

# UCUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

“Sinergismo existente entre enzimas tóxicas presentes en el veneno de serpientes en accidentes ofídicos: revisión bibliográfica”

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico.

Autores:

Campo Guerrero Fernando Sebastián

CI: 0104982764

Correo electrónico: sebastiancampo88@hotmail.com

Villarroel Rubio Luigy Enrique

CI: 2100432596

Correo electrónico: l.e.v.r13@hotmail.com

Tutora:

Dra. María Elena Cazar Ramírez, PhD

CI: 0602243800

**Cuenca, Ecuador**

11-enero-2023

## Resumen:

Los accidentes ofídicos ocurren en todas las partes del mundo y despierta un gran interés por la desatención a nivel de salud pública. Existen alrededor de cinco millones de personas víctimas de mordeduras de serpientes las cuales, al vivir en condiciones de precariedad, requieren del apoyo de entidades gubernamentales para afrontar ese evento que puede ser mortal. El veneno de serpiente es un cóctel enzimático producido por mecanismos de supervivencia o defensa, como consecuencia, la sumatoria de los efectos al final es mayor al conseguido de manera individual; con desenlaces fatales. El objetivo de la presente investigación es presentar información actual acerca de los mecanismos de acción, posibles estrategias sinérgicas y fisiopatología de las enzimas mayormente encontradas en las familias *Viperidae* y *Elapidae*.

En esta revisión bibliográfica se recopiló información científica de estudios realizados desde el año 2010 hasta el año 2022, publicados en plataformas de bases digitales: Science Direct, PubMed, Scopus, SciELO y SpringerLink. Se recolectaron 253 artículos científicos, los cuales, tras aplicar los criterios de selección, se obtuvieron 14 artículos. Los estudios detallan evidencia del sinergismo entre fosfolipasa A2, metaloproteasa, serinproteasa, L-aminoácido oxidasa y acetilcolinesterasa. Así mismo, se demostró, que la presencia de dosis mínimas de enzima puede potenciar el efecto tóxico, actuando sobre diferentes objetivos de un mismo proceso fisiológico o en la formación de complejos dirigida a un objetivo teniendo un ahorro metabólico.

En conclusión, en el veneno de serpiente, las toxinas no se encuentran como moléculas aisladas, sino que son sustancias proteicas que necesitan de otras para ejercer su acción más tóxica. Se describió sinergismo entre enzimas como: fosfolipasa A2 y metaloproteasa en el aumento de citotoxicidad, también en la formación de complejos entre subunidades de fosfolipasa A2 (Asp49 y Lys49) para potenciar su efecto aislado. El presente trabajo contiene información que apoyará a futuras investigaciones en el desarrollo de agentes antiofídicos.

**Palabras clave:** Venenos. Venenos de serpientes. Toxinas. Sinergismo. Sinergismo enzimático.

## **Abstract:**

Snakebite accidents occur in all parts of the world and arouse great interest in neglect at the public health. There are around five million people who are victims of snakebites, live in precarious conditions, and require the support of governmental entities to face this event than can be mortal. Snake venom is an enzymatic cocktail produced by survival or defense mechanisms, as a consequence, the sum of the effects in the end is greater than that achieved individually; with fatal outcomes. The review aims to present information about the mechanisms of action, possible synergistic strategies and pathophysiology of the enzymes mostly found in the Viperidae and Elapidae families.

In this bibliographic review, scientific information was collected from studies conducted from 2010 to 2022, published on digital database platforms: Science Direct, PubMed, Scopus, SciELO and SpringerLink. 253 scientific articles were collected, and 14 articles were obtained once the selection criteria were applied. These studies summarize evidence of synergism between phospholipase A2, metalloprotease, serine protease, L-amino acid oxidase and acetylcholinesterase; about to concerning potentiation of neurotoxicity, hemotoxicity, and cytotoxicity. It is shown that the presence of minimal doses of enzyme can enhance the toxic effect, acting on different targets of the same physiological process or the formation of complexes directed to a target having metabolic sparing.

To conclude, in snake venom, toxins are not found as isolated molecules, but are protein substances that need others to exert their most toxic action. Synergism is described between enzymes such as: phospholipase A2 and metalloprotease in increasing cytotoxicity, also in the formation of complexes between phospholipase A2 subunits (Asp49 and Lys49) to enhance their isolated effect. This work contains information that will support future research in the development of anti-venom agents.

**Key words:** Venoms. Snake venoms. Toxins. Synergism. Enzymatic synergism.

## ÍNDICE DEL TRABAJO

Resumen:	1
Abstract:	2
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA.	8
AGRADECIMIENTO	13
DEDICATORIA	14
INTRODUCCIÓN	16
CAPÍTULO I	18
MARCO TEÓRICO	18
1.1. Características biológicas de ofidios	18
1.2. Ofidismo en Ecuador	21
1.2.1. Identificación de accidentes ofídicos	22
1.3. Cuadros tóxicos del accidente ofídico	23
1.3.1. Manifestaciones clínicas del envenenamiento	23
1.3.2. Cuadro Clínico	24
1.3.2.1. Accidente bothrópico	24
1.3.2.2. Accidente crotálico	24
1.3.2.3. Accidente lachésico	25
1.3.2.4. Accidente elápido	25
1.4. Venenos de serpiente	26
1.4.1. Características de los venenos de serpientes.	26
1.4.2. Mecanismo de acción del veneno de serpiente	27
1.4.3. Clasificación venómica	28
1.5. Efectos fisiopatológicos de los venenos de serpientes	32
1.5.1. Efectos neurotóxicos	33
1.5.1.1. Bloqueo neuromuscular presináptico	33

1.5.1.2. Bloqueo neuromuscular postsináptico	34
1.5.2. Efectos miotóxicos	34
1.5.3. Efectos hemotóxicos	35
1.5.3.1. Factor procoagulante	37
1.5.3.2. Factor anticoagulante	37
1.5.3.3. Factor fibrinolítico	38
1.5.4. Efecto nefrotóxico	38
1.5.5. Efecto citotóxico	39
1.6. Sinergismo en venenos de serpiente	39
1.6.1. Sinergismo vs efecto auxiliar	40
1.6.2. Tipos de sinergismo que ocurren en los venenos	40
1.6.2.1. Sinergismo Intermolecular	41
1.6.2.2. Sinergismo Supramolecular	42
1.6.3. Determinación de la presencia de sinergismo	43
1.6.3.1. Coadministración del componente del veneno	43
1.6.3.2. Puntuación o índice de toxicidad acumulada	43
1.6.3.3. Índice de combinación	44
CAPÍTULO II	45
METODOLOGÍA	45
2.1. Tipo de estudio	45
2.2. Criterios de selección.	45
2.2.1. Criterios de inclusión	45
2.2.2. Criterios de exclusión	45
2.3. Procedimiento de recolección de información	46
CAPÍTULO III	47
RESULTADOS	47

# UCUENCA

3.1. Fuentes bibliográficas seleccionadas para evaluar el sinergismo de enzimas en venenos ofídicos.	47
3.2. Caracterización bioquímica y fisiopatológica de las principales enzimas tóxicas involucradas en sinergismo en venenos ofídicos	48
3.3. Sinergismo enzimático en venenos de serpiente.	53
3.3.1. Complejos sinérgicos	54
3.3.1.1. Complejos de fosfolipasa A2	54
3.3.1.2. Complejos de Metaloproteasas	57
3.3.2. Evidencia científica del sinergismo entre enzimas	57
3.3.3. Estrategias sinérgicas entre enzimas ofídicas.	62
CAPÍTULO IV	64
DISCUSIÓN	64
4.1. Composición de venenos de serpientes	64
4.2. Sinergismo enzimático en venenos de serpientes	65
CAPITULO V	70
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	70
5.1 CONCLUSIONES	70
5.2. RECOMENDACIONES	71
BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Principales especies presentes en Ecuador .....	21
<b>Figura 2.</b> Acción fisiopatológica general de las toxinas de serpiente .....	32
<b>Figura 3.</b> Interacción del veneno de serpiente en la cascada de coagulación.. .....	36
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática del sinergismo intermolecular. ....	41
<b>Figura 5:</b> Representación esquemática del sinergismo supramolecular: .....	42
<b>Figura 6:</b> Diagrama de selección de artículos .....	47
<b>Figura 7:</b> Flujograma de los mecanismos de acción y posibles interacciones sinérgicas de las principales enzimas ofídicas.....	62

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Diferencias entre serpientes venenosas y no venenosas. ....	19
<b>Tabla 2.</b> Composición proteica y no proteica de los venenos de ofidios. ....	26
<b>Tabla 3.</b> Clasificación de los venenos según varios autores. ....	29
<b>Tabla 4.</b> Ejemplos representativos para la evaluación del sinergismo de toxinas utilizando el índice de toxicidad. ....	53
<b>Tabla 5.</b> Complejos sinérgicos de Fosfolipasa A2. ....	55
<b>Tabla 6.</b> Complejos sinérgicos de las Metaloproteasas. ....	57
<b>Tabla 7.</b> Evidencia experimental del sinergismo entre las principales enzimas ofídicas. ...	58

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA.

**MEC:** Matriz extracelular

**3 FTx:** Toxina de 3 dedos

**PLA2:** Fosfolipasa A2

**svPLA2:** Fosfolipasa A2 de venenos de serpientes

**TRPV1:** Receptor de potencial transitorio V1

**CLECL:** Lectina tipo C

**FAD:** Flavín adenín dinucleótido

**svMP:** Metaloproteasas del veneno de serpiente

**svSP:** Serinproteasas del veneno de serpiente

**LAAO:** L-amino oxidasa

**BPTI:** inhibidor de la tripsina pancreática bovina.

**AcHE:** Acetilcolinesterasa

**IRA:** Insuficiencia renal aguda

**Ach:** Acetilcolina

**nAChR:** Receptores de acetilcolina nicotínicos postsinápticos

**svTLE:** Enzimas similares a la trombina

**Ca<sup>++</sup>:** Calcio

**LDH:** Lactato deshidrogenasa

**CK:** Creatina cinasa

**ATP:** Adenosín trifosfato

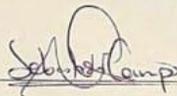
## Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Fernando Sebastián Campo Guerrero en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Sinergismo existente entre enzimas tóxicas presentes en el veneno de serpientes en accidentes ofídicos: revisión bibliográfica", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 11 de enero de 2023



Fernando Sebastián Campo Guerrero

0104982764

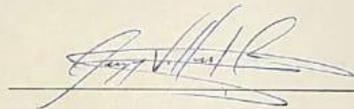
## Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Luigy Enrique Villarroel Rubio en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Sinergismo existente entre enzimas tóxicas presentes en el veneno de serpientes en accidentes ofídicos: revisión bibliográfica", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 11 de enero de 2023



Luigy Enrique Villarroel Rubio

2100432596

## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Fernando Sebastián Campo Guerrero, autor del trabajo de titulación "Sinergismo existente entre enzimas tóxicas presentes en el veneno de serpientes en accidentes ofídicos: revisión bibliográfica", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 11 de enero de 2023



Fernando Sebastián Campo Guerrero

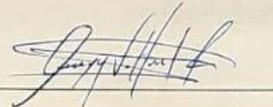
0104982764

## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Luigy Enrique Villarroel Rubio, autor del trabajo de titulación "Sinergismo existente entre enzimas tóxicas presentes en el veneno de serpientes en accidentes ofídicos: revisión bibliográfica", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 11 de enero de 2023



Luigy Enrique Villarroel Rubio

2100432596

## AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradecemos de todo corazón a nuestros padres por brindarnos su apoyo incondicional a lo largo de nuestra formación como profesionales, por su amor y fe que han sido nuestro motor en estos años.

A nuestros queridos profesores que nos acompañaron a lo largo de este camino, fueron muchos años de brindarnos sus vastos conocimientos, así como experiencias gratas que tendremos siempre presente. Agradecemos al Dr. Saulo da Silva por inculcarnos este gran interés hacia el tema. A la Dra. María Elena Cazar, PhD, por su fundamental ayuda y ser nuestra guía en la revisión de este trabajo, gracias por sus consejos y motivación.

A nuestros amigos y compañeros, son tantos los recuerdos y anécdotas, que nunca podremos olvidar, gracias por tantos años de amistad y confianza. Por las noches de desvelo y los pequeños momentos que serán eternos.

**Luigy & Sebastián**

## DEDICATORIA

A mi hermana, Lorena, aunque tu tiempo en este mundo fue corto, el vacío que dejaste en mí fue enorme, a pesar de ello, nunca fue un impedimento para alcanzar nuestro sueño que ahora lo estoy cumpliendo. Por llevarme de la mano por mucho tiempo, por ser más que mi hermana una madre para mí. Siempre estarás en mi corazón.

A mi mami, Adriana, por apoyarme siempre incondicionalmente en toda mi vida, en los buenos y malos momentos que se atravesaron, por enseñarme valores de honestidad y puntualidad, por sus consejos y amor eterno que me brinda. A mi papi, Carlos, por los valores de vida y anécdotas que siempre me han ayudado a estar preparado, y que me han hecho fuerte y paciente. A mi hermana, Sonia, a la distancia siempre has sabido cómo apoyarnos, por enseñarme a ser un hombre de bien. A mis sobrinas, Adri y Marley, por ser mi fuente de inspiración para seguir adelante y ser alguien en quien puedan ver un ejemplo a seguir. A mis queridos primos, sin su amistad y cariño, nunca podría haber llegado hasta aquí.

**Luigy Villarroel Rubio**

## DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mis padres; ya que el esfuerzo que realizan día tras día me ha permitido formarme profesionalmente, a pesar de los duros momentos vividos, siempre sus consejos y alientos en todo momento han sido el motor para no desfallecer en el camino y seguir adelante sin importar la adversidad.

A mis hermanos, que son ellos, fuente de inspiración para mi preparación hacia conseguir una meta planteada en mi vida y poder ser en quién tomen como ejemplo para cumplir sus proyectos.

Sin olvidar a una personita importante que ya no está en este mundo, a quién toda mi vida y sacrificio siempre será para ti.

**Sebastián Campo Guerrero**

## INTRODUCCIÓN

Actualmente, los accidentes ofídicos son considerados un serio problema de salud pública a nivel mundial, afectando aproximadamente a cinco millones de personas cada año (Ochoa Avilés et al., 2020). Los reportes en su mayoría son en países con climas tropicales y subtropicales. El territorio ecuatoriano alberga pisos climáticos, ecológicos y geográficos que lo hacen megadiverso. Nuestro país posee ecosistemas donde habitan especies potencialmente venenosas y peligrosas para el ser humano. Anualmente, en Ecuador se reportan alrededor de 1.400 a 1.800 accidentes ofídicos, siendo una de las frecuencias más altas en el continente, por detrás de Argentina, Bolivia, Brasil y Colombia. La mortalidad promedio por esta causa en nuestro país se estima de al menos 0.07 por cada 100.000 habitantes, señalando a las provincias de Morona Santiago, Manabí y Guayas como las que tienen la mayor tasa de envenenamiento; donde los grupos más afectados son agricultores, jornaleros, mineros y campesinos con una edad entre los 20 a 55 años aproximadamente (MSP.,2017).

La causa de estos incidentes no puede atribuirse al tipo de clima sino a la precariedad de estilo de vida que poseen los habitantes en dichas zonas, a la poca información que se brinda por parte de entidades de salud pública, así como la falta de conocimiento sobre la composición y relaciones sinérgicas de las toxinas de serpientes. Por consiguiente, es imprescindible la generación de información que permita ampliar el conocimiento en la estrategia de sinergismo en los venenos de serpientes.

Los venenos de serpientes son secreciones exógenas producidas por tejidos especializados que durante años han ido evolucionando y adaptando con el objetivo de tener dominio sobre su presa, llegando a mejorar la inmovilización y digestión (Carrasco & Lozano, 2013; Sánchez et al., 2015). Las toxinas en los venenos de serpientes comprenden un innumerable conjunto de sustancias químicas complejas, entre las que destacan cócteles de enzimas proteicas o peptídicas. Esta variedad de toxinas ofídicas depende especialmente de la especie de serpiente; sin embargo, la presente revisión de literatura aborda información sobre el sinergismo de toxinas enzimáticas de las familias *Viperidae* y *Elapidae*: fosfolipasas A2, serinproteasas, metaloproteasas, acetilcolinesterasa y L-aminoácido oxidasa, siendo estas las enzimas más frecuentes en venenos de serpiente (Mohamed, Soares, & Stockand, 2019, Pucca,2020).

El sinergismo es el resultado de potenciar un efecto con varios principios activos de manera que la sumatoria de los efectos al final sea superior al que se conseguiría con solamente la acción individual. De esta manera, las acciones fisiopatológicas producidas pueden llegar a ser letales al ser simultáneas, afectando a nivel sanguíneo, cardiovascular, nervioso y respiratorio (Díaz & Gómez.,2015). Esta descripción general de los efectos sinérgicos ya descubiertos en varios venenos de serpiente y sus posibles mecanismos, junto con los métodos apropiados para evaluar el sinergismo, son importantes para comprender los variados efectos fisiopatológicos y a su vez funciona como una herramienta cognitiva en el desarrollo de antivenenos o inhibidores más eficientes.

La presente revisión de literatura fue planteada para cumplir con los siguientes objetivos

## **Objetivo General**

- Presentar de manera narrativa, los aspectos sinérgicos que se desarrollan entre las principales enzimas presentes en los venenos ofídicos, correlacionando así la potencialización de sus efectos tóxicos, bioquímicos y fisiopatológicos decurrentes de las mordeduras de serpientes.

## **Objetivos Específicos**

- Describir los efectos tóxicos de las principales enzimas ofídicas: acetilcolinesterasa, L-aminoácido oxidasa, serin proteinasa, metaloproteinasa y fosfolipasa A2.
- Analizar los efectos sinérgicos de las enzimas acetilcolinesterasa, L-aminoácido oxidasa, serinproteasa, metaloproteinasa y fosfolipasa A2, que maximizan los procesos neurotóxicos, miotóxicos y hemotóxicos, tanto locales como sistémicos, resultando un efecto más grave en relación a la acción de las enzimas de forma individual.
- Aportar información resumida para futuras investigaciones de desarrollo de agentes antiofídicos.

## CAPÍTULO I

### MARCO TEÓRICO

#### 1.1. Características biológicas de ofidios

En la historia, las serpientes han sido narradas como símbolos místicos, religiosos y militares. Es el animal que genera más percepción negativa en todos los seres humanos y esto se debe a una herencia evolutiva. Cumple una función importante en la cadena trófica debido a su naturaleza depredadora, de esta manera controlan plagas, pero también son presas de aves y mamíferos (Gualán., 2011;Martínez-Vaca León & López Medellín., 2019)

Cuando hablamos de serpientes nos referimos a reptiles sin extremidades, pertenecientes al orden *Squamata* de la clase *Reptilia*. Son animales ectotermos, vertebrados que varían en tamaño y poseen una piel resistente que permite reptar en el suelo, las mismas que contienen escamas que pueden ser lisas o rugosas. Sus párpados son móviles y no tienen aberturas para los oídos, sin embargo, usan su lengua como órgano sensorial que recolecta información del lugar donde se encuentran. Sus dientes varían en posición y permiten diferenciar entre serpientes venenosas y no venenosas. Su cráneo contiene articulaciones que facilita tragar presas de gran tamaño (Fernández Badillo et al., 2016; MSD, 2020).

Con respecto a su hábitat, son animales que pueden vivir en ambientes terrestres, marinos y acuáticos. Pueden cazar a sus presas durante el día o la noche. No hacen madrigueras, sino que ocupan deformaciones cóncavas de terreno, piedras o troncos, incluso, “agujeros” de otros mamíferos pequeños para refugiarse, sitios para poner sus huevos y alimentarse.

Es imprescindible saber diferenciar entre especies venenosas de aquellas que no lo son, para ello el examen visual del ofidio sirve como punto de partida tomando en cuenta aquellas características macroscópicas que pueden representar a la familia (Tabla 1).

**Tabla 1.** Diferencias entre serpientes venenosas y no venenosas (Carrasco & Lozano., 2013; Castro et al., 2020; Ochoa Andrade., 2020).

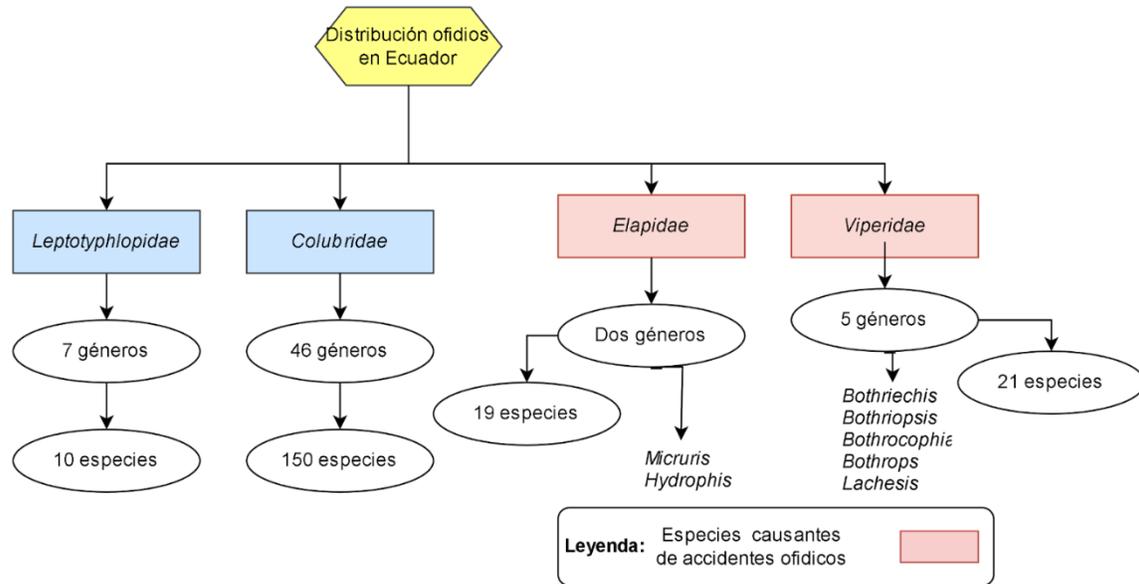
	Venenosas		No Venenosas	
<b>Familias</b>	<i>Viperidae</i>	<i>Elapidae</i>	<i>Colubridae</i>	<i>Boideae</i>
<b>Cabeza</b>	Triangular	Redonda	Redonda	Ligeramente Triangular
<b>Escamas cabeza</b>	Quilladas, ásperas	Ausentes	Generalmente ausentes	Lisas
<b>Foseta</b>	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
<b>Pupilas</b>	Elípticas con disposición vertical	Elípticas con disposición diagonal	Redondas	Redondas
<b>Cuello</b>	Estrecho	Grueso	Grueso	Grueso

# UCUENCA

<b>Escamas</b>	Pequeñas	Pequeñas	Grandes	Grandes
<b>Colmillos</b>	Móviles (Solenoglifa)	Fijos (Proteroglifa)	Ausentes (Aglifa)  Colmillos posteriores (Opistoglifas)	Ausentes (Aglifa)
<b>Cola</b>	Corta y afinada	Larga y afinada	Corta	Larga y afinada
<b>Anillos transversales de colores</b>	Ausentes	Bandas negras impares	Bandas pares, incompletos	Ausentes
<b>Hábitos</b>	Nocturnos	Nocturnos	Diurnos	Diurnos
<b>Ante amenaza</b>	Atacan	Atacan	Huyen	Huyen

## 1.2. Ofidismo en Ecuador

El 70% del territorio ecuatoriano tiene características tropicales y subtropicales, lo cual permite tanto el crecimiento como el desarrollo de varias especies de serpientes que pueden ser venenosas como no venenosas. Se habla de alrededor de 238 especies de ofidios, de las cuales 37 especies son venenosas, siendo de nuestro interés las familias *Elapidae* y *Viperidae* (Figura1) (SIVE., 2019; MSP., 2017).



**Figura 1.** Principales especies presentes en Ecuador.

Las especies que pertenecen a la familia *Viperidae* son muy territoriales y pueden estar adaptadas a zonas intervenidas por los seres humanos, lo que ocasiona accidentes al intentar “invadir”. Este grupo de serpientes puede ocasionar cuadros clínicos de envenenamiento leves, moderados y graves a diferencia de la familia *Elapidae* que puede causar cuadros clínicos graves debido a que su veneno posee características neurotóxicas, sin embargo, son los que menos accidentes ofídicos provocan, esto debido a que no son territoriales y en presencia de humanos tienden a huir; las mordeduras más bien ocurren cuando se las manipula (MSP., 2017).

Las serpientes responsables de la mayoría de accidentes en nuestro territorio, en un 70%-80% pertenecen al género *Bothrops*: *B. asper* en la región litoral *B. atrox* en la región amazónica. Son muy conocidas comúnmente con el nombre de equis y pitalala respectivamente (Gualán, 2011; Ochoa Avilés et al., 2020). Principalmente, el reporte de mordeduras de ofidios se realiza con mayor frecuencia en los meses en donde aumentan las precipitaciones, es decir, en los meses de febrero, marzo, abril y mayo (Gualán., 2011).

## 1.2.1. Identificación de accidentes ofídicos

El accidente ofídico es causado por la mordedura de serpientes que poseen e inoculan sustancias tóxicas, las cuales lesionan los tejidos y provocan alteraciones fisiopatológicas en la víctima; su frecuencia y gravedad hacen que tengan importancia para la salud pública.

Es necesaria la diferenciación del tipo de mordedura al momento de un accidente. Como primera instancia, el examen visual de la herida en el sitio de la lesión suele ser de mucha ayuda al momento de la identificación de una mordedura de una especie venenosa de otra que no lo sea. Las laceraciones provocadas por las serpientes no venenosas generalmente se visualizan como arañazos sobre la piel, mientras que la presencia de marcas de colmillos, como agujas hipodérmicas, constituye un indicativo de la mordedura por un ofidio venenoso (MSP.,2017).

El *dry bite* (mordedura seca) se caracteriza por provenir de una serpiente venenosa la cual no desencadena síntomas locales, sistémicos o alteraciones en estudios de laboratorio, debido a que la administración del veneno es muy pequeña o casi nula. Es importante sospechar una mordedura seca, aun cuando se tiene evidencia clara de que el animal ofensor es una serpiente venenosa (Freund et al., 2022).

El diagnóstico de esta condición se realiza de forma retrospectiva, al transcurrir 24 horas del evento y no documentarse ninguna alteración local, sistémica o en estudios de laboratorio y su manejo es meramente expectante, manteniendo al paciente en observación por este periodo (Freund et al., 2022).

## 1.3. Cuadros tóxicos del accidente ofídico

De manera general, la gravedad de los distintos cuadros tóxicos se clasifica siguiendo una escala del 0 al 3 atendiendo a varios factores: severidad del dolor, inducción de coagulopatía, hipotensión o presencia de respiración débil. Algunas de las lesiones y alteraciones consecuentes a la mordedura, como son la parálisis total o parcial, la amputación de miembros o los dolores recurrentes en el lugar de la mordedura, pueden perdurar durante toda la vida en el individuo agredido (Maguiña Vargas et al., 2020).

**Grado 0:** No existe envenenamiento, pero si existe la ausencia de una reacción local o sistémica, con presencia de marcas de colmillos como evidencia de una probable mordedura de víbora que no haya inoculado veneno.

**Grado 1: Envenenamiento leve.** Presencia de edema local moderado con equimosis alrededor del punto de inoculación y ausencia de sintomatología sistémica.

**Grado 2: Envenenamiento moderado.** Existe edema local marcado, con equimosis, linfangitis, dolor intenso al movimiento y, en ocasiones, manifestaciones sistémicas leves, como náuseas, vómito, diarrea.

**Grado 3: Envenenamiento grave.** Extensión más allá de la extremidad afecta con manifestaciones generales muy graves (rabdomiólisis, coagulación intravascular diseminada, insuficiencia renal aguda, alteraciones neurológicas, insuficiencia respiratoria, diátesis hemorrágica o shock anafiláctico)

(Ochoa Andrade., 2020; Vico Andueza et al., 2015).

### 1.3.1. Manifestaciones clínicas del envenenamiento

Los signos y síntomas de los accidentes ofídicos, así como su gravedad, varían de acuerdo con el ofidio (especie, tamaño, edad del animal, cantidad de veneno inoculado, entre otras), el paciente (edad, sexo, enfermedades de base,) y el tiempo de inicio del tratamiento después del evento (Pereañez et al., 2014). Además, la zona afectada depende de la serpiente. Las serpientes arborícolas producen mordeduras con más frecuencia en los miembros superiores y la cabeza, a diferencia de las terrestres que son en los miembros inferiores. Otro punto a tomar en cuenta es el hábitat de la especie, puesto que, los

accidentes en la selva ocurren más en los miembros inferiores y en la costa en los miembros superiores (Maguiña Vargas et al., 2020).

El envenenamiento, por tratarse de proteínas extrañas altamente antigénicas, puede provocar reacciones anafilácticas, sobre todo en pacientes con mordeduras previas, por lo cual debe tenerse al lado medicación para un shock anafiláctico de presentarse el evento (Maguiña Vargas et al., 2020).

### **1.3.2. Cuadro Clínico**

De acuerdo a la serpiente, los cuadros clínicos de los accidentes ofídicos se clasifican en bothrópico, crotálicos, lachésicos, elapídicos y por serpiente marina.

#### **1.3.2.1. Accidente bothrópico**

Aquel ocasionado por serpientes de los géneros *Bothrops*, *Bothrocophias*, *Bothriopsis*, *Bothriechis* y *Porthidium*. Estas serpientes son las que ocasionan la mayor frecuencia de accidentes. El veneno de estas serpientes induce manifestaciones locales y sistémicas por su alta concentración de factores anticoagulantes y mio-necrotizantes (MSP.,2017).

El cuadro clínico después de una a tres horas de la mordedura se caracteriza por dolor local intenso, edema firme, que aumenta progresivamente, y eritema con manchas rosáceas o cianóticas. Además, si la cantidad de veneno inoculado es mayor, en las primeras horas el paciente presentará disminución de la presión arterial y del fibrinógeno circulante, lo que causa equimosis, linfangitis, bulas y, luego de días o semanas, necrosis superficial o profunda del miembro o zona afectada, que puede causar una necrosis total (Maguiña Vargas et al., 2020).

#### **1.3.2.2. Accidente crotálico**

Producido por una serpiente de la especie *Crotalus durissus ssp*. Los incidentes suelen ser de mayor letalidad, pero mucho menos frecuentes. Se caracteriza por tener una acción principal neurotóxica y miotóxica, dejando su hemotoxicidad de manera secundaria. El cuadro clínico se manifiesta con dolor local leve que desaparece rápidamente, además presenta mialgia generalizada, disnea progresiva, taquicardia y diplopía. Uno de los signos de laboratorio más característicos por este tipo de mordedura es el oscurecimiento gradual

de la orina conjuntamente con su disminución en volumen, a tal punto que se puede desencadenar una anuria y posteriormente fallo renal (García et al., 2014; Maguiña Vargas et al., 2020).

### **1.3.2.3. Accidente lachésico**

Ocasionado por serpientes del género *Lachesis*, conocidas como verrugosas, se caracteriza por confusión mental (acción vagal), palidez intensa, sudoración, frialdad cutánea y obnubilación que se observa luego de las primeras horas del accidente, posteriormente se desarrolla hipotensión, que puede ocasionar shock e incluso muerte (Maguiña Vargas et al., 2020; MSP.,2017).

El accidente lachésico generalmente es considerado como grave, por ser causado por serpientes de gran porte, lo que implica que la cantidad de veneno inoculado es potencialmente grande, teniendo una letalidad no mayor que el accidente bothrópico (García et al., 2014).

### **1.3.2.4. Accidente elápidio**

Producido por serpientes pertenecientes a la familia *Elapidae* del género *Micrurus* (corales) y la especie *Hydrophis platurus*. La principal acción del veneno de estas serpientes es neurotóxica. El veneno se distribuye vía hematológica y linfática, llegando a la unión neuromuscular, donde se produce bloqueo sináptico responsable del cuadro que caracteriza estos envenenamientos. Generalmente, no se presentan complicaciones o efectos locales importantes, y si se presentan son mínimos, generando adormecimiento en la zona afectada (MSP.,2017).

A los 30 a 60 minutos del accidente, aparece la facies neurotóxica, sialorrea, disfagia y, a veces, disartria. También aparecen parálisis flácida del sistema locomotor y alteraciones en la función miocárdica. De manera más tardía, se presentan alteraciones urinarias y hematuria, que pueden progresar a oliguria, anuria e insuficiencia renal aguda (Maguiña Vargas et al., 2020).

## 1.4. Venenos de serpiente

### 1.4.1. Características de los venenos de serpientes.

Se le ha considerado como uno de los venenos mejor caracterizados, debido a las composiciones complejas de proteínas, péptidos tóxicos y farmacológicamente activos. En comparación con venenos de otros animales como arañas, escorpiones y caracoles, el veneno de serpiente, es considerado como avanzado por su amplia gama de proteínas, así como de péptidos de tamaños moleculares grandes que contienen efectos medicinales y toxicológicos. Cerca de 50 a 100 componentes en los venenos de serpientes se distribuyen en familias dominantes y secundarias, de esta manera se obtiene variedad de isoformas de proteínas y péptidos enzimáticos como no enzimáticos (Abdullahi et al., 2021).

El veneno es una sustancia exocrina compleja de coloración amarillenta o incolora producida en las glándulas salivales que está constituido por varios péptidos y proteínas tóxicas como miotoxinas, hemorraginas, neurotoxinas y toxinas coagulantes. Se trata de una sustancia de consistencia viscosa, esto debido al contenido de sólidos totales (aproximadamente 25%). Del total de estos sólidos el 70 – 90% corresponde a proteínas y polipéptidos de un peso molecular elevado, las mismas que ocasionan la mayoría de los efectos biológicos. El porcentaje restante, 10-30% se asocia a una amplia gama de sustancias orgánicas de peso molecular bajo (Maguiña Vargas et al., 2020). Tiene un pH ácido, es soluble en agua y posee una densidad de 1.03 g/ml (Goswami et al., 2014).

**Tabla 2.** Composición proteica y no proteica de los venenos de ofidios. (Abdullahi et al., 2021; Maguiña Vargas et al., 2020; MSP., 2017).

Composición química de los venenos	
<b>Elementos proteicos</b>	<b>no</b> Aniones, cationes, aminoácidos libres, lípidos, carbohidratos, aminos biógenas, nucleósidos.
<b>Bacterias</b>	Actúan sinérgicamente con la acción tóxica.

<b>Proteínas enzimáticas (dominantes)</b>	Fosfolipasa A2, metaloproteasas, serinproteasas, L-aminoácido oxidasa, acetilcolinesterasa, fosfodiesterasa, hialuronidasa.
<b>Proteínas enzimáticas (secundarias)</b>	<b>no</b> Toxinas tres dedos, desintegrinas, inhibidores de la serinproteasa, proteínas ricas en cisteína y proteínas similares a las lectinas tipo C

Se debe tomar en cuenta que la presencia y abundancia de cada uno de los componentes que tiene el veneno va a estar en función de cada especie de serpiente, así como su edad, sexo, tamaño del animal, regiones geográficas y el tipo de presa. La presencia de una toxina va a depender a la inexistencia o existencia del gen que va a codificar esa toxina en particular o la regulación en su expresión a nivel transcripcional (por medio de elementos cis y trans) y/o postranscripcional (a través de corte, empalme alternativo y microRNAs). De acuerdo al género de la serpiente, el veneno puede tener diferentes acciones fisiopatológicas (Castro et al., 2020; Maguiña Vargas et al., 2020).

Los ofidios emplean su veneno con varios objetivos entre ellos; neutralizar y predigerir a sus presas, y para alejar o debilitar a los depredadores. Emplean varios tipos de estrategias: 1) parálisis muscular por bloqueo de la unión neuromuscular 2) alteraciones de la función cardiovascular para provocar isquemia tisular o colapso circulatorio y finalmente 3) predigestión tisular por necrosis celular (Frangieh et al., 2021).

#### 1.4.2. Mecanismo de acción del veneno de serpiente

Los venenos de serpientes se sintetizan y almacenan en glándulas venenosas, las mismas que se encuentran a cada lado de la cabeza y detrás del ojo encapsulada en una vaina muscular. Las glándulas tienen alvéolos grandes que permite almacenar el veneno al momento de transportar a los colmillos tubulares (Goswami et al., 2014).

Las sustancias tóxicas comprendidas en el veneno ingresan a los tejidos por medio de los colmillos de la serpiente, y dependiendo del tamaño, va a romper tejidos llegando a áreas subcutáneas o intramusculares comenzando la inoculación. Cuando ya ingresa en los tejidos puede presentar efectos locales o manifestaciones sistémicas, esto se logra a través de una distribución por el sistema vascular (Cañas et al., 2016).

Los venenos ofídicos pueden ser separados en dos grandes grupos, de acuerdo a sus principales mecanismos de acción: 1) Venenos neurotóxicos (principalmente en la familia *Elapidae*), y 2) Venenos miotóxicos (principalmente en la familia *Viperidae*). Las neurotoxinas actúan en el tejido nervioso bloqueando la acción de los neurotransmisores y neuroreceptores de la presa o víctima. El efecto neurotóxico provoca que la víctima pierda el control y sensibilidad del miembro afectado. Dependiendo del grado de toxicidad producirá parálisis orgánica severa. Por otro lado, las miotoxinas producen degradación del tejido muscular, además provocar tanto activación como inhibición de los factores de la coagulación (trombina, factores X y II) previniendo o promoviendo la formación del coágulo (Córdova & Santos.,2015).

La variedad de componentes que constituyen el veneno de las serpientes ejerce sus efectos tóxicos sobre diversas dianas toxicológicas, aunque no únicamente se enfocan en estos, sino que también una misma estructura biológica puede ser diana común a varias toxinas, la cual puede pertenecer a distintas familias de proteínas y parte de las sustancias presentes en el veneno de diversas serpientes (Waheed et al., 2017).

### **1.4.3. Clasificación venómica**

Debido a la composición heterogénea de los venenos de serpientes, y la multiplicidad de acciones fisiopatológicas y farmacológicas, es muy complejo generar una clasificación estricta. Ciertos componentes llegan incluso a ser tóxicos y desarrollan un desenlace fatal. A continuación, un cuadro resumen de cómo diferentes autores han especulado sobre la clasificación tóxica de los venenos de serpiente.

**Tabla 3.** Clasificación de los venenos según varios autores. (Córdova Mera & Santos Espín., 2015; Goswami et al., 2014; J. Jiménez., 1970; Morera, 2001; WHO., 2010).

Autor	Año	Criterio de clasificación	Clasificación de los venenos	Descripción
<b>Jiménez Porras</b>	1970	Acciones fisiopatológicas	Productoras de shock, hemorragias, anticoagulantes, mionecroticos	Mayoría de víboras y cascabeles norteamericanas
			Hemolíticos y neurotóxicos	Cascabel brasileña y argentina
			Neurotóxicos, miotóxicos y hemolíticos	Serpientes marinas
			Neurotóxicos y mionecrogénicos	Algunas cobras
			Neurotóxicos	Serpientes elapideas con acción letal
<b>Lee</b>	1979	Acciones Farmacológicas	Cardiotóxicos	-
			Fosfolipasas A2	-
			Neurotoxinas presinápticas	-

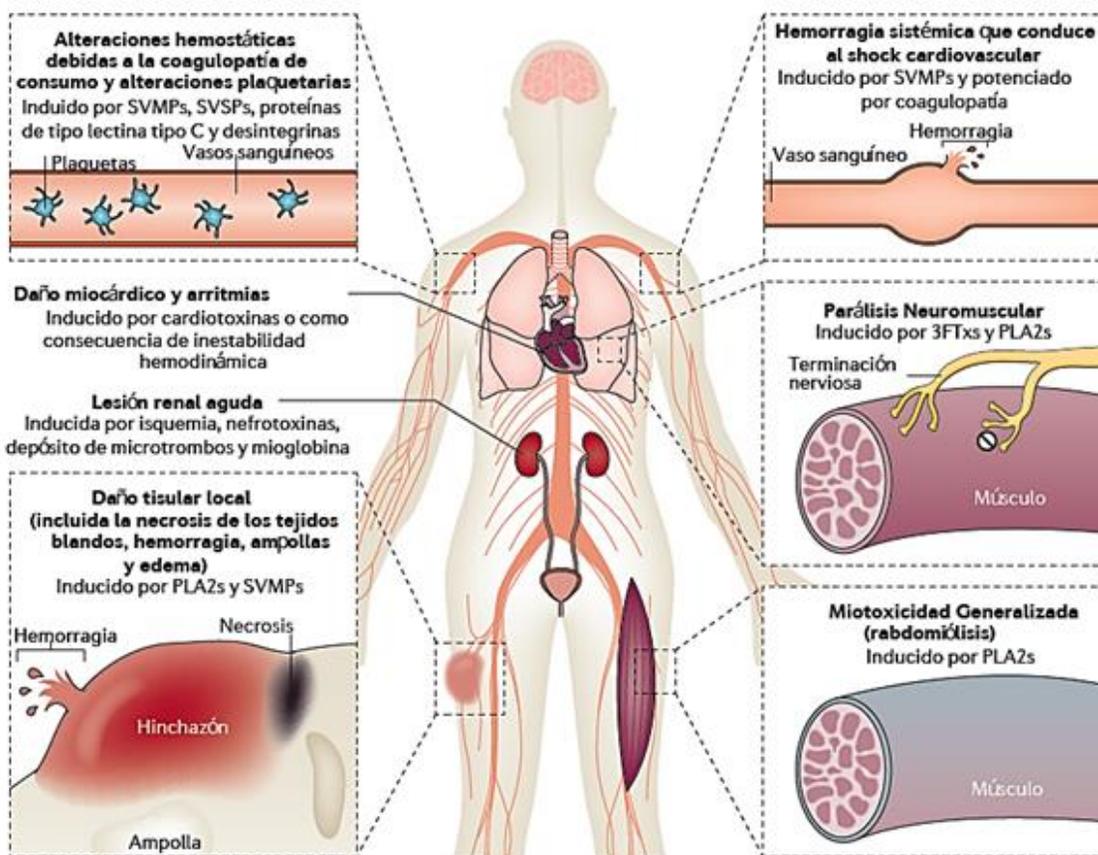
			Neurotoxinas postsinápticas	-
			Toxinas que afectan a los canales de Sodio	-
<b>Organización mundial de la salud (OMS)</b>	2010	Tipo de envenenamiento	Citotóxicos	Víboras de escamas de sierra/alfombras, víboras bufadoras, víboras del Gabón y cobras escupidoras
			Neurotóxicos	Cobras no escupidoras, Mamba verde y negra
			Hemorrágicos	Víboras de escama de sierra, víboras bufadoras, Boomslang y serpientes de vino
			Miotóxicos	Serpiente marina de vientre amarillo
<b>Córdova Mera &amp; Santos Espín</b>	2013	Fisiopatología	Proteolíticos	Familia <i>Elapidae</i> & <i>Hydrophiidae</i> altamente neurotóxicos
			Coagulantes	
			Hemolíticos	

			Mionecróticos	Familia <i>Viperidae</i> inductores de shock, hemorragia local y sistémica y necrosis
			Neurotóxicos	
<b>Goswami y otros</b>	2014	Según su efecto	Hemotóxico	-
			Citotóxico	-
			Neurotóxico	-

## 1.5. Efectos fisiopatológicos de los venenos de serpientes

La mayoría de los componentes de los venenos parecen unirse a varios receptores fisiológicos, y los intentos por clasificar los venenos como tóxicos para un sistema o aparato específico conllevan errores de juicio clínico (Robert Barish, 2020).

Debido a que la variación en la composición venómica es bastante pronunciada incluso dentro de una misma familia ofídica, los compuestos tóxicos pueden causar una variedad de efectos biológicos a nivel local y sistémico (Figura 2). El efecto local se caracteriza por dolor quemante, estallante o punzante seguido de inflamación local y necrosis tisular. A nivel sistémico, el veneno puede causar diferentes efectos incluyendo neurotoxicidad, miotoxicidad, cardiotoxicidad, nefrotoxicidad, coagulopatía y shock circulatorio (Frangieh et al., 2021).



**Figura 2.** Acción fisiopatológica general de las toxinas de serpiente.

Tomado de: (Ochoa Andrade, 2020)

## 1.5.1. Efectos neurotóxicos

Por lo general el cuadro neurotóxico es producido en su mayoría por el veneno de las serpientes de las familias *Elapidae* e *Hydrophiidae*. (Nogués et al., 2008). La mayoría de las neurotoxinas actúan sobre el sistema nervioso periférico, donde la unión neuromuscular esquelética es un objetivo favorito. Las neurotoxinas provocan parálisis neuromuscular aguda siendo una causa de morbilidad y mortalidad (Mohamed Abd El-Aziz et al., 2019).

Las neurotoxinas atraviesan la barrera hematoencefálica y actúan en los núcleos mesencefálicos. Se bloquean los mediadores que controlan la actividad de las neuronas efectoras y no por lesión directa sobre el nervio, de ahí que los signos neurológicos tiendan a desaparecer al cabo de unos días del envenenamiento (Fernanber., 2013). Tradicionalmente, se sabe que las neurotoxinas del veneno de serpiente producen dos tipos de bloqueo neuromuscular: presináptico (neurotoxinas  $\beta$ ) y postsináptico (neurotoxinas  $\alpha$ ) según su sitio de acción.

### 1.5.1.1. Bloqueo neuromuscular presináptico

Las neurotoxinas presinápticas son complejas y están relacionadas con actividad de fosfolipasa A2 (llamadas  $\beta$ -Neurotoxinas) inhibiendo la liberación de acetilcolina (Ach) en la hendidura sináptica, acción generalmente irreversible. Estas  $\beta$ -neurotoxinas juegan un papel crítico en el envenenamiento por serpientes, bloqueando la transmisión en la unión neuromuscular sin afectar la sensibilidad de la placa terminal motora a la Ach siendo responsables de una alta toxicidad e insuficiencia respiratoria, debido a la parálisis flácida de los músculos esqueléticos. Estas moléculas se han identificado en venenos de cuatro familias principales de serpientes venenosas: *Crotalidae*, *Elapidae*, *Hydrophiidae* y *Viperidae*; donde podemos encontrar toxinas como: taipoxina (*Oxyuranus scutellatus*), paradoxina (*Oxyuranus microlepidotus*), trimucrotoxina, viperotoxina, textilotoxina (de *Pseudonaja textilis*) y comotoxina, las cuales estructuralmente están constituidas por entre una y cinco subunidades que interactúan covalente o no covalentemente (Manrique & Ramirez Ramos, 2016; Mohamed Abd El-Aziz et al., 2019).

## 1.5.1.2. Bloqueo neuromuscular postsináptico

Las toxinas de acción postsináptica o  $\alpha$ -neurotoxinas son complejos proteínicos en dedos de zinc (3 FTx) con un mecanismo de acción similar al curare (conocidas también como toxinas curamiméticas), que ocasionan un bloqueo reversible de los receptores de acetilcolina nicotínicos postsinápticos (nAChR), lo cual impide la apertura de los canales iónicos a nivel de la unión neuromuscular esquelética, desencadenando así, una muerte por asfixia (Mackessy, 2010; Mohamed Abd El-Aziz et al., 2019).

Estas neurotoxinas se caracterizan por tener una acción de menor potencia pero son más comunes que las presinápticas, son rápidas y potencialmente más letales, ya que actúan cuando alcanzan la placa neuromotora; sin embargo, al estar expuestas en la superficie celular son sensibles a los antivenenos, por lo tanto la parálisis flácida ocasionada por neurotoxinas postsinápticas son potencialmente reversibles. (Mackessy, 2010; Mohamed Abd El-Aziz et al., 2019). Si bien estas toxinas se encuentran predominantemente en venenos de serpientes elápidas e hidrófidas, así como en algunas especies de vipéridos, también se han identificado neurotoxinas  $\alpha$  en venenos de *Colubridae*, que, si bien es la familia de serpientes más grande, no se ha considerado médicamente importante con respecto al envenenamiento humano (Inagaki et al., 2017).

## 1.5.2. Efectos miotóxicos

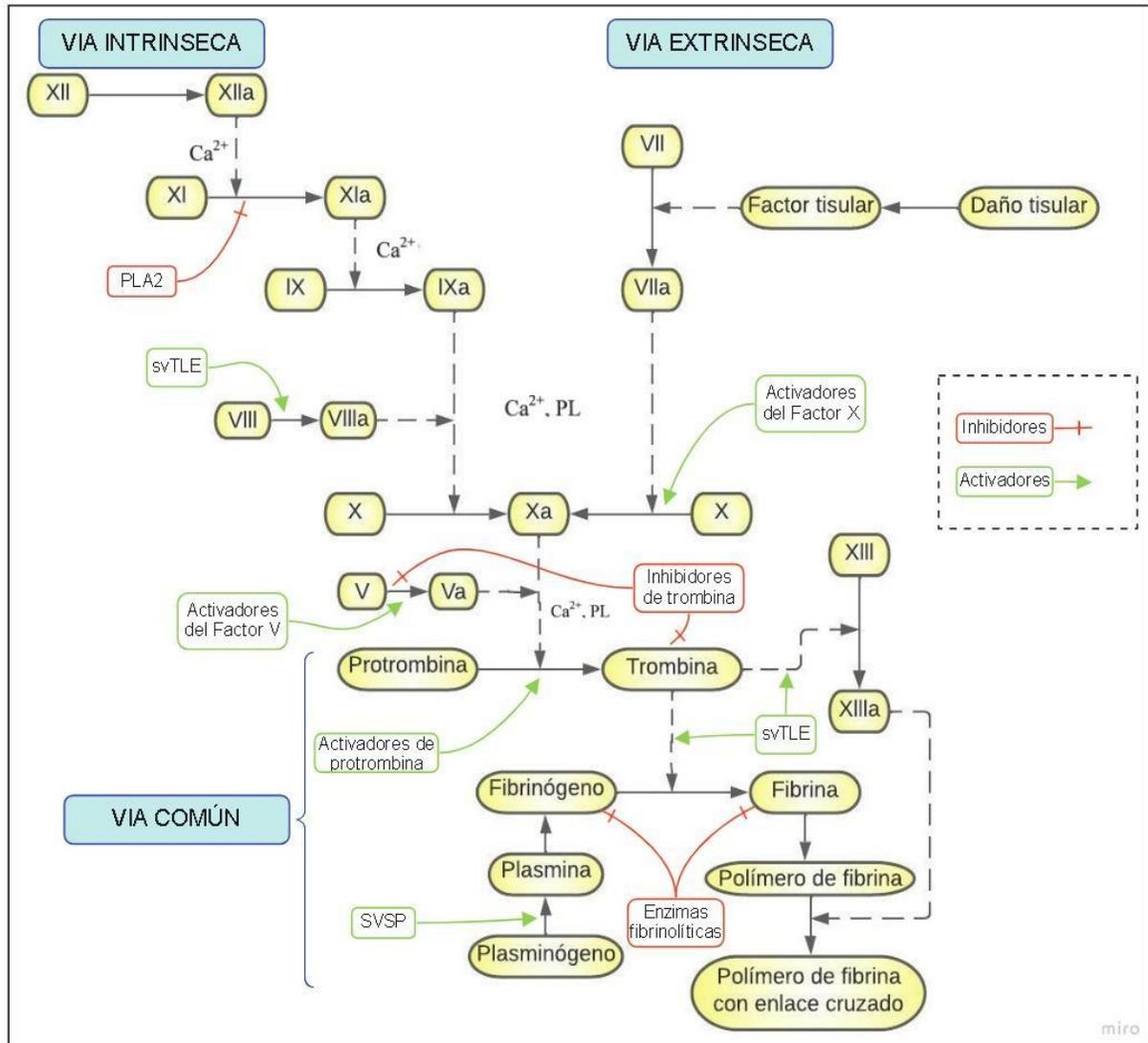
Las miotoxinas que se encuentran en los venenos de serpiente tienen acciones específicas sobre el músculo esquelético que afectan la integridad del sarcolema. Estas toxinas conducen a la inflamación y desintegración tanto del retículo sarcoplásmico como de las fibrillas musculares provocando daño miotóxico o necrosis muscular. Los venenos de las especies *Elapidae* y *Viperidae* son los principales fluidos donde se han aislado miotoxinas y son ricos en fosfolipasas, siendo la PLA2 las miotoxinas más importantes y abundantes en estos venenos de serpiente. Por otro lado, existen otras miotoxinas, como las miotoxinas de bajo peso molecular (miotoxina-a, crotamina) aisladas de los venenos de la serpiente *Crotalus viridis viridis* y de la serpiente *Crotalus durissus*, las cuales se unen específicamente a los canales de sodio sensibles al voltaje del sarcolema del músculo esquelético, induciendo una entrada de sodio que es responsable de la despolarización y contracción del músculo esquelético (Chan et al., 2016; Mohamed Abd El-Aziz et al., 2019).

Así mismo, se ha descrito que las metaloproteinasas hemorrágicas de los venenos de serpientes también son capaces de inducir mionecrosis, aunque dicha acción no resulta de una lesión directa a las fibras musculares, sino que es una consecuencia de la isquemia producto de las alteraciones que inducen estas enzimas en la microvasculatura. Algunos venenos de serpiente también contienen cardiotoxinas (también llamadas citotoxinas) que causan la despolarización y degradación de la membrana plasmática de las células del músculo esquelético causando mionecrosis (Johnston & Isbister, 2021).

### 1.5.3. Efectos hemotóxicos

La hemotoxicidad es uno de los signos clínicos más comunes en las víctimas de mordedura de serpiente, causada principalmente por factores anticoagulantes, procoagulantes, fibrinolisin, hemorraginas y hemolisinas (Figura 3). Las hemotoxinas se caracterizan por causar hemorragia local y sistémica. El sangrado sistémico espontáneo contribuye a las muertes causadas por shock hipotenso. También son responsables de causar muertes por hemorragia, especialmente cuando se produce sangrado intracraneal (Slagboom et al., 2017).

Los venenos de serpientes de las familias *Viperidae* y *Crotalidae* son una rica fuente de proteínas y péptidos que interactúan con los componentes del sistema hemostático y provocan hemorragias que se pueden observar después de las mordeduras. El cuadro hemotóxico generalmente es producido por el veneno de casi todas las familias de serpientes, excepto *Hydrophiidae*. Estos componentes (enzimáticos y no enzimáticos) pueden clasificarse en factores coagulantes, anticoagulantes y fibrinolíticos (Mohamed Abd El-Aziz et al., 2019; Nogués et al., 2008).



**Figura 3.** Interacción del veneno de serpiente en la cascada de coagulación. svTLE, Enzimas similares a la trombina; PL, fosfolipasa; PLA2, fosfolipasa A2; svSP, serinproteasa. Activadores del Factor V: svSP; inhibidores de factor X: lectina tipo C; activadores de factor X: svMP, svSP; activador de protrombina: svMP; inhibidores de trombina: lectina tipo c, Inhibidor de la serina proteasa tipo Kunitz; fibrinogenolíticos: svSP, svMP. Adaptado de: (Jiménez & Muñoz, 2009; Slagboom et al., 2017; Waheed et al., 2017).

### 1.5.3.1. Factor procoagulante

Varios componentes del veneno actúan sobre elementos de la cascada coagulante y activan el sistema de coagulación. El efecto coagulante se da por una coagulopatía intravascular diseminada masiva junto a la actividad fibrinolítica en plasma. Esta patología es una coagulopatía por consumo e hiperfibrinólisis, depositándose fibrina en los vasos y la consiguiente disminución del fibrinógeno y factores de coagulación (Fernanber, 2013).

Estas proteínas del veneno incluyen diferentes activadores de los factores de coagulación de la sangre, como el factor V, IX, X y activadores de protrombina. No todas las especies de serpientes contienen cada uno de estos activadores. Los activadores del veneno de vipéridos y crotálidos son generalmente metaloproteasas (Clase P-III, sin acción hemorrágica), a diferencia de los activadores del veneno de elápidos que son serinproteasas que actúan directamente sobre el fibrinógeno, generando fibrina, denominándose “enzimas tipo trombina”. En el proceso de coagulación, los factores V, IX, X junto con los iones de calcio y los fosfolípidos activan la protrombina e inducen la formación de coágulos de fibrina (Mohamed Abd El-Aziz et al., 2019).

### 1.5.3.2. Factor anticoagulante

Las hemotoxinas ejercen una acción anticoagulante de forma directa o indirecta al inhibir el proceso de coagulación, teniendo como consecuencia un sangrado asociado al envenenamiento. La acción anticoagulante de las proteínas del veneno de serpiente se debe a los activadores de la proteína C, los inhibidores de los factores IX y X de la coagulación sanguínea y la inhibición de la trombina o las fosfolipasas. Entre las proteínas anticoagulantes podemos encontrar las de naturaleza enzimática como lo son las proteasas y PLA2, o proteínas no enzimáticas. Las PLA2 previenen la formación del complejo de protrombinasa al degradar los fosfolípidos dentro de este complejo (Mohamed Abd El-Aziz et al., 2019). Así mismo, otro grupo de toxinas que muestran propiedades anticoagulantes son las enzimas fibrinolíticas o desintegrinas. Las desintegrinas pertenecen a una familia de proteínas inhibidoras de integrinas aisladas del veneno de víbora. Contienen la secuencia RGD que actúa como sitio de reconocimiento por parte de los receptores de glicoproteína IIb-IIIa e inhibe la agregación plaquetaria (Chan et al., 2016).

### 1.5.3.3. Factor fibrinolítico

Las enzimas fibrinolíticas se pueden clasificar además en fibrin(ogen)asas de cadena  $\alpha$  o  $\beta$  según sus especificidades. Muchos svMP, particularmente los P-I, son fibrinogenolíticos. La mayoría de las svMP escinden activamente la cadena  $\alpha$  del fibrinógeno en fibrinopéptidos, y aunque algunas de estas proteínas también exhiben un menor grado de actividad en la cadena  $\beta$ , hay relativamente pocas svMP que degradan preferentemente esta cadena, un ejemplo clave es la metaloproteinasa fibrinolítica aislada del veneno de la víbora del desierto (*Vipera lebetina*). La degradación ocasionada da como resultado la desfibrilación, que a su vez contribuye a la coagulopatía y las alteraciones hemorrágicas. Por otro lado, la fibrolasa, actúa directamente sobre el fibrinógeno escindiendo las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , pero no la cadena  $\gamma$ , siendo eficaz para digerir la fibrina y los coágulos sanguíneos de forma dependiente de la dosis, ya que actúa directamente sobre el factor I sin activar el plasminógeno (Frangieh et al., 2021; Mohamed Abd El-Aziz et al., 2019).

Las enzimas fibrinolíticas de bajo peso molecular, jararafibrasas I, II, III y IV aisladas del veneno de *Bothrops jararaca* también exhiben una actividad hemorrágica. Este tipo de enzimas con acción fibrinolítica se han aislado principalmente de la familia *Elapidae*, aunque también de especies de crotálicos asiáticos, norteamericanos y sudamericanos (Frangieh et al., 2021; Slagboom et al., 2017).

### 1.5.4. Efecto nefrotóxico

Con frecuencia, en los envenenamientos causados por la familia *Viperidae* se desarrolla insuficiencia renal aguda (IRA). Es importante recalcar que dicha patología es una de las principales causas de muerte en los envenenamientos severos por cascabel en Sudamérica. Son diversas las acciones ejercidas por dichos venenos sobre el funcionamiento y estructura renal. Por un lado, los problemas de perfusión derivados de las alteraciones hemodinámicas originan isquemia renal que culmina con necrosis tubular aguda. También, la membrana basal glomerular es degradada por las metaloproteasas del veneno, generando hematuria y proteinuria visible macroscópicamente. Además, al momento de producirse la hemólisis intravascular o toxicidad importante, la hemoglobina y mioglobina se acumulan en los túbulos renales, con el consecuente efecto tóxico sobre las células tubulares. Todas las alteraciones antes mencionadas son responsables de la lesión

celular a diferentes niveles, la cual se manifiesta como necrosis cortical bilateral, lesión glomerular y necrosis tubular aguda (Gutiérrez et al.,2011).

### **1.5.5. Efecto citotóxico**

Caracterizado por producir una inflamación dolorosa y progresiva en el sitio de la mordedura, convirtiéndose en ampollas y hematomas, de las cuales, muchas de las veces se combinan con efectos sistémicos, incluyendo shock hipovolémico. A menudo, se desarrolla un daño tisular local extenso, caracterizado por necrosis de la extremidad afectada. Las enzimas hidrolíticas, como las SVMP y PLA2, y los 3FTX citotóxicos no enzimáticos se han relacionado como agentes causales.

Las citotoxinas y fibrinolíticos, producen necrosis y hemorragias en el tejido nervioso, así como, también en otros tejidos, esto se debe a que dichas sustancias en su mayoría poseen acción tipo trombina, se consume el fibrinógeno, se forma un monómero de fibrina poco estable y discapacitado en su función de formar coágulos (Fernanber, 2013).

### **1.6. Sinergismo en venenos de serpiente**

El sinergismo es un fenómeno significativo presente en los venenos de serpientes que puede ser respuesta a una adaptación estratégica para potenciar la acción de unas toxinas con otras. Según Pucca et al.,2020, menciona que el sinergismo es "la interacción o cooperación de dos o más organizaciones, sustancias u otros agentes para producir un efecto combinado mayor que la suma de sus efectos por separado". Esto proporciona a los animales que poseen venenos una toxicidad mejorada sinérgicamente con una ventaja metabólica, ya que se necesita menos veneno para infligir potentes efectos tóxicos en presas y depredadores.

La adaptación al ambiente y a sus diferentes presas hizo que este tipo de reptil produzca venenos con moléculas cada vez más bioactivas, que si bien de manera aislada su mecanismo de acción es suficiente para ejercer daños colaterales; muy probablemente estas funciones digestivas y de defensa vengan dadas por mecanismos sinérgicos entre moléculas ofídicas.

## 1.6.1. Sinergismo vs efecto auxiliar

La diferenciación entre términos es importante puesto que, por un lado, si nos referimos a efectos auxiliares, estos son los efectos de los componentes del veneno que no contribuyen directamente a la toxicidad del mismo, sino que tienen otras funciones para apoyar la toxicidad, como modificar la administración, la vida media y la distribución del veneno; esto difiriendo de los efectos sinérgicos que contribuyen directamente al aumento de la toxicidad, y los componentes del veneno que actúan sinérgicamente suelen tener un efecto tóxico en los mismos objetivos o vías fisiológicas o relacionados, o interactúan con una toxina clave y la potencian. Un ejemplo clave de efecto auxiliar es la presencia de adenosina en el veneno de serpiente, donde sus efectos vasodilatadores pueden aumentar la perfusión sanguínea en el sitio del envenenamiento conduciendo a una mayor tasa de distribución del veneno sistémico en la víctima, pero no necesariamente a un aumento de la toxicidad del veneno. También, las hialuronidasas en los venenos de serpiente pueden tener principalmente una función de apoyo al aumentar la tasa de distribución de los componentes del veneno a través de la degradación del ácido hialurónico en la matriz extracelular (Laustsen, 2016).

Por lo tanto, se puede decir que la diferencia entre la sinergia de toxinas y los efectos auxiliares podría verse como la diferencia entre potenciar y facilitar los efectos tóxicos en una víctima envenenada.

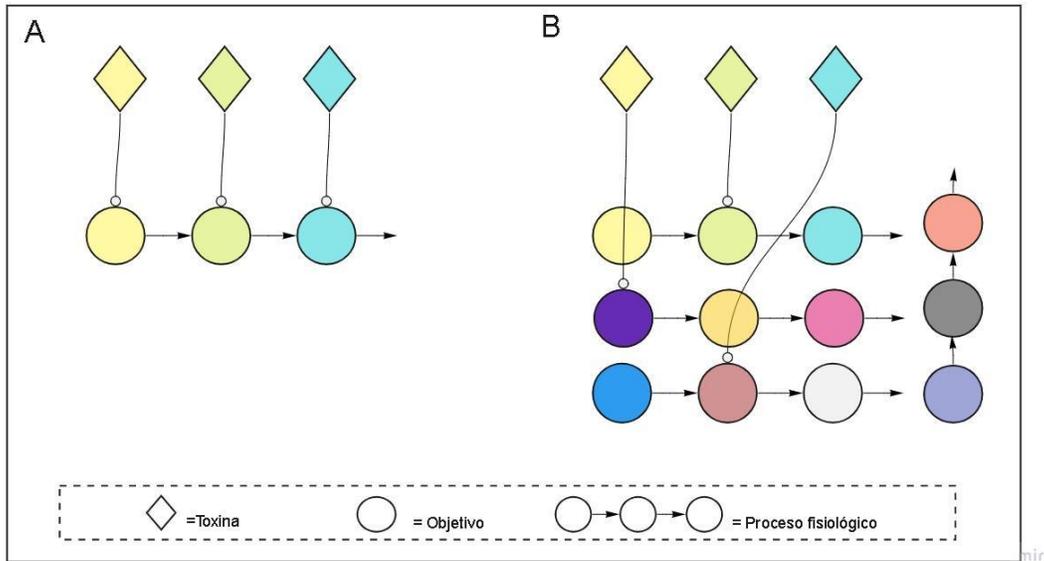
## 1.6.2. Tipos de sinergismo que ocurren en los venenos

Desde el punto de vista molecular, el sinergismo puede existir en dos formas generales:

- Sinergismo intermolecular, cuando dos o más toxinas interactúan con dos o más objetivos en una o más vías biológicas relacionadas, provocando un aumento sinérgico de la toxicidad.
- Sinergismo supramolecular, cuando dos o más toxinas interactúan con el mismo objetivo de manera sinérgica o cuando dos o más toxinas se asocian y crean un complejo con mayor toxicidad.

## 1.6.2.1. Sinergismo Intermolecular

El sinergismo intermolecular a su vez puede existir en dos formas, donde las toxinas pueden actuar sobre diferentes objetivos de un mismo proceso fisiológico causando un efecto sinérgico combinado (Figura 4A) o en diferentes procesos fisiológicos, que posteriormente afectan otro proceso más adelante de una manera mejorada sinérgicamente (Figura 4B).



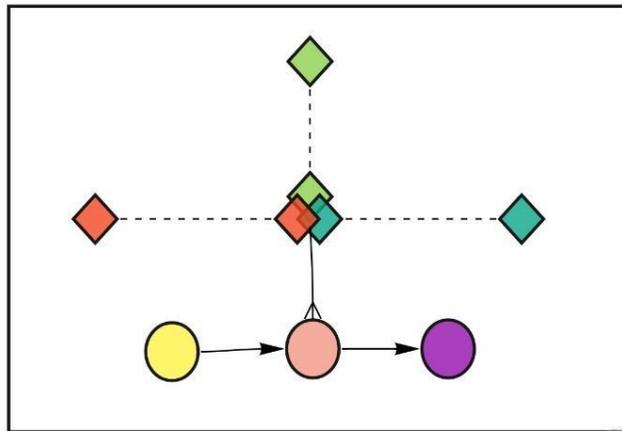
**Figura 4.** Representación esquemática del sinergismo intermolecular: A: Cuando las toxinas se dirigen a diferentes objetivos en la misma vía fisiológica, esto puede crear un efecto sinérgico debido a la amplificación. B: Cuando las toxinas se dirigen a diferentes vías, todas las cuales regulan o interactúan con otra vía fisiológica, esto puede crear un efecto sinérgico por amplificación Tomado de: (Laustsen, 2016).

En el primer caso tenemos como ejemplo al sinergismo que ocurre en el veneno de la mamba negra (*Dendroaspis polylepis*), cuya relación viene siendo expuesta por las dendrotoxinas que ejercen un efecto excitatorio sobre el sistema neuromuscular, combinado con una rápida anulación de la función neuromuscular por alfa-neurotoxinas. Conjuntamente, estas toxinas ocasionan un potente efecto sinérgico tóxico que desencadena parálisis flácida e insuficiencia respiratoria en víctimas y presas. Cabe recalcar que, dicha relación puede culminar cuando las toxinas van dirigidas al mismo receptor, en este caso en lugar de provocar una acción sinérgica, las toxinas compiten entre sí por el objetivo, provocando efectos aditivos, pero no sinérgicos como ocurre con las alfa-neurotoxinas del veneno de *Naja kaouthia* (Laustsen, 2016).

Por otro lado, un ejemplo de sinergismo que surge a través de un efecto combinado de toxinas que se dirigen a diferentes vías, es la relación de las acciones de las L-aminoácidos oxidasas combinadas con las acciones de otros componentes del veneno de *Daboia russelii* causando hemorragias prolongadas y aumentadas en casos de envenenamiento por esta especie de víbora (Chen et al., 2012).

## 1.6.2.2. Sinergismo Supramolecular

En este tipo de sinergismo, las toxinas forman complejos a través de un mecanismo en el que varios componentes del veneno se combinan para crear una toxina sobrepotenciada dirigida a un objetivo, representada en la Figura 5. Según Lausten, 2016 detalla que un ejemplo de dicha estrategia sinérgica es la presencia de citotoxinas de diferentes especies de cobra, donde se ha demostrado que tales toxinas mejoran la actividad PLA2 a través de la formación de complejos y la deformación de las membranas celulares, lo que provoca la lisis celular debido a la hidrólisis de los fosfolípidos. A nivel enzimático, la neurotoxina presináptica textilotoxina, muestra un sinergismo supramolecular a través de la oligomerización. La textilotoxina es ensamblada por cinco subunidades de PLA2 homólogos, por lo que la toxicidad de la subunidad A es hiperpotenciada.



**Figura 5:** Representación esquemática del sinergismo supramolecular: Cuando las toxinas se combinan para formar una toxina oligomérica que tiene una toxicidad superior a las toxicidades combinadas de los componentes individuales, se produce sinergismo. Tomado de: (Laustsen, 2016).

Por otra parte, se ha caracterizado este tipo de sinergismo en las dos toxinas de tres dedos, hemextina A y hemextina B, de la cobra *Ringhals africana*, estas dos toxinas se combinan con el fin de formar un complejo AB hemextina que inhibe el complejo FT. VIIa formado entre el factor tisular recién expuesto y el factor VIIa, anulando así sinérgicamente la formación de coágulos de sangre (Laustsen, 2016).

### **1.6.3. Determinación de la presencia de sinergismo**

La presencia de sinergismo entre las toxinas del veneno generalmente se evalúa determinando si la administración concomitante de diferentes componentes de veneno crudo, aumentan significativamente la potencia letal, o los efectos patológicos de las toxinas individuales *in vitro* o *in vivo*. Siendo pocos los métodos estandarizados, el uso de tecnologías proteómicas y transcriptómicas ha permitido una determinación general de la presencia de sinergismo en venenos de serpientes mediante el índice de toxicidad y la administración del componente del veneno (Rodríguez Acosta, 2021).

#### **1.6.3.1. Coadministración del componente del veneno**

En este tipo estudio, se coadministra una dosis constante (subletal) de un solo componente del veneno, mientras se determina la LD50 de otro componente del veneno. Si la LD50 del segundo componente se reduce significativamente por la presencia de la dosis subletal del primer componente, puede haber sinergismo. Cabe resaltar que una de las ventajas de los estudios de coadministración es sacar a flote las interacciones sinérgicas directas entre los componentes seleccionados. Sin embargo, el inconveniente de tales estudios es que requieren una experimentación laboriosa y optimización para producir resultados útiles. Así mismo, existen disputas éticas sobre este tipo de experimentación, puesto que en estudios *in vivo*, no se puede tener suficientes datos relevantes si no es con un gran número de individuos (animales), lo que implicaría un mayor número de sacrificios (Laustsen, 2016).

#### **1.6.3.2. Puntuación o índice de toxicidad acumulada**

Los puntajes de toxicidad de los componentes del veneno se pueden usar para ordenar las toxinas según su importancia en caso de un envenenamiento. Esta estrategia puede ser útil para determinar qué toxinas son esenciales para neutralizar con antivenenos y cuáles no. Además de su utilidad desde el punto de vista médico en un accidente ofídico,

recientemente el uso de tecnologías proteómicas y transcriptómicas ha permitido una determinación general de la presencia de sinergismo entre venenos de serpientes mediante el índice de toxicidad acumulada, siendo este un método cuantitativo (Laustsen, 2016; Rodríguez Acosta, 2021).

Según Laustsen et al menciona que “La puntuación de toxicidad de una toxina determinada se calcula dividiendo la abundancia relativa (en porcentaje) en el veneno del que se deriva la toxina para su valor DL50”. Si el índice de toxicidad de todo el veneno es significativamente mayor que la suma de las puntuaciones de toxicidad de las fracciones individuales, indica presencia de sinergismo. En estos casos es importante realizar análisis más a fondo de los efectos sinérgicos evaluando las toxicidades de pares de toxinas para identificar moléculas con un bajo índice, pero que ejercen de igual forma efectos sinérgicos (Laustsen, Lohse, et al., 2015).

### 1.6.3.3. Índice de combinación

Otro método poco utilizado es el índice de combinación de drogas, tal que al aplicarse en la toxicología lleva el nombre de índice de combinación de toxinas (CTI) el cual responde a la siguiente ecuación:

$$CTI: \frac{(E)_{1,2}}{E_1 \times E_2}$$

En donde:

E<sub>1,2</sub>: es el efecto medido del efecto de combinación

E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub>: son los efectos individuales de cada toxina

Por lo tanto, los valores de CTI de <1, =1 o >1 indican que las interacciones toxina-toxina son sinérgicas, aditivas o antagónicas, respectivamente (Pucca et al., 2020).

## CAPÍTULO II

### METODOLOGÍA

#### 2.1. Tipo de estudio

El presente estudio aborda, mediante una revisión bibliográfica de artículos originales y completos en bases digitales entre los años 2010 hasta 2022, el conocimiento generado acerca del sinergismo de las principales enzimas presentes en venenos de serpientes de las familias *Elapidae* y *Viperidae*.

#### 2.2. Criterios de selección.

##### 2.2.1. Criterios de inclusión

Para el desarrollo de esta revisión bibliográfica se aplicaron los siguientes criterios de inclusión:

- Documentos originales y completos.
- Los artículos publicados en idiomas inglés, español y portugués
- Artículos de corte experimental, revisiones y tesis de maestría cuya fecha de publicación está en el rango temporal desde 2010 hasta 2022.
- Fuentes terciarias de venómica, como libros con fecha de publicación en el mismo rango de los artículos, revisiones y tesis.

##### 2.2.2. Criterios de exclusión

- Se excluyen de esta revisión de literatura los documentos incompletos o a manera de resumen relacionados con el tema de interés.
- Artículos sin registro DOI.
- Los documentos o artículos provenientes de fuentes no verificables.

## 2.3. Procedimiento de recolección de información

Los artículos científicos se recuperaron de bases digitales mediante el uso de palabras clave como: venenos, venenos de serpiente, toxinas, sinergismo y sinergismo enzimático. Para el efecto se emplearon operadores booleanos AND y OR. Se analizaron el título del texto y resumen tomando en cuenta su afinidad con el tema y los objetivos del estudio. Los documentos fueron clasificados y almacenados en carpetas accesibles para los autores y tutora mediante la aplicación de documentos Drive con una nomenclatura específica, la misma que consta del apellido del autor seguido del nombre, fecha de publicación y título de la publicación. Adicionalmente, se almacenaron las referencias con la ayuda del gestor bibliográfico Zotero.

Los artículos que cumplieron los criterios de inclusión fueron analizados exhaustivamente. Posteriormente se diseñó una base de datos, en el programa Excel®, donde se sintetizó la información en función a los siguientes indicadores: enzimas ofídicas, caracterización bioquímica y molecular de cada enzima, efectos fisiopatológicos, mecanismo sinérgico y sinergismo enzimático encontrado.

La información recopilada mediante este procedimiento fue incluida en la presente revisión de literatura en forma narrativa y con la elaboración de tablas e infografías que permiten la mejor comprensión de los resultados de este trabajo.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS

#### 3.1. Fuentes bibliográficas seleccionadas para evaluar el sinergismo de enzimas en venenos ofídicos.

Se identificaron 253 estudios a través de las bases de datos electrónicas, de los cuales 14 artículos reportaron sobre el sinergismo entre enzimas en venenos de serpientes. El proceso de selección de fuentes bibliográficas se esquematiza en la Figura 6. Se presentan los resultados obtenidos en las principales bases digitales científicas: Science Direct, PubMed, Scopus, SciELO, SpringerLink.

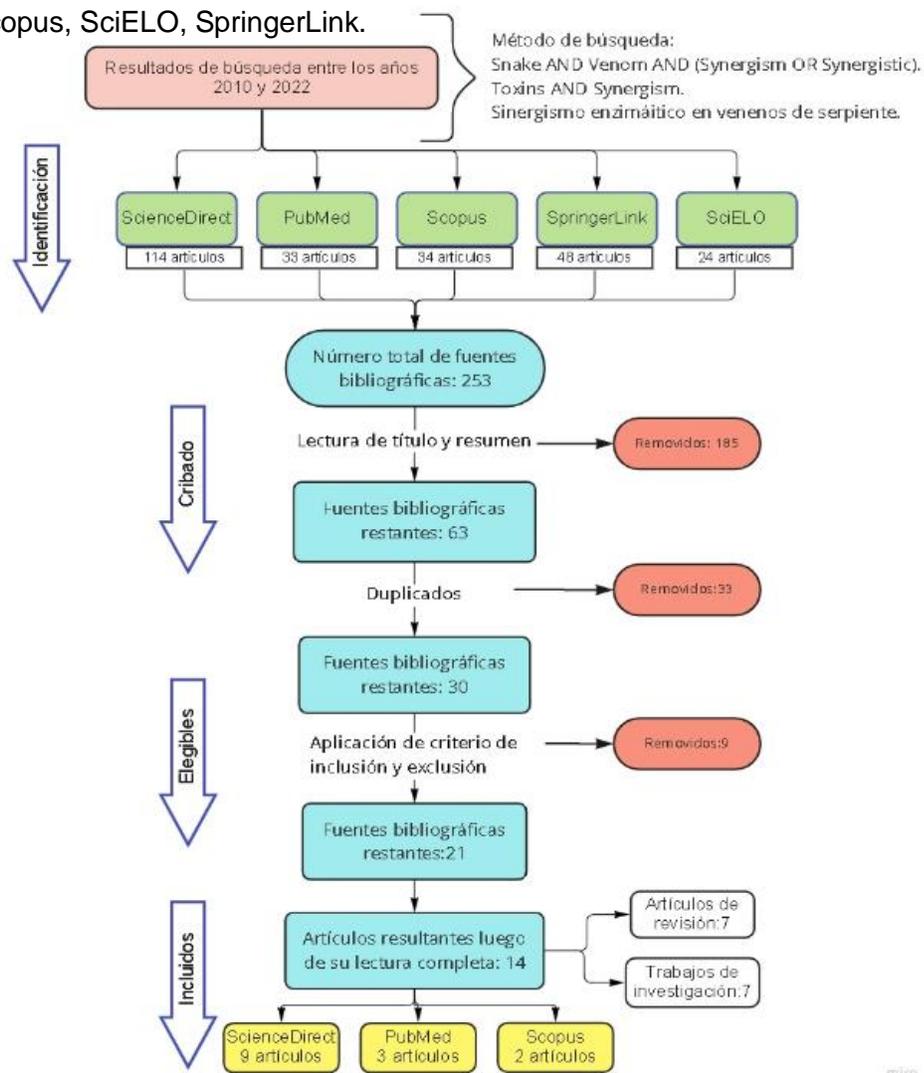
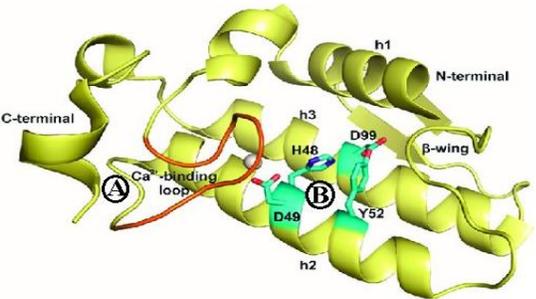


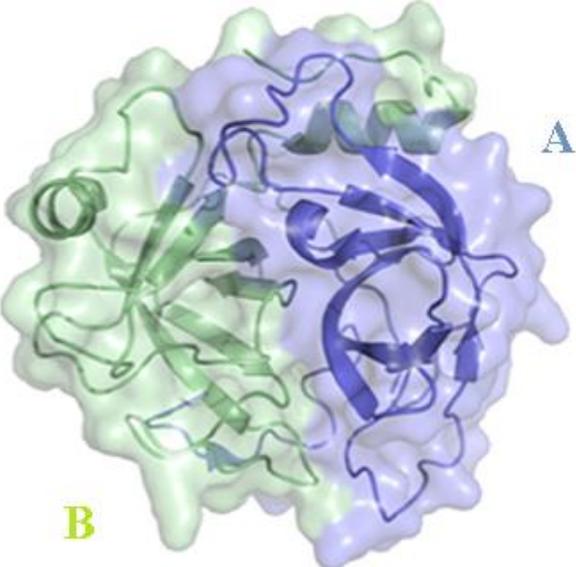
Figura 6: Diagrama de selección de artículos.

Adicionalmente, se realizaron búsquedas bibliográficas con el fin de encontrar información reciente sobre el mecanismo de acción, efectos fisiopatológicos y estructura tridimensional de las enzimas incluidas en este estudio. En total se recolectaron 17 artículos.

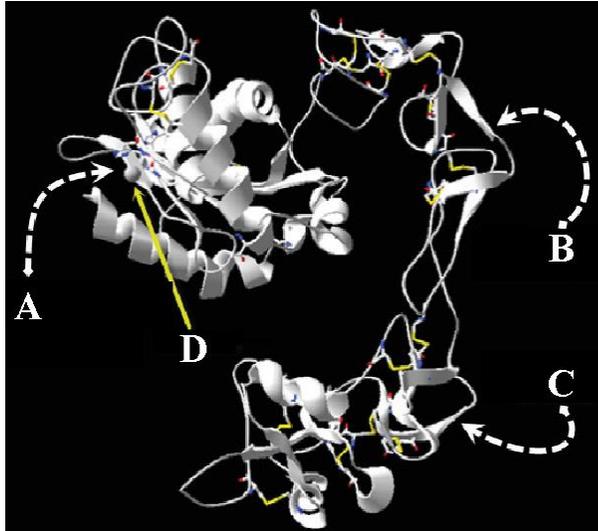
### 3.2. Caracterización bioquímica y fisiopatológica de las principales enzimas tóxicas involucradas en sinergismo en venenos ofídicos

En la siguiente tabla se describen las principales enzimas que se encuentran en los venenos de serpientes. La descripción incluye un resumen detallado sobre: estructura tridimensional, mecanismo de acción y efectos fisiopatológicos.

FOSFOLIPASA A2 (svPLA2)	
	<p><b>Mecanismo de acción:</b></p> <p>Tiene una actividad calcio dependiente. Su unión en residuos Asp 47 e His 48 cataliza la ruptura de puentes de hidrógeno de la Sn-2 del éster glicerofosfolípido obteniendo ácidos grasos libres y lisofosfolípidos, especialmente poliinsaturados como el ácido araquidónico.</p>
<p><i>Estructura tridimensional. A) Sitio unión Ca<sup>++</sup></i>  <i>B) Sitio activo (Zambelli et al., 2017).</i></p>	<p><b>Efecto fisiopatológico:</b></p>
<p>EC 3.1.1.4. De naturaleza lipolítica, termoestable, con peso molecular de 13-15 kDa. Sitio activo entre segmentos H2 y H, se ubican aminoácidos His 48, Asp 49, Tyr 52 y Asp 99.</p> <p>La carga negativa de Asp 49 mejora unión a Ca<sup>++</sup>, contribuye a la hidrofobicidad y actividad catalítica mientras que Lys 49 tiene carga positiva, provocando acciones opuestas.</p>	<p>Tiene efectos neurotóxicos; presináptica y postsináptica debido a la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana terminal nerviosa mientras que la segunda actúa sobre el músculo.</p> <p>Provoca inflamación, como consecuencia de actuar sobre la biosíntesis de lípidos, edema, necrosis y daño de membrana celular. Los lisofosfolípidos liberados como resultado de la actividad catalítica actúan como surfactantes y lisan los eritrocitos provocando hemólisis.</p> <p>La alteración de la membrana da como resultado el intercambio desenfrenado de iones Ca<sup>++</sup> del medio extracelular generando aumento de la concentración citosólica e hipercontracción con efectos cardiotoxicos, convulsivantes. Inhiben la coagulación al hidrolizar fosfolípidos procoagulantes.</p>
<p><b>Referencias:</b> (Akef, 2017; Cañas et al., 2016; Castro et al., 2020; Cedro et al., 2018; Harris &amp; Scott-Davey, 2013; Simoes Silva et al., 2018; Xiong &amp; Huang, 2018)</p>	

SERINPROTEINASA (svSP)	
	<p><b>Mecanismo de acción:</b></p> <p>Las svSP catalizan la escisión del péptido covalente en el C-terminal de los residuos de aminoácidos cargados positivamente. Son similares a la trombina; convierte el fibrinógeno en fibrina, liberando fibrinopéptidos A y B de las cadenas AK y BL del fibrinógeno.</p> <p>Estimulan la coagulación a través de la activación de factores de coagulación como V, VIII y XIII, quizás intervengan factores como VII y XI. Además, tiene acción sobre la fibrinólisis debido a que la estimula y activa la agregación plaquetaria. Estas enzimas no solamente son similares a la trombina, sino que también se asemejan a las calicreínas ya que son el segundo grupo que libera bradiquinina.</p>
	<p><b>Efecto fisiopatológico:</b></p> <p>Causan cambios en el sistema hemostático, participando en la coagulación sanguínea, agregación plaquetaria, fibrinólisis, sistema del complemento y sistema inmunitario. Ejecutan su toxicidad principal al alterar el sistema hemostático de sus víctimas, inducir edema e hiperalgesia a través de mecanismos aún poco conocidos.</p>
	<p><b>Referencias:</b> ( Ferraz et al., 2019; Nanjaraj et al., 2013; Xiong &amp; Huang, 2018)</p>
<p><i>Estructura tridimensional. A) Dominio N- y B) Dominio C-terminal (Ferraz et al., 2019).</i></p> <p>Pertenece a la familia S1 serin proteínasa con masa molecular 26-67 kDa. Tienen una cola C-terminal extendida, que forma un puente disulfuro que le confiere gran estabilidad estructural. El residuo catalíticamente importante Asp 102 se encuentra en el dominio N-terminal</p>	

## METALOPROTEASA (svMP)



*Estructura tridimensional P-III. A) Dominio Metaloproteinasas B) Dominio desintegrina C) Dominio rico en cisteína D) Unión ión zinc (Florea et al., 2016).*

Posee naturaleza glicoproteica y son enzimas dependientes de zinc, con peso molecular heterogéneo 18-70kDa. Se divide en varios dominios en función del tamaño y número de componentes.

**SVMP P-I (20-30 kDa):** Son los más simples y contienen sólo un dominio de metaloproteinasas (M)

**SVMP P-II (30-50 kDa):** Lo componen un dominio M conjuntamente con un dominio de desintegrina (D)

**SVMP P-III (50-80 kDa):** compuesto de dominios M y D más un dominio rico en cisteína (C).

### Mecanismo de acción:

Catalizan proteínas y péptidos tisulares en aminoácidos, generando una actividad hemorrágica. Resultado de la alteración combinada de la integridad de los vasos capilares y el deterioro del sistema de coagulación de la sangre, provoca el consumo de factores plasmáticos de coagulación. Se dirige a diferentes objetivos como la activación del factor X de coagulación, la activación del factor II, la actividad fibrino(gen)olítica. Provocan lesiones en endotelio y membrana basal. En la primera disminuye el número de vesículas pinocíticas, se distienden y adelgazan y, eventualmente, se rompen. En la segunda hay la pérdida de lámina, nidogen y colágeno tipo IV.

### Efecto fisiopatológico:

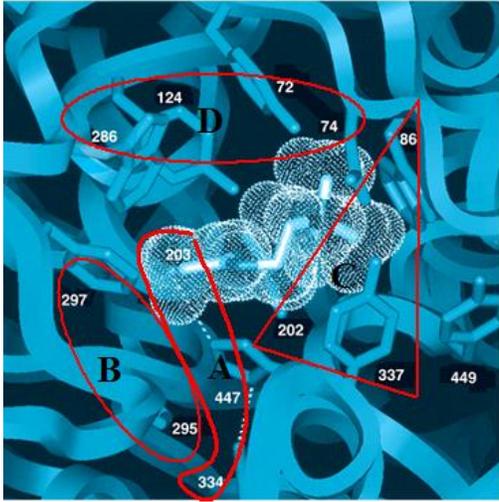
Actúa a nivel del sistema hemostático; a nivel local y sistémico. Hidroliza componentes claves de la cascada de coagulación, plaquetas, sistemas fibrinolíticos y calicreína-cinina dando como resultado efecto biológicos como procoagulación, anticoagulación, agregación plaquetaria, consumo de fibrinógeno y liberación de cinina

Hay daño vascular con modificación de las paredes, alteración endotelial y de la membrana basal, producto de lo anterior hay extravasación de líquidos (inducción de edema) y ampollas hemorrágicas. A consecuencia de todos estos procesos isquémicos hay daños tisulares.

Adicional, un efecto nocivo es la inducción de necrosis muscular, probablemente como consecuencia de la isquemia resultante de la obstrucción microvascular.

**Referencias:** (Cañas et al., 2016; Castro et al., 2020; Markland & Swenson, 2013; Moura-da-Silva et al., 2016);

## ACETILCOLINESTERASA (AChE)



*Estructura tridimensional. A) Triada catalítica B) Saco de acilo C) subsitio de colina D) Sitio periférico (Brunton et al., 2017).*

EC 3.1.1.7. La enzima se encuentra tanto en ubicación sináptica como no sináptica. Hay dos dominios de unión en el sitio activo: un sitio iónico y un esteárico, el primero contiene residuo de glutamato mientras que el segundo residuo de serina e histidina.

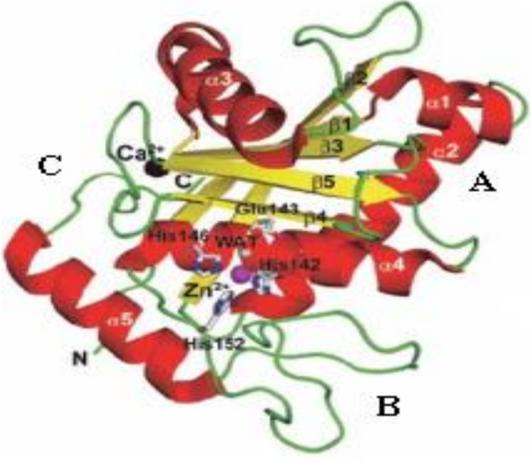
### Mecanismo de acción:

Para el caso de los venenos de serpientes hablamos en contexto no sináptico. El residuo de serina actúa como nucleófilo y la histidina actúa como catalizador ácido/base. La hidrólisis de ACh provoca agotamiento de acetilcolina en las sinapsis nerviosas afectando al músculo negativamente

### Efecto fisiopatológico:

Si bien no se conoce en concreto su papel fisiológico no es tóxico por sí mismo y no aumenta la toxicidad de los componentes farmacológicamente activos del veneno, sin embargo, podría ser un vestigio del origen pancreático de la glándula venenosa. Facilita la captura de la presa con el agotamiento de acetilcolina.

**Referencias:** (Ahmed et al., 2012; Bourne et al., 2015; Mackessy, 2010)

L_ AMINOÁCIDO OXIDASA (LAAO)	
	<p><b>Mecanismo de acción:</b></p> <p>El FAD reacciona con los L-aminoácidos y los oxida de aminoácidos a iminoácidos para posteriormente hidrolizar a alfa cetoácidos y amoniaco. Por lo tanto, cataliza la desaminación oxidativa para obtener como producto final amoniaco. Ocurre otra semi reacción para generar el FADH<sub>2</sub> y prolongar el ciclo oxidando el FADH<sub>2</sub> a FAD, obteniendo como resultado peróxido de hidrógeno.</p>
	<p><b>Efecto fisiopatológico:</b></p> <p>Oxida varias proteínas en la membrana plasmática, generando edema, aumentando la permeabilidad vascular con inducción de inflamación y liberación de marcadores de inflamación. Daño al endotelio vascular con aparición de hemorragia, agregación plaquetaria debido a la interferencia con los receptores (GPIIb/IIIa) de las plaquetas y fibrinógeno provocado por peróxido de hidrógeno, hemorragia y efecto pro-apoptótico por lo que en la literatura se los estudia como antineoplásico</p>
<p><i>Estructura general de L-AAO. A) Dominio de unión FAD B) Dominio Helicoidal C) Dominio unión al sustrato (T. Kang et al., 2011).</i></p>	
<p>EC 1.4.3.2. Naturaleza glicoproteica/flavoproteica, con peso molecular 120 – 150 kDa. En su forma activa dimérica contiene FAD. Contiene tres dominios distintos, un dominio de unión a FAD, un dominio de unión a sustrato estabilizado con puente disulfuro y un dominio helicoidal.</p>	
<p><b>Referencias:</b> (Abdullahi et al., 2021; Cañas et al., 2016; Rodríguez Acosta, 2021; Ullah, 2020)</p>	

### 3.3. Sinergismo enzimático en venenos de serpiente.

En 1976, Daniel Strydom demostró que cuando se purifican fracciones de algunos venenos y se inyectan separadamente, éstos no son fatales para los animales experimentales. No obstante, a la misma concentración de veneno crudo entero los animales murieron en pocos minutos. Esto sugiere que las diferentes fracciones actuaron sinérgicamente potenciando su efecto tóxico (Laustsen, 2016; Rodríguez Acosta, 2021).

Desde este importante hallazgo, se realizaron diferentes estudios con la finalidad de demostrar la presencia de sinergismo en los venenos ofídicos. Conjuntamente, se han propuesto estrategias sinérgicas donde especulan los posibles mecanismos de potencialización entre las distintas toxinas que componen el veneno de serpiente.

Los principales métodos para evaluar sinergismo en venenos son la puntuación de toxicidad y la coadministración de los componentes del veneno, los cuales fueron descritos en el apartado 1.6.3 Para evaluar el sinergismo del veneno ofídico mediante el índice de toxicidad, es fundamental comparar la toxicidad del veneno crudo con la toxicidad de sus fracciones. En la tabla 4 se observan diferentes estudios realizados por Laustsen et al & Lauridsen et al, en donde demuestran la presencia de sinergismo mediante el método cuantitativo.

**Tabla 4.** Ejemplos representativos para la evaluación del sinergismo de toxinas utilizando el índice de toxicidad (Laustsen, 2016; Laustsen, Lohse, et al., 2015; Xiong & Huang, 2018).

Especies ofídicas	Porcentajes de enzimas tóxicas aisladas	Puntaje de toxicidad del veneno crudo (TVC)	Puntajes de toxicidad acumulada (TA)	Evaluación de sinergismo (+/-)	Referencia
<i>Dendroaspis polylepis</i>	svPL A2:<0.1% svMP: 3.2%	147.1	127.8	TVC > TA (+)	(Laustsen, Lomonte, et al., 2015)
<i>Naja Kaouthia</i>	svPLA2: 13.5% svMP:2.4% LAAO: 0.4%	423.2	418.62	TVC> TA (+)	(Laustsen, Gutiérrez, Lohse, et al., 2015)

<i>Aipysurus laevis</i>	svPLA2:71.2%	676	357	TVC> TA (+)	(Laustsen, Gutiérrez, Rasmussen, et al., 2015)
<i>Dendroaspis angusticeps</i>	svMP: 6.7%	117.6	62.6	TVC> TA (+)	(Lauridsen et al., 2016)

Si bien el método solo detecta la presencia de sinergismo, esta estrategia se considera como el primer paso para indagar entre qué fracciones del veneno ocurre la potenciación que genera el sinergismo.

### 3.3.1. Complejos sinérgicos

Las fracciones tóxicas interactúan entre sí directamente o conducen indirectamente a una potencia toxicológica y/o farmacológica mejorada de los venenos. La mayoría de los sinergismos de toxinas se han identificado cuando las familias de proteína predominantes (PLA2, svMP y svSP) se administraron conjuntamente. Además de estas acciones sinérgicas complejas, la interacción entre las proteínas de veneno de serpiente (principalmente complejos PLA2) también contribuye significativamente hacia el incremento de la potencia de los componentes individuales del complejo (Rodríguez Acosta, 2021).

#### 3.3.1.1. Complejos de fosfolipasa A2

La subunidad individual (PLA2) existe como monómero en el veneno, exhibiendo actividades fisiopatológicas por sí misma. Pese a esto, la subunidad contribuye significativamente a la estructura integrada y a la función elevada de los complejos tóxicos del veneno, ya sea de forma covalente o no covalente.

La importancia de este tipo de complejos radica principalmente en su potente acción neurotóxica presináptica.

**Tabla 5.** Complejos sinérgicos de Fosfolipasa A2 (Abdullahi et al., 2021; Rodríguez Acosta, 2021; Xiong & Huang, 2018).

Nombre de complejo	Especie	Tipo de complejo	Característica de las subunidades	Efecto de la acción sinérgica	Mecanismo sinérgico
Crotoxina	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	No covalente	Heterodímero: A, ácido inactivo no tóxico similar a PLA2 (crotopotina); B, básico activo PLA2 tóxico	Potenciación de neurotoxicidad	La subunidad 'A' actúa como chaperona para potenciar la unión específica
Textilotoxina	<i>Pseudonaja textilis</i>	No covalente	Pentámero; A, PLA2 básico más tóxico; B, similar a PLA2 no tóxico; C, PLA2 poco activo y tóxico; D, dos PLA2 covalentes, poco activos y tóxicos	Máxima neurotoxicidad después de todas las subunidades reformadas.	No descrito
Toxina Mojave	<i>Crotalus s. scutulatus</i>	No covalente	Heterodímero con un componente ácido inactivo (PLA2) no tóxico, unido a un elemento tóxico básico activo (PLA2)	Aumento de neurotoxicidad y miotoxicidad sistémica	El componente ácido actúa como chaperón del elemento básico
Proteína Cb	<i>Pseudocerastes fieldi</i>	No covalente	Heterodímero: A, PLA2 ácido activo no tóxico; B, PLA2 básica activa de baja toxicidad	Aumentan 4 veces más la acción neurotóxica	La fracción básica actúa como acompañante, aumentando la unión específica
Taipoxina	<i>Oxyuranus scutellatus</i> s.	No covalente	Trímero; $\alpha$ : PLA2 básica más tóxica; $\beta$ : similar a PLA2 no tóxico; $\gamma$ : PLA2 de baja toxicidad;	Después de unidas todas las subunidades hay una máxima neurotoxicidad	La subunidad $\gamma$ actúa como chaperona para potenciar la toxicidad de la subunidad $\alpha$

PLA2-I	<i>Vipera aspis zinnikeri</i>	No descrito	Heterodímero: A, PLA2 ácido inactivo no tóxico; B, similar a PLA2 tóxico activo básico	Potenciación de neurotoxicidad	de	La subunidad inactiva actúa como acompañante
Vipera toxina	<i>Vipera palestinae</i>	No covalente	Heterodímero: A, PLA2 ácido no tóxico; B, similar a PLA2 no tóxico básico	Aparición de neurotoxicidad y letalidad.	de y	No descrito
B-bungarotoxina	<i>Bungarus multicinctus</i>	Covalente	Heterodímero: A, PLA2 tóxica activa; B, péptido similar a BPTI	Potenciación de neurotoxicidad.	de	El péptido similar a BPTI al unirse a los canales de K <sup>+</sup> ayuda a la PLA2 a unirse al sitio presináptico
Viperotoxina F	<i>Vipera russelli formosensis</i>	No covalente	Heterodímero: A, PLA2 no tóxico de baja actividad ácida; B, PLA2 tóxica activa básica	Potenciación de neurotoxicidad y letalidad	de y	La fracción ácida actúa como inhibidor y acompañante

### 3.3.1.2. Complejos de Metaloproteasas

La formación de este tipo de complejos únicamente se le atribuye a cierto tipo de svMP. Las svMP P-III<sub>d</sub> tienen una subunidad adicional que interactúa a través de interacciones covalentes o no covalentes. Lo que fácilmente las hace formadoras de complejos.

**Tabla 6.** Complejos sinérgicos de las Metaloproteasas (Rodríguez Acosta, 2021; Xiong & Huang, 2018).

Nombre de complejo	Especie	Características bioquímicas	Mecanismo individual	Mecanismo sinérgico
RVV-X	<i>Daboia russelii</i>	Presenta subunidades compuestas por dos dominios tipo lectina tipo C unidos a la cadena de proteinasa principal por enlaces disulfuro.	Activador del factor X	La actividad inductora de edema de RVV-X aumenta notablemente en presencia de dosis no inductoras de edema de TI-I y TI-II.
TI-I y TI-II		No descrito	Inhibidores de tripsina	

### 3.3.2. Evidencia científica del sinergismo entre enzimas

El sinergismo entre enzimas de venenos ofídicos ha sido estudiado diseñando diferentes ensayos. A continuación, se presenta información sobre la metodología y resultados obtenidos en estudios experimentales enfocados a la evaluación del sinergismo enzimático, los cuales evaluaron efectos de citotoxicidad, hemotoxicidad y miotoxicidad en especies ofídicas de la familia *Viperidae*.

Tabla 7. Evidencia experimental del sinergismo entre las principales enzimas ofídicas.

No.	Tipo de estudio	Familia/Especie	Efecto evaluado	Metodología		Resultados		Referencia
				Fracciones de veneno analizadas	Ensayo	Bioactividad de toxinas	Sinergismo en toxinas combinadas	
1	Experimental in vitro	<i>Viperidae/Bothrops alternatus</i>	Citotoxicidad	Baltergin (svMP PIII) Ba SPII RP4 (PLA2 ácida)	Viabilidad celular en mioblastos C2C12 de músculo esquelético murino	PLA2: negativo  svMP: reducción 40% en viabilidad celular	Reducción de viabilidad celular en 97,5%. En ensayos de neutralización de la actividad citotóxica por IgG anti baltergin e IgG anti-PLA2. La inhibición de la citotoxicidad inducida por ambos anticuerpos específicos confirma la relación sinérgica.	(Bustillo et al., 2012)
2	Experimental In vivo	<i>Viperidae/Bothrops atrox</i>	Actividad hemorrágica	Fosfolipasa A2 ácida (BatroxPLA2)  Metaloproteasa P-I (Batroxasa)	Ausencia o presencia de halos hemorrágicos luego de inyección intradérmica en ratones BALB/c macho	Diámetro del halo hemorrágico a dosis mínima de: PLA2: 20,0 mm svMP: 10,0 mm	A dosis mínimas combinadas de cada enzima, no se encontraron cambios significativos que demuestren una actividad sinérgica. Diámetro del halo en combinación PLA2-svMP: 20,5 mm	(Menaldo et al., 2015)

3	Experimental In vitro	<i>Viperidae/Bothrops asper</i>	Citotoxicidad	Fosfolipasas básicas Miotoxina I (Asp 49) Miotoxina II (Lys 49)	Liberación de LDH en Línea celular C2C12 en las etapas de mioblasto o miotubo	Porcentaje de citólisis en: Mioblastos I: <10% Miotoxina II: <20% Miotubos I: <50% Miotoxina II: <60%	Aumento de porcentaje de citólisis en ambas etapas de diferenciación celular. Mioblastos: >60% Miotubos >80% En el ensayo de inactivación catalítica de Asp 49 se confirmó el sinergismo con su homóloga Lys 49 al superar el 80% de citólisis. Se reveló la direccionalidad del efecto sinérgico, mediante combinaciones de cantidades fijas de Lys 49 y cantidades bajas de Asp 49.	(Mora Obando et al., 2014)
	Experimental In vivo		Mitotoxicidad					

4	Experimental In vitro	<i>Viperidae/Bothrops alternatus</i>	Citotoxicidad	Baltergin (svMP PIII) PLA2 ácida	Desprendimiento celular en línea celular endotelial murina (tEnd)	PLA2: negativo  svMP: Separación celular del 30%	Aumento de separación notablemente mayor (>70%) El grado de sinergia depende proporcionalmente de la concentración de PLA2 y probablemente sea independiente de su actividad catalítica. Ensayos de neutralización por anticuerpos específicos confirman el sinergismo.	(Bustillo et al., 2015)
5	Experimental in vitro	<i>Viperidae/Bothrops diporus</i>	Citotoxicidad	Fosfolipasas básicas  PLA2-I (Asp 49) PLA2-II (Lys 49)	Viabilidad celular, actividad antiadherente y migración celular en mioblastos C2C12 de músculo esquelético murino.	PLA2-I: Viabilidad Celular del 100%  PLA2-II: Reducción de la viabilidad celular en 60%.  Mayor actividad de la variante Lys 49 en ensayos adicionales	Disminución de la viabilidad celular menor al 40%.  Ensayos de actividad antiadherente y migración celular no analizados	(Bustillo et al., 2019)
	Experimental in vivo		Mitotoxicidad	Actividad de creatininas a en ratones CD-1	Mayor actividad para PLA2-II	Ensayo no especificado		

6	Experimental In vitro	<i>Viperidae/ Bothrops asper</i>	Actividad plasmodicida /sinergismo	Fosfolipasa A2 Fracciones BaspB II (Lys49-PLA2) BaspB IV (Asp49-PLA2)	Medición de la actividad antiplasmodia I entre BaspB- II y BaspB IV mediante la concentración mínima inhibitoria	Concentración mínima inhibitoria 50 en monoterapia: BaspB-II: 2,46 uM  BaspB IV: 0,019 uM	La IC50 de BaspB-II bajó de 2,46 uM a 0,98 uM; aumentando 2,5 veces. Para BaspB-IV su valor bajó de 0,019 uM a 0,0019 uM; aumentando 10 veces. Para los dos casos hay un aumento de la actividad antiplasmodial utilizando menor concentración cuando se combinaron.	(Simões Silva et al., 2021)
---	--------------------------	--------------------------------------	--	--	--	---	---	--------------------------------



**Sinergia entre PLA2 y svMP:** Los PLA2 y svMP miotóxicos inducen la liberación rápida de trifosfato de adenosina (ATP) de las células musculares dañadas y las células endoteliales, respectivamente. Posterior a esto, los ATP son hidrolizados por la nucleotidasa liberando así adenosina. La adenosina liberada como resultado de la sinergia desencadena la hipotensión y efectos anticoagulantes potenciados (Rodríguez Acosta., 2021).

**Sinergia entre LAAO y PLA2:** Gracias a su mecanismo de acción, las amino oxidasas pueden generar peróxido de hidrógeno(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) provocando fuertes efectos antiplaquetarios y potencialmente generar sinergia con los PLA2 antiplaquetarios en el mismo veneno. Por otro lado, su acción combinada puede llegar a complicarse en falla renal por los procesos hemolíticos producidos (Rodríguez Acosta., 2021; Xiong & Huang., 2018).

**Sinergia entre svMP y svSP:** Existen otras toxinas que actúan sinérgicamente afectando la coagulación sanguínea, como es en el caso de los activadores de protrombina del grupo B (metaloproteasas) y los activadores de protrombina del grupo C (serina proteinasas). Estos activadores de protrombina ejercen su función a través de la activación proteolítica de la protrombina para madurar la trombina, que puede combinarse con otras coagulopatías inducidas por toxinas que provocan una toxicidad potenciada sinérgicamente (Laustsen., 2016).

**Sinergia entre svSP y PLA 2:** Existe un efecto pseudo procoagulante impulsado por la actividad de la calicreína. Esta svSP actúa sinérgicamente con la svPLA2 inhibidora de la protrombinasa durante el envenenamiento humano, agotando el fibrinógeno disponible y potenciando aún más el efecto anticoagulante general del veneno (Youngman et al., 2022).

## CAPÍTULO IV

### DISCUSIÓN

#### 4.1. Composición de venenos de serpientes

La composición de los venenos de serpientes representa en un tema de gran interés dada su relevancia como fuente potencial de fármacos y el rol que cumple en los procesos fisiopatológicos que desencadenan los accidentes ofídicos. En la literatura revisada se enfatiza la complejidad de demostrar el sinergismo, y aún más, en evidenciar la vía empleada en este mecanismo potenciador de la toxicidad del veneno de serpientes. La razón principal puede atribuirse a que, dado que el veneno es un cóctel multiproteico, su conformación está dispuesta por múltiples moléculas tóxicas con mecanismos de acción específicos, que muchas de las veces se correlacionan entre sí.

A pesar del gran avance en la proteómica y la genómica, el hecho de que los venenos de serpiente son sistemas multicomponentes integrados no ha sido abordado a profundidad. Así mismo, es necesario profundizar la caracterización de los perfiles de toxicidad del veneno en la evaluación de los sinergismos potenciales que pueden existir entre sus diversos componentes. El objetivo de dicha relación sinérgica se fundamenta en que los venenos alcancen una eficiencia significativa consumiendo una dosis mínima. Es importante mencionar que no todas las especies tienen todas las enzimas propuestas, por lo que el proceso sinérgico requerido en la investigación no es fácil de encontrar.

Muchos estudios de investigación y aislamiento de toxinas se centran principalmente en las fracciones de mayor abundancia (svPLA2, svMP, svSP,3FTX) coincidiendo con lo que indica Rodríguez Acosta, 2021. Esto se debe a que los compuestos enzimáticos y no enzimáticos están presentes en todas las familias de serpientes. El autor Xiong Huang, 2018 establece que son estos últimos compuestos enzimáticos los que tienen capacidad de interactuar sinérgicamente con otras toxinas.

Oliveira et al., 2022 describieron las diferentes proporciones de toxinas en relación a la familia *Elapidae*. Para la familia *Elapidae*, un total del 51% del veneno pertenece a 3FTx, una toxina no enzimática, seguida de PLA2 con un 27%, notándose la baja concentración de metaloproteasas y serinoproteasas (menos del 10%). Por otra parte, las toxinas más abundantes en serpientes vipéridas son svMP y PLA2 con un 33% y 21% respectivamente.

Munawar et al., 2018 & Simoes Silva et al., 2018 establecen que la variación en la composición del veneno, es el resultado de la interacción de varios factores como la edad, el sexo, la genética, la alimentación y la ubicación geográfica del espécimen. Este es un factor a considerar al momento de plantear estrategias para caracterizar la composición de venenos de serpientes.

La composición de venenos de serpientes, que incluye componentes mayoritarios y minoritarios, implica métodos finos de cromatografía acoplados a estrategias sensibles de detección como la espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear. Esta caracterización permitirá entender el rol de compuestos minoritarios mediante estrategias de sinergia. Sin embargo, la existencia de una combinación de toxinas en estos venenos forja un desafío para el estudio del sinergismo y de otras interacciones entre ellas.

Enzimas como las acetilcolinesterasas, presentes en especies pertenecientes a la familia *Elapidae*, con la excepción de *Dendroaspis*, existen en cantidades significativas. Por otra parte, los venenos de las serpientes de las familias *Viperidae* y *Crotalidae* no cuentan con esta enzima en su composición (Kang et al., 2011). Aunque la acción de esta enzima en el veneno de serpiente no está completamente elucidada; Pereañez et al., 2014 describen su importancia en la fisiopatología, ya que la degradación de la acetilcolina podría ayudar potencialmente a la acción de algunas neurotoxinas, como es en el caso de la fosfolipasa A2. Sin embargo, estudios experimentales sobre esta posible acción de potencialización no han sido descritos llevados a cabo hasta nuestro mejor conocimiento.

## 4.2. Sinergismo enzimático en venenos de serpientes

Dentro de la toxicología, el sinergismo surge cuando un veneno muestra una toxicidad mucho mayor que la suma de las toxicidades de los componentes individuales del veneno, lo que posiblemente proporcione una ventaja evolutiva (Laustsen, 2016). Si bien en los venenos de serpientes existen fracciones cuya acción individual carece de bioactividad, su interacción con otra subunidad, activa y/o potencia su efecto toxicológico. Ciertas enzimas forman complejos covalentes o no covalentes con otras proteínas o subunidades de sí mismas para inducir a actividades fisiopatológicas más potentes. Laustsen., 2016 & Rodríguez Acosta., 2021 describen a la fosfolipasa A2 como núcleo integral de estos complejos sinérgicos, puesto que la subunidad individual contribuye

significativamente a la estructura integrada y a la función elevada de los complejos tóxicos del veneno; participando la mayoría de las veces como “chaperonas” o acompañantes entre fracciones. Por lo general estas relaciones sinérgicas concluyen en potentes mecanismos neurotóxicos y miotóxicos, cuya variación en el complejo, radica en la especie de serpiente que se está estudiando.

Existen algunos estudios que ejemplifican dicha potenciación sinérgica en base las subunidades integrales de la enzima PLA2. Es importante mencionar que el sitio catalítico de la fosfolipasa A2 se caracteriza por presentar cuatro residuos clave: His48, Tyr52, Asp99 y Asp49, Este último juega un papel importante al coordinar y posicionar el ion calcio durante la hidrólisis de fosfolípidos. En el homólogo de PLA2, un residuo de Lys49 reemplaza a Asp49, lo que da como resultado la pérdida de actividad enzimática y de unión a  $Ca^{++}$ , disminuyendo y cancelando su actividad tóxica ( Xiong & Huang, 2018).

Mora Obando et al.,2014 concluyen en un importante hallazgo al demostrar una notable mejora de los efectos mionecróticos en base a la acción combinada de las fracciones Asp 49 y Lys 49 del veneno de *Bothrops asper* en ratones. Los resultados revelaron un claro aumento de la miotoxicidad, a juzgar por la mayor liberación de creatina quinasa del músculo dañado al plasma. Específicamente a una dosis de 20 ug, la liberación fue mayor a 4000 U/L en comparación a su efecto aislado donde los valores de CK no sobrepasan los 3000 U/L. Así mismo, obtuvieron buenos resultados al experimentar con miotubos de líneas celulares C2C12. Una exposición muy baja a Asp49 PLA2, 0,1% de la miotoxina Lys49 PLA2, fue suficiente para aumentar la citotoxicidad de esta última obteniendo un porcentaje de citólisis mayor al 80%. En el mismo estudio se determinó que la direccionalidad de esta sinergia era una mejora de la toxicidad de la miotoxina Lys49 por parte de la enzima Asp49, y no a la inversa, ya que cantidades bajas de la miotoxina Lys49 no aumentaban la acción tóxica de la enzima Asp 49. Por lo tanto, el mecanismo de sinergismo se puede atribuir a la acción enzimática de Asp49 PLA2, más que a una actividad catalíticamente independiente.

A una conclusión similar llegaron Bustillo et al.,2019 en donde observaron que al exponer el mismo tipo de líneas celulares al veneno de una especie de serpiente diferente potenció la actividad citotóxica individual de las fracciones. Aunque la viabilidad celular se vio interrumpida en mayor proporción por la fracción Lys 49, resultando en la disminución

del 40% de viabilidad, la acción sinérgica de las dos subunidades evidenció una mejora de la actividad, obteniendo hasta un 60% de reducción de la acción.

Otro de los sinergismos enzimáticos más comunes encontrados en experimentación son los que ocurren entre fosfolipasas y metaloproteasas. En un estudio realizado en la especie *Bothrops alternatus* por Bustillo et al,2012, indagaron sobre la posible potencialización de la actividad citotóxica de Ba SpII RP4 fosfolipasa A2 y la metaloproteína baltergina sobre mioblastos de músculo esquelético en cultivo. Baltergin indujo una reducción del 40 % en la viabilidad de las células de mioblastos C2C12, mientras que Ba SpII RP4 no mostró citotoxicidad en los tiempos y dosis probados. Al tratarse de una fosfolipasa A2 de naturaleza ácida, no tiene gran relevancia en la actividad citotóxica, tal característica es respaldada por García Denegri et al., 2010, donde incluso en dosis altas no mostró miotoxicidad ni letalidad. Sin embargo, al actuar simultáneamente, baltergin y Ba SpII RP4 provocaron un desprendimiento casi completo de las células (97,5 %), lo que respalda la toxicidad sinérgica. La neutralización del veneno mediante anticuerpos específicos (IgG anti-baltergin e IgG anti-PLA2) confirmó este sinergismo, demostrando que la actividad citotóxica *in vitro* de todo el veneno se inhibe completamente al bloquear solo las metaloproteinasas.

Años más tarde los mismos autores replicaron el experimento en una línea celular diferente, debido a que las células endoteliales son un objetivo natural de las svMP *in vivo*, se indagó sobre la posibilidad de encontrar el efecto sinérgico en este tipo de células. Efectivamente los resultados confirmaron que la PLA2 ácida, a pesar de carecer de toxicidad para las células endoteliales, mejora significativamente el efecto de separación del baltergin svMP, lo que demuestra que el efecto sinérgico descrito anteriormente puede ocurrir en otros tipos de células fisiológicamente relevantes además de los mioblastos. Otro punto a notar es que el grado de sinergia dependía de la concentración de PLA2. Con la adición de una pequeña cantidad de PLA2 a Baltergin, provocó mejora de la actividad citotóxica. Este efecto aumentó proporcionalmente al usar cantidades más altas de la fosfolipasa, llegando a una sinergia máxima a partir de 50 ug/mL (Bustillo et al,2015).

A pesar de la evidente potencialización en la acción por parte de estas dos enzimas descrita por Bustillo et al; discrepa con los resultados encontrados por Menaldo et al., 2015. Con el fin de investigar la actividad hemorrágica de BatroxPLA2 (PLA2 ácida) y Batroxasa (svMP P-I), ratones fueron sometidos a inoculación de enzimas por vía intravenosa. Posterior a su sacrificio, se evaluó el diámetro del halo hemorrágico, concluyendo que, a dosis mínimas combinadas de ambas enzimas, no se encontraron cambios significativos que demuestren una actividad sinérgica, esto en comparación con las actividades aisladas de cada enzima.

Una posible respuesta a esta disparidad de resultados es la variedad estructural y funcional de la enzima. En relación con el potencial hemorrágico, los svMP P-III son los más potentes entre las tres clases, siendo capaz de inducir no solo hemorragias locales sino también sistémicas. Otro punto a considerar es su método de fraccionamiento, puesto que para aislar proteínas específicas de los venenos de serpiente generalmente son necesarios dos o más pasos cromatográficos. Debido a los disolventes usados en RP-HPLC las proteasas se desnaturalizan, por lo que se debe tener cuidado al método de purificación. Finalmente, hay que considerar la influencia de ciertos factores en la composición del veneno, que podrían afectar a la interacción sinérgica requerida. Sin embargo, no hemos evidenciado estudios que defienden estas hipótesis (Xiong & Huang., 2018).

Los mecanismos de acción sinérgica exactos entre estas enzimas siguen siendo una incógnita a investigar, a pesar de esto se han presentado hipótesis que corroboran esta interacción. En el caso de las subunidades miotóxicas de la PLA2. Las miotoxinas Asp 49 desestabilizan la membrana mediante hidrólisis enzimática de fosfolípidos (PL), produciendo liso-PL y ácidos grasos (AG). Por otro lado, las miotoxinas Lys 49 ejercen un mecanismo de permeabilización directo a través de su región C-terminal. Al actuar en combinación, los AG formados, generan nuevos sitios aniónicos que facilitan la unión de la miotoxina II. La membrana se vuelve mucho más inestable debido a la hidrólisis y acumulación de productos de reacción. Como resultado de las acciones combinadas, se potencia el daño de la membrana y la célula se daña irreversiblemente (Mora Obando et al.,2014).

Por otro lado, el posible mecanismo de la interacción entre PLA2 y svMP es debido a que la PLA2 puede interactuar con moléculas lipídicas de la membrana celular, por un mecanismo independiente de la catálisis. Tal interacción, a su vez, puede alterar las propiedades biofísicas de la membrana, ya sea facilitando el contacto entre las SVMP y las células endoteliales o afectando la fuerza de unión de las integrinas de las células endoteliales con las proteínas de la matriz extracelular, de tal manera que la unión célula-sustrato no se realizará. ( Bustillo et al,2012; Bustillo et al 2015).

Esta descripción general de los efectos sinérgicos ya descubiertos en varios venenos de serpiente y sus posibles mecanismos, junto con los métodos apropiados para evaluar el sinergismo, son importantes para discernir los variados efectos fisiopatológicos y también como herramientas cognitivas en el desarrollo de antivenenos o inhibidores más eficientes (Rodríguez Acosta,2021).La selección de la toxina o subunidad de veneno probablemente no tóxica, que puede potenciar la toxicidad de otra toxina o subunidad a través de la sinergia, o tal vez sus análogos sintéticos para el diseño de antiveneno, proporciona potencialmente una mejor eficacia y seguridad, así como un menor costo de tratamiento.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 CONCLUSIONES

En la presente revisión bibliográfica se abordó los efectos tóxicos de las principales enzimas ofídicas, las cuales se encuentran formando parte de una mezcla compleja, lo que implica un reto para los mecanismos asociados a su efecto. Se evidenció la importancia de conocer de primera mano cuáles son sus mecanismos de acción, de esta manera su fisiopatología favorecerá al entendimiento de las relaciones sinérgicas.

En el presente trabajo se describió el sinergismo de fosfolipasa A2, sustancia proteica enzimática que se encuentra en la mayoría de venenos de ofidios, que aporta como núcleo central de complejos sinérgicos. Su combinación con enzimas como: metaloproteasa, serinproteasa y L-animo oxidasa tienen una acción directa en la potenciación de efectos hemotóxicos, citotóxicos y neurotóxicos. Así mismo, la acción conjunta de las subunidades Asp49 y Lys49 de PLA2, es mucho mayor en comparación a su efecto aislado.

La acetilcolinesterasa si bien no se conoce con exactitud su acción sinérgica, proporciona potenciar sus efectos miotóxicos, neurotóxicos. El grupo de las proteasas tiene su enfoque tóxico a nivel hemotóxico, lo que constituye una acción sistémica que puede llegar a ser mortal.

La recolección de información científica de manera resumida aporta como base para futuros estudios enfocados en la investigación y desarrollo de agentes antiofídicos con el fin de obtener una atención rápida y precisa en accidentes por mordeduras de serpientes.

## 5.2. RECOMENDACIONES

Se recomienda que se amplíen los estudios descriptivos hacia las principales enzimas participantes en los accidentes ofídicos y no únicamente en aquellas moléculas más abundantes y/o tóxicas de los venenos de serpientes.

En estudios experimentales, se recomienda implementar métodos de investigación que se centren en el sinergismo enzimático, relacionado a la variación venómica interespecies en serpientes, puesto que, la composición del veneno, suele ser dependiente de varios factores, muchos de ellos ambientales.

Dada la factibilidad de aislamiento de enzimas, muchas investigaciones dirigen su atención hacia la composición de vipéridos, por lo que se recomienda incluir el nivel de búsqueda de las relaciones sinérgicas entre enzimas hacia especies de la familia *Elapidae*.

Se recomienda abordar estudios enfocados a efectos sinérgicos de toxinas ofídicas, considerando como respuestas experimentales hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y neurotoxicidad.

## BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

- Abdullahi, Z. U., Musa, S. S., He, D., & Bello, U. M. (2021). Antiprotozoal Effect of Snake Venoms and Their Fractions: A Systematic Review. *Pathogens*, *10*(12), 1632. <https://doi.org/10.3390/pathogens10121632>
- Ahmed, M., Latif, N., Khan, R. A., Ahmad, A., Rocha, J. B. T., Mazzanti, C. M., Bagatini, M. D., Morsch, V. M., & Schetinger, M. R. C. (2012). Enzymatic and biochemical characterization of Bungarus sindanus snake venom acetylcholinesterase. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, *18*, 236-243. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992012000200014>
- Akef, H. (2017). Snake venom: Kill and cure. *Toxin Reviews*, *38*, 1-20. <https://doi.org/10.1080/15569543.2017.1399278>
- Andreas Hougaard Laustsen. (2016, agosto 1). *Sinergismo de toxinas en venenos de serpientes*. *35*, 165-170.
- Bickler, P. E. (2020). Amplification of Snake Venom Toxicity by Endogenous Signaling Pathways. *Toxins*, *12*(2), E68. <https://doi.org/10.3390/toxins12020068>
- Bourne, Y., Renault, L., & Marchot, P. (2015). Crystal structure of snake venom acetylcholinesterase in complex with inhibitory antibody fragment Fab410 bound at the peripheral site: Evidence for open and closed states of a back door channel. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(3), 1522-1535. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.603902>
- Brunton, L., Chabner, B., & Knollmann, B. (2017). *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (12.<sup>a</sup> ed.). Mc Graw Hill.
- Bustillo, S., Fernández, J., Chaves-Araya, S., Angulo, Y., Leiva, L. C., & Lomonte, B. (2019). Isolation of two basic phospholipases A2 from Bothrops diporus snake venom: Comparative characterization and synergism between Asp49 and Lys49 variants. *Toxicon*, *168*, 113-121. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.07.004>
- Bustillo, S., García-Denegri, M. E., Gay, C., Van de Velde, A. C., Acosta, O., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., & Leiva, L. (2015). Phospholipase A2 enhances the endothelial cell detachment effect of a snake venom metalloproteinase in the absence of catalysis. *Chemico-Biological Interactions*, *240*, 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.08.002>
- Bustillo, S., Gay, C. C., García Denegri, M. E., Ponce-Soto, L. A., Bal de Kier Joffé, E., Acosta, O., & Leiva, L. C. (2012). Synergism between baltergin metalloproteinase and Ba SPII RP4 PLA2 from Bothrops alternatus venom on skeletal muscle (C2C12) cells. *Toxicon*, *59*(2), 338-343. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.11.007>

- Cañas, C., Castaño, S., & Castro-Herrera, F. (2016). *Serpientes venenosas: Lecciones aprendidas desde Colombia*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2218.8565>
- Castro, E. E. N., Bénard-Valle, M., Alagón, A., Gil, G., León, J. L. de, & Borja, M. (2020). SERPIENTES VENENOSAS EN MÉXICO: UNA REVISIÓN AL ESTUDIO DE LOS VENENOS, LOS ANTIVENENOS Y LA EPIDEMIOLOGÍA. *Revista Latinoamericana de Herpetología*, 3(2), Art. 2. <https://doi.org/10.22201/fc.25942158e.2020.2.205>
- Cedro, R. C. A., Menaldo, D. L., Costa, T. R., Zoccal, K. F., Sartim, M. A., Santos-Filho, N. A., Faccioli, L. H., & Sampaio, S. V. (2018). Cytotoxic and inflammatory potential of a phospholipase A2 from Bothrops jararaca snake venom. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 24, 33. <https://doi.org/10.1186/s40409-018-0170-y>
- Chan, Y. S., Cheung, R. C. F., Xia, L., Wong, J. H., Ng, T. B., & Chan, W. Y. (2016). Snake venom toxins: Toxicity and medicinal applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(14), 6165-6181. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7610-9>
- Chen, H.-S., Wang, Y.-M., Huang, W.-T., Huang, K.-F., & Tsai, I.-H. (2012). Cloning, characterization and mutagenesis of Russell's viper venom l-amino acid oxidase: Insights into its catalytic mechanism. *Biochimie*, 94(2), 335-344. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.07.022>
- Córdova Mera, G. de los Á., & Santos Espín, D. L. (2015). Factores asociados con las complicaciones de un accidente ofídico en pacientes que ingresaron al Hospital General Puyo de la provincia de Pastaza en el periodo enero 2007 a diciembre 2013. *Pontificia Universidad Católica del Ecuador*. <http://repositorio.puce.edu.ec:80/xmlui/handle/22000/8886>
- Fernanber. (2013). *TOXINOLOGIA CLINICA. LESIONES POR PICADURAS Y MORDEDURAS DE ANIMALES. TOMO II*. Bubok.
- Fernández Badillo, L., Capellán, N. M.-, Contreras-Patiño, R., & Carreño-Cervantes, A. (2016). Confirmación de la presencia de la serpiente de cascabel *Crotalus scutulatus* para el Estado de México, México. *ACTA ZOOLOGICA MEXICANA (N.S.)*, 32(2), Art. 2. <https://doi.org/10.21829/azm.2016.322951>
- Ferraz, C. R., Arrahman, A., Xie, C., Casewell, N. R., Lewis, R. J., Kool, J., & Cardoso, F. C. (2019). Multifunctional Toxins in Snake Venoms and Therapeutic Implications: From Pain to Hemorrhage and Necrosis. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7, 218. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00218>

- Florea, Ș. A. G., Florea, A. G., Kelemen, H., & Muntean, D.-L. (2016). Snake Venom Metalloproteinases. *Acta Marisiensis - Seria Medica*, 62(1), 106-111. <https://doi.org/10.1515/amma-2015-0114>
- Frangieh, J., Rima, M., Fajloun, Z., Henrion, D., Sabatier, J.-M., Legros, C., & Mattei, C. (2021). Snake Venom Components: Tools and Cures to Target Cardiovascular Diseases. *Molecules*, 26(8), 2223. <https://doi.org/10.3390/molecules26082223>
- Freund, F. C., Barquero, F. M., & Monge, S. M. R. (2022). Accidente ofídico: Un enfoque al manejo en primer nivel de atención. *Revista Medica Sinergia*, 7(2), Art. 2. <https://doi.org/10.31434/rms.v7i2.756>
- Garcia Denegri, ME, Acosta, OC, Huanchuire-Vega, S., Martins-de Souza, D., Marangoni, S., Marunak, SL, Teibler, GP, Leiva, LC, Ponce Soto, LA, (2010). Aislamiento y Caracterización funcional de un nuevo PLA ácido (2) Ba SpII RP4 del veneno de serpiente *Bothrops alternatus* de Argentina. *Toxicón* 56, 64–74.
- Garcia Denegri, M. E., Bustillo, S., Gay, C. C., Van De Velde, A., Gomez, G., Echeverría, S., Gauna Pereira, M. D. C., Maruñak, S., Nuñez, S., Bogado, F., Sanchez, M., Teibler, G. P., Fusco, L., & Leiva, L. C. A. (2019). Venoms and Isolated Toxins from Snakes of Medical Impact in the Northeast Argentina: State of the Art. Potential Pharmacological Applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 19(22), 1962-1980. <https://doi.org/10.2174/1568026619666190725094851>
- García, O. E. P., Bonilla, H. Q., Walteros, D., Paredes, A., & Núñez, L. J. L. (2014). *Mancel Enrique Martínez Duran*. 02, 28.
- Goswami, P. K., Samant, M., & Srivastava, R. S. (2014). Snake venom, anti-snake venom & potential of snake venom. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6, 4-7.
- Gualán, S. (2011). *CARACTERIZACION EPIDEMIOLOGICA Y CLINICA DE LOS PACIENTES QUE PRESENTARON ACCIDENTE OFIDICO, ATENDIDOS EN EL "HOSPITAL MARCO VINICIO IZA" DE LA PROVINCIA DE SUCUMBIOS, DURANTE EL PERIODO DE ENERO A DICIEMBRE DEL AÑO 2010*". <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/4105/T-PUCE-3383.pdf?sequence=1>
- Gutiérrez, M., Lamonte, M., Rucavado, A & Chavez.F.(2011). Venenos de serpiente de la familia Viperidae en América bioquímica y fisiopatología. *Dicresa*. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.09.019>

- Harris, J. B., & Scott-Davey, T. (2013). Secreted phospholipases A2 of snake venoms: Effects on the peripheral neuromuscular system with comments on the role of phospholipases A2 in disorders of the CNS and their uses in industry. *Toxins*, 5(12), 2533-2571. <https://doi.org/10.3390/toxins5122533>
- Inagaki, H., Vogel, C.-W., Mukherjee, A. K., & Rahmy, T. R. (Eds.). (2017). *Snake Venoms*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6410-1>
- Jiménez, J. (1970). *BIOQUIMICA, FARMACOLOGIA y FISIOPATOLOGIA DE LOS VENENOS DE SERPIENTES*. 1970.
- Jiménez, J. A. P., & Muñoz, L. J. V. (2009). *Toxinas de serpientes con alto potencial terapéutico y su uso en la biomedicina*. 22(4), 10.
- Johnston, C. I., & Isbister, G. K. (2021). Australian snakebite myotoxicity (ASP-23). *Clinical Toxicology*, 59(7), 611-618. <https://doi.org/10.1080/15563650.2020.1836377>
- Kang, T. S., Georgieva, D., Genov, N., Murakami, M. T., Sinha, M., Kumar, R. P., Kaur, P., Kumar, S., Dey, S., Sharma, S., Vrieling, A., Betzel, C., Takeda, S., Arni, R. K., Singh, T. P., & Kini, R. M. (2011). Enzymatic toxins from snake venom: Structural characterization and mechanism of catalysis. *The FEBS Journal*, 278(23), 4544-4576. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08115.x>
- Lauridsen, L. P., Laustsen, A. H., Lomonte, B., & Gutiérrez, J. M. (2016). Toxicovenomics and antivenom profiling of the Eastern green mamba snake ( *Dendroaspis angusticeps* ). *Journal of Proteomics*, 136, 248-261. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.02.003>
- Laustsen, A. H. (2016). Toxin synergism in snake venoms. *Toxin Reviews*, 35(3-4), 165-170. <https://doi.org/10.1080/15569543.2016.1220397>
- Laustsen, A. H., Gutiérrez, J. M., Lohse, B., Rasmussen, A. R., Fernández, J., Milbo, C., & Lomonte, B. (2015). Snake venomomics of monocled cobra (*Naja kaouthia*) and investigation of human IgG response against venom toxins. *Toxicon*, 99, 23-35. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.03.001>
- Laustsen, A. H., Gutiérrez, J. M., Rasmussen, A. R., Engmark, M., Gravlund, P., Sanders, K. L., Lohse, B., & Lomonte, B. (2015). Danger in the reef: Proteome, toxicity, and neutralization of the venom of the olive sea snake, *Aipysurus laevis*. *Toxicon*, 107, 187-196. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.07.008>
- Laustsen, A. H., Lohse, B., Lomonte, B., Engmark, M., & Gutiérrez, J. M. (2015). Selecting key toxins for focused development of elapid snake antivenoms and inhibitors guided by a Toxicity Score. *Toxicon*, 104, 43-45. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.07.334>

- Laustsen, A. H., Lomonte, B., Lohse, B., Fernández, J., & Gutiérrez, J. M. (2015). Unveiling the nature of black mamba (*Dendroaspis polylepis*) venom through venomomics and antivenom immunoprofiling: Identification of key toxin targets for antivenom development. *Journal of Proteomics*, 119, 126-142. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.02.002>
- Mackessy, S. P. (Ed.). (2010). *Handbook of venoms and toxins of reptiles*. Taylor & Francis.
- Maguiña Vargas, C., Chinchá-Lino, O., Vilcapoma-Balbín, P., & Morante, D. (2020). Actualización en clínica y terapia de mordedura de serpiente (ofidismo). *Revista Médica Herediana*, 31(1), 48-55. <https://doi.org/10.20453/rmh.v31i1.3729>
- Manrique, G., & Ramírez Ramos, C. F. (2016). *Oftalmoplejía asociada a neurotoxicidad por veneno de serpiente: Presentación de un caso y revisión de la literatura Ophthalmoplegia associated with snake venom neurotoxicity: case report and literature review*. 314-319.
- Markland, F. S., & Swenson, S. (2013). Snake venom metalloproteinases. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 62, 3-18. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.004>
- Menaldo, D. L., Jacob-Ferreira, A. L., Bernardes, C. P., Cintra, A. C. O., & Sampaio, S. V. (2015). Purification procedure for the isolation of a P-I metalloprotease and an acidic phospholipase A2 from *Bothrops atrox* snake venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 21(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s40409-015-0027-6>
- Mohamed Abd El-Aziz, T., Soares, A. G., & Stockand, J. D. (2019). Snake Venoms in Drug Discovery: Valuable Therapeutic Tools for Life Saving. *Toxins*, 11(10), Art. 10. <https://doi.org/10.3390/toxins11100564>
- Mora Obando, D., Fernández, J., Montecucco, C., Gutiérrez, J. M., & Lomonte, B. (2014). Synergism between Basic Asp49 and Lys49 Phospholipase A2 Myotoxins of Viperid Snake Venom In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE*, 9(10), e109846. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109846>
- Morera, L. M. T. (2001). *Tratado de cuidados críticos y emergencias*. Arán Ediciones.
- Moura-da-Silva, A. M., Almeida, M. T., Portes-Junior, J. A., Nicolau, C. A., Gomes-Neto, F., & Valente, R. H. (2016). Processing of Snake Venom Metalloproteinases: Generation of Toxin Diversity and Enzyme Inactivation. *Toxins*, 8(6), Art. 6. <https://doi.org/10.3390/toxins8060183>
- MSD. (2020, septiembre). *Description and Physical Characteristics of Reptiles—All Other Pets*. <https://www.msdsvetmanual.com/all-other-pets/reptiles/description-and-physical-characteristics-of-reptiles>

- MSP. Manejo clínico del envenenamiento por mordeduras de serpientes venenosas y picaduras de escorpiones. (s. f.). Recuperado 7 de agosto de 2021, de [https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/AC\\_00153\\_2017%2021%20NOV.pdf?fbclid=IwAR3Ty0SLIGBoAMBSLiO9NxHVFIhgkB\\_YukIzjvRAuquryAW5vFSpDqbsSfk](https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/AC_00153_2017%2021%20NOV.pdf?fbclid=IwAR3Ty0SLIGBoAMBSLiO9NxHVFIhgkB_YukIzjvRAuquryAW5vFSpDqbsSfk)
- Munawar, A., Ali, S., Akrem, A., & Betzel, C. (2018). Snake Venom Peptides: Tools of Biodiscovery. *Toxins*, 10(11), 474. <https://doi.org/10.3390/toxins10110474>
- Nanjaraj, U., Manjunath, Y., Joshi, V., Angaswamy, N., Gowda, T., & Vishwanath, B. S. (2013). Implications of phytochemicals in snakebite management: Present status and future prospective. *Toxin Reviews*, 33, 1-24. <https://doi.org/10.3109/15569543.2013.854255>
- NOGUÉS, M., Rojo-Solis, C., RUIZ, M., & Encinas, T. (2008). Estudio del veneno de serpientes: Tipos y tratamientos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 2008, 2.
- Ochoa Andrade, M. J. (2020). Frecuencia del envenenamiento por mordeduras de serpientes y perfil sociodemográfico en una población de la Amazonía ecuatoriana y revisión de la literatura. *Práctica Familiar Rural*, 5(2). <https://doi.org/10.23936/pfr.v5i2.152>
- Ochoa Avilés, A., Heredia-Andino, O. S., Escandón, S. A., Celorio-Carvajal, C. A., Arias-Peláez, M. C., Zaruma-Torres, F., Caldeira, C. A. da S., Soares, A. M., & Da Silva, S. L. (2020). Viperidae snakebites in Ecuador: A review of epidemiological and ecological aspects. *Toxicon: X*, 7, 100051. <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2020.100051>
- Oliveira, A. L., Viegas, M. F., da Silva, S. L., Soares, A. M., Ramos, M. J., & Fernandes, P. A. (2022). The chemistry of snake venom and its medicinal potential. *Nature Reviews Chemistry*. <https://doi.org/10.1038/s41570-022-00393-7>
- Pereañez, A., Patiño, A., & Henao Castañeda, I. C. (2014). Toxinas provenientes de venenos de serpiente: Blancos terapéuticos, herramientas en investigación biomédica y agentes con potencial terapéutico. *Curare*, 1, 49. <https://doi.org/10.16925/cu.v1i1.308>
- Pucca, M. B., Ahmadi, S., Cerni, F. A., Ledsgaard, L., Sørensen, C. V., McGeoghan, F. T. S., Stewart, T., Schoof, E., Lomonte, B., auf dem Keller, U., Arantes, E. C., Çalışkan, F., & Laustsen, A. H. (2020). Unity Makes Strength: Exploring Intraspecies and Interspecies Toxin Synergism between Phospholipases A2 and Cytotoxins. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 611. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00611>
- Robert Barish. (2020). *Picaduras de serpientes—Lesiones y envenenamientos* [Informativa]. Manual MSD versión para profesionales. <https://www.msdmanuals.com/es->

ec/professional/lesiones-y-envenenamientos/mordeduras-y-picaduras/picaduras-de-serpientes

- Rodríguez Acosta, A. (2021). Notas de los efectos sinérgicos presentes entre varias toxinas de venenos de serpientes y sus posibles mecanismos de inter-relación. *Revista de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela*, 84, 115-125. <https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2021.84.1-2.10>
- Simoes Silva, R., Alfonso, J., Gomez, A., Holanda, R. J., Sobrinho, J. C., Zaqueo, K. D., Moreira-Dill, L. S., Kayano, A. M., Grabner, F. P., da Silva, S. L., Almeida, J. R., Stabeli, R. G., Zuliani, J. P., & Soares, A. M. (2018). Snake Venom, A Natural Library of New Potential Therapeutic Molecules: Challenges and Current Perspectives. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 19(4), 308-335. <https://doi.org/10.2174/1389201019666180620111025>
- Simões Silva, R., Alfonso, J. J., Gómez, A. F., Sobrinho, J. C., Kayano, A. M., de Medeiros, D. S. S., Teles, C. B. G., Quintero, A., Fuly, A. L., Gómez, C. V., Pereira, S. S., da Silva, S. L., Stábeli, R. G., & Soares, A. M. (2021). Synergism of in vitro plasmodicidal activity of phospholipase A2 isoforms isolated from panamanian Bothrops asper venom. *Chemico-Biological Interactions*, 346, 109581. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109581>
- Slagboom, J., Kool, J., Harrison, R. A., & Casewell, N. R. (2017). Haemotoxic snake venoms: Their functional activity, impact on snakebite victims and pharmaceutical promise. *British Journal of Haematology*, 177(6), 947-959. <https://doi.org/10.1111/bjh.14591>
- Ullah, A. (2020). Structure-Function Studies and Mechanism of Action of Snake Venom L-Amino Acid Oxidases. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 110. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00110>
- Vico Andueza, L., Martínez Sanchez, L., Martínez Osorio, J., Trenchs Sainz de La Maza, V., & Luaces Cubells, C. (2015). Mordedura de serpientes venenosas: Experiencia durante 5 años. *Anales de Pediatría*, 83(3), 209-211. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2015.03.010>
- Waheed, H., Moin, S. F., & Choudhary, M. I. (2017). Snake Venom: From Deadly Toxins to Life-saving Therapeutics. *Current Medicinal Chemistry*, 24(17). <https://doi.org/10.2174/0929867324666170605091546>
- WHO. (2010). *Guidelines for the prevention and Clinical Management Snakebite in Africa* (Vol. 1). Regional Office for Africa.
- Xiong, S., & Huang, C. (2018). Synergistic strategies of predominant toxins in snake venoms. *Toxicology Letters*, 287, 142-154. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.02.004>

Youngman, N. J., Lewin, M. R., Carter, R., Naude, A., & Fry, B. G. (2022). Efficacy and Limitations of Chemically Diverse Small-Molecule Enzyme-Inhibitors against the Synergistic Coagulotoxic Activities of Bitis Viper Venoms. *Molecules*, 27(5), 1733. <https://doi.org/10.3390/molecules27051733>

Zambelli, V. O., Picolo, G., Fernandes, C. A. H., Fontes, M. R. M., & Cury, Y. (2017). Secreted Phospholipases A2 from Animal Venoms in Pain and Analgesia. *Toxins*, 9(12), Art. 12. <https://doi.org/10.3390/toxins9120406>