

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**EVALUACIÓN PROTEÓMICA Y TOXINOLÓGICA DEL VENENO DE
HEMACHATUS HAEMACHATUS Y SU COMPARACIÓN CON VENENOS DE
COBRAS DEL GENERO *NAJA* SP. EN TÉRMINOS DE INMUNOREACTIVIDAD
Y NEUTRALIZACIÓN CRUZADA PARA LA PREPARACIÓN DE UN
ANTIVENENO POLIESPECÍFICO PARA ÁFRICA**

Tesis sometida a consideración de la Comisión del Programa de Posgrado en
Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología para optar por el grado de
Maestría Académica en Microbiología

Andrés Sánchez Brenes

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2020

DEDICATORIA

A todas aquellas personas que me han apoyado a lo largo de mi formación académica, principalmente a mi familia y a Karla, que son las personas que me impulsan a ser mejor cada día.

A mis compañeros de trabajo en el ICP, que me han extendido la mano en algún momento tanto para asuntos académicos, profesionales y personales. Muy especialmente a los compañeros de SEDETEC: Álvaro, María, Mariángela y Mauren, que me han apoyado incondicionalmente en este proceso.

A Memo, Chema y Bruno, porque han sido parte importante de mi formación como científico. Gracias por compartir todo ese conocimiento conmigo y con los compañeros alrededor.

A Mariángela, por ser más que una tutora en este proceso y ser una amiga incondicional en todo momento.

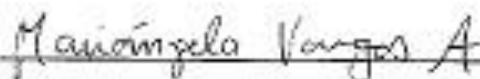
AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Dr. Juan José Calvete (Instituto de Biomedicina de Valencia, Laboratorio de Venómica Evolutiva y Traslacional) por permitirme realizar la pasantía en su laboratorio y poder realizar el estudio de antivenómica. Al Dr. Bruno Lomonte por llevar a cabo el análisis de las muestras para obtener el proteoma del veneno de *H. haemachatus*. A todo el personal del Instituto Clodomiro Picado por su colaboración para la realización de esta investigación. Este proyecto fue apoyado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (Proyecto 741-B7-108) y por el Sistema de Estudios de Posgrado (Beca del Millón, SEP-484-2019).

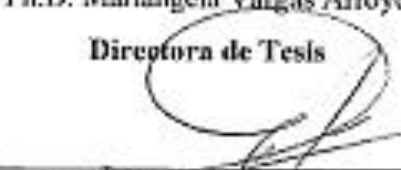
“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología.”



Ph.D. Gilbert David Loría Masís
Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado

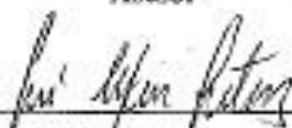


Ph.D. Mariángela Vargas Arroyo
Directora de Tesis



Ph.D. Guillermo León Mortero

Asesor

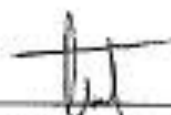


Ph.D. José María Gutiérrez Gutiérrez

Asesor



Master David Vargas Díaz
Representante Programa de Posgrado



Andrés Sánchez Brenes
Candidato

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
HOJA DE APROBACIÓN.....	iv
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Problemática del envenenamiento ofídico en África	1
1.2 Serpientes de la familia Elapidae en África	1
1.2.1 Composición de los venenos de la familia Elapidae	2
1.2.1.1 Toxinas de tres dedos (3FTx).....	2
1.2.1.2 Fosfolipasas A ₂ (PLA ₂)	2
1.2.1.3 Metaloproteinasas (SVMP).....	3
1.2.1.4 Serino proteasas	3
1.2.1.5 Proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISP).....	3
1.2.1.6 Desintegrinas.....	3
1.2.1.7 Proteínas inhibidoras tipo Kunitz (KTPI)	4
1.2.1.8 Dendrotoxinas	4
1.2.2 Cobras de África sub-Sahariana.....	4
1.2.3 Serpiente escupidora <i>Hemachatus haemachatus</i>	6
1.3 Terapia con antivenenos para el tratamiento del envenenamiento ofídico	7
1.3.1 Generalidades de los antivenenos	7
1.3.2 Respuesta inmunológica contra los venenos de serpiente.....	7
1.3.3 Especificidad de los antivenenos y reactividad cruzada	8

1.3.4 Situación de la disponibilidad de antivenenos en África	9
1.4 Evaluación preclínica de la eficacia de los antivenenos.....	10
1.4.1 Ensayos <i>in vivo</i>	11
1.4.2 Ensayos <i>in vitro</i>	11
2. HIPÓTESIS.....	12
3. OBJETIVO GENERAL	13
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS	14
4.1 Condiciones éticas.....	14
4.2 Venenos de serpientes.....	14
4.3 Caracterización proteómica del veneno <i>Hemachatus haemachatus</i>	14
4.4 Caracterización toxinológica de los venenos de <i>H. haemachatus</i> , <i>N. annulifera</i> , <i>N. mossambica</i> y <i>N. nigricollis</i>	16
4.4.1 Determinación de actividades tóxicas <i>in vivo</i>	16
4.4.1.1 Animales de laboratorio	16
4.4.1.2 Actividad letal	16
4.4.1.3 Actividad dermonecrotica	16
4.4.1.4 Actividad miotóxica.....	17
4.4.2 Determinación de actividades enzimáticas <i>in vitro</i>	17
4.4.2.1 Actividad fosfolipasa	17
4.4.2.2 Actividad anticoagulante.....	18
4.4.3 Análisis toxicovenómico de fracciones individuales del veneno de <i>H. haemachatus</i>	19
4.5 Comparación del perfil de inmunoreactividad de cada veneno por antivenenos homólogos y heterólogos.....	19
4.5.1 Antiveneno heterólogo anti- <i>Naja</i> sp	19
4.5.2 Preparación de antiveneno homólogo anti- <i>H. haemachatus</i>	20
4.5.2.1 Inmunización de caballos con el veneno de <i>H. haemachatus</i>	20
4.5.2.2 Purificación de anticuerpos por precipitación con ácido caprílico.....	20

4.5.3 Evaluación de la neutralización cruzada de las actividades tóxicas de cada veneno por antivenenos homólogos y heterólogos	20
4.5.4 Determinación de inmunoreactividad mediante antivenómica de tercera generación	21
4.5.4.1 Preparación de las columnas de afinidad con antiveneno homólogo y heterólogo ...	21
4.5.4.2 Evaluación del perfil de inmunoreactividad de antivenenos homólogos y heterólogos	22
4.6 Análisis estadístico.....	25
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
5.1 Caracterización proteómica del veneno de <i>H. haemachatus</i> y su comparación con venenos del género <i>Naja</i> sp	26
5.2 Caracterización toxinológica de los venenos <i>H. haemachatus</i> , <i>N. annulifera</i> , <i>N. mossambica</i> y <i>N. nigricollis</i>	32
5.2.1 Actividades tóxicas de los venenos <i>H. haemachatus</i> , <i>N. annulifera</i> , <i>N. mossambica</i> y <i>N. nigricollis</i>	32
5.2.2 Actividades enzimáticas de los venenos <i>H. haemachatus</i> , <i>N. annulifera</i> , <i>N. mossambica</i> y <i>N. nigricollis</i>	35
5.2.3 Evaluación toxicovenómica de fracciones individuales del veneno de <i>H. haemachatus</i> .	36
5.3 Evaluación de la neutralización e inmunoreactividad cruzada de los venenos <i>H. haemachatus</i> , <i>N. annulifera</i> , <i>N. mossambica</i> y <i>N. nigricollis</i>	38
5.3.1 Evaluación del perfil de neutralización de antivenenos homólogos y heterólogos	38
5.3.2 Evaluación del perfil de inmunoreactividad de antivenenos homólogos y heterólogos ..	40
6. CONCLUSIONES	44
7. RECOMENDACIONES	45
8. REFERENCIAS	46
9. ANEXOS	60

RESUMEN

Las cobras representan el grupo de serpientes clínicamente más relevantes de la familia Elapidae en África, dentro de los cuales los géneros *Naja* y *Hemachatus* incluyen serpientes con venenos neurotóxicos y citotóxicos. Debido a que la composición proteica del veneno de *Hemachatus haemachatus* (Ringhals) no había sido descrita completamente, y que posee características análogas a venenos citotóxicos y neurotóxicos, se realizó una caracterización de este veneno a nivel proteómico y toxinológico para determinar su similitud antigénica con otras cobras. Adicionalmente, se desarrolló un antiveneno mono-específico experimental anti-*H. haemachatus*, para evaluar la reactividad cruzada contra venenos del género *Naja* del África sub-Sahariana, mediante análisis preclínicos y antivenómica de tercera generación. La composición proteica del veneno de la cobra escupidora *H. haemachatus* se caracterizó mediante la metodología proteómica “bottom-up”. El veneno se compone de abundante presencia de toxinas de tres dedos (3FTx; 63,3%), seguido de fosfolipasas A₂ (PLA₂; 22,8%), metaloproteinasas (SVMPs; 7,1%), proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISPs; 4,1%) y proteínas inhibidoras tipo kunitz (KTPIs; 1,5%). El veneno de *H. haemachatus* comparte una composición similar en cuanto a la presencia de familias de toxinas con los venenos de *N. annulifera*, *N. mossambica* y *N. nigricollis*; sin embargo, presenta variaciones en las proporciones de toxinas de 3FTx, PLA₂, SVMPs y CRISPs. El antiveneno anti-*Hemachatus* neutralizó la actividad letal de los tres venenos de cobras escupidoras: *H. haemachatus* (veneno homólogo neuro/citotóxico), *N. mossambica* y *N. nigricollis* (venenos heterólogos cito/cardiotóxicos). No obstante, no neutralizó la actividad letal y actividades tóxicas del veneno neurotóxico de la cobra no escupidora *N. annulifera*. La capacidad del antiveneno anti-*Hemachatus* para neutralizar la actividad dermonecrótica, anticoagulante y fosfolipasa de los venenos de cobras escupidoras, así como su perfil de inmunoreactividad obtenido mediante antivenómica de tercera generación, sugieren mayor similitud antigénica y una relación filogenética más cercana entre *H. haemachatus* y el género *Naja* subgénero *Afrocobra* (cobras escupidoras), en comparación al género *Naja* subgénero *Uraeus* (cobras neurotóxicas). Este estudio aporta evidencia para la producción de antivenenos de amplio espectro contra envenenamientos de especies de cobra. A partir de los resultados obtenidos, se propone que para la preparación de antivenenos, si la mezcla de inmunización incluye venenos de *N. mossambica* y *N. nigricollis*, no es estrictamente necesario incluir en el esquema de inmunización el veneno de *H. haemachatus*.

ABSTRACT

Cobras are the most medically important elapid snakes in Africa. The African genera *Naja* and *Hemachatus* include snakes with neurotoxic and cytotoxic venoms. Since the protein composition of *Hemachatus haemachatus* (Ringhals) venom has not been fully described, and that it has characteristics analogous to cytotoxic and neurotoxic venoms, a characterization of this venom was carried out at the proteomic and toxinological level to determine its antigenic similarity with other cobras. Additionally, an experimental monospecific anti- *H. haemachatus* antivenom was developed, to evaluate the cross-reactivity against venoms of the genus *Naja* from sub-Saharan Africa, through preclinical and third-generation antivenomics analysis. The protein composition of the venom of the African spitting elapid *H. haemachatus* was characterized by bottom-up proteomics. Venom is composed of abundant three-finger toxins (3FTx; 63.3%), followed by phospholipases A₂ (PLA₂; 22.8%), snake venom metalloproteinases (SVMPs; 7.1%), cysteine-rich secretory proteins (CRISPs; 4.1%) and Kunitz type protease inhibitors (KTPIs; 1.5%). We found that *H. haemachatus* venom shares family toxin composition with venoms of *N. annulifera*, *N. mossambica* and *N. nigricollis*, but they present variations in their proportions of 3FTx classes, PLA₂, SVMPs and CRISPs. Anti-*Hemachatus* antivenom neutralized the lethal activity of all three spitting cobra venoms: *H. haemachatus* (neuro/cytotoxic homologous venom), *N. mossambica* and *N. nigricollis* (cyto/cardiotoxic heterologous venoms). However, it did not neutralize the lethal activity and toxic activities of the neurotoxic venom of the non-spitting cobra *N. annulifera*. The ability of anti-*Hemachatus* antivenom to neutralize the dermonecrotic, anticoagulant and phospholipase activity of spitting cobra venoms, as well as its immunoreactivity profile obtained by third-generation antivenomics, prove greater antigenic similarity and a closer phylogenetic relationship between *H. haemachatus* and the genus *Naja* subgenus Afrocobra (spitting cobras), compared to the genus *Naja* subgenus *Uraeus* (neurotoxic cobras). This study provides evidence for the production of broad-spectrum antivenoms against cobra species envenomations. It is proposed that for the preparation of antivenoms, if the immunization mixture includes venoms of *N. mossambica* and *N. nigricollis*, it is not strictly necessary to include *H. haemachatus* venom in the immunization scheme.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Productores mundiales de antivenenos para África Sub-sahariana.....	9
Cuadro 2. Ciclos de lavado de las minicolumnas de sefarosa-antiveneno para obtener la fracción no unida y unida de los venenos en estudio.	24
Cuadro 3. Actividades tóxicas y enzimáticas del veneno de <i>Hemachatus haemachatus</i> y de algunas especies de <i>Najas</i> del África sub-Sahariana.....	33
Cuadro 4. Neutralización de actividades tóxicas y enzimáticas inducidas por venenos homólogos y heterólogos de África Sub-sahariana por medio del antiveneno anti- <i>Hemachatus</i> -ICP.	39
Cuadro 5. Análisis de antivenómica de tercera generación del antiveneno monoespecífico anti- <i>Hemachatus</i> -ICP contra los venenos de <i>Hemachatus</i> y especies de <i>Naja</i> del África Sub-sahariana.	42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Análisis proteómico del veneno de *H. haemachatus*. (A) Cromatograma del veneno de *H. haemachatus* obtenido mediante RP-HPLC. (B) Gel de electroforesis SDS-PAGE (12% de acrilamida) de las fracciones separadas del veneno en condiciones reductoras. (C) Representación del proteoma completo del veneno de *H. haemachatus*. 3FTx: toxinas de tres dedos; PLA2: fosfolipasas A2; SVMP: metaloproteinasas; CRISP: proteínas secretoras ricas en cisteína; KTPI: proteínas inhibidoras tipo Kunitz. 27
- Figura 2. Comparación de la composición de familias de toxinas mayoritarias presentes en los venenos de cobras del África sub-Sahariana. 3FTx: toxinas de tres dedos; PLA₂: fosfolipasas A₂; SVMPs: metaloproteínas; CRISPs: proteínas secretoras ricas en cisteína. 31
- Figura 3. Lesiones en la piel de ratón causadas por la inyección de veneno de *H. haemachatus*. (A) Diámetro de la lesión inducida por la inyección intradérmica de 60 µg de veneno luego de 1, 2, 3 y 4 días ($p < 0,05$). (B) Fotografía macroscópica de la lesión inducida por la inyección intradérmica de PBS (control) y 60 µg de veneno luego de un día. (C) Fotografía microscópica de lesiones causadas por la inyección de PBS (control) y 60 µg de veneno luego de 1 y 4 días, teñidas con hematoxilina-eosina. Las flechas señalan cambios en la epidermis, presencia de infiltrado inflamatorio, edema y necrosis del *paniculos carnosus*. 34
- Figura 4. (A) Actividad letal y anticoagulante de las fracciones del veneno de *H. haemachatus* separadas mediante RP-HPLC y (B) composición relativa de toxinas de cada fracción. 37
- Figura 5. Representación de la capacidad máxima de unión de las diferentes toxinas presentes en los venenos de África Sub-sahariana inmovilizados en columnas de inmunoafinidad acopladas con antiveneno monoespecífico anti-Hemachatus (A, C, D, E) y Premium Serum and Vaccines (B).... 42

LISTA DE ABREVIATURAS

3FTx: Toxinas de Tres Dedos
CD-1: ratones multipropósito utilizados como modelos animales de investigación
cm: centímetros
cm²: centímetros cuadrados
CO₂: Dióxido de carbono
CRISP: Proteínas Secretoras Ricas en Cisteína
CaCl₂: cloruro de calcio
DL₅₀: Dosis Letal 50%
DMN: Dosis Mínima Necrotizante
F(ab')₂: Molécula compuesta por 2 Fab
Fab: *Fragment antigen binding* (inglés); fragmentos de unión de antígeno
g: gramos
HCl: Ácido clorhídrico
HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución
IgG: Inmunoglobulina tipo G
kDa: kilodalton
kg: kilogramos
KTPI: Proteínas inhibidoras tipo Kunitz
KCl: cloruro de potasio
LC 95%: límite de confianza del 95%
mg: miligramos
μL: microlitros
mL: mililitros
mm: milímetros
μm: micrómetros
nm: nanómetros
mM: milimolar
NaCl: Cloruro de Sodio
NaOH: Hidróxido de Sodio
PBS: Solución Amortiguadora de Fosfatos
pH: concentración de hidrogeniones

PLA₂: fosfolipasa tipo A₂

SDS-PAGE: Sodio duodecil sulfato - Electroforesis en Gel de Poliacrilamida

SVMP: metaloproteinasas de veneno de serpientes

WHO: Organización mundial de la Salud

TFA: ácido trifluoroacético



Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Andrés Sánchez Bernal, con cédula de identidad 303970497, en mi condición de autor del TFG titulado Evaluación profesional y taxonomía del sector de Herramientas biométricas y su comparación con métodos de saberes del género Maje en la toma de decisiones y autogestión basada por la preparación de un artículo científico para África

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:

Nombre Completo: Andrés Sánchez Bernal

Número de Carné: ACT120 Número de cédula: 303970497

Correo Electrónico: andres.sanchez@gmail.com / andres.sanchez@unccr.ac.cr

Fecha: 17/01/2020 Número de teléfono: 88556397

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Margarita Vargas Araya, Ph.D

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Problemática del envenenamiento ofídico en África

El envenenamiento ofídico es un problema de salud pública, con repercusiones sociales y económicas, de muchos países presentes en regiones tropicales y subtropicales del mundo (Brown, 2012; Chippaux, 1998; Gutiérrez et al, 2006). Recientemente, fue incluido por la Organización Mundial de la Salud en la lista de Enfermedades Tropicales Desatendidas (WHO, 2017). Las poblaciones presentes en estas regiones experimentan una alta tasa de morbilidad y mortalidad, debido al poco acceso a servicios de salud, y en ciertos casos, producto de la escasez de tratamientos efectivos (Kasturiratne et al., 2008).

De acuerdo con Chippaux (2008), se estima que ocurren cerca de cinco millones de casos por mordedura de serpiente anualmente en el mundo, con un total de muertes cercano a los 125.000. Un estudio previo publicado por este mismo autor, menciona que en África probablemente ocurren cerca de un millón de mordeduras por serpientes venenosas anualmente, de las cuales 20.000 de ellas ocasionan la muerte del individuo; sin embargo, únicamente 10.000 son reportadas por los servicios de salud respectivos (Chippaux, 2011). En África sub-Sahariana, la alta mortalidad por mordedura de serpientes venenosas se debe principalmente a la escasez de antiveneno, así como a estrategias de almacenamiento y distribución deficientes, personal médico mal capacitado y dificultad para acceder rápidamente a centros de salud (Chippaux et al., 2015; Gutiérrez et al., 2006).

1.2 Serpientes de la familia Elapidae en África

La gran cantidad de casos de envenenamientos en África, se debe a que, de las 3.500 especies de serpientes presentes en el mundo, este continente cuenta con aproximadamente 350 serpientes venenosas, representadas por cuatro familias: Colubridae, Lamprophiidae, Viperidae y Elapidae. Esta última, es una familia grande y diversa, presente en casi todo África (Lee et al., 2016) y responsable de un gran número de casos clínicos de envenenamiento.

La familia Elapidae cuenta con cerca de 40 especies en el continente africano, pertenecientes a los géneros *Aspidelaps*, *Boulengerina*, *Dendroaspis*, *Elapsoidea*,

Hemachatus, Naja, Paranaia, Hydrophis, Pseudohaje y Walterinesia (Chippaux et al., 2016).

1.2.1 Composición de los venenos de la familia Elapidae

Durante la última década, la caracterización de una gran variedad de venenos de serpientes de la familia Elapidae ha sido posible gracias al desarrollo de técnicas y estrategias para determinar la composición proteica de venenos de serpientes, denominadas como venómica (Calvete, 2013). Dichos estudios, en conjunto con estudios previos de caracterización biológica y estructural de toxinas aisladas, han permitido determinar la presencia de una gran variedad de familias de toxinas en dichos venenos, que se describen a continuación.

1.2.1.1 Toxinas de tres dedos (3FTx)

Corresponden a proteínas de baja masa molecular, se caracterizan por tener una estructura de tres lazos β emergiendo de un núcleo globular estabilizado por cuatro o cinco enlaces disulfuro, y por presentar diversos efectos tóxicos, principalmente asociados a neurotoxicidad y citotoxicidad (Kini, 2002; Tsetlin, 1999). Dentro de esta familia se encuentran α neurotoxinas, κ neurotoxinas, fasciculinas, toxinas muscarínicas, cardiotoxinas o citotoxinas, entre otras (Hegde et al., 2009).

1.2.1.2 Fosfolipasas A₂ (PLA₂)

Estas enzimas son de baja masa molecular (14-18 kDa) y pueden presentarse en estructuras multiméricas (Doley et al., 2009). Pueden inducir diferentes efectos, tales como neurotoxicidad, miotoxicidad local y sistémica, hipotensión, anticoagulación, inhibición de agregación plaquetaria y hemólisis, entre otros (Kini, 2003). A pesar de la diversidad de propiedades farmacológicas de esta familia, usualmente comparten un alto porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos, y por lo tanto, presentan similitud en su estructura terciaria.

1.2.1.3 Metaloproteinasas (SVMP)

Corresponden a enzimas dependientes de Zn^{2+} de masa molecular variada (20-100 kDa). De acuerdo a la composición de sus dominios, se clasifican como P I, P II, P III y P IV (Takeda et al., 2012), y son las principales responsables de la hemorragia local y sistémica inducida por venenos de serpiente. Las metaloproteinasas actúan mediante mecanismos diferentes tales como disrupción de la hemostasis mediada por efectos pro o anticoagulantes, inhibición de la agregación plaquetaria e inducción de actividades apoptóticas o pro inflamatorias (Gutiérrez et al., 2005).

1.2.1.4 Serino proteasas

Presentan masa molecular variada (25-70 kDa), y se caracterizan por tener la triada catalítica de aminoácidos serina, histidina y asparagina, así como presencia de numerosos enlaces disulfuro (Braud et al., 2000). Pueden inducir diferentes efectos como hipotensión y disrupción de la hemostasis mediada por defibrinogénación, o activación del complejo protrombina (Kini, 2005).

1.2.1.5 Proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISP)

Denominadas así debido a que presentan una gran cantidad de residuos de cisteína en la región C-terminal. El papel de estas toxinas durante el envenenamiento aún no es claro. Sin embargo, diferentes investigaciones han determinado que pueden interactuar con canales de potasio, bloquear las corrientes de calcio en las neuronas, y bloquear la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico en músculo esquelético y cardíaco, entre otros (Heyborne y Mackessy, 2010).

1.2.1.6 Desintegrinas

Corresponden a toxinas ricas en enlaces disulfuro, que pueden encontrarse como monómeros, dímeros o fragmentos que contienen dominios adicionales. De acuerdo a la longitud de la cadena de aminoácidos y el número de enlaces disulfuro, esta familia se clasifica en cinco grupos diferentes: cortas, medianas, largas, P III y diméricas (Calvete et al., 2005). Las desintegrinas se unen a las integrinas presentes en membranas celulares; por lo tanto, su efecto depende de la interacción con la célula blanco.

1.2.1.7 Proteínas inhibidoras tipo Kunitz (KTPI)

Las KTPI son toxinas de baja masa molecular, que cuentan con aproximadamente 50 a 60 residuos de aminoácidos estabilizados por tres puentes disulfuro. La mayoría de estas toxinas presentan estructuras plegadas α/β con un sitio activo conservado (P1) responsable de la unión y subsecuente inhibición de serino proteasas específicas (Mourão y Schwartz, 2013). Poseen gran variedad de funciones biológicas, entre las que se mencionan inhibición de una o más serino proteasas, bloqueo de canales iónicos, disrupción de la hemostasis, inflamación y fibrinólisis.

1.2.1.8 Dendrotoxinas

Son proteínas pequeñas aisladas de venenos del género *Dendroaspis* sp. Contienen aproximadamente entre 57 a 60 aminoácidos entrecruzados por tres puentes disulfuro, y tienen homología con las serino proteasas inhibidoras tipo Kunitz (Harvey y Robertson, 2004). Presentan poca o nula actividad anti-proteasa, pero tienen la capacidad de bloquear subtipos diferentes de canales de potasio dependientes de voltaje presentes en las neuronas.

1.2.2 Cobras de África sub-Sahariana

Las cobras representan el grupo de serpientes más relevante de la familia Elapidae en África, que engloba los géneros *Naja*, *Hemachatus*, *Pseudohaje* y *Walterinnesia* (Chippaux et al., 2016). El género más importante desde el punto de vista epidemiológico, corresponde a *Naja* sp. o cobras típicas, las cuales se dividen en tres subgéneros (Van et al., 2009; Wüster et al., 2018):

- Cobras escupidoras incluidas en el subgénero *Afronaja*: *N. ashei*, *N. katiensis*, *N. mossambica*, *N. nigricincta*, *N. nigricollis*, *N. nubiae* y *N. pallida*. Presentan veneno con efecto citotóxico, responsable del daño tisular y pocos efectos neurotóxicos.
- Cobras no escupidoras neurotóxicas incluidas en el subgénero *Boulengerina* representadas por cobras semiacuáticas (*N. nana*, *N. annulata*, *N. christyi* y *N. multifasciata*) y cobras de bosque (*N. melanoleuca*, *N. guineensis*, *N. savannula*, *N. subfulva* y *N. peroescobari*).

- Cobras no escupidoras neurotóxicas incluidas en el subgénero *Uraeus*: *N. anchietae*, *N. annulifera*, *N. arabica*, *N. haje*, *N. nivea* y *N. senegalensis*. Presentan veneno con efecto neurotóxico, alterando funciones neuromusculares.

Las cobras escupidoras han desarrollado un mecanismo de defensa caracterizado por elevar su cabeza y expandir su cuello, con el fin de verse más agresivas (Berthé et al., 2009). Adicionalmente, modificaron sus colmillos para tener la capacidad de escupir veneno a distancias cercanas a los 3 metros, dirigiéndolo hacia los ojos del atacante (Chippaux et al., 2016). La acción del veneno sobre los ojos ocasiona dolor intenso, irritación y puede dañar la córnea sino es rápidamente tratada. Producto de una mordedura por una serpiente escupidora, no se espera un envenenamiento sistémico; sin embargo es comúnmente frecuente, que producto de toxinas que actúan a nivel local, se formen úlceras y/o necrosis alrededor de la mordedura (Chippaux et al., 2016).

Cuando una serpiente con veneno citotóxico muerde a una persona, este ocasiona daños que pueden conllevar a la pérdida de función del miembro. Debido a que el accidente ofídico es una enfermedad que afecta mayoritariamente a poblaciones más vulnerables, los envenenamientos citotóxicos generan una carga socioeconómica considerable en los países en vías de desarrollo, al disminuir la mano de obra que trabaja directamente en actividades agrícolas (Chippaux, 2011; Harrison et al., 2009).

Por otra parte, cuando ocurren mordeduras por cobras neurotóxicas, generalmente se genera parálisis neurotóxica severa e inclusive letal. Dicha parálisis suele desarrollarse rápidamente como una parálisis flácida clásica descendente, generalmente se observa ptosis, un importante signo de advertencia (Chippaux et al., 2016). Datos clínicos acerca de mordeduras por cobras neurotóxicas, indican que el dolor local e inflamación es significativo, pero no se observa presencia de necrosis alrededor de la mordedura.

Con respecto de las especies pertenecientes a los géneros *Pseudohaje* y *Walterinnesia* sp., estas no ocasionan comúnmente accidentes por mordeduras. Sin embargo, basado en datos clínicos limitados, Chippaux et al. (2016) reportó que la cobra negra del desierto

(*Walterinnesia aegyptia*) causa únicamente efectos locales como dolor, inflamación, pero sin la presencia de ampollas o necrosis.

1.2.3 Serpiente escupidora *Hemachatus haemachatus*

La serpiente *Hemachatus haemachatus* también conocida como *Ringhals* o serpiente escupidora de cuello rojo, pertenece al grupo principal de cobras de la familia Elapidae (Wüster et al., 2007). Dentro de las serpientes africanas, es considerada una serpiente que muerde con frecuencia pero que no causa envenenamientos severos; por lo tanto, es clasificada como una serpiente de importancia médica categoría 2 (WHO, 2010). El género es representado por una única especie, estrechamente relacionada al género *Naja* sp.

H. haemachatus es una serpiente bastante común en el sur de África; sin embargo, se tiene poca información acerca de datos clínicos. De acuerdo con Chippaux et al. (2016), generalmente esta serpiente causa dolor local, inflamación y equimosis. No se ha observado formación de ampollas, necrosis y muerte por parálisis total del cuerpo. No obstante, es común observar muertes por parálisis respiratoria. Por su parte, Warrell (1995) menciona que los pacientes mordidos por esta serpiente presentan síntomas sistémicos tales como mareos, náusea, vómito, vértigo y pirexia leve. Algunos síntomas neurotóxicos se asocian a parálisis de la lengua y cuerdas vocales, inconsciencia, diplopía y disnea, hasta parálisis respiratoria. Entre los síntomas y signos locales leves que se presentan, se menciona hormigueo, ardor, hinchazón local leve y moretones.

La composición total del veneno de *H. haemachatus* no ha sido aún elucidada. Sin embargo, diversos autores han aislado toxinas de diferentes familias con funciones que se pueden relacionar con actividad neurotóxica, miotóxica, citotóxica y anticoagulante. Es importante recalcar que falta realizar un estudio integral de la composición proteica del veneno, así como un estudio toxinológico detallado. Dicha información permitirá predecir las implicaciones clínicas que tendría una mordedura por dicha serpiente, y si el veneno debe ser incluido o no en un futuro esquema de inmunización para la producción de antivenenos para el África sub-Sahariana.

Siendo que la serpiente *H. haemachatus* es una cobra escupidora con un veneno considerado predominantemente neurotóxico y citotóxico, cabe la posibilidad de que el proteoma del veneno presente similitudes con cobras escupidoras y/o neurotóxicas. Diferentes estudios han reportado la caracterización proteómica de los venenos de cobras escupidoras *N. ashei* (Hus et al., 2018), *N. katiensis*, *N. mossambica*, *N. nigricollis*, *N. nubiae* y *N. pallida* (Petras et al., 2011). Con respecto a las cobras neurotóxicas, hasta el momento se han reportado cuatro estudios: *N. melanoleuca* (Lauridsen et al., 2017), *N. annulifera* (Silva-de-Franca et al., 2019; Tan et al., 2020) y *N. haje* (Malih et al., 2014). Por lo que, es de gran interés la comparación proteómica y toxinológica del veneno de *H. haemachatus* con venenos de serpientes pertenecientes a ambos grupos de cobras.

1.3 Terapia con antivenenos para el tratamiento del envenenamiento ofídico

1.3.1 Generalidades de los antivenenos

Actualmente, el único tratamiento disponible para el envenenamiento por mordedura de serpientes venenosas es la administración parenteral de antivenenos. La producción de antivenenos a nivel industrial conlleva a la inmunización de caballos y ovejas, con venenos específicos de cada país o región. Estos antivenenos pueden ser monoespecíficos o poliespecíficos si se utiliza en la mezcla de inmunización uno o varios venenos, respectivamente (Gutiérrez y León, 2009).

El plasma hiperinmune obtenido luego de la inmunización es sometido a un proceso de fraccionamiento mediante el cual se pueden obtener tres tipos de formulaciones, dependiendo del proceso empleado: fragmentos monovalentes F(ab), fragmentos divalentes F(ab)² e inmunoglobulinas completas (León et al., 2011). Las inmunoglobulinas o sus fragmentos son capaces de unirse a las toxinas presentes en el veneno y neutralizar sus efectos tóxicos.

1.3.2 Respuesta inmunológica contra los venenos de serpiente

La producción de plasma animal hiperinmune para la producción de antivenenos se basa en la inyección repetida de veneno(s) siguiendo un esquema de inmunización específico. Dicho esquema busca estimular una respuesta inmune innata y adaptativa, que genere

anticuerpos capaces de neutralizar y remover las toxinas presentes en el veneno durante el tratamiento de un envenenamiento (León et al., 2011).

Cada una de las toxinas del veneno, es considerada como un antígeno, es decir una sustancia capaz de elicitar una respuesta asociada a su interacción con células del sistema inmune (principalmente linfocitos y células procesadoras de antígenos). La capacidad de los antígenos para inducir dicha respuesta se conoce como inmunogenicidad (Elves et al., 2000). Desde este punto de vista, los venenos de serpientes están conformados por cerca de un 98% de componentes inmunogénicos proteicos, encontrándose tanto proteínas con capacidad de inducir efectos tóxicos relevantes, como proteínas sin actividad tóxica (Mackessy, 2009).

La respuesta inmune contra los venenos de serpientes depende de diversos factores, tales como: inmunogenicidad (masa molecular, estructura terciaria y cuaternaria, grado de glicosilación y modificaciones post-traduccionales), abundancia en el veneno y dosis administrada. En algunos venenos existen componentes tóxicos relevantes que se encuentran presentes en bajas concentraciones, dificultando la generación de una adecuada respuesta inmune neutralizante. Finalmente, es importante mencionar que la ruta de administración del veneno, el historial genético del animal y el procesamiento de las toxinas, son factores que determinan la capacidad del sistema inmune del animal de reconocer cada toxina como extraña (León et al., 2011).

1.3.3 Especificidad de los antivenenos y reactividad cruzada

La mayoría de los antivenenos comerciales disponibles en África son poliespecíficos, y un paso crítico en su elaboración está directamente relacionado con la selección de los venenos a incluir en la mezcla de inmunización. Esta selección está basada en la importancia clínica de las serpientes y el conocimiento de los cuadros clínicos de los envenenamientos, para facilitar el diagnóstico de la especie responsable del accidente ofídico. Por último, debe considerarse la capacidad del antiveneno para neutralizar venenos tanto homólogos como heterólogos, con el fin de que estos presenten un amplio espectro de cobertura (Gutiérrez et al., 2013; Pla et al., 2017).

Diversos autores mencionan que existe una alta variación en la composición del veneno en diferentes niveles taxonómicos (género y especie), entre y dentro de poblaciones

e individuos de la misma especie, así como entre individuos juveniles y adultos (Calvete et al., 2009; Chippaux et al., 1991; Gutiérrez et al., 2017; Pla et al., 2017). Por lo tanto, estudiar el fenómeno de neutralización cruzada o su ausencia, permite definir cuáles venenos incluir en la mezcla de inmunización. La neutralización cruzada es posible debido a que los venenos de especies relacionadas comparten características bioquímicas, toxicológicas y antigénicas (Fry et al., 2008). La importancia de realizar este tipo de estudios radica en que muchos antivenenos disponibles neutralizan ciertas especies, pero no es claro si existe neutralización cruzada para asegurar el tratamiento del envenenamiento por otras especies, especialmente las de importancia médica poco comunes (Petras et al., 2011).

1.3.4 Situación de la disponibilidad de antivenenos en África

Actualmente, existen siete antivenenos comerciales utilizados en algunos países africanos (cuadro 1). Pese a que ha ocurrido un incremento en la cantidad de antivenenos en los últimos años, no se ha logrado mitigar la escasez de producto existente y el vacío que dejó la empresa Sanofi Pasteur al discontinuar la producción del antiveneno Fav-Afrique (Wolf et al., 2011). Otros países como Brasil y Colombia han desarrollado antivenenos experimentales, no obstante estos no han sido comercializados (Guidolin et al., 2016; Laing et al., 2003).

Cuadro 1. Productores mundiales de antivenenos para África Sub-sahariana

Antiveneno	Productor	Referencia
Antivipmyn® Africa	Instituto Bioclon S.A. de C.V.	Ramos-Cerrillo et al., 2008
EchiTAbG®	MicroPharm	Al-Abdulla et al., 2003; Laing et al., 1995
EchiTab-Plus-ICP®	Instituto Clodomiro Picado	Gutiérrez et al., 2005
Inoserp® Panafrican	Inosan Biopharma	Chippaux et al., 2015
Africa Snake Venom Antiserum®	VINS Bioproducts Ltd.	NR
Pan Africa Snake Venom Antiserum®	Premium Serums and Vaccines Pvt. Ltd.	NR
Polyvalent Snake Antivenom®	South African Vaccine Producers	NR

NR: no se encontraron publicaciones por parte de los productores/desarrolladores evaluando la eficacia preclínica de dichos antivenenos.

Por su parte, el Instituto Clodomiro Picado en el 2001 se involucró en un proyecto internacional con el Ministerio de Salud de Nigeria, la Universidad de Oxford y la Escuela de Medicina Tropical de Liverpool para desarrollar un antiveneno para Nigeria. Dicho antiveneno se produjo mediante la inmunización de caballos con venenos de *Bitis arietans*, *Echis ocellatus* y *Naja nigricollis* de Nigeria, y tiene la capacidad de neutralizarlos efectivamente (Gutiérrez et al., 2005). Adicionalmente, este antiveneno es eficaz en la neutralización de venenos de diferentes especies de los géneros *Echis* y *Bitis* (Segura et al., 2010), y *Naja* (Petras et al., 2011). En el 2010, se utilizó en un estudio clínico en Nigeria contra el veneno de *Echis ocellatus*. El antiveneno demostró controlar el envenenamiento sistémico ocasionado por esta serpiente, y presentó un 10% de reacciones adversas (Abubakar et al., 2010).

Más recientemente, el ICP trabajó en conjunto con una fundación en Suazilandia para desarrollar un antiveneno para dicho país. Las serpientes de importancia clínica consideradas para la elaboración del antiveneno correspondieron a *Bitis arietans*, *Dendroaspis polylepis*, *Hemachatus haemachatus*, *Naja annulifera* y *Naja mossambica*. La inclusión de estos venenos en el esquema de inmunización permitió ampliar el espectro de cobertura del EchiTab+ICP[®], logrando neutralizar dichos venenos, así como mantener la capacidad neutralizante de los venenos provenientes de la región oeste (Sánchez et al., 2016). Es importante considerar, que aún no se ha realizado un estudio detallado que indique si todos los venenos del Sur de África deberían ser incluidos en el esquema de inmunización. Por lo que el presente estudio pretende evaluar la inclusión de *H. haemachatus* en el esquema de inmunización.

1.4 Evaluación preclínica de la eficacia de los antivenenos

La complejidad de los venenos de serpientes y el amplio espectro de manifestaciones patológicas y patofisiológicas del envenenamiento producto de la interacción entre toxinas, representa un gran reto para la evaluación preclínica de la eficacia de los antivenenos. Los ensayos utilizados para evaluar la neutralización de los venenos de serpientes se clasifican en ensayos *in vivo* e *in vitro* (Gutiérrez et al., 2017).

1.4.1 Ensayos *in vivo*

Estos ensayos evalúan la capacidad de los anticuerpos presentes en el antiveneno de neutralizar diferentes efectos tóxicos inducidos por el veneno en modelos animales (León et al., 2011; Theakston et al., 2003). Actualmente, el estándar para evaluar la eficacia de los antivenenos producidos corresponde a la prueba de neutralización de letalidad. Algunos laboratorios adicionalmente evalúan la neutralización de otras actividades tóxicas, tales como hemorragia, dermonecrosis, defibrinogénación y miotoxicidad; especialmente cuando se desarrolla un nuevo antiveneno (Theakston & Reid, 1983; Segura et al., 2010; Petras et al., 2011).

1.4.2 Ensayos *in vitro*

Los ensayos *in vitro* evalúan la habilidad del antiveneno de formar complejos inmunes con el veneno mediante ensayos inmunoquímicos o neutralización *in vitro* de actividades enzimáticas del veneno (Gutiérrez et al., 2013). Recientemente, surgió una técnica proteómica que permite realizar un análisis inmunoquímico, conocida como antivenómica (Calvete et al., 2009). Esta técnica provee información relevante para determinar mezclas de venenos que presentan reconocimiento cruzado con los componentes más importantes de los venenos de una región particular (Gutiérrez et al., 2009); siempre y cuando se combine con ensayos de toxicidad preclínicos, por ejemplo neutralización de letalidad, actividad coagulante y hemorrágica, entre otros.

2. HIPÓTESIS

Las actividades tóxicas de los venenos de cobras africanas *Naja annulifera*, *Naja mossambica* y *Naja nigricollis* no son neutralizadas por un antiveneno obtenido con el veneno de *Hemachatus haemachatus*, debido a las diferencias antigénicas existente entre los venenos.

3. OBJETIVO GENERAL

Comparar el veneno de *Hemachatus haemachatus* con el veneno de las cobras *Naja annulifera*, *Naja mossambica* y *Naja nigricollis* en cuanto a su composición proteica, toxicidad y antigenicidad, para evaluar su inclusión como inmunógeno en la preparación de un antiveneno poliespecífico para África.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la composición proteica del veneno de *H. haemachatus* mediante análisis proteómicos y compararla con la de los venenos de las cobras *N. annulifera*, *N. mossambica* y *N. nigricollis*, para predecir las actividades tóxicas de este veneno.
2. Determinar el perfil toxinológico del veneno de *H. haemachatus* y compararlo con el de los venenos de *N. annulifera*, *N. mossambica* y *N. nigricollis*, para identificar las actividades tóxicas relevantes que el antiveneno debe neutralizar.
3. Evaluar la inmunoreactividad y neutralización de las actividades tóxicas de los venenos *H. haemachatus*, *N. annulifera*, *N. mossambica* y *N. nigricollis* por antivenenos homólogos y heterólogos, para determinar la similitud antigénica entre los venenos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Condiciones éticas

Este proyecto cumple con los Principios de las Guías Internacionales para la Investigación Biomédica que involucra Animales (CIOMS, 2012) y las guías ARRIVE para el reporte de experimentos *in vivo* (Kilkenny et al., 2010). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuido y Uso de Animales de la Universidad de Costa Rica (CICUA, acta 061-2019).

4.2 Venenos de serpientes

Se emplearon venenos de las serpientes *H. haemachatus*, *N. annulifera* y *N. mossambica*, obtenidos de especímenes adultos de Suráfrica y mantenidos en cautiverio en el Serpentario de African Reptiles & Venom Company, Suráfrica. El veneno de *N. nigricollis* se obtuvo de especímenes adultos provenientes de Nigeria y mantenidos en cautiverio en el serpentario de Latoxan. Todos los venenos fueron obtenidos por estimulación mecánica de la glándula de las serpientes, estabilizados por liofilización y conservados a -20 °C hasta su uso.

4.3 Caracterización proteómica del veneno *Hemachatus haemachatus*

El análisis cromatográfico del veneno se llevó a cabo siguiendo el protocolo experimental descrito por Petras et al. (2011). Se disolvieron 5 mg de veneno en 3 mL de 0,1% ácido trifluoroacético (TFA) y 5% acetonitrilo (solución A). El material insoluble se removió mediante un filtro de 0,2 µm (Sartorius Stedim). Las proteínas presentes en el filtrado se separaron mediante una columna C18 (250 x 4,6 mm con un tamaño de partícula de 5 µm, Agilent Technologies) en un HPLC de fase reversa con detector UV de onda variable (Agilent 1200 series, Agilent Technologies). Las proteínas se separaron en fracciones utilizando el siguiente gradiente: 0% solución B (95% acetonitrilo, 0,1% TFA) por 10 min, 0-15% solución B por 20 min, 15-45% solución B por 120 min y 45-70% solución B por 30 min, a un flujo de 1 mL/min. Las fracciones proteicas se detectaron a 215 nm y fueron colectadas manualmente para su posterior análisis; previamente se secaron en un evaporador centrífugo (Speed Vac, Savant).

Las proteínas presentes en cada fracción se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% bajo condiciones reductoras (Laemmli, 1970). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250, las bandas de interés se cortaron y se redujeron con 10 mM de ditioneitol, posteriormente se alquilaron con 50 mM de iodoacetamida e incubaron con tripsina bovina (50 mM en bicarbonato de amonio) durante la noche a 37°C, en tubos Lo-Bind® (Eppendorf). Los péptidos resultantes de la digestión se extrajeron del gel con 0,1% TFA y 50% acetonitrilo, posteriormente se concentraron mediante un evaporador centrífugo (Speed Vac, Savant). El producto resultante se disolvió con solución matriz (solución saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico disuelto en 0,1% TFA y 50% acetonitrilo). Un microlitro de muestra de cada preparación peptídica se colocó en una placa de MALDI (384 Opti-TOF, Applied Biosystems), se secaron con aire y se analizaron mediante espectrometría de masas en el equipo 4800-Plus-MALDI-TOF-TOF (Applied Biosystems). Se utilizaron calibraciones externas en cada corrida utilizando un estándar CalMix-5® (ABSciex). Los espectros se obtuvieron utilizando una intensidad de láser de 3100 a 500 disparos, y al menos 10 picos del espectro de masas se seleccionaron para realizar una disociación automática masas/masas en modo positivo a 1 KV (560 disparos/espectro, a una intensidad de laser de 3300). El espectro de masas obtenido se comparó con los espectros presentes en la base de datos Serpentes (Uniprot/SwissProt, fecha: 12 enero, 2016) usando el algoritmo Paragon® del software ProteinPilot v.4, con un nivel de confianza mayor o igual al 95%; de lo contrario se procedió a la interpretación manual y su posterior asignación a sus respectivas familias proteicas. La similaridad existente entre la secuencia de aminoácidos de los péptidos obtenidos entre las toxinas de *H. haemachatus* y otras especies de serpientes se determinó utilizando el programa BLAST (Altschul et al., 1990). La abundancia relativa de cada familia de proteínas presente en el veneno se calculó integrando el cromatograma (software ChemStation v.B.04.01, Agilent software) y los resultados del análisis densitométrico del gel de electroforesis (Image Lab Software, v 2.0.1-18, Bio-Rad Laboratories) para cada una de las fracciones obtenidas.

Adicionalmente, las fracciones más abundantes se sometieron a un análisis de masas mediante nESI-MS en el espectrómetro de masas QTrap3200 (Applied Biosystems). Muestras de 10 μ L se disolvieron en una solución de 50% v/v acetonitrilo y 0,1% v/v de ácido fórmico, cargadas en puntas capilares recubiertas de metal (Proxeon) y directamente

aplicados en la fuente de nano-iones. Los espectros se adquirieron en modo positivo multicargado a 1500 V, usando el software Analyst® v.1.6.2 (Sciex). La deconvolución de las series cargadas de iones multicargados se realizó con el software PeakView® v.2.1 (Sciex). En el caso de la proteína de alta masa molecular de la fracción G (evidenciada mediante SDS-PAGE, figura 1), la masa intacta se determinó mediante MALDI-TOF en modo linear positivo, usando 1000 disparos y con una intensidad de laser de 3600 en el equipo 4800 Plus Proteomics Analyzer.

4.4 Caracterización toxinológica de los venenos de *H. haemachatus*, *N. annulifera*, *N. mossambica* y *N. nigricollis*

4.4.1 Determinación de actividades tóxicas *in vivo*

4.4.1.1 Animales de laboratorio

Se utilizaron ratones de la cepa CD-1 de ambos géneros, con un peso corporal entre 18 a 20 g, proporcionados por el Bioterio del Instituto Clodomiro Picado. Durante los experimentos, los animales se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum*, en cajas de 42,5 x 26,2 x 18,5 cm mantenidas a 21°C con 64% de humedad y ciclos de luz de 12 horas (5-10 animales por caja). Al finalizar los experimentos, los animales se sacrificaron mediante inhalación con CO₂.

4.4.1.2 Actividad letal

Se inyectaron 200 µL de una solución con diferentes cantidades de veneno disuelto en PBS (0,14 M NaCl, 0,04 M fosfatos, pH 7,2) por vía intravenosa a grupos de cinco ratones (18-20 g) (Theakston & Reid, 1983). Se inyectaron dos ratones con 200 µL de PBS como control. Se determinaron las muertes ocurridas en un período de 24 horas y se calculó la dosis letal media (DL₅₀, cantidad de veneno que ocasiona muerte en la mitad de la población) mediante el análisis Probits (Finney, 1971).

4.4.1.3 Actividad dermonecrótica

Se siguió el procedimiento descrito por Gutiérrez et al. (2005). Diferentes cantidades de veneno se disolvieron en 100 µL de PBS, y se inyectaron mediante la vía intradérmica en

grupos de tres ratones (18-20 g). Se inyectaron dos ratones con 100 μ L de PBS como control. Luego de 72 h, los animales se sacrificaron y las lesiones necróticas en la superficie interna de la piel se midieron para determinar la dosis mínima necrótica (DMN), de acuerdo al procedimiento descrito por Jenkins et al. (2017). DMN corresponde a la cantidad de veneno que induce lesiones dermonecroticas con un diámetro de 5 mm.

Adicionalmente, se realizó un análisis histológico de lesiones causadas por el veneno de *H. haemachatus*, para lo cual se inyectaron grupos de tres ratones con 60 μ g de veneno disuelto en PBS por vía intradérmica. Se realizó una evaluación de la lesión causada en los ratones a diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 horas). Se determinó el daño de la lesión de acuerdo al procedimiento previamente descrito, y se tomó una muestra de la lesión para realizar los análisis histológicos siguiendo el procedimiento descrito por Rivel et al. (2016). Las muestras de piel de los tiempos 0 h y 24 h se fotografiaron para comparar la evolución de la lesión a nivel macroscópico.

4.4.1.4 Actividad mitotóxica

La miotoxicidad se determinó mediante la inyección de diferentes cantidades de veneno disuelto en 100 μ L de PBS, en el músculo gastrocnemio de cuatro ratones por grupo (18-20 g). Tres horas luego de la inyección, se anestesiaron los ratones con CO₂ y se tomaron muestras de sangre del plexo orbital con tubos capilares heparinizados. Se inyectaron cuatro ratones con 100 μ L de PBS como control. Las muestras se centrifugaron y se determinó la actividad CK en plasma utilizando el kit CK-NAC Unitest (Wiener, St Ingbert, Alemania). Se determinó la absorbancia de las muestras a 340 nm mediante un lector de placas (Cytation 3 Imaging Reader, BioTek®). La actividad CK se expresó en U/L y los resultados se determinaron como un promedio y su respectiva desviación estándar.

4.4.2 Determinación de actividades enzimáticas *in vitro*

4.4.2.1 Actividad fosfolipasa

Se determinó la actividad siguiendo el procedimiento descrito por Gutiérrez et al. (1986). Para tal fin, se utilizó como sustrato fosfolípidos de yema de huevo cruda, diluida 1:5 en una solución de 0,1 M Tris-HCl y 0,01 M de CaCl₂ (pH 8,5), en presencia de 1% de Tritón

X-100. Se realizaron mezclas de 1 mL de sustrato con 100 μ L de diferentes cantidades de veneno disueltas en PBS, las mezclas sustrato-veneno se incubaron por 15 min a 37 °C. Los ácidos grasos liberados se extrajeron y titularon con 0,018 M de NaOH de acuerdo al procedimiento descrito por Dole (1956). Se construyó una curva NaOH consumido versus concentración de veneno, y de esta forma se determinó la dosis de veneno que provoca un consumo de NaOH promedio. La actividad se expresó como micro equivalentes de ácido graso liberados por mg de proteína por minuto (μ Eq/mg min).

4.4.2.2 Actividad anticoagulante

El tiempo de recalcificación del plasma se determinó siguiendo el procedimiento propuesto por Pla et al. (2014), con ciertas modificaciones basadas en el método turbidimétrico por O'Leary y Isbister (2010). Diferentes cantidades de veneno se disolvieron en 100 μ L de buffer TBS (25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 3,4 mM KCl, pH 7,4) y se colocaron en una placa de microtitulación de 96 pozos incubada a 37 °C (Cytation 3 Imaging Reader, Biotek®). Con el fin de acelerar el tiempo de coagulación de las muestras, se adicionaron 10 μ L de una solución al 10% m/v de Neoplastine® a cada pozo, y se incubó la mezcla por 5 min a 37 °C. En un tubo de ensayo se preincubó el plasma a 37 °C, a cada muestra se le agregó 100 μ L de plasma y 4 μ L de CaCl₂ 0,4 M, esta mezcla se adicionó rápidamente a cada uno de los pozos mediante una pipeta multicanal. La placa de microtitulación se agitó por 5 segundos y se determinó la densidad óptica a 340 nm cada 30 segundos por un período de 30 min. Se utilizó como control plasma incubado con amortiguador TBS en lugar de veneno. Los tiempos de coagulación se determinaron considerando un aumento de la absorbancia mayor a 0,01 unidades previas a la última lectura. Este incremento en la absorbancia representó el aumento de la densidad óptica correspondiente con la formación del coágulo en la muestra bajo análisis. La actividad anticoagulante se expresó como la dosis mínima anticoagulante (DMA), es decir, la cantidad mínima de veneno que prolonga el doble el tiempo de recalcificación de la muestra control.

4.4.3 Análisis toxicovenómico de fracciones individuales del veneno de *H. haemachatus*

Se separaron 5 mg de veneno de *H. haemachatus* mediante HPLC de fase reversa (Agilent 1200 series, Agilent Technologies), siguiendo el procedimiento descrito anteriormente en la sección 4.3. Las fracciones más abundantes se colectaron, secaron y se disolvieron en buffer TBS (25 mM Tris, 137 mM NaCl, 3,4 mM KCl, pH 7,4). Dichas fracciones fueron analizadas según su actividad letal y anticoagulante, así como por su composición de familias de toxinas, para determinar aquellas fracciones de mayor interés desde el punto de vista de la toxicidad del veneno. Para la determinación de la actividad letal, la dosis se seleccionó tomando en consideración la abundancia de cada fracción en el veneno y asumiendo una dosis de veneno de 24 µg/g. Se estableció como letales aquellas fracciones que ocasionaron la muerte de los ratones en 24 h, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.4.1.2. Con respecto a la actividad anticoagulante, se evaluó cuantitativamente considerando la abundancia de cada fracción en el veneno y asumiendo una dosis de 0,16 µg/µL de plasma. Las fracciones anticoagulantes se determinaron de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 4.4.2.2.

4.5 Comparación del perfil de inmunoreactividad de cada veneno por antivenenos homólogos y heterólogos

4.5.1 Antiveneno heterólogo anti-*Naja* sp

Se utilizó un control de antiveneno poliespecífico F(ab)₂, producido por Premium Serum and Vaccines de la India (lote 062008, proteína 5 g/dL). Este antiveneno es elaborado mediante la inmunización de una mezcla de catorce venenos de serpientes de África. Dentro de las especies utilizadas para su producción se incluyen varias del género *Bitis*, *Echis*, *Dendroaspis* y *Naja* sp. Con respecto de este último género, se utilizan los venenos de *N. nigricollis*, *N. melanoleuca* y *N. haje* (Ainsworth et al., 2017).

4.5.2 Preparación de antiveneno homólogo anti-*H. haemachatus*

*4.5.2.1 Inmunización de caballos con el veneno de *H. haemachatus**

Para generar un antiveneno monoespecífico, se inmunizó un grupo de cuatro caballos (5 a 6 años, peso aproximado de 400-450 Kg) con veneno de *H. haemachatus*. Se siguió el procedimiento descrito por Freitas et al. (1991), con algunas variaciones. Los caballos se inyectaron vía subcutánea en una sola inyección a diferentes tiempos. La primera inyección consistió en veneno mezclado con adyuvante Freund completo (5 mg de veneno, día 1). Se realizó un refuerzo utilizando Freund incompleto (5 mg de veneno, día 23) y tres refuerzos en solución salina (2 mg de veneno, día 30, 32 y 34). Se dio un descanso de un mes y se aplicaron dos refuerzos más en Freund completo (5 mg de veneno, distanciados dos semanas entre ellos).

4.5.2.2 Purificación de anticuerpos por precipitación con ácido caprílico

Se sangraron los caballos 14 días después de la última inmunización, el plasma se separó mediante sedimentación de los glóbulos rojos, y se trató con 6,7% de ácido caprílico bajo agitación vigorosa por 60 min a temperatura ambiente (Rojas et al., 1994). Posteriormente, se removió el precipitado obtenido mediante filtración por gravedad. Se dializó el filtrado contra una solución 0,15 M de NaCl y 0,2% de fenol, se ajustó la proteína a 5 g/dL, y se filtró el producto final a través de 0.2 µm. El antiveneno formulado se almacenó a 4 °C hasta su posterior uso.

4.5.3 Evaluación de la neutralización cruzada de las actividades tóxicas de cada veneno por antivenenos homólogos y heterólogos

Se evaluó la neutralización de las actividades tóxicas de los cuatro venenos, utilizando un antiveneno monoespecífico anti-*Hemachatus* (cuatro neutralizaciones por actividad). Por lo tanto, se mezcló una cantidad constante de veneno (dosis reto) con varias diluciones del antiveneno. Las mezclas se incubaron a 37°C por 30 min antes de probar las mezclas en los ensayos *in vivo* e *in vitro* anteriormente detallados. Se utilizó como muestra control, solución de veneno incubado con PBS. Las dosis reto utilizadas para cada actividad corresponden a:

2 DL₅₀ para letalidad, 1 DMN para dermonecrosis, 20 µg para mitotoxicidad, 5 µg para fosfolipasa y 2 DMA para anticoagulante.

Para la actividad letal, dermonecrosis y fosfolipasa, la capacidad neutralizante del antiveneno se expresó como la dosis media efectiva (DE₅₀), definida como la relación µL de antiveneno/mg de veneno a la cual la actividad del veneno se redujo en un 50%. Para la actividad anticoagulante, la neutralización se expresó como dosis efectiva (DE), definida como la relación de µL de antiveneno/mg de veneno a la cual el tiempo de coagulación del plasma se redujo dos veces en comparación al tiempo de anticoagulación del plasma en presencia de veneno. Finalmente, para la actividad miotóxica, solo se utilizó una relación antiveneno/veneno.

4.5.4 Determinación de inmunoreactividad mediante antivenómica de tercera generación

4.5.4.1 Preparación de las columnas de afinidad con antiveneno homólogo y heterólogo

Se siguió el procedimiento descrito por Pla et al. (2017) para llevar a cabo antivenómica de tercera generación. Para dicho fin, los antivenenos anti-*Hemachatus* (anti-H) y Premium Serum and Vaccines (PSV) fueron previamente resuspendidos con agua MilliQ®, dializados con una membrana con tamaño de corte entre 6-8 kDa contra agua MilliQ® y finalmente liofilizados nuevamente.

Se procedió acoplar cada antiveneno a una matriz de 3 mL de Sepharose® 4B activada con CNBr (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Se pesó 0,8 g de sefarosa liofilizada (rehidratada se generan 3 mL de resina), posteriormente se hidrató con 30 mL de solución 1 mM de HCl a 4°C. En una columna de inunmoafinidad ABT sellada (Agarose Bead Technologies, España) se procedió a empacar la columna con 3 mL de sefarosa. Posteriormente, se lavó la resina con 15 mL de solución 1 mM HCl y dos lavados con 6 mL de amortiguador de acople (0,2 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3 ajustado con NaOH), para ajustar el pH de la columna entre 7,0-8,0.

A continuación, se pesó 125 mg de anti-H y 85 mg de PSV previamente liofilizados y se reconstituyeron en 6 mL de amortiguador de acople. Se centrifugaron las muestras a 4000 rpm por 10 min y se midió la concentración proteica de ambos antivenenos estimando la absorbancia a 280 nm. Se selló la salida inferior de las columnas y se agregó los 6 mL de ambos antivenenos resuspendidos (en una proporción 1:2 v/v gel/amortiguador). Se mezcló suavemente en un rotador y se dejó completar la reacción por 4 h a temperatura ambiente. Se recuperó la fracción no unida en tres tubos cónicos, realizando un primer lavado con 6 mL de amortiguador de acople (volumen total de 12 mL) y posteriormente dos lavados más con 6 mL de amortiguador. Se determinó la absorbancia a 280 nm de cada uno de los tubos, se sumó la concentración de proteína no acoplada y se restó a la concentración de proteína inicial, para determinar la proteína acoplada.

Posteriormente, se bloqueó el exceso de grupos reactivos con 12 mL de 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 a temperatura ambiente durante 4 h. Finalmente, se realizaron lavados haciendo seis ciclos de cambio de pH alto y bajo, respectivamente, utilizando tres volúmenes de columna con amortiguador de acetato (0,1 M acetato de sodio, 0,5 M NaCl, pH 4,0 ajustado con ácido acético) y tres volúmenes de columna con amortiguador tris (0,1 M Tris, 0,5 M NaCl, pH 8,0 ajustado con HCl), para eliminar lo que no se unió a la matriz. Las columnas se equilibraron con cinco volúmenes de amortiguador de trabajo (PBS, 20 mM buffer fosfatos, 150 mM NaCl, pH 7,4). De acuerdo a la cantidad de proteína acoplada a la resina, se prepararon las minicolumnas (Pierce Centrifuge Column, 0,8 mL) con aproximadamente 300 µL de matriz, se almacenaron en PBS-etanol 20% hasta su posterior uso.

4.5.4.2 Evaluación del perfil de inmunoreactividad de antivenenos homólogos y heterólogos

Se utilizaron cinco columnas acopladas con su respectivo antiveneno para determinar la inmunoreactividad existente entre venenos homólogos y heterólogos, una para cada concentración de veneno (100 µg, 300 µg, 600 µg, 900 µg y 1200 µg). Adicionalmente, se utilizó un control de IgG equina inespecífica y un control de matriz (sin anticuerpos acoplados) que se trabajaron con la concentración más alta de veneno (1200 µg).

Se pesó aproximadamente 15 mg de veneno, se resuspendió en PBS y se recuperó el sobrenadante luego de centrifugar la muestra a 13000 r.p.m. por 10 min. Se midió la concentración proteica mediante absorbancia a 280 nm para determinar la concentración de proteína. Se determinó el volumen de veneno para tener una concentración de 100 µg, 300 µg, 600 µg, 900 µg y 1200 µg para cada una de las columnas, el volumen se completó a 300 µL con PBS. Previo a la incubación, se equilibraron las columnas con 900 µL de PBS, se sellaron con parafilm y se incubaron con el veneno por 1 h a 25 °C.

Se recuperó las fracciones no unida y unida de los venenos, realizando lavados de acuerdo a como se detalla en el cuadro 2. Luego de la incubación del veneno con la matriz, se lavó la mini columna con PBS-agua MilliQ® hasta que toda la fracción no unida se recuperó de la columna. Se realizó un lavado con 900 µL de PBS que no se recuperó para eliminar cualquier proteína remanente presente en la columna. Posteriormente, la fracción de veneno unida a la columna se eluyó con una solución 0,1 M glicina, pH 2,7. El pH de la fracción unida se ajustó posteriormente entre 6,9-7,1, con una solución 1 M Tris-HCl, pH 9,0, utilizando una relación de 30 µL de amortiguador de neutralización por cada 300 µL de buffer de elución. Finalmente, se realizó un último lavado con 900 µL de amortiguador de elución (no se recuperó), 900 µL de PBS y se almacenaron las mini columnas en 300 µL de PBS-etanol 20%. De cada concentración evaluada, se tomó una muestra representativa que se concentró hasta 40 µL mediante un evaporador centrífugo (Savant Speed Vac, ThermoFisher Scientific, USA).

Cuadro 2. Ciclos de lavado de las minicolumnas de sefarosa-antiveneno para obtener la fracción no unida y unida de los venenos en estudio.

Fracción	Concentración (μg)	Volumen de lavados (μL)					Total (μL)	Muestra (μL)
		0	1	2	3	4		
No unido	100	350	600				950	950
	300	350	600				950	950
	600	350	600	600			1550	775
	900	350	600	600	600		2150	717
	1200	350	600	600	600	600	2750	688
	1200-CM	350	600	600	600	600	2750	688
	1200-CI	350	600	600	600	600	2750	688
Unido*	100	300	600				990	990
	300	300	600				990	990
	600	600	600	600			1980	990
	900	600	600	600	600	300	2970	990
	1200	600	600	600	600	300	2970	990
	1200-CM	600	600	600	600	300	2970	990
	1200-CI	600	600	600	600	300	2970	990

Los productos concentrados se fraccionaron mediante HPLC de fase reversa (Agilent LC 1100 High Pressure Gradient System) equipado con una columna C18 Discovery® BioWide Pore (15 cm x 2,1 mm, tamaño de partícula de 3 μm , tamaño de poro de 300 Å, Supelco) y un detector DAD (Agilent Technologies). Para la elución de las proteínas, se utilizó un flujo de 0,4 mL/min bajo un gradiente lineal de 0,1 % TFA (solución A) y 0,1% TFA en acetonitrilo (solución B), gradiente isocrático al 5% de solución B por 1 min, seguido de 5-25% solución B por 5 min, 25-45% solución B por 35 min, y 45-70% solución B por 5 min. Se utilizó como controles de veneno, 100 μg y 300 μg disueltos en 40 μL de solución A. La detección de proteínas se realizó a una longitud de onda de 215 nm con una longitud de onda de referencia de 400 nm.

La fracción de toxinas no inmunocapturadas se estimó como una relación relativa del área del cromatograma de las toxinas recuperadas en la fracción no unida (NU) y la fracción unida (U), utilizando la siguiente ecuación:

$$\% NU_i = 100 - \left(\frac{U_i}{U_i + NU_i} \times 100 \right)$$

U_i corresponde a la misma proteína “ i ” en el cromatograma de la fracción no unida y unida. Para aquellas toxinas con muy alta afinidad por el antiveneno, el porcentaje de toxinas no inmunocapturadas “ ti ” (% NU_{ti}) se calculó como la relación entre las áreas del cromatograma del mismo pico recuperado de la fracción no unida (NU_{ti}) y del veneno completo (V_{ti}), utilizando la siguiente ecuación:

$$\% NU_{ti} = \left(\frac{NU_{ti}}{V_{ti}} \right) \times 100$$

4.6 Análisis estadístico

Las diferencias significativas entre los valores de letalidad y su neutralización por el antiveneno anti-*Hemachatus* se determinó mediante el traslape de los intervalos de confianza al 95%, donde valores que no se traslapan entre sí son considerados significativamente diferentes. Con respecto a las demás actividades tóxicas y enzimáticas evaluadas, así como su neutralización por los antivenenos homólogos y heterólogos, las diferencias se evaluaron mediante una prueba no paramétrica de Mann-Whitney mediante el software Minitab® v.16.1.0.0. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando los valores de $P < 0,05$.

Con respecto al análisis histológico de lesiones causadas por el veneno de *H. haemachatus*, se realizó un análisis estadístico para determinar la diferencia significativa entre el diámetro de las lesiones a los diferentes tiempos utilizando la prueba de Mann-Whitney mediante el software Minitab® v.16.1.0.0.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización proteómica del veneno de *H. haemachatus* y su comparación con venenos del género *Naja* sp

Hemachatus haemachatus, o serpiente escupidora de cuello rojo, es una serpiente de importancia clínica en el sur de África (WHO, 2010). Diferentes estudios han aislado y caracterizado toxinas de este veneno; sin embargo, a la fecha no se contaba con una caracterización del veneno completo. El presente estudio permitió identificar los componentes proteicos individuales del veneno, su asociación a familias de toxinas y establecer los porcentajes correspondientes de cada familia con respecto al veneno completo.

El perfil de elución obtenido por RP-HPLC muestra que el veneno presenta una complejidad en cuanto al número de fracciones cromatográficas o picos; estos resultados muestran similitud con estudios previos realizados en venenos de elápidos relacionados (Petras et al., 2011; Lauridsen et al., 2017; Tan et al., 2020) (figura 1A). El análisis de cada una de las fracciones del veneno en un gel de electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras permitió determinar presencia de proteínas de masas moleculares diferentes (figura 1B).

La composición del veneno de *H. haemachatus* abarca 8 familias de toxinas (figura 1C). Las familias con mayor proporción corresponden a toxinas de tres dedos (3FTx) y fosfolipasas A₂ (PLA₂). Seguido de metaloproteinasas (SVMs), proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISPs) y proteínas inhibidoras tipo Kunitz (KTPI). El porcentaje restante de toxinas se encuentra relacionado a familias presentes en proporciones muy bajas, como es el caso de cistatinas, factores de crecimiento de nervio (NGF), ohanina/vesprina y un porcentaje pequeño que no se logró caracterizar. A continuación, se evaluará la presencia de cada familia de toxina encontrada en el veneno de *H. haemachatus* siguiendo la metodología de caracterización proteómica conocida como “bottom-up”.

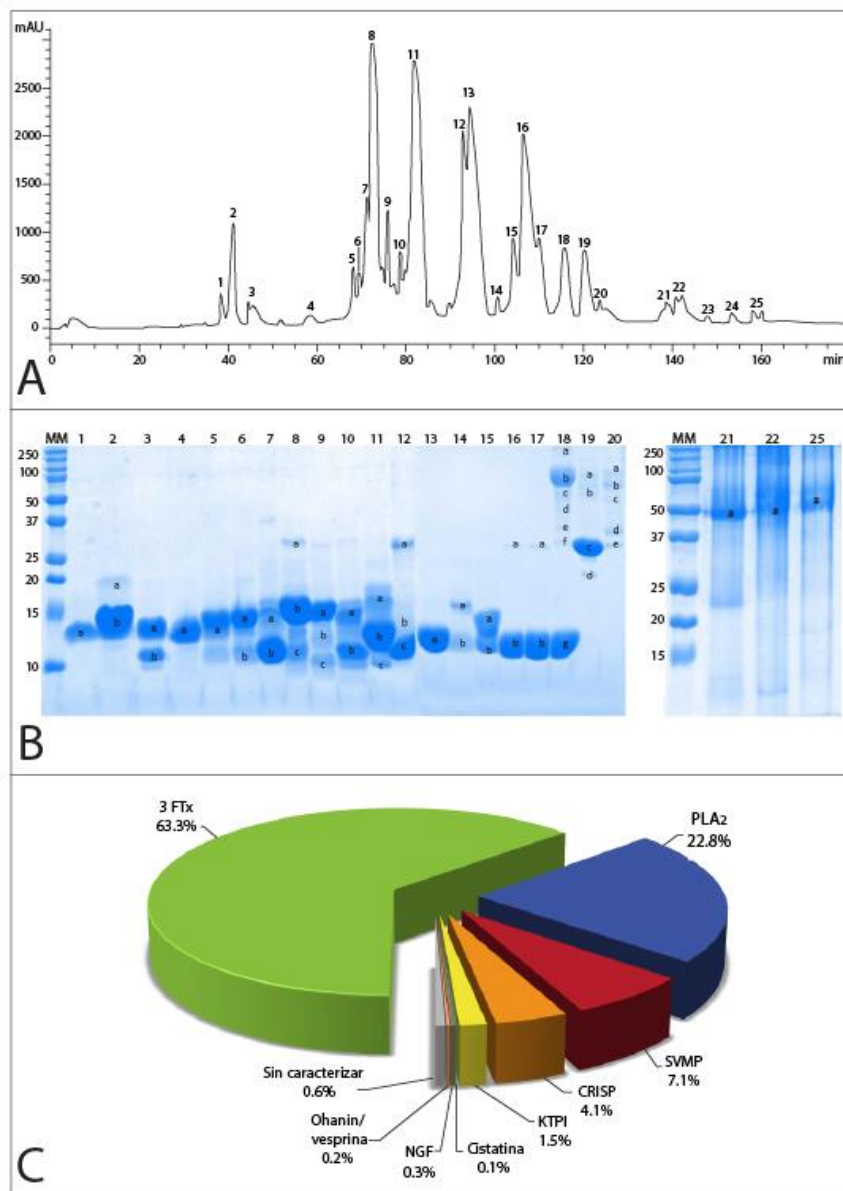


Figura 1. Análisis proteómico del veneno de *H. haemachatus*. (A) Cromatograma del veneno de *H. haemachatus* obtenido mediante RP-HPLC. (B) Gel de electroforesis SDS-PAGE (12% de acrilamida) de las fracciones separadas del veneno en condiciones reductoras. (C) Representación del proteoma completo del veneno de *H. haemachatus*. 3FTx: toxinas de tres dedos; PLA₂: fosfolipasas A₂; SVMP: metaloproteinasas; CRISP: proteínas secretoras ricas en cisteína; KTPI: proteínas inhibidoras tipo Kunitz.

A. Toxinas de tres dedos (3FTx)

El análisis proteómico realizado al veneno de *H. haemachatus* muestra que está compuesto en su mayoría por 3FTx (63,3% de abundancia). Algunos miembros de esta familia se encontraron entre los picos 1 a 18 del cromatograma (figura 1A, anexo 1). De acuerdo al patrón electroforético de las bandas presentadas en la figura 1B, se observa que algunas bandas no coinciden con la masa molecular de las 3FTx (aproximadamente entre 6 a 8 kDa). El análisis de los picos mayoritarios del veneno mediante nESI-MS (anexo 2), demostró que las bandas corresponden a proteínas pequeñas (3FTx) y que presentaron un patrón anómalo de migración en el gel SDS-PAGE. Por otra parte, los resultados indican que la migración anómala no se debe a la formación de dímeros covalentes, puesto que en la espectrometría de masas no se rompen los enlaces disulfuro y los geles se corrieron bajo condiciones reductoras.

Dentro de las 3FTx encontradas en el veneno, una alta proporción corresponde a citotoxinas, algunas de las cuales han sido identificadas previamente (anexo 1). Una de las más abundantes corresponde a la toxina 9B/BB (citotoxina 1, pico 9 y 11) con una abundancia de 15,4%; esta toxina presenta una baja toxicidad (33,5 µg/g ratón, inyección i.v.) y pertenece al grupo huérfano XVI a la subfamilia de cadena corta (Joubert, 1977). La toxina 12A (citotoxina 2, pico 12 y 13) y la toxina 11/11A (citotoxina 3, picos 15 y 16), se encuentran en el veneno con una abundancia de 12% cada una. De acuerdo a Cheymol et al. (1974) ambas citotoxinas presentan actividad cardiotoxica, pero carecen de actividad neurotóxica.

Recientemente, se describió una citotoxina 1 homóloga denominada hemacatoxina (Girish et al., 2012), la cual se identificó en el pico 13 con un 6,7% de abundancia (figura 1A, anexo 1). Esta toxina difiere en dos posiciones de aminoácidos con la citotoxina 1 y muestra una alta similitud estructural con cardiotoxinas tipo P; por lo tanto, es probable que presente actividad cardiotoxica y citotóxica.

El análisis mediante espectrometría de masas permitió determinar proteínas con homología a las toxinas IV y II, presentes en los picos 2 y 3 del cromatograma, respectivamente (figura 1A). Ambas toxinas pertenecen a la subfamilia de cadena corta,

específicamente a las neurotoxinas α tipo I (Strydom y Botes, 1971). Estas toxinas tienen la capacidad de unirse al receptor de músculo de acetilcolina nicotínico (nAChR), afectando la transmisión neuromuscular mediante la inhibición de la unión entre la acetilcolina y el receptor, causando parálisis flácida (Strydom y Botes, 1971; Bengis y Noble, 1976). Adicionalmente, en el pico 7 se encontró la toxina CM-1b en muy baja proporción, la cual pertenece al grupo huérfano XX de la subfamilia de cadena corta y presenta una baja toxicidad (11,7 $\mu\text{g/g}$ ratón), probablemente debido al reemplazo de tres aminoácidos invariantes usualmente encontrados en neurotoxinas (Joubert y Taljaard, 1980).

B. Fosfolipasas A_2 (PLA_2)

Las fosfolipasas A_2 conforman el segundo grupo de familia de toxinas más abundantes del veneno de *H. haemachatus*, con un 22,8%, donde se observó una mayor predominancia de la PLA_2 básica DE-I (figura 1, anexo 1). Esta toxina es una enzima conformada por 119 aminoácidos con una masa molecular de 13.500 Da, que también puede ser encontrada en el veneno como una isoforma, DE-II (Joubert, 1975). Un estudio realizado con la toxina DE-I sobre plaquetas humanas demostró que hidroliza predominantemente fosfatidilcolina y en menor proporción fosfatidiletanolamina (Wang et al., 1987). Otro estudio determinó que esta enzima no provoca hemólisis sobre eritrocitos, pero actúa hidrolizando fosfolípidos expuestos (Condrea et al., 1980). La PLA_2 DE-I presenta similitud en su secuencia con la PLA_2 básica de *Naja nigricollis*, sin embargo, la DE-I es menos tóxica, con valores de letalidad de 8,6 mg/Kg y 0,63 mg/Kg, respectivamente (Condrea et al., 1980).

C. Metaloproteinasas (SVMPs)

El veneno de *H. haemachatus* presentó SVMPs en la fracción más hidrofóbica del cromatograma (picos 21 a 25, figura 1, anexo 1), con un 7,1% de abundancia. Es importante considerar que en el caso de venenos de elápidos, las SVMPs usualmente no suelen ser hemorrágicas y tienden a presentar especificidad por sustratos de forma restringida, como por ejemplo hidrólisis de factores de complemento o factor de von Willebrand (Hamako et al., 1998; Shoibonov et al., 2005). El efecto farmacológico de estas enzimas presentes en venenos de cobras escupidoras debe ser estudiado más a fondo. Probablemente juegan un

papel en la patofisiología del envenenamiento, o bien podrían estar relacionadas con la inmovilización y muerte de las presas que forman parte de su dieta regular.

D. Otras familias de toxinas

Las proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISPs) están presentes en una baja proporción en el veneno de *H. haemachatus* (4,1% de abundancia), algunas de las cuales eluyeron en los picos 16 a 20 del cromatograma (figura 1A, anexo 1). Matsunaga et al. (2009) reportaron una CRISP presente en este veneno denominada hematina (código de acceso P0DL17). Esta toxina inhibe canales de potasio activados por calcio y/o voltaje, así como al receptor del canal de liberación de calcio/rianodina. Adicionalmente, se encontraron otras toxinas homólogas a CRISPs presentes en otras especies, e.g. latisemina, DIS1 y Sut-27.

En algunos picos del cromatograma se identificó presencia de péptidos relacionados a proteínas inhibitoras tipo Kunitz (KTPI), particularmente correspondientes a la toxina básica inhibidora de proteasas 2 (1,5% de abundancia). Esta toxina presenta 57 aminoácidos y cuenta con una masa molecular de 6,9 kDa, y presenta efectos inhibitorios en proteínas tipo serino-proteasas de mamíferos, como por ejemplo tripsina, α -quimotripsina, calicreína y plasmina (Hokama et al., 1976). Otro inhibidor de proteasas fue encontrado en el veneno de *H. haemachatus* presente en el pico 18 del cromatograma (0,1% de abundancia), esta toxina corresponde a un homólogo de cistatina de *M. ikaheka*, la cual es un inhibidor de cisteína-proteasas (Richards et al., 2011).

Una toxina tipo ohanina se identificó en el pico 14 en una proporción muy baja (0,2% de abundancia), la cual presenta homología con la taicobrina de *Naja kaouthia*. La ohanina presente en *Ophiophagus hannah* genera efectos hiperalgésicos y de hipolocomoción en ratones, por lo tanto, actúa a nivel del sistema nervioso central (Yuh et al., 2005). Finalmente, se encontró una toxina homóloga a NGF de *W. aegyptia* en el pico 10 del veneno, la cual presenta funciones relacionadas a factores de crecimiento.

Con respecto a la comparación del veneno de *H. haemachatus* con los venenos de las otras cobras bajo estudio, la composición del veneno de *H. haemachatus* es ligeramente diferente de las cobras africanas *Naja mossambica*, *N. nigricollis* (Petras et al., 2011), y *N. annulifera* (Tan et al., 2020), presentando variaciones en la proporción de 3FTx, PLA₂s,

SVMPs y CRISPs (figura 2). Tomando en consideración la sintomatología clínica reportada durante los envenenamientos y los estudios preclínicos, los venenos bajo estudio se pueden clasificar en dos grupos: venenos neurotóxicos (*H. haemachatus* y *N. annulifera*) y venenos citotóxicos (*N. mossambica* y *N. nigricollis*) (Blaylock, 2005; Petras et al., 2011; Rivel et al., 2016; Sánchez et al., 2017).

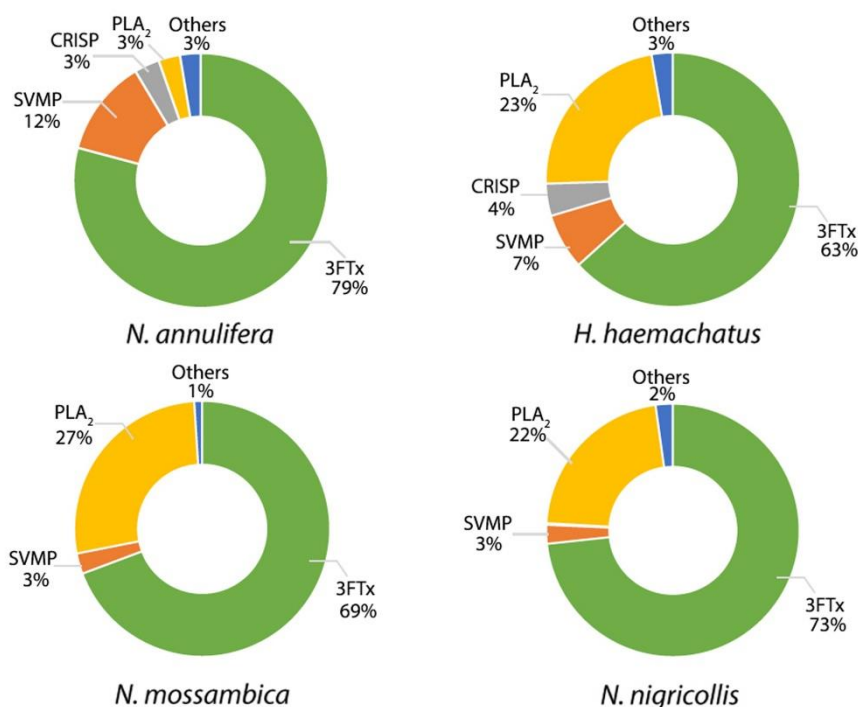


Figura 2. Comparación de la composición de familias de toxinas mayoritarias presentes en los venenos de cobras del África sub-Sahariana. 3FTx: toxinas de tres dedos; PLA₂: fosfolipasas A₂; SVMPs: metaloproteínas; CRISPs: proteínas secretoras ricas en cisteína.

Los estudios proteómicos “bottom-up” realizados con estos venenos (figura 2), muestran que el mayor porcentaje de 3FTx lo presenta el veneno de *N. annulifera* (79,1%) en comparación a las cobras escupidoras *N. nigricollis*, *N. mossambica*, y *H. haemachatus* (73,3%, 69,3% y 63,1%, respectivamente) (Petras et al., 2011; Sánchez et al., 2018). Todos los venenos muestran predominancia de toxinas de 3FTx tipo citotoxina, en comparación a toxinas tipo neurotoxina. Venenos con una alta proporción de esta familia de toxinas podrían presentar actividad anticoagulante, citotóxica y neurotóxica (Kini y Doley, 2010; Utkin, 2019).

Con respecto al contenido de PLA₂, *N. annulifera* presenta el menor contenido de PLA₂ (2,7%), seguido por *N. nigricollis* y *H. haemachatus* (22,8% y 21,9%, respectivamente), y *N. mossambica* con el mayor contenido de esta familia de toxinas (27,1%, figura 2). Esta familia de toxinas puede ser la responsable de diferentes efectos tóxicos de los venenos en estudio como anticoagulación, hemolisis, miotoxicidad y neurotoxicidad (Doley et al., 2009).

Por otra parte, las cobras escupidoras *N. mossambica* y *N. nigricollis* presentaron una baja proporción de SVMPs (2,6% y 2,4%, respectivamente). No obstante, los venenos de *H. haemachatus* y *N. annulifera* presentaron una mayor proporción de SVMPs (7,1% y 12,3%, respectivamente). En términos generales, a pesar de que los venenos en estudio presentaron SVMPs, usualmente los venenos de serpientes de la familia Elapidae carecen de actividad proteolítica alguna (Tambourgi et al., 1994).

Finalmente, los venenos neurotóxicos de *N. annulifera* y *H. haemachatus* presentaron una mayor proporción de CRISPs (3,2% y 4,1%, respectivamente), en comparación a los venenos citotóxicos de *N. mossambica* y *N. nigricollis*. Dicha familia puede exhibir una variedad de actividades biológicas, siendo la más importante la inhibición de canales iónicos (Matsunaga et al., 2009). Estas diferencias en la composición de CRISPs, resulta interesante de explorar, con el fin de explicar la patofisiología del envenenamiento por serpientes neurotóxicas.

5.2 Caracterización toxinológica de los venenos *H. haemachatus*, *N. annulifera*, *N. mossambica* y *N. nigricollis*

5.2.1 Actividades tóxicas de los venenos *H. haemachatus*, *N. annulifera*, *N. mossambica* y *N. nigricollis*

El cuadro 3 muestra el perfil toxinológico de los venenos en estudio. En relación a la actividad letal de los venenos (DL₅₀), los venenos más letales evaluados corresponden a las cobras escupidoras *N. mossambica* y *N. nigricollis* (20,6 y 22,6 µg/ratón, respectivamente). Cuando se comparan estos venenos con otras cobras escupidoras, se observan valores similares de letalidad, por ejemplo, *N. katiensis* y *N. pallida* (27,0 y 17,0 µg/ratón; Petras et al., 2011). Por otra parte, en los venenos neurotóxicos de *H. haemachatus* y *N. annulifera*, la

letalidad en ratones se asocia con neurotoxicidad, debido a que estos mueren con síntomas de parálisis respiratoria. Estos venenos resultaron ser menos letales (36,4 y 51,2 $\mu\text{g}/\text{ratón}$, respectivamente) comparados con otras cobras neurotóxicas de África sub-Sahariana, por ejemplo: *N. haje* (12,0-12,3 $\mu\text{g}/\text{ratón}$; Casasola et al., 2009; Laing et al., 2003), *N. nivea* (8,2 $\mu\text{g}/\text{ratón}$; Casasola et al., 2009), y *N. melanoleuca* (6,5-12,5 $\mu\text{g}/\text{ratón}$; Casasola et al., 2009; Lauridsen et al., 2017).

Cuadro 3. Actividades tóxicas y enzimáticas del veneno de *Hemachatus haemachatus* y de algunas especies de *Najas* del África sub-Sahariana.

Actividad ¹	<i>H. haemachatus</i>	<i>N. annulifera</i>	<i>N. mossambica</i>	<i>N. nigricollis</i>
Letalidad ($\mu\text{g}/\text{ratón}$)	36,4 (28,6-50,5) ^a	51,2 (42,1-68,4) ^a	20,6 (16,4-24,5) ^b	22,6 (18,4-27,0) ^b
Dermonecrótica (DMN, μg)	ND	ND	53,58 \pm 14,90 ^c	28,44 \pm 5,82 ^d
Miotóxica (U/L CK)	1192 \pm 199 ^e	1282 \pm 13 ^e	2420 \pm 22 ^f	1035 \pm 85 ^e
PLA ₂ ($\mu\text{Eq}/\text{mg}/\text{min}$)	241 \pm 49 ^g	NA	266 \pm 6 ^g	249 \pm 27 ^g
Anticoagulante (DMA, μg)	1,00 \pm 0,01 ^h	3,42 \pm 0,54 ⁱ	0,51 \pm 0,16 ^j	0,26 \pm 0,09 ^k

¹ La letalidad es expresada como dosis media letal (DL₅₀), la actividad anticoagulante como dosis mínima anticoagulante (DMA), la actividad dermonecrótica como dosis mínima necrotizante (DMN), la actividad miotóxica como actividad CK en U/L con 20 μg de veneno, y la actividad PLA₂ expresada como μEq de ácidos grasos liberados por mg de proteína por min. ² Los resultados se presentan como el promedio \pm desviación estándar, para el caso de la letalidad como dosis media letal y sus respectivos intervalos de confianza al 95%. ³ ND: actividad no determinada. Para cada actividad, valores con el mismo superíndice indica que los valores no son significativamente diferentes entre sí.

Estudios realizados por Rivel y colaboradores (2016) reportaron que las citotoxinas de la familia de 3FTx son las responsables de la actividad dermonecrótica observada durante los envenenamientos de la cobra escupidora *N. nigricollis*. De las tres cobras escupidoras en estudio, *N. nigricollis* presentó la actividad dermonecrótica más alta (DMN = 28 $\mu\text{g}/\text{ratón}$), seguido de *N. mossambica* (DMN = 54 $\mu\text{g}/\text{ratón}$) (cuadro 3). Sin embargo, dicha actividad no se presentó en los venenos de *H. haemachatus* y *N. annulifera*; para ambos casos se observó un área blanca no necrótica a nivel macroscópico. Cuando los ratones se inyectaron intradérmicamente con dosis sub-letales de 60 μg de veneno de *H. haemachatus* (figura 3), se observó macroscópicamente una lesión blanca de unos 7 mm de diámetro, rodeada por un

anillo hiperémico. El tamaño de la lesión ocasionada por el veneno disminuyó significativamente con respecto al tiempo (figura 3A, $p < 0,05$).

Análisis histológicos de las lesiones luego de 24 h de la inyección de veneno, revelaron engrosamiento de la epidermis, pérdida de folículos pilosos de la piel, presencia de infiltrado inflamatorio, edema y formación de trombos en los vasos capilares que podrían causar isquemia (figura 3C). Adicionalmente, se observó necrosis del musculo *paniculos carnosus*. Por otra parte, no se observaron úlceras o necrosis, hemorragia o pérdida de epidermis. El análisis de las lesiones a las 96 h post inyección, mostraron que la epidermis recuperó su grosor normal con presencia de folículos pilosos, pero aún se mantuvo la presencia de infiltrado inflamatorio y edema. En términos generales, se observó una rápida recuperación de la lesión, por lo que se confirma que, a pesar de ser una cobra escupidora, este veneno carece de actividad tóxica dermonecrótica evidente en este modelo animal.

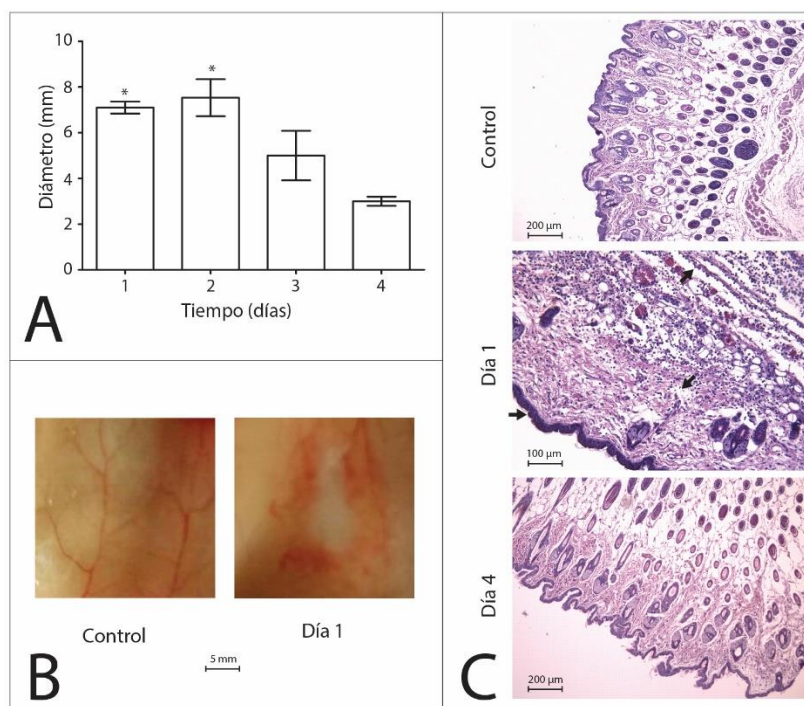


Figura 3. Lesiones en la piel de ratón causadas por la inyección de veneno de *H. haemachatus*. (A) Diámetro de la lesión inducida por la inyección intradérmica de 60 µg de veneno luego de 1, 2, 3 y 4 días ($p < 0,05$). (B) Fotografía macroscópica de la lesión inducida por la inyección intradérmica de PBS (control) y 60 µg de veneno luego de un día. (C) Fotografía microscópica de lesiones causadas por la inyección de PBS (control) y 60 µg de

veneno luego de 1 y 4 días, teñidas con hematoxilina-eosina. Las flechas señalan cambios en la epidermis, presencia de infiltrado inflamatorio, edema y necrosis del *paniculous carnosus*.

Con respecto de la actividad miotóxica, todos los venenos indujeron un incremento de la actividad CK en plasma cuando se inyectaron 20 μg de veneno en el músculo gastronemio de los ratones (cuadro 3). El veneno de *N. mossambica* presentó la actividad más alta, seguido de *N. annulifera*, *H. haemachatus* y *N. nigricollis*. Estudios previos con el veneno de *N. nigricollis* demostraron que el daño ocasionado al músculo se debe a la acción de 3FTx tipo citotoxinas (Rivel et al., 2016), lo cual también fue sugerido para el veneno de *H. haemachatus* (Sánchez et al., 2018). Para los venenos de *N. annulifera* y *N. mossambica*, se deben realizar estudios adicionales para identificar las toxinas responsables de su miotoxicidad.

5.2.2 Actividades enzimáticas de los venenos *H. haemachatus*, *N. annulifera*, *N. mossambica* y *N. nigricollis*

Los resultados muestran una correlación entre el contenido de PLA₂ y la cuantificación de dicha actividad enzimática para cada uno de los venenos. Es importante mencionar, que para el veneno de *N. annulifera*, no se observó actividad PLA₂, incluso utilizando una dosis de 100 μg . No obstante, los venenos de las tres cobras escupidoras presentaron una actividad PLA₂ similar (cuadro 3).

Adicionalmente, todos los venenos presentaron actividad anticoagulante a diferentes niveles. Los venenos de las cobras escupidoras *N. mossambica* y *N. nigricollis* presentaron la actividad anticoagulante más potente (DMA de 0,5 y 0,3 μg , respectivamente, cuadro 3). Un estudio reciente atribuye la actividad anticoagulante de estos venenos a la presencia de PLA₂, que actúan mediante un mecanismo de inhibición de la formación del complejo trombina y protrombinasa, esta última proteína asociada a la unión competitiva al factor de coagulación Xa (Bittenbinder et al., 2018). Actualmente existen pocos estudios de 3FTx anticoagulantes en venenos de cobras escupidoras. Un estudio previo purificó cuatro cardiotoxinas (citotoxinas de la familia 3FTx) del veneno de *N. nigricollis*, capaces de inhibir la coagulación del plasma y agregación plaquetaria (Kini et al., 1988). Se deben realizar más

estudios detallados, para entender el papel de las 3FTx en la actividad anticoagulante de estos venenos.

Por otra parte, el veneno de *H. haemachatus* presentó una actividad anticoagulante intermedia entre los venenos evaluados, esta actividad se atribuye a la presencia de 3FTx reportadas previamente, por ejemplo: ringalexina y exactina (ambas inhiben la activación del factor X; (Barnwal et al., 2016; Girish & Kini, 2016)); y hemextina AB (inhibe la activación del factor VIIa y la formación del complejo factor tisular-FVIIa; (Banerjee et al., 2005)). Hasta la fecha, no se han reportado PLA₂s con actividad anticoagulante en este veneno. Finalmente, el veneno de *N. annulifera* presentó la actividad anticoagulante más baja. Silva de Franca et al. (2019) sugieren que la actividad anticoagulante de este veneno puede ser atribuida a la presencia de proteasas fibrinogenolíticas o a PLA₂.

5.2.3 Evaluación toxicovenómica de fracciones individuales del veneno de *H. haemachatus*

El veneno de *H. haemachatus* se sometió a un análisis toxicovenómico, con el fin de correlacionar la composición proteica de las fracciones con la actividad letal y anticoagulante, y de esta manera aumentar la comprensión de la actividad farmacológica de toxinas relevantes en el mismo. Se seleccionaron ocho fracciones del veneno de *H. haemachatus* tomando en consideración su abundancia relativa, luego de su separación mediante RP-HPLC (figura 4A).

Las fracciones A, D, E y F presentaron actividad letal en el modelo murino utilizado, los ratones inyectados con las fracciones A y F murieron inmediatamente luego de ser inyectados. Por otra parte, los ratones inyectados con las fracciones E y F murieron con signos de parálisis. Estas fracciones letales se encuentran principalmente compuestas por 3FTx (figura 4B), lo que evidencia la importancia de esta familia de toxinas en la letalidad del veneno de *H. haemachatus*. Por el contrario, fracciones ricas en PLA₂ (fracciones B y C) no causaron la muerte de los ratones.

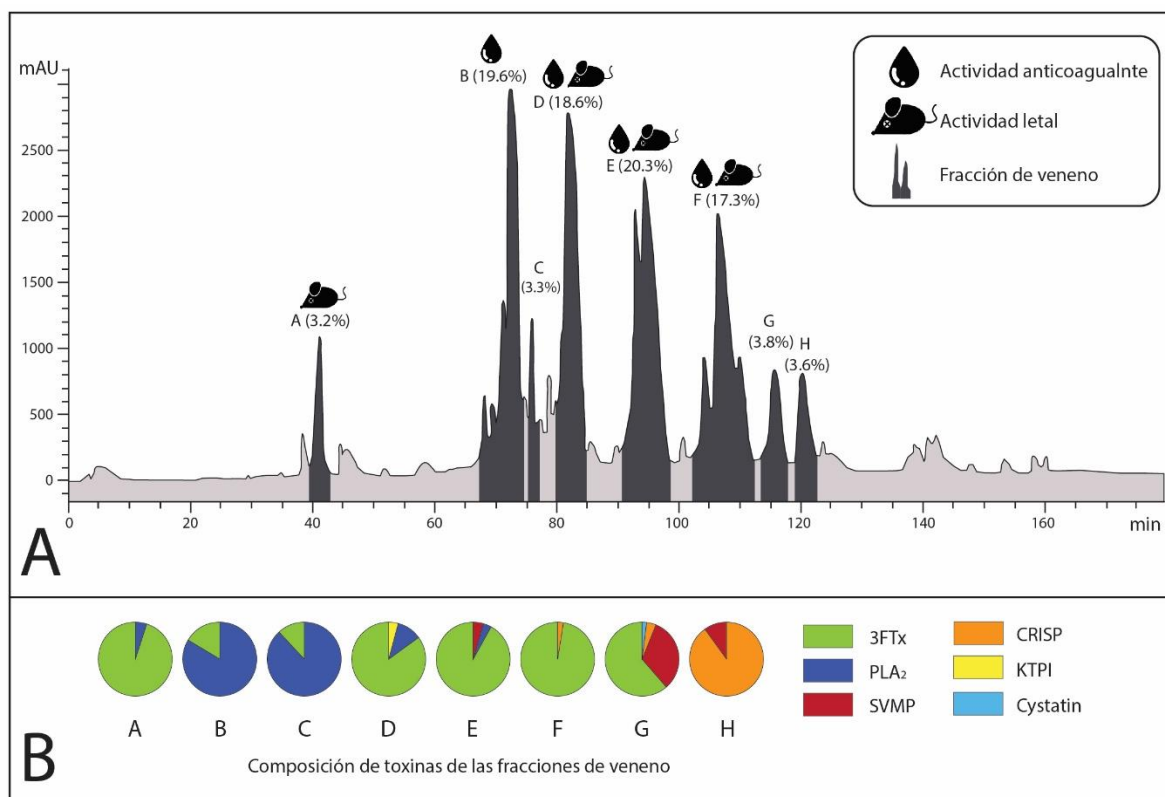


Figura 4. (A) Actividad letal y anticoagulante de las fracciones del veneno de *H. haemachatus* separadas mediante RP-HPLC y (B) composición relativa de toxinas de cada fracción.

La cantidad de cada una de las fracciones utilizadas en los ensayos fue proporcional a su abundancia estimada en el veneno. Con respecto de la fracción A, a pesar de que la cantidad de dicha fracción inyectada en ratones solo representa el 3,2% del reto total del veneno (0,8 $\mu\text{g/g}$), esta fracción fue una de las más letales. Esto se debe probablemente a que esta fracción se encuentra principalmente compuesta por la neurotoxina corta IV (pico 2b, anexo 1). La otra fracción más letal corresponde a la F, la cual contiene a la cardiotoxina toxina 11/11A con un 12% de abundancia (picos 15b y 16b, anexo 1).

Tomando en consideración que el veneno de *H. haemachatus* presenta actividad anticoagulante, las ocho fracciones fueron evaluadas de manera *in vitro* sobre plasma humano. Las fracciones B, D, E y F presentaron actividad anticoagulante (figura 4A), de las cuales las fracciones B y E fueron las más potentes, prolongando el tiempo de coagulación del plasma por más de 45 min. Excepto por la fracción B, la cual contiene 84% de PLA₂, la

mayoría de las proteínas presentes en las otras tres fracciones anticoagulantes corresponden a 3FTx (figura 4B). De hecho, la fracción B y D contienen a las toxinas de 3FTx anticoagulantes conocidas como exactina y ringalexina, respectivamente. Ambas toxinas presentan actividad anticoagulante basado en su efecto inhibitorio de la formación del complejo extrínseco (Barnwal et al., 2016; Girish y Kini, 2016). Un resultado interesante muestra que la fracción B presenta una alta actividad anticoagulante sin ser letal. Por lo tanto, resulta de gran interés realizar estudios más detallados para determinar la factibilidad de diseñar agentes terapéuticos novedosos para el tratamiento de desórdenes de la coagulación que generan enfermedades cardio y cerebrovasculares (Kini, 2006).

Con respecto a las últimas dos fracciones del cromatograma (G y H), a pesar de presentar un alto contenido de 3FTx y CRISPs, no se evidenció presencia de actividad letal ni anticoagulante. No obstante, ambas fracciones contienen un alto porcentaje de las SVMPS del veneno, las cuales se desnaturalizan por los solventes utilizados durante la separación mediante RP-HPLC (Lomonte y Calvete, 2017), por lo que no se puede evidenciar el perfil tóxico de dichas fracciones claramente.

5.3 Evaluación de la neutralización e inmunoreactividad cruzada de los venenos *H. haemachatus*, *N. annulifera*, *N. mossambica* y *N. nigricollis*.

5.3.1 Evaluación del perfil de neutralización de antivenenos homólogos y heterólogos

Con el fin de producir antivenenos con un amplio espectro de cobertura, capaces de neutralizar venenos homólogos y heterólogos, se deben seleccionar cuidadosamente los venenos que se incluirán en el esquema de inmunización de los animales durante el diseño del antiveneno (León et al., 2018). Es por esto que el presente estudio pretende analizar la neutralización cruzada del antiveneno monoespecífico anti-*Hemachatus* contra los venenos de *N. annulifera*, *N. mossambica* y *N. nigricollis*; con el fin de determinar la similitud antigénica presente entre dichos venenos y mejorar el esquema de inmunización previamente reportado por Sánchez y colaboradores (2017).

El antiveneno anti-*Hemachatus* neutralizó la actividad letal de los venenos de las cobras escupidoras bajo estudio. Como era de esperar, la letalidad del veneno homólogo fue

neutralizada con la dosis más baja de antiveneno (233 $\mu\text{L AV/mg V}$, cuadro 4). No obstante, para neutralizar los venenos de las cobras escupidoras *N. mossambica* y *N. nigricollis*, se requirió una mayor dosis de antiveneno (1250 y 2439 $\mu\text{L AV/mg V}$, respectivamente). Por otra parte, resultó interesante evaluar si el antiveneno anti-*Hemachatus* lograba neutralizar el veneno de *N. annulifera*, una cobra neurotóxica, no escupidora. Los resultados muestran que este veneno no logró ser neutralizado. Esto se debe probablemente a la distancia filogenética existente entre las cobras escupidoras de África (genero *Naja*, subgénero *Afrocobra*) y las cobras no escupidoras (genero *Naja*, subgénero *Uraeus*), como *N. annulifera* (Van et al., 2009; Wüster et al., 2018). Los resultados sugieren una similitud antigénica entre las toxinas letales presentes en los venenos de las cobras escupidoras bajo estudio, y diferencias antigénicas entre los venenos de *H. haemachatus* y *N. annulifera*.

Cuadro 4. Neutralización de actividades tóxicas y enzimáticas inducidas por venenos homólogos y heterólogos de África Sub-sahariana por medio del antiveneno anti-*Hemachatus*-ICP.

	<i>H. haemachatus</i>	<i>N. annulifera</i>	<i>N. mossambica</i>	<i>N. nigricollis</i>
Letalidad ($\mu\text{L/mg}$)	233 (154-333) ^a	>1750 ^b	1250 (667-1667) ^c	2439 (1754-4000) ^d
Dermonecrótica ($\mu\text{L/mg}$)	ND ¹	ND ¹	> 1500 ^e	2701 \pm 312 ^f
Miotóxica ($\mu\text{L/mg}$)	1429 \pm 33 ^g	> 2000 ^h	> 2000 ^h	1853 \pm 116 ⁱ
PLA ₂ ($\mu\text{L/mg}$)	504 \pm 15 ^j	ND	6421 \pm 496 ^k	7309 \pm 602 ^k
Anticoagulante ($\mu\text{L/mg}$)	734 \pm 241 ^l	> 10000 ^m	8644 \pm 577 ⁿ	> 10000 ^m

¹ No determinada, debido a que el veneno no presenta esta actividad toxica. Para cada actividad, la relación veneno/antiveneno con el mismo superíndice indica que no presentan diferencia significativa entre sus valores.

Con respecto de la actividad dermonecrótica, resulta interesante que a pesar de que el veneno de *H. haemachatus* no presenta dicha actividad, el antiveneno anti-*Hemachatus* logró neutralizar la actividad dermonecrótica del veneno de *N. nigricollis*, esto evidencia la neutralización cruzada de 3FTx citotóxicas presentes en ambos venenos (cuadro 4). De igual forma, el antiveneno anti-*Hemachatus* logró neutralizar la actividad miotóxica, tanto de su veneno homólogo como el de *N. nigricollis*. Esto sugiere que anticuerpos contra las 3FTx citotóxicas del veneno de *H. haemachatus* neutralizan las 3FTx citotóxicas presentes en el veneno de *N. nigricollis*. Se evidenció además, que el antiveneno no presentó la capacidad

de neutralizar la actividad miotóxica de los venenos *N. annulifera* y *N. mossambica*, por lo tanto, muy posiblemente existen diferencias antigénicas entre las 3FTx citotóxicas presentes entre *H. haemachatus* y estos venenos.

Con respecto a las actividades enzimáticas evaluadas, el antiveneno anti-*Hemachatus* neutralizó con la dosis más baja la actividad PLA₂ de su veneno homólogo (504 µL AV/mg V, cuadro 4). De igual forma, se observó neutralización de esta actividad para los venenos *N. mossambica* y *N. nigricollis*, sin embargo, se requirió de una dosis mayor de antiveneno (6421 and 7309 µL AV/mg V, respectivamente). Estos resultados indican que existen diferencias antigénicas y/o estructurales entre las PLA₂ presentes entre las serpientes escupidoras en estudio.

Finalmente, el antiveneno anti-*Hemachatus* logró neutralizar eficazmente la actividad anticoagulante de su veneno homólogo y del veneno de *N. mossambica*. Estos resultados sugieren presencia de similitud antigénica entre las toxinas anticoagulantes presentes entre ambos venenos. Por el contrario, esta actividad no se logró neutralizar en los venenos de *N. annulifera* y *N. nigricollis*, incluso utilizando una relación de 10 mL de antiveneno por mg de veneno (cuadro 4).

5.3.2 Evaluación del perfil de inmunoreactividad de antivenenos homólogos y heterólogos

La inmunoreactividad del antiveneno monoespecífico anti-*Hemachatus* contra venenos de cobras de África sub-Sahariana se determinó mediante antivenómica de tercera generación (Pla et al., 2017). Los resultados muestran que las columnas de afinidad con 9 mg de IgG anti-*Hemachatus* presentaron una capacidad máxima de unión de 38 mg de veneno *H. haemachatus*/g de antiveneno (cuadro 5, anexo 3). Este valor fue mayor en comparación a la capacidad máxima de unión obtenida con las columnas de afinidad con 9 mg de anticuerpos F(ab')₂ del antiveneno control, correspondiente a 23 mg de veneno *H. haemachatus*/g de antiveneno (cuadro 5, anexo 4).

La figura 5A y 5B muestran la capacidad máxima de unión de las columnas de afinidad acopladas con el antiveneno anti-*Hemachatus* y el antiveneno control, contra las fracciones del veneno de *H. haemachatus*. Se observa que la capacidad máxima de unión

(mayor a 60 μg) corresponde a aquellas fracciones que contienen en mayor proporción $\text{PLA}_2/3\text{FTx}$ y SVMP (segunda y novena fracción). En términos generales, cada fracción evaluada en términos de capacidad máxima de unión fue mayor para el antiveneno anti-*Hemachatus* en comparación al antiveneno utilizado como control.

El antiveneno control de Premium Serum and Vaccines, no incluye al veneno de *H. haemachatus* como inmunogeno; sin embargo, incluye venenos de tres especies de cobras (*N. haje*, *N. melanoleuca* y *N. nigricollis*) y varios venenos de otros géneros (Ainsworth et al., 2017). La inclusión de estos venenos en el esquema de inmunización permite la neutralización cruzada y el inmunoreconocimiento del veneno de *H. haemachatus* (2,6 mg V/mL antiveneno, anexo 4). No obstante, el reconocimiento del veneno de *H. haemachatus* es menor en comparación al porcentaje obtenido con el antiveneno anti-*Hemachatus* (IgG específica contra todo el veneno de 9-18% y 23-46%, respectivamente, cuadro 5).

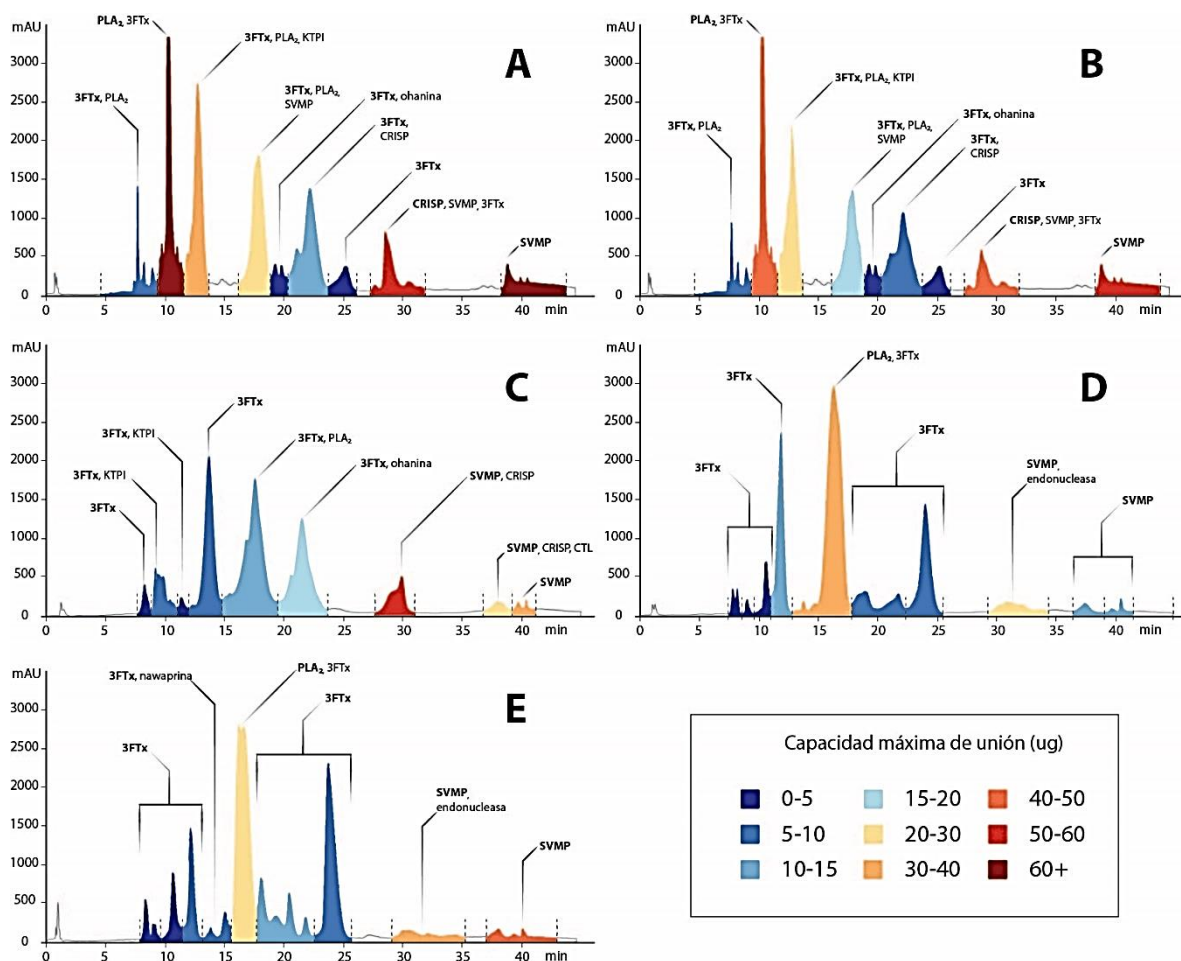


Figura 5. Representación de la capacidad máxima de unión de las diferentes toxinas presentes en los venenos de África Sub-sahariana inmovilizados en columnas de inmunoafinidad acopladas con antiveneno monoespecífico anti-*Hemachatus* (A, C, D, E) y Premium Serum and Vaccines (B). (A) y (B) veneno de *H. haemachatus*, (C) veneno de *N. annulifera*, (D) veneno de *N. mossambica* y (E) veneno de *N. nigricollis*. 3FTx: toxinas de tres dedos; PLA₂: fosfolipasas A₂; SVMPS: metaloproteínas; CRISPs: proteínas secretoras ricas en cisteína; KTPI: proteínas inhibidoras tipo Kunitz.

Cuadro 5. Análisis de antivenómica de tercera generación del antiveneno monoespecífico anti-*Hemachatus* contra los venenos de *Hemachatus* y especies de *Naja* del África Sub-sahariana.

	AV Control		Anti- <i>Hemachatus</i> -ICP		
	<i>H. haemachatus</i>	<i>H. haemachatus</i>	<i>N. annulifera</i>	<i>N. mossambica</i>	<i>N. nigricollis</i>
Veneno retenido (µg/9 mg AV columna)	210	338	159	122	138
Capacidad max. unión (mg V/g AV)	23	38	18	14	15
Capacidad max. unión (mg V/vial)	12	17	8	6	7
IgG específica contra todo veneno (%)	9 a 18	23 a 46	10 a 19	10 a 20	12 a 24
IgG específica contra toxinas letales (%)	8 a 15	19 a 37	6 a 13	6 a 13	6 a 13
IgG neutralizante especf. contra toxinas letales (%)	100	100	100	100	63
IgG neutralizante contra toxinas letales/vial (%)	32	91	15	15	8

La capacidad máxima de unión del antiveneno anti-*Hemachatus* contra venenos de cobras del África sub-Sahariana presentó el siguiente orden: 18 mg de veneno *N. annulifera*/g de antiveneno, 14 mg de veneno *N. mossambica*/g de antiveneno y 15 mg de veneno *N. nigricollis*/g de antiveneno (cuadro 5, anexo 5-7). Es importante mencionar que el antiveneno anti-*Hemachatus* presentó la mitad de anticuerpos específicos contra el veneno completo de *N. annulifera*, *N. mossambica* y *N. nigricollis* (valores entre 10 a 24%) en comparación al resultado obtenido contra su veneno homólogo (cuadro 5).

El estudio antivenómico demostró que el inmunoreconocimiento del veneno de *N. annulifera* por parte del antiveneno anti-*Hemachatus* presentó una capacidad máxima de unión por fracciones con predominancia de SVMPs y CRISPs (figura 5C), las cuales no contribuyen de forma significativa en las actividades letales y tóxicas. Por el contrario, fracciones con predominancia de 3FTx fueron poco reconocidas por el antiveneno. Estos resultados sugieren una correlación entre la falta de reconocimiento de 3FTx y la poca capacidad del antiveneno de neutralizar la actividad letal, miotóxica y anticoagulante de este veneno.

Con respecto a los venenos de las cobras escupidoras *N. mossambica* y *N. nigricollis*, la fracción con predominancia de PLA₂ presentó mejor inmunoreconocimiento por parte del antiveneno; sin embargo, el valor de capacidad máxima de unión fue mayor para el veneno de *N. mossambica* (figura 5D y 5E). Esto de cierta forma explica la habilidad del antiveneno de neutralizar la actividad letal, PLA₂ y anticoagulante del veneno de *N. mossambica*. Por otra parte, se observó que el antiveneno presentó una capacidad máxima de unión mayor para fracciones ricas en 3FTx del veneno de *N. nigricollis*, en comparación a fracciones similares al veneno de *N. mossambica*, esto concuerda con la capacidad del antiveneno de neutralizar la actividad dermonecrótica y miotóxica del veneno de *N. nigricollis* (cuadro 4).

Tomando en consideración los anticuerpos contra los componentes tóxicos de los venenos más relevantes (3FTx y PLA₂), se sugiere a nivel preliminar que todas las IgG específicas capaces de inmunoreconocer las toxinas más letales de *H. haemachatus* son anticuerpos clínicamente relevantes (valor entre 19-37%, cuadro 5). Interesantemente, para *N. annulifera*, *N. mossambica* y *N. nigricollis*, se encontró que la IgG específica contra las toxinas más letales presentaron valores similares entre sí (6-13%). Sin embargo, el valor de IgG neutralizante específica contra las toxinas letales de *N. nigricollis* resultó ser menor, 63% en comparación al 100% obtenida para los otros venenos (cuadro 5). El porcentaje de anticuerpos neutralizantes por vial de antiveneno contra las toxinas más letales resultó ser menor para los venenos heterólogos en comparación al veneno homólogo. De hecho, la presencia de solo un 8% de anticuerpos neutralizantes por vial de antiveneno anti-*Hemachatus* contra las toxinas más letales de *N. nigricollis* correlaciona con la poca capacidad del antiveneno de neutralizar su actividad letal.

6. CONCLUSIONES

El veneno de *Hemachatus haemachatus* presenta un alto contenido de 3FTx y PLA₂, seguido de SVMPs, CRISPs y KTPIs. La presencia de estas familias de toxinas es similar a la de los venenos de cobras del África sub-Sahariana tales como *N. annulifera*, *N. mossambica* y *N. nigricollis*, aunque en diferente proporción.

Las toxinas de 3FTx y PLA₂ son las responsables de las principales actividades tóxicas del veneno de *H. haemachatus*. Considerando la alta proporción de 3FTx y el análisis de las fracciones ricas en estas toxinas, se concluye que dicha familia juega un papel relevante en la actividad letal del veneno, probablemente debido a la acción de cardiotoxinas o neurotóxicas post-sinápticas.

A pesar de contar con familias de toxinas similares, los venenos de las cuatro cobras mostraron un perfil toxinológico distinto. Por ende, el antiveneno monoespecífico anti-*Hemachatus* presentó inmunoreactividad y neutralización diferencial de las actividades tóxicas y enzimáticas de los venenos de *H. haemachatus*, *N. annulifera*, *N. mossambica* y *N. nigricollis*.

El perfil de neutralización mostrado por el antiveneno anti-*Hemachatus* de las actividades tóxicas de los venenos *N. mossambica*, *N. nigricollis* y *N. annulifera*, indica que existe una estrecha relación entre *H. haemachatus* y las cobras escupidoras del género *Naja* subgénero *Afrocobra*, en comparación a las cobras neurotóxicas del género *Naja* subgénero *Uraeus*.

Los resultados obtenidos permiten aportar evidencia para la producción de antivenenos de amplio espectro contra envenenamientos por especies de cobras del África sub-Sahariana, considerando incluir en el esquema de inmunización venenos representativos de los tres subgéneros *Afronaja*, *Boulengerina* y *Uraeus* pertenecientes al género *Naja*.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se sugiere que si la mezcla de inmunización incluye venenos de *N. mossambica* y *N. nigricollis*, no es estrictamente necesario incluir en el esquema de inmunización el veneno de *H. haemachatus*.

7. RECOMENDACIONES

Realizar un análisis proteómico “top-down” entre los venenos evaluados que permita evidenciar diferencias en cuanto a la composición específica de toxinas presentes en los venenos.

Ampliar el estudio de neutralización cruzada del antiveneno anti-*Hemachatus* contra venenos de elápidos de otras especies de *Naja* y otros géneros de serpientes de África sub-Sahariana.

Evaluar la neutralización del veneno de *H. haemachatus* con antivenenos poliespecíficos que contengan únicamente venenos de *Najas*.

Profundizar en el estudio del efecto fisiopatológico de las familias de toxinas SVMP y CRISP presentes en los venenos de *H. haemachatus* y *N. annulifera*.

Caracterizar y purificar toxinas con propiedades anticoagulantes del veneno de *H. haemachatus* como posibles agentes terapéuticos.

8. REFERENCIAS

- Abubakar, I. S., Abubakar, S. B., Habib, A. G., Nasidi, A., Durfa, N., Yusuf, P. O., Larnyang, S., Garnvwa, J., Sokomba, E., Salako, L., Theakston, R. D. G., Juszczak, E., Alder, N., & Warrell, D. A. (2010). Randomised controlled double-blind non-inferiority trial of two antivenoms for Saw-scaled or carpet viper (*Echis ocellatus*) envenoming in Nigeria. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *4*(7), 8–17.
- Ainsworth, S., Petras, D., Engmark, M., Süssmuth, R. D., Whiteley, G., Albulescu, L.-O., Kazandjian, T. D., Wagstaff, S. C., Rowley, P., Wüster, W., Dorrestein, P. C., Arias, A. S., Gutiérrez, J. M., Harrison, R. A., Casewell, N. R., & Calvete, J. J. (2017). The medical threat of mamba envenoming in sub-Saharan Africa revealed by genus-wide analysis of venom composition, toxicity and antivenomics profiling of available antivenoms. *Journal of Proteomics*, August.
- Al-Abdulla, I., Garnvwa, J. M., Rawat, S., Smith, D. S., Landon, J., & Nasidi, A. (2003). Formulation of a liquid ovine Fab-based antivenom for the treatment of envenomation by the Nigerian carpet viper (*Echis ocellatus*). *Toxicon*, *42*(4), 399–404.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403–410.
- Banerjee, Y., Mizuguchi, J., Iwanaga, S., & Kini, R. M. (2005). Hemextin AB complex, a unique anticoagulant protein complex from *Hemachatus haemachatus* (African Ringhals cobra) venom that inhibits clot initiation and factor VIIa activity. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(52), 42601–42611.
- Barnwal, B., Jobichen, C., Girish, V. M., Foo, C. S., Sivaraman, J., & Kini, R. M. (2016). Ringhalexin from *Hemachatus haemachatus*: A novel inhibitor of extrinsic tenase complex. *Scientific Reports*, *6*(October 2015), 25935.

- Bengis, R. G., & Noble, D. F. (1976). Postsynaptic blockade of neuromuscular transmission by toxin II from the venom of the South African ringhals cobra (*Hemachatus haemachatus*). *Toxicon*, *14*(3), 167–173.
- Berthé, R. A., de Pury, S., Bleckmann, H., & Westhoff, G. (2009). Spitting cobras adjust their venom distribution to target distance. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, *195*(8), 753–757.
- Bittenbinder, M. A., Zdenek, C. N., op den Brouw, B., Youngman, N. J., Dobson, J. S., Naude, A., Vonk, F. J., & Fry, B. G. (2018). Coagulotoxic Cobras: Clinical Implications of Strong Anticoagulant Actions of African Spitting Naja Venoms That Are Not Neutralised by Antivenom but Are by LY315920 (Varespladib). *Toxins*, *10*(12), 516.
- Blaylock, R. S. (2005). The identification and syndromic management of snakebite in South Africa. *South African Family Practice*, *47*(9), 48–53.
- Braud, S., Bon, C., & Wisner, A. (2000). Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie*, *82*(9–10), 851–859.
- Brown, N. I. (2012). Consequences of neglect: Analysis of the sub-saharan african snake antivenom market and the global context. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *6*(6), 1670.
- Calvete, J. J. (2013). Snake venomomics: From the inventory of toxins to biology. *Toxicon*, *75*, 44–62.
- Calvete, J. J., Marcinkiewicz, C., Monleón, D., Esteve, V., Celda, B., Juárez, P., & Sanz, L. (2005). Snake venom disintegrins: Evolution of structure and function. *Toxicon*, *45*(8), 1063–1074.

- Calvete, J. J., Sanz, L., Angulo, Y., Lomonte, B., & Gutiérrez, J. M. (2009). Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Letters*, 583(11), 1736–1743.
- Casasola, A., Ramos-Cerrillo, B., de Roodt, A. R., Saucedo, A. C., Chippaux, J. P., Alagón, A., & Stock, R. P. (2009). Paraspecific neutralization of the venom of African species of cobra by an equine antiserum against *Naja melanoleuca*: A comparative study. *Toxicon*, 53(6), 602–608.
- Cheymol, J., Karlsson, E., Bourillet, F., & Roch-Arveiller, M. (1974). Biological activities of various fractions isolated from venom of *Hemachatus haemachates*. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, 208, 81–93.
- Chippaux, J. P. (1998). Snake-bites: Appraisal of the global situation. *Bulletin of the World Health Organization*, 76(5), 515–524.
- Chippaux, J. P., Baldé, M. C., Sessinou, Yéro Boiro, M., & Massougbojji, A. (2015). Évaluation d'un nouvel antivenin polyvalent contre les envenimations ophidiennes (Inoserp1 Panafricain) dans deux contextes épidémiologiques: Le Nord Bénin et la Guinée Maritime. *Medecine et Sante Tropicales*, 25(1), 56–64.
- Chippaux, J. P., Williams, V., & White, J. (1991). Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, 29(11), 1279–1303.
- Chippaux, J.P., White, J., & Habib, A. G. (2016). African Snakes. *Critical Care Toxicology*.
- Chippaux, Jean Philippe. (2011). Estimate of the burden of snakebites in sub-Saharan Africa: A meta-analytic approach. *Toxicon*, 57(4), 586–599.
- Chippaux, Jean Philippe, Massougbojji, A., Diouf, A., Baldé, C. M., & Boyer, L. V.

(2015). Snake bites and antivenom shortage in Africa. *The Lancet*, 386(10010), 2252–2253.

CIOMS. (2012). *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*.

Condrea, E., Yang, C. C., & Rosenberg, P. (1980). Comparison of a relatively toxic phospholipase A2 from *Naja nigricollis* snake venom with that of a relatively non-toxic phospholipase A2 from *Hemachatus haemachatus* snake venom-I. Enzymatic activity on free and membrane bound substrates. *Biochemical Pharmacology*, 29(11), 1555–1563.

Dole, V. P. (1956). A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. *The Journal of Clinical Investigation*, 35(2), 150–154.

Doley, R., Zhouh, X., & Kini, R. . (2009). Snake venom phospholipase A2 enzymes. In S.P Mackessy (Ed.), *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles* (pp. 173–205). CRC Press.

Elves, P. J., Roitt, I. M., Mackay, I. R., & Rosen, F. S. (2000). The Immune System. *New England Journal of Medicine*, 343(1), 37–49.

Finney, D. J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60(9), 1432.

Freitas, T. ., Fortes-Dias, C. L., Diniz, C. R., Velarde, D. T., & Freitas, C. F. (1991). Immunization of horses with *Crotalus durissus terrificus* (South American Rattlesnake) venom. A Comparison of four different procedures. *Brazilian J. Med Biol Res*, 24, 281–291.

- Fry, B. G., Scheib, H., van der Weerd, L., Young, B., McNaughtan, J., Ramjan, S. F. R., Vidal, N., Poelmann, R. E., & Norman, J. A. (2008). Evolution of an Arsenal: Structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(2), 215–246.
- Girish, V. M., & Kini, R. M. (2016). Exactin: A specific inhibitor of Factor X activation by extrinsic tenase complex from the venom of *Hemachatus haemachatus*. *Scientific Reports*, 6(April), 1–13.
- Girish, V. M., Kumar, S., Joseph, L., Jobichen, C., Kini, R. M., & Sivaraman, J. (2012). Identification and Structural Characterization of a New Three-Finger Toxin Hemachatoxin from *Hemachatus haemachatus* Venom. *PLoS ONE*, 7(10), 1–9.
- Guidolin, F. R., Caricati, C. P., Marcelino, J. R., & da Silva, W. D. (2016). Development of Equine IgG Antivenoms against Major Snake Groups in Mozambique. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(1), e0004325.
- Gutierrez, J. M.; León, G. (Ed.). (2009). Snake antivenoms Technological , clinical and public health issues. In *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology* (pp. 295–322).
- Gutiérrez, J. M., Rojas, E., Quesada, L., León, G., Núñez, J., Laing, G. D., Sasa, M., Renjifo, J. M., Nasidi, a., Warrell, D. a., Theakston, R. D. G., & Rojas, G. (2005). Pan-African polyspecific antivenom produced by caprylic acid purification of horse IgG: An alternative to the antivenom crisis in Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 99(6), 468–475.
- Gutiérrez, J. M., Rucavado, A., Escalante, T., & Díaz, C. (2005). Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: Biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*, 45(8), 997–1011.

- Gutiérrez, J., Solano, G., Pla, D., Herrera, M., Segura, Á., Vargas, M., Villalta, M., Sánchez, A., Sanz, L., Lomonte, B., León, G., & Calvete, J. (2017). Preclinical Evaluation of the Efficacy of Antivenoms for Snakebite Envenoming: State-of-the-Art and Challenges Ahead. *Toxins*, 9(5), 163.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., Chaves, F., Moreno, E., & Cerdas, L. (1986). Pharmacological activities of a toxic phospholipase a isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative*, 84(1), 159–164.
- Gutiérrez, José María, Lomonte, B., León, G., Alape-Girón, A., Flores-Díaz, M., Sanz, L., Angulo, Y., & Calvete, J. J. (2009). Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *Journal of Proteomics*, 72(2), 165–182.
- Gutiérrez, José María, Solano, G., Pla, D., Herrera, M., Segura, álvaro, Villalta, M., Vargas, M., Sanz, L., Lomonte, B., Calvete, J. J., & León, G. (2013). Assessing the preclinical efficacy of antivenoms: From the lethality neutralization assay to antivenomics. *Toxicon*, 69, 168–179.
- Gutiérrez, José María, Theakston, R. D. G., & Warrell, D. A. (2006). Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: The need for a global partnership. *PLoS Medicine*, 3(6), 0727–0731.
- Hamako, J., Matsui, T., Nishida, S., Nomura, S., Fujimura, Y., Ito, M., Ozeki, Y., & Titani, K. (1998). Purification and characterization of kaouthiagin, a von Willebrand factor-binding and -cleaving metalloproteinase from *Naja kaouthia* cobra venom. *Thrombosis and Haemostasis*, 80(3), 499–505.
- Harrison, R. A., Hargreaves, A., Wagstaff, S. C., Faragher, B., & Lalloo, D. G. (2009).

- Snake envenoming: A disease of poverty. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(12).
- Harvey, A., & Robertson, B. (2004). Dendrotoxins: Structure-Activity Relationships and Effects on Potassium Ion Channels. *Current Medicinal Chemistry*, 11(23), 3065–3072.
- Hegde, R., Rajagopalan, N., Doley, R., Kini, R. (2009). Snake Venom Three-Finger Toxins. *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*, 287–301.
- Heyborne, W. H., & Mackessy, S. P. (2010). Cysteine-Rich Secretory Proteins in Reptile Venoms. *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles, March 2016*, 325–336.
- Hokama, Y., Iwanaga, S., Tatsuki, T., & Suzuki, T. (1976). Snake venom proteinase inhibitors. III. Isolation of five polypeptide inhibitors from the venoms of *Hemachatus haemachatus* (Ringhal's cobra) and *Naja nivea* (Cape cobra) and the complete amino acid sequences of two of them. *Journal of Biochemistry*, 79(3), 559–578.
- Hus, K., Buczkowicz, J., Petrilla, V., Petrillová, M., Łyskowski, A., Legáth, J., & Bocian, A. (2018). First Look at the Venom of *Naja ashei*. *Molecules*, 23(3), 609.
- Jenkins, T. P., Sánchez, A., Segura, Á., Vargas, M., Herrera, M., Stewart, T. K., León, G., & Gutiérrez, J. M. (2017). An improved technique for the assessment of venom-induced haemorrhage in a murine model. *Toxicon*, 139, 87–93.
- Joubert, F. J. (1975). *Hemachatus haemachatus* (Ringhals) Venom. Purification, Some Properties and Amino-Acid Sequence of Phospholipase A (Fraction DE-I). *European Journal of Biochemistry*, 52(3), 539–554.
- Joubert, F. J. (1977). Snake venom toxins. The amino-acid sequences of three toxins (9B, 11 and 12A) from *Hemachatus haemachatus* (Ringhals) venom. *European Journal of Biochemistry*, 74(1), 387–396.

- Joubert, F. J., & Taljaard, N. (1980). The complete primary structure of toxin CM-1b from *Hemachatus haemachatus* (Ringhals) snake venom. *Toxicon*, *18*(2), 191–198.
- Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A. R., De Silva, N., Gunawardena, N. K., Pathmeswaran, A., Premaratna, R., Savioli, L., Lalloo, D. G., & De Silva, H. J. (2008). The global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Medicine*, *5*(11), 1591–1604.
- Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M., & Altman, D. G. (2010). Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biology*, *8*(6), 1–5.
- Kini, M. R., Haar, N. C., & Evans, H. J. (1988). Non-enzymatic inhibitors of coagulation and platelet aggregation from *Naja nigricollis* venom are cardiotoxins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *150*(3), 1012–1016.
- Kini, R. M. (2002). Molecular moulds with multiple missions: Functional sites in three-finger toxins. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *29*(9), 815–822.
- Kini, R. M. (2003). Excitement ahead : structure , function and mechanism of snake venom phospholipase A 2 enzymes. *Toxicon*, *42*, 827–840.
- Kini, R. M. (2005). The intriguing world of prothrombin activators from snake venom. *Toxicon*, *45*(8), 1133–1145.
- Kini, R. M. (2006). Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. *The Biochemical Journal*, *397*(3), 377–387.
- Kini, R. M., & Doley, R. (2010). Structure, function and evolution of three-finger toxins:

Mini proteins with multiple targets. *Toxicon*, 56(6), 855–867.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.

Laing, G. D., Lee, L., Smith, D. C., Landon, J., & Theakston, R. D. G. (1995). Experimental assessment of a new, low-cost antivenom for treatment of carpet viper (*Echis ocellatus*) envenoming. *Toxicon*, 33(3), 307–313.

Laing, G. D., Renjifo, J. M., Ruiz, F., Harrison, R. a., Nasidi, a., Gutierrez, J. M., Rowley, P. D., Warrell, D. a., & Theakston, R. D. G. (2003). A new Pan African polyspecific antivenom developed in response to the antivenom crisis in Africa. *Toxicon*, 42(1), 35–41.

Lauridsen, L. P., Laustsen, A. H., Lomonte, B., & Gutierrez, J. M. (2017). Exploring the venom of the forest cobra snake: Toxicovenomics and antivenom profiling of *Naja melanoleuca*. *Journal of Proteomics*, 150, 98–108.

Lee, M. S. Y., Sanders, K. L., King, B., & Palci, A. (2016). Diversification rates and phenotypic evolution in venomous snakes (Elapidae) Subject Category : Subject Areas : *Royal Society Open Science*, 3(50277).

León, G., Vargas, M., Segura, Á., Herrera, M., Villalta, M., Sánchez, A., Solano, G., Gómez, A., Sánchez, M., Estrada, R., & Gutiérrez, J. M. (2018). Current technology for the industrial manufacture of snake antivenoms. *Toxicon*, 151, 63–73.

León, Guillermo, Sánchez, L., Hernández, A., Villalta, M., Herrera, M., Segura, A., Estrada, R., & Gutiérrez, J. M. (2011). Immune response towards snake venoms. *Inflammation & Allergy Drug Targets*, 10(5), 381–398.

- Lomonte, B., & Calvete, J. J. (2017). Strategies in 'snake venomics' aiming at an integrative view of compositional, functional, and immunological characteristics of venoms. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 23(1), 26.
- Mackessy, Stephen P. (2009). *The field of reptile toxinology. Snakes, lizards, and their venoms. In Handbook of venoms and toxins of reptiles.* CRC Press.
- Malih, I., Ahmad rusmili, M. R., Tee, T. Y., Saile, R., Ghalim, N., & Othman, I. (2014). Proteomic analysis of moroccan cobra *Naja haje legionis* venom using tandem mass spectrometry. *Journal of Proteomics*, 96, 240–252.
- Matsunaga, Y., Yamazaki, Y., Hyodo, F., Sugiyama, Y., Nozaki, M., & Morita, T. (2009). Structural Divergence of Cysteine-Rich Secretory Proteins in Snake Venoms†. *The Journal of Biochemistry*, 145(3), 365–375.
- Mourão, C. B. F., & Schwartz, E. F. (2013). Protease inhibitors from marine venomous animals and their counterparts in terrestrial venomous animals. *Marine Drugs*, 11(6), 2069–2112.
- O'Leary, M. A., & Isbister, G. K. (2010). A turbidimetric assay for the measurement of clotting times of procoagulant venoms in plasma. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 61(1), 27–31.
- Petras, D., Sanz, L., Segura, Á., Herrera, M., Villalta, M., Solano, D., Vargas, M., León, G., Warrell, D., Theakston, R. D. G., Harrison, R., Durfa, N., Nasidi, A., Gutiérrez, J. M., & Calvete, J. J. (2011). Snake venomics of African spitting cobras: Toxin composition and assessment of congeneric cross-reactivity of the Pan-African EchiTAb-Plus-ICP antivenom by antivenomics and neutralization approaches. *Journal of Proteome Research*, 10(3), 1266–1280.

- Pla, D., Paiva, O. K., Sanz, L., Beutler, M., Wright, C. E., Calvete, J. J., Williams, D. J., & Gutiérrez, J. M. (2014). Preclinical efficacy of Australian antivenoms against the venom of the small-eyed snake, *Micropechis ikaheka*, from Papua New Guinea: An antivenomics and neutralization study. *Journal of Proteomics*, *110*, 198–208.
- Pla, D., Rodr, Y., & Calvete, J. J. (2017). Third Generation Antivenomics: Pushing the Limits of the *In Vitro* Preclinical Assessment of Antivenoms. *Toxins*, *9*(5), 158.
- Ramos-Cerrillo, B., de Roodt, A. R., Chippaux, J. P., Olgúin, L., Casasola, A., Guzmán, G., Paniagua-Solís, J., Alagón, A., & Stock, R. P. (2008). Characterization of a new polyvalent antivenom (Antivipmyn® Africa) against African vipers and elapids. *Toxicon*, *52*(8), 881–888.
- Richards, R., St Pierre, L., Trabi, M., Johnson, L. A., de Jersey, J., Masci, P. P., & Lavin, M. F. (2011). Cloning and characterisation of novel cystatins from elapid snake venom glands. *Biochimie*, *93*(4), 659–668.
- Rivel, M., Solano, D., Herrera, M., Vargas, M., Villalta, M., Segura, Á., Arias, A. S., León, G., & Gutiérrez, J. M. (2016). Pathogenesis of dermonecrosis induced by venom of the spitting cobra, *Naja nigricollis*: An experimental study in mice. *Toxicon*, *119*, 171–179.
- Rojas, G., Jiménez, J. M., & Gutiérrez, J. M. (1994). Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon*, *32*(3), 351–363.
- Sánchez, A., Herrera, M., Villalta, M., Solano, D., Segura, Á., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., León, G., & Vargas, M. (2018). Proteomic and toxinological characterization of the venom of the South African Ringhals cobra *Hemachatus haemachatus*. *Journal of Proteomics*.

- Sánchez, Andrés, Segura, Á., Vargas, M., Herrera, M., Villalta, M., Estrada, R., Wu, F., Litschka-Koen, T., Perry, M. A., Alape-Girón, A., & León, G. (2017). Expanding the neutralization scope of the EchiTAB-plus-ICP antivenom to include venoms of elapids from Southern Africa. *Toxicon*, *125*, 59–64.
- Sánchez, Andrés, Segura, Á., Vargas, M., Herrera, M., Villalta, M., Estrada, R., Wu, F., Litschka, T., Perry, M. A., Alape-Girón, A., & León, G. (2016). Expanding the neutralization scope of the EchiTAB-plus-ICP antivenom to include venoms of elapids from Southern Africa. *Toxicon*.
- Segura, Á., Villalta, M., Herrera, M., León, G., Harrison, R., Durfa, N., Nasidi, A., Calvete, J. J., Theakston, R. D. G., Warrell, D. a., & Gutiérrez, J. M. (2010). Preclinical assessment of the efficacy of a new antivenom (EchiTAB-Plus-ICP®) for the treatment of viper envenoming in sub-Saharan Africa. *Toxicon*, *55*(2–3), 369–374.
- Shoibonov, B., Osipov, A., Kryukova, E., Zinchenko, A., Lakhtin, V., Tsetlin, V., & Utkin, Y. (2005). Oxiagin from the *Naja oxiana* cobra venom is the first reprolysin inhibiting the classical pathway of complement. *Molecular Immunology*, *42*(10), 1141–1153.
- Silva-de-Franca, F., Villas-Boas, I. M., Toledo Serrano, S., Cogliati, B., Andrade Chudzinski, S., Lopes, P. H., Kitano, E. S., Okamoto, C. K., & Tambourgi, D. V. (2019). *Naja annulifera* Snake : New insights into the venom components and pathogenesis of envenomation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(1), 1–27.
- Strydom, A. J. C., & Botes, D. P. (1971). Snake venom toxins. Purification, properties, and complete amino acid sequence of two toxins from Ringhals (*Hemachatus haemachatus*) venom. *European Journal of Biochemistry*, *69*(1), 169–176.
- Takeda, S., Takeya, H., & Iwanaga, S. (2012). Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins.

Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics, 1824(1), 164–176.

- Tambourgi, D. V., dos Santos, M. C., Furtado, M. de F. D., de Freitas, M. C. W., Dias da Silva, W., & Kipnis, T. L. (1994). Pro- inflammatory activities in elapid snake venoms. *British Journal of Pharmacology*, 112(3), 723–727.
- Tan, K. Y., Wong, K. Y., Tan, N. H., & Tan, C. H. (2020). Quantitative proteomics of *Naja annulifera* (sub-Saharan snouted cobra) venom and neutralization activities of two antivenoms in Africa. In *International journal of biological macromolecules*. Elsevier B.V.
- Theakston, R. D. G., & Reid, H. A. (1983). Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of the World Health Organization*, 61(6), 949–956.
- Theakston, R. D. G., Warrell, D. A., & Griffiths, E. (2003). Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*, 41(5), 541–557.
- Tsetlin, V. (1999). Snake venom α -neurotoxins and other “three-finger” proteins. *European Journal of Biochemistry*, 264(2), 281–286.
- Utkin, Y. N. (2019). Last decade update for three-finger toxins: Newly emerging structures and biological activities. *World Journal of Biological Chemistry*, 10(1), 17–27.
- Van, W., Wüster, W., & Broadley, D. G. (2009). In praise of subgenera: Taxonomic status of cobras of the genus *Naja* Laurenti (Serpentes: Elapidae). *Zootaxa*, 2236, 26–36.
- Wang, C.-T., Wei-Jern, T., Chang, S.-M., Shiao, Y.-J., & Yang, C.-C. (1987). Different susceptibilities of platelet phospholipids to various phospholipases and modifications induced by thrombin . Possible evidence of rearrangement of lipid domains.

Biochimica et Biophysica Acta, 899, 205–212.

Wolf, A., Mazonot, C., Spadoni, S., Calvet, F., & Jp, D. (2011). *FAV-Afrique*® : un sérum antivenimeux polyvalent employé en Afrique et en Europe. 537–540.

World Health Organisation. (2010). *WHO Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins*. 1–134.

Wüster, W., Chirio, L., Trape, J. F., Ineich, I., Jackson, K., Greenbaum, E., Barron, C., Kusamba, C., Nagy, Z. T., Storey, R., Hall, C., Wüster, C. E., Barlow, A., & Broadley, D. G. (2018). Integration of nuclear and mitochondrial gene sequences and morphology reveals unexpected diversity in the forest cobra (*Naja melanoleuca*) species complex in Central and West Africa (Serpentes: Elapidae). *Zootaxa*, 4455(1), 68–98.

Wüster, W., Crookes, S., Ineich, I., Mané, Y., Pook, C. E., Trape, J. F., & Broadley, D. G. (2007). The phylogeny of cobras inferred from mitochondrial DNA sequences: Evolution of venom spitting and the phylogeography of the African spitting cobras (Serpentes: Elapidae: *Naja nigricollis* complex). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45(2), 437–453.

Yuh, F. P., Wong, P. T. H., Kumar, P. P., Hodgson, W. C., & Kini, R. M. (2005). Ohanin, a novel protein from king cobra venom, induces hypolocomotion and hyperalgesia in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 280(13), 13137–13147.

9. ANEXOS

Anexo 1. Identificación de las familias proteicas correspondientes a las fracciones obtenidas mediante cromatografía de fase reversa del veneno de *Hemachatus haemachatus* mediante espectrometría de masas en tandem MALDI-TOF-TOF a partir de la digestión de las bandas separadas mediante electroforesis en gel SDS-PAGE digeridas.

Fracción	%	Masa, kDa • (Da)	Ión		Secuencia derivada MS/MS*	Conf (%)	Sc	Familia proteica	Proteína relacionada	# accesión
			m/z	z						
1a	0.73	~13.2	1338.6	1	GIEINCCTTDR	99	8	3FTx	Alpha neurotoxin NTX-1, <i>N. sputatrix</i>	Q9YGI6
2a	0.16	~20.0	2497.2	1	LAAICFAGAHYND(N ^{da})NNYIDLAR	99	10	PLA ₂	DE-1, <i>H. haemachatus</i>	P00595
			1864.7	1	SWWHFADYGCYCGR	99	13			
2b	3.04	~14.1 (6834.1)	1273.6	1	GCGCPTVKPGIK	99	10	3FTx	Short neurotoxin 2, <i>H. haemachatus</i>	P01433
			2970.3	1	LECHNQSS(Q ^{da})TPPTQTCPGETNCYK	99	11			
			3098.4	1	LECHNQSS(Q ^{da})TPPTQTCPGETNCYKK	99	13			
3a	0.93	~13.3	1754.8	1	LECHNQSSQPPTTK	99	17	3FTx	Short neurotoxin 1, <i>H. haemachatus</i>	P01425
			1500.8	1	GCGCPTVKPGINLK	99	13			
			1471.6	1	SCPGDTNCYNKR	99	12			
3b	0.50	~10.9	1262.5	1	CE(Q ^{da})FIYGGCK	99	9	KTPI	KTPI 2, <i>B. flaviceps</i>	D5J9Q5
			995.5	1	TRHECHR	99	9			
			1390.6	1	KCE(Q ^{da})FIYGGCK	99	16			
4a	0.64	~13.0	1317.6	1	GCAATCPEAKPR	99	13	3FTx	Weak toxin, <i>N. oxiana</i>	P85520
			1473.7	1	RGCAATCPEAKPR	99	15			

			1133.6	1	LTCLICPEK	97.1	8			
			1298.5	1	TWCDAWCGSR	99	7	3FTx	Den-15, <i>D. devisi</i>	R4FID4
5a	0.59	~14.1	1422.6	1	LAAICFAGAHYND	99	10	PLA ₂	DE-1, <i>H. haemachatus</i>	P00595
			1864.8	1	SWWHFADYGCYCGR	99	19			
	0.59		1298.5	1	TWCDAWCGSR	99	13	3FTx	Den-15, <i>D. devisi</i>	R4FID4
6a	0.95	~14.4	1422.7	1	LAAICFAGAHYND	99	12	PLA ₂	DE-1, <i>H. haemachatus</i>	P00595
			1127.6	1	ISGCRPYFK	99	13			
			1864.8	1	SWWHFADYGCYCGR	99	22			
6b	0.10	~11.0	995.5	1	WHMLVPGR	99	7	3FTx	3FTx 12, <i>M. fulvius</i>	U3EPM 9
	0.10		1088.6	1	VVTCQPEQK	99	7	3FTx	Weak toxin CM-1b, <i>H. haemachatus</i> Exactin, <i>H. haemachatus</i>	P01402
	0.10		1864.8	1	SWWHFADYGCYCGR	96.4	6	PLA ₂	PLA2 B, <i>N. sputatrix</i>	Q92085
7a	1.00	~15.3	1787.7	1	CCQTHDNCYSDAEK	99	11	PLA ₂	DE-1, <i>H. haemachatus</i>	P00595
			1422.7	1	LAAICFAGAHYND	99	17			
			2497.2	1	LAAICFAGAHYND(N ^{da})NNYIDL AR	99	12			
			1127.6	1	ISGCRPYFK	99	11			
			1876.8	1	PWWHFADYGCYCGR	99	11			
			1864.8	1	SWWHFADYGCYCGR	99	19			
7b	1.21	~11.1	1303.7	1	SKVVTCQPEQK	94.7	5	3FTx	Weak toxin CM-1b, <i>H. haemachatus</i> Exactin, <i>H. haemachatus</i>	P01402
	1.21		1214.5	1	CCTTDKCNR	99	7	3FTx	Exactin, <i>H. haemachatus</i>	
8a	13.79	~30.3	1398.6	1	EGNNECAAFVCK	99	6	PLA ₂	DE-1, <i>H. haemachatus</i>	P00595
			1787.7	1	CCQTHDNCYSDAEK	99	9			
			2497.2	1	LAAICFAGAHYND(N ^{da})NNYIDL AR	99	15			

			1127.6	1	ISGCRPYFK	99	12			
			1864.8	1	SWWHFADYGCYCGR	99	15			
			1037.4	1	TYSYDCTK	95.3	5			
8b		~15.3 (13507.5)	1829.8	1	EGNNECAAFVCKCDR	99	8	PLA ₂	DE-1, <i>H. haemachatus</i>	P00595
			2497.2	1	LAAICFAGAHYND(N ^{da})NNYIDL AR	99	23			
			1864.8	1	SWWHFADYGCYCGR	99	19			
			2957.3	1	GGSGTPVDDLDRCCQTHDNCY SDAEK	98.7	7			
8c		~11.1	2497.2	1	LAAICFAGAHYND(N ^{da})NNYIDL AR	99	9	PLA ₂	DE-1, <i>H. haemachatus</i>	P00595
			1864.8	1	SWWHFADYGCYCGR	99	13			
9a	2.53	~15.2 (13508.1)	1127.6	1	ISGCRPYFK	99	10	PLA ₂	DE-1, <i>H. haemachatus</i>	P00595
			2497.2	1	LAAICFAGAHYND(N ^{da})NNYIDL AR	99	22			
			1864.8	1	SWWHFADYGCYCGR	99	21			
			2957.3	1	GGSGTPVDDLDRCCQTHDNCY SDAEK	98.7	7			
9b	0.10	~12.6	1644.9	1	LICHNRPLPFLHK	99	12	3FT _x	Toxin 9B-9BB, <i>H. haemachatus</i>	P24778
			2222.0	1	GCAATCPSERPLVQVECCK	94	8			
			1369.6	1	TC(PP ^{ox})GKNLCYK	99	9			
	0.10		2497.2	1	LAAICFAGAHYND(N ^{da})NNYIDL AR	99	11	PLA ₂	DE-1, <i>H. haemachatus</i>	P00595
			1864.8	1	SWWHFADYGCYCGR	99	17			
			1127.6	1	ISGCRPYFK	94.6	8			
9c	0.29	~10.4	2497.2	1	LAAICFAGAHYND(N ^{da})NNYIDL AR	99	9	PLA ₂	DE-1, <i>H. haemachatus</i>	P00595
			1864.8	1	SWWHFADYGCYCGR	99	14			

	0.29		1644.9	1	LICHNRPLPFLHK	99	8	3FTx	Toxin 9B-9BB, <i>H. haemachatus</i>	P24778	
10a	0.25	~14.8	1422.6	1	LAAICFAGAHYND	99	16	PLA ₂	DE-1, <i>H. haemachatus</i>	P00595	
			2497.2	1	LAAICFAGAHYND(N ^{da})NNYIDL AR	99	14				
			1842.7	1	SWWDFADYGCYCGR	99	8				
			1864.7	1	SWWHFADYGCYCGR	99	19				
			1127.6	1	ISGCRPYFK	98.7	11				
			2957.2	1	GSGTPVDDLDRCCQTHDNCY SDAEK	97.3	6				
	0.25		1050.4	1	DYGCYCGR	99	12	PLA ₂	PLA ₂ D, <i>N. sputatrix</i>	Q9I900	
	0.25		1363.7	1	ALTMEGNQASWR	99	11	NGF	Nerve growth factor, <i>W. aegyptia</i>	V9I1F9	
10b	0.25	~11.1	2846.3	1	SFHYNLAAQQCLQFIYGGCGGN ANR	99	6	KTPI	KTPI 2, <i>H. haemachatus</i>	P00985	
			1792.8	1	RPDFCELPAETGLCK	99	10				
	0.25			1017.5	1	CGVSGCHLK	99	7	3FTx	3FTx 8, <i>M. fulvius</i>	U3FVH 6
	0.25			1169.5	1	FNSHHLTWK	95.7	6	3FTx	MTLP-1, <i>N. kaouthia</i>	P82462
11a	1.02	~18.5	1369.6	1	TCPEGQNICYK	99	11	3FTx	Toxin 9B-9BB, <i>H. haemachatus</i>	P24778	
			2222.0	1	GCAATCPSERPLVQVECK	99	17				
			1644.9	1	LICHNRPLPFLHK	99	13				
	1.02			2497.2	1	LAAICFAGAHYND(N ^{da})NNYIDL AR	99	20	PLA ₂	DE-1, <i>H. haemachatus</i>	P00595
	1.02			1864.7	1	SWWHFADYGCYCGR	99	15			
	1.02		1842.7	1	SWWDFADYGCYCGR	99	16	PLA ₂	PLA ₂ D, <i>N. sputatrix</i>	Q9I900	
11b	13.22	~12.1 (7185.6; 7213.5)	1369.6	1	TCPEGQNICYK	99	11	3FTx	Toxin 9B-9BB, <i>H. haemachatus</i>	P24778	
			2378.1	1	RGCAATCPSERPLVQVECK	99	15				
			2222.0	1	GCAATCPSERPLVQVECK	99	14				

			1644.9	1	LICHNRPLPFLHK	99	15			
11c	0.79	~10.2	2846.3	1	SFHYNLAAQQCLQFIYGGCGGN ANR	99	25	KTPI	KTPI 2, <i>H. haemachatus</i>	P00985
			1792.8	1	RPDFCELPAETGLCK	99	15			
	0.79		1644.9	1	LICHNRPLPFLHK	99	10	3FTx	Toxin 9B-9BB, <i>H. haemachatus</i>	P24778
			0.79	2312.9	1	GCAATCPKPEAQVYVDCCAR	99	16	3FTx	Ringhalexin, <i>H. haemachatus</i>
12a	0.94	~29.3	1313.7	1	YIELVVVADHR	99	13	SVMP	Atrolysin-C, <i>C. atrox</i>	Q90392
			1819.0	1	YIELVVVADHRVFMK	95.9	6			
			1607.8	1	VHEIVNFINGFYR	99	17			
			2340.1	1	DYITVQSSAENTLHSFGEWR	99	8	SVMP	Metalloproteinase, <i>C. molossus</i>	Q8JJ50
12b	0.76	~13.0	1842.6	1	SWWDFADYGCYCGR	99	6	PLA ₂	PLA2 2, <i>N. naja</i>	P15445
12c	5.29	~11.5	1569.8	1	LKCHNKVVPFLSK	99	6	3FTx	Toxin 12A, <i>H. haemachatus</i>	P24776
			1310.6	1	SSLLVNMCCCK	99	14			
13a	6.68	~12.1 (6837.1; 6793.0)	1583.9	1	LKCHNKLVFPFLSK	99	11	3FTx	Hemachatoxin, <i>H. haemachatus</i>	B3EWH 9
	6.68		1310.6	1	SSLLVNMCCCK	99	11	3FTx	Toxin 12A, <i>H. haemachatus</i>	P24776
14a	0.15	~15.3	930.5	1	EWAVGLAGK	99	9	Ohanin/v espryn	Thaicobrin, <i>N. kaouthia</i>	P82885
			1233.6	1	GSPCVLGSPGFR	99	13			
			2595.4	1	SGKHFFEVKYGTQREWAVGLA GK	99	8			
			1535.8	1	YGTQREWAVGLAGK	99	14			
			2270.1	1	ADVTFDSNTAFESLVVSPDKK	99	22			
			1810.9	1	TVENVGVSQVAPDNPER	99	21			
14b	0.24	~12.1	1389.7	1	CHNTPLPIYK	99	7	3FTx	Cytotoxin homolog 3, <i>N. melanoleuca</i>	P01473
			1630.9	1	IKCHNTPLPIYK	99	7			

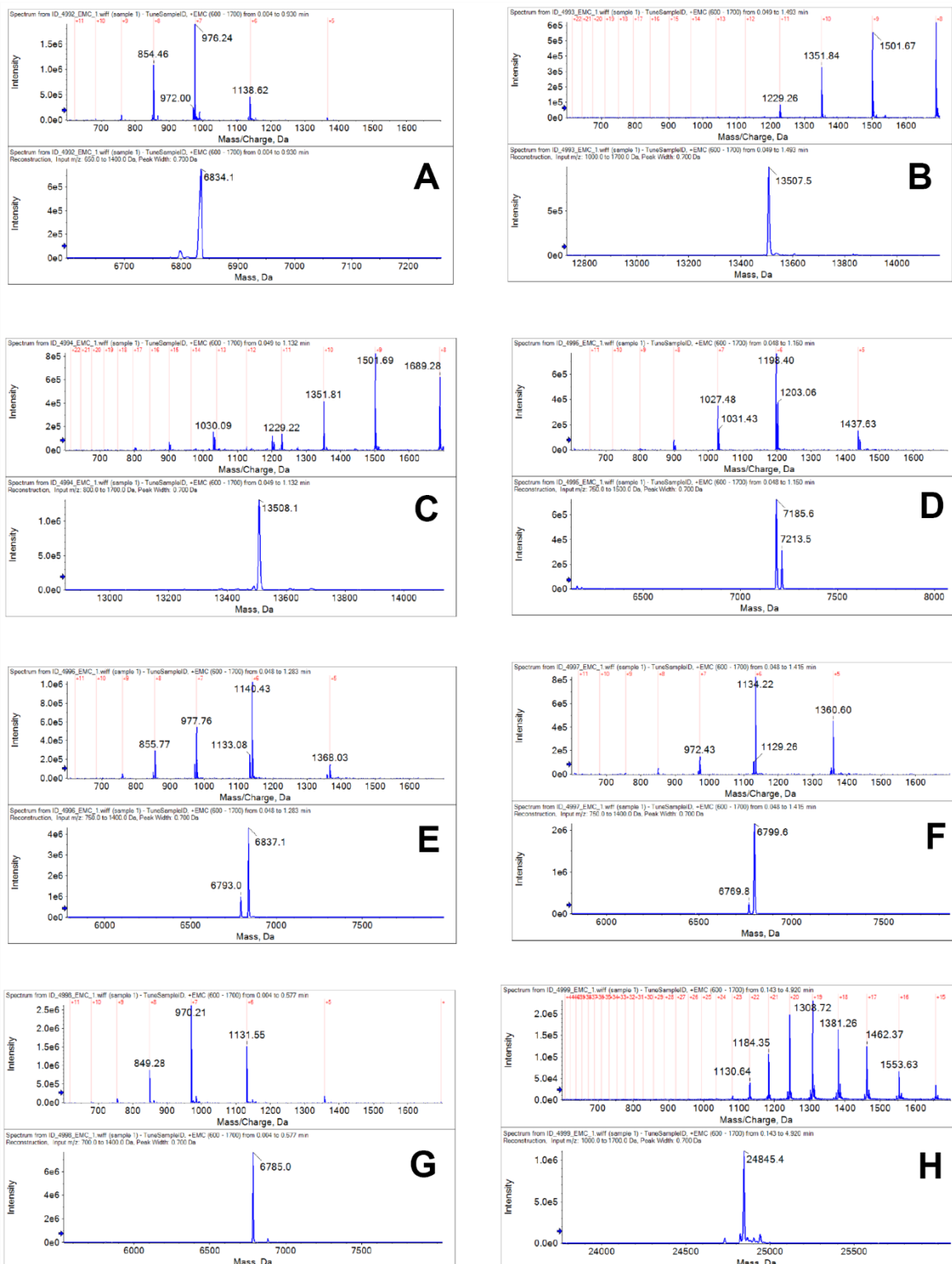
15a	1.77	~14.4	1630.9	1	IKCHNTPLPFIYK	99	15	3FTx	Cytotoxin homolog 3, <i>N. melanoleuca</i>	P01473
			1389.7	1	CHNTPLPFIYK	99	16			
15b	0.81	~12.1	1531.8	1	MSMEVTPMIPIKR	man	9	3FTx	Toxin 11/11A, <i>H. haemachatus</i>	P24777
16a	0.35	~29.3	1298.6	1	CSFAHSPSHLR	96.2	6	CRISP	Latisemin, <i>L. semifasciata</i>	Q8JI38
16b	11.21	~11.5 (6799.6)	1531.8	1	MSMEVTPMIPIKR	man	10	3FTx	Toxin 11/11A, <i>H. haemachatus</i>	P24777
17a	0.05	~29.3	1349.8	1	QIVDKHNALRR	99	9	CRISP	CRVP2, <i>N. atra</i>	Q7ZZN8
			1272.6	1	SKCPASCFCR	97.2	6			
			1057.4	1	CPASCFCR	94.3	7			
	0.05		1298.6	1	CSFAHSPSHLR	99	11	CRISP	Latisemin, <i>L. semifasciata</i>	Q8JI38
17b	3.04	~11.5	1531.8	1	MSMEVTPMIPIKR	95,9	10	3FTx	Toxin 11/11A, <i>H. haemachatus</i>	P24777
18a	0.03	~250.0	1297.6	1	SAECPTDSFQR	99	10	SVMP	Hop-13, <i>H. bungaroides</i>	R4G7J1
			1115.6	1	EHREYLLR	98.2	8			
	0.03			1720.8	1	AAKDDCDLPELCTGR	99	11	SVMP	Metalloproteinase 1, <i>M. fulvius</i>
18b	0.53	~75.0 (74356) ▲	1720.8	1	AAKDDCDLPELCTGR	99	13	SVMP	Metalloproteinase 1, <i>M. fulvius</i>	U3EPC7
	0.53		1297.6	1	SAECPTDSFQR	99	12	SVMP	Hop-18, <i>H. bungaroides</i>	R4G2Z1
18c	0.14	~50.0	1416.7	1	YIEFYVVVDNR	99	8	SVMP	Atrase B, <i>N. atra</i>	D6PXE8
			1297.6	1	SAECPTDSFQR	99	10			
18d	0.08	~37.0	1522.9	1	KNCRPQEPGAPLR	92.7	8	Cystatin	Cystatin, <i>M. ikaheca</i>	E3P6P3
18e	0.04	~31.0	1552.8	1	MQWYPEAASNAER	99	7	CRISP	Ophanin, <i>O. hannah</i>	Q7ZT98
			1607.9	1	QKEIVDLHNSLRR	97.8	7			
	0.04			2041.0	1	IL(N ^{da})GIKCGENIYMSSIPM	99	11	CRISP	DIS 1, <i>D. typus</i>
18f	0.04	~29.3	1552.7	1	MQWYPEAASNAER	99	10	CRISP	Ophanin, <i>O. hannah</i>	Q7ZT98
	0.04		1735.8	1	SKCPATCFCHNKII	99	8	CRISP	Sut-27, <i>S. fasciata</i>	R4G2L2

18g	2.34	~11.5 (6785.0)	1531.8	1	MSMEVTPMIPIKR	man	10	3FTx	Toxin 11/11A, <i>H. haemachatus</i>	P24777
19a	0.16	~100.0	1297.6	1	SAECPTDSFQR	97.2	7	SVMP	Hop-18, <i>H. bungaroides</i>	R4G2Z1
19b	0.10	~50.0	1720.8	1	AAKDDCDLPELCTGR	99	10	SVMP	Metalloproteinase 1, <i>M. fulvius</i>	U3EPC7
	0.10		1297.6	1	SAECPTDSFQR	97.4	8	SVMP	Hop-18, <i>H. bungaroides</i>	R4G2Z1
19c	1.49	~25.0 (24845.4)	1552.7	1	MQWYPEAASNAER	99	15	CRISP	Ophanin, <i>O. hannah</i>	Q7ZT98
			1607.9	1	QKEIVDLHNSLRR	99	9			
	1.49		2041.0	1	IL(N ^{da})GIKCGENIYMSSIPM	99	17	CRISP	DIS 1, <i>D. typus</i>	Q2XXQ6
19d	0.13	~20.0	1552.7	1	MQWYPEAASNAER	99	12	CRISP	Ophanin, <i>O. hannah</i>	Q7ZT98
	0.13		2041.0	1	IL(N ^{da})GIKCGENIYMSSIPM	99	11	CRISP	DIS 1, <i>D. typus</i>	Q2XXQ6
20a	0.13	~100.0	1297.5	1	SAECPTDSFQR	99	10	SVMP	Atrase B, <i>N. atra</i>	D6PXE8
			1038.5	1	SFGEWREK	99	8			
			1416.7	1	YIEFYVVVDNR	99	13			
	0.13		1720.8	1	AAKDDCDLPELCTGR	99	11	SVMP	Metalloproteinase 1, <i>M. fulvius</i>	U3EPC7
20b	0.14	~75.0	1720.7	1	AAKDDCDLPELCTGR	99	14	SVMP	Metalloproteinase 1, <i>M. fulvius</i>	U3EPC7
			1544.8	1	KYIEFYVVVDNR	99	12			
			1416.7	1	YIEFYVVVDNR	99	15			
	0.14		1297.5	1	SAECPTDSFQR	99	10	SVMP	Ech-32, <i>E. curta</i>	R4FJM6
	0.14		1012.4	1	GCFDLNMR	99	8	SVMP	Kaouthiagin, <i>N. kaouthia</i>	P82942
20c	0.02	~50.0	1297.5	1	SAECPTDSFQR	99	10	SVMP	Atrase B, <i>N. atra</i>	D6PXE8
			1416.7	1	YIEFYVVVDNR	99	9			
	0.02		1720.7	1	AAKDDCDLPELCTGR	99	15	SVMP	Metalloproteinase 1, <i>M. fulvius</i>	U3EPC7
20d	0.18	~31.0	1416.7	1	YIEFYVVVDNR	99	10	SVMP	MTP4, <i>M. fulvius</i>	U3FWL3
			1544.8	1	KYIEFYVVVDNR	99	12			

	0.18		1141.6	1	EYREYLLR	98.2	10	SVMP	Atrase B, <i>N. atra</i>	D6PXE8
20e	0.10	~29.0	1607.9	1	QKEIVDLHNSLRR	99	8	CRISP	Ophanin, <i>O. hannah</i>	Q7ZT98
			1552.7	1	MQWYPEAASNAER	99	13			
			1735.7	1	SKCPATCFCHNKII	99	9	CRISP	Sut-27, <i>S. fasciata</i>	R4G2L2
			2040.9	1	IL(N ^{da})GIKCGENIYMSSIPM	99	11	CRISP	DIS 1, <i>D. typus</i>	Q2XXQ6
21a	1.08	~67.2	1140.5	1	DSCFTLNQR	99	11	SVMP	Metalloproteinase, <i>N. kaouthia</i>	Q9PVK7
			2997.3	1	AAKDDCDLPELCTGQSAECPTD VFQR	99	14	SVMP	Metalloproteinase, <i>A. andersonii</i>	Q9PT49
			961.5	1	LKGAGAECR	98	7			
22a	1.88	~71.0	1140.5	1	DSCFTLNQR	99	12	SVMP	Metalloproteinase, <i>N. kaouthia</i>	Q9PVK7
23a	0.16		-	-	-			Uncharact . prot		
24a	0.43		-	-	-			Uncharact . prot		
25a	0.55	~73.6	1753.8	1	AAKNDCDFPELCTGR	99	11	SVMP	Mocarhagin, <i>N. mossambica</i>	Q10749

● SDS-PAGE reducido indicando masa aparente en kDa. Picos seleccionados fueron analizados por ESI-MS y sus masas se indicant entre paréntesis (Da); ▲ masa determinada mediante MALDI-TOF. *Residuos de cisteína se encuentran carbamidometilados. ox: oxidado; da: deaminado; Valores de confianza (Conf) y puntaje (Sc) son calculados con el algoritmo Paragon® del software ProteinPilot®.

Anexo 2. Análisis nESI-MS de las fracciones mayoritarias del veneno (A-H). Paneles superiores muestran las series multicargadas de iones y los paneles inferiores muestran las masas isotópicas promedio correspondientes.



Anexo 3. Concentración dependiente de toxinas del veneno de *H. haemachatus* inmunoretendidas por las columnas de afinidad con antiveneno anti-*Hemachatus*.

<i>Hemachatus haemachatus</i> total venom proteins (μg)							Major Toxin class	% of total toxin binding	% of fraction toxins at maximal binding
RP-HPLC fraction		100	300	600	900	1200			
1	μg TOTAL	5,4	16,2	32,3	48,5	64,6	αNTX 3FTx PLA2	2,0	21,0
	μg RET	3,8	4,0	6,8	5,9	6,2			
2	μg TOTAL	24,8	74,4	148,7	223,1	297,4	PLA2 αNTX 3FTx	26,8	60,9
	μg RET	22,4	37,7	90,6	57,3	62,2			
3	μg TOTAL	19,2	57,7	115,5	173,2	231,0	αNTX 3FTx PLA2, KTPI	10,6	30,9
	μg RET	16,0	19,0	35,8	24,0	25,9			
4	μg TOTAL	16,0	47,9	95,7	143,6	191,5	3FTx PLA2, SVMP	6,1	21,4
	μg RET	13,0	13,0	20,5	14,1	12,8			
5	μg TOTAL	2,0	6,1	12,1	18,2	24,3	3FTx Ohanin	0,7	13,7
	μg RET	1,3	1,4	2,0	2,5	1,7			
6	μg TOTAL	15,1	45,3	90,7	136,0	181,3	3FTx CRISP	3,9	14,3
	μg RET	10,7	9,1	13	10,4	7,4			
7	μg TOTAL	2,4	7,1	14,2	21,3	28,4	3FTx CRISP	0,98	15,5
	μg RET	1,5	1,1	2,7	3,3	2,6			
8	μg TOTAL	5,9	17,7	35,5	53,2	70,9	CRISP PIII-SVMP, 3FTx	16,2	77,3
	μg RET	5,9	17,7	35,5	47,1	54,8			
9	μg TOTAL	9,2	27,6	55,3	82,9	110,6	PIII-SVMP	32,8	100
	μg RET	9,2	27,6	55,3	82,9	110,6			

	Whole venom	Lethal toxins
9 mg anti- <i>Hemachatus</i> -ICP antivenom immunoretained	337,5	172,1 μg
	0,3	0,2 mg
	38	19 mg venom/ g antivenom
	460,0	460,0 mg total Ig/vial
	17,3	8,8 mg immunoretained venom/ vial AV
	1,3E-06	1,1E-06 mol Ag-binding site
	1,58E+05	1,58E+05 g/mol IgG
	0,2	0,2 g IgG interacting with venom toxins
	213,2	170,6 mg IgG interacting with toxins
% of specific IgG against venom toxins	46	37 % 1 Ag-binding site occupied
	23	19 % 2 Ag-binding site occupied
Antivenom potency	4,3	4,3 mg venom/mL AV
	0,043	0,043 g venom/vial
	3,4E-06	5,3E-06 mol Ag-binding site
	0,5	0,8 g neutralizing IgG
	531,4	833,6 mg neutralizing IgG 1 Ag-binding site occupied
	265,7	416,8 mg neutralizing IgG 2 Ag-binding site occupied
	58	91 % neutralizing IgG 2 Ag-binding site occupied
	100%	100% Specific neutralizing IgG (%)

Anexo 4. Concentración dependiente de toxinas del veneno de *H. haemachatus* inmunoretendidas por las columnas de afinidad con antiveneno control (Premium Serum and Vaccines).

RP-HPLC fraction		<i>Hemachatus haemachatus</i> total venom proteins (μg)					Toxin class	% of total toxin binding	% of fraction toxins at maximal binding
		100	300	600	900	1200			
1	μg TOTAL	4,2	12,5	25,0	37,5	50,0	3FT α PLA2	4,3	18,0
	μg RET	2,5	5,3	7,0	7,6	9,0			
2	μg TOTAL	25,3	75,8	151,6	227,5	303,3	PLA2 3FT α	19,2	16,6
	μg RET	17,4	24,2	33,0	35,9	40,2			
3	μg TOTAL	20,2	60,7	121,4	182,2	242,9	3FT α PLA2, KTPI	13,4	11,6
	μg RET	8,5	15,9	24,7	28,1	28,2			
4	μg TOTAL	17,3	52,0	104,0	156,0	208,0	3FT α PLA2, SVMP	9,0	12,1
	μg RET	10,7	16,0	18,6	18,9	14,9			
5	μg TOTAL	2,0	6,0	12,0	18,1	24,1	3FT α Ohanin	1,2	13,8
	μg RET	1,1	1,7	2,1	2,5	2,4			
6	μg TOTAL	16,7	50,1	100,3	150,4	200,6	3FT α CRISP	4,4	9,3
	μg RET	7,4	8,8	9,3	8,4	5,1			
7	μg TOTAL	3,1	9,4	18,7	28,1	37,4	3FT α CRISP	1,5	8,3
	μg RET	1,5	1,4	2,3	2,2	3,1			
8	μg TOTAL	6,2	18,7	37,4	56,2	74,9	CRISP SVMP, 3FT α	19,2	53,9
	μg RET	6,2	15,2	25,0	34,7	40,4			
9	μg TOTAL	4,9	14,7	29,4	44,1	58,8	SVMP	28,0	100
	μg RET	4,9	14,7	29,4	44,1	58,8			

	Whole venom	Lethal toxins
9 mg anti-Hemachatus-ICP antivenom immunoretained	210,2	111,1 μg
	0,2	0,1 mg
	23,4	12,3 $\text{mg venom/g antivenom}$
	500,0	500,0 mg total IgG/vial
	11,7	6,2 $\text{mg immunoretained venom/vial AV}$
	9,1E-07	7,6E-07 $\text{mol Ag-binding site}$
	1,00E+05	1,00E+05 g/mol IgG
	0,091	0,076 $\text{g IgG interacting with venom toxins}$
	91,4	75,7 $\text{mg IgG interacting with toxins}$
% of specific IgG against venom toxins	18	15 % 1 Ag-binding site occupied
	9	8 % 2 Ag-binding site occupied
Antivenom potency	2,6	2,6 mg venom/mL AV
	0,026	0,026 g venom/vial
	2,0E-06	3,2E-06 $\text{mol Ag-binding site}$
	0,203	0,3 $\text{g neutralizing IgG}$
	203,4	319,0 $\text{mg neutralizing IgG 1 Ag-binding site occupied}$
	101,7	159,5 $\text{mg neutralizing IgG 2 Ag-binding site occupied}$
	20	32 % neutralizing IgG 2 Ag-binding site occupied
	100%	100% Specific neutralizing IgG (%)

Anexo 5. Concentración dependiente de toxinas del veneno de *N. annulifera* inmunoretinadas por las columnas de afinidad con antiveneno anti-*Hemachatus*.

<i>Naja annulifera</i> total venom proteins (µg)							Toxin class	% of total toxin binding	% of fraction toxins at maximal binding
RP-HPLC fraction		100	300	600	900	1200			
1	µg TOTAL	2,3	6,8	13,5	20,3	27,1	αNTX 3FT_{xs} WTXs, KPTI	1,3	14,8
	µg RET	1,1	1,4	2,0	1,6	1,6			
2	µg TOTAL	7,7	23,0	46,0	69,0	92,0	αNTX 3FT_{xs} vNGF, PLA2	5,2	18,1
	µg RET	4,1	6,3	8,3	6,8	6,8			
3	µg TOTAL	1,4	4,2	8,4	12,6	16,7	αNTX 3FT_{xs} PLA2	1,3	25,0
	µg RET	0,9	1,2	2,1	1,7	2,2			
4	µg TOTAL	22,5	67,6	135,2	202,8	270,4	CTX 3FT_{xs}	4,7	5,5
	µg RET	7,2	6,3	7,5	5,9	6,8			
5	µg TOTAL	33,9	101,7	203,4	305,1	406,8	CTX 3FT_{xs}	7,0	32,7
	µg RET	11,1	9,0	9,7	7,2	8,4			
6	µg TOTAL	20,6	61,9	123,8	185,7	247,6	CTX 3FT_{xs} ohanin, CRISP	10,0	12,8
	µg RET	10,6	11,6	15,8	14,8	16,3			
7	µg TOTAL	5,8	17,3	34,5	51,8	69,1	SVMP CRISP	32,7	100
	µg RET	5,8	17,3	34,5	51,8	34,2			
8	µg TOTAL	2,2	6,6	13,2	19,8	26,4	SVMP PDE, CTL	16,7	100
	µg RET	2,2	6,6	13,2	19,8	26,4			
9	µg TOTAL	3,7	11,0	21,9	32,9	43,8	SVMP LAAD	21,2	76,7
	µg RET	3,7	11,0	21,9	32,9	33,6			

	Whole venom	Lethal toxins
9 mg anti- <i>Hemachatus</i> -ICP antivenom immunoretained	158,5	46,8 µg
	0,2	0,05 mg
	17,6	5,2 mg venom/ g antivenom
	460,0	460,0 mg total IgG/vial
	8,1	2,4 mg immunoretained venom/ vial AV
	5,6E-07	3,7E-07 mol Ag-binding site
	1,58E+05	1,58E+05 g/mol IgG
	0,1	0,1 g IgG interacting with venom toxins
	89,2	58,8 mg IgG interacting with toxins
% of specific IgG against venom toxins	19	13 % 1 Ag-binding site occupied
	10	6 % 2 Ag-binding site occupied
Antivenom potency	0,6	0,6 mg venom/mL AV
	0,01	0,01 g venom/vial
	3,9E-07	8,7E-07 mol Ag-binding site
	0,1	0,1 g neutralizing IgG
	61,6	137,9 mg neutralizing IgG 1 Ag-binding site occupied
	30,8	68,9 mg neutralizing IgG 2 Ag-binding site occupied
	7	15 % neutralizing IgG 2 Ag-binding site occupied
	35%	100% Specific neutralizing IgG (%)

Anexo 6. Concentración dependiente de toxinas del veneno de *N. mossambica* inmunoretinadas por las columnas de afinidad con antiveneno anti-*Hemachatus*.

		<i>Naja mossambica</i> total venom proteins (µg)					Toxin class	% of total toxin binding	% of fraction toxins at maximal binding
RP-HPLC fraction		100	300	600	900	1200			
1	µg TOTAL	2,4	7,1	14,2	21,3	28,5	3FTx	1,3	5,6
	µg RET	1,0	1,4	1,5	1,5	1,6			
2	µg TOTAL	0,8	2,5	5,0	7,5	10,0	3FTx	1,3	32,0
	µg RET	0,5	1,4	1,6	1,5	1,5			
3	µg TOTAL	4,1	12,4	24,8	37,3	49,7	3FTx	2,2	7,2
	µg RET	1,2	2,1	2,5	2,7	2,6			
4	µg TOTAL	17,5	52,4	104,7	157,1	209,5	3FTx	8,7	6,7
	µg RET	4,8	6,6	9,2	10,6	10,5			
5	µg TOTAL	47,9	143,7	287,5	431,2	574,9	PLA2 3FTx	29,5	8,4
	µg RET	19,2	28,5	34,4	36,1	35,9			
6	µg TOTAL	7,7	23,0	46,0	69,0	92,1	3FTx	5,3	9,4
	µg RET	3,0	4,3	5,7	6,5	5,2			
7	µg TOTAL	14,2	42,7	85,4	128,2	170,9	3FTx	6,1	5,9
	µg RET	4,5	5,8	6,7	7,5	6,3			
8	µg TOTAL	3,2	9,6	19,2	28,7	38,3	SVMP Endonuclease	24,1	77,0
	µg RET	3,2	9,6	19,2	24,8	29,5			
9	µg TOTAL	1,0	3,1	6,3	9,4	12,6	SVMP	10,3	100
	µg RET	1,0	3,1	6,3	9,4	12,6			
10	µg TOTAL	1,1	3,4	6,8	10,2	13,6	SVMP	11,1	100
	µg RET	1,1	3,4	6,8	10,2	13,6			

	Whole venom	Lethal toxins
9 mg anti- <i>Hemachatus</i> -ICP antivenom immunoretained	122,3	66,5 µg
	0,1	0,1 mg
	13,6	7,4 mg venom/ g antivenom
	460,0	460,0 mg total Ig/vial
	6,2	3,4 mg immunoretained venom/ vial AV
	5,9E-07	3,8E-07 mol Ag-binding site
	1,58E+05	1,58E+05 g/mol IgG
	0,1	0,1 g IgG interacting with venom toxins
	93,8	59,8 mg IgG interacting with toxins
% of specific IgG against venom toxins	20	13 % 1 Ag-binding site occupied
	10	6 % 2 Ag-binding site occupied
Antivenom potency	0,8	0,8 mg venom/mL AV
	0,008	0,008 g venom/vial
	7,6E-07	8,9E-07 mol Ag-binding site
	0,1	0,1 g neutralizing IgG
	120,1	140,6 mg neutralizing IgG 1 Ag-binding site occupied
	60,0	70,3 mg neutralizing IgG 2 Ag-binding site occupied
	13	15 % neutralizing IgG 2 Ag-binding site occupied
	64%	100% Specific neutralizing IgG (%)

Anexo 7. Concentración dependiente de toxinas del veneno de *N. nigricollis* inmunoretinadas por las columnas de afinidad con antiveneno anti-*Hemachatus*.

		<i>Naja nigricollis</i> total venom proteins (µg)					Toxin class	% of total toxin binding	% of fraction toxins at maximal binding
RP-HPLC fraction		100	300	600	900	1200			
1	µg TOTAL	3,7	11,0	22,0	33,1	44,1	3FTx	2.6	10,9
	µg RET	1,1	3,0	2,8	3,6	2,8			
2	µg TOTAL	6,0	18,0	36,0	54,1	72,1	3FTx	1.75	13,3
	µg RET	1,5	2,4	1,8	2,3	2,0			
3	µg TOTAL	9,4	28,1	56,2	84,2	112,3	3FTx	6.2	10,1
	µg RET	3,0	5,1	6,1	8,5	8,5			
4	µg TOTAL	3,5	10,4	20,7	31,1	41,5	3FTx nawaprin	4.4	14,7
	µg RET	1,1	2,9	4,3	5,7	6,1			
5	µg TOTAL	36,7	110,2	220,3	330,5	440,6	PLA2 3FTx	17.5	21,8
	µg RET	14,3	24,0	18,6	22,9	19,5			
6	µg TOTAL	12,9	38,7	77,4	116,2	154,9	3FTx	8.9	10,6
	µg RET	6,4	11,3	9,5	12,3	9,9			
7	µg TOTAL	21,6	64,7	129,4	194,0	258,7	3FTx	3.6	7,7
	µg RET	4,1	5,0	3,2	3,7	3,1			
8	µg TOTAL	2,8	8,5	17,0	25,5	34,0	SVMP Endonuclease	24.8	100
	µg RET	2,8	8,5	17,0	25,5	34,0			
9	µg TOTAL	3,5	10,4	20,9	31,3	41,8	SVMP	30.5	100
	µg RET	3,5	10,4	20,9	31,3	41,8			

	Whole venom	Lethal toxins
9 mg anti- <i>Hemachatus</i> -ICP antivenom immunoretained	137,7	61,9 µg
	0,1	0,1 mg
	15,3	6,9 mg venom/ g antivenom
	460,0	460,0 mg total IgG/vial
	7,0	3,2 mg immunoretained venom/ vial AV
	7,0E-07	3,7E-07 mol Ag-binding site
	1,58E+05	1,58E+05 g/mol IgG
	0,1	0,1 g IgG interacting with venom toxins
	110,8	57,8 mg IgG interacting with toxins
% of specific IgG against venom toxins	24	13 % 1 Ag-binding site occupied
	12	6 % 2 Ag-binding site occupied
Antivenom potency	0,4	0,4 mg venom/mL AV
	0,004	0,004 g venom/vial
	4,0E-07	4,6E-07 mol Ag-binding site
	0,063	0,073 g neutralizing IgG
	63,0	73,0 mg neutralizing IgG 1 Ag-binding site occupied
	31,5	36,5 mg neutralizing IgG 2 Ag-binding site occupied
	7	8 % neutralizing IgG 2 Ag-binding site occupied
	28%	63% Specific neutralizing IgG (%)

Anexo 8. Artículo científico “Proteomic and toxinological characterization of the venom of the South African Ringhals cobra *Hemachatus haemachatus*”