelular de todos los órganos y puede actuar como regulador de la coagulación sanguínea (Makita y Taniguchi, 1985; Abe y Shayman, 2013; Frati, 2012). Existen muchos estudios del funcionamiento de esta proteína en mamíferos y la presencia de la misma en la glándula de veneno de algunos insectos (Lane et al., 2023; Hanson et al., 2004; Nok et al., 2003). Por otro lado, las investigaciones en reptiles son escasas debido a la diversidad de componentes que presentan en sus venenos dificulta el análisis de proteínas que se expresan en pequeñas cantidades. El elápidico *Naja nigricolis* es una de las pocas serpientes en donde se ha identificado la arilsulfatasa y su posible contribución al veneno (Nok et al., 2003).

La botrocetina es una proteína similar a la lectina tipo C con la capacidad de interactuar con los dominios del factor von Willebrand (vWF) y el receptor plaquetario GPIIb/IIIa (Arlinghaus y Eble, 2012; Fukuda et al., 2005). Dicha proteína se identificó en el veneno

de *Bothrops jararaca*, y se la ha catalogado como anticoagulante, induciendo hemorragia en sus presas (Arlinghaus y Eble, 2012). Además de la botrocetina, se han identificado más proteínas homologas con efectos similares, tales como la alboagregina-B (*Trimeresurus albolabris*), echicetina (*Echis carinatus*), flavocetina-A (*Trimeresurus flavoviridis*), convulxina (*Crotalus durissus terrificus*), rodocitina (*Calloselasma rhodostoma*) y batroxobina (*Bothrops moojeni*) (Cañas, 2016; Arlinghaus y Eble, 2012). Cada una de estas proteínas similares a la lectina C tienen diferente impacto en sus víctimas, llegando a ser unas más potentes que otras y la diferencia radica en su estructura tridimensional y la afinidad que tienen para unirse a otros péptidos (Arlinghaus y Eble, 2012).

La dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) es una enzima flavina que cataliza la reducción de las pirimidinas uracilo y timina utilizando electrones del NADPH (Fujimoto et al., 1991; Smith et al., 2023). Este proceso es crucial para mantener el equilibrio de los nucleótidos dentro de las células, lo cual es esencial para la síntesis y reparación del ADN y ARN (Smith et al., 2023). Sin embargo, la DPD sigue siendo una proteína enigmática, ya que estructuralmente es similar a la dihidroorotato deshidrogenasa (DHOD), una enzima involucrada en la biosíntesis de pirimidinas (Smith et al., 2023; Forouzesht y Moran, 2021). Hasta la fecha, no se ha identificado la presencia de DPD en las glándulas de veneno de serpientes y otros animales venenosos. No obstante, es posible su existencia en estas estructuras debido a las funciones reguladoras que tanto DPD como DHOD desempeñan. Su presencia podría influir en la composición y variabilidad del veneno de las serpientes.

Finalmente, la basparina-A es una metaloproteinasa tipo III, identificada en el veneno de *Bothrops asper*, que induce la actividad coagulante y puede inhibir la agregación plaquetaria dependiendo del colágeno (Rucavado et al., 2005). Sus efectos clínicos han sido ampliamente estudiados, ya que, a diferencia de la mayoría de las metaloproteinasas y otras proteínas tóxicas, no degrada los componentes de la matriz extracelular ni tampoco incita la formación de edemas o mionecrosis (Loria et al., 2003). Pese a las constantes investigaciones que tiene esta proteína en las bases de datos como PDB, UniProt y NCBI, solo existe un único modelo. Por lo tanto, identificar regiones más completas de la basparina-A podría proporcionar información valiosa sobre sus dominios o sitios activos.

Para llenar este vacío de conocimiento, el objetivo general de este estudio es identificar la expresión de posibles nuevas proteínas en la glándula de veneno de *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca*.

Dentro de los objetivos específicos, se llevará a cabo un análisis detallado de las siguientes proteínas: apolipoforina, alérgeno 5, arilsulfatasa, botrocetina, dihidropirimidina deshidrogenasa y basparina A. Estas proteínas serán modeladas utilizando I-TASSER para obtener sus estructuras secundarias y terciarias. Además, se utilizará el servidor web de Pfam para identificar los dominios y sitios activos presentes en cada proteína. Los resultados obtenidos pueden ser utilizados en el futuro para mejorar la efectividad de los antiofídicos, así como para facilitar el desarrollo de herramientas de diagnóstico y terapias más específicas.

4. METODOLOGÍA

4.1. Obtención de datos

Las secuencias proteicas de la apolipoforina, alergeno 5, arilsulfatasa, botrocetina, dihidropirimidina deshidrogenasa y la basparina A, fueron obtenidas de un estudio previo en el que se ensambló el transcriptoma de la glándula de veneno de *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca*. Las secuencias proteicas utilizadas como referencia forman parte de la glándula de veneno de diferentes organismos (Tabla 1). Emplear secuencias peptídicas de otros organismos permitirá identificar nuevas proteínas tóxicas en la glándula de veneno de ambas especies de *Bothrops*.

Tabla 1. Lista de proteínas a identificar.

Proteína	Especie	ID
Alergeno 5	<i>Vespula germanica</i>	P35784.1
Apolipoforina	<i>Odontomachus monticola</i>	BBF97895.1
Arilsulfatasa	<i>Ophiophagus hannah</i>	ETE71984.1
Botrocetina	<i>Bothrops jararaca</i>	AAB25231.1
Dihidropirimidina deshidrogenasa	<i>Pseudonaja textilis</i>	A0A670YCN7
Basparina	<i>Bothrops asper</i>	P84035.1

4.2. Identificación de dominios y sitios activos

La predicción de familias, motivos, dominios y sitios activos de cada proteína se realizó mediante la base de datos proteicos Pfam de InterPro. Las secuencias empleadas en este paso fueron aquellas que tuvieron el valor-e más cercano a cero, con la finalidad de obtener toda la información posible de las nuevas proteínas identificadas. Las secuencias obtenidas fueron alineadas con Muscle para observar la similitud entre secuencias.

4.3. Predicción de la estructura secundaria y terciaria

Para predecir la estructura secundaria y terciaria de las proteínas, se empleó la plataforma en línea I-TASSER (Iterative Threading ASSEMBly Refinement), que utiliza algoritmos y métodos computacionales exhaustivos basados en las características de la secuencia de aminoácidos (Yang y Zhang, 2015). Esta plataforma se diferencia de MODELLER y SWISS-MODEL ya que no emplea plantillas de estructuras tridimensionales como referencia, siendo de gran utilidad para modelar proteínas desconocidas. Los modelos fueron visualizados con CHIMERA y se compararon con las proteínas de referencia mencionadas previamente.

4.4. Validación de modelos

La calidad de todos los modelos generados por I-TASSER se evaluaron utilizando tres herramientas de validación: PROCHECK, ERRAT y el Factor-B. PROCHECK analiza la geometría de los modelos de proteínas tridimensionales, utilizando el gráfico de Ramachandran para representar las posibles combinaciones de los ángulos de torsión phi (φ) y psi (ψ) de cada aminoácido en una proteína (Oberholser et al., 2013). El gráfico de Ramachandran tiene diferentes gradientes de color (Tabla 2). Además, los aminoácidos se representan con cuadrados, exceptuando las glicinas que están con rectángulos.

Tabla 2. Gradiente de calor de Ramachandran.

Gradiente de color	Descripción
Rojo	Indican regiones favorables donde los ángulos phi y psi son típicos de estructuras bien definidas.
Amarillo intenso	Indican regiones permitidas donde los ángulos phi y psi no están restringidos, pero no son tan comunes. Las estructuras son estables.
Amarillo claro	Indican regiones medianamente permitidas donde los ángulos phi y psi ocurren con menos frecuencia. No se consideran completamente prohibidos.
Blanco	Indican regiones no permitidas donde los ángulos phi y psi están físicamente restringidos debido a las colisiones entre átomos de la estructura tridimensional. Estas conformaciones son inestables

Por otro lado, ERRAT evalúa la fiabilidad de las regiones de la cadena polipeptídica basándose en patrones geométricos (Dym et al., 2006). Ambas herramientas están disponibles en el servidor: <https://saves.mbi.ucla.edu/>. Finalmente, el Factor-B indica la flexibilidad o rigidez de los átomos en la estructura predicha, los valores más altos que 0 indican que los residuos son más flexibles en comparación con residuos que tienen valores más bajos o negativos. (Sun et al., 2019; Yang et al., 2016). Este análisis se obtiene durante la generación de modelos por I-TASSER y se comparó con el gráfico de Ramachandran para identificar los aminoácidos con posibles errores en el plegado.

5. RESULTADOS

5.1. Alérgeno 5

5.1.1. Dominios y sitios activos

Los resultados de Pfam para *Bothripos asper* y *Bothripos jararaca* permitieron identificar secuencias relacionadas al sitio activo del alérgeno 5 (Ag5), el dominio CAP y las proteínas ricas en cisteína.

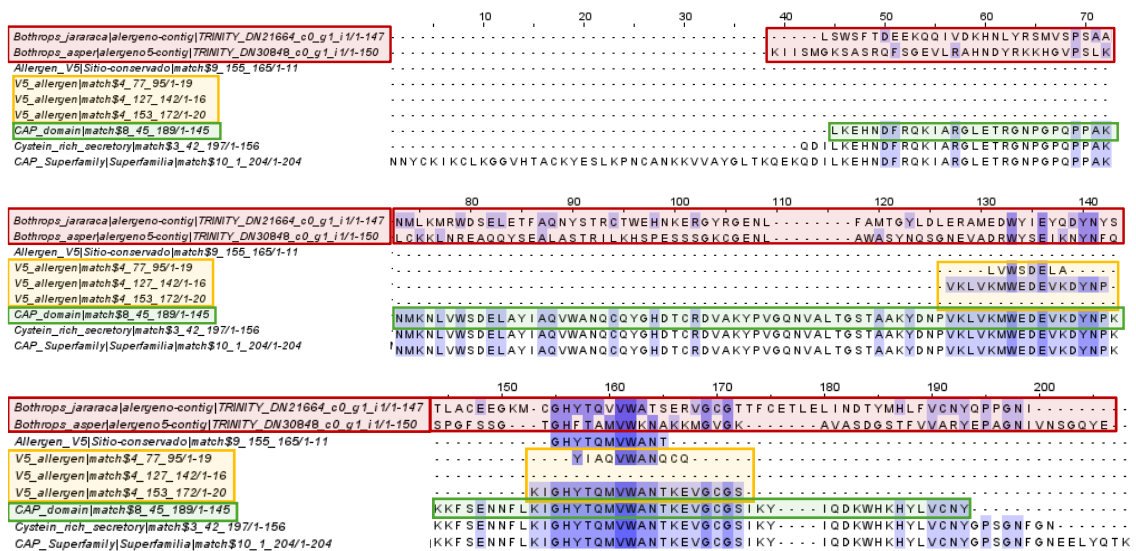


Figura 1. Alineamiento múltiple de secuencias del alérgeno 5. Los contigs de *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca*, resaltados en rojo, presentan varios aminoácidos conservados con el dominio CAP (verde) y con los sitios activos del alérgeno 5 (amarillo).

5.1.2. Estructura secundaria

Los sitios activos del alérgeno 5 (Ag5) de la Figura 1 se identificaron en la predicción de estructura secundaria de la Figura 2 (A-B), en la cual se observó que el sitio activo Ag5 incluye zonas de hélices alfa y hojas beta.

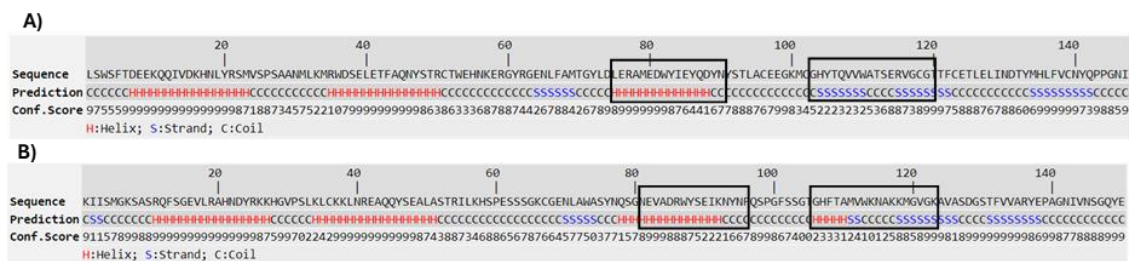


Figura 2. Estructura secundaria del alérgeno 5 predicha por I-TASSER. A) *Bothrops jararaca* y B) *Bothrops asper*. En ambas estructuras las áreas marcadas de rojo corresponden a las hélices alfa (H), en azul las hojas beta (S) y de color negro los segmentos de la proteína que forman la región desordenada (C).

5.1.3. Estructura terciaria

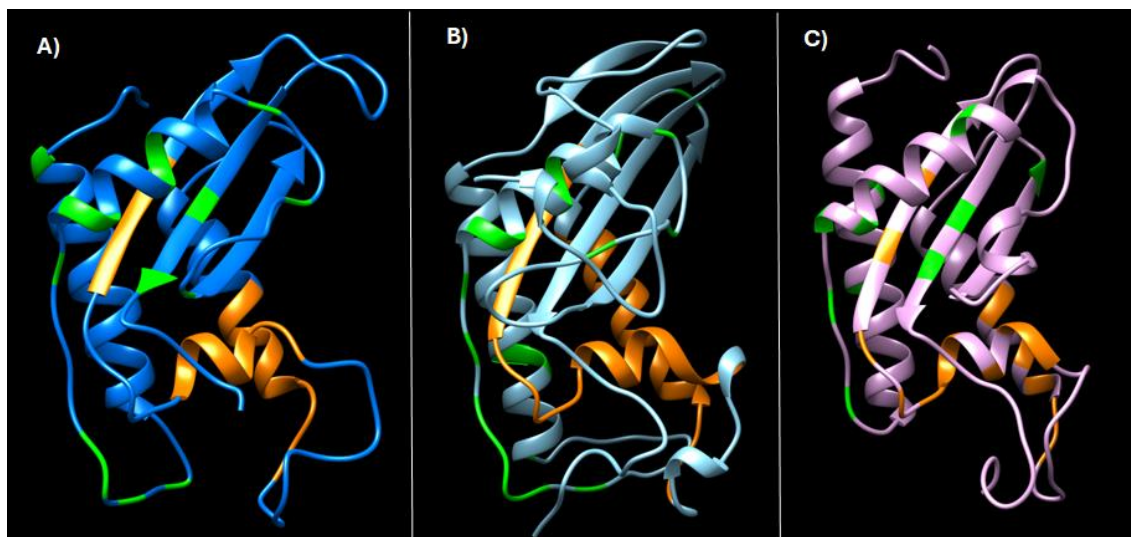


Figura 3. Estructura terciaria del alérgeno 5 predicha por I-TASSER. A) *Bothrops jararaca*, B) *Vespula germanica* (Avispa alemana) y C) *Bothrops asper*. El color naranja es el sitio activo del alérgeno 5 y el color verde es el dominio CAP, estas regiones están conservadas, como lo muestra el alineamiento múltiple (Figura 1).

Las secuencias de los dominios y sitios activos variaron entre *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca*. Aunque los aminoácidos de una misma proteína difieran entre especies, las estructuras terciarias pueden conservarse si las proteínas desempeñan funciones homólogas. En la Figura 4 se observa la similitud de las estructuras terciarias.

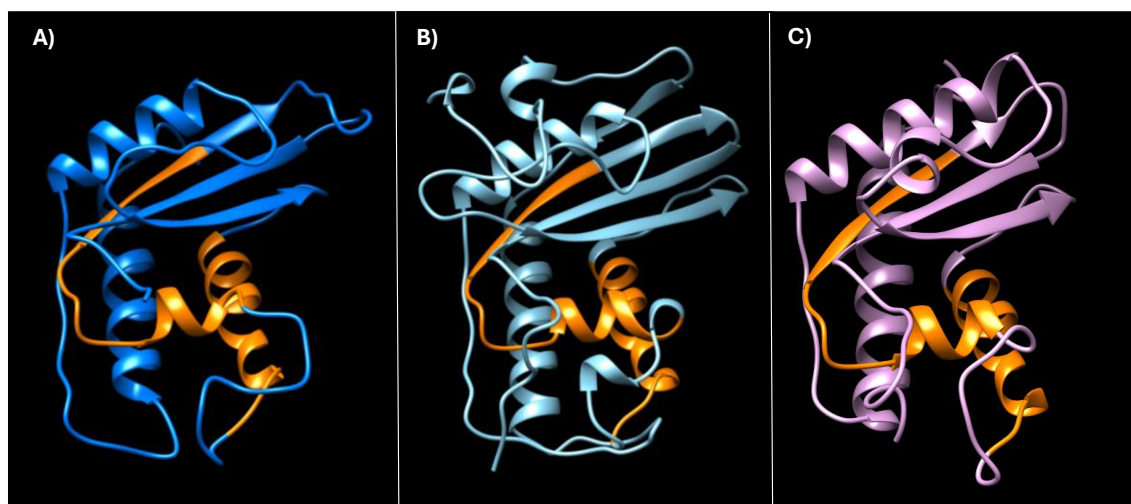


Figura 4. Sitios conservados del alérgeno 5. A) *Bothrops jararaca*, B) de *Vespula germanica* (Avispa alemana) y C) *Bothrops asper*. En todos los modelos el color naranja es el sitio activo del alérgeno 5 (Ag5) identificado previamente en la Figura 1 y 2.

Los modelos A, B y C (Figura 4), presentaron el Ag5 en las mismas posiciones de las hélices alfa y hojas beta. Debido a que el sitio activo es una región específica donde se lleva a cabo la actividad catalítica o funcional, es muy probable que compartan la misma función.

5.1.4. Validación de modelos

A. Gráfico de Ramachandran

Tabla 3. Número de residuos del alérgeno 5 para cada región del gráfico de Ramachandran de *Bothrops asper*.

Tipos de residuos	#Residuos
Residuos en regiones favorables	106
Residuos en regiones permitidas	23
Residuos en regiones medianamente permitidas	0
Residuos en regiones no permitidas	1

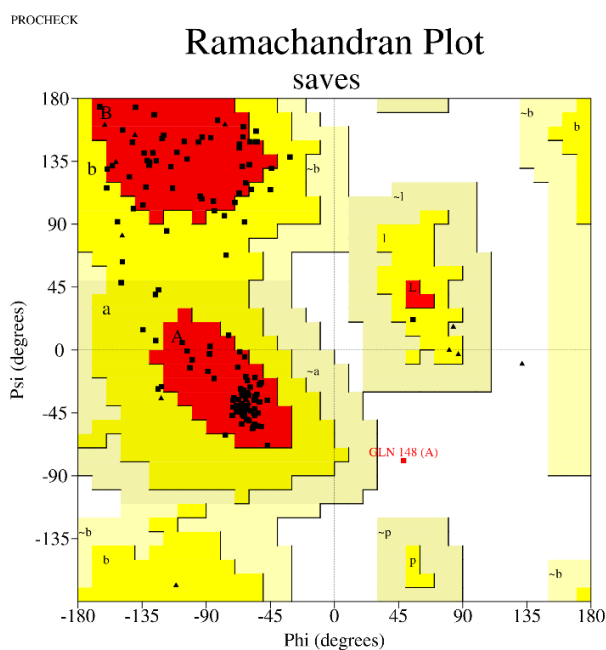


Figura 5. Gráfico de Ramachandran del alérgeno 5 para el modelo de *Bothrops asper*. La glutamina (GLN 148) está en la región no permitida. Gráfico generado por PROCHEK.

Tabla 4. Número de residuos del alérgeno 5 para cada región del gráfico de Ramachandran de *Bothrops jararaca*.

Tipos de residuos	#Residuos
Residuos en regiones favorables	99
Residuos en regiones permitidas	28
Residuos en regiones medianamente permitidas	5
Residuos en regiones no permitidas	2

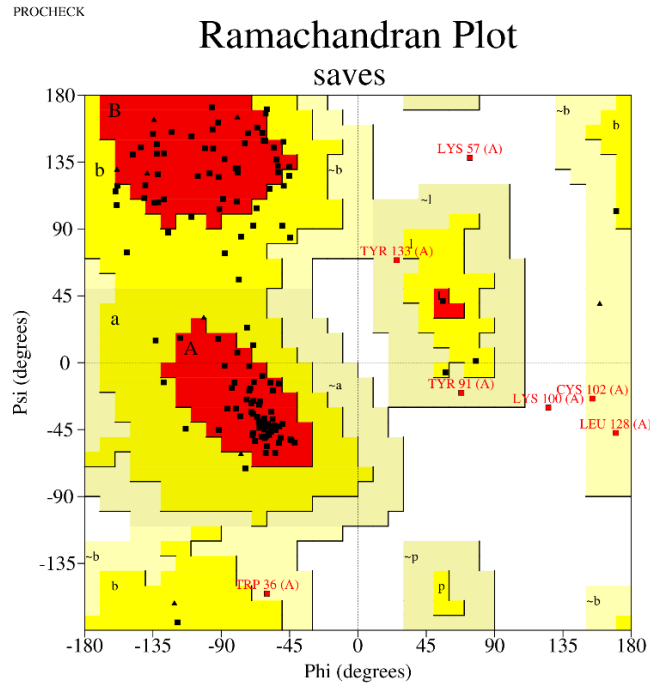


Figura 6. Gráfico de Ramachandran del alérgeno 5 para el modelo de *Bothrops jararaca*. La lisina (LYS 57 y 100) está en la región no permitida. Gráfico generado por PROCHEK.

Los gráficos de Ramachandran para *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca* demostraron que los aminoácidos del modelo predicho tienen una estructura estable. Sin embargo, se deben analizar detalladamente las lisinas en las posiciones 57 y 100 para *B. jararaca* y la glutamina de la posición 148 para *B. asper*. Estos aminoácidos están generando interferencia en el plegado, por lo que se consideran parte de la estructura flexible de la proteína. No obstante, tanto la lisina como la glutamina forman hélices alfa.

B. Factor-B

El Factor-B normalizado de *Bothrops asper* (Figura 7A), estimó que la glutamina (GLN 148) se encontraba dentro de la zona flexible del modelo. Sin embargo, la estructura de la glutamina se caracteriza por formar hélices alfa, por lo que la presencia de ese aminoácido en la zona flexible posiblemente sea un error. Esto se corroboró con el gráfico de Ramachandran de la Figura 5.

Por otro lado, para el modelo de *Bothrops jararaca* el gráfico de Ramachandran (Figura 6) muestra como la lisina (LYS 57 y 100) está en regiones no permitidas. La lisina tiende a formar hélices alfa, no obstante, el Factor-B (Figura 7B) la clasificó en el modelo como parte de la zona flexible. A diferencia de lo observado en la Figura 7A, la lisina no está muy lejos del valor límite, ya que entre más cerca del cero, lo más probable es que ese aminoácido forme parte de una estructura rígida (hoja beta o hélice alfa).

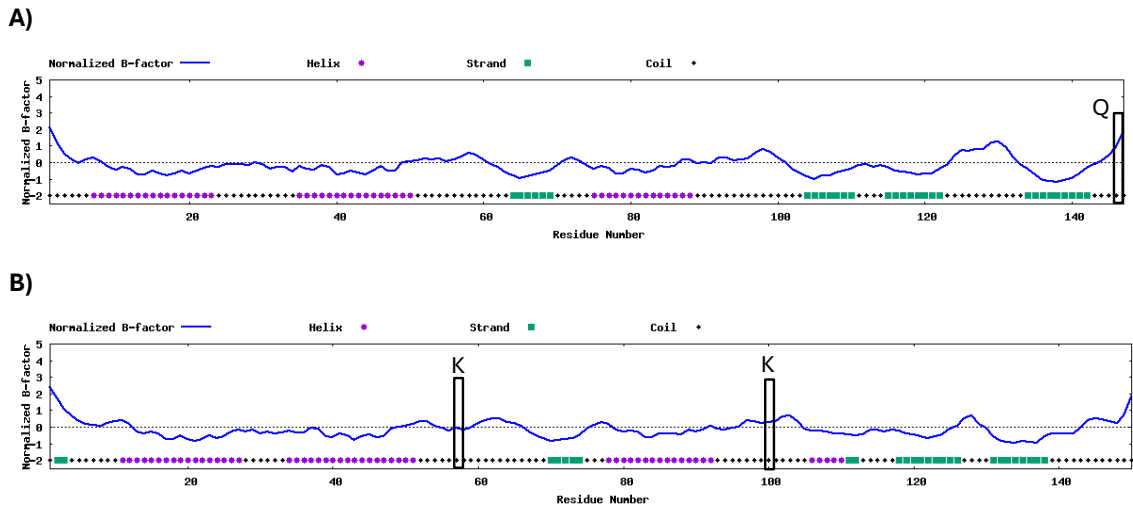


Figura 7. Factor-B del alérgeno 5 para cada modelo, proporcionado por I-TASSER. Modelo A) *Bothrops jararaca* y B) *Bothrops asper*. Se marcan los aminoácidos identificados en regiones no permitidas. En *B. jararaca* glutamina (Q) y en *B. asper* lisina (K).

C. ERRAT (Factor de calidad general)

A Program: ERRAT2
File: B_jararaca_model1.pdb
Chain#:A
Overall quality factor**: 84.173

B Program: ERRAT2
File: B_asper_model1.pdb
Chain#:A
Overall quality factor**: 91.549

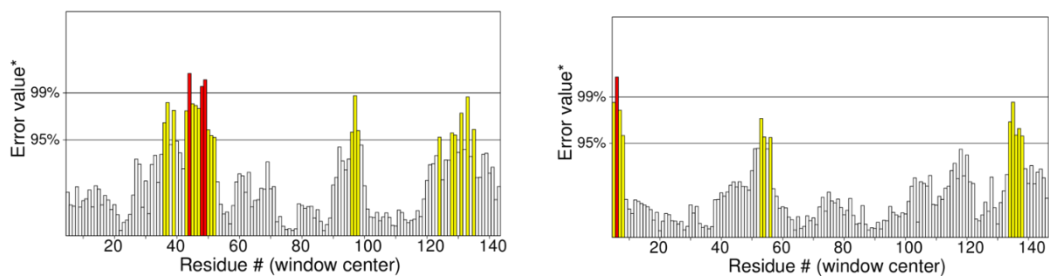


Figura 8. Gráfico del factor de calidad general de la estructura modelada para el alérgeno 5. Modelo A) *Bothrops jararaca* y B) *Bothrops asper*. Las regiones de color rojo y amarillo representan la parte problemática, mientras que el color blanco representa la parte normal de la estructura.

El factor de calidad medido por ERRAT para *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper* es del 84,17% y 91,54%, respectivamente. Aunque idealmente se busca un factor de calidad superior al 95% para considerar un modelo como de alta calidad, se ha establecido que valores por encima del 50% son considerados como modelos aceptables (Omar et al., 2018; Dym et al., 2006). Considerando todos los parámetros de calidad evaluados, se establece que los modelos predichos del alérgeno 5 para *B. jararaca* y *B. asper* son considerados buenos, ya que los aminoácidos incongruentes no generan mayores efectos adversos en la estabilidad del modelo.

5.2. Apolipoforina

5.2.1. Dominios y sitios activos

5.2.3. Estructura terciaria

La apolipoforina de *Odontomachus monticola* (Hormiga trampa) tiene una longitud de 3375 aminoácidos, sin embargo, el análisis se centró específicamente en el dominio vWFD que se encuentra entre 2799-2968 (169 aminoácidos). El modelo para esta proteína fue predicho con SWISS-MODEL. Por otro lado, las estructuras terciarias de *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca* fueron predichas con I-TASSER.

En la Figura 11 el modelo A y B comparten casi por completo las hojas beta, sin embargo, difieren en la posición de las hélices alfa. Por otro lado, el modelo C está incompleto debido a que la secuencia recuperada es muy corta, plegándose solo una parte de las hojas beta asociadas con vWFD.

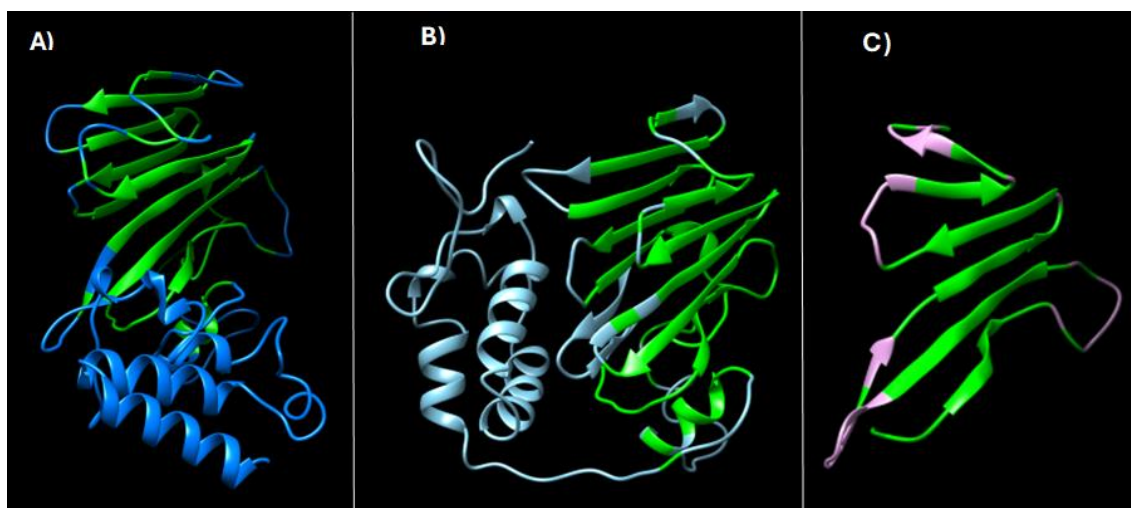


Figura 11. Estructura terciaria de la apolipoforina predicha por I-TASSER. A) *Bothrops jararaca*, B) *Odontomachus monticola* (Hormiga trampa) y C) *Bothrops asper*. En todos los modelos el color verde es el dominio del factor von Willebrand tipo D (vWFD).

5.2.4. Validación de modelos

A. Gráfico de Ramachandran

Tabla 5. Número de residuos de la apolipoforina para cada región del gráfico de Ramachandran de *Bothrops asper*.

Tipos de residuos	# Residuos
Residuos en regiones favorables	39
Residuos en regiones permitidas	25
Residuos en regiones medianamente permitidas	0
Residuos en regiones no permitidas	1

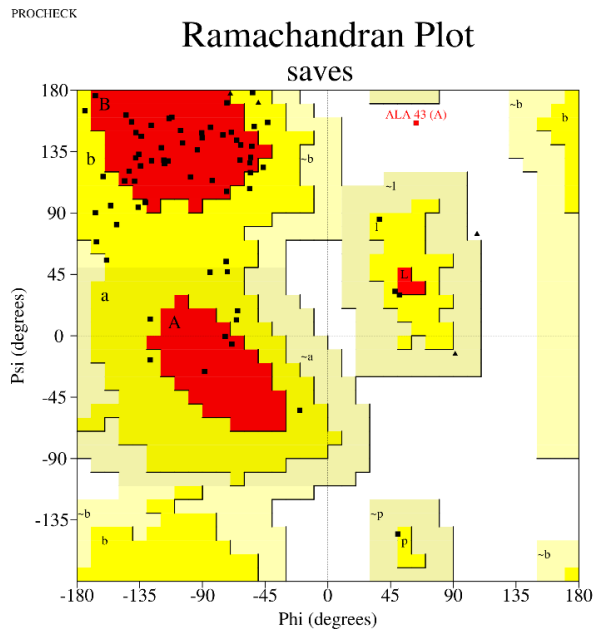


Figura 12. Gráfico de Ramachandran de la apolipoporfina para el modelo de *Bothrops asper*. La alanina (ALA 43) está en la región no permitida. Gráfico generado por PROCHEK.

Tabla 6. Número de residuos de la apolipoporfina para cada región del gráfico de Ramachandran de *Bothrops jararaca*.

Tipos de residuos	# Residuos
Residuos en regiones favorables	149
Residuos en regiones permitidas	46
Residuos en regiones medianamente permitidas	10
Residuos en regiones no permitidas	4

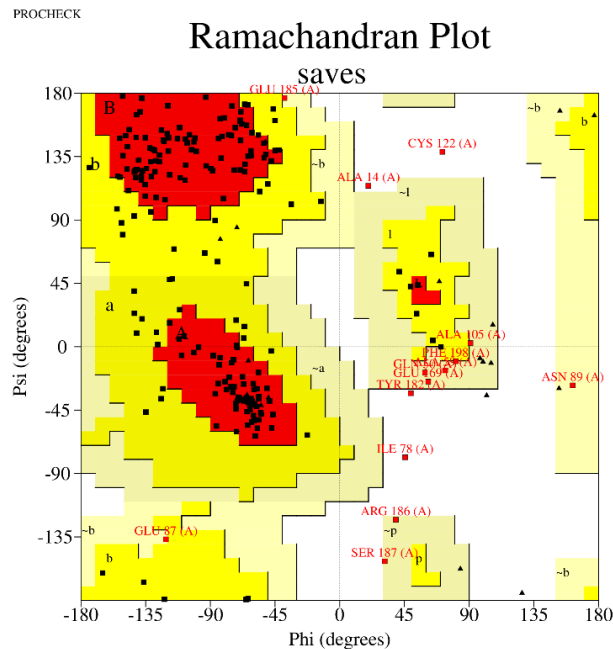


Figura 13. Gráfico de Ramachandran de la apolipoproteína para el modelo de *Bothrops jararaca*. La cisteína (CYS 122), alanina (ALA 14), tirosina (TYR 182) y la isoleucina (ILE 78) están en la región no permitida. Gráfico generado por PROCHECK.

Los gráficos de Ramachandran para *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca* demostraron que los aminoácidos del modelo predicho, tienen en su mayoría, una estructura estable. Sin embargo, en *B. jararaca* hay más aminoácidos en regiones no permitidas que en *B. asper*. Este resultado se generó porque *B. jararaca* tiene una secuencia más completa (Figura 10) y durante el modelado algunos aminoácidos interfirieron con el plegado.

B. Factor-B

El gráfico de Ramachandran de *Bothrops jararaca* (Figura 13) ubicaron a la cisteína (CYS 122), alanina (ALA 14), tirosina (TYR 182) e isoleucina (ILE 78) en la región no permitida. Entre estos aminoácidos el Factor-B normalizado no logró modelar la isoleucina, catalogándola como parte de la estructura flexible. Por otro lado, la cisteína, alanina y tirosina, se modelaron de forma errónea, ya que la tirosina corresponde a la hoja beta y no a la hélice alfa como sugiere la Figura 14A. De igual forma, en la Figura 14B se observa que la cisteína y alanina formarían hojas beta, pese a que son propias de estructuras de hélices alfa.

De manera similar, en *Bothrops asper* el gráfico de Ramachandran (Figura 12) reveló que la alanina (ALA 43) está en una región no permitida. Sin embargo, el Factor-B normalizado (Figura 14B) indicó que fue posible modelarla dentro de una hoja beta, que estructuralmente no coincide con las características de la alanina.

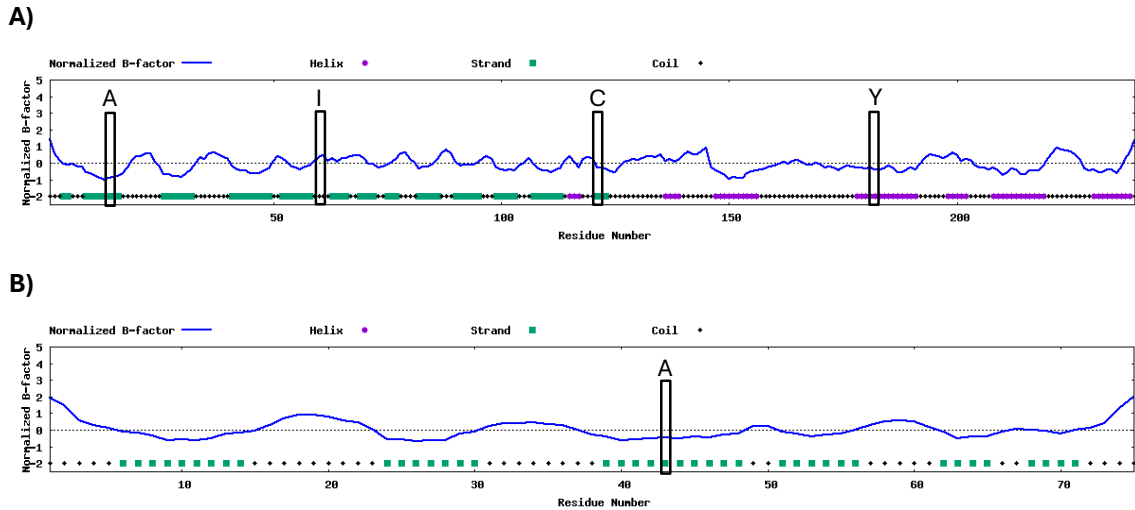


Figura 14. Factor-B normalizado del factor von Willebrand tipo D para cada modelo, proporcionado por I-TASSER. Modelo A) *Bothrops jararaca* y B) *Bothrops asper*. Se marcan los aminoácidos identificados en regiones no permitidas. En B. jararaca son alanina (A), isoleucina (I), cisteína (C), tirosina (Y) y en B. asper es alanina (A).

C. ERRAT (Factor de calidad general)

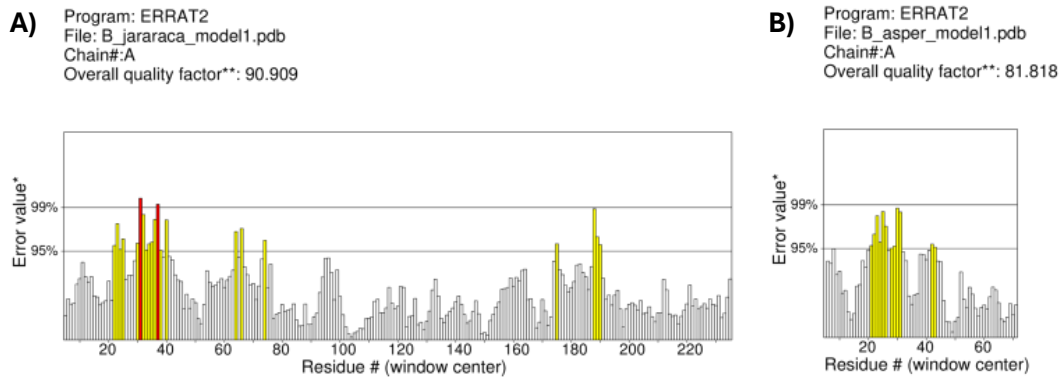


Figura 15. Gráfico del factor de calidad general de la estructura modelada para el factor von Willebrand tipo D (vWFD). Modelo A) *Bothrops jararaca* y B) *Bothrops asper*. Las regiones de color rojo y amarillo representan la parte problemática, mientras que el color blanco representa la parte normal de la estructura.

El factor de calidad medido por ERRAT para *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper* es del 90,90% y 81,81%, respectivamente. Los modelos predichos para *B. jararaca* y *B. asper* son considerados buenos. Sin embargo, el modelo de *B. asper* está incompleto, puesto que solo se recuperó un fragmento del dominio de la proteína vWFD. En contraste, *B. jararaca* presentó un dominio vWFD completo y comparable con el de *Odontomachus monticola* (Hormiga trampa).

5.3. Arilsulfatasa

5.3.1. Dominios y sitios activos

El análisis Pfam identificó la superfamilia fosfatasa alcalina, los dominios y sitios conservados tipo sulfatasa que coinciden con el transcriptoma de la glándula de veneno de *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca*.

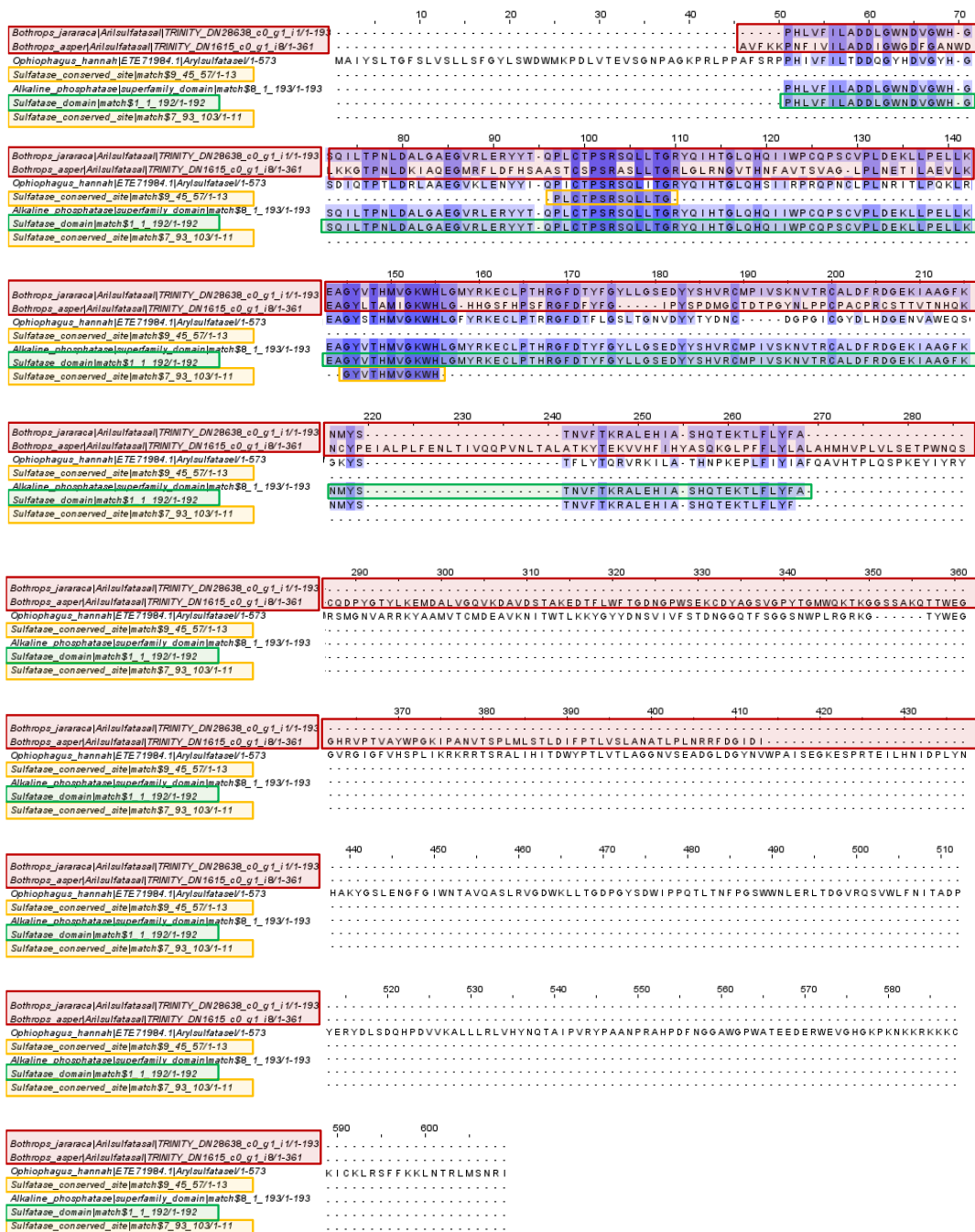


Figura 16. Alineamiento múltiple de secuencias de la arilsulfatasa. Los contigs de *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca*, resaltados en rojo, presentan varios aminoácidos conservados con el dominio sulfatasa (verde) y con los sitios activos sulfatasa (amarillo). Las secuencias fueron recuperadas de la base de datos de Pfam.

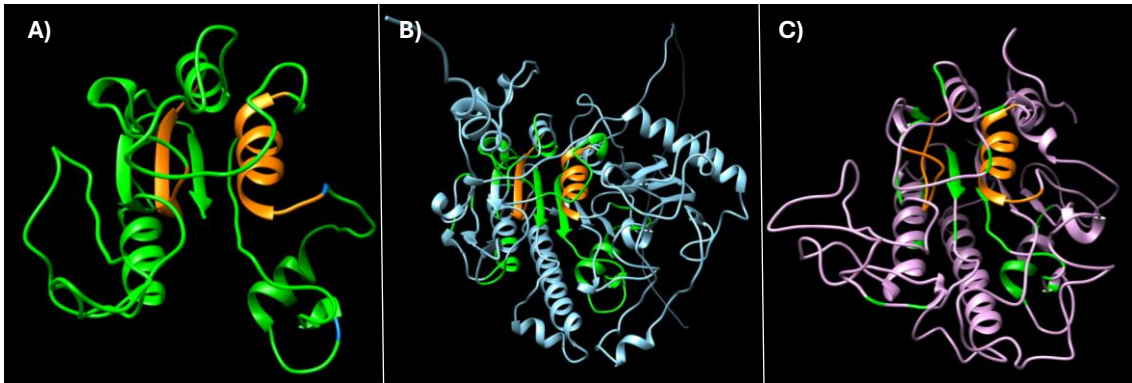


Figura 18. Estructura terciaria de la arilsulfatasa predicha por I-TASSER. A) *Bothrops jararaca*, B) *Ophiophagus hannah* (Cobra real) y C) *Bothrops asper*. El color naranja es el sitio conservado sulfatasa y el color verde es el dominio sulfatasa.

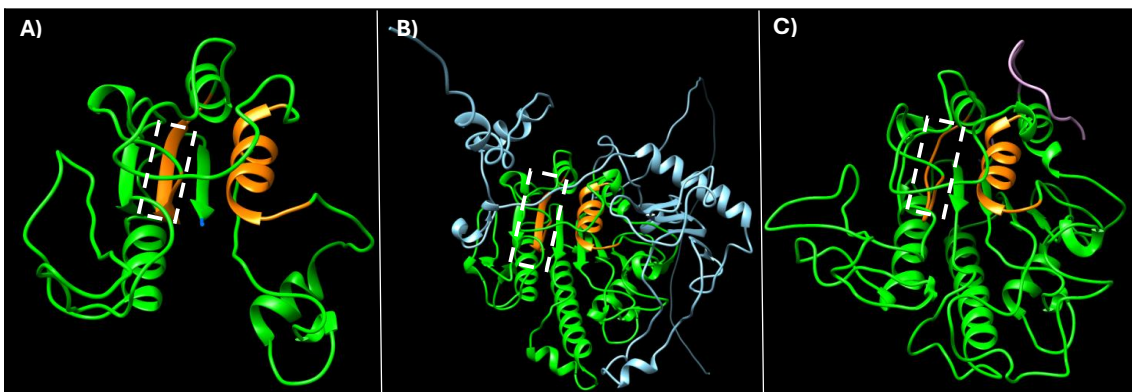


Figura 19. Sitios conservados de la arilsulfatasa. A) *Bothrops jararaca*, B) *Ophiophagus hannah* (Cobra real) y C) *Bothrops asper*. En todos los modelos el color naranja es el sitio conservado sulfatasa y el color verde es el dominio sulfatasa. En el modelo de *B. asper* no se formó una hoja beta del dominio sulfatasa (cuadrado blanco).

5.3.4. Validación de modelos

A. Gráfico de Ramachandran

Tabla 7. Número de residuos de la arilsulfatasa para cada región del gráfico de Ramachandran de *Bothrops asper*.

Tipos de residuos	# Residuos
Residuos en regiones favorables	176
Residuos en regiones permitidas	94
Residuos en regiones medianamente permitidas	21
Residuos en regiones no permitidas	10

PROCHECK

Ramachandran Plot

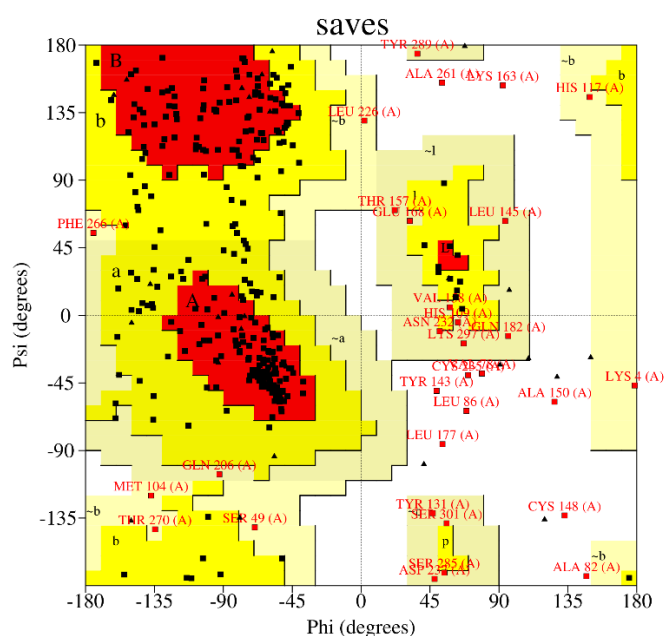


Figura 20. Gráfico de Ramachandran de la arilsulfatasa para el modelo de *Bothrops asper*. La alanina (ALA 82, 150 y 261), valina (VAL 78), cisteína (CYS 148 y 235), tirosina (TYR 143), leucina (LEU 86 y 177) y lisina (LYS 163) están en la región no permitida. Gráfico generado por PROCHEK.

Tabla 8. Número de residuos de la arilsulfatasa para cada región del gráfico de Ramachandran de *Bothrops jararaca*.

Tipos de residuos	# Residuos
Residuos en regiones favorables	109
Residuos en regiones permitidas	46
Residuos en regiones medianamente permitidas	9
Residuos en regiones no permitidas	3

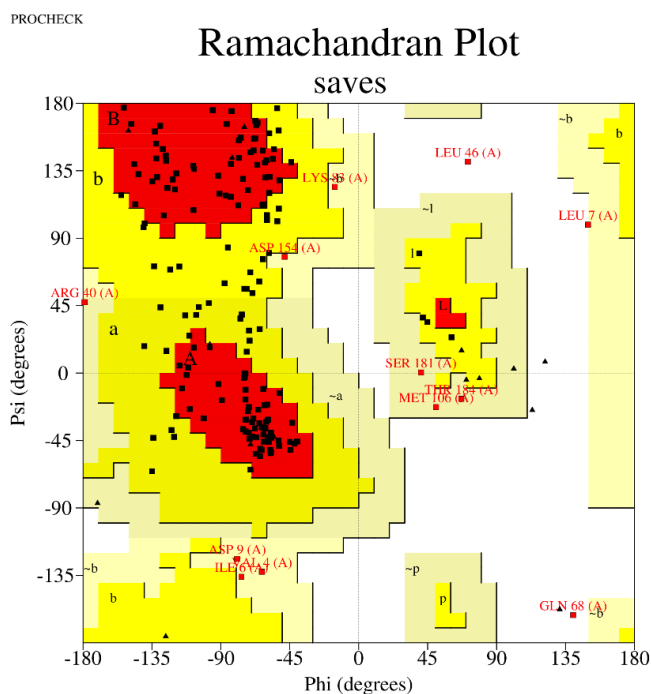


Figura 21. Gráfico de Ramachandran de la arilsulfatasa para el modelo de *Bothrops jararaca*. La leucina (LEU 46 y 7) y glutamina (GLN 68) están en la región no permitida. Gráfico generado por PROCHEK.

Los gráficos de Ramachandran para *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca* indicaron como los aminoácidos del modelo predicho, tienen en su mayoría, una estructura estable. Sin embargo, *B. asper* presentó más aminoácidos en regiones no permitidas que *B. jararaca*. Para el modelo de *B. asper* se recuperó una secuencia más completa (Figura 16) que posiblemente tenga aminoácidos que interfieren con el plegado, como por ejemplo en la hoja beta que se muestra como una estructura flexible (Figura 19).

B. Factor-B

El gráfico de Ramachandran de *Bothrops jararaca* (Figura 21) identificó a la leucina (LEU 46 y 7) y glutamina (GLN 68) en la región no permitida. Entre estos aminoácidos el Factor-B normalizado no logró modelar la glutamina y leucina de la posición 46, catalogándola como parte de la estructura flexible. Por otro lado, la leucina de la posición 7 se modeló de forma errónea, ya que la leucina corresponde a una hélice alfa y no a la hoja beta como sugirió el Factor-B de la Figura 22A. De igual forma la Figura 22B asumió que la alanina, valina, leucina, cisteína, tirosina y lisina forman la estructura flexible, pese a que tienen afinidad por estructuras de hélices alfa (cisteína, alanina, leucina, lisina) y hojas beta (valina, tirosina).

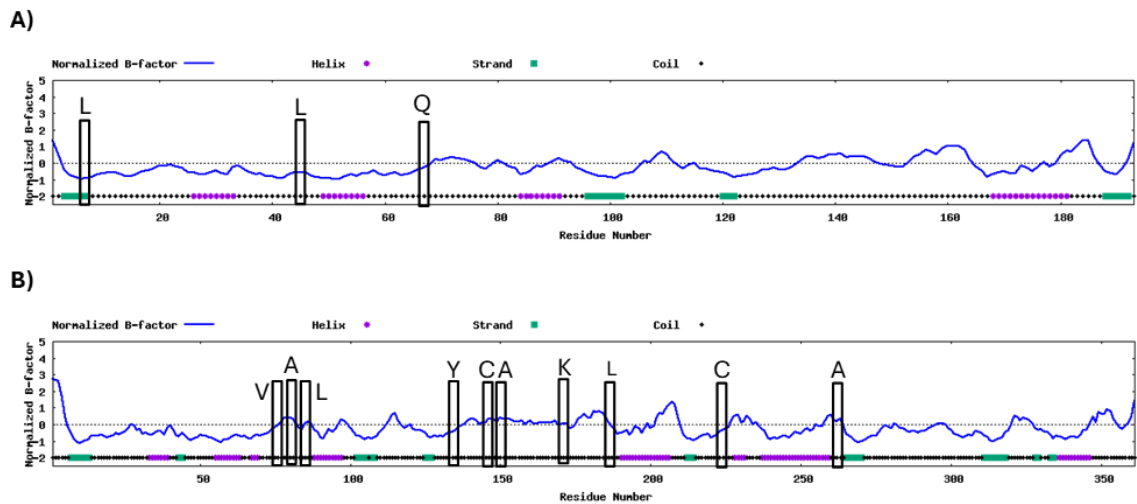
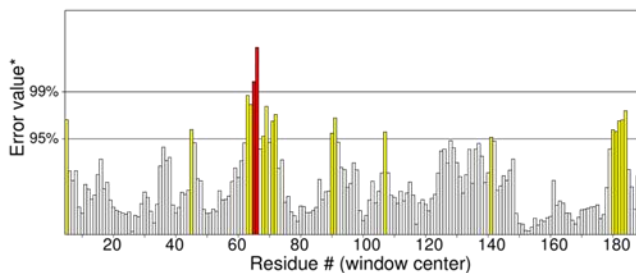


Figura 22. Factor-B de la arilsulfatasa para cada modelo, proporcionado por I-TASSER. Modelo A) *Bothrops jararaca* y B) *Bothrops asper*. Se marcan los aminoácidos identificados en regiones no permitidas. En *B. jararaca* son leucina (L), glutamina (Q) y en *B. asper* son alanina (A), valina (V), leucina (L), cisteína (C), tirosina (Y), lisina (K).

C. ERRAT (Factor de calidad general)

A) Program: ERRAT2
File: B_jararaca_model1.pdb
Chain#:A
Overall quality factor**: 89.730



B) Program: ERRAT2
File: B_asper_model1.pdb
Chain#:A
Overall quality factor**: 75.921

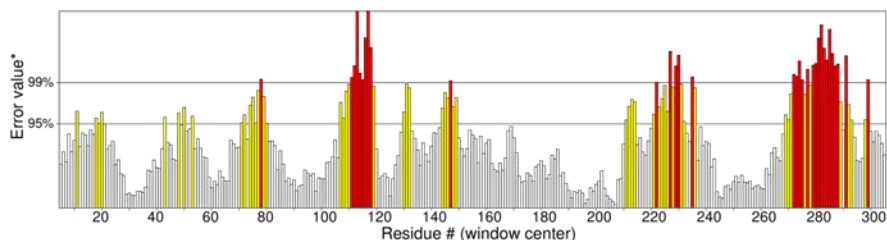


Figura 23. Gráfico del factor de calidad general de la estructura modelada para la arilsulfatasa-I. Modelo A) *Bothrops jararaca* y B) *Bothrops asper*. Las regiones de color rojo y amarillo representan la parte problemática, mientras que el color blanco representa la parte normal de la estructura.

El factor de calidad medido por ERRAT para *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper* es del 89,73% y 75,92%, respectivamente. Los modelos predichos para *B. jararaca* y *B. asper*

5.4.3. Estructura terciaria

Los modelos de la Figura 26 presentaron una estructura terciaria muy similar con dos hélices alfa en todos los modelos, cinco hojas beta para el modelo A-B, y cuatro hojas beta para el modelo C. El recuadro rojo señala una hoja beta (63-65) presente únicamente en *Bothrops jararaca*, mientras que el recuadro amarillo indica la hoja beta (7-9) que se moldeó en *B. jararaca* del presente estudio y *B. jararaca* de UniProt [P22030]. Además, la hoja beta del recuadro blanco (117-123) presentó los mismos aminoácidos del modelo B y C. Dichas variaciones pueden ser producto de errores durante el modelado de las proteínas.

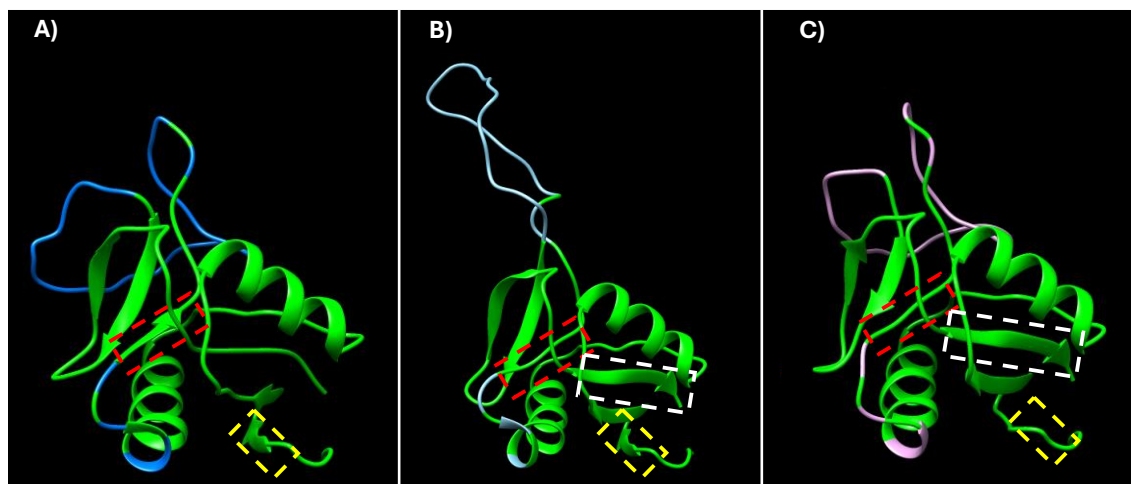


Figura 26. Estructura terciaria de la botrocetina predicha por I-TASSER. A) *Bothrops jararaca*, B) *Bothrops jararaca* de UniProt y C) *Bothrops asper*. El color verde es el dominio de la lectina tipo C.

5.4.4. Validación de modelos

A. Gráfico de Ramachandran

Tabla 9. Número de residuos de la botrocetina para cada región del gráfico de Ramachandran de *Bothrops asper*.

Tipos de residuos	# Residuos
Residuos en regiones favorables	76
Residuos en regiones permitidas	25
Residuos en regiones medianamente permitidas	7
Residuos en regiones no permitidas	0

PROCHECK

Ramachandran Plot

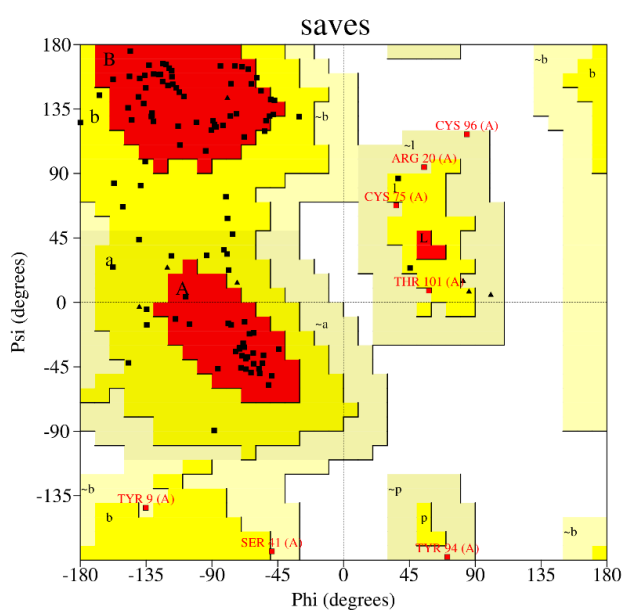


Figura 27. Gráfico de Ramachandran de la botrocetina para el modelo de *Bothrops asper*. La cisteína (CYS 75 y 96), tirosina (TYR 9 y 94), serina (SER 41) y la treonina (THR 101) están en las regiones medianamente permitidas. Gráfico generado por PROCHEK.

Tabla 10. Número de residuos de la botrocetina para cada región del gráfico de Ramachandran de *Bothrops jararaca*.

Tipos de residuos	# Residuos
Residuos en regiones favorables	72
Residuos en regiones permitidas	31
Residuos en regiones medianamente permitidas	7
Residuos en regiones no permitidas	6

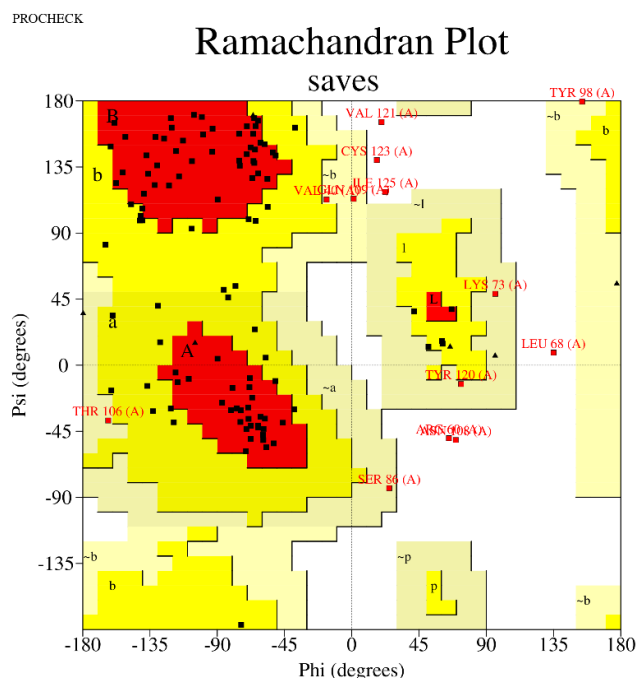


Figura 28. Gráfico de Ramachandran de la botrocetina para el modelo de *Bothrops jararaca*. La arginina (ARG 60), asparagina (ASN 108), leucina (LEU 68), cisteína (CYS 123), isoleucina (ILE 125) y la valina (VAL 121) están en las regiones no permitidas. Gráfico generado por PROCHEK.

Los gráficos de Ramachandran para *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca* mostraron como los aminoácidos del modelo predicho tienen en su mayoría una estructura estable. Sin embargo, en *B. jararaca* hay más aminoácidos en regiones no permitidas que en *B. asper*. Posiblemente, los aminoácidos que están causando ruido en *B. jararaca* sean aquellos que están formando una hoja beta únicamente en el modelo de la Figura 26A. Del mismo modo, en *B. asper*, los aminoácidos en regiones medianamente permitidas no pueden plegarse y formar una hoja beta, la cual sí se expresa en los demás modelos (Figura 26).

B. Factor-B

El gráfico de Ramachandran de *Bothrops jararaca* (Figura 28A) identificó a la leucina (LEU 68) y cisteína (CYS 123) en la región no permitida. No obstante, el Factor-B normalizado predijo que dichos aminoácidos forman parte de una hoja beta, pese a que estos residuos conforman la estructura de una hélice alfa. La ubicación errónea de los aminoácidos provocó que la hoja beta (117-123) no se represente en el modelo de la Figura 26A. De igual forma la Figura 29B asume que la serina (SER 41), tirosina (TYR 94), treonina (THR 101) y cisteína (75 Y 96), forman la estructura flexible, pese a que tienen preferencia por las estructuras de hélices alfa (cisteína) y hojas beta (serina, tirosina y treonina). La tirosina de la posición 9 (TYR 9) impide que se forme una hélice alfa, esto se comprobó con el modelo de la Figura 26C, donde el recuadro amarillo marca la ausencia de esta estructura.

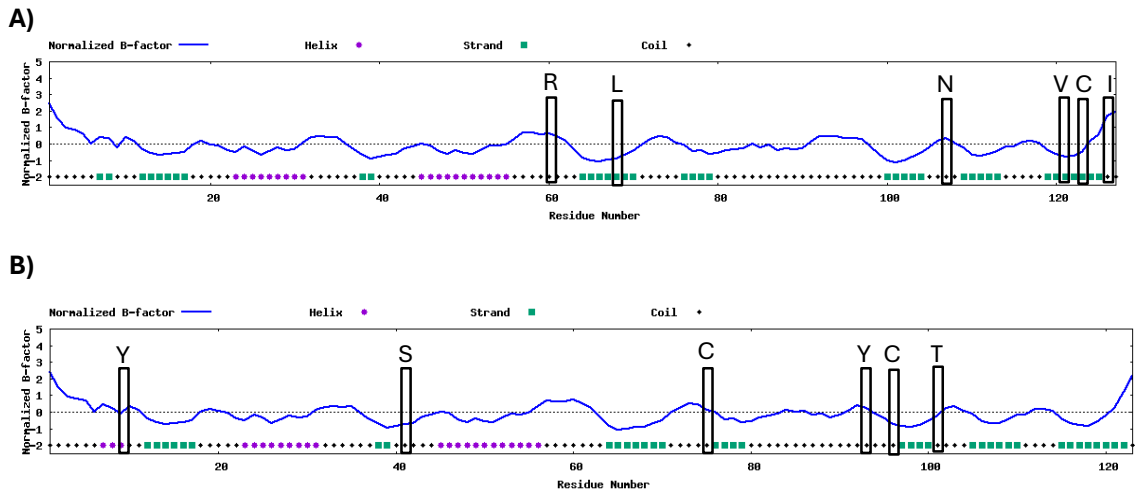


Figura 29. Factor-B normalizado de la arilsulfatasa para cada modelo, proporcionado por I-TASSER. Modelo A) *Bothrops jararaca* y B) *Bothrops asper*. Se marcan los aminoácidos identificados en regiones no permitidas, para *B. jararaca* son: asparagina (N), isoleucina (I), cisteína (C), valina (V), leucina (L) y arginina (R). Las regiones medianamente permitidas en *B. asper* son: cisteína (C), tirosina (Y), serina (S), treonina (T).

C. ERRAT (Factor de calidad general)

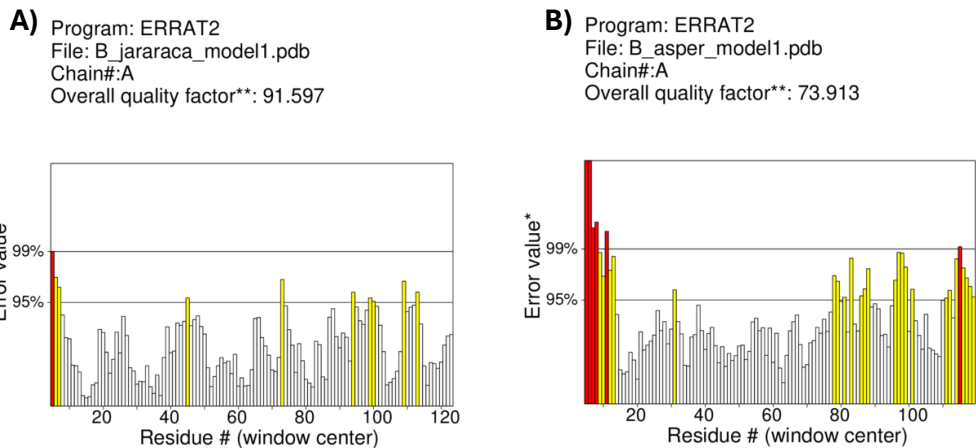


Figura 30. Gráfico del factor de calidad general de la estructura modelada para la botrocetina. Modelo A) *Bothrops jararaca* y B) *Bothrops asper*. Las regiones de color rojo y amarillo representan la parte problemática, mientras que el color blanco representa la parte normal de la estructura.

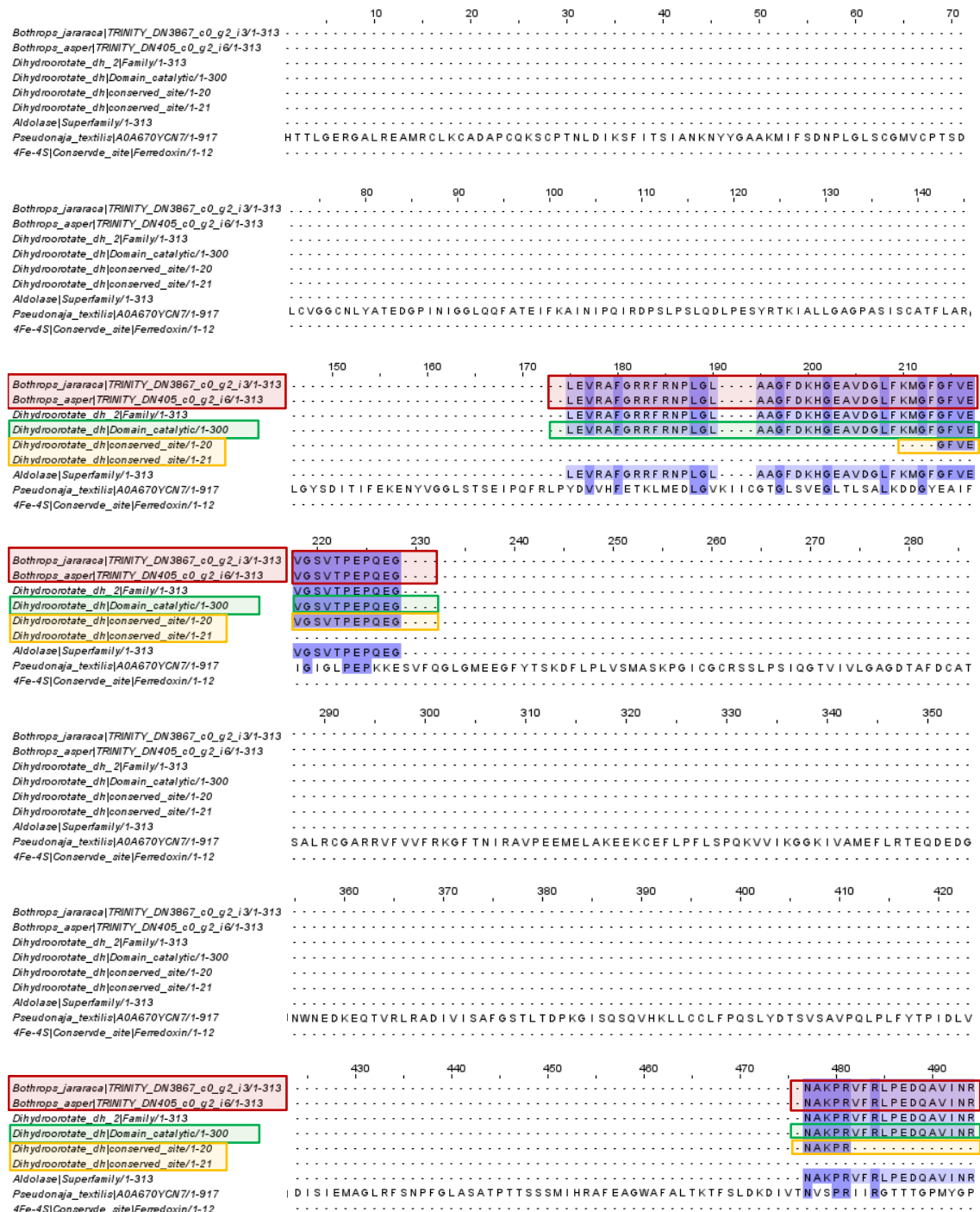
El factor de calidad medido por ERRAT para *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper* es del 91,59% y 73,91%, respectivamente. Los modelos predichos para *B. jararaca* y *B. asper* son considerados buenos. Sin embargo, el modelo de *B. asper* presentó varios aminoácidos en posiciones erróneas (Figura 30B), lo que provocó que estructuras como las hojas beta en la posición 7-9 no se plieguen correctamente (Figura 26C). En contraste, el modelo de *B. jararaca* formó con una hoja beta adicional en la posición 63-65 y una hoja beta faltante en la posición 117-123 (Figura 26A). No obstante, la estructura faltante sí se ve representada por ERRAT y el Factor-B, pero el gráfico de Ramachandran indicó que la cisteína (CYS 123) está en una región no permitida y, por ende, genera ruido. En

resumen, durante el modelamiento, la mala posición de un solo aminoácido comprometió la formación de toda una estructura.

5.5. Dihidropirimidina deshidrogenasa

5.5.1. Dominios y sitios activos

Los resultados de PFAM para *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca* identificaron secuencias relacionadas con la superfamilia aldolasa, el dominio y el sitio conservado dihidroorotato deshidrogenasa. Además, con el alineamiento múltiple se identificó ciertas coincidencias con el sitio conservado ferredoxina (4Fe-4S) de *Pseudonaja textilis* (Serpiente marrón).



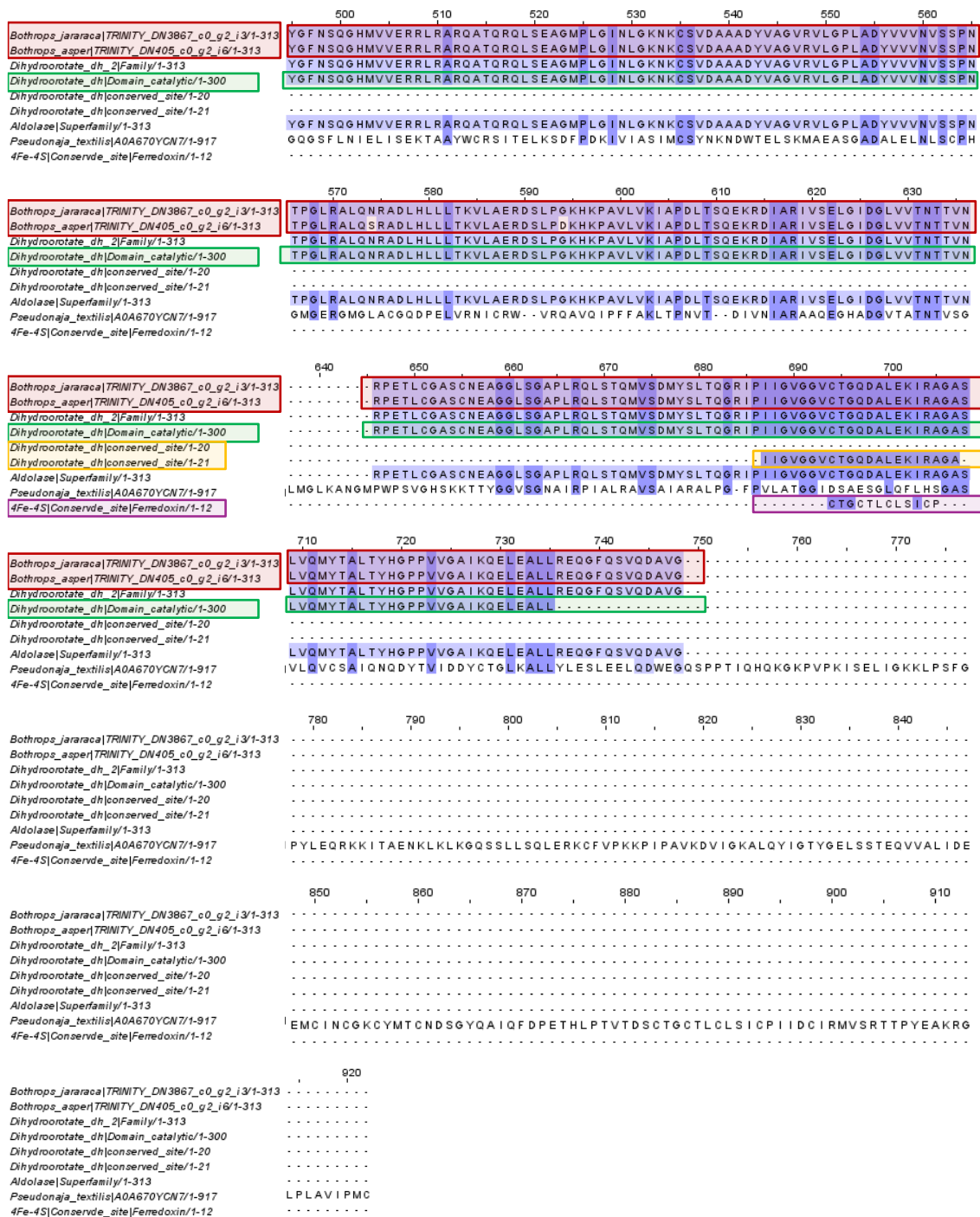
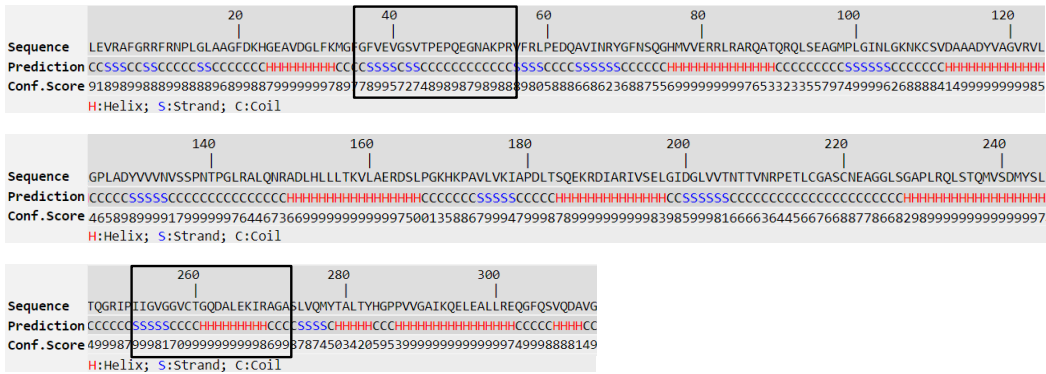


Figura 31. Alineamiento múltiple de secuencias de la dihidropirimidina deshidrogenasa. Los contigs de *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca*, resaltados en rojo, presentan un alto grado de conservación con el dominio dihidroorotato deshidrogenasa (verde) y los sitios conservados de dihidroorotato (amarillo), así como con la superfamilia de aldolasa. Por otro lado, en el sitio conservado de ferredoxina (morado), hay muy pocas coincidencias. Las secuencias fueron recuperadas de la base de datos de Pfam.

5.5.2. Estructura secundaria

A)



B)

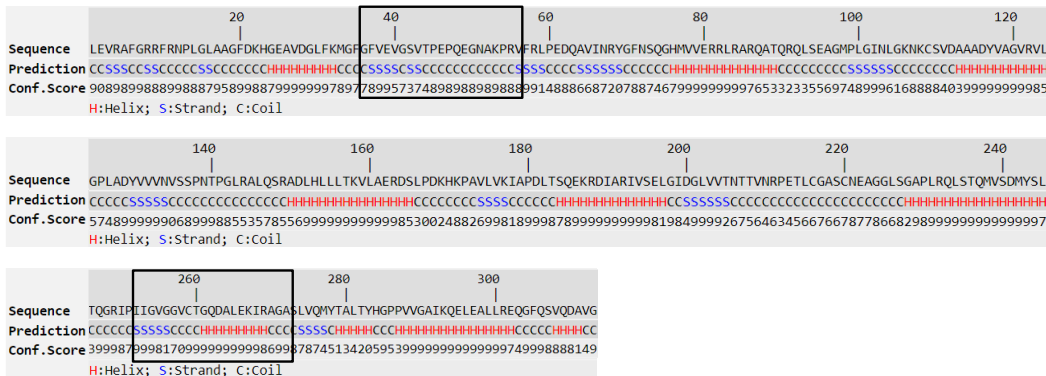


Figura 32. Estructura secundaria de la dihidropirimidina deshidrogenasa predicha por I-TASSER. A) Estructura secundaria de *Bothrops jararaca* y B) de *Bothrops asper*. En ambas estructuras, las áreas marcadas en rojo corresponden a las hélices alfa (H), en azul a las hojas beta (S), y de color negro los segmentos de la proteína que forman la región desordenada (C). Los recuadros marcan las estructuras que conformarían sitios conservados del dihidroorotato deshidrogenasa.

5.5.3. Estructura terciaria

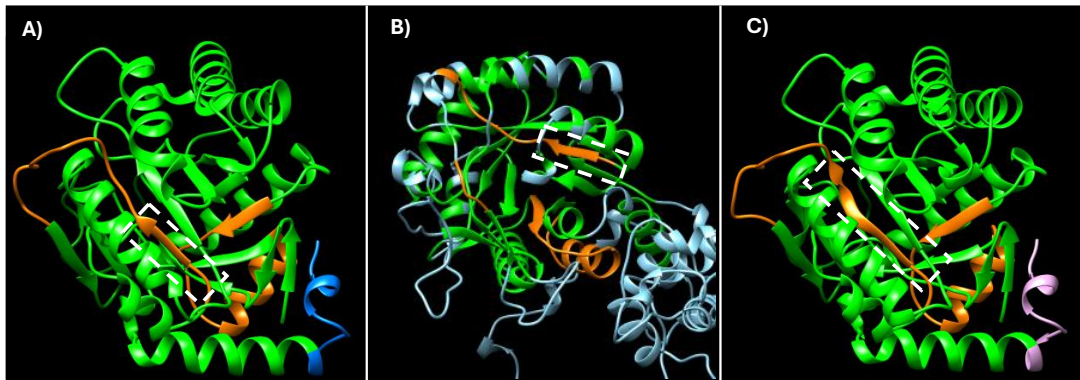


Figura 33. Estructura terciaria de la dihidropirimidina deshidrogenasa predicha por I-TASSER. A) *Bothrops jararaca*, B) *Pseudonaja textilis* (Serpiente marrón) y C) *Bothrops asper*. El color verde es el dominio dihidroorotato deshidrogenasa y el color naranja son los sitios conservados dihidroorotato. El cuadro blanco muestra la diferencia de tamaño de la hoja beta conservada en los modelos.

Los modelos de *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper* presentaron una estructura terciaria muy similar al modelo de *Pseudonaja textiles* (Serpiente marrón), considerando que su secuencia es mucho más grande que las obtenidas. Los sitios conservados y el dominio dihidroorotato deshidrogenasa son muy parecidos, sin embargo, el tamaño de las hojas beta difieren, siendo más grande en *B. asper* que en los otros dos modelos.

Debido a que en la Figura 33 el modelo de referencia corresponde a la dihidropirimidina deshidrogenasa de *Pseudonaja textiles* (Serpiente marrón), no es fácil detectar las similitudes con respecto al dominio dihidroorotato deshidrogenasa. Por esta razón, se alinearon las secuencias obtenidas frente a la dihidroorotato deshidrogenasa humana.

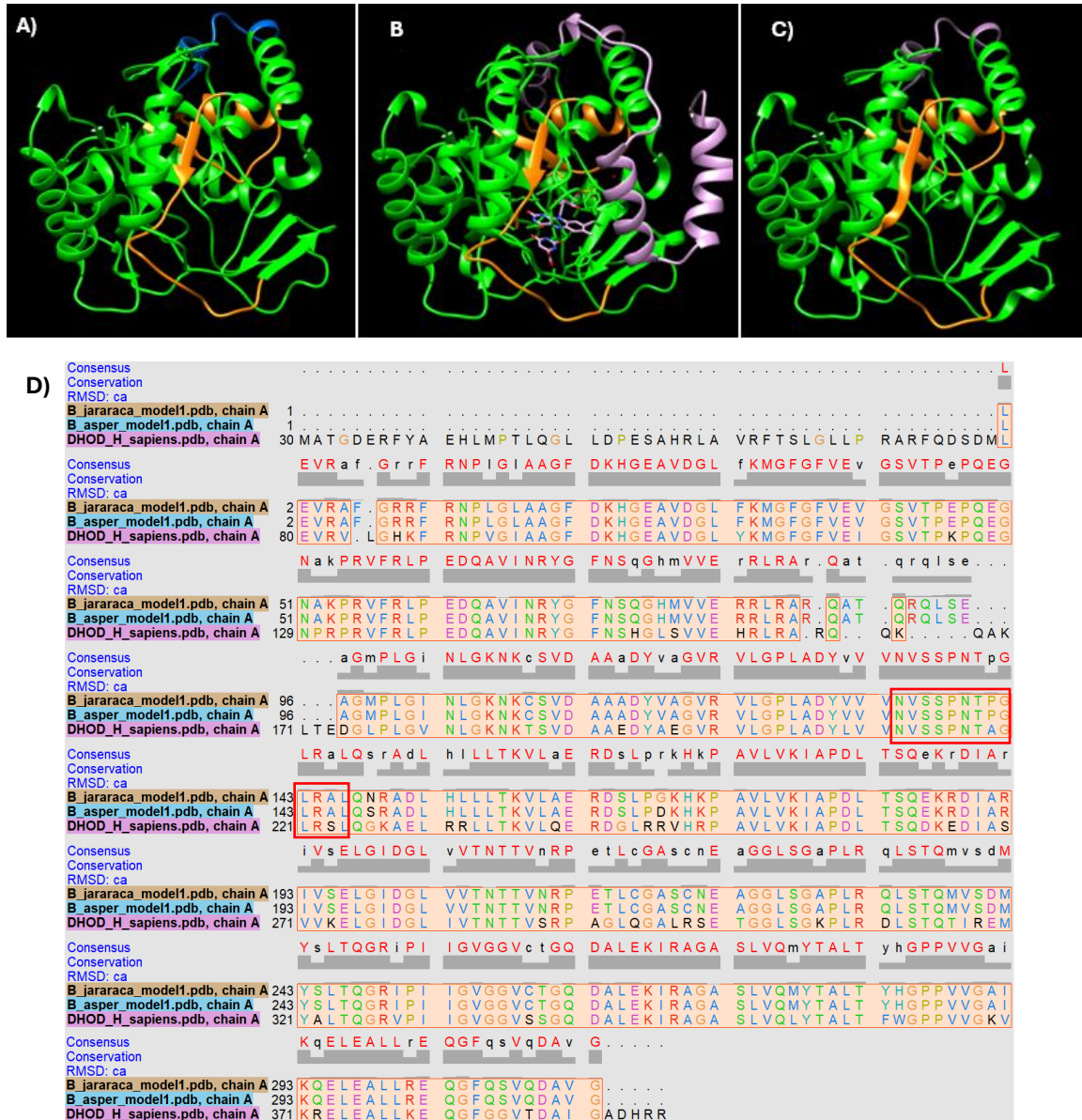


Figura 34. Modelos para el dominio dihidroorotato deshidrogenasa (DHOD). A) DHOD de *Bothrops jararaca*, B) DHOD de *Homo sapiens* y C) DHOD en *Bothrops asper*. El color verde es el dominio dihidroorotato deshidrogenasa y el color naranja son los sitios conservados. D) Alineamiento a nivel estructural, el recuadro rojo marca el motivo conservado entre Asn212 y Leu224.

5.5.4. Validación de modelos

A. Gráfico de Ramachandran

Tabla 11. Número de residuos de la dihidropirimidina deshidrogenasa para cada región del gráfico de Ramachandran de *Bothrops asper*.

Tipos de residuos	# Residuos
Residuos en regiones favorables	218
Residuos en regiones permitidas	37
Residuos en regiones medianamente permitidas	2
Residuos en regiones no permitidas	5

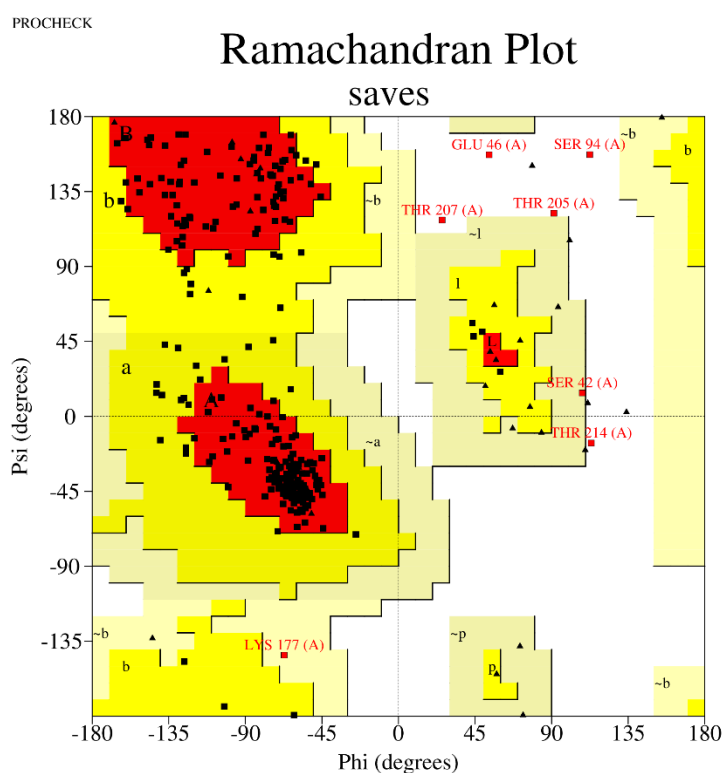


Figura 35. Gráfico de Ramachandran de la dihidropirimidina deshidrogenasa para el modelo de *Bothrops asper*. La glutamina (GLU 46), serina (SER 42 y 94), treonina (THR 205, 207 y 214) y lisina (LYS 177) están en las regiones no permitidas. Gráfico generado por PROCHEK.

Tabla 12. Número de residuos de la dihidropirimidina deshidrogenasa para cada región del gráfico de Ramachandran de *Bothrops jararaca*.

Tipos de residuos	# Residuos
Residuos en regiones favorables	209
Residuos en regiones permitidas	42
Residuos en regiones medianamente permitidas	4
Residuos en regiones no permitidas	6

PROCHECK

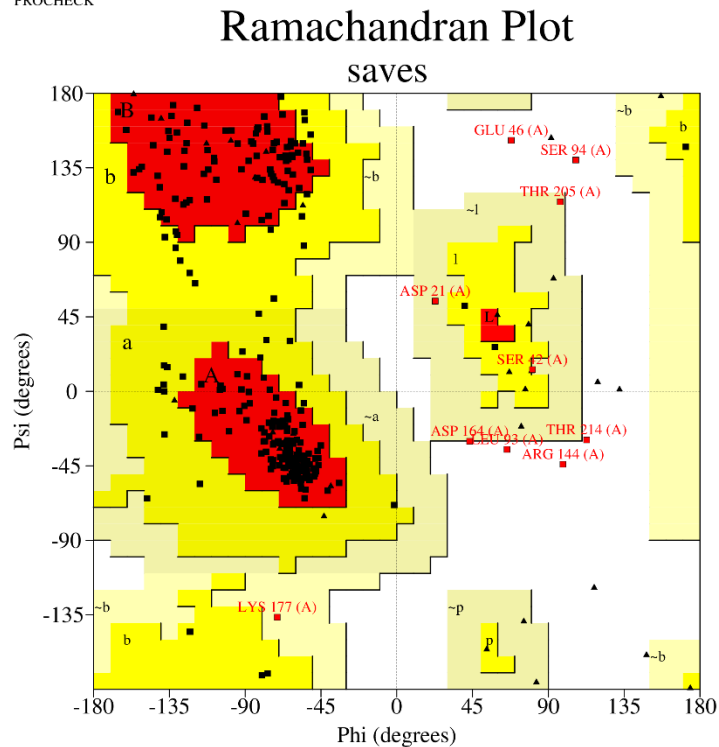


Figura 36. Gráfico de Ramachandran de la dihidropirimidina deshidrogenasa para el modelo de *Bothrops jararaca*. La glutamina (GLU 46), serina (SER 42 y 94), treonina (THR 205 y 214), ácido aspártico (ASP 21 y 164), leucina (LEU 93) y lisina (LYS 177) están en las regiones no permitidas. Gráfico generado por PROCHEK.

Los gráficos de Ramachandran para *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca* mostraron en su mayoría una estructura estable. Sin embargo, en *B. jararaca* se observó un mayor número de aminoácidos en regiones no permitidas que en *B. asper*. Posiblemente, los aminoácidos que estuvieron causando ruido en *B. jararaca* provocaron que algunas estructuras no se formen de manera correcta. Del mismo modo para *B. asper*, aminoácidos como la serina o glutamina generaron un plegado de hoja beta más grande de lo normal, ya que tanto en *B. jararaca* como para el modelo de referencia, esta estructura no es muy grande.

B. Factor-B

El gráfico de Ramachandran de *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper* (Figura 35-36) identificaron a la serina (SER 42) en la región no permitida. Sin embargo, el Factor-B normalizado predijo que dicho aminoácido forma parte de una hoja beta, lo cual era esperado ya que este residuo puede formar giros en esta estructura. Por otro lado, la glutamina que se caracteriza por formar hélices alfa, se la identificó cerca de la hoja beta y puede estar influenciado en la estructura, provocando una variación entre los modelos (Figura 33). Se cree que el error del plegado es causado por el resto de aminoácidos mal posicionados (Figura 37).

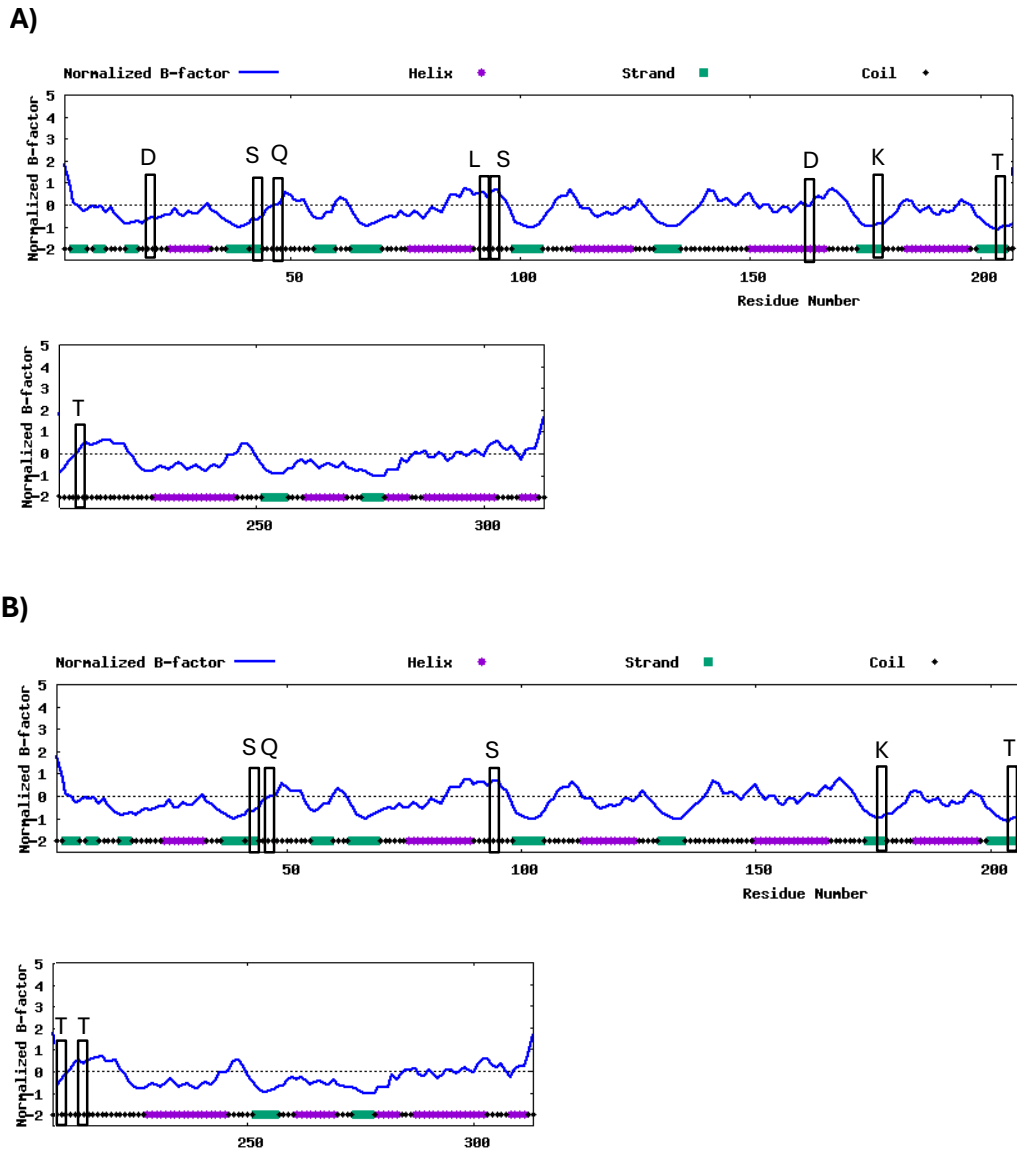
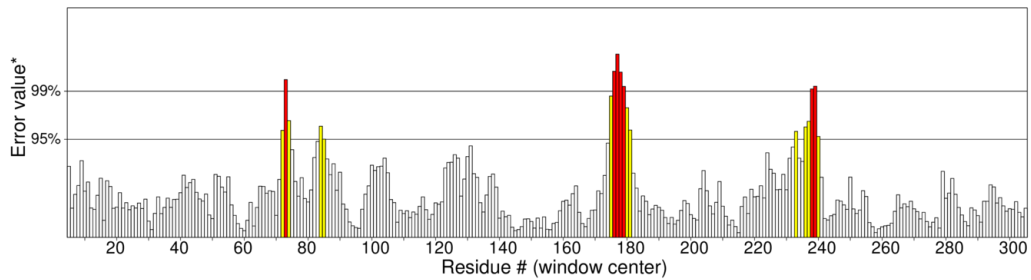


Figura 37. Factor-B normalizado de la dihidropirimidina deshidrogenasa para cada modelo, proporcionado por I-TASSER. Modelo A) *Bothrops jararaca* y B) *Bothrops asper*. Se marcan los aminoácidos identificados en regiones no permitidas, para *B. jararaca* son: el ácido aspártico (D), serina (S), lisina (K), glutamina (Q), leucina (L) y treonina (T). Las regiones no permitidas en *B. asper* son: lisina (K), glutamina (Q), serina (S), treonina (T).

C. ERRAT (Factor de calidad general)

A) Program: ERRAT2
 File: B_jararaca_model1.pdb
 Chain#:A
 Overall quality factor**: 94.098



B) Program: ERRAT2
 File: B_asper_model1.pdb
 Chain#:A
 Overall quality factor**: 92.787

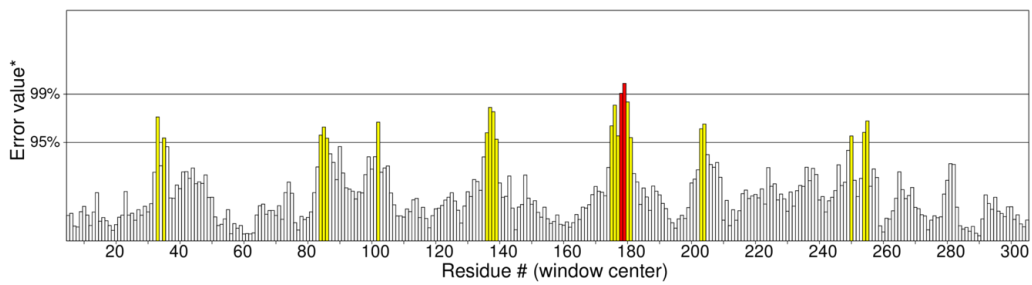


Figura 38. Gráfico del factor de calidad general de la estructura modelada para la dihidropirimidina deshidrogenasa. Modelo A) *Bothrops jararaca* y B) *Bothrops asper*. Las regiones de color rojo y amarillo representan la parte problemática, mientras que el color blanco representa la parte normal de la estructura.

El factor de calidad medido por ERRAT para *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper* es del 94,09% y 92,78%, respectivamente. Los modelos predichos para *B. jararaca* y *B. asper* son considerados buenos. El resultado para el modelo de *B. asper* fue ligeramente menor al de *B. jararaca*, ya que presentó más zonas problemáticas, lo que permitió corroborar que la diferencia de tamaño de la hoja beta del modelo de *B. asper* es producto del mal posicionamiento de varios aminoácidos.

5.6. Basparina

5.6.1. Dominios y sitios activos

Los resultados de PFAM en *Bothrops asper* identificaron secuencias relacionadas con el dominio catalítico metalopeptidasa y el dominio desintegrina (ADAM).

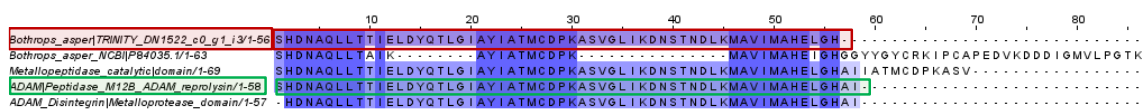


Figura 39. Alineamiento múltiple de secuencias de la basparina. El contig de *Bothrops asper* marcado en rojo, tiene un alto grado de conservación con el dominio desintegrina

5.6.4. Validación de modelos

A. Gráfico de Ramachandran

Tabla 13. Número de residuos de la basparina para cada región del gráfico de Ramachandran de *Bothrops asper*.

Tipos de residuos	# Residuos
Residuos en regiones favorables	32
Residuos en regiones permitidas	14
Residuos en regiones medianamente permitidas	1
Residuos en regiones no permitidas	3

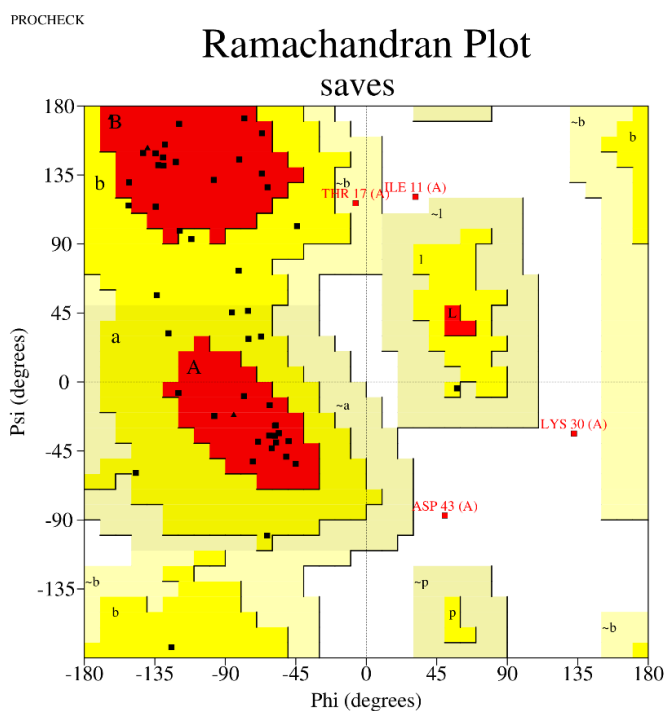


Figura 42. Gráfico de Ramachandran de la basparina para el modelo de *Bothrops asper*. La treonina (THR 17), lisina (LYS 30), isoleucina (ILE 11) y el ácido aspártico (ASP 43) están en las regiones no permitidas. Gráfico generado por PROCHEK.

El gráfico de Ramachandran de *Bothrops asper* presentó una estructura estable. Se identificaron aminoácidos en las regiones no permitidas, los cuales pueden estar generando ruido durante el plegado. Sin embargo, dichas variaciones no comprometieron al correcto plegado del modelo (Figura 40).

B. Factor-B

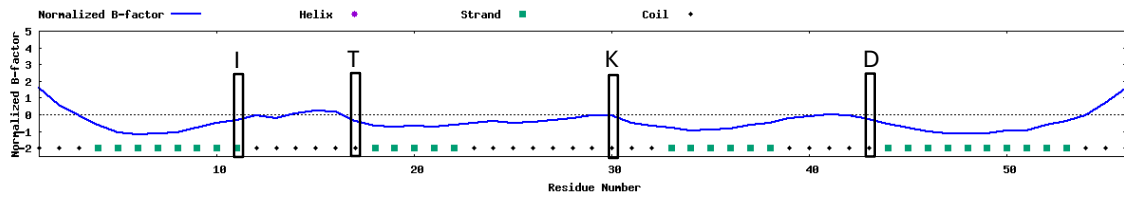


Figura 43. Factor-B normalizado de la basparina en *Bothrops asper* proporcionado por I-TASSER. Se marcan los aminoácidos identificados en regiones no permitidas, son: el ácido aspártico (D), lisina (K), isoleucina (I) y treonina (T).

C. ERRAT (Factor de calidad general)

A) Program: ERRAT2
File: B_asper_model1.pdb
Chain#:A
Overall quality factor**: 93.617

B) Program: ERRAT2
File: AF-P84035-F1-model_v4.pdb
Chain#:A
Overall quality factor**: 83.673

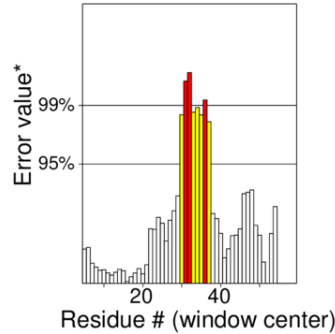
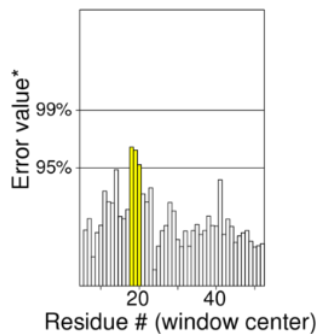


Figura 44. Gráfico del factor de calidad general de la estructura modelada para la basparina. Modelo A) *Bothrops asper* y B) *Bothrops asper* del NCBI. Las regiones de color rojo y amarillo representan la parte problemática, mientras que el color blanco representa la parte normal de la estructura.

El factor de calidad medido por ERRAT para *Bothrops asper* y el modelo de referencia es del 93,61% y 83,67%, respectivamente. Los modelos predichos son considerados buenos, sin embargo, la estructura obtenida es ligeramente mejor a la que se encuentra en la base de datos NCBI. Los parámetros de validación del modelo permitieron corroborar que la presencia de la hoja beta es correcta y no se debe a un mal plegamiento o interferencia de los aminoácidos mal posicionados, ya que el gráfico ERRAT (Figura 44A) cuenta con muy pocos errores que no comprometen a la formación de la estructura. Además, se recuperó información de esta secuencia como los dominios relacionados a la desintegrina (Figura 39). Posiblemente la secuencia del estudio sea una isoforma de la basparina, ya que estructuralmente es igual a la de referencia, no obstante, están orientadas de diferente forma (Figura 41).

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1. Alergeno 5

La superfamilia CAP se encuentra en una amplia gama de organismos y está conformada por proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISP), antígeno 5 (Ag5) y proteínas relacionadas con la patogénesis 1 (PR-1) (Tadokoro et al., 2020). El alergen 5 (Ag5) es una proteína abundante en el veneno y la saliva de los himenópteros tales como hormigas y avispas (Blank et al., 2020). Dentro de las especies con alto contenido de alergen se encuentra *Vespula germanica* (Avispa alemana), cuyo veneno provoca anafilaxia y en casos extremos conlleva a la muerte por problemas respiratorios (Blank et al., 2020; Gibbs et al., 2008). Por otro lado, las proteínas CRISP se han identificado en las respuestas inmunitarias de mamíferos y en las glándulas de veneno de serpientes, escorpiones, arañas y caracoles (Tadokoro et al., 2020).

Las proteínas CRISP en el veneno de serpientes de las familias Viperidae, Elapidae y Colubridae pueden inhibir los canales iónicos y promover las respuestas inflamatorias (Tadokoro et al., 2020). Actualmente en las bases de datos de UniProt y NCBI solo se ha detallado CRISP para las especies *Bothrops jararaca*, *Bothrops cotiara*, *Bothrops fonsecai*, *Bothrops moojeni* y *Bothrops atrox*, en las cuales no se ha descrito un modelo tridimensional para estas proteínas (UniProt, 2024; NCBI, 2024). Se ha documentado que el funcionamiento de las proteínas CRISP en *B. jararaca* y *B. alternatus* promueve la producción de anafilotoxinas que están relacionadas con la contracción muscular, agregación plaquetaria y en procesos inflamatorios, además inhibe los canales de calcio y potasio (Lodovicho et al., 2017; Bernardes et al., 2019). Pese a estas investigaciones, los roles de las CRISP durante el envenenamiento de serpientes aún se comprenden poco y no existen reportes previos respecto a los sitios conservados del alergen 5, por tanto, en este estudio se describen por primera vez. Desde un punto de vista estructural, las proteínas de la superfamilia CAP muestran una notable conservación, a pesar de las diferencias evolutivas entre *V. germanica* (Avispa alemana) y las especies de *Bothrops*. Esta superfamilia comparte un pliegue único α - β - α , el mismo que se observa en la Figura 3 (Gibbs et al., 2008). En el caso de *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca*, se identificaron proteínas que contienen los dominios CAP y CRISP. Sin embargo, se observaron tres sitios conservados específicamente relacionados con Ag5, característicos de las avispas. En el alineamiento múltiple (Figura 1) aparentemente no existe mucha conservación entre los aminoácidos, no obstante, tienen residuos importantes para la Ag5 como la glutamina (Q) y el ácido glutámico (E) que forman enlaces de hidrogeno que brindan soporte estructural a la proteína (Blank et al., 2020).

Blank y colaboradores (2020), mencionan que el Ag5 es una proteína cuya secuencia puede variar entre los himenópteros, sin embargo, su función y estructura no se ve comprometida, ya que el Ag5 comparte un pliegue conservado con la superfamilia CAP, garantizando que la estructura se mantenga. Por tal motivo, no es de extrañar la presencia del Ag5 en las proteínas CRISP de *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca*. Además, esta investigación proporciona el primer modelo tridimensional hipotético de la proteína CRISP con sitios conservados relacionados con Ag5, los cuales muestran un alto nivel de similitud con *Vespula germanica* (Avispa alemana).

6.2. Apolipoforina

La apolipoforina es una proteína conservada en invertebrados y vertebrados debido a su papel fundamental en el transporte de lípidos (Babin et al., 1999). Dicha proteína tiene similitudes con la vitelogenina de vertebrados e invertebrados, la apolipoproteína B humana y el factor von Willebrand tipo D (Kutty et al., 1996; Bogerd et al., 2000; Babin et al., 1999). En el alineamiento múltiple (Figura 9), se observa una alta conservación del dominio del factor von Willebrand tipo D (vWFD) en *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca*. El Factor von Willebrand (vWF) es una glicoproteína que participa en la adhesión y agregación plaquetaria en los sitios con daño vascular (Jorieux et al., 2000). Además, es esencial para el transporte del factor VIII (FVIII) que se activa durante la coagulación de la sangre en los mamíferos (Sadler, 1998; Dong et al., 2019). Cuando se interrumpe la interacción entre el vWF con el factor VIII, provoca una deficiencia del factor VIII que conlleva a hemorragias en articulaciones, tejidos blandos y el cerebro (Sadler, 1998).

El vWF es una proteína multidominio con funciones específicas en la hemostasia, consta de cuatro dominios vWFD, tres dominios VWFA, tres dominios VWFB y dos dominios VWFC (Zhou et al., 2012). El factor vWFD esta conforma por dominios cisteína y dominios similares a inhibidores de tripsina, los cuales están asociados a la unión del factor VIII con VWF (Zhou et al., 2012). En el veneno de algunas serpientes se ha identificado que la bitiscentina y botrocetina inhiben la función del vWF, promoviendo hemorragias y otros efectos adversos (Maita et al., 2003). Sin embargo, existen otras proteínas con la misma función como las metaloproteinasas (SVMP), serina proteasas (SVSP) y lectinas tipo C (CTLP), esta última se encuentra de forma abundante en el veneno de viperidos del género *Bothrops* (Thomazini et al., 2021). En la literatura no hay evidencia de la presencia del vWF en el transcriptoma de la glándula de veneno, no obstante, los resultados de la estructura tridimensional (Figura 11) muestran similitudes notables entre *Bothrops jararaca* y *Odomantus monticola* (Hormiga trampa), en contraste con *Bothrops asper*. En la investigación de Dong y colaboradores (2019), se describe la estructura del dominio vWFD cuyas hojas beta son comparables con las obtenidas, y se identifican residuos de histidina conservados que contribuyen a la estabilidad a la estructura. Considerando la similitud entre los modelos tridimensionales, se estima que estas proteínas pueden tener una función similar en la interacción con el vWF. En las serpientes, esta habilidad podría ser usada para interferir con los procesos normales del vWF en sus presas, potenciando los efectos hemorrágicos. Se ha documentado que las mutaciones en los dominios del vWFD (D1, D2 y D'D3) pueden interferir con la unión entre el vWF y el FVIII, afectando la coagulación sanguínea (Zheng et al., 2022; Zhou et al., 2012). Por tal motivo, si el transcriptoma de la glándula de veneno de *B. jararaca* contiene dominios relacionados con el vWFD, es probable que estas proteínas obstaculicen la unión del vWF y el FVIII de sus presas (pequeños mamíferos), provocando hemorragias. Sin embargo, solo es una hipótesis, ya que la función específica de las proteínas del veneno de serpiente puede diferir de sus homólogos en mamíferos y otros organismos.

6.3. Arilsulfatasa

La sulfatasa es una familia de genes que se ha conservado en los eucariotas y procariotas, en esta familia se incluyen varios tipos de arilsulfatasa (A-K), siendo los más estudiados en mamíferos la arilsulfatasa A (ARSA) y arilsulfatasa B (ARSB) (Hanson et al., 2004; Kovacs et al., 2019; Lukatela et al., 1998). Tanto el ARSA como el ARSB son importantes en la degradación de los sulfatidos y glicosaminoglicanos (GAG), este proceso ayuda al reciclaje de componentes moleculares permitiendo una adecuada función de la matriz extracelular (Kovacs et al., 2019). Los tejidos ricos en glicosaminoglicanos son tendones, las articulaciones y el endotelio vascular, también, estas moléculas están implicadas en la regulación de la coagulación sanguínea y la respuesta inflamatoria (Linhardt y Toiad, 2004; Makita y Taniguchi, 1985; Abe y Shayman, 2013; Frati, 2012). Bose y colaboradores (2017), detectaron ARSB en el molusco *Charonia tritonis* y establecieron que, debido a las propiedades de esta enzima para degradar GAG, pueden estar implicadas en la digestión y descomposición de biomoléculas de la presa.

En el veneno de serpientes solo se ha identificado la ARSB en *Naja nigricollis* (Cobra escupidora) y se ha planteado la hipótesis de que su posible efecto está relacionado con la degradación del GAG de tendones, tejido conectivo y ligamentos (Nok et al., 2003). Además, dicha investigación demostró que la arilsulfatasa es estable entre 40°C y 50°C, lo que es fundamental para mantener la toxicidad en las presas. Actualmente, para la familia Viperidae la base de datos del NCBI tiene secuencias relacionadas a la arilsulfatasa en *Crotalus tigris*, *Protobothrops mucrosquamatus* y *Crotalus adamanteus*, sin embargo, todas provienen de anotaciones del genoma. Las investigaciones más recientes de la arilsulfatasa en las glándulas de veneno se han realizado en la avispa ectoparásitoide *Torymus sinensis* (Scieuzo et al., 2021), el escorpión *Diplocentrus whitei* (Nystrom et al., 2023) y el ciempiés *Theatops posticus* (Lane et al., 2023). El presente estudio es el primero en determinar dominios y sitios conservados de la sulfatasa para *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca* (Figura 16).

En procariotas y eucariotas el motivo sulfatasa (C/S-X-P-X-R-X4-TG) está altamente conservado, ya que activa la función enzimática de la degradación de GAGs (Kertesz, 2000; Stressler et al., 2016). Este motivo fue identificado en el transcriptoma de la glándula de veneno de *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca* (Figura 17). En los modelos de la Figura 18 y 19, el motivo sulfatasa se pliega como una hélice alfa, la misma que está conservada con el modelo de referencia. Este hallazgo sugiere que la presencia de arilsulfatasas en el transcriptoma de la glándula de veneno de *B. asper* y *B. jararaca* puede estar relacionada con la degradación de GAGs en los tejidos de las presas, lo que podría resultar en un incremento del daño tisular, inflamación y necrosis. Además, se identificó un sitio conservado sulfatasa que se pliega como hoja beta tanto en *B. jararaca* como en el modelo de referencia, mientras que en *B. asper* se observa como una estructura flexible. Sardiello y colaboradores (2005), mencionan que las sulfatasas presentan segmentos altamente divergentes, aunque ciertos residuos muestran tasas evolutivas más bajas que el resto de la proteína debido a su implicación en funciones específicas. En el trabajo analizado, se analizan nueve regiones conservadas, de las cuales la secuencia GYVT----VGK coincide con *B. jararaca* (Figura 17), donde la lisina (K) facilita la unión y activación de la sulfatasa (Sardiello et al., 2005). En contraste, en *B. asper* el sitio conservado muestra menos residuos: AGY----GK (Figura 17), lo que podría afectar el plegamiento de la hoja beta y resultar en una estructura más flexible (Figura 19).

6.4. Botroctetina

La Botroctetina es una proteína similar a la lectina tipo C, que promueve la coagulación sanguínea al interactuar con el factor von Willebrand (vWF) y el receptor plaquetario GPIb α (Arlinghaus y Eble, 2012; Fukuda et al., 2005). Dicha proteína se identificó en el veneno de *Bothrops jararaca* y se determinó que su factor tromboaglutinante puede ser un agente de agregación plaquetaria universal para el plasma de los mamíferos (Read et al., 1978; Usami et al., 1993). En casos de envenenamiento, la Botroctetina tiene un alto impacto, generando alteraciones hemostáticas como el consumo de los factores de coagulación sanguínea (factor V y VIII), inflamaciones y trombocitopenia (Usami et al., 1993; Thomazini et al., 2021). La trombocitopenia aparece cuando hay una disminución de plaquetas en la sangre induciendo hemorragias al no poder cerrar las heridas (NIH, 2022; Shen et al., 2021). Las proteínas similares a las lectinas tipo C son componentes esenciales en el veneno de vipéridos, ya que interactúan con la GPIb α de las plaquetas promoviendo el desarrollo de trombocitopenia (Shen et al., 2021).

Los miembros de la familia de lectinas tipo C tienen una amplia gama de actividades biológicas, tales como la Bothrojaracina que interactúa con la trombina, la Botroctetina que se une específicamente al factor von Willebrand y la proteína de unión al Factor IX/X que inhibe la actividad procoagulante (Castro et al., 2003). A nivel estructural la Botroctetina es un heterodímero unido por enlaces disulfuro, compuesto por dos cadenas homólogas, A y B (Sen et al., 2001; Fukuda et al., 2005). La cadena A tiene un alto grado de similitud con proteínas relacionadas a la lectina tipo C, sin embargo, la cadena B es específica de la Botroctetina y le brinda la capacidad única de unirse y activar el vWF (Sen et al., 2001).

La presente investigación se centró en analizar la cadena B, obteniendo similitudes entre la Botroctetina de *Bothrops jararaca* y *Bothrops asper*, siendo lo más destacado los residuos relacionados al sitio de unión del magnesio (Mg⁺²) (Sen et al., 2001). En la Figura 25 se observa que los residuos implicados en esta interacción son los mismos en Ser41(S), Gln43(Q) y Glu47(E), no obstante, difiere la Glu122(E) del modelo de referencia con respecto a las especies analizadas. La Glu122(E) del modelo de referencia conforma una hoja beta con los residuos FVCEFQ de la posición 119-124, en *B. jararaca* no se forma esa estructura, mientras que en *B. asper* presenta los mismos residuos que la referencia, pero en la posición 117-122. En los modelos tridimensionales se aprecian estas variaciones (Figura 26), siendo el modelo de referencia y el de *B. asper* los más similares. Este resultado no se esperaba, ya que la Botroctetina se la ha estudiado e identificado únicamente en *Bothrops jararaca*, por lo que se estima que la secuencia obtenida en *B. asper* es un homólogo a la aspercetina que pertenece a la familia de las lectinas tipo C (Soto et al., 2001). En el repositorio de UniProt solo hay dos resultados para la aspercetina que corresponden a la cadena A y B, de 62 aminoácidos cada una, mientras que la cadena B analizada en el presente estudio tiene un tamaño de 123 aminoácidos. Para investigaciones futuras sería ideal modelar la cadena A junto con la cadena B, para analizar las interacciones con el vWF.

6.5. Dihidropirimidina deshidrogenasa

En humanos la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) es una enzima que participa en la degradación del uracilo y timina en β -alanina y β -ureidopropionasa, que son compuestos importantes en la respuesta neuronal (Fleger et al., 2017; Van et al., 2004). La estructura de la DPD es muy similar al dihidroorotato deshidrogenasa (DHOD), sin embargo, esta proteína se encarga de la síntesis de pirimidinas (Dobritzsch et al., 2001; Smith et al., 2023). En los seres humanos, la DHOD participa en tejidos metabólicamente activos como el hígado, las células inmunitarias y el tejido linfático (Madak et al., 2018; Ulanet et al., 2019; Kurth et al., 2021). En el presente trabajo se identificaron dominios y sitios conservados relacionadas al dihidroorotato deshidrogenasa en el transcriptoma de la glándula de veneno de *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca* (Figura 31). Las glándulas de veneno de crotalidos y vipéridos están conformadas por una glándula principal y una glándula accesoria (Giannotti et al., 2013; Mackessy, 1991; Mackessy, 2016). Estos tejidos cuentan con células ricas en mitocondrias, sin embargo, la glándula principal es la que está relacionada con la síntesis de toxinas (Mackessy, 1991). En *Crotalus viridis oreganus* (Cascabel del oeste) se ha evidenciado que luego de la extracción del veneno, la glándula principal aumenta la producción de toxinas y de células mitocondriales (Mackessy, 1991). Las células ricas en mitocondrias no solo compensan el gasto metabólico de la producción de toxinas, sino que también están implicadas en la estabilización del veneno en pH ácidos (5.4) (Mackessy y Baxter, 2006).

En la base de datos del NCBI, se ha identificado el DHOD en el genoma de *Protobothrops mucrosquamatus* y *Crotalus tigris*, sin embargo, no hay evidencia publicada de esta proteína en el transcriptoma de la glándula de veneno de vipéridos. La estructura tridimensional del DHOD ha sido ampliamente estudiada en humanos (Walse et al., 2008) y en bacterias como *Escherichia coli* (Nørager et al., 2002), *Streptococcus mutans* (Liu et al., 2011) y *Lactococcus lactis* (Wolfe et al., 2007). La estructura de la DHOD humana (DHODH) es muy parecida a la identificada en *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca* (Figura 34). En el alineamiento múltiple se observó que la región N-terminal de DHODH no está presente en las especies estudiadas, posiblemente porque esta sección es altamente variable y comprende los primeros 40 aminoácidos de la proteína (Walse et al., 2008; Nørager et al., 2002).

La estructura del DHODH está formada por doce hélices alfa y ocho hojas beta, aunque puede variar, como en el caso de la DHODH de *Escherichia coli* que contiene once hélices alfa y trece hojas beta (Nørager et al., 2002). En los modelos de *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca* se observaron doce hélices alfa y doce hojas beta. A pesar de las variaciones en la DHODH, la estructura central se mantiene consistente, formada por ocho hojas beta paralelas rodeadas por doce hélices alfa, lo cual permite la unión al FMN y al orotato (Liu et al., 2000; Nørager et al., 2002). Además, la interacción entre Leu68 y Arg72 y entre Asn212 y Leu224 tienen roles regulatorios importantes en la actividad de DHODH (Walse et al., 2008). Los aminoácidos Leu68 y Arg72 forman parte de la región N-terminal del modelo de referencia, dicha región no se encuentra en los modelos generados (Figura 34D). Por otro lado, la región entre Asn212 y Leu224 son casi idénticas (Figura 34D). Estos resultados sugieren que la DHOD del modelo tiene una estructura estable y cuenta con las regiones necesarias para cumplir sus funciones. Sin embargo, es necesario realizar más investigaciones, ya que la DHOD podría estar presente en las mitocondrias bacterianas, por lo que su presencia en el transcriptoma de las dos especies

de *Bothrops* podría ser producto de contaminación o de la presencia de simbioses (Esmailshirazifard et al. 2018; Esmailshirazifard et al., 2022; Torres et al., 2017).

6.6. Basparina

La basparina es una metaloproteinasa tipo III (SVMP-III) conformada por dominios metaloproteinasa y desintegrina, fue identificada en el veneno de *Bothrops asper* y actualmente en los repositorios de UniProt y NCBI solo hay un registro (Loria et al., 2003). La familia de metaloproteinasas comprende tres clases que difieren en su composición de dominios, siendo la clase P-III la más potente que desencadena hemorragia y activa la protrombina que genera trombosis (Bell, 1997; Loria et al., 2003; Herrera et al., 2020). A nivel estructural se ha identificado que el motivo de unión al zinc de las metaloproteinasas está altamente conservado en HEXXH (Loria et al., 2003; Selistre et al., 1997). Esta secuencia se encuentra en la Figura 41, sin embargo, en *Bothrops asper* el motivo forma parte de una hélice alfa, mientras que en el modelo de referencia está situado en una hoja beta. Además, la posición espacial de los modelos es completamente diferentes pese a que los aminoácidos están en su mayoría conservados.

Pese a que la basparina tiene una composición de dominios similar a la SVMP-III, las actividades funcionales son diferentes, ya que la basparina resulta tener un efecto más específico sobre el colágeno y la membrana basal (Herrera et al., 2020). El modelo obtenido en este estudio tiene una estructura estable y la secuencia se evaluó frente con un BLASTp en el sitio web del NCBI, resultando en varias alineaciones con metaloproteinasas de diferentes vipéridos, pero ninguno con respecto a *Bothrops asper*. La secuencia obtenida posiblemente sea otra isoforma de la basparina producto del empalme alternativo. Se ha evidenciado que el empalme alternativo esté involucrado en la producción de transcripciones de genes divergentes para proteínas del veneno de serpientes (Ogawa et al., 2019). La investigación de Ogawa y colaboradores (2019), demostró que en *Protobothrops flavoviridis* existe empalme alternativo en las familias de genes de proteínas del veneno de metaloproteinasa, serina proteasa y factores de crecimiento endotelial vascular. Análisis genómicos en *Crotalus* revelaron que los genes de la familia SVMP ha tenido una serie de duplicación y delección intergenica, creando genes que sinteticen proteínas grandes y pequeñas con diferentes niveles de complejidad (Giorgianni et al., 2020). Estos análisis indican que existen diferentes métodos por los cuales se han diversificado las metaloproteinasas, y no es de extrañar que existan nuevas isoformas que aún no estén identificadas.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos sobre nuevas proteínas tóxicas en el transcriptoma de la glándula de veneno de *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca* revelan varios hallazgos importantes que ofrecen nuevas perspectivas sobre sus roles en el envenenamiento. La superfamilia CAP está altamente conservada en las glándulas de veneno de varios linajes, desempeñando efectos inflamatorios. Dentro de esta superfamilia se encuentran las proteínas CRISP, que prevalecen en serpientes, sin embargo, se evidenciaron similitudes estructurales con el alérgeno 5 de himenópteros, a pesar de que las secuencias no tienen un alto grado de conservación. Debido a que las secuencias son diferentes, pero forman una estructura similar, se estima que las proteínas CRISP y el alérgeno 5 son muy variables, pero mantienen su función inflamatoria. Por tal motivo, se recomienda estudiar si estas variaciones pueden afectar la eficacia de los antivenenos de serpientes.

Por otro lado, el dominio del factor von Willebrand tipo D identificado en *Bothrops jararaca* tiene una estructura estable y muy parecida al factor von Willebrand de los mamíferos. Se cree que esta similitud le permite obstaculizar la unión del factor von Willebrand y el factor VIII en sus presas (pequeños mamíferos), provocando hemorragias. Sin embargo, esto es solo una hipótesis que debe ser corroborada con análisis experimentales. Otra proteína nueva identificada en ambas especies de *Bothrops* es la arilsulfatasa, cuya estructura y motivos funcionales altamente conservados sugieren su participación en la degradación de glicosaminoglicanos, lo cual podría incrementar el daño tisular en las presas.

Además de identificar nuevas proteínas, este trabajo también ha recopilado información adicional sobre la botrocetina y basparina. Aunque estas proteínas han sido ampliamente estudiadas, los repositorios de libre acceso (NCBI) contienen poca información actualizada, por lo que las secuencias recuperadas podrían enriquecer estas bases de datos.

Para futuras investigaciones, se recomienda realizar estudios funcionales detallados de estas proteínas para confirmar sus roles y mecanismos de acción en el envenenamiento. Los modelos presentados son predicciones que pueden ser acertadas o incorrectas, sin embargo, han sido validados en términos de calidad y proporcionan una base sólida para estudios experimentales adicionales. Explorar la variabilidad genética y estructural entre diferentes especies de *Bothrops* podría ofrecer una comprensión más completa de la evolución y diversificación de las toxinas venenosas. Finalmente, se sugiere la integración de estas proteínas en estudios de desarrollo de antivenenos, considerando sus implicaciones en la toxicidad y la respuesta inmune.

8. REFERENCIAS

- Arlinghaus, F. T., & Eble, J. A. (2012). C-type lectin-like proteins from snake venoms. *Toxicon*, 60(4), 512–519. doi:10.1016/j.toxicon.2012.03.001
- Abe, A., & Shayman, J. A. (2013). Sphingolipid Catabolism. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 287–292. doi:10.1016/b978-0-12-378630-2.00462-x
- Abraham, A., & Chandler, D. E. (2017). Tracing the Evolutionary History of the CAP Superfamily of Proteins Using Amino Acid Sequence Homology and Conservation of Splice Sites. *Journal of Molecular Evolution*, 85(3-4), 137–157. doi:10.1007/s00239-017-9813-9
- 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.
- Barua, A., & Mikheyev, A. S. (2020). Toxin expression in snake venom evolves rapidly with constant shifts in evolutionary rates. *Proceedings of the Royal Society B*, 287(1926), 20200613.
- Bogerd, J., Babin, P. J., Kooiman, F. P., André, M., Ballagny, C., Van Marrewijk, W. J., & Van Der Horst, D. J. (2000). Molecular characterization and gene expression in the eye of the apolipoprotein II/I precursor from *Locusta migratoria*. *Journal of Comparative Neurology*, 427(4), 546-558.
- Babin, P. J., Bogerd, J., Kooiman, F. P., Van Marrewijk, W. J. A., & Van der Horst, D. J. (1999). Apolipoprotein II/I, Apolipoprotein B, Vitellogenin, and Microsomal Triglyceride Transfer Protein Genes Are Derived from a Common Ancestor. *Journal of Molecular Evolution*, 49(1), 150–160. doi:10.1007/pl00006528
- Babenko, V. V., Ziganshin, R. H., Weise, C., Dyachenko, I., Shaykhutdinova, E., Murashev, A. N. & Utkin, Y. (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.
- Boldrini-França, J., Cologna, C. T., Pucca, M. B., Bordon, K. de C. F., Amorim, F. G., Anjolette, F. A. P., ... Arantes, E. C. (2017). Minor snake venom proteins: Structure, function and potential applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1861(4), 824–838. doi:10.1016/j.bbagen.2016.12.022
- Bose, U., Wang, T., Zhao, M., Motti, C. A., Hall, M. R., & Cummins, S. F. (2017). Multiomics analysis of the giant triton snail salivary gland, a crown-of-thorns starfish predator. *Scientific reports*, 7(1), 6000.
- Bell, W. R. (1997). Defibrinogenating Enzymes. *Drugs*, 54(Supplement 3), 18–31. doi:10.2165/00003495-199700543-00005

- 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, 1-13.
- Bernardes, C. P., Menaldo, D. L., Zoccal, K. F., Boldrini-França, J., Peigneur, S., Arantes, E. C., ... Sampaio, S. V. (2019). First report on BaltCRP, a cysteine-rich secretory protein (CRISP) from *Bothrops alternatus* venom: Effects on potassium channels and inflammatory processes. *International Journal of Biological Macromolecules*. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.08.108
- Castro, H. C., Lemos, M. G. J., Bon, C., & Zingali, R. B. (2003). Comparative evaluation of immunological and structural similarities of snake venom C-type lectin proteins. *Toxicon*, 41(4), 525–528. doi:10.1016/s0041-0101(02)00358-6
- Cañas, C. A. (2016). Brainstem ischemic stroke after to *Bothrops atrox* snakebite. *Toxicon*, 120, 124–127. 10.1016/j.toxicon.2016.08.005
- Casewell, N. R., Jackson, T. N., Laustsen, A. H., & Sunagar, K. (2020). Causes and consequences of snake venom variation. *Trends in pharmacological sciences*, 41(8), 570-581.
- Dong, X., Leksa, N. C., Chhabra, E. S., Arndt, J. W., Lu, Q., Knockenhauer, K. E., ... & Springer, T. A. (2019). The von Willebrand factor D' D3 assembly and structural principles for factor VIII binding and concatemer biogenesis. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 133(14), 1523-1533.
- Dobritzsch, D., Schneider, G., Schnackerz, K. D., & Lindqvist, Y. (2001). Crystal structure of dihydropyrimidine dehydrogenase, a major determinant of the pharmacokinetics of the anti-cancer drug 5-fluorouracil. *The EMBO journal*.
- Dym, O., Eisenberg, D., & Yeates, T. O. (2006). Detection of errors in protein models. *International Tables for Crystallography*, 520-530.
- Earl, S. T. H., Richards, R., Johnson, L. A., Flight, S., Anderson, S., Liao, A., ... Lavin, M. F. (2012). Identification and characterisation of Kunitz-type plasma kallikrein inhibitors unique to *Oxyuranus* sp. snake venoms. *Biochimie*, 94(2), 365–373. 10.1016/j.biochi.2011.08.003
- Esmaeilishirazifard, E., Usher, L., Trim, C., Denise, H., Sangal, V., Tyson, G. H., ... & Moschos, S. A. (2022). Bacterial adaptation to venom in snakes and arachnida. *Microbiology spectrum*, 10(3), e02408-21.
- Esmaeilishirazifard, E., Usher, L., Trim, C., Denise, H., Sangal, V., Tyson, G. H., ... & Moschos, S. A. (2018). Microbial adaptation to venom is common in snakes and spiders. *BioRxiv*, 348433.
- Frati-Munari, A. C. (2012). Glicosaminoglicanos en las enfermedades vasculares. *Revista Mexicana de angiología*, 40(3), 89-99.

- Fujimoto, S., MATSUDA, K., KIKUGAWA, M., KANEKO, M., & TAMAKI, N. (1991). Effect of vitamin B2 deficiency on rat liver dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 37(1), 89-98.
- Forouzesh, D. C., & Moran, G. R. (2021). Mammalian dihydropyrimidine dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 714, 109066.
- Fukuda, K., Doggett, T., Laurenzi, I. J., Liddington, R. C., & Diacovo, T. G. (2005). The snake venom protein botrocetin acts as a biological brace to promote dysfunctional platelet aggregation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(2), 152–159. doi:10.1038/nsmb892
- Fleger, M., Willomitzer, J., Meinsma, R., Alders, M., Meijer, J., Hennekam, R. C. M., Huemer, M., & van Kuilenburg, A. B. P. (2017). Dihydropyrimidine Dehydrogenase Deficiency: Metabolic Disease or Biochemical Phenotype?. *JIMD reports*, 37, 49–54. https://doi.org/10.1007/8904_2017_14
- Gibbs, G. M., Roelants, K., & O'bryan, M. K. (2008). The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins—roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocrine reviews*, 29(7), 865-897.
- Giannotti, K. C., Sesso, A., Grego, K. F., Fernandes, W., Cardoso, R. P., Camargo, G. G., & Carneiro, S. M. (2013). Viperid venom glands with defective venom production. Morphological study. *Toxicon*, 70, 32–43. doi:10.1016/j.toxicon.2013.03.019
- Giorgianni, M. W., Dowell, N. L., Griffin, S., Kassner, V. A., Selegue, J. E., & Carroll, S. B. (2020). The origin and diversification of a novel protein family in venomous snakes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(20), 10911-10920.
- Hanson, S. R., Best, M. D., & Wong, C.-H. (2004). Sulfatases: Structure, Mechanism, Biological Activity, Inhibition, and Synthetic Utility. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(43), 5736–5763. doi:10.1002/anie.200300632
- Herrera, C., Escalante, T., Rucavado, A., & Gutiérrez, J. M. (2020). Hemorrhagic and procoagulant P-III snake venom metalloproteinases differ in their binding to the microvasculature of mouse cremaster muscle. *Toxicon*. doi:10.1016/j.toxicon.2020.02.011
- Jorieux, S., Fressinaud, E., Goudemand, J., Gaucher, C., Meyer, D., Mazurier, C., & INSERM Network on Molecular Abnormalities in von Willebrand Disease. (2000). Conformational changes in the D' domain of von Willebrand factor induced by CYS 25 and CYS 95 mutations lead to factor VIII binding defect and multimeric impairment. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 95(10), 3139-3145.
- Jackson, K. (2003). The evolution of venom-delivery systems in snakes. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 137(3), 337-354.
- Jackson, T. N. W., Young, B., Underwood, G., McCarthy, C. J., Kochva, E., Vidal, N., ... Fry, B. G. (2016). Endless forms most beautiful: the evolution of ophidian oral

- glands, including the venom system, and the use of appropriate terminology for homologous structures. *Zoomorphology*, 136(1), 107–130. doi:10.1007/s00435-016-0332-9
- Kohlhoff, M., Borges, M. H., Yarleque, A., Cabezas, C., Richardson, M., & Sanchez, E. F. (2012). Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*. *Journal of Proteomics*, 75(7), 2181–2195. 10.1016/j.jprot.2012.01.020
- Kazuma, K., Masuko, K., Konno, K., & Inagaki, H. (2017). Combined Venom Gland Transcriptomic and Venom Peptidomic Analysis of the Predatory Ant *Odontomachus monticola*. *Toxins*, 9(10), 323. <https://doi.org/10.3390/toxins9100323>
- Kutty, R. K., Kutty, G., Kambadur, R., Duncan, T., Koonin, E. V., Rodriguez, I. R., ... & Wiggert, B. (1996). Molecular characterization and developmental expression of a retinoid-and fatty acid-binding glycoprotein from *Drosophila*: A putative lipophorin. *Journal of Biological Chemistry*, 271(34), 20641-20649.
- Kovacs, Z., Jung, I., & Gurzu, S. (2019). Arylsulfatases A and B: From normal tissues to malignant tumors. *Pathology - Research and Practice*, 152516. doi:10.1016/j.prp.2019.152516
- Kertesz, M. A. (2000). Riding the sulfur cycle—metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 24(2), 135-175.
- Kurth, I., Yamaguchi, N., Andreu-Agullo, C., Tian, H. S., Sridhar, S., Takeda, S., ... & Tavazoie, S. F. (2021). Therapeutic targeting of SLC6A8 creatine transporter suppresses colon cancer progression and modulates human creatine levels. *Science advances*, 7(41), eabi7511.
- Lodovicho, M. E., Costa, T. R., Bernardes, C. P., Menaldo, D. L., Zoccal, K. F., Carone, S. E., ... Sampaio, S. V. (2017). Investigating possible biological targets of Bj-CRP, the first cysteine-rich secretory protein (CRISP) isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicology Letters*, 265, 156–169. doi:10.1016/j.toxlet.2016.12.003
- Lukatela, G., Krauss, N., Theis, K., Selmer, T., Gieselmann, V., von Figura, K., & Saenger, W. (1998). Crystal Structure of Human Arylsulfatase A: The Aldehyde Function and the Metal Ion at the Active Site Suggest a Novel Mechanism for Sulfate Ester Hydrolysis^{†,‡}. *Biochemistry*, 37(11), 3654–3664. doi:10.1021/bi9714924
- Linhardt, R. J., & Toida, T. (2004). Role of Glycosaminoglycans in Cellular Communication. *Accounts of Chemical Research*, 37(7), 431–438. doi:10.1021/ar030138x
- Lane, A. N., Nash, P. D., Ellsworth, S. A., Nystrom, G. S., & Rokyta, D. R. (2023). The arylsulfatase-and phospholipase-rich venom of the plutoniimid centipede *Theatops posticus*. *Toxicon*, 233, 107231.

- Liu, S., Neidhardt, E. A., Grossman, T. H., Ocain, T., & Clardy, J. (2000). Structures of human dihydroorotate dehydrogenase in complex with antiproliferative agents. *Structure*, 8(1), 25-33.
- Liu, Y., Gao, Z. Q., Liu, C. P., Xu, J. H., Li, L. F., Ji, C. N., Su, X. D., & Dong, Y. H. (2011). Structure of the putative dihydroorotate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications*, 67(Pt 2), 182–187. <https://doi.org/10.1107/S1744309110048414>
- Loría, G. D., Rucavado, A., Kamiguti, A. S., Theakston, R. D. G., Fox, J. W., Alape, A., & Gutiérrez, J. M. (2003). Characterization of 'basparin A,' a prothrombin-activating metalloproteinase, from the venom of the snake *Bothrops asper* that inhibits platelet aggregation and induces defibrination and thrombosis. *Archives of biochemistry and biophysics*, 418(1), 13-24.
- Madak, J. T., Bankhead, A., Cuthbertson, C. R., Showalter, H. D., & Neamati, N. (2018). Revisiting the role of dihydroorotate dehydrogenase as a therapeutic target for cancer. *Pharmacology & Therapeutics*. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.10.012
- Maita, N., Nishio, K., Nishimoto, E., Matsui, T., Shikamoto, Y., Morita, T., ... & Mizuno, H. (2003). Crystal structure of von Willebrand factor A1 domain complexed with snake venom, bitiscetin: insight into glycoprotein Iba binding mechanism induced by snake venom proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 37777-37781.
- Mackessy, S. P. (1991). Morphology and ultrastructure of the venom glands of the northern pacific rattlesnake *Crotalus viridis oreganus*. *Journal of Morphology*, 208(1), 109–128. doi:10.1002/jmor.1052080106
- Mackessy, S. P., & Baxter, L. M. (2006). Bioweapons synthesis and storage: the venom gland of front-fanged snakes. *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 245(3-4), 147-159.
- Mackessy, S. P. (2016). *Handbook of venoms and toxins of reptiles* (2nd ed.). CRC Press. Chapter 8, pp. 99-115.
- Mackessy, S. P. (2021). Reptile venoms and toxins: Unlimited opportunities for basic and applied research. In *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles* (pp. 225-239). CRC Press.
- 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
- Mora-Obando, D., Salazar-Valenzuela, D., Pla, D., Lomonte, B., Guerrero-Vargas, J. A., Ayerbe, S., ... & Calvete, J. J. (2020). Venom variation in *Bothrops asper* lineages from north-western South America. *Journal of proteomics*, 229, 103945.
- NIH. (2022). Trombocitopenia. <https://www.nhlbi.nih.gov/es/salud/trombocitopenia>

- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2024). Protein database search: CRISP Bothrops. NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=CRISP+Bothrops>
- Nystrom, G. S., Ellsworth, S. A., & Rokyta, D. R. (2023). The remarkably enzyme-rich venom of the Big Bend Scorpion (*Diplocentrus whitei*). *Toxicon*, 226, 107080.
- 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
- Nørager, S., Jensen, K. F., Björnberg, O., & Larsen, S. (2002). *E. coli* dihydroorotate dehydrogenase reveals structural and functional distinctions between different classes of dihydroorotate dehydrogenases. *Structure*, 10(9), 1211-1223.
- 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. 10.1016/j.jprot.2016.06.029
- Ogawa, T., Oda-Ueda, N., Hisata, K., Nakamura, H., Chijiwa, T., Hattori, S., ... & Shibata, H. (2019). Alternative mRNA splicing in three venom families underlying a possible production of divergent venom proteins of the habu snake, *Protobothrops flavoviridis*. *Toxins*, 11(10), 581.
- Omar, S., Mohd Tap, F., Shameli, K., Rasit Ali, R., Che Jusoh, N., & Ahmad Khairudin, N. B. (2018). Sequence analysis and comparative modelling of nucleocapsid protein from *Pseudomonas stutzeri*. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 458, 012025. doi:10.1088/1757-899x/458/1/012025
- Oberholser, K., Sussman, L., Hodis, E., Decatur, W., Livne, S., Prilusky, J., Richardson, J., Berchanskym, A. (2013). Ramachandran Plot. *Proteopedia*. <https://dx.doi.org/10.14576/381225.1772128>
- Post, Y., Puschhof, J., Beumer, J., Kerckamp, H. M., de Bakker, M. A. G., Slagboom, J., ... Clevers, H. (2020). Snake Venom Gland Organoids. *Cell*, 180(2), 233–247.e21. 10.1016/j.cell.2019.11.038
- Pereira, L. D. M., Messias, E. A., Sorroche, B. P., Oliveira, A. D. N., Arantes, L. M. R. B., Carvalho, A. C. D., ... & Melendez, M. E. (2020). In-depth transcriptome reveals the potential biotechnological application of *Bothrops jararaca* venom gland. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 26, e20190058.
- Read, M. S., Shermer, R. W., & Brinkhous, K. M. (1978). Venom coagglutinin: an activator of platelet aggregation dependent on von Willebrand factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(9), 4514-4518.
- Rucavado, A., Soto, M., Escalante, T., Loria, G. D., Arni, R., & Gutiérrez, J. M. (2005). Thrombocytopenia and platelet hypoaggregation induced by *Bothrops asper* snake

- venom: toxins involved and their contribution to metalloproteinase-induced pulmonary hemorrhage. *Thrombosis and Haemostasis*. doi:10.1160/th05-02-0112
- Resiere, D., Monteiro, W., Houcke, S., Pujo, J. M., Mathien, C., Mayence, C., ... & Kallel, H. (2020). Bothrops snakebite envenomings in the Amazon Region. *Current Tropical Medicine Reports*, 7, 48-60.
- Rao, W. Q., Kalogeropoulos, K., Allentoft, M. E., Gopalakrishnan, S., Zhao, W. N., Workman, C. T., ... & Laustsen, A. H. (2022). The rise of genomics in snake venom research: recent advances and future perspectives. *GigaScience*, 11.
- Sen, U., Vasudevan, S., Subbarao, G., McClintock, R. A., Celikel, R., Ruggeri, Z. M., & Varughese, K. I. (2001). Crystal structure of the von Willebrand factor modulator botrocetin. *Biochemistry*, 40(2), 345-352.
- Shen, C., Liu, M., Mackeigan, D. T., Chen, Z. Y., Chen, P., Karakas, D., ... & Ni, H. (2021). Viper venoms drive the macrophages and hepatocytes to sequester and clear platelets: Novel mechanism and therapeutic strategy for venom-induced thrombocytopenia. *Archives of Toxicology*, 95, 3589-3599.
- Sadler, J. E. (1998). Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annual review of biochemistry*, 67(1), 395-424.
- Scieuzo, C., Salvia, R., Franco, A., Pezzi, M., Cozzolino, F., Chicca, M., ... & Falabella, P. (2021). An integrated transcriptomic and proteomic approach to identify the main *Torymus sinensis* venom components. *Scientific Reports*, 11(1), 5032.
- Stressler, T., Seitzl, I., Kuhn, A., & Fischer, L. (2016). Detection, production, and application of microbial arylsulfatases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(21), 9053–9067. doi:10.1007/s00253-016-7838-4
- Sardiello, M., Annunziata, I., Roma, G., & Ballabio, A. (2005). Sulfatases and sulfatase modifying factors: an exclusive and promiscuous relationship. *Human Molecular Genetics*, 14(21), 3203–3217. doi:10.1093/hmg/ddi351
- Soto, M., Kamiguti, A., Theakston, D., Fox, J., Escalante, T., Gutiérrez, J. M., & Rucavado, A. (2001). Characterization of Aspercetin, a Platelet Aggregating Component from the Venom of the Snake *Bothrops asper* which Induces Thrombocytopenia and Potentiates Metalloproteinase-induced Hemorrhage. *Thrombosis and Haemostasis*, 85(04), 710–715. doi:10.1055/s-0037-1615657
- Smith, M. M., Forouzesh, D. C., Kaley, N. E., Liu, D., & Moran, G. R. (2023). Mammalian dihydropyrimidine dehydrogenase: Added mechanistic details from transient-state analysis of charge transfer complexes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 736, 109517.
- Selistre de Araujo, H. S., de Souza, D. H. ., & Ownby, C. L. (1997). Analysis of a cDNA sequence encoding a novel member of the snake venom metalloproteinase, disintegrin-like, cysteine-rich (MDC) protein family from *Agkistrodon contortrix laticinctus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1342(2), 109–115. doi:10.1016/s0167-4838(97)00111-8

- Surm, J. M., & Moran, Y. (2021). Insights into how development and life-history dynamics shape the evolution of venom. *Evodevo*, 12(1), 1.
- Suntravat, M., Cromer, W. E., Marquez, J., Galan, J. A., Zawieja, D. C., Davies, P., ... Sánchez, E. E. (2019). The isolation and characterization of a new snake venom cysteine-rich secretory protein (Svcrisp) from the venom of the Southern Pacific rattlesnake and its effect on vascular permeability. *Toxicon*. 10.1016/j.toxicon.2019.04.006
- 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.
- Thomazini, C. M., Sachetto, A. T. A., de Albuquerque, C. Z., de Moura Mattaraia, V. G., de Oliveira, A. K., Serrano, S. M. D. T., ... & Santoro, M. L. (2021). Involvement of von Willebrand factor and botrocetin in the thrombocytopenia induced by *Bothrops jararaca* snake venom. *PLoS neglected tropical diseases*, 15(9), e0009715.
- Tan, C. H., Tan, K. Y., Fung, S. Y., & Tan, N. H. (2015). Venom-gland transcriptome and venom proteome of the Malaysian king cobra (*Ophiophagus hannah*). *BMC genomics*, 16, 1-21.
- Torres, J. P., Tianero, M. D., Robes, J. M. D., Kwan, J. C., Biggs, J. S., Concepcion, G. P., ... & Schmidt, E. W. (2017). *Stenotrophomonas*-like bacteria are widespread symbionts in cone snail venom ducts. *Applied and environmental microbiology*, 83(23), e01418-17.
- UniProt Consortium. (2024). UniProtKB search: CRISP *Bothrops*. UniProt. <https://www.uniprot.org/uniprotkb?query=CRISP+Bothrops>
- Usami, Y., Fujimura, Y., Suzuki, M., Ozeki, Y., Nishio, K., Fukui, H., & Titani, K. (1993). Primary structure of two-chain botrocetin, a von Willebrand factor modulator purified from the venom of *Bothrops jararaca*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(3), 928-932.
- Ulanet, D., Chubukov, V., Coco, J., McDonald, G., Steadman, M., Narayanaswamy, R., ... & Marks, K. (2019). Hematologic malignancies exhibit selective vulnerability to inhibition of de novo pyrimidine biosynthesis by AG-636, a novel inhibitor of dihydroorotate dehydrogenase in phase 1 clinical trials. *Blood*, 134, 1570.
- Uribe, A., Acosta-de-Patiño, H., Martínez-Cortés, V., Correa-Ceballos, D., Rodríguez, A., Gómez-Leija, L., ... & Otero-Patiño, R. (2021). Toxicological, enzymatic, and immunochemical characterization of *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) reference venom from Panama. *Revista de Biología Tropical*, 69(1), 127-138.
- Van Kuilenburg, A. B., Stroomer, A. E., Van Lenthe, H., Abeling, N. G., & Van Gennip, A. H. (2004). New insights in dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency: a pivotal role for beta-aminoisobutyric acid?. *Biochemical journal*, 379(1), 119-124.

- Vonk, F. J., Casewell, N. R., Henkel, C. V., Heimberg, A. M., Jansen, H. J., McCleary, R. J., ... & Richardson, M. K. (2013). The king cobra genome reveals dynamic gene evolution and adaptation in the snake venom system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(51), 20651-20656.
- WEERS, P., & RYAN, R. (2006). Apolipoprotein III: Role model apolipoprotein. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(4), 231–240. 10.1016/j.ibmb.2006.01.001
- Wolfe, A. E., Thymark, M., Gattis, S. G., Fagan, R. L., Hu, Y., Johansson, E., ... Palfey, B. A. (2007). Interaction of Benzoate Pyrimidine Analogues with Class 1A Dihydroorotate Dehydrogenase from *Lactococcus lactis*†,‡. *Biochemistry*, 46(19), 5741–5753. doi:10.1021/bi7001554
- Walse, B., Dufe, V. T., Svensson, B., Fritzson, I., Dahlberg, L., Khairoullina, A., ... Al-Karadaghi, S. (2008). The Structures of Human Dihydroorotate Dehydrogenase with and without Inhibitor Reveal Conformational Flexibility in the Inhibitor and Substrate Binding Sites†. *Biochemistry*, 47(34), 8929–8936. doi:10.1021/bi8003318
- Yang, J., & Zhang, Y. (2015). Protein Structure and Function Prediction Using I-TASSER. *Current protocols in bioinformatics*, 52, 5.8.1–5.8.15. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0508s52>
- Yang, J., Wang, Y., & Zhang, Y. (2016). ResQ: An Approach to Unified Estimation of B-Factor and Residue-Specific Error in Protein Structure Prediction. *Journal of molecular biology*, 428(4), 693–701. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.024>
- Zhou, Y. F., Eng, E. T., Zhu, J., Lu, C., Walz, T., & Springer, T. A. (2012). Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 120(2), 449-458.
- Zeng, J., Shu, Z., Liang, Q., Zhang, J., Wu, W., Wang, X., & Zhou, A. (2022). Structural basis of von Willebrand factor multimerization and tubular storage. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 139(22), 3314-3324.
- Zhang, Q., Xu, J., Zhou, X., & Liu, Z. (2022). CAP superfamily proteins from venomous animals: Who we are and what to do?. *International Journal of Biological Macromolecules*, 221, 691-702.
- Zelanis, A., Andrade-Silva, D., Rocha, M. M., Furtado, M. F., Serrano, S. M., Junqueira-de-Azevedo, I. L., & Ho, P. L. (2012). A transcriptomic view of the proteome variability of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(3), e1554.