

**ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS CON ACTIVIDAD TOXICA
QUE POSEEN FOSFOLIPASAS A₂, ÚTILES PARA EL DISEÑO DE ANTI
VENENOS ESPECÍFICOS DE TOXINAS.**

DIEGO FELIPE MARTINEZ MOLINA

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
POPAYAN
2011**

**ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS CON ACTIVIDAD TOXICA
QUE POSEEN FOSFOLIPASAS A₂, ÚTILES PARA EL DISEÑO DE ANTI
VENENOS ESPECÍFICOS DE TOXINAS.**

TRABAJO DE GRADO

DIEGO FELIPE MARTINEZ MOLINA

Director

Patricia E Vélez, M.Sc, Ph.D

UNIVERSIDAD DEL CAUCA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

POPAYAN

2011

Nota de aceptación

Director: Patricia Eugenia Vélez

Jurado

Jurado

Fecha de sustentación: _____

*Este trabajo es dedicado a mi
Madre a mi Padre y a mi
Hermano.*

AGRADECIMIENTOS

A mi padre, por enseñarme siempre el valor del trabajo honesto, el sacrificio la responsabilidad y la disciplina, el inmenso valor de los ideales y las metas, en todas y cada una de las acciones de la vida gracias papá por siempre hacerme sentir orgulloso de ti.

Agradezco a mi madre, por su amor incondicional, su apoyo y comprensión en todas las decisiones de mi vida, por sus consejos y regaños que siempre fueron el faro para ir por un mejor camino.

Agradezco a mi hermano por su ejemplo de responsabilidad, inteligencia y determinación en su vida académica y en general en su vida diaria, por los buenos ratos y por los consejos.

Agradezco a profesores de la universidad por sus conocimientos académicos y consejos para la vida, especialmente a Patricia Vélez, por ser mi directora de tesis, por demostrar cada día y en cada momento la vocación y la pasión por la biología y por todas las ciencias así como por la investigación, por su optimismo, por el buen humor, los buenos consejos, y el apoyo incondicional a lo largo de este último año de mi vida universitaria.

Agradezco a mis amigos, personas muy especiales con las que recorrí un largo camino en la universidad, agradezco a todas esas personas que conocí y de las que algo aprendí, por los buenos ratos, por los buenos recuerdos, por las risas algunas veces la tristeza, por la felicidad a veces la angustia, por todos los buenos recuerdos que no se pueden olvidar, por los consejos, por su ayuda y compañía . Gracias muchas gracias por hacer mas grato el largo camino de la universidad.

Agradezco por ultimo a la vida por darme la bendición de tener unos padres amorosos y comprensivos, agradezco a la vida por la bella oportunidad de tenerlos y haberme dado todas las comodidades y oportunidades para llegar a cumplir esta meta.

MUCHAS GRACIAS....

ÍNDICE

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
2. JUSTIFICACIÓN.....	14
3. OBJETIVOS.....	15
4. MARCO TEÓRICO.....	16
4.1 Bioinformática.....	16
4.1.1 La Bioinformática: actualidad y perspectivas futuras para Colombia.....	16
4.2 Las serpientes y su veneno.....	17
4.2.1 Generalidades.....	17
4.2.2 Serpientes en Colombia.....	17
4.3 Tipos de venenos.....	18
4.4 Mecanismo de Acción del Veneno.....	18
4.5. Fosfolipasas (FLA₂).....	19
4.5.1 Fosfolipasas A ₂ y Necrosis Muscular.....	20
4.5.2 Inhibidores de Fosfolipasas A ₂	22
4.7 Recursos terapéuticos y tratamientos contra mordedura de serpiente:.....	23
4.8 Complicaciones de la Sueroterapia.....	24
4.8.1 Tipo I o inmediata:.....	24
4.8.2 Tipo II o tardía.....	24
4.9 Alternativas a la sueroterapia.....	24
4.10 Diseño de Vacunas.....	25

5. ANTECEDENTES.....	28
6. METODOLOGÍA.....	30
6.1 Búsqueda en bases de datos biológicas.....	30
6.2 Almacenamiento de datos:.....	30
6.3 Análisis de datos:.....	31
6.4 Visualización de estructuras:.....	31
6.5 Predicción de epitopes a partir de secuencias en formato FASTA.....	32
6.5.1 Métodos para predicción.....	32
6.5.2 Medida de precisión de la predicción.....	33
6.5.3 Umbral de Medidas Independientes.....	34
6.6 Algoritmo de Predicción de epitopes no lineales:.....	35
7. RESULTADOS.....	37
7.1 Resultados Análisis con herramienta Bio-edit.....	40
7.1.1 Análisis de las secuencias de Fosfolipasa A_2 de <i>B. asper</i>	40
7.1.2 Análisis fosfolipasas A_2 de <i>B. asper</i> y <i>Crotalus durissus</i>	40
7.1.3 Análisis de miotoxinas de diferentes <i>Crotalus</i>	41
7.1.4 Análisis de miotoxinas de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	41
7.1.5 Análisis de miotoxinas de diferentes especies y de MIP.....	41
7.1.6 Análisis de secuencias de metaloproteinasas.....	42
7.1.7 Análisis de metaloproteinasas ADAMS.....	43
7.2 Análisis de Metaloproteinasa usando BCE-pred.....	47
7.3 Analisis de crodu miotoxin con BCE-pred.....	52
7.4 Análisis de secuencias con Disco Tope server para búsqueda de epitopes no lineales.....	53
7.4.1 Predicción para modelo de FlA_2 con umbral de -7.7 el máximo.....	53
7.4.2 Predicción para modelo de Metaloproteinasa con porcentaje con umbral de -6.9.....	55
7.4.3 Análisis para Myotoxin con umbral de -6.0.....	57
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
8.1.1 Análisis con Bio – edit de Fosfolipasas A_2 <i>B. Asper</i>	59
8.1.2 Análisis Fosfolipasas A_2 de <i>B. asper</i> y <i>Crotalus durissus</i>	60
8.1.3 Análisis de secuencias Miotoxinas especie <i>crotalus</i>	60
8.1.4 Análisis Miotoxinas especies <i>crotalus</i>	61
8.1.5 Análisis de secuencia Miotoxina y MIP.....	61
8.1.6 Análisis de SVMPs con Bio-edit.....	62
8.1.7 Análisis de SVMPs.....	62

8.2 EPITOPES DE CELULAS T, PREDICCIÓN Y RELACIÓN CON EL ENVENAMIENTO.....	64
8.2.1 Predicción epitopes de células T	64
8.2.2 Células T, Epitopes de células T y relación con el envenamiento.....	65
8.3 Análisis con algoritmo de <i>Bce-pred</i> para epitopes de células B.....	69
8.4 Análisis y correlación entre <i>Bce-Ped</i> y Disco tope server.....	71
CONSIDERACIONES FINALES.....	72
9. CONCLUSIONES.....	76
10. LITERATURA CITADA.....	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación general de Fosfolipasas.....	20
Tabla 2. Secuencias de la especie <i>B. asper</i> encontradas en bases de datos.....	36
Tabla 3. Secuencias de la especie <i>Crotalus durissus</i> encontradas en las bases de datos.....	37
Tabla 4. Secuencias Miotoxinas de especies varias encontradas en bases de datos.....	38
Tabla 5. Secuencias de la especie <i>lachesis muta</i> encontradas en bases de datos.....	38
Tabla 6. Epitopes no lineales para FLA ₂	52
Tabla 7 epitopes no lineales para metaloproteinasas.....	54
Tabla 8. Epitopes no lineales para myotoxin.....	56
Tabla 9. Predicción de nonámeros con Pro-ped para FLA ₂ , Metaloproteinasas, Miotoxinas.....	67
Tabla 10. Predicción de epitopes para células B con BCE -pred.....	70
Tabla 11. Predicción de epitopes para células B con BCE-pred para <i>C. d. terrificus</i>	70

ÍNDICE GRAFICAS

Grafica 1. Análisis de secuencia FLA2 posición 1 a 60.....	44
Grafica 2. Análisis de secuencia FLA2 posición 61 a 120.....	44
Grafica 3. Análisis de secuencia FLA2 posición 121 a 138.....	45
Grafica 4. Análisis secuencia proteica Metaloproteinasas posición 1 a 60.....	47
Grafica 5. Análisis secuencia proteica Metaloproteinasas posición 61 a 120.....	47
Grafica 6. Análisis secuencia proteica Metaloproteinasas posición 121 a 180.....	48
Grafica 7. Análisis secuencia proteica Metaloproteinasas posición 181 a 240.....	48
Grafica 8. Análisis secuencia proteica Metaloproteinasas posición 241 a 300.....	49
Grafica 9. Análisis secuencia proteica Metaloproteinasas posición 301 a 360.....	49
Grafica 10 Análisis secuencia proteica Metaloproteinasas posición 361 a 420.....	50
Grafica 11. Análisis secuencia proteica Metaloproteinasas posición 421 a 480.....	50
Grafica 12. Análisis secuencia proteica Miotoxina posición 1 a 60.....	52
Grafica 13. Análisis secuencia proteica Miotoxina posición 61 a 68.....	52

INTRODUCCIÓN

A partir del rápido avance en la era de la información y de las amplias aplicaciones que tiene y pueden llegar a tener las herramientas informáticas al campo biológico, ha surgido un inmenso abanico de posibilidades en la investigación molecular, farmacológica, inmunológica y genética que se pretenden explorar y aprovechar y es este precisamente el interés del presente trabajo.

Las bases de datos actualmente disponibles en la web, hacen posible que se disponga de información concerniente a los recursos biológicos ya sean del tipo genómicos, proteínicos, enzimáticos, entre otros, de muchos organismos de interés científico, entre estos, la información biológica del ser humano tiene un lugar relevante, así como la información y el análisis molecular de muchas de sus enfermedades, ocupan un lugar importante dentro de las bases de datos disponibles y existentes a nivel mundial.

La Bioinformática es una disciplina que se halla en la intersección entre las ciencias de la vida y de la información. Provee herramientas y recursos para favorecer la investigación biomédica. Busca desarrollar sistemas que sirvan para entender el flujo de información desde los genes a las estructuras moleculares, su función bioquímica, la conducta biológica y, finalmente, su influencia en las enfermedades y la salud (Cañedo *et al*, 2005).

Teniendo en cuenta que existe un conocimiento acumulado, producto de un gran número de investigaciones, en la estructura y función de secuencias proteicas y moléculas involucradas con los venenos de serpientes, de la disponibilidad de grandes bases de datos proteicas y de poderosas herramientas bioinformáticas para la predicción de epitopes se pretende aprovechar dicho conocimiento haciendo uso de estos datos. Esto se hace relevante debido a que los envenenamientos por mordeduras de serpiente constituyen un problema de salud pública importante en la región latinoamericana (Fan *et al*, 1995) y, en Colombia en la década de 1990 a 1999 se informaron en promedio cada año 2.675 mordeduras por serpientes (Registro SIS-12, Ministerio de Salud de Colombia, 1990-1998). Por lo anterior, se plantea realizar una investigación de las secuencias proteicas de características toxicas de *B. asper*, y especies afines geográficamente como *crotalus* que estén reportadas en las bases de datos públicas de internet, como una alternativa coherente, valida y de bajo costo a los esfuerzos clásicamente realizados de experimentación in vivo ya que como única solución, hasta esta época, el único tratamiento para combatir los efectos de las secreciones toxicas es el uso de sueros antiofídicos. Este suero antiofídico o anti veneno constituye el principal y casi exclusivo elemento en la terapia del accidente ofídico (Gutierrez *et al*, 2005).

Dicho veneno de *B. asper* que posee actividad de Fosfolipasas A₂, por su capacidad de producir hemólisis de glóbulos rojos *In vitro* que junto a la mionecrosis *In vivo* observada en los resultados de trabajos previos, determinan que sea un veneno altamente tóxico (Maruñak, *et al* 2005) y su componente de Fosfolipasas A₂ uno, es el principal actor en lesiones necróticas graves y usualmente mortales para la víctima de la mordedura. Además de moléculas como Metaloproteinasas, y otro número de Miotoxinas.

A si mismo especies como *crotalus* que se encuentran en gran medida distribuida en la región geográfica también tienen una incidencia notable con casos de ofidismo, lo que hace pertinente incluirlas en el estudio investigativo de su veneno.

A partir de esta premisa, se hace necesario llevar a cabo una investigación y buscar alternativas para contrarrestar los efectos de las moléculas de los venenos de mordeduras basados en la información disponible y construyendo a partir de estas bases ya cimentadas. Ante la imposibilidad de obtener nuevos sueros con eficacia completa, con un nuevo abordaje bioinformático, con el cual se plantea realizar una investigación de las secuencias proteicas de efecto toxico (venenos) reportadas en las diferentes bases de datos biológicas a nivel mundial, de las especies o especie que poseen FLA₂ en sus secreciones, para su estudio.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Cien años después de que el suero antiofídico fuera presentado por Calmette, este sigue siendo el único tratamiento específico contra mordedura de serpiente (Bon, 1996). En Colombia los datos epidemiológicos, reportan más del 90 % de 2000 mordeduras de serpiente que son causadas por especies de *Bothrops*, (Otero *et al*, 1992). El mayor productor de anti veneno es el Instituto Nacional de Salud (INS), aunque son usados con mucha frecuencia anti venenos de otros países en el área (Brasil, Costa Rica y México) y también son usados para el tratamiento del accidente ofídico (Otero-Patiño *et al*, 1998).

Los esfuerzos tradicionales para buscar soluciones se enmarcan en el uso de diferentes tipos de sueros ya sean estos de tipo monovalente o polivalente; dichos sueros en su mayoría se preparan mediante la inmunización de caballos. Estos sueros preparados *In vitro* aunque muestran un alto porcentaje de efectividad también presentan desventajas (Bolaños & Cerdas, 1980)

Ya que los venenos de serpientes son mezclas complejas de proteínas, siendo solo un porcentaje de estas, tóxicas, por consiguiente, los sueros antiofídicos convencionales contienen una gran cantidad de anticuerpos que en su mayoría no corresponden a los componentes antigénicos tóxicos (Madrigal-Villalobos, 2006), y su administración para contrarrestar la mordedura de serpiente conlleva complicaciones de tipo alérgicas, renales entre otras.

Dado que en la actualidad una importante cantidad de secuencias proteicas obtenidas de los venenos de las serpientes se encuentran reportadas en diferentes bases de datos biológicas, y observando las desventajas que presentan los actuales tratamientos con suero, se plantea llevar a cabo un estudio de las secuencias lineales o primarias buscando homologías, y de sus estructuras tridimensionales (también disponibles en bases de datos públicas) de dichas secuencias proteicas. En este proyecto se aborda el estudio de las Fosfolipasas FLA₂ presentes en las secreciones toxicas (venenos) de las serpientes que son responsables entre algunas otras lesiones de: mionecrosis (Duque *et al*, 2007).

A partir de la explicación anterior en el actual proyecto de investigación se plantean las siguientes preguntas:

¿Qué tipo de homologías se encuentran en las secuencias proteicas de naturaleza toxica, que representan una amenaza por ser altamente nocivas (hemotóxicas) para el ser humano, y si estas existen como pueden ser útiles para el mejoramiento de los sueros antiofídicos producidos actualmente?

¿Existe la posibilidad de crear anti venenos específicos de toxinas contra mordeduras de serpiente *bothrops asper* a partir del estudio de la estructura lineal y de la molécula tridimensional de la FLA₂?

¿Existen secuencias parciales o completas consenso de naturaleza tóxica con otras especies de serpientes que permitan profundizar en el conocimiento de la presencia de éstas secuencias determinantes en la toxicidad y/o hemotoxicidad del veneno?

¿Existen secuencias parciales o completas consenso de naturaleza tóxica con otras especies de animales ponzoñoso que permitan ampliar el conocimiento de la presencia de éstas secuencias determinantes en la toxicidad y/o hemotoxicidad del veneno y su impacto en la biodiversidad de especies?

La finalidad del presente trabajo es el de explorar y utilizar intensivamente los recursos bioinformáticos (datos de bases biológicas de acceso público, y herramientas bioinformáticas) públicamente disponibles vía internet, para sugerir un método en la investigación de anti venenos específicos de toxinas contra las fosfolipasas, presentes en las secreciones toxicas de serpientes.

2. JUSTIFICACIÓN

En Colombia, contamos con una incidencia de ofidismo causada en el 90 % por el género *Bothrops asper*, por lo tanto se hace de urgente necesidad el establecer metodologías y abordajes, que apoyen el conocimiento de la toxicidad proteica del veneno de dicha especie lo cual ayudaría en el tratamiento del efecto hemotóxico causado por su mordedura. La aplicación temprana de las dosis de anti veneno adecuadas, y el probable control a las lesiones que esta mordedura determina el curso vital de su efecto o el desenlace incapacitante permanente (amputación de miembros, caso más común de los casos) o en el peor de los casos, la muerte de la víctima de cómo consecuencia de la mordedura.

El estudio o conocimiento del veneno de, esta especie podría proyectarse hacia otras especies, donde se conoce que existen otras secreciones toxicas, de naturaleza hemotoxicas y/o neurotoxica como: *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis*, y, que causan una importante afección con las mordeduras a la población especialmente en zona rural que por su oficio se ven expuestos a este riesgo de mordedura.

Por lo anterior esta investigación tiene un impacto relevante en el apoyo a los esfuerzos investigativos previos que se han realizado para mitigar el efecto deletéreo que causan las mordeduras de estas serpientes en la población colombiana, y propone una metodología de investigación nueva, mediante herramientas bioinformáticas para la búsqueda de soluciones coherentes, y de bajo costo para el problema de ofidismo en nuestro país.

OBJETIVOS

➤ **Objetivo General.**

Buscar homologías con significado biológico, en las secuencias proteicas presentes en el veneno de naturaleza toxica de *Bothrops asper*, reportadas en las bases de datos biológicas públicas como posibles alternativas para la producción de anti venenos específicos para toxinas.

➤ **Objetivos Específicos.**

- a. Proponer protocolos o metodologías investigativas alternativas a las tradicionalmente utilizadas, empleando nuevas herramientas de la Bioinformática para el estudio de secuencias proteicas de naturaleza toxica.
- b. Estudiar moléculas de interés clínico involucradas en las secreciones toxicas de serpientes *Bothrops asper*.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Bioinformática.

La Bioinformática es sin lugar a dudas una ciencia interdisciplinaria, como el resultado de la unión indisoluble entre las tecnologías informáticas y las ciencias biológicas. Fue concebida en principio para resolver interrogantes como los siguientes: ¿cómo almacenar y organizar secuencias de ADN? ¿Cómo conocer más acerca de la estructura de una proteína? ¿Cómo comparar secuencias de proteínas o predecir su estructura? En esta era post genómica, la adquisición de nuevas y mejores herramientas computacionales ha hecho posible que la Bioinformática se convierta en pieza clave para aplicaciones como diagnóstico molecular, hallazgo de nuevos fármacos, (Franco *et al*, 2008), entre otros.

Brown (2000) , definió la Bioinformática como «el uso de computadores para la adquisición, manejo y análisis de la información biológica», de esta forma la contextualiza en la intersección de la biología molecular, la biología computacional, la medicina clínica, las bases de datos informáticas, el Internet y el análisis de secuencias (Brown, 2000). En la actualidad existen bases de conocimiento porque contienen el conocimiento biológico acumulado necesario para comprender el funcionamiento y la utilidad en todos los niveles de organización de un ser vivo (molecular, celular, y del organismo completo). Así por ejemplo, estas bases incluyen todas las familias de proteínas con sus dominios funcionales y sus estructuras tridimensionales. (Martinez Barreneche, 2007).

4.1.1 La Bioinformática: actualidad y perspectivas futuras para Colombia.

La Bioinformática se puede considerar en la actualidad como una de las columnas en la investigación de los sistemas vivos; el beneficio de ésta para el estudio de los seres vivos y sus interacciones es incuestionable. Hasta ahora se ha basado en la acumulación de datos (genes, proteínas, genomas enteros); la tendencia futura de esta disciplina apunta hacia la integración del conocimiento biológico a varios niveles desde los genomas hasta la organización de los elementos más complejos de la vida, las moléculas.

Además del enorme potencial aun por explotar de la Bioinformática junto con todas sus herramientas en el campo molecular, genético y farmacológico entre otros muchos, la Bioinformática apunta también a ser parte del *pool* de soluciones que posiblemente servirán como mitigadoras de los daños causados por el cambio climático a causa del calentamiento global por el aumento de los gases

invernadero como productos de la contaminación ambiental por la industrial y el escape de monóxido de carbono de los automóviles. Lo anterior, debido a que permite hacer análisis de los potenciales microorganismos que por bioprospección pueden jugar un papel crucial en éste propósito.

Asimismo, la Bioinformática tiene un uso de primer orden, para temas relacionados con investigación molecular para Colombia que es uno de los países con mayor biodiversidad del mundo. Por lo tanto, éste se ve enfrentado al reto de iniciar varios frentes de acción de forma coordinada para consolidar el conocimiento completo de dicha biodiversidad. La Bioinformática ofrece las herramientas y los conceptos para sistematizar y aprovechar ese conocimiento (Barreto Hernandez, 2008)

4.2 Las serpientes y su veneno

4.2.1 Generalidades:

Las serpientes aparecieron en la era cenozoica. En la actualidad se pueden encontrar en casi cualquier lugar y algunas de ellas pueden ser muy peligrosas. Pertenecen a la clase *Reptilia* (amniotas, respiración pulmonar, sin metamorfosis, ectodermos), orden *Squamata*, que también comprende a los lagartos (escamas epidérmicas, corazón tricavitario, cuerpo alargado); suborden *Ophidia* (ápodos, sin orificio auditivo externo ni párpados móviles) (Gonzalez *et al*, 2009).

La distribución de las poblaciones de las distintas especies de serpientes varía en las distintas regiones y latitudes del planeta. Algunos de los individuos de esta Clase se conocen como venenosos, ya que son capaces de producir una intoxicación en otros animales debido a la inoculación mediante mordedura del veneno de sus glándulas salivales (Perez-Nogues *et al*, 2008). La mayoría de las serpientes son terrestres, algunas son arborícolas.

Existe además un grupo bien diferenciado, el de las serpientes marinas, que son de vida estrictamente acuática. De las serpientes terrestres se estima que la mayoría son inofensivas y solo el 10 a 15% son verdaderamente venenosas y peligrosas para el hombre.

4.2.2 Serpientes en Colombia.

En Colombia, un país de variada topografía y formaciones vegetales, son abundantes y se encuentran desde las aguas del océano pacifico y el nivel del mar, hasta alturas de 3000 metros aproximadamente (Angel, 1987).

Las serpientes venenosas en Colombia pertenecen a los géneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis*, *Micrurus* y *Pelamis*; los accidentes por envenenamiento ofídico

son causados principalmente por los géneros *Bothrops* (90%), *Crotalus* y *Micrurus*. El género *Bothrops* (mapaná, cuatro narices, pudridora, pelo de gato, 24 etc.) se encuentra ampliamente distribuido en el país, es la más importante debido a su amplia distribución geográfica, y como la productora de la mayor cantidad de veneno; se encuentra en bosques húmedos, en plantaciones de banano, caña, arroz y potreros (Patiño, 2002).

4.3 Tipos de venenos.

Los venenos de serpientes son complejas mezclas de diversas proteínas y polipéptidos con potencial actividad farmacológica (Manjunatha, 2006). Estos tienen un importante papel para incapacitar e inmovilizar a su presa, así mismo como para degradarla (Tu, 1991). A través de los últimos años un gran número de toxinas que afectan directamente la circulación, han sido aisladas y caracterizadas, a partir de diferentes venenos de serpiente (Markland, 1998).

Principalmente podemos distinguir dos tipos de veneno y, por lo tanto, dos tipos de envenenamiento: un veneno hemotóxico y un veneno neurotóxico. En una clasificación menos general y siguiendo a los autores (Chippaux & Goyfon, 1998) las sustancias presentes en los venenos de serpientes se pueden dividir en:

- **Neuro- y/o Mio-Toxinas:** Las más importantes son las neurotoxinas pre-sinápticas con actividad fosfolipásica y las neuro-toxinas post-sinápticas
- **Toxinas** que se acoplan de receptores membranales induciendo citólisis.
- **Hemorráginas (SVMPs):** Causan daño a endotelios vasculares.
- **Factores** que influyen la coagulación sanguínea: Son numerosos pero la mayoría son enzimas que convierten el fibrinógeno en fibrino-péptidos.
- **Enzimas:** Tienen estructura y actividad variadas pero generalmente muestran menos toxicidad que las neuro-toxinas

4.4 Mecanismo de Acción del Veneno.

Con relación al veneno, este es una secreción espesa, viscosa de color blanco amarillento de gran complejidad química que puede poseer hasta 30 fracciones diferentes, entre proteínas o péptidos con actividad enzimática o farmacológica; aminoácidos libres, ácidos orgánicos, azúcares como glucosa, galactosa; aminos biógenos como acetilcolina, histamina, serotonina; ácidos grasos; agua, detritos celulares, iones como sodio, calcio y zinc; hialuronidasa, enzima que facilita la difusión del veneno a los tejidos; riboflavina y L-aminoácido-oxidasa responsables del color amarillo del veneno y de las propiedades antibacterianas respectivamente. El veneno de las diferentes especies y aún de la misma especie varía en su constitución según la edad de la serpiente, la localidad geográfica, la

época del año y otros factores, teniendo en cuenta que los venenos del mismo género tienen reactividad cruzada con algunas fracciones de los venenos de otros géneros de la misma familia (Otero & Mesa, 2006).

4.5. Fosfolipasas (FLA₂)

De principal interés en este trabajo, las fosfolipasas representan uno de los componentes más importantes de los venenos de serpientes, de especies como *B. asper*, estas son responsables del efecto catalítico, de la mionecrosis, neurotoxicidad, cardiotoxicidad, hemólisis y del efecto anticoagulante e inhibidor de la agregación plaquetaria (Otero, 1994) En la Tabla # 1 se relaciona una clasificación general de las Fosfolipasas:

Tabla 1 Clasificación general de fosfolipasas (Valdes-Rodriguez *et al*, 2002)

FLA ₂ s	Localización	Efectos fisiológicos
Grupo I o pancreática	Jugo pancreático, pulmón, hígado, riñón, bazo, suero	Digestión de fosfolípidos, contracción muscular lisa, proliferación celular, migración celular
Grupo II o inflamatoria	Fluido sinovial, plasma, pulmón, hígado, plaquetas, macrófagos, polimorfonucleares	Producción de potentes mediadores lipídicos de la inflamación, activación de linfocitos T, eliminación de bacterias, migración celular, degranulación de mastocitos
FLA ₂ -8 FLA ₂ -10	Cerebro, testículos, intestino, corazón, placenta, hígado	? ?
Insectos Serpientes	Venenos	Digestión, neurotoxicidad, miotoxicidad, efectos anticoagulantes

Las toxinas del veneno de serpiente que prolongan la coagulación sanguínea son proteínas o glicoproteínas con masas moleculares entre 6 kDa y 350 kDa. Estos factores inhiben la coagulación de la sangre por diferentes mecanismos. Algunas de estas proteínas anticoagulantes presentan las actividades enzimáticas, tales como FLA₂ (fosfolipasas A₂) y proteinasas, mientras que otras no presentan ninguna actividad enzimática (Manjunatha, 2006).

Dentro de las Fosfolipasas se puede encontrar una clasificación, las FLA₂ de venenos que se podrían clasificar en 3 grupos, teniendo en cuenta su estructura

primaria: el grupo I incluye las Fosfolipasas A_2 pancreáticas de mamíferos y del veneno de serpientes de la familia *Elapidae*; el grupo II está formado por aquellas FLA_2 de mamíferos no-pancreáticas, así como las derivadas del veneno de serpientes de la familia *Viperidae* y por último las FLA_2 s derivadas del veneno de abejas y algunos lagartos que pertenecen al grupo III (Araya Castillo, 2004).

Las fosfolipasas A_2 (FLA_2) son un gran grupo de proteínas que poseen funciones moleculares parecidas y muestran homología enorme (Soares, Rodrigues *et al*, 1997). No son exclusivas de veneno de serpiente, pero han sido encontradas mayoritariamente en serpientes, y tejidos de mamíferos, en los cuales están directamente relacionadas en diversas funciones normales y en algunas enfermedades como reumatismo osteoartritis, asma, psoriasis y choque séptico (Duque Osorio *et al*, 2007)

Las Fosfolipasas A_2 miotóxicas pueden ser divididas en dos grupos (Mebs, 1998):

1. Las FLA_2 s neurotóxicas, las cuales pueden ser de cadena simple o proteínas complejas constituidas por FLA_2 s como subunidades. Éstas son altamente tóxicas con una LD50 en un rango de 0.002 a 0.2 mg/kg (inyección intravenosa en ratones).
2. Las FLA_2 s no neurotóxicas, menos tóxicas, con una LD50 > 1mg/kg, pero que exhiben actividad miotóxicas considerables. Dentro de éste grupo se pueden distinguir dos subgrupos:
 - I. FLA_2 s enzimáticamente activas.
 - II. FLA_2 s enzimáticamente inactivas

4.5.1 Fosfolipasas A_2 y Necrosis Muscular.

Dentro de los efectos nocivos que producen las FLA_2 s, la Miotoxicidad (necrosis muscular) hace referencia a la capacidad de causar daño en el músculo esquelético arruinándolo, lo cual implica una alteración de la arquitectura normal de las fibras del músculo esquelético (Araya Castillo, 2004). Este efecto se podría explicar debido a la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, lo cual podría conllevar a un incremento en la inespecificidad de la permeabilidad de ésta y con ello el colapso de todos los gradientes iónicos existentes. Sin embargo, aún no se ha identificado el receptor específico ni el mecanismo por el cual su rápido efecto es ejercido (Lomonte *et al*, 2003)

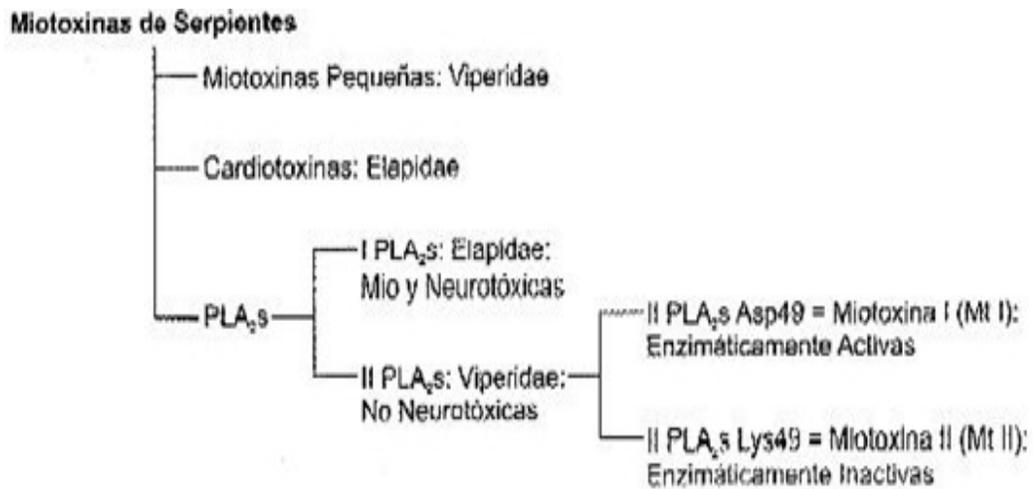


Figura 1 Clasificación de las miotoxinas de veneno de serpientes. Tomada de (Lomonte, Angulo, & Calderon, 2003)

La necrosis de tejido muscular o mionecrosis es uno de los efectos más notables de los envenenamientos por serpientes de la familia Viperidae (Gutierrez & Lomonte, 1989).

Las primeras miotoxinas de venenos de serpientes del género *Bothrops* fueron purificadas en 1984, a partir del veneno de *B. asper* (Gutierrez & Ownby, 1984). Los estudios de las secuencias de estas miotoxinas han permitido clasificarlas en dos subtipos: aquellas que presentan aspartato en el residuo 49 y las que presentan lisina en dicha posición. Esta diferencia tiene implicaciones drásticas en la catálisis, ya que el aspartato en el residuo 49 juega un papel central en la capacidad de estas proteínas de unir el ion calcio, el cual es requisito para la actividad catalítica al estabilizar el intermediario tetraédrico característico de esta reacción (Arni, *et al* 1996). La sustitución de aspartato por lisina tiene como consecuencia una incapacidad de la molécula para ligar calcio y, por lo tanto, la pérdida de la actividad enzimática. Las primeras lisinas 49 aisladas y secuenciadas fueron la miotoxina II de *B. asper* y la bothropstoxina de *B. jararacussu* (Cintra *et al*, 1993). Lo interesante de este grupo de Lis49 es que, pese a ser inactivas enzimáticamente, poseen una fuerte acción miotóxica. Esta observación demuestra que la actividad de hidrólisis de fosfolípidos no es estrictamente necesaria para lesionar la integridad de la membrana plasmática de las fibras musculares, evidenciando que otras regiones moleculares diferentes del sitio catalítico son las responsables de este efecto (Gutierrez, 2002). Se ha demostrado que las miotoxinas, sean éstas Asp49 o Lis49, causan un daño grave a la integridad de la membrana plasmática de las células musculares, causando un influxo de calcio hacia el citosol, lo cual pone en actividad una serie de eventos degenerativos que culminan con lesión celular irreversible (Gutierrez & Ownby, 1984). El sitio de unión de estas miotoxinas a la membrana plasmática no se ha establecido claramente, aunque se plantea la existencia de dos tipos de sitios de

unión: (a) fosfolípidos negativos (Diaz *et al*, 2001) presentes en las membranas de muchos tipos celulares, lo cual explica la amplia acción citolítica de estas proteínas *in vitro* (Lomonte & Pizarro, 1999); y (b) receptores proteicos, presentes en células musculares, lo cual hace a estas células más susceptibles a la acción de las miotoxinas, sin embargo, la identidad de estos receptores proteicos para las miotoxinas aún no ha sido establecida.

4.5.2 Inhibidores de Fosfolipasas A₂

Los inhibidores de Fosfolipasas A₂ se clasifican en tres familias: (a) proteínas con homología con secuencias de unión a carbohidratos de lectinas tipo C, (b) proteínas con secuencias ricas en leucina, y (c) proteínas con el motivo de 'tres dedos', característico de diversos grupos de proteínas, como las a - neurotoxinas de venenos de elápidos (Lizano *et al*, 1999).

La existencia de este tipo de inhibidores esboza alguna posibilidad para su utilización en el perfeccionamiento de la terapia antiofídica en el futuro; además, permite su utilización como compuestos de base para la síntesis de nuevos inhibidores enzimáticos con posible uso farmacéutico más general, dada la relevancia de las proteinasas y Fosfolipasas endógenas en procesos como el cáncer y las enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas. (Gutierrez , 2002)

4.6 Metaloproteinasas:

Las metaloproteinasas están presentes en los venenos de muchas serpientes, y estructuralmente se clasifican en trypsin-like serine proteinases (SVSPs) and metaloproteinasas (SVMPs), la composición de los venenos de serpiente contiene al menos 30 % de SVMPs, lo que sugiere que tiene un rol determinante en el envenenamiento de la víctima, esto evidenciado en el sangrado, en la coagulación intravascular, edema inflamación y necrosis. (Bjarnason & Fox, 1994).

La actividad hemorrágica del SVMPs es uno de los principales factores letales en el veneno de serpiente de víbora. SVMPs Algunos no poseen actividad hemorrágica, pero actúan por mecanismos diferentes tales como la alteración de la hemostasia mediada por pro-o anti-coagulante efectos (por ejemplo, fibrinógenos, fibrolasa, las actividades de la activación de la protrombina), inhibidor de la agregación plaquetaria y la apoptosis (Markland, 1998) SVMPs son endopeptidasas mono zinc que varían en tamaño de 20 a 100 kDa y se agrupan en varias subclases de acuerdo con su organización de dominio proteico (H. Takeya, *et al* 1993)

4.6.1 Clasificación de metaloproteinasas.

SVMPs se clasifican en las clases PI a P-III de acuerdo con su dominio de organización SVMPs PI son la más simples clases de enzimas que contienen sólo una metaloproteinasa (M) de dominio. Las de tipo P-II SVMPs contienen una metaloproteinasa de dominio seguido por un desintegrina (D) de dominio. P-III SVMPs contienen M, desintegrina-como (D) y dominios (C) rica en cisteína. P-III SVMPs se dividen en subclases basadas en sus distintas modificaciones post-traduccionales, como homo-dimerización (P-IIIc) o proteólisis entre dominios M y D (P-IIIb). (Takeda, 2011)

4.6.2 Actividad Biológica de la SMVPs

La mayor parte de las actividades funcionales de SVMPs se asocian con hemorragia o la alteración del sistema hemostático, que son principalmente mediado por la actividad proteolítica del dominio M. SVMPs causar hemorragias al alterar las interacciones entre las células endoteliales y la membrana basal a través de la degradación de las proteínas de la membrana celular endotelial (por ejemplo, la integrina, cadhelin) y componentes de la membrana basal (por ejemplo, la fibronectina, laminina, colágeno IV) (Baramova & Shannon, 1989)

4.7 Recursos terapéuticos y tratamientos contra mordedura de serpiente:

El suero antiofídico puede ser:

POLIVALENTE: Se utiliza para tratamiento provocados por accidentes Bothrópico (mapaná), Crotálico (cascabel) y en algunos sueros por reacción cruzada el Lachésico (verrugosa).

MONOVALENTE: Usados exclusivamente para la mordedura de un solo tipo de serpientes y pueden ser:

Antibothropico: Contra la mordedura de mapaná, taya x, cuatro narices.

Anticrotalico: Contra mordedura de cascabel

Antilachesico: Contra mordeduras de verrugosa, surucucú

Anticoral: Contra mordedura de corales

4.8 Complicaciones de la Sueroterapia

La complicación más frecuente luego de la aplicación del suero antiofídico, es la aparición de reacciones de hipersensibilidad; éstas pueden ser inmediatas o tardías. Las inmediatas se presentan en las primeras seis horas después de administrado el suero y se caracterizan por la aparición de urticaria, eritema en el tronco y la cara, fiebre, mareo, vómito y arritmias. Un cuadro más severo y de aparición inmediata, es el shock anafiláctico con colapso circulatorio, palidez o cianosis marcadas, bronco espasmo y edema glótico (Rodríguez & Negrin, 2009), a continuación se usa una clasificación hecha por (Mota, 2008) usada en la parte de justificación:

4.8.1 Tipo I o inmediata: Reacciona el antígeno con el anticuerpo fijo a los mastocitos liberando histamina y otras sustancias inmunológicas. Es la reacción anafiláctica propiamente dicha, se inicia con rinorrea, estornudo, lagrimeo, enrojecimiento conjuntival, congestión facial, prurito generalizado, urticaria, taquicardia e hipotensión. Las situaciones más graves conllevan bronco espasmo o edema laríngeo con gran dificultad respiratoria, taquicardia e hipotensión arterial por shock cardiovascular (Mota, 2008)

4.8.2 Tipo II o tardía: Las mediadas por **hipersensibilidad tipo III**, que aparece a los varios días o semanas del emponzoñamiento con fiebre, artralgiás, linfadenopatías, angioedema y urticaria. Puede aparecer glomerulonefritis o síndrome nefrótico por depósito de inmunocomplejos en glomérulos renales, o vasculitis como la púrpura de Shönlein-Henoch. (Mota, 2008)

4.9 Alternativas a la sueroterapia.

La búsqueda de anti venenos con menores reacciones adversas ha sido intensa en la última década. Así de los anti venenos a base de Inmunoglobulina G total, se ha pasado a la producción de gammaglobulina digerida enzimáticamente: obteniendo fracciones altamente purificadas Fab y más recientemente la Fab2 dando lugar a una nueva denominación farmacéutica, los faboterápicos. (Zavaleta-Martinez-Vargas, 2004).

Varias alternativas se han planteado frente a la escasez de suero antiofídico existente en Latinoamérica: la evaluación cruzada de los sueros fabricados en diferentes países centro y sudamericanos a fin de determinar sueros de uso potencial en zonas de escasez, (Estevez, De Roodt, & Otero, 2004) la búsqueda de otros agentes terapéuticos alternativos a partir de recursos naturales como las plantas medicinales, algunos de cuyos componentes neutralizan *in vitro* las fracciones hemorrágica y letal de venenos botrópicos, o el empleo de agentes químicos sintéticos capaces de neutralizar una o más actividades del veneno. (Rucavado, *et al* 2000), y la investigación alternativa en este trabajo se proyectan

como opciones en la búsqueda de alternativas al clásico suero antiofídico producido en la actualidad.

4.10 Diseño de vacunas y predicción de epitopes.

El diseño de vacunas efectivas y seguras basadas en proteínas terapéuticas requiere conocimiento sobre epítopes de células T y células B. Mientras que los métodos de predicción de epitopes de células T están disponibles, la predicción de epitopes de células B, es un poco más complicada. (van de Weert & Møller, 2008) Los epitopes de células B pueden ser lineales (continuos) o de conformación (discontinua). Los Epitopes lineales se construyen con residuos de aminoácidos que son secuenciales en las secuencias primarias de la proteína. Aproximadamente el 10% de los epitopes de células B puede contener un sitio de unión lineal primaria. Los epitopes conformacionales no son secuenciales en la secuencia principal. En las proteínas globulares, podría suponer el 90% de los epitopes de células B (Bentley, 1996).

Los epitopes de células B fueron identificados a partir de una serie de proteínas por combinaciones *in vivo e in vitro* en diferentes enfoques, por ejemplo ensayos con animales, cristalografía de rayos X, ingeniería de proteínas, escaneo de péptido, detección inmune a la competencia de azar y bibliotecas de oligo-péptidos (Roggen, 2008)

4.10.1 Enfoques de la Bioinformática para la predicción de epitopes para células B.

Con los años, la bioinformática ha permitido calcular y predecir diversas características de proteínas (incluyendo la estructura) estructura primaria de aminoácidos.

Estas herramientas han establecido las bases para el desarrollo de una serie de herramientas informáticas a fin de evaluar la antigenicidad de las proteínas. Lo que ha permitido un gran avance en el desarrollo de medicamentos y aproximaciones más acertadas al diseño de fármacos.

Los métodos actualmente disponibles se pueden agrupar en seis tecnologías de cada uno con la expectativa general de predecir antigenicidad de cualquier proteína de importancia relevante.

Tecnología 1:

Herramientas para Predicción de epitopes de células B basado en las características de la misma proteína.

Tecnología 2

Herramientas para Predicción de epitopes de células B usando Herramientas de predicción basada en una combinación de las características de las proteínas.

Tecnología 3

Usando herramientas de aprendizaje de máquinas o learning machines tools.

Tecnología 4

Predicción a partir de estructuras en 3 D

Tecnología 5

Predicción de inmuno-genicidad de proteínas desconocidas a partir de proteínas conocidas.

Tecnología 6.

Predicción de epitopes de células B por mapeo de secuencia de aminoácidos y motivos.

4.10.2 Herramientas Bioinformáticas para la predicción de epitopes para células T (T cell epitopes.)

La inmunidad se manifiesta como respuestas inmunes ya sean celulares o humorales, la respuesta celular inmunitaria es dada por las células T, las células T constantemente patrullan el organismo, a la la caza de las proteínas procedentes de patógenos, microorganismos (como virus, bacterias, y parásitos), aunque en las mordedura de serpiente se ha demostrado como algunas toxinas e inclusive venenos inhiben la función de algunas células del sistema inmune, como por ejemplo los macrófagos. Se ha demostrado también que algunos pacientes que han sufrido más de una mordedura por serpientes del mismos género, pueden producir anticuerpos, sin embargo no es claro aún la capacidad neutralizante sobre de dichos anticuerpos sobre todos los efectos provocados por los venenos (Pereañez & Nuñez, 2009).

Las células T expresan una población de diferentes receptores de células T (TCR), que exhibe una amplia gama de selectividades y las afinidades de sus objetivos

Las TCR reconocen el complejo mayor de Histocompatibilidad (MHC), las proteínas presentan en la superficie de otras células. Estas proteínas se unen pequeños fragmentos peptídicos derivados tanto del anfitrión como las proteínas de patógenos a formar complejos péptido-MHC (pMHC) (Flower & Brusich, 2004) Un requisito esencial para generar linfocitos B de memoria y anticuerpos es la presentación de péptidos antigénicos a moléculas del CMH de clase II, este tipo de presentación origina lo que se denomina respuesta humoral. Estos péptidos

pueden ser predichos por medio de programas computacionales. Para el presente trabajo se utilizó ProPred, programa que hace parte de la suite de herramientas *on line* del grupo Raghava, es un software de predicción basado en un modelo matemático/estadístico que utiliza matrices cuantitativas para predecir péptidos, en este caso nonámeros (péptidos de 9 aminoácidos (Singh & Raghava, 2001) se usa para la identificación de subunidades candidatas para el mejoramiento de un posible suero, o en alguna forma en la profundización del conocimiento del enorme número de moléculas que hacen parte y componen el veneno de las serpientes y que hace tan complicado su tratamiento farmacológico. A esta herramienta se puede acceder vía internet en la página web <http://www.imtech.res.in/raghava/propred> o desde su mirror site <http://bioinformatics.uams.edu/mirror/propred>.

5. ANTECEDENTES

En cuanto a la investigación en venenos de serpientes los esfuerzos científicos, han sido numerosos, a continuación se enumeran algunas investigaciones relacionadas con la investigación del veneno de *B asper*, asimismo como esfuerzos encaminados a posicionar a la bioinformática como una herramienta importante en la investigación de ciencias biológicas.

En el año 2006, en el artículo titulado Bioinformatics and Multiepitope Dna Immunization to Design Rational Snake Antivenom (Wagstaff, Laing, Papaspyridis, & Harrison, 2006) se menciona una novedosa estrategia que pretende identificar secuencias codificantes de epitopes estructural e inmunogénicos importantes, a partir de una colección de cDNA expresada a partir de las glándulas venosas de la serpiente *Echis ocellatus*. Esto se enfoca especialmente en las metaloproteinasas (SVMPs) que son responsables por una severa y frecuentemente letal hemorragia en las víctimas de su mordedura. La importancia de estudio fue proveer información valiosa acerca de la función de las secuencias y estructura, de las hemorraginas, pero aun más importante, de ofrecer una novedosa forma de diseñar anti venenos específicos de toxinas; un gran cambio en el concepto de diseños de anti venenos después de un siglo de producción (Wagstaff, *et al* 2006).

En el Instituto Clodomiro Picado de Costa Rica en el año 2006, se realizó el trabajo titulado Serina proteasas de *lachesis stenophrys* Y *Bothrops asper*: producción de anticuerpos mediante inmunización con adn y subclonaje, en el que se propuso metodologías alternativas usando el subclonaje de una serina proteasa del veneno de *Bothrops asper* en el vector de expresión eucariota: pVAX1-UbC. Tras determinar el nivel de IgGs específicas para la serina proteasa de *L. stenophrys* en el suero de ratones inmunizados, se determinó la ausencia de una respuesta inmune específica mediante inmunización intravenosa, lo cual evidencia la necesidad de buscar nuevas estrategias para optimizar los constructos de ADN a ser utilizados. El subclonaje realizado constituye una de ellas, con el fin de estudiar a futuro el efecto regulador de un promotor muy conservado en mamíferos (el gen de la Ubiquitina C) sobre la expresión de la serina proteasa de *B. asper* (Madrigal-Villalobos, 2006)

En un contexto Nacional, en la universidad de Antioquia se encuentran reportado el trabajo realizado por Jaime andres Pereañez titulado: Biochemical and biological characterization of a PLA₂ from crotoxin complex of *Crotalus durissus* cumanensis,

Un trabajo en la Universidad del Cauca destacado en el campo de venenos es el de Nancy Patricia Mosquera titulado “Efecto antiinflamatorio del extracto de la raíz de la planta *Polygala panicula* en ratones inoculados con dosis subletal de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae)”, en 2008.

También en este mismo campo el trabajo realizado por Rafael Alejandro Camayo titulado: “Evaluación del efecto del veneno de *bothrops asper* (serpentes: viperidae) sobre fibrinógeno humano y la neutralización producida por sueros antiofídicos polivalentes colombianos en el 2010”.

En la literatura, también se encuentra el estudio realizado en el campo de la bioinformática en 2006, en el que se hacen aportes al campo inmunológico para la malaria, titulado “Búsqueda de secuencias con actividad inmunogénica, útiles para el diseño de un modelo de posible vacuna contra la malaria”, realizado por Román Yesid Ramírez (Ramírez, 2006) en el cual el autor propone, por medio de herramientas bioinformáticas públicas y disponibles, obtener epítopes que van a ser propuestos como componentes de una aproximación teórica de vacuna contra malaria. Para éste se utilizaron las aplicaciones SRS (Sistema de Recuperación de Secuencias) para recuperar proteínas antigénicas de *Plasmodium*, y las herramientas: TAPPred, ProPred, CTLPred, ProPred I, ABCPred para la predicción de epítopes, todas estas herramientas bioinformáticas disponibles en internet en www.imtech.res.in/raghava/.

Y por último, se encuentra en revisión de la literatura, el trabajo titulado “Aproximación *In Silico* a la Estructura 3D de la Proteína Anti veneno DM64 de la Zarigüeya (Mammalia: Marsupialia: Didelphidae)”, como Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para obtener el título de Maestría en Ciencias Básicas Médicas realizado en la Universidad del Valle por Juan Fernando Duque Osorio. En éste proyecto se hizo una aproximación *in silico* (Métodos computacionales) y por homología (basado en proteínas cuya estructura 3D esté establecida por métodos experimentales) a la estructura 3D de DM64, con el sistema Swiss Model- Deep View para la proteína DM43. Este proceso permitió estandarizar el uso de Swiss Model- Deep View (SM-DV) como técnica de modelamiento de proteínas, muy útil en nuestro medio por su eficiencia y bajo costo.

6. METODOLOGÍA

6.1 Búsqueda en bases de datos biológicas

Llamamos bases de datos biológicas a aquellas bases de datos que contienen información de tipo biológica (proteínas, genomas, enzimas) .Estas son de acceso público; a continuación se especifica cuáles se usaran para los diferentes objetivos de éste Ante-proyecto.

Para identificar las secuencias proteicas candidatas para un análisis bioinformático, se utilizará el SRS implementado en el European Bioinformatics Institute (EBI) <http://srs.ebi.ac.uk>) y seleccionando la base de datos UNIPROTKB aplicando los siguientes criterios de inclusión en la búsqueda:

- Búsqueda Secuencias proteicas de la especie *Bothrops asper*
- Búsqueda Secuencias de proteínas de *Bothrops asper* incluyendo el criterio de búsqueda "toxin"
- Búsqueda de secuencias que preferiblemente se encuentren completas con criterio "toxin"
- Búsqueda de secuencias en fragmentos de proteínas con el criterio "toxin "
- Búsqueda de secuencias fibrinógeno humano cadenas: α , β , γ

Para la búsqueda en la base de datos se usará el National Center for Biotechnology (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con los siguientes criterios de búsqueda:

- Búsqueda Secuencias proteicas de la especie *Bothrops asper*
- Búsqueda Secuencias de proteínas de *Bothrops asper* incluyendo el criterio de búsqueda "toxin."
- Para obtener las imágenes tridimensionales de las moléculas, se usa la base de datos llamada GENE 3D como motor de búsqueda de posibles estructuras tridimensionales de fosfolipasas A2 y sus respectivos homólogos.

6.2 Almacenamiento de datos:

Los datos de secuencias proteicas completas y fragmentos pertenecientes a la especie *Bothrops asper* con los criterios de búsqueda previamente explicados, que se logren encontrar, en las bases de datos, se guardaran y serán puestos en formato FASTA, -un programa diseñado para la búsqueda de similitudes en

secuencias proteicas descrito en 1988 (Pearson, 1988)- para su posterior análisis con, la herramienta Bio Edit 7.0.5.3 (Hall, 1999). La estructuras tridimensionales de las moléculas de interés al estudio, se obtendrán de la base de datos GENE 3D, especializada en el almacenamiento de este tipo de información biológica, y para su posterior análisis usando los programas de visualización se hace necesario guardarla con un formato PDB que es el apropiado para la correcta interpretación del software que se plantea usar para los análisis y conclusiones finales.

6.3 Análisis de datos:

La herramienta Bio Edit se usará en primer lugar para encontrar las similitudes en las secuencias proteicas encontradas en las bases de datos biológicas publicas en internet y posteriormente almacenadas en formato *FASTA*, usando el ítem "shade identities and similarities in alignment in window", teniendo en cuenta que un valor de juicio, igual o superior al 80 % de porcentaje de homología entre las secuencias analizadas. También se usaron la herramienta (conserved domains) para la búsqueda de dominios conservados en las secuencias de proteínas tipo FLA₂ (Marchler-Bauer, 2009) y así poder identificar en qué posiciones de la secuencia, según el análisis de la herramienta pueden existir dominios con actividad catalítica conservada. Lo anterior, para poder tener un criterio más acertado en la búsqueda y en el análisis de la estructura tridimensional de la molécula.

6.4 Visualización de estructuras:

Por último las estructuras proteicas tridimensionales se analizaron, usando dos softwares de uso público cn3D y Swiss-PDBViewer 4.0.1, con el fin de lograr la ubicación espacial más acertada de las secuencias de aminoácidos de interés o cadenas de aminoácidos de interés para el estudio. De este modo, se obtiene una visión completa de la orientación espacial de estos aminoácidos, y se permite una correcta selección de aminoácidos teniendo como principales candidatos, los que presenten homologías previamente analizadas o bien tengan una orientación espacial de superficie dentro de la molécula, estas secuencias serán las candidatas al posterior análisis inmunológico con el software especializado en predicción de epitopes. ya que se supone que los péptidos que son compatibles con CMH II se puede usar el programa Propred disponible en: <http://www.imtech.res.in/raghava/propred/>, ya que no se conoce ningún programa que haga predicciones de linf TH2 (importantes por la naturaleza del veneno que se tiene en cuenta en este estudio) se buscarían algunos epitopes mediante la metodología de búsqueda de homologías en las estructuras tridimensionales y después de que se realice esta búsqueda se realizaría un BLAST de los encontrados dentro del trabajo y los propuestos por el programa PROPED.

6.5 Predicción de epitopes a partir de secuencias en formato FASTA

Para las FLAs 2 usando BCE pred predicción de B-cell epitopes usando propiedades Físico químicas (B-Cell epitopes using Physico-chemical properties).

Este algoritmo emplea para el análisis Epítopes de células B se obtuvieron de la base de datos de células B epítipo (BCIPEP), que contiene 2.479 epítipes continuos, incluyendo 654 inmunodominantes de 1617 epítipes inmunogénicos. Todos los epitopes idénticos y péptidos no inmunogénicos se retiraron, por último se tienen 1029 epitopes continuos de células B únicos experimentalmente probados. El conjunto de datos cubre una amplia gama de grupos patógenos como virus, bacterias, protozoos y hongos. El conjunto de datos final se compone de 1029 epítipes de células B y 1029 epítipes no pepiticos o Peptidos al azar (de la misma longitud y la misma frecuencia generada a partir de SWISS-PROT).

Bases generales para la predicción de epitopes:

Parámetros generales para la predicción como la: Hidrofobicidad, flexibilidad, accesibilidad, superficie de exposición, polaridad y propensión antigénica de las cadenas de los Poli péptidos han sido correlacionadas, con la localización de los epitopes continuos en algunas proteínas muy bien caracterizadas que se usan como modelo. Esto ha llevado a la búsqueda de reglas empíricas que permitan predecir la posición de epitopes continuos a partir de ciertas características de la secuencia de la proteína. Todos los cálculos de predicción se basan en escalas de propensión para cada uno de los 20 aminoácidos.

6.5.1 Métodos para predicción.

A continuación se hace una breve descripción de los métodos aplicados por los algoritmos para la predicción

Método de Parker:

En este método, la escala hidrófila está basada en los tiempos de retención del péptido durante la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en una columna de fase inversa que se construyó. Una ventana de siete residuos se utilizó para el análisis de la región del epítipo. El valor correspondiente de la escala fue introducida para cada uno de los siete residuos y la media aritmética del valor de residuos siete fue asignado a la cuarta, $(i + 3)$, de residuos en el segmento (Parker & Guo, 1986).

Método de Karplus:

En este método, la escala de flexibilidad se construyó basada en la movilidad de los segmentos de la proteína en base a factores de temperatura conocida de los carbonos alfa de 31 proteínas de estructura conocida. El cálculo está basado en una escala de flexibilidad similar al cálculo clásico, salvo que en el centro está el primer aminoácido de los seis aminoácidos de longitud estándar, y hay tres escalas para describir la flexibilidad en lugar de una sola escala. En el presente algoritmo de estudio, la escala "3 Karplus" se utilizó para la predicción de la región de los posibles epítopes (Karplus & Schulz, 1985).

Método Emini:

El cálculo se basa en la escala de la superficie de la accesibilidad a un producto. El perfil de la accesibilidad se obtiene usando la fórmula: **$S_n = (n + 4 + i) (0.37) - 6$** , Donde S_n es la probabilidad de superficie, n es el valor de la superficie de probabilidad fraccional, entonces i varía de 1 a 6. Una secuencia hexapéptido, con S_n igual a la unidad y las probabilidades mayores a 1.0, indican una mayor posibilidad de poder ser encontrado en la superficie de la molécula. (Emini, 1985)

Método Pellequer:

Este método se basa en el análisis de los plegamientos beta, el cálculo se basa en una escala de plegamiento, pero había 3 escalas para describir plegamientos, en vez de una sola. Una ventana de siete residuos es usada para el análisis de la región de epítopo. El valor correspondiente de la escala fue introducido para cada uno de los siete residuos, y la media aritmética de los siete residuos es asignado al cuarto ($i+3$) residuo en el segmento, se hizo una suavización de la curva Gauss, que asigna los pesos a cada uno de los siete residuos los valores para los pesos son (0.05/0.11/0.19/0.22/0.19/0.11/0.05). (Pellequer & Westhof, 1993)

Método de Kolaskar

En este método 156 determinantes antigénicos se usan (<20 aminoácidos) estos se analizan en 34 diferentes proteínas, para calcular la propensión antigénica (A_p) de los residuos. Esta escala antigénica se utilizó para predecir los epítopes en la secuencia.

6.5.2 Medida de precisión de la predicción

Ambos umbrales tanto el de medidas dependientes como el de independientes han sido usadas para evaluar el rendimiento de la predicción.

Umbral de medidas dependientes:

Tres parámetros se utilizan para medir el desempeño de los métodos de predicción. Lo que sigue es una breve descripción de estos parámetros:

1. **Sensibilidad (Qsens):** la sensibilidad de los métodos de predicción se define como el porcentaje de epítopes que se predijo correctamente como epítopes. Mayor sensibilidad significa que casi todos los posibles epítopes se incluirán en los resultados previstos.

$$Qsens = (TP/TP+FN)*100$$

Donde TP se refiere a verdaderos positivos y FN a falsos negativos.

2. **Especificidad (Qspec):** La especificidad se refiere al de los métodos de predicción se define como el porcentaje de predicciones correctas de los no epítopes.

$$Qspec = (TN / VN + FP) * 100.$$

Donde TN se refiere a verdaderos negativos y FP a falsos positivos.

3. **Exactitud (Qacc)** es una medida muy común usada para medir el rendimiento e un cálculo con algoritmos.

$$Qacc = (TOTc/Total)*100$$

Dónde: TOTc es el número de predicciones correctas incluidas TP (true positives) positivos verdaderos y FN (false negatives) falsos negativos.

Todos los parámetros utilizados sensibilidad, Especificidad, Exactitud en este algoritmo fueron calculados con un umbral que va desde -1.5 a +3.0.

6.5.3 Umbral de Medidas Independientes

Un problema con las medidas de umbral dependiente es que ellos miden el rendimiento de un determinado umbral. Ellos fallan en la utilización de toda la información proporcionada por un método de evaluación. El Receiver Operating Characteristics (ROC) es una medida independiente de umbral que se ha desarrollado como una técnica de procesamiento. Un gráfico de ROC se obtiene representando todos los valores de sensibilidad (fracción de verdaderos positivos) sobre el eje y en contra de su equivalente (1 - especificidad) valores (fracción de falsos positivos) para todos los límites disponibles en el eje "x".

Procedimiento de normalización:

Cada propiedad de la escala se compone de 20 valores, asignados a cada uno de los tipos de aminoácidos sobre la base de su propensión relativa como se describe en el cuadro, se calculó la media de siete valores máximos y siete valores mínimos de una escala de propiedades físico químicas dada, y luego se calculó la diferencia entre los dos. Los valores originales de la escala de cada uno se establecen entre 3 a -3 utilizando las fórmulas

$$\text{Puntaje de Normalización} = \text{AMS} / \text{DS} * 6$$

Dónde: AMS se refieren al promedio de los siete valores máximos y mínimos de la escala de características físico-química, y DS se refieren a la diferencia entre el máximo puntaje y el puntaje mínimo. De esta forma se establece La puntuación en 3 (máxima) y -3 (mínima) para la normalización.

6.6 Algoritmo de Predicción de epitopes no lineales:

Disco tope es un algoritmo matemático desarrollado de manera que permite la identificación de epitopes no lineales en moléculas de las cuales se disponga, una estructura tridimensional definida en formato .PDB

El descubrimiento de epítopes discontinuos de células B es un reto importante en el diseño de vacunas. Anteriores métodos de predicción de epítopes han sido en su mayoría sobre la base de secuencias lineales de proteínas y no son muy eficaces. Con DiscoTope, un método para la predicción epítopes discontinuos que utiliza la información de datos estructurales de secuencias proteicas de las cuales se dispone su estructura tridimensional en formato .pdb .El método se basa en estadísticas de aminoácidos, la información espacial y el acceso a la superficie en un conjunto de datos recopilados de epítopes discontinuos determinados por cristalografía de rayos X de anticuerpos contra los complejos antígeno proteico (Nielsen & Lund, 2006). DiscoTope es el primer método para centrarse explícitamente en epitopes discontinuos. Se demuestra que el método basado en la estructura nueva tiene un mejor desempeño para la predicción de los residuos de epitopes discontinuos que los métodos basados únicamente en información de la secuencia y que puede predecir con éxito los residuos epítopes, que han sido identificados por técnicas diferentes. DiscoTope detecta el 15,5% de residuos situados en epitopes discontinuos con una especificidad del 95%. En este nivel de especificidad, la escala convencional Parker hidrofobicidad para predicción lineal

epitopes de células B identifica sólo el 11,0% de los residuos situados en epitopes discontinuos. Predicciones por el método de asignación DiscoTope puede guiar el mapeo o identificación de epítopes experimentales, tanto en el diseño de vacunas racionales y desarrollo de herramientas de diagnóstico y puede llevar a identificación de epitopes mucho más eficiente. (Nielsen & Lund, 2006)

Diferentes umbrales para la puntuación Disco-Tope pueden traducirse en valores de sensibilidad especificidad /. En un punto de referencia que contiene más de 75 antígeno / anticuerpo, las relaciones se encontraron los siguientes porcentajes de relación.

Puntuación	Sensibilidad	Especificidad
>-3,1	0,16	0,95
>-4,7	0,24	0,90
>-6,0	0,32	0,85
>-6,9	0,40	0,80
>-7,7	0,47	0,75

Una Especificidad de 0,75 significa que el 25% de los residuos no epitopes fueron predichos como parte de epitopes.
 Una sensibilidad de 0,47 significa que el 47% de los residuos epitopes fueron predichos como parte de epitopes.

7. ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después llevar a cabo una búsqueda en las bases de datos publicas disponibles vía internet NCBI Y EBI (European Bioinformatics Institute) en la tabla 2 se agrupan las secuencias proteicas encontradas, pertenecientes a la especie *B asper*, necesarias para realizar el respectivo análisis de homologías, de las secuencias que contiene moléculas nocivas, de naturaleza hemotoxicas, a continuación se presentan dichas secuencias proteicas

Tabla 2. Secuencias de la especie B. asper encontradas en bases de datos.

Código referencia uniprot	Nombre de uniprot	Descripción de la proteína	Longitud de secuencia
P20474	PA21_BOTAS Phospholipase A2	Fosfolipasa A2	137 aa
P24605	PA2H2_BOTAS Phospholipase A2 homolog 2	Fosfolipasa A2 homolog 2	137 aa
Q9PVE3	PA2H3_BOTAS Phospholipase A2 homolog M1-3-3	Fosfolipasa A2 homolog M1, 3-3	138 aa
Q9PRT7	PA2H4_BOTAS Phospholipase A2 homolog 4	Fosfolipasa A2 homolog 4	23aa (fragmento)
P81077	BOTAS Myotoxin inhibitor protein MIP	Proteina inhibidora de Miotoxina	63aa
P0C616	PA2HA_BOTAS Phospholipase A2 homolog 4a	Fosfolipasa A2 Homologo 4a	137aa
Q072L5	VM2_BOTAS Zinc	Metaloproteinasas/ desintegrina.	477 aa
P84035	VMBAS_BOTAS Zinc	Metaloproteinasa / basperin A (activador de protrombina)	63 aa
P83512	VMBP1_BOTAS Zinc	Metaloproteinasa Bap 1	408 aa
Q072L6	VSPL_BOTAS Venom serine	Proteinasa	259 aa

Para realizar un estudio de las homologías hipotéticas, que se esperaban encontrar en este trabajo se debían comparar las secuencias de la especie, *B asper* con especies de similares características tanto en la composición de la secreción toxicas, así mismo como de su distribución geográfica, se escogieron

las especies: *Lachesis muta muta* y *Crotalus durissus*. A continuación se muestran las secuencias proteicas encontradas para cada una de estas especies.

Tabla 3 . Secuencias de la especie *Crotalus durissus* encontradas en las bases de datos.

Código referencia uniprot	Nombre de uniprot	Descripción de la proteína	Longitud de secuencia
Q90Y12	BNP_CRODU Bradykinin	Péptidos natriureticos tipo C	181 aa
Q719L8	CRC0_CRODU Crotoctin	Crotoctin	148 aa
Q719L9	CRC1_CRODU Crotoctin-1	Crotoctin	158 aa
O93426	CVXA_CRODU Convulxin subunit alpha		158 aa
O93427	CVXB_CRODU Convulxin subunit beta		148 aa
O57540	MYC1_CRODU Crotoamine CRO1	Crotoamina	65 aa
Q9PWF3	MYC2_CRODU Crotoamine CRO2	Crotoamina	65 aa
O73799	MYC3_CRODU Crotoamine CRO3	Crotoamina	64 aa
P01475	MYXC_CRODU Crotoamine	Crotoamina	42 aa
P0CAS5	PA215_CRODU Phospholipase A2 F15	Fosfolipasa A2	122 aa
P0CAS6	PA216_CRODU Phospholipase A2 F16	Fosfolipasa A2	122 aa
P62022	PA2B_CRODU Phospholipase A2 CB1	Fosfolipasa A2	138 aa
P24331	MYX1_CRODU Myotoxin-1	Miotoxinas	65 aa
P24332	MYX2_CRODU Myotoxin-2	Miotoxinas	64 aa
P24333	MYX3_CRODU Myotoxin-3	Miotoxinas	65 aa
P24334	MYX4_CRODU Myotoxin-4	Miotoxinas	51 aa
P34182	HRTE_CROAT Zinc metalloproteinase/disintegrin;	Metaloproteinasas	478aa
Q90282	VM2B_CROAT Zinc metalloproteinase-disintegrin	Metaloproteinasas	609aa
C9E1R7	M2_CROAT Zinc metalloproteinase/disintegrin VMP-II;	Metaloproteinasas	486aa

Tabla 4. Secuencias Miotoxinas de especies varias encontradas en bases de datos.

Código referencia <u>UniProtKB</u>	Nombre de <u>UniProtKB</u>	Descripción de la proteína	Longitud de secuencia
P24330	CROAD Myotoxin;	Miotoxin de la especie <i>Crotalus adamantus</i>	45aa
P12029	MYX2_CROVC Myotoxin-2;	Miotoxinas de la especie <i>Crotalus concolor</i> .	43aa
P63175	MYX2_CROVV Myotoxin-2;	Miotoxina especie <i>Crotalus viridis viridis</i>	45aa
P01477	MYXC_CROVH Myotoxin	Miotoxina <i>Crotalus viridis helleri</i>	43aa

Para la especie *Lachesis muta* se encontraron reportadas en las bases de datos las siguientes secuencias proteicas de naturaleza toxica:

Tabla 5. Secuencias de la especie *lachesis muta* encontradas en bases de datos.

Código referencia	Nombre de <u>UniProtKB</u>	Descripción de la proteína	Longitud de secuencia
P22796	HRL2_LACMU Hemorrhagic factor 2	Factor hemorrágico	200aa
P0C942	PA2T1_LACMU Phospholipase A ₂ LmTX-I	Fosfolipasa A ₂	122aa
P33589	VSPA_LACMU Gyroxin analog	Serine Proteasa Giroxina	228aa
P0C932	PA21_LACMU Phospholipase A ₂ LM- PLA2-I	Fragmento de secuencia Fosfolipasa A ₂	50aa
P0C943	PA2T2_LACMU Phospholipase A ₂ LmTX- II	Fosfolipasa A ₂	122aa
P0C933	PA22_LACMU Phospholipase A ₂ LM- PLA2-II (Fragment)	Fragmento de secuencia Fosfolipasa A ₂	49aa
Q27J47	VSPB_LACMU Plasminogen-activating proteinase	Proteinasas	258aa
Q27J49	BNP_LACMU Bradykinin-potentiating natriuretic peptides	Peptidos natriureticos	239aa
Q27J50	Q27J50_9SAUR Three finger toxin-like	Miotoxina	93aa
P31990	DISI_LACMU Disintegrin lachesisin	Desintegrina	73aa

7.1 Análisis con Bio-edit

De acuerdo con el análisis llevado a cabo con el programa Bio-edit se pudo verificar las homologías, que se creían existían en las secuencias proteicas de venenos de serpientes, de las que se tuvo a disposición, y que fueron encontradas en las bases de datos de acceso público. Estas secuencias se reportan en las tablas 2 a 5 de las páginas 37-39, y se debe aclarar que no todas las secuencias reportadas, encontradas y descargadas desde las bases de datos de acceso público se tuvieron en cuenta para llevar a cabo el estudio y análisis correspondiente. Se tuvieron en cuenta especialmente las de las especies *B. asper*, y *Crotalus*.

7.1.1 Análisis con Bio – edit de Fosfolipasas A₂ *B. Asper*

En la figura 2 en la página 41, obtenida con la herramienta Bio-edit, se observa el análisis realizado para las Fosfolipasas A₂ pertenecientes a *B. asper*, en la que se muestra que estas comparten en gran medida una identidad química en la secuencia de aminoácidos que han sido secuenciados, al realizar el análisis con un umbral de identidad del 85 % porcentaje que se encontró óptimo para el análisis, ya que con este porcentaje se observan las homologías compartidas de las secuencias, con un porcentaje más alto, si nos referimos a un porcentaje del 95% o superior las homologías existentes no serían tan notorias, por el contrario con un porcentaje menor al 70 % las homologías dentro de las secuencias proteicas serían uniformes y se resaltaría toda la secuencia como idéntica una de la otra, por lo tanto no sería significativo tener en cuenta un análisis con la herramienta Bio-edit, con un porcentaje menor al 70 y superior al 95% .

Por lo anterior, se comprueba su similaridad en características químicas, que se supondrían por ser de la misma especie, especialmente se destacan las homologías que se presentan entre los aminoácidos de posición 1 a 6 (secuencia MRTLWI), los aminoácidos entre la posición 9 a 18 (VLLVGVEGSL) la posición 23 a 26 (KMIL) 78 a 83 (DRYSYS), 101 a 107 (CECDKA) por lo que se infiere que estas secuencias de aminoácidos encontradas en las diferentes secuencias son las más conservadas dentro de la especie y podrían dar algún tipo de evidencia para el estudio asociado a la secreciones toxicas. Además valiéndose de este tipo de caracteres tan únicos dentro de la especie, estas también podrían tener validez para el estudio taxonómico y clasificación del genero *Bothrops*.

7.1 Resultados Análisis con herramienta Bio-edit

7.2.7.1.1 Análisis de las secuencias de Fosfolipasa A₂ de B asper

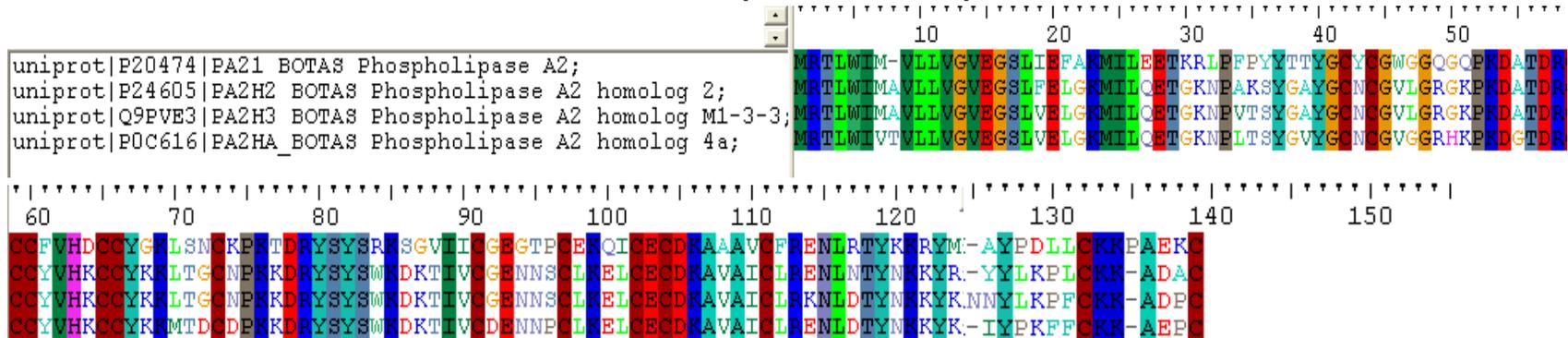


Figura 2. Comparación de las secuencias de Fosfolipasa A₂ de B asper. Usando Bio-Edit.

7.1.2 Análisis fosfolipasas A₂ de B.asper y crotalus durissus

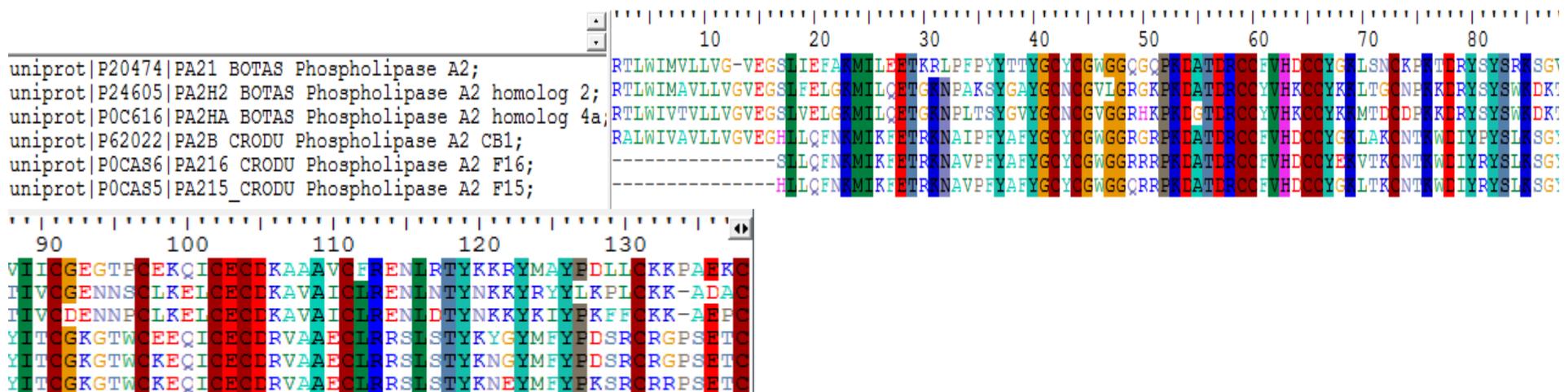


Figura 3. Análisis fosfolipasas A₂ de B.asper Vs crotalus con homología.

Análisis de secuencias Miotoxinas especie *crotalus*

En la figura 5 de la pagina 43 se hace un análisis de secuencias proteicas de miotoxinas de diferentes especies de *crotalus* teniendo en cuenta las especies: *viridis viridis* , *helleri* , y *concolor*, cuyas secuencias se tuvo a disposición desde el buscador del EBI (European Bioinformatics Institute) , y que se enumeran en la tabla 4 de la página 38, y se observa en la figura 4 de la página 41. En estas se observa el alto porcentaje de homología que comparten estas secuencias, especialmente las de las tres especies diferentes a la *Crotalus durissus terrificus*, además de diferir en longitud y en la composición de aminoácidos presentes. Las secuencias de *crotalus durissus*, y las otras tres especies con sus secuencias reportadas y mencionadas arriba, comparten un alto porcentaje en la homología de su secuencia proteica para la molécula Miotoxina a diferencia de las secuencias de *Crotalus durissus* en la que las secuencias reportadas para miotoxinas de la misma especie no comparten un alto porcentaje de homología. Esto se hace llamativo, y al mismo tiempo explicaría el por qué es tan difícil el combatir los efectos nocivos de esta molécula presente en las secreciones toxicas de las serpientes, ya que al ser tan variable su composición química dentro de una misma especie se hace más difícil de lograr que un suero sea eficaz y destinado a contrarrestar el efecto nocivo de este y tener el éxito que debería tener en el caso de un accidente ofídico. La variabilidad de estas secuencias podría ser una de las razones de su drástico y muchas veces variable efecto en el caso de una mordedura.

Análisis de secuencias Miotoxinas especie *crotalus*

En la figura 4 de la pagina 43 se hace un análisis de secuencias proteicas de miotoxinas de diferentes especies de *crotalus* teniendo en cuenta las especies: *viridis viridis* , *helleri* , y *concolor*, cuyas secuencias se tuvo a disposición desde el buscador del EBI (European Bioinformatics Institute) , y que se enumeran en la tabla 4 de la página 38, y se observa en la figura 4 de la página 41. En estas se observa el alto porcentaje de homología que comparten estas secuencias, especialmente las de las tres especies diferentes a la *Crotalus durissus terrificus*, además de diferir en longitud y en la composición de aminoácidos presentes. Las secuencias de *crotalus durissus*, y las otras tres especies con sus secuencias reportadas y mencionadas arriba, comparten un alto porcentaje en la homología de su secuencia proteica para la molécula Miotoxina a diferencia de las secuencias de *Crotalus durissus* en la que las secuencias reportadas para miotoxinas de la misma especie no comparten un alto porcentaje de homología. Esto se hace llamativo, y al mismo tiempo explicaría el por qué es tan difícil el combatir los efectos nocivos de esta molécula presente en las secreciones toxicas

7.1.3 Análisis de miotoxinas de diferentes *Crotalus*

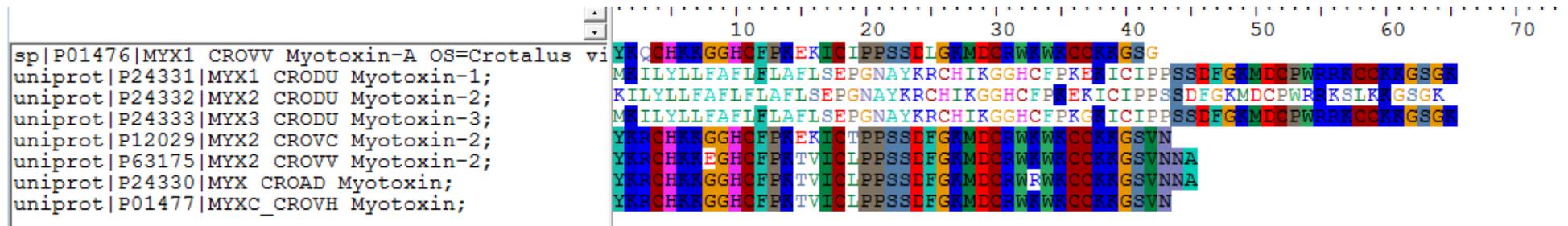


Figura 4. Comparación miotoxinas de diferentes especies crotalus

7.1.4 Analisis de miotoxinas de *Crotalus durissus terrificus*

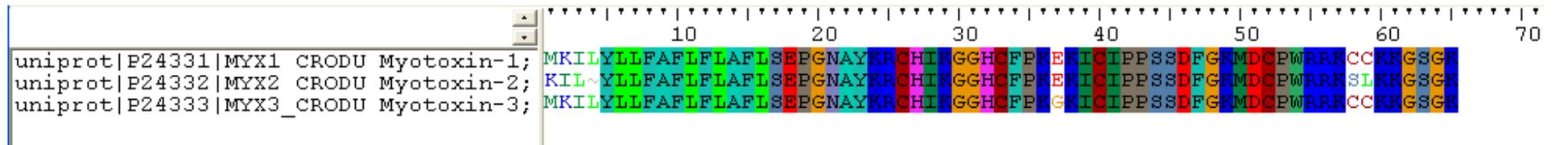


Figura 5. Análisis miotoxinas de crotalus durissus terrificus

7.1.5 Análisis de miotoxinas de diferentes especies y de MIP

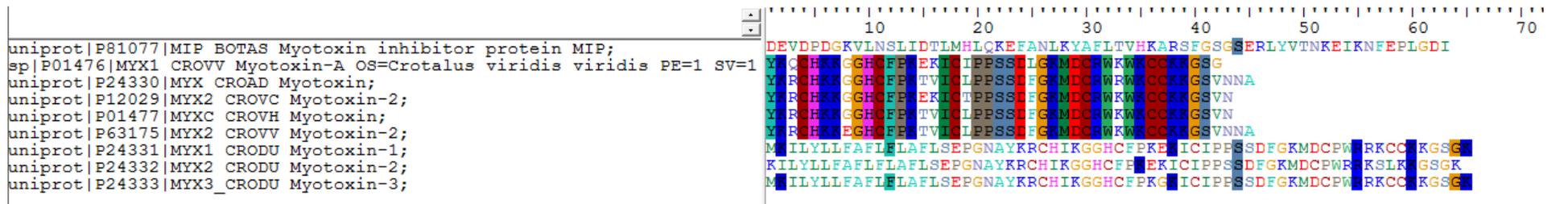


Figura 6. Análisis de secuencias Miotoxinas de diferentes especies y MIP inhibidor de miotoxina de B.asper

de las serpientes, ya que al ser tan variable su composición química dentro de una misma especie se hace más difícil de lograr que un suero sea eficaz y destinado a contrarrestar el efecto nocivo de este y tener el éxito que debería tener en el caso de un accidente ofídico. La variabilidad de estas secuencias podría ser una de las razones de su drástico y muchas veces variable efecto en el caso de una mordedura.

Análisis Miotoxinas especies *crotalus*.

En la figura 5 pagina 43 se puede observar el resultado que muestra el alto porcentaje de homología existente en las 3 secuencias de las miotoxinas de *crotalus durissus terrificus* que se lograron obtener en las bases de datos públicas. Estas secuencias relativamente cortas de entre 64 y 68 aminoácidos, en la que se puede observar la identidad química compartida por estas tres secuencias es muy alta, solo observándose una inconsistencia en la identidad en los 4 primeros aminoácidos de las secuencias. En el resto de la secuencia se observa la coincidencia de los aminoácidos en 100 %, lo que demuestra la alta conservación que han mantenido estas moléculas en esta especie.

Análisis de secuencia Miotoxina y MIP

Al realizar un análisis con la herramienta Bio-edit que se muestra en la figura 6 de la página 43 entre las secuencias de miotoxinas y la secuencia MIP (inhibidor miotoxin protein) reportada para *bothrops*, se esperaría que esta tuviera o compartiera en algún grado dominios en las secuencias de aminoácidos con las secuencias de miotoxinas teniendo en cuenta su característica como molécula antagonista de las miotoxinas. Sin embargo, como se observa, no comparte ningún tipo de homología lo que se hace llamativo y sería interesante el realizar nuevos estudios a nivel proteómico de las características de estas secuencias. Además se puede aclarar que de dicha proteína (MIP) no se pudo obtener un modelo tridimensional modelado, ya que no se logró hacer un modelado por homología que sería la forma más práctica para obtener un modelo tridimensional de dicha proteína, lo que impidió realizar un análisis más detallado de la estructura tridimensional de dicha secuencia que podría mostrar de forma más completa.

7.1.6 Análisis de secuencias de metaloproteinasas

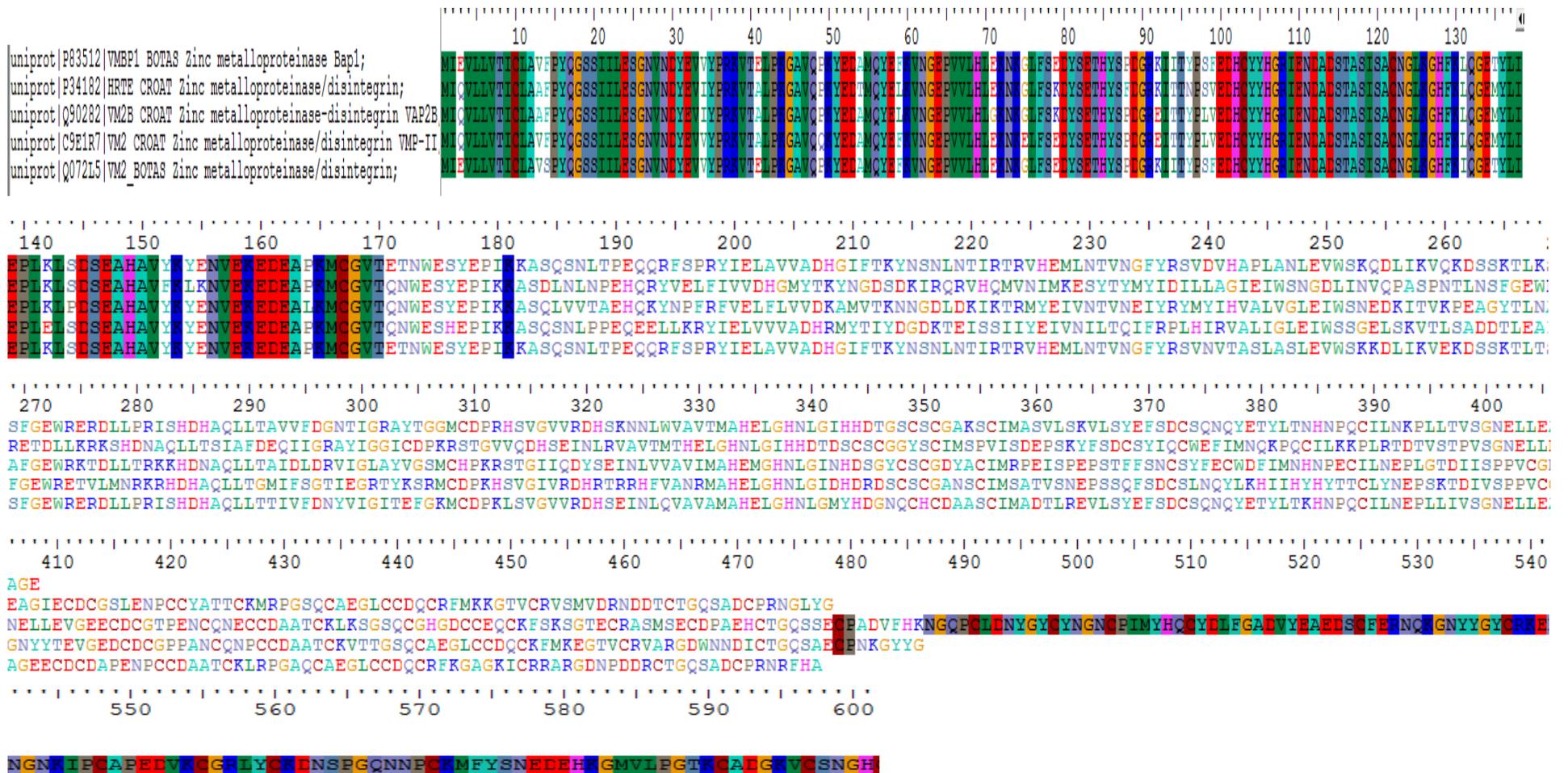


Figura 7. Análisis de secuencias de metaloproteinasas

7.1.7 Análisis de metaloproteinasas ADAMS

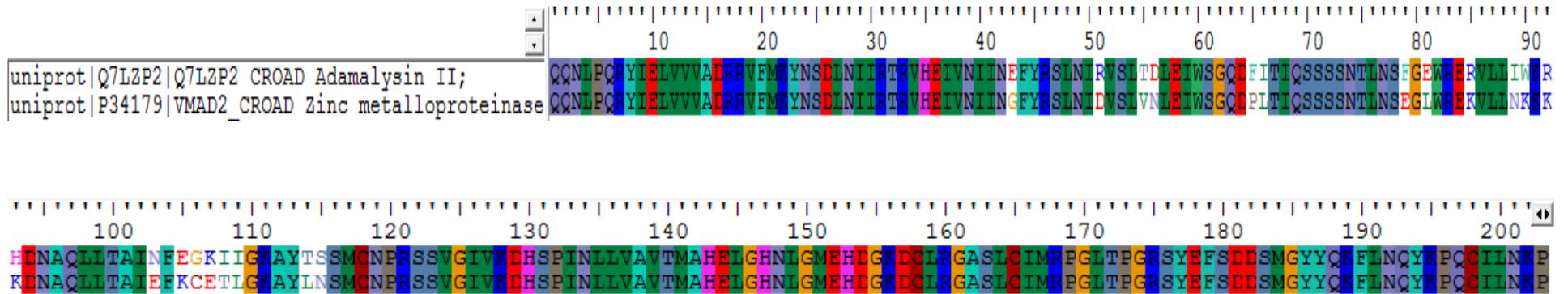


Figura 8. Análisis de metaloproteinasas tipo II (ADAMS)

Análisis de SVMPs con Bio-edit

En la figura 7 de la página 45 se muestra el análisis realizado para las secuencias proteicas de las moléculas metaloproteinasas también conocidas como SVMPs. Estas secuencias proteicas de gran tamaño mayores a 400 aminoácidos en sus secuencias las SMVPs son los factores primarios responsables por el daño local y la hemorragia sistémica (Takeya & Iwanaga, 1998), y actúan especialmente degradando los componentes de las membranas basales subyacentes, células endoteliales vasculares causando así la alteración del vaso permitiendo el escape de sangre al contenido del estroma. (Gutierrez & Rojas, 2005). Como se observa en la figura 7 se analizan 5 secuencias que se encontraban disponibles, 3 pertenecientes a *crotalus* y 2 pertenecientes a *bothrops*. Allí se observa que el porcentaje compartido por las 5 secuencias es muy alto entre las posiciones 1 y 170 por lo que se creería que dentro de estas posiciones se encontrarían los dominios más conservados de las secuencias y sería allí donde se esperaría encontrar los dominios catalíticos de la molécula. A partir de la posición 170 la homología de las secuencias es muy escasa, casi nula, por lo que se entendería el por qué se da la gran variabilidad en la composición de los venenos. A partir de este análisis se podría comprender por que se da la variabilidad en la composición de los venenos ya que al variar la composición de aminoácidos y longitud de las secuencias proteicas la alteración de estas se reflejaría en el resultado de una mordida que conllevaría complicaciones.

8.1.7 Análisis de SVMPs

El dominio catalítico M de las SMVPs está en el rango de 200 a 210 residuos de longitud (Fox & Serrano, 2005). El dominio M tiene una forma elipsoidal achatada con una muesca en su parte plana que separa a un dominio relativamente pequeño e inferior y a uno superior del cuerpo principal molecular, en donde el sitio activo de la hendidura se extiende horizontalmente a través de la superficie de dominio M donde se unen a péptidos sustratos de izquierda a derecha (Takeda, 2011). Según el análisis realizado en este trabajo, los datos encontrados coinciden con los reportados en trabajos como los de Takeda (2011) en los que se reporta como *el dominio catalítico zinc ion que se encuentra localizado* en la parte inferior de la hendidura como se muestra en la figura 14, página 62 y está formado por átomos de Ne_2 de tres histidinas, posiciones HIS 143, HIS 146 y HIS 152. Se relaciona esta evidencia, que se reporta con una estructura tridimensional con la obtenida en el análisis con Bio-edit que es un análisis de la secuencia plana que se observa en la figura 8 página 43 y a su vez, esto solo se reporta para las metaloproteinasas del tipo adamalysin II y se debe resaltar que este tipo de

moléculas no posee un actividad hemorrágica significativa. En la comparación que se hizo usando Bio-edit en la figura 9, página 46, se puede observar como este tipo de moléculas comparten una homología significativa y una muy escasa con las del grupo III.

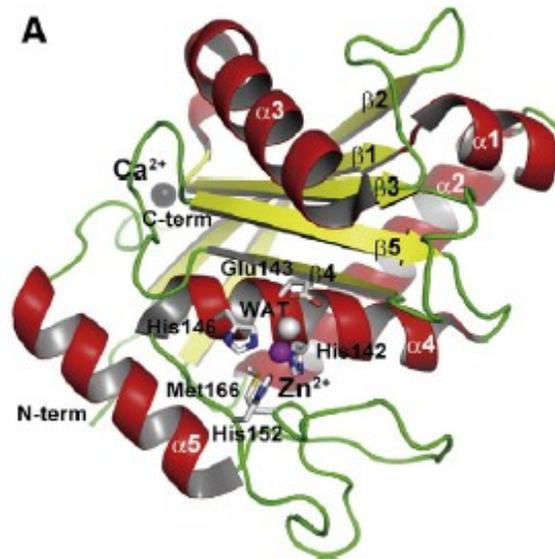


Figura 9. Estructura del dominio M de las metaloproteinasas muestra la secuencia de 4 Histidinas conservadas en la estructura de la proteína tomado de (Takeda, Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins, 2011)

8.1.7.1 Análisis de SVMPs tipo III

El análisis de las metaloproteinasas del tipo SVMPs tipo III que se observa en la gráfica 7 en la página 48, las moléculas metaloproteinasas de este tipo, es decir aquellas que tienen un mayor efecto nocivo en estudios previos, con el alineamiento de 40 secuencias de SVMPs tipo III, se ha encontrado que poseen esta secuencia consenso: Q-D-H-S(N)-K, residuos 320–324 en VAP1 en el dominio M (Takeda, *et al* 2006). En el analisis comparativo, se observa que en las posiciones 320 a 324 de las secuencias encontradas en las bases de datos no se encuentra una alta homologia como se esperaria, en lugar de ello, se observa una tendencia a encontrar los residuos de estos aminoacidos pero en posiciones corridas ya sea por uno o dos espacios. Sin embargo, en el analisis con la herramienta *Bce pred* se encuentra una prediccion interesante relacionada con una secuencia que presenta un grado apreciable de antigenicidad asi como de accesibilidad . No obstante, la condicion de exposicion en superficie no reporta un valor significativo asi como de flexibilidad reportada en la figura 9, pagina 49, por lo tanto seria adecuado profundizar en el estudio de esta secuencia de 4

aminoácidos, como refiere la literatura. Las metaloproteinasas SVMPs por lo general muestran una alta actividad hemorrágica o más actividad fisiológica que otras metaloproteinasas de otras familias, sin embargo no es exacto como la arquitectura del modelo se relaciona con sus funciones dañinas, este es un campo aun por estudiar a profundidad.

3 Análisis con algoritmo de *Bce-pred* para epitopes de células B en FLA₂

En el análisis individual de los resultados obtenidos con el algoritmo *Bce-pred* que se realizó en la secuencia identificada con el número de ingreso P 20474 que corresponde a una Fosfolipasa A₂ de la especie *B. asper*. Usando este abordaje se analizó el comportamiento para las variables: flexibilidad, accesibilidad, exposición en superficie, polaridad y propensión a la antigenicidad de la molécula, y se encontró que los picos más altos para la variable accesibilidad se encuentran en las secuencias ILEETKRLPFPYYTTYG, GGQGQPKDATDRC, KLSNCKPKTDRYSYSRKSQV, EGTPCEKQ, FRENLRITYKKRYMAYPD, CKKPAAEKC cuyo comportamiento se muestran en las gráficas 1 a 3 en las páginas 50 y 51. De acuerdo a estos resultados se observan secuencias muy largas, por lo que se hace necesario realizar una correlación entre las otras variables como exposición a superficie y propensión antigénica. En cuanto a la exposición en superficie se obtuvieron picos altos en las siguientes secuencias, EETKRLP, PKDATDR, NCKPKTDRYSYSRK, ENLRITYKKRYMAY, CKKPAAEKC.

Para la variable de propensión antigénica se obtuvieron las siguientes secuencias representativas observadas en los picos de las gráficas 1 a 3 y en la tabla 10 de la página 50 que resume la tabulación de resultados: TLWMVLLVGVEGSL, RLPFPYYTTGTCYCGW, TDRCCFVHDCCYGKLS, KSGVIICGEG, PCEKQICECDK, VCFRENL, YPDLLCKKP.

A partir de estas observaciones se plantea hacer una correlación entre estas variables que se encuentran resumidas en la figura 9 de la página 53 y observar cuáles de ellas comparte fracciones o secuencias resumidas la siguiente tabla:

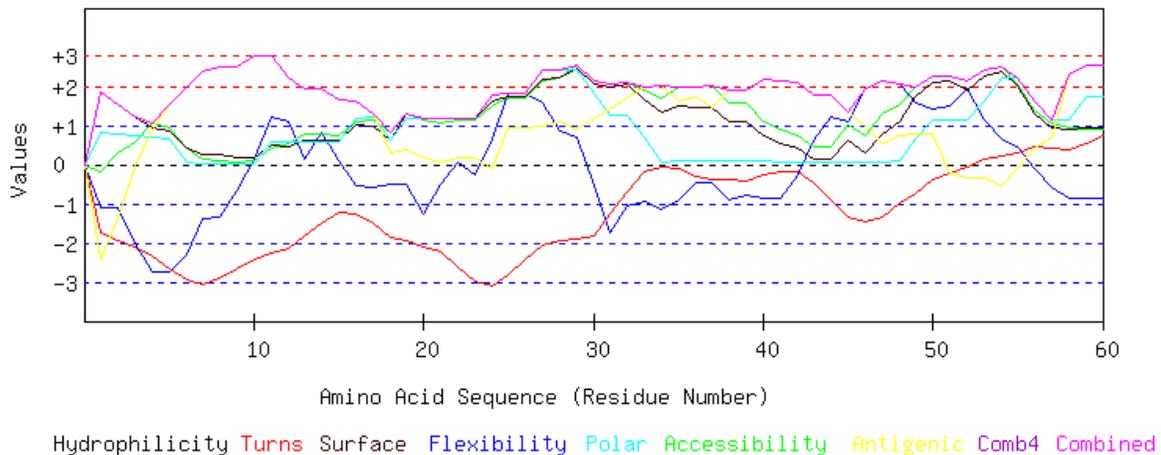
Tabla 6. Predicción de epitopes para células B con BCE –pred

Especie	Proteína	Epitope célula B	Posición	Longitud de secuencia	Accesibilidad	Exposición en superficie
<i>B. asper</i>	FLA 2	RLP ^o FFYYTTYG	31-41	137	Si	Si
<i>B. asper</i>	FLA 2	TDRCC	56-60	137	Si	No
<i>B. asper</i>	FLA 2	KSGV	85-88	137	Si	No
<i>B. asper</i>	FLA 2	PCEKQ	96-101	137	Si	No
<i>B. asper</i>	FLA 2	FRENL	112-117	137	Si	No
<i>B. asper</i>	FLA 2	YCKKP			Si	Si

FLA₂ = PA21_BOTAS Phospholipase A₂ (Fosfolipasas A₂ reportada bajo el código P20474 en EBI (European Bioinformatics Institute))

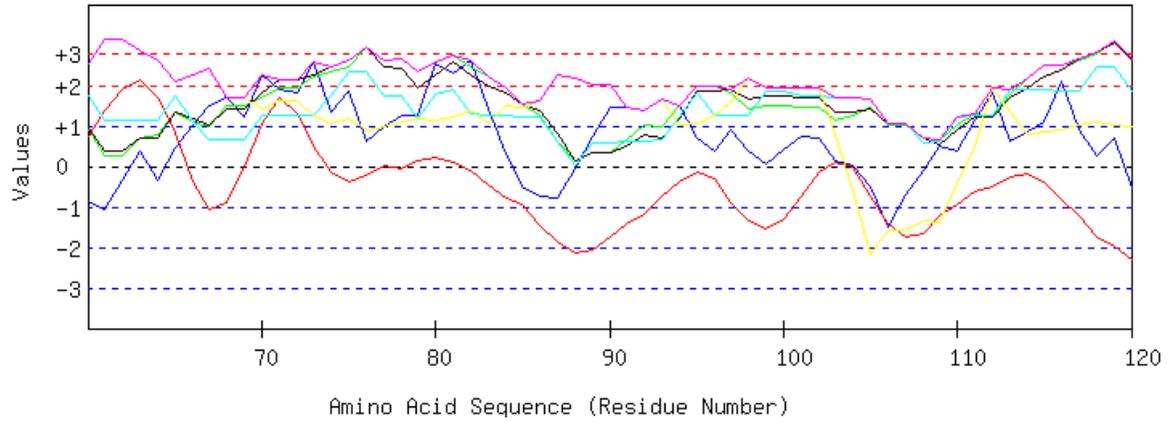
7.2 Resultados del Análisis de la FLA₂ Usando Bce-pred

GRAPHICAL RESULT :: SEQ 1 to 60



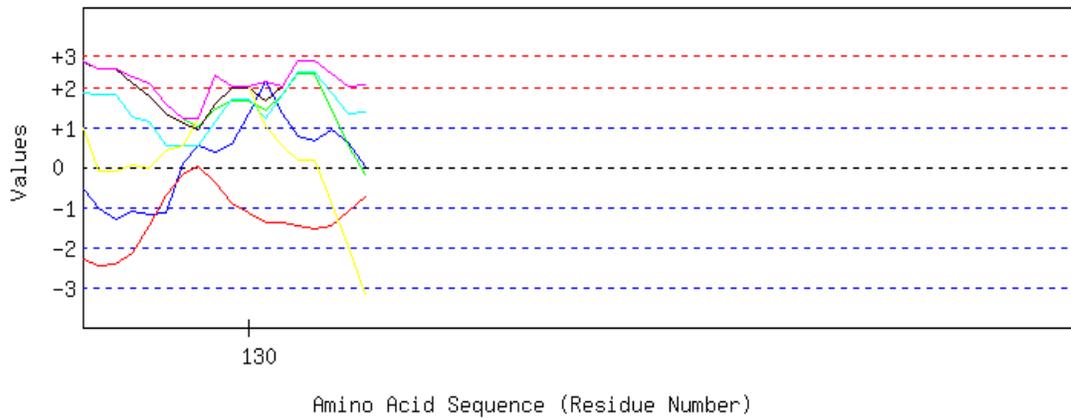
Grafica 1. Análisis de secuencia FLA₂ posición 1 a 60

GRAPHICAL RESULT :: SEQ 61 to 120



Grafica 2. Análisis de secuencia FLA₂ posición 61 a 120

GRAPHICAL RESULT :: SEQ 121 to 180



Grafica 3. Análisis de secuencia FLA₂ posición 121 a 138

Sequence	¹ MRTLWIMVLLVGVEGSLIEFAKMLEETKRLPFPPYYTTYGCYCGWGGQGPKDATDRCCFVHDCCYGKLSNCKPKTD RYSYSRKS GVICGEGTPCEKQICECDKAAA CFRENLR TYKKRYMAYPDLLCKKPAEK ¹³⁷
Flexibility	¹ MRTLWIMVLLVGVEGSLIEFAKMLEETKRLPFPPYYTTYGCYCGWGGQGPKDATDRCCFVHDCCY GKLSNCKPKTD RYSYSRKS GVICGEGTPCEKQICECDKAAA CFRENLR TYKKRYMAYPDLLCKKPAEK ¹³⁷
Accessibility	¹ MRTLWIMVLLVGVEGSLIEFAKML EETKRLPFPPYYTTYGCYCGW GGQGPKDATDRCCFVHDCCY GKLSNCKPKTD RYSYSRKS GVICGEGTPCEKQICECDKAAA CFRENLR TYKKRYMAYPDLLCKKPAEK ¹³⁷
Toma	¹ MRTLWIMVLLVGVEGSLIEFAKMLEETKRLPFPPYYTTYGCYCGWGGQGPKDATDRCCFVHDCCYGKLSNCKPKTD RYSYSRKS GVICGEGTPCEKQICECDKAAA CFRENLR TYKKRYMAYPDLLCKKPAEK ¹³⁷
Exposed Surface	¹ MRTLWIMVLLVGVEGSLIEFAKML EETKRLPFPPYYTTYGCYCGWGGQGPKDATDR CCFVHDCCYGKLS NCKPKTD RYSYSRKS GVICGEGTPCEKQICECDKAAA CFRENLR TYKKRYMAYPDLLCKKPAEK ¹³⁷
Polarity	¹ MRTLWIMVLLVGVEGSLIEFAKML EETKRLPFPPYYTTYGCYCGWGGQGPKDATDR CCFVHDCCYGKLS NCKPKTD RYSYSRKS GVICGEGTPCEKQICECDKAAA CFRENLR TYKKRYMAYPDLLCKKPAEK ¹³⁷
Antigenic Propensity	¹ MRTLWIMVLLVGVEGSLIEFAKMLEETKRL PFPPYYTTYGCYCGW GGQGPKDA TRCCFVHDCCYGKLSNCKPKTD RYSYSRKS GVICGEGTPCEKQICECDKAAA CFRENLR TYKKRYMAYPDLLCKKPAEK ¹³⁷

Figura 10 .Resultado tabulado del análisis de B-cell epitopes para la secuencia FLA2 (P20474) en azul se muestran los posibles epitopes predichos por el programa BCE pred

Análisis con algoritmo de *Bce-pred* para epítopes de células B en SVMs

Con respecto al análisis de la secuencia correspondiente a metaloproteínasa, se debe tener en cuenta que al ser una secuencia proteica relativamente grande en el orden de 478 aa, este análisis reporta un amplio número de fracciones de secuencia resaltadas como potenciales epítopes para células B por lo que en este análisis solo se reportaran, al igual que en el punto anterior aquellas que poseen una concordancia con las variables de accesibilidad, exposición en superficie y antigenicidad. Esto debido a que son estos tres parámetros los más importantes a tener en cuenta al momento de una selección de posibles epítopes para células B en la molécula de interés para posteriores investigaciones. El comportamiento de estas se muestran en las graficas 4 a 11 páginas 54 a 58 y su comportamiento se resume en la figura 10 página 59. En la secuencia EVIYPRK se reporta coincidencia con accesibilidad y exposición en superficie para Epítope B como se muestra en la tabla 7 de la página 53.

La secuencia DQCRF**KGT se encuentra interrumpida por dos espacios en los aminoácidos y se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 7. Predicción de epítopes para células B con BCE-pred para *C.d.terrificus*.

Especie	Proteína	Epítope célula B	Posición	Longitud de secuencia	Accesibilidad	Exposición en superficie
<i>Crotalus</i>	SMPVs	EVIYPRK	30-38	478	Si	Si
<i>Crotalus</i>	SMPVs	LHLEK	68-72	478	Si	Si
<i>Crotalus</i>	SMPVs	KLKNN	153-157	478	Si	Si
<i>Crotalus</i>	SMPVs	HQRY	191-195	478	Si	Si
<i>Crotalus</i>	SMPVs	VHQM	220-223	478	Si	Si
<i>Crotalus</i>	SMPVs	LKKPL	386-390	478	Si	Si
<i>Crotalus</i>	SMPVs	DQCRF°°KGT	441-450	478	Si	Si

SMPVs = HRTE_CROAT Zinc metaloproteínasa/disintegrin(Metaloproteínasa reportada con el código P34182) en EBI (European Bioinformatics Institute)

Parecería probable entonces afirmar que a pesar de la complejidad proteica del veneno de serpiente, una sección definida de estas proteínas (toxinas) y el estudio a profundidad haciendo uso de la Proteómica, Bioinformática e inmunología, sería un camino adecuado para la producción de anti venenos terapéuticos más eficaces, profundizando más en el estudio de dichas secuencias proteicas y llegado el caso, secuenciar las propias secuencias con ejemplares de especies locales colombianas o cercanos a la región geográfica de interés.

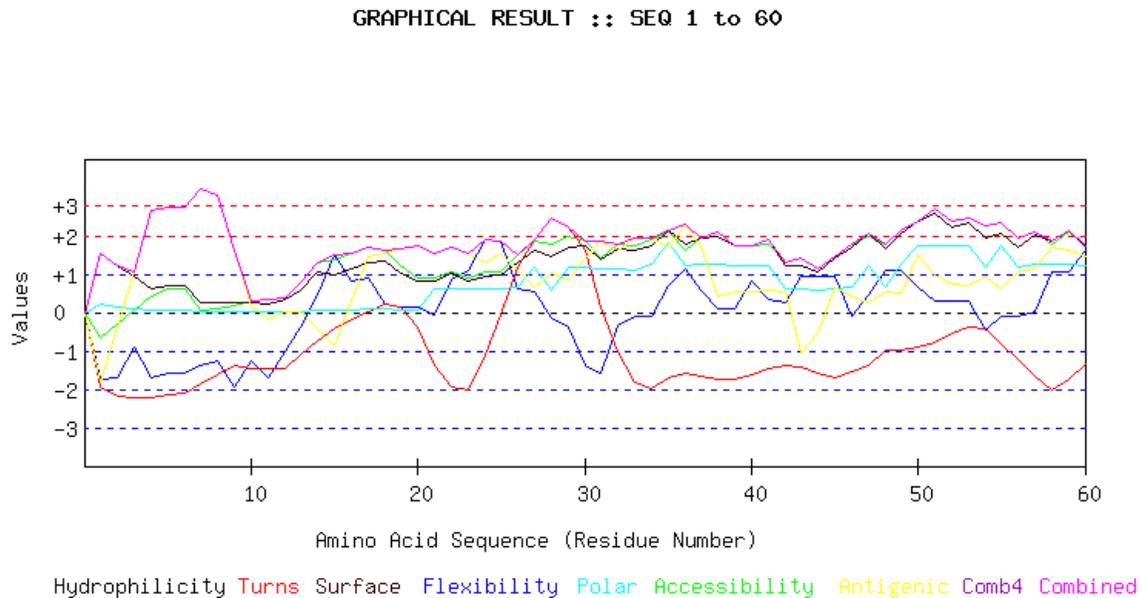
Se han encontrado muchas evidencias de la variabilidad en la composición de los venenos de serpientes, aun entre individuos de la misma especie y la región

geográfica, lo que dificulta el estudio, ya que está comprobado que la composición del veneno de serpiente está bajo el control genético. Por esta razón, los estudios a nivel proteómico y genómico usando librerías de ADN, podrían proveer información valiosa de tipo molecular para propósitos de terapia antiofídica, además de marcadores moleculares para clasificación taxonómica (*Calvette et al, 2009*)

Claramente, el diseño de dichas mezclas inmunogénicas dependería de un conocimiento detallado del proteoma de los distintos venenos y por lo tanto la caracterización Proteómica de dichos venenos. (*Alape et al, 2009*)

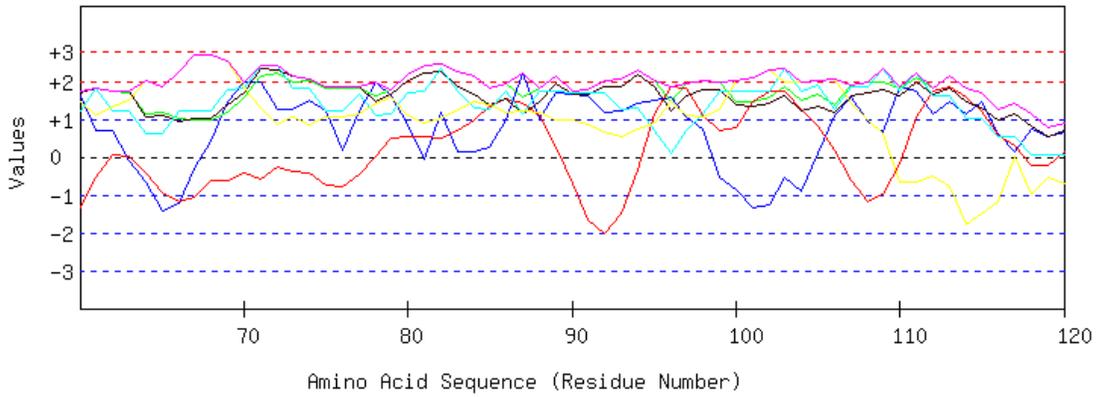
7.2 Análisis de Metaloproteinasa usando BCE-pred

Dado que esta secuencia proteica es de 478 aa



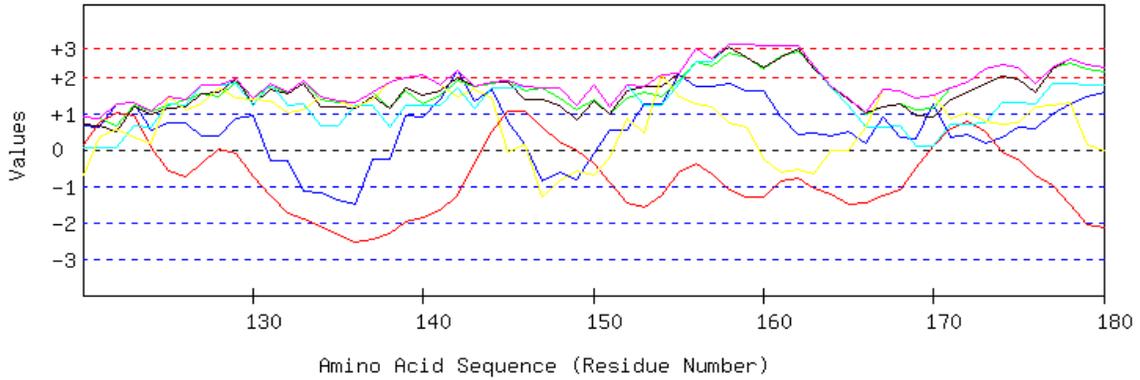
Grafica 4. Analisis secuencia proteica Metaloproteinasas posición 1 a 60

GRAPHICAL RESULT :: SEQ 61 to 120



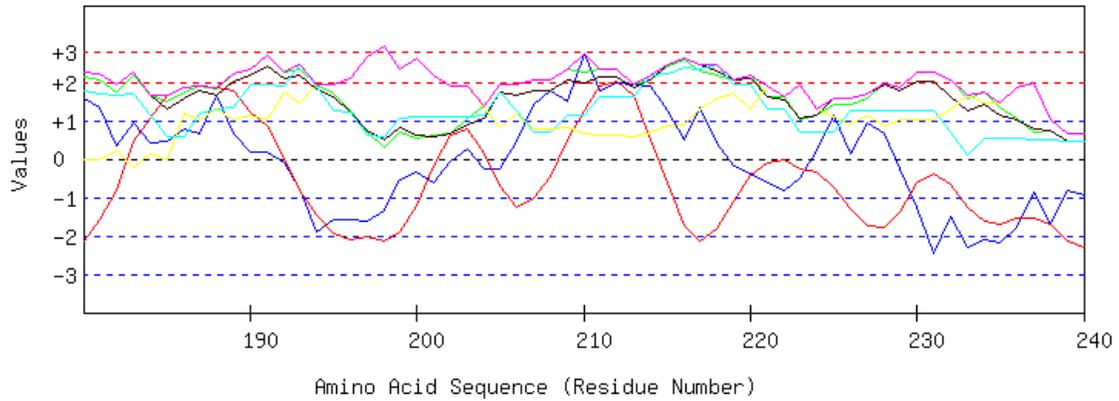
Hydrophilicity Turns Surface Flexibility Polar Accessibility Antigenic Comb4 Combined
Grafica 5. Análisis secuencia proteica Metaloproteinasas posición 61 a 120

GRAPHICAL RESULT :: SEQ 121 to 180



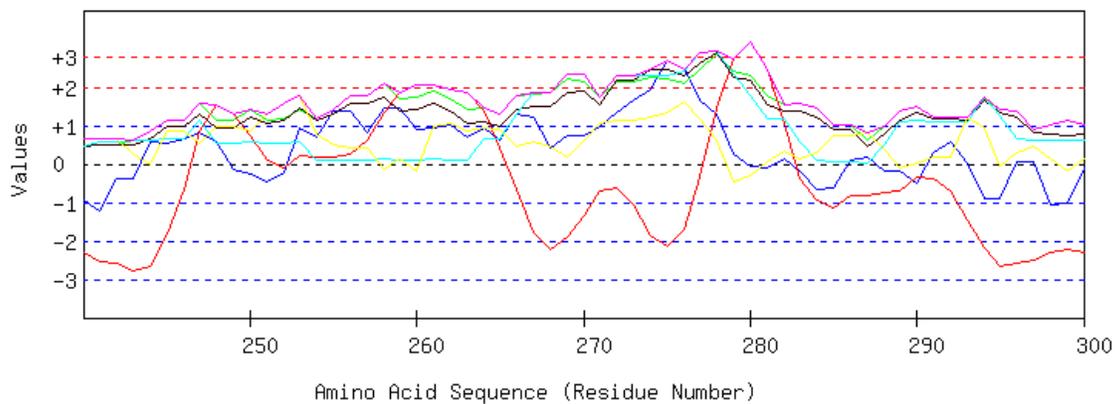
Hydrophilicity Turns Surface Flexibility Polar Accessibility Antigenic Comb4 Combined
Grafica 6. Análisis secuencia proteica Metaloproteinasas posición 121 a 180

GRAPHICAL RESULT :: SEQ 181 to 240



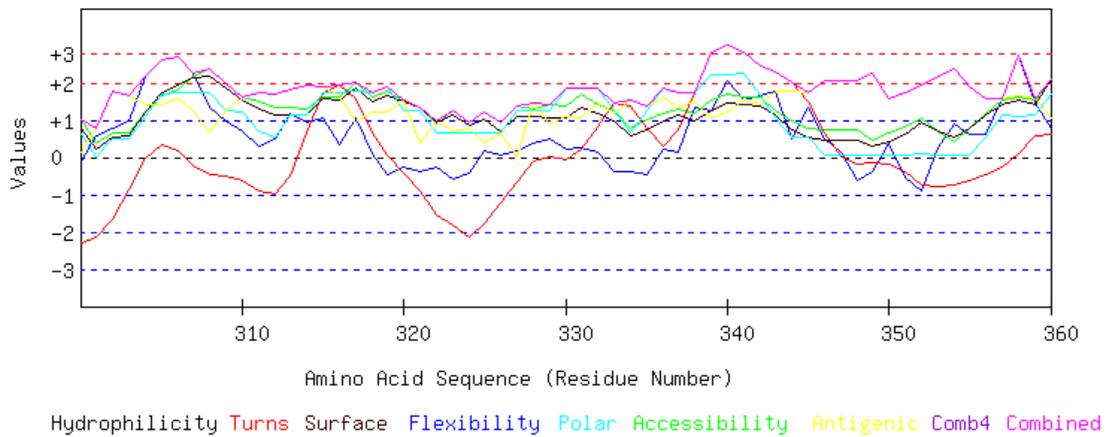
Hydrophilicity Turns Surface Flexibility Polar Accessibility Antigenic Comb4 Combined
Grafica 7. Análisis secuencia proteica Metaloproteinasa posición 181 a 240

GRAPHICAL RESULT :: SEQ 241 to 300



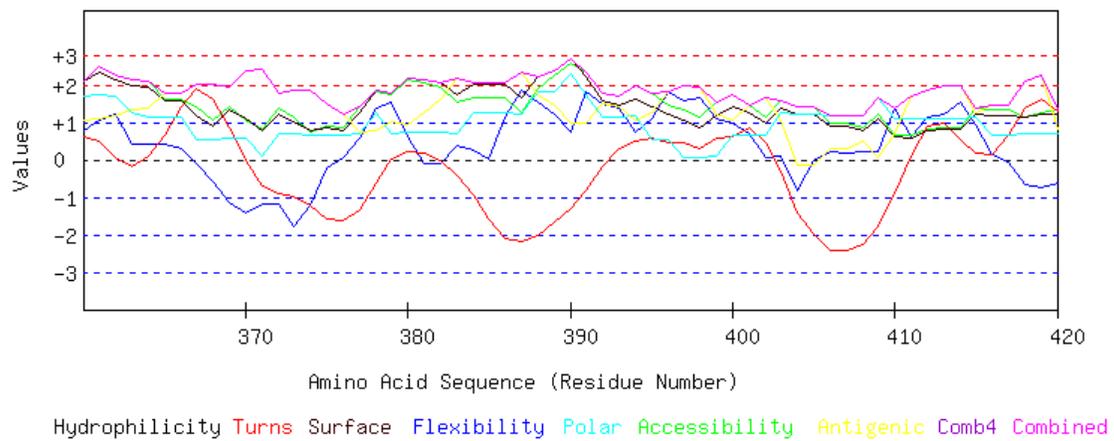
Hydrophilicity Turns Surface Flexibility Polar Accessibility Antigenic Comb4 Combined
Grafica 8. Análisis secuencia proteica metaloproteinasa posición 241 a 300

GRAPHICAL RESULT :: SEQ 301 to 360



Grafica 9. Análisis secuencia proteica metaloproteinasas posición 301 a 360

GRAPHICAL RESULT :: SEQ 361 to 420



Grafica 10. Análisis secuencia proteica metaloproteinasas posición 361 a 420

GRAPHICAL RESULT :: SEQ 421 to 480

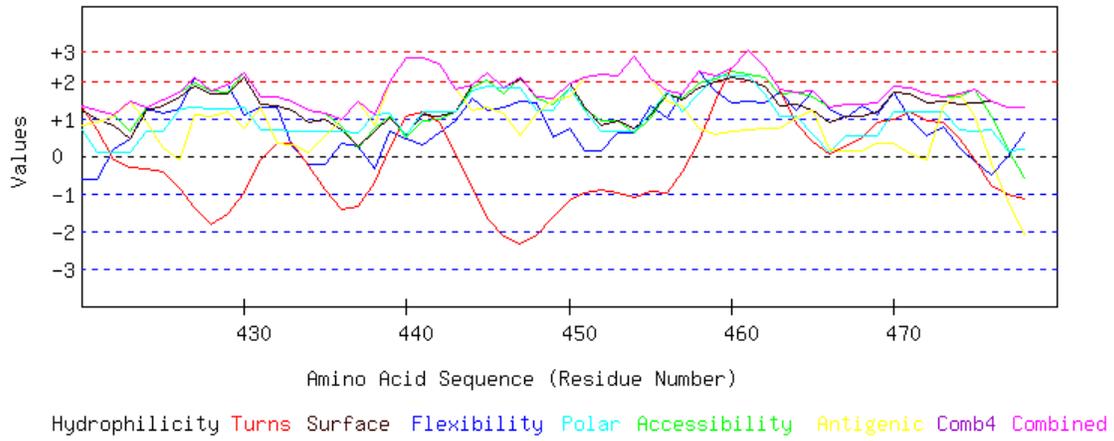


Grafico 11. . Análisis secuencia proteica metaloproteinasa posición 421 a 480

Sequence	1MIQVLLVTICLAAPFYQGSSIIILESGNVNDYEVIIYPRKVTALPKGAVQPKYEDTMQYELKVNGEPVVLHLEKNKGLFSKDYSETHYSFDGRKITTNPVSDHCHYHGRIENDADSTASISACNGLKGFHKLQGEMYLIEPLKLSL
Flexibility	1MIQVLLVTICLAAPFYQGSSIIILESGNVNDYEVIIYPRKVTALPKGAVQPKYEDTMQYELKVNGEPVVLHLEKNKGLFSKDYSETHYSFDGRKITTNPVSDHCHYHGRIENDADSTASISACNGLKGFHKLQGEMYLIEPLKLSL
Accessibility	1MIQVLLVTICLAAPFYQGSSIIILESGNVNDYEVIIYPRKVTALPKGAVQPKYEDTMQYELKVNGEPVVLHLEKNKGLFSKDYSETHYSFDGRKITTNPVSDHCHYHGRIENDADSTASISACNGLKGFHKLQGEMYLIEPLKLSL
Turns	1MIQVLLVTICLAAPFYQGSSIIILESGNVNDYEVIIYPRKVTALPKGAVQPKYEDTMQYELKVNGEPVVLHLEKNKGLFSKDYSETHYSFDGRKITTNPVSDHCHYHGRIENDADSTASISACNGLKGFHKLQGEMYLIEPLKLSL
Exposed Surface	1MIQVLLVTICLAAPFYQGSSIIILESGNVNDYEVIIYPRKVTALPKGAVQPKYEDTMQYELKVNGEPVVLHLEKNKGLFSKDYSETHYSFDGRKITTNPVSDHCHYHGRIENDADSTASISACNGLKGFHKLQGEMYLIEPLKLSL
Polarity	1MIQVLLVTICLAAPFYQGSSIIILESGNVNDYEVIIYPRKVTALPKGAVQPKYEDTMQYELKVNGEPVVLHLEKNKGLFSKDYSETHYSFDGRKITTNPVSDHCHYHGRIENDADSTASISACNGLKGFHKLQGEMYLIEPLKLSL
Antigenic Propensity	1MIQVLLVTICLAAPFYQGSSIIILESGNVNDYEVIIYPRKVTALPKGAVQPKYEDTMQYELKVNGEPVVLHLEKNKGLFSKDYSETHYSFDGRKITTNPVSDHCHYHGRIENDADSTASISACNGLKGFHKLQGEMYLIEPLKLSL
<p>SEAHAVFKLNVEKEDEAPKMGVTQNWESYEPIKKASDLNLNPEHQRYVELFIVVDHGMYTKYNGSDSKIRQRVHQMVNIMKESYTYMYIDILLAGIEIWSNGDLINVQPASPNTLNSFGEWRETDLLKRKSHDNAQLLTSIAFDEQIIGRAYIGGIC</p> <p>SEAHAVFKLNVEKEDEAPKMGVTQNWESYEPIKKASDLNLNPEHQRYVELFIVVDHGMYTKYNGSDSKIRQRVHQMVNIMKESYTYMYIDILLAGIEIWSNGDLINVQPASPNTLNSFGEWRETDLLKRKSHDNAQLLTSIAFDEQIIGRAYIGGIC</p> <p>SEAHAVFKLNVEKEDEAPKMGVTQNWESYEPIKKASDLNLNPEHQRYVELFIVVDHGMYTKYNGSDSKIRQRVHQMVNIMKESYTYMYIDILLAGIEIWSNGDLINVQPASPNTLNSFGEWRETDLLKRKSHDNAQLLTSIAFDEQIIGRAYIGGIC</p> <p>SEAHAVFKLNVEKEDEAPKMGVTQNWESYEPIKKASDLNLNPEHQRYVELFIVVDHGMYTKYNGSDSKIRQRVHQMVNIMKESYTYMYIDILLAGIEIWSNGDLINVQPASPNTLNSFGEWRETDLLKRKSHDNAQLLTSIAFDEQIIGRAYIGGIC</p> <p>SEAHAVFKLNVEKEDEAPKMGVTQNWESYEPIKKASDLNLNPEHQRYVELFIVVDHGMYTKYNGSDSKIRQRVHQMVNIMKESYTYMYIDILLAGIEIWSNGDLINVQPASPNTLNSFGEWRETDLLKRKSHDNAQLLTSIAFDEQIIGRAYIGGIC</p> <p>SEAHAVFKLNVEKEDEAPKMGVTQNWESYEPIKKASDLNLNPEHQRYVELFIVVDHGMYTKYNGSDSKIRQRVHQMVNIMKESYTYMYIDILLAGIEIWSNGDLINVQPASPNTLNSFGEWRETDLLKRKSHDNAQLLTSIAFDEQIIGRAYIGGIC</p> <p>SEAHAVFKLNVEKEDEAPKMGVTQNWESYEPIKKASDLNLNPEHQRYVELFIVVDHGMYTKYNGSDSKIRQRVHQMVNIMKESYTYMYIDILLAGIEIWSNGDLINVQPASPNTLNSFGEWRETDLLKRKSHDNAQLLTSIAFDEQIIGRAYIGGIC</p> <p>DPKRSTGVVQDSEINLRVAVTMTHELGHNLGIHHDTDSCSCGGYSCIMSPVISDEPSKYFSDCSYIQWEIFIMNQKPKCILKKPLRTDTVSTPVSGNELLEAGIECDCGSLENPCCYATTCKMRPGSQCAEGLCCDQCRFMKKGTVCRVSMVDRNDTDC</p> <p>DPKRSTGVVQDSEINLRVAVTMTHELGHNLGIHHDTDSCSCGGYSCIMSPVISDEPSKYFSDCSYIQWEIFIMNQKPKCILKKPLRTDTVSTPVSGNELLEAGIECDCGSLENPCCYATTCKMRPGSQCAEGLCCDQCRFMKKGTVCRVSMVDRNDTDC</p> <p>DPKRSTGVVQDSEINLRVAVTMTHELGHNLGIHHDTDSCSCGGYSCIMSPVISDEPSKYFSDCSYIQWEIFIMNQKPKCILKKPLRTDTVSTPVSGNELLEAGIECDCGSLENPCCYATTCKMRPGSQCAEGLCCDQCRFMKKGTVCRVSMVDRNDTDC</p> <p>DPKRSTGVVQDSEINLRVAVTMTHELGHNLGIHHDTDSCSCGGYSCIMSPVISDEPSKYFSDCSYIQWEIFIMNQKPKCILKKPLRTDTVSTPVSGNELLEAGIECDCGSLENPCCYATTCKMRPGSQCAEGLCCDQCRFMKKGTVCRVSMVDRNDTDC</p> <p>DPKRSTGVVQDSEINLRVAVTMTHELGHNLGIHHDTDSCSCGGYSCIMSPVISDEPSKYFSDCSYIQWEIFIMNQKPKCILKKPLRTDTVSTPVSGNELLEAGIECDCGSLENPCCYATTCKMRPGSQCAEGLCCDQCRFMKKGTVCRVSMVDRNDTDC</p> <p>DPKRSTGVVQDSEINLRVAVTMTHELGHNLGIHHDTDSCSCGGYSCIMSPVISDEPSKYFSDCSYIQWEIFIMNQKPKCILKKPLRTDTVSTPVSGNELLEAGIECDCGSLENPCCYATTCKMRPGSQCAEGLCCDQCRFMKKGTVCRVSMVDRNDTDC</p> <p>DPKRSTGVVQDSEINLRVAVTMTHELGHNLGIHHDTDSCSCGGYSCIMSPVISDEPSKYFSDCSYIQWEIFIMNQKPKCILKKPLRTDTVSTPVSGNELLEAGIECDCGSLENPCCYATTCKMRPGSQCAEGLCCDQCRFMKKGTVCRVSMVDRNDTDC</p>	
<p>IGQSADCPRNGLYG⁴⁷⁵</p> <p>IGQSADCPRNGLYG⁴⁷⁵</p> <p>IGQSADCPRNGLYG⁴⁷⁵</p> <p>IGQSADCPRNGLYG⁴⁷⁵</p> <p>IGQSADCPRNGLYG⁴⁷⁵</p> <p>IGQSADCPRNGLYG⁴⁷⁵</p> <p>IGQSADCPRNGLYG⁴⁷⁵</p>	

Figura 11. Secuencia tabulada de metaloproteinas de 478 aa

7.3 Analisis de crodu miotoxin con BCE-pred

GRAPHICAL RESULT :: SEQ 1 to 60

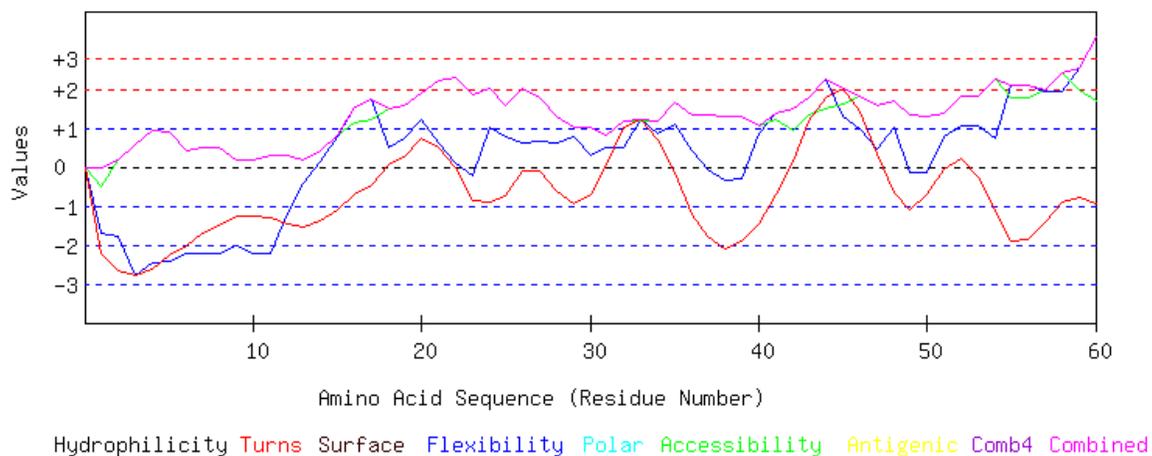


Grafico 12. Análisis secuencia proteica miotoxina posición 1 a 60

GRAPHICAL RESULT :: SEQ 61 to 120

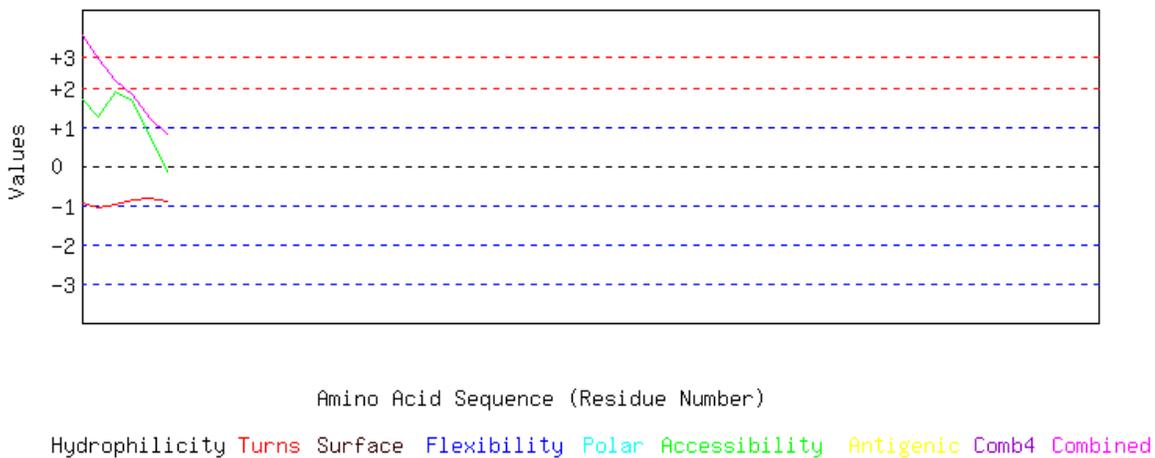


Grafico 13. Análisis secuencia proteica Miotoxina posición 61 a 68.

Análisis y correlación entre *Bce-Ped* y Disco tope server.

Al relacionar los hallazgos encontrados con el algoritmo de predicción de epítopes de células B, (*BCE-pred* y *Disco tope*) para la predicción de epítopes lineales y conformacionales (no lineales) respectivamente, se hacen importantes estos últimos, por el hecho que son los sitios de las moléculas que son reconocidos por anticuerpos del sistema inmunológico. El conocimiento de epítopes de células B puede ser utilizado en el diseño de vacunas, fármacos y pruebas de diagnóstico (Nielsen & Lund, 2006). Por lo tanto, es de interés hacer análisis mediante los mejores métodos y haciendo uso de las herramientas disponibles para la predicción de epítopes de células B como son la Proteómica, y la inmunogenómica. En el presente trabajo se describe un método para la predicción de dichos epítopes para células B con el algoritmo DISCO TOPE 1.2 desarrollado por Nielsen y colaboradores en el año 2007, el cual permite la ubicación espacial de los epítopes conformacionales de las moléculas FLA₂, Metaloproteinasas y Miotoxinas. En las figuras 12, 13 (a,b) y 14 en las páginas 63,65,67 se muestran los modelos tridimensionales analizados de un miembro de cada una de las familias de moléculas (Fosfolipasas A₂, Metaloproteinasas y miotoxinas); dichos modelos se acompañan con la información en tablas que se observa en las páginas 62,64,66 en las que se enumeran su posición en la cadena de proteína y los valores calculados por el algoritmo en la columna 4 en la que se muestran los valores que corresponden a la propensión o predisposición a ser un epítope. En la columna 5 se observa esta misma característica calculada con los parámetros únicos que posee el algoritmo.

Los principales valores obtenidos con el algoritmo Discotope server 1.2 son destacados en las tablas 6,7,8 y en las figuras 12,13,14. Al correlacionar los resultados obtenidos en las tablas de las dos herramientas y al observar el análisis en cada molécula individualmente, se pueden observar coincidencias escasas pero llamativas; en los casos del análisis de la secuencia de Fosfolipasa A₂, se pueden observar coincidencias en la predicción en 2 puntos de la secuencia que se pueden ver en la tabla número 6 de la página 50 y en la tabla número 8 página 62 al obtener coincidencias en la predicción entre las posiciones 31-41 específicamente en las posiciones 34-35, y, 56-60 y exactamente en las posiciones 55-56-57. Estos resultados, permiten admitir la validez de los métodos de predicción de los 2 algoritmos ya que ambos tienen diferentes métodos de predicción, y aunque se debe aclarar que tienen diferentes propósitos de predicción, es alentador el observar los resultados obtenidos por las coincidencias que se obtuvieron. El análisis y la correlación de los resultados obtenidos en las

tablas 9 de la página 64 del algoritmo disco tope server y de la tabla 11 de la página 70 permite observar las coincidencias en la predicción entre las posiciones 191-195 y 220-223 de la secuencia proteica de Metaloproteinasa. En las figuras 16,17 y 18 se muestran esquemas de ubicación espacial de los epitopes encontrados.

7.4 Análisis de secuencias con Disco Tope server para búsqueda de epitopes no lineales

7.4.1 Predicción para modelo de FLA₂ con umbral de -7.7 el máximo

Tabla 8. Epitopes no lineales para FLA₂

Residue number	amino acid	contac number	propensity	scorediscotope score
30	LYS	12	-1.354	-7.354
34	PHE	11	-1.381	-6.881
35	PRO	13	-0.709	-7.209
77	THR	11	0.026	-5.474
78	ASP	14	-1.013	-8.013
79				
85	LYS	9	-1.266	-5.766
86	SER	9	-1.266	-5.766
87	GLY	10	-1.656	-6.656
95	THR	10	-2.632	-7.632
117	ARG	11	-0.784	-6.284
118	THR	11	1.592	-3.908
120	LYS	14	1.672	-5.328
121	LYS	12	0.872	-5.128
122	ARG	11	-0.203	-5.703
134	PRO	11	-0.840	-6.340
136	GLU	12	-1.106	-7.106
137	LYS	7	-3.552	-7.052

Identified 16 B-Cell epitope residues out of 121 total residues.

A continuación se muestra en la figura la posición espacial de los aminoácidos especificados en la tabla anterior mostrando su exposición en superficie.

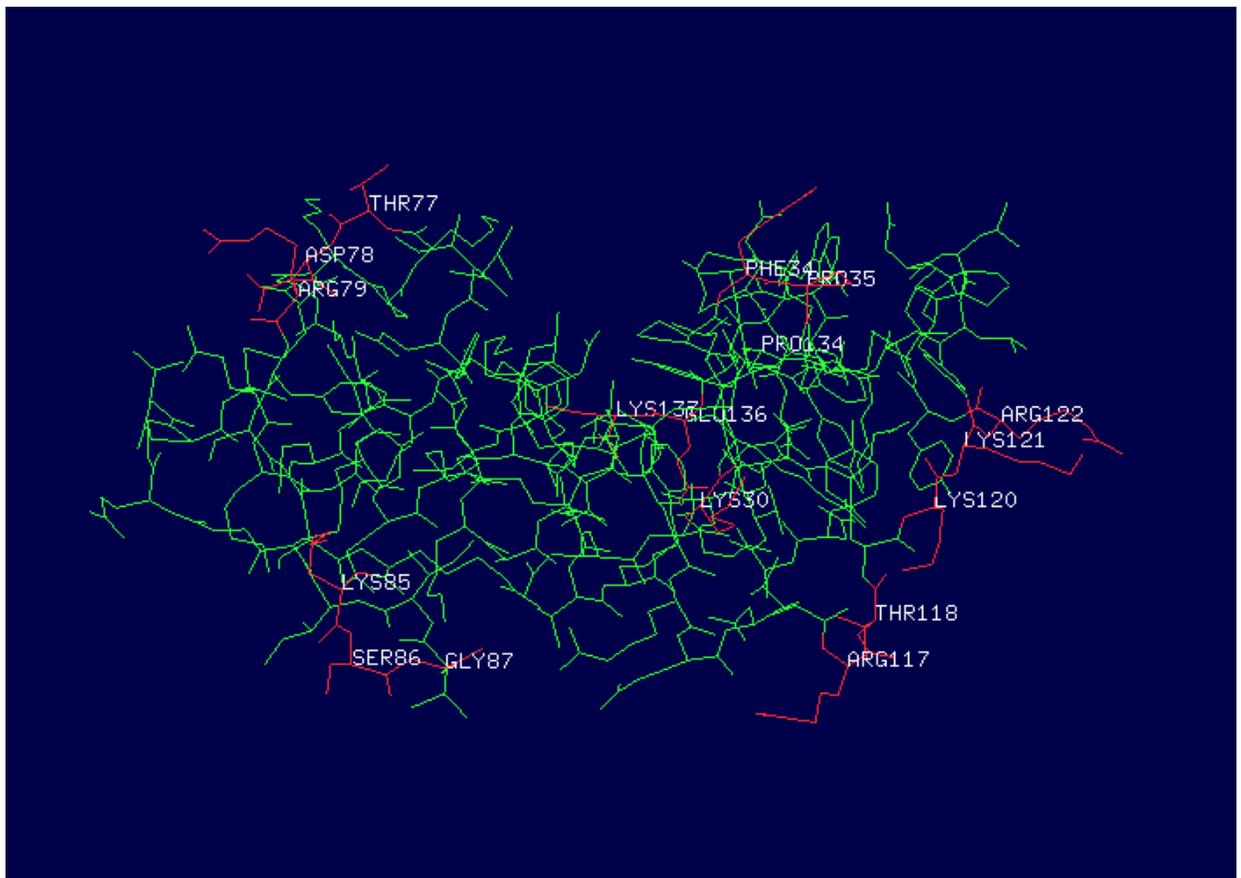


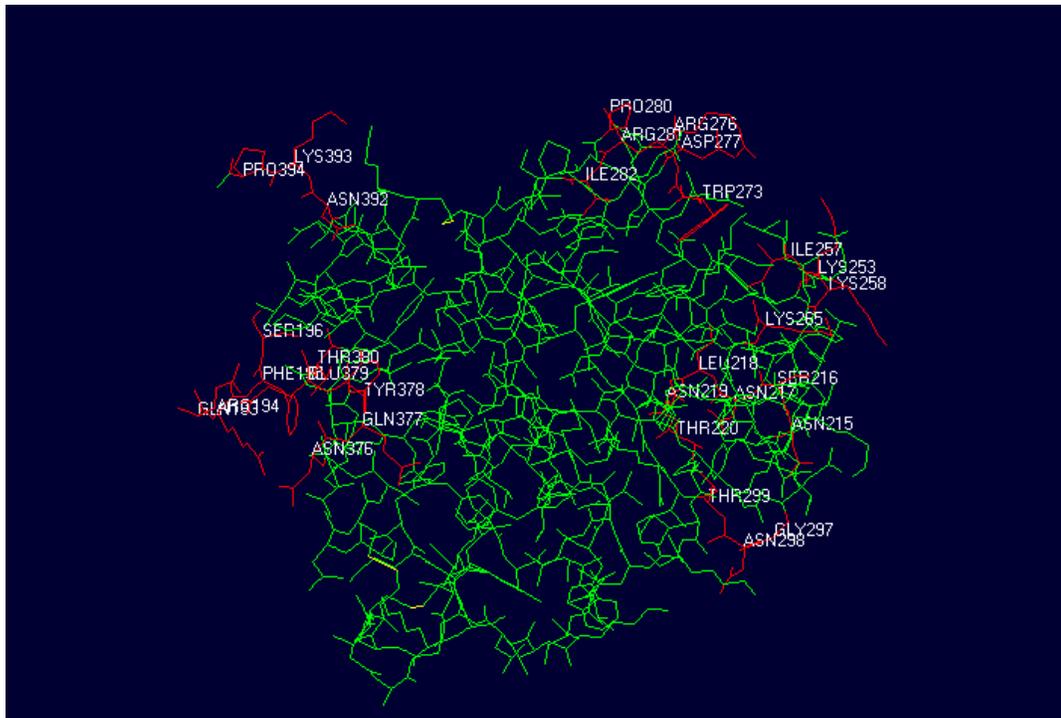
Figura 12. Modelo tridimensional de la molécula Fosfolipasa A2 en rojo se muestran los 16 epitopes no lineales

Predichos por el algoritmo Disco-tope server 1.2.

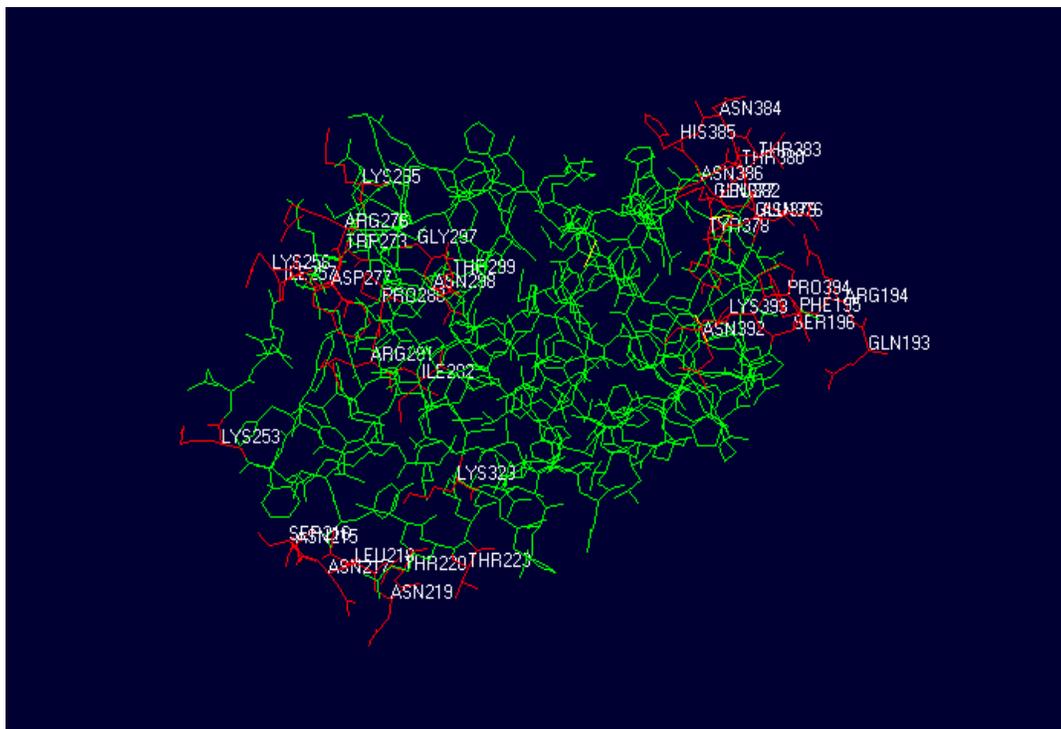
7.4.2 Predicción para modelo de Metaloproteinasas con porcentaje con umbral de -6.9

Tabla 9 epitopes no lineales para metaloproteinasas

Residue number	amino acid	contac number	propensity score	discotope score
193	GLN	8	1.642	-2.358
194	ARG	9	1.553	-2.947
195	PHE	14	1.998	-5.002
196	SER	10	1.473	-3.527
215	ASN	12	1.386	-4.614
216	SER	16	0.700	-7.300
217	ASN	14	1.589	-5.411
218	LEU	15	1.536	-5.964
219	ASN	10	1.534	-3.466
220	THR	14	2.137	-4.863
223	THR	11	1.212	-4.288
253	LYS	10	-1.213	-6.213
257	ILE	13	0.307	-6.193
258	LYS	12	0.815	-5.185
265	LYS	14	0.983	-6.017
273	TRP	16	1.202	-6.798
276	ARG	14	1.185	-5.815
277	ASP	12	1.553	-4.447
280	PRO	11	1.374	-4.126
281	ARG	10	1.353	-3.647
282	ILE	15	-1.518	-9.018
297	GLY	10	-1.083	-6.083
298	ASN	11	-1.087	-6.587
299	THR	16	-1.524	-9.524
323	LYS	9	0.607	-3.893
376	ASN	13	-0.182	-6.682
377	GLN	19	1.422	-8.078
378	TYR	22	1.115	-9.885
379	GLU	19	2.937	-6.563
380	THR	16	2.301	-5.699
382	LEU	16	2.197	-5.803
383	THR	11	1.512	-3.988
384	ASN	10	1.683	-3.317
385	HIS	14	1.075	-5.925
386	ASN	14	1.622	-5.378
392	ASN	10	-0.102	-5.102
393	LYS	7	-0.146	-3.646
394	PRO	4	-0.464	-2.464



a.



b. Figura 13. Modelo tridimensional de metaloproteínasa en rojo se muestran los epítopos no lineales predichos por el algoritmo disco tope server 1.2. a. vista posterior; b. vista anterior

7.4.3 Análisis para Myotoxin con umbral de -6.0

Tabla 10. Epitopes no lineales para myotoxin.

Residue number	amino acid	Contac number	Propensity score	Discotope score
22	TYR	13	0.815	-5.685
23	LYS	10	0.105	-4.895
27	ILE	11	-0.124	-5.624
28	LYS	14	0.474	-6.526
36	GLU	10	-0.532	-5.532
37	LYS	9	-1.425	-5.925
40	ILE	10	0.380	-4.620
41	PRO	11	0.734	-4.766
42	PRO	11	0.399	-5.101
43	SER	9	0.397	-4.103
44	SER	12	1.340	-4.660
46	PHE	16	2.516	-5.484
47	GLY	17	2.436	-6.064
48	LYS	16	2.258	-5.742
52	PRO	13	1.084	-5.416
53	TRP	12	0.506	-5.494
54	ARG	12	0.000	-6.000
61	GLY	11	0.966	-4.534
62	SER	8	0.260	-3.740
63	GLY	12	0.555	-5.445

Identified 18 B-Cell epitope residues out of 42 total residues

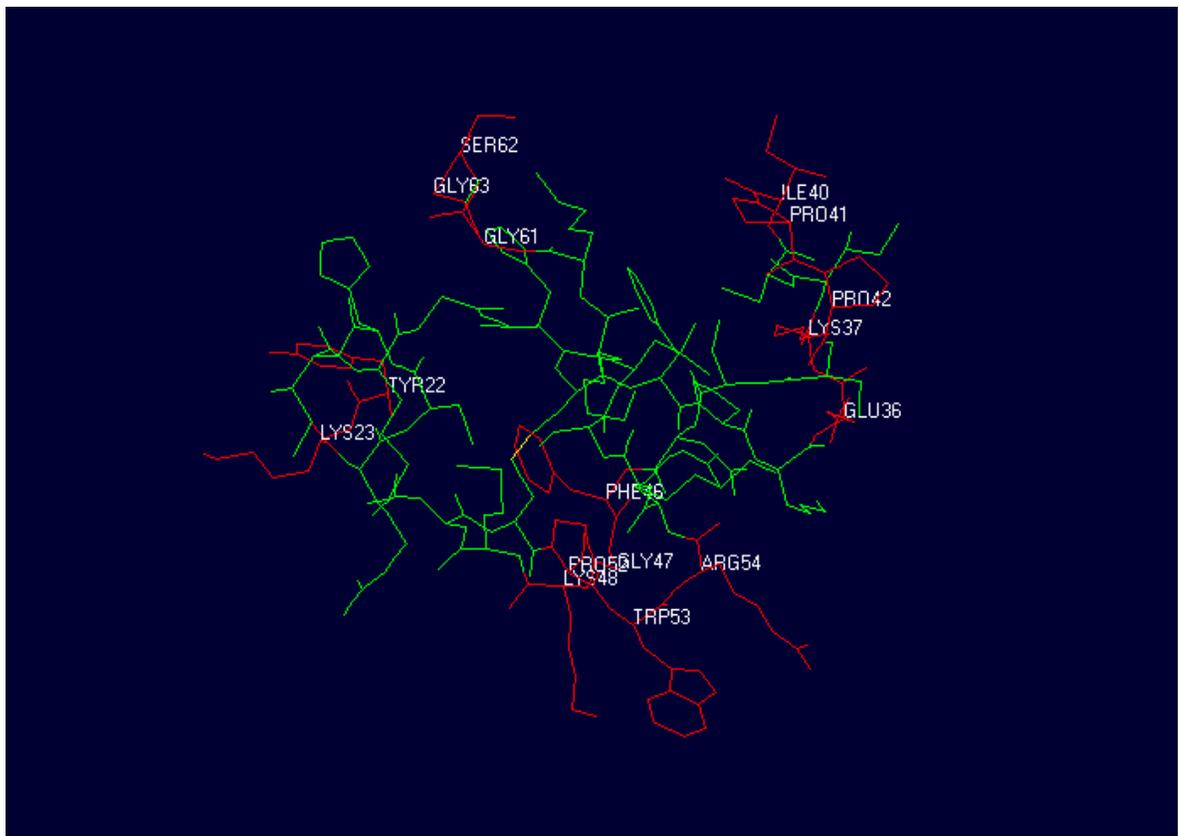


Figura 14 . Vista de modelo tridimensional mitoxina B .asper en rojo se muestran los epitopes de prediccion .

Células T, Epitopes de células T y relación con el envenamineto.

El aspecto inmunológico asociado al envenenamiento por mordedura de serpiente aún tiene muchas incógnitas, es tanto así que se reporta que como el veneno, a pesar de ser un agente extraño al cuerpo, este no se comporta como un antígeno cuando entra al cuerpo; lo que ha hecho complicado su entendimiento y tratamiento a nivel inmunológico, en la figura 15 página 74 se muestra un esquema del comportamiento de este en los tejidos y sus acciones a nivel intracelular. Una aproximación desde la teoría inmunológica podría hacerse si se explica cómo se relaciona la reacción inmunológica mediada por las células T: La fuerza que vincula a los epítopes de células T a las moléculas del complejo mayor de Histocompatibilidad (MHC o HLA), es un factor determinante en la inmunogenicidad de los epitopes de células T. Esto permite que los epitopes con mayor afinidad de unión puedan tener más posibilidades de aparecer en la superficie de la célula (en el contexto de moléculas MHC) donde son reconocidos por su correspondiente receptor de células T llamado (T Cell Receptor) (De Groot & Martin, 2009). Si se tiene en cuenta que el destino de un potencial fármaco de proteínas puede ser determinado por su componente en nonámeros (9-meros) de secuencias de 9 aminoácidos y sus correspondientes HLA afines al complejo de histocompatibilidad. Esta sería una buena estrategia de búsqueda; por lo tanto observar el comportamiento de las secuencias proteicas de las diferentes moléculas de veneno y hacer las correspondientes predicciones de su comportamiento podría ser una opción válida, si se tienen en cuenta las anteriores deducciones, y se observa cuales sitios de las molécula tienden a tener una mayor afinidad inmunológica y con qué clase de HLAs.

Según los resultados encontrados y reportados en la tabla 11 de la página 70-71 se puede decir que se encontraron 47 potenciales nonámeros que varían en sus porcentajes de afinidad, además en las figuras 17 ,18,19 se muestran esquemas de sus posiciones teóricas en la cadena plana de aminoácidos. Estos podrían ser sugeridos para un estudio de mayor complejidad por cuanto estos en su mayoría presentan características de alto porcentaje de afinidad al MHC lo que permite decir que podrían ser potenciales péptidos mejoradores de antídotos específicos por su alta afinidad a los diferentes HLA propuestos por el algoritmo *Pro-ped*.

Afortunadamente, después de años de desarrollo y validación, los epitopes de células T ya se pueden predecir con relativa exactitud con el uso de herramientas *in silico*, dicho de otra forma, con el uso de herramientas bioinformáticas, o en este caso *inmunoinformáticas*, como resultado de esto, las herramientas

inmunoinformáticas se están aplicando al estudio de potenciales proteínas terapéuticas clasificándolas desde el riesgo más alto al más bajo antes del desarrollo clínico en función de su contenido epítopes en células T. Por lo tanto, la búsqueda de secuencias de péptidos que pueden provocar o suprimir, alternativamente, una respuesta de células T puede ser el paso más importante a tener en cuenta en el desarrollo preclínico de un medicamento basado en proteínas y de blanco específico.

Sin embargo, el conocimiento del potencial de unión HLA no se traduce en el conocimiento del tipo de respuesta de células T que pueden derivarse. Potencialmente, pueden ser efectos de inflamación o de supresión a la inmunidad de células T que puede ser activada. Esto complica un proceso de detección de inmunogenicidad (Webber & Arditto, 2009). La presencia de epítopes de células T puede contribuir a la inmunogenicidad, pero no es suficiente. El factor de control parece ser el "Contexto" en el que se reconoce un epítope de células T por una célula T, esto justificaría lo complicado que podría llegar a hacer un suero de amplio cubrimiento para diferentes especies si se tiene en cuenta la amplia distribución geográfica y variaciones en el componente del veneno de cada especie. El "concepto" de la respuesta inmune es el factor más importante que determina el rol de células T (Webber & Arditto, 2009) y las respuestas que dan estas ante un antígeno cuando está dentro del organismo lo que muestra la importancia que podría llegar a tener la predicción de epítopes para células T y un posterior análisis con pruebas *in vitro* o *in vivo*. Así los Epítopes de células T reguladoras pueden ser una característica clave de los medicamentos biológicos, pero su existencia y su papel en la respuesta inmune a agentes biológicos dañinos en este caso el veneno de una serpiente que sería un antígeno específico, no podría ser predicho con seguridad.

A continuación, se muestran las tablas con los hallazgos logrados con el análisis de la herramienta *Pro-pred* para la predicción de epítopes de células T en las secuencias de aminoácidos obtenidas de las bases de datos para tres tipos de moléculas involucradas en el daño sistémico ocasionado en una mordedura; estas son fosfolipasas A₂, metaloproteinasas y miotoxinas, de diferentes especies.

Tabla 11. Predicción de nonámeros con Pro-ped para FLA₂, Metaloproteinasas, Miotoxinas.

Especie	Tipo de proteína	Secuencia de epitopes	Posición	Longitud de cadena aminoácidos	Coincidencias	% de Coincidencia
<i>B. asper</i>	FLA ₂ (P20474)	MRTLWIMVL	1-9	137	47/51	92.15%
		FVHDCCYK	59-68	137	14/51	27.45
<i>B. asper</i>	FLA ₂ (P24605)	MRTLWIMAVL	1-10	137	46/51	90.19
		YRYYLKPL	122-130	137	32/51	62.74
<i>B. asper</i>	FLA ₂ (Q9PVE3)	MRTLWIMAVVL	1-11	137	47/51	92.15
		YVHKCCYKK	61-68	137	12/51	23.52
<i>B. asper</i>	FLA ₂ (P0C616)	YKIYPKFFC	123-131	137	28/51	54.90
		YYHKCCYKK	61-69	137	12/51	23.52
		IVCDENNPL	89-97	137	17/51	33.33
<i>B. asper</i>	Zinc Metalloproteinase basparin (P84035)	YGYCRKIPC	37-45	68	18/51	35.29
<i>B. asper</i>	SMPVs (Q072L5)	LLVTICLAVS	5-13	477	28/51	54.90
		YRSVNTAS	236-244	477	37/51	72.54
		LQVAVAMAH	226-234	477	31/51	60.78
<i>B. asper</i>	SMPVs (83512)	IELAVVADH	200-208		23/51	45.09
		LWVAVTMAH	66-74		18/51	35.29
<i>Crotalus durissus</i>	Myotoxin (P24331)	WRRKCKKKG	54-62	65	21/51	41.17
		MKILYLLFA	0-8	65	44/51	86.27
		YKRCHIKGG	23-31	65	10/51	19.60
<i>Crotalus durissus</i>	Myotoxin(P24332)	LYLLFAFLF	33-41	64	23/51	45.09
		WRRKSLKKG	54-62	64	25/51	45.09
<i>Crotalus durissus</i>	Myotoxin(P24333)	MKILYLLFA	0-8	65	44/51	86.27
		WRRKCKKKG	54-62	65	21/51	41.17
<i>Crotalus durissus</i>	Myotoxin(P24334)	YKQCHKKGG	9-18	51	12/51	23.52
		WRWKCKKRS	40-48	51	11/51	21.56
<i>Crotalus viridis helleri</i>	Myotoxin (P01477)	YKRCHKKGG	19-27	45	21/51	41.17
<i>Crotalus viridis viridis</i>	Myotoxin (P63175)	YKRCHKKGG	19-27	45	21/51	41.17
<i>Crotalus concolor</i>	Myotoxin(P12029)	YKRCHKKGGH	0-8	43	13/51	25.49
<i>Crotalus adamantu</i>	Myotoxin (P24330)	YKRCHKKGGH	0-8	45	13/51	25.49
		WRWKCKKKG	34-42	45	16/51	31.37

s						
<i>Crotalus durissus</i>	FLA ₂ (P0CAS5)	YRYSLKSGY	64-72	122	28/51	54.90
		LRRSLSTYK	96-104	122	16/51	31.37
		YMFYPKSRC	109-116	122	16/51	31.37
<i>Crotalus durissus</i>	FLA ₂ (P0CAS6)	YRYSLKSGY	65-72	122	24/51	47.05
		LRRSLSTYK	95-104	122	17/51	33.33
<i>Crotalus durissus</i>	FLA ₂ (P62202)	MRALWIVAN	0-8	138	35/51	68.62
		FVHDCCYGK	61-68	138	13/51	25.49
		LRRSLSTYK	112-121	138	17/51	33.33
<i>Crotalus durissus</i>	SMPVs (P34182)	IQVLLVTIC	0-8	478	31/51	60.78
		MYLIEPCKL	135-143	478	33/51	64.70
		YMYIDILLA	233-241	478	40/51	78.43
		LRVAVTMTH	321-328	478	44/51	86.27
<i>Crotalus durissus</i>	SMPVs (Q90282)	IQVLLVTIC	2-10	609	31/51	60.78
		MYLIEPLK	135-143	609	33/51	64.70
		YRYMYIHVALV	236-244	609	47/51	92.15
		LVVAVIMAH	325-333	609	41/51	80.39
<i>Crotalus durissus</i>	SMPVs (C9E1R7)	IQVLLVTIC	2-10	486	33/51	64.70
		MYLIEPLE	0-8	486	33/51	64.70

Según literatura consultada se reporta a la Histidina-48 en FLA₂ como un aminoácido de importancia por su alta tasa de conservación en las secuencias reportadas, siendo parte de un péptido corto insertado en la cadena YVHK y FVHD lo que le ha atribuido un rol importante en la actividad catalítica. Como se observa en la tabla 11 de la página 70 y 71, dichas secuencias se encuentran reportadas como predichas por el algoritmo *Pro-ped*; aunque con un bajo porcentaje del 27.45% y el 23.52%, la literatura valida los resultados dando la importancia con previos estudios, en ese mismo sentido, y los resultados obtenidos por los algoritmos deberían de tenerse en cuenta como base en estudios bioquímicos de mayor profundidad para el entendimiento del complejo mecanismo de actuación de las mezclas de veneno de las serpientes.

Lo que se pretende con este trabajo, es mostrar las herramientas que se tienen a disposición para llevar a cabo un análisis básico de secuencias proteicas de venenos, así como mostrar los resultados obtenidos, e intentar validarlos a través de la revisión bibliográfica de trabajos previos, muchos de ellos llevados a cabo en

laboratorio. Los resultados de este trabajo de investigación ofrecen una aproximación teórica al conocimiento inmunológico de secuencias específicas de venenos de serpiente de especies con alta presencia en la geografía nacional

CONSIDERACIONES FINALES.

Según la literatura es ampliamente aceptado que la reactividad cruzada inmunológica de venenos de serpiente está mediada por anticuerpos que reconocen los componentes del veneno, ya sea teniendo una homología de secuencia de aminoácidos o de la función biológica similar. En trabajos previos como los de Stabeli & Pimenta Magalhaes se ha demostrado que el antídoto poliespecífico *Bothrops* es una fuente de anticuerpos de reacción cruzada que interactúan con los rasgos distintivos las proteínas, estas son las estructuras primarias involucradas en funciones biológicas.

Nuestro conocimiento de la reactividad cruzada de venenos de serpiente se ha desarrollado a partir de las evidencias que se han podido conocer, por distintos métodos experimentales, la contribución es de alguna manera limitada, pero por una combinación de al menos tres factores se ha logrado entender de forma básica algunos de los mecanismos. (Stabeli & Pimenta Magalhaes, 2005)

La fuente de anticuerpos, como el llamado suero mono y/o polivalente, o anticuerpos de toxinas específicas.

La naturaleza del objeto de estudio que van desde los venenos en crudo a bien caracterizados, los componentes aislados.

Los ensayos inmunológicos para evaluar las reacciones cruzadas, tales como pruebas de precipitación, ELISA, Western blot, y la acción de los antivenenos medida por neutralización cruzada de los venenos de todo o toxinas aisladas.

En previos estudios se ha logrado hacer aislamientos de anticuerpos específicos contra secuencias. Como ejemplo, se conoce la secuencia IQRWSLDKYAM undecapéptido (Ile1-Hse11) que tuvo un papel decisivo en revelar de reactividad cruzada entre proteínas no relacionadas del veneno.

En resultados previos se indica que en todos los venenos de prueba hubo por lo menos tres componentes reactivos hacia la anti-Ile1-Hse11 (anticuerpos), entre los que se identificaron dos proteasas de serina, una Fosfolipasa A₂ homóloga. La hipótesis más aceptada es que la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-Ile1-Hse11 a las proteínas que no tienen relación se deriva de su mecanismo de

reconocimiento de antígenos, por el que la complementariedad se logra a través de la adaptación recíproca de conformación de las moléculas que reaccionan. Además, se cree que estos resultados tienen implicaciones tanto en el desarrollo de anti venenos mejorados y de la preparación de reactivos de inmunoquímica para el diagnóstico y la investigación científica en el campo de los venenos de serpiente.

Las dificultades en estudios previos para la interpretación de los resultados de estudios inmunoquímicos de venenos de serpiente son ilustradas por resultados paradójicos obtenidos con crotoxina, neutralizada con anticuerpos monoclonales, la cual podría neutralizar aproximadamente 1.6 mol de toxina purificada, por mol de anticuerpos pero, sorprendentemente fue inefectiva contra la letalidad del veneno crudo de *C. d. terrificus* (Kaiser & Middlebrook, 1988). Así pues, lo que se pretende en el presente trabajo es hacer una aproximación al conocimiento de las relaciones estructurales y químicas de las moléculas presentes en el veneno de estas especies, haciendo uso de las herramientas inmuno-informáticas disponibles para recolectar información de posibles péptidos de los que se podría creer poseen algún indicio de ser agentes causantes del daño que este tiene, y lograr así obtener la información para futuros estudios de aislamiento y producción de anticuerpos específicos contra dichos péptidos.

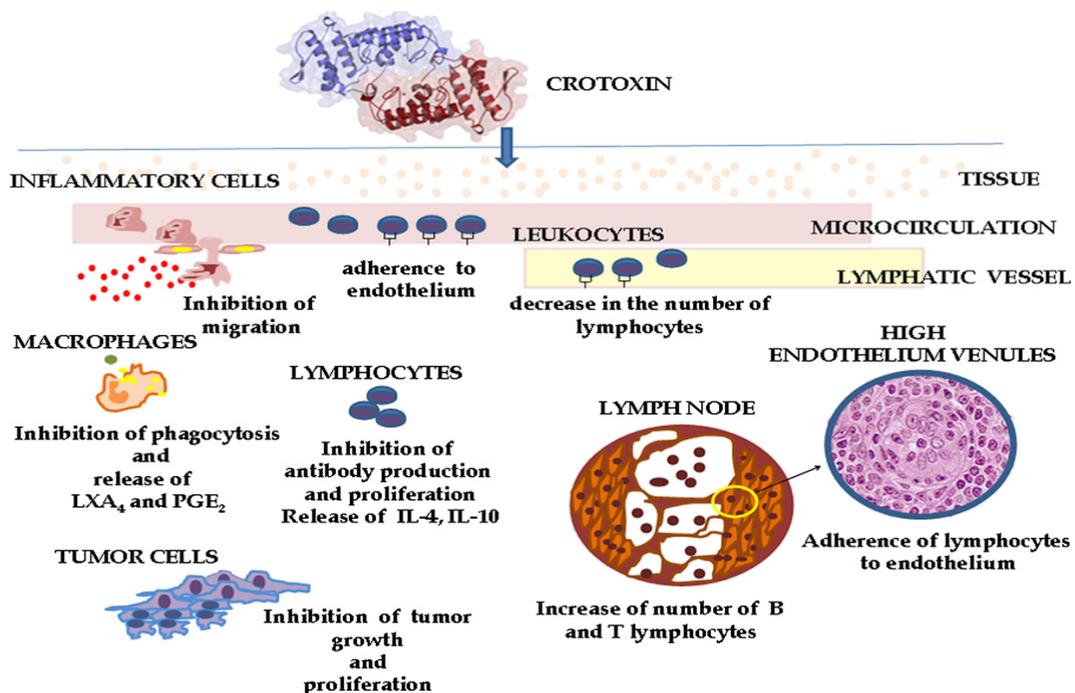


Figura 15. Esquema de reacción inmunológica a la crotoxina tomado de (Sampaio & Hyslop, 2010)

Esquema de ubicación espacial de epitopes en secuencias proteicas de Fosfolipasas A₂

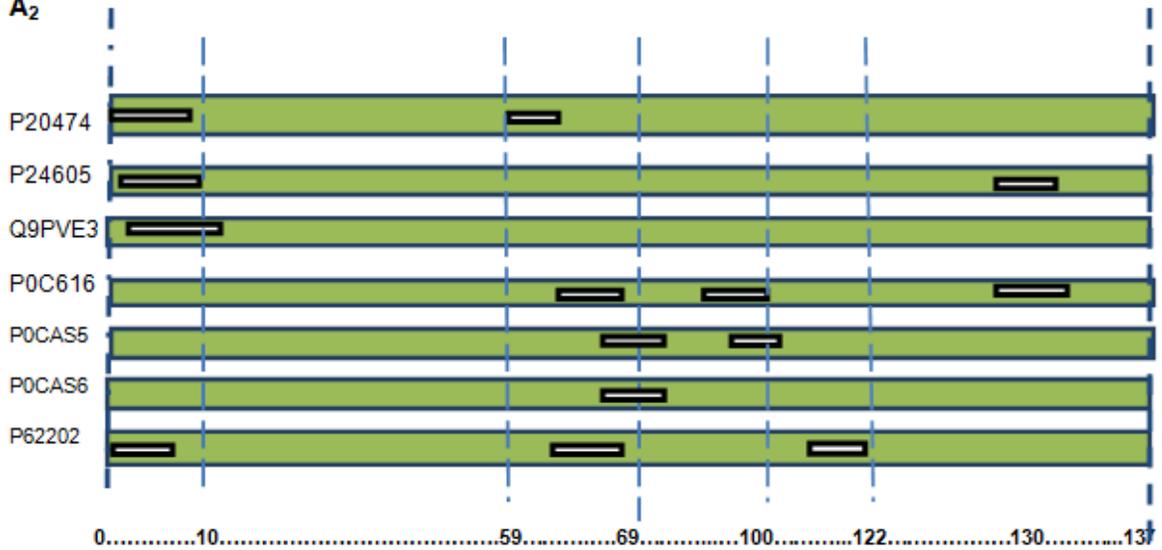


Figura 16. Ubicación espacial de epitopes de Fosfolipasas A2

Figura 17. Ubicación espacial de epitopes de secuencias proteicas de Metaloproteinasas.

Esquema de ubicación de epitopes en secuencias proteicas para Miotoxinas

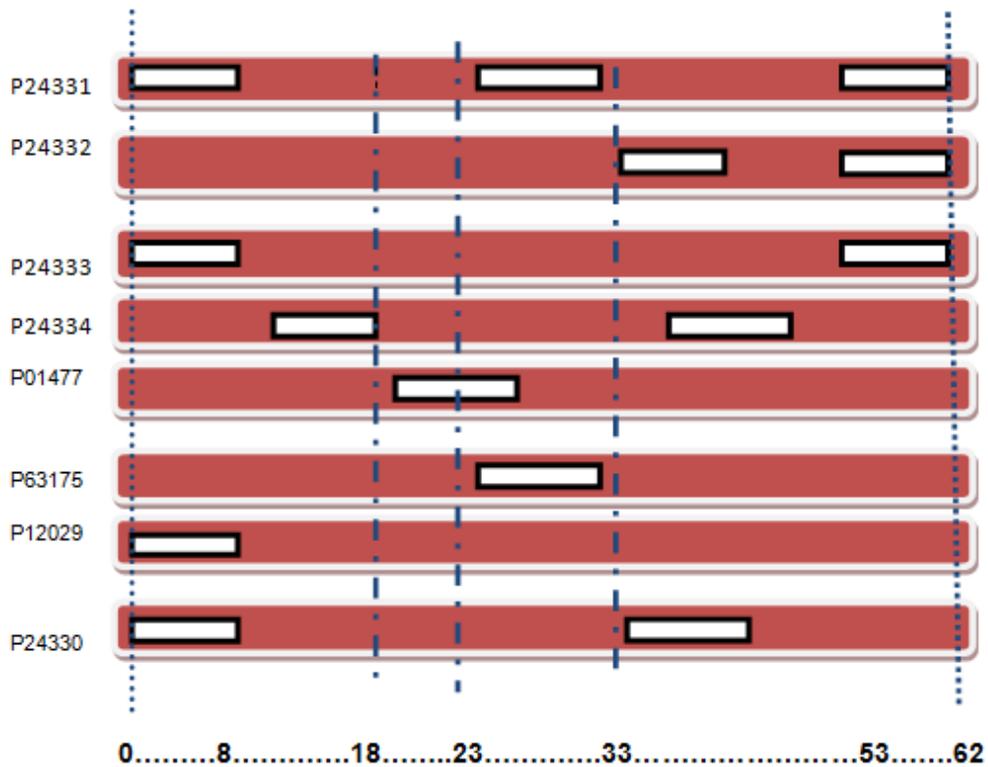
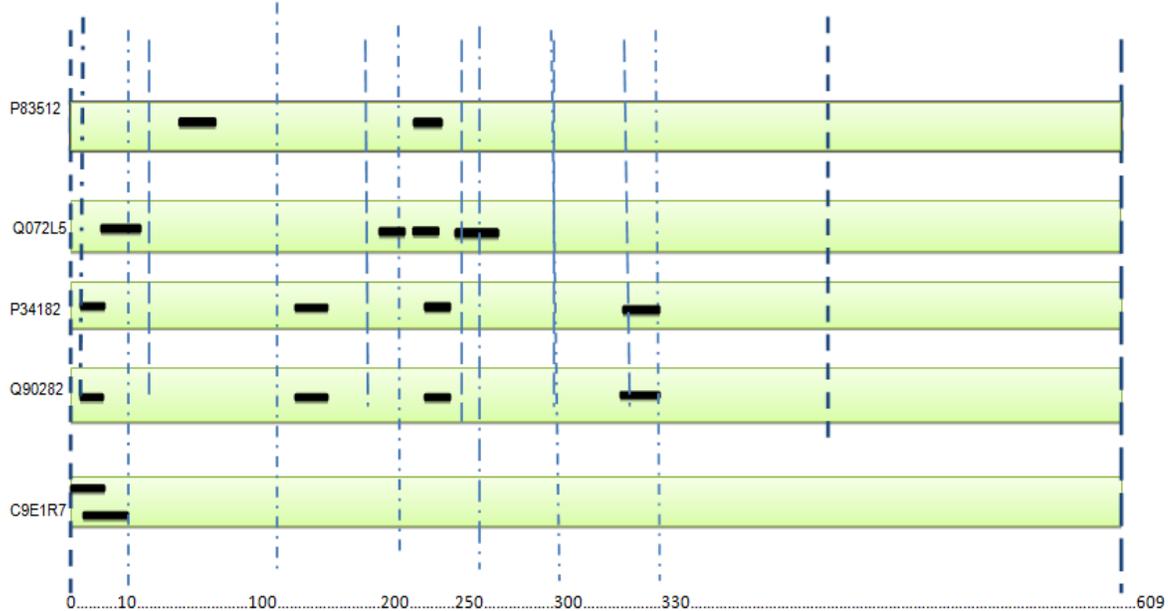


Figura 18. Ubicacion espacial de epitopes de secuencias proteicas de Miotoxinas.

Esquema de ubicación espacial de epitopes en secuencias proteicas de Metaloproteinasas.



9. CONCLUSIONES

El análisis bioinformático que se realizó a las secuencias proteicas de fosfolipasas A_2 de diferentes especies confirmó una variación notoria en su composición en la cadena de aminoácidos. De igual modo el estudio se extendió hacia otras moléculas como metaloproteinasas y miotoxinas que componen los venenos de serpientes, hallando diferencias significativas en la composición de su estructura química en diferentes especies.

Los programas usados como herramientas Bioinformáticas como Bio-edit mostraron eficiencia en el análisis de las secuencias proteicas, además el uso de algoritmos con un propósito de predicción inmune como BCE-pred, PRO- Ped Y Discotope server 1.2 descritas como herramientas inmunoinformáticas dieron resultados satisfactorios en cuanto al análisis de los diferentes tipos de moléculas que se querían estudiar.

La realización de este trabajo permite mostrar una forma innovadora de llevar a cabo estudios en el área de la ciencias biológicas; combinando dos campos de la investigación al tener en cuenta la Bioinformática como pilar en la búsqueda de respuestas a interrogantes biológicos, sin embargo la Bioinformática debe estar apoyada por el trabajo de laboratorio ya que es una parte fundamental.

Mediante el análisis de las secuencias proteicas encontradas reportadas en las bases de datos (EBI y NCBI) se lograron obtener un total de 53 secuencias proteicas de diferentes tipos en las que se incluyen metaloproteinasas, Fosfolipasa A_2 y miotoxinas de diferentes especies de serpientes de las cuales se emplearon 21 Para el análisis inmunoinformático.

El análisis Bioinformático e Inmunoinformático básico que se realizó, se emplearon 21 secuencias de las obtenidas en las bases de datos de acceso público, obteniéndose de estas secuencias un total de 47 nonameros para células T y para células B un total de 13 en las secuencias completas con códigos P20474 una fosfolipasas A_2 de la especie *B. asper* y para la secuencia P34182 una Metaloproteinasa secuencias encontradas se reportan como posibles blancos de estudio.

La Bioinformática se encuentra a la vanguardia entre las nuevas disciplinas del conocimiento científico, y junto a esta las disciplinas que se derivan de ella como la Inmunoinformática, es muy considerable el aporte que en la actualidad y en el futuro darán a la investigación en ciencias biológicas.

10. LITERATURA CITADA

- Alape, A., Flores, M., & Sanz, L. (2009). Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: Perspectives and applications. *Toxicon* , 938-948.
- Angel, R. (1987). *Serpientes de colombia su relacion con el hombre*. Medellin: Secretaria de educacion y cultura de antioquia.
- Araya Castillo, C. (2004). *Evaluación de la actividad citotóxica de dos péptidos catiónicos, sintetizados a partir de toxinas ofídicas de Bothrops asper y Agkistrodon piscivorus piscivorus*, sobre células eucarióticas normales y cancerosas. Universidad de Costa Rica Coronado San jose.
- Arni, R. K., Ward, R. J., & Gutierrez, J. M. (1996). Crystal structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper* venom. *Acta Cryst. D51* , 311-317.
- Baramova, E. N., & Shannon, J. D. (1989). Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. *Arch Biochem Biophys* 275 , 63–71.
- Barreto H. E.(2008). Bioinformatica:una oportunidad un desafio. *10* (1 ,132-138).
- Bentley, G. H. (1996). The crystal structures of complexes formed between lysozyme and antibody fragments In *Lysozymes: Model Enzymes in Biochemistry and Biology*. (Jolle´, S.P., ed.) *Birkhauser* , 301–319.
- Bjarnason, J. B., & Fox, J. W. (1994). Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol Ther* 62 , 325–372.
- Bolaños, R., & Cerdas, L. (1980). Produccion y Control de Sueros Antiofidicos en Costa Rica. *Bol Of Sanil Panam* 88 (3) , 189-195.
- Bon, C. (1996). The serum-therapie was discovered 100 years. *Toxicon* 34 , 142-143.
- Brown, S. M. (2000). Get your bioinformatics on the Web. *BioTechniques Vol 26 No 2* , 28 (244 - 6), 244-246.
- Calvette, J. J., Borges, A., & Segura, A. (2009). Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox–asper* complex endemic to Venezuela: contributing to its taxonomy and snakebite management. *Journal Proteomics* , 227–240.

- Cañedo, A. R., & Arencibia, R. (2005). Bioinformática: en busca de los secretos moleculares de la vida. *Red Telemática de Salud en Cuba (Infomed). Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas* , 12.
- Chippaux, J. P., & Goyfon, M. (1998). Venoms, Antivenoms and. *Toxicon* 36 , 823 - 846.
- Cintra, A. C., Marangoni, S., & Oliveira, B. (1993). Bothropstoxin-I: Amino acid sequence and function. *J. Prot. Chem* 12 , 57-64.
- De Groot, A. S., & Martin, W. (2009). Reducing risk, improving outcomes: bioengineering less immunogenic protein therapeutics. *Clinical Immunology* , 189-201.
- Diaz, C., Alape, A., & Lomonte, B. (2001). Cleavage of the NH₂ -terminal octapeptide of Bothrops asper myotoxic lysine-49 phospholipase A₂ reduces its membrane-destabilizing effect. *Arch. Biochem. Biophys* , 228-238.
- Duque Osorio, J. F., Sanchez, A., & Fierro, L. (2007). Venenos de Serpientes y Moléculas. *REV. ACAD. COLOMB. CIENC* , 110-134.
- Emini, E. A. (1985). Accessibility scale. *Journal of Virology* , 55,836.
- Estevez, J., De Roodt, A., & Otero, R. (2004). Neutralization potencies of four Latin-American antivenoms. Pan-American Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins . *Simposio da Sociedade Brasileira de Toxinologia* , 19-23.
- Fan, H., & Cardozo, J. (1995). Clinical toxicology of snake bites in South America . *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons* , 667-688.
- Flower, D., & Brusica, V. (2004). Bioinformatics tools for identifying T cell epitopes. *BIOSILICO Vol. 2, No. 1* , 18-23.
- Fox, J. W., & Serrano, M. S. (2005). Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 45 , 969–985.
- Franco. M., Cediel, J. F., & Payan, C. (s.f.). Brief history of bioinformatics.
- Franco, m. L., Cediel, J. F., & Payan, C. (2008). Breve historia de la bioinformática. *Colomb Med. 2008; 39* , 39 enero marzo 2008 (1), 117-120.

- Gonzalez, A., Dominguez, W., López-Alquicira, M., & Cuellar-Ramírez, . A. (2009). Epidemiología de las mordeduras por serpiente. Su simbolismo. *Acta Pediátrica Mexicana* , 182 -191.
- Gutierrez, J. M. (2002). Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Revista. biología. tropical*, 50 , 377-394.
- Gutierrez, J. M., & Lomonte, B. (1989). Local tissue damage induced by Bothrops snake venoms. *Mem. Inst. Butantan* 51 , 211-233.
- Gutierrez, J. M., & Ownby, C. L. (1984). Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of Bothrops asper. *Exp. Mol. Pathol.* 40 , 367-379.
- Gutierrez, J. M., & Ownby, C. L. (1984). Isolation of a myotoxin from Bothrops asper venom: Partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon* 22 , 115-128.
- Gutierrez, J. M., & Rojas, G. (2005). El envenamiento por mordedura de serpiente en latinoamerica. *Acta Tropica* 93 , 85-95.
- Takeya. H., T. Miyata, T., Nishino, N., & Omori-Satoh, T. (1993). Snake venom hemorrhagic and nonhemorrhagic metalloendopeptidases. *Methods Enzymol* 223 , 365–378.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis .
- Higashino, K., Yokota, Y., Ono, T., & Hanasaki, K. (2002). Identification of a Soluble Form Phospholipase A2 Receptor as a Circulating Endogenous Inhibitor for Secretory Phospholipase A2. *J Biol Chem* , 13583-13588.
- Kaiser, I. I., & Middlebrook, J. L. (1988). Preparation of a crotoxin. *Toxicon* , 26, 855–865.
- Karplus, P. A., & Schulz, G. E. (1985). Flexibility scale. *Naturwissenschaften* , 72-212.
- Lizano, S., Angulo, Y., Lomonte, B., & Fox, J. W. (1999). Two phospholipase A2 inhibitors from the plasma of Cerrophidion (Bothrops) godmani which selectively inhibit two different group-II phospholipase A2 myotoxins from its own venom: Isolation, molecular cloning and biological properties. *Biochemistry. Journal* , 631-639.

Lomonte, B., & Pizarro, J. (1999). -substituted peptide 115-129 of a Lys49 phospholipase A2 expresses enhanced membrane-damaging activities and reproduces its in vivo myotoxic effect. *Biochim. Biophys. Acta* , 19-26.

Lomonte, B., Angulo, Y., & Calderon, L. (2003). An overview of Lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon* 43 , 885-991.

Madrigal-Villalobos, M. (2006). *Serina Proteasas de Lachesis stenophrys y Bothrops asper: Produccion de Anticuerpos Mediante inmunizacion con Adn y Subclonaje*. Cartago, Costa Rica.

Manjunatha, R. (2006). Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function. *Biochemistry Journal* , 377-387.

Marchler-Bauer. (2009). CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res.*37 , 205-210.

Marchler-Bauer, A. (2011). CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res* , 225-9.

Markland, F. S. (1998). Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* , 1749-1800.

Markland, F. S. (1998). Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 36 , 1749-1800.

Martinez Barreneche, J. (2007). La bioinformática como herramienta. *Salud Publica Mex.* 2007; 49 , 49 (64 -6), 64-6.

Maruñak, S., Leiva, L., Gay, C., & Ruiz de Torrent, R. (2005). Mionecrosis inducida por fosfolipasa A2 aislada del veneno. *Universidad Nacioanl del Noroeste Comunicaciones Cientificas y Tecnologicas* .

Mebis, D. (1998). Enzymes from Snake Venom: Enzymes in Snake Venoms. *Aleken, Inc. Fort Collins* , 1-11.

Mota, J. V. (2008). *Accidente Ofidico en Venezuela*. Los Teques. Estado Miranda: Universidad Romulo Gallegos Area de Ciencia de la Salud Centro de Rotaciones Asistenciales.

Nielsen , M., & Lund, O. (2006). Prediction of residues in discontinuous B cell epitopes using protein 3D structures. *Protein Science*, 15 , 2558-2567.

- Otero, R. (1994). *Manual de diagnóstico y tratamiento del accidente ofídico*. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia.
- Otero, R., & Mesa, M. B. (2006). *Manual de urgencias en pediatría*. Medellín.
- Otero, R., Tobon, G. S., & Gomez, L. F. (1992). Accidente ofídico en Antioquia y Choco. Aspectos clínicos y epidemiológicos. *Acta Med Colomb* 17: , 229-249.
- Otero, R., Valderrama, R., Osorio, R. G., & Posada, L. (1992). Programa. *IATREIA* 5 , 96-102.
- Otero-Patiño, R., Cardozo, J. L., Higashi, H., Nuñez, V., & Moreno, A. M. (1998). A Randomized, Blinded, Comparative Trial of one Pepsin-Digested and Two Whole IgG Antivenoms for bothrops snake bites in uraba, Colombia. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* , 183-189.
- Parker, J. M., & Guo, D. (1986). Hydrophilicity scale. *Biochemistry* , 25-5245.
- Patiño, B. s. (2002). Serpientes Venenosas. *Grupo de Estudio de Animales Silvestres (Boletín GEAS)* , 37-41.
- Pearson. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. 8 (85).
- Pellequer, J. L., & Westhof, E. (1993). Turns scale. *Inmunology Letters* , 36-83.
- Pereañez, J. A., & Nuñez, V. (2009). Biochemical and biological characterization of a PLA2 from crotoxin complex of *Crotalus durissus cuman*. *Toxicon* , 535-542.
- Perez, J. C., Haws, W. C., & Garcia, V. E. (1978). Resistance of Warm-Blooded Animals to Snake Venoms. *Toxicon* , 375-383.
- Perez-Nogues, M., Rojo-solis, C., & Encinas-Cerezo, M. (2008). Estudio del Veneno de Serpientes: Tipos y Tratamientos. *RCCV* , 100-105.
- Ramirez, R. Y. (2006). Búsqueda de secuencias con actividad inmunogénica, útiles para el diseño de un modelo de posible vacuna contra la malaria. *Centro de Bioinformática. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia* , 8-13.
- Rodriguez, S., & Negrin, A. (2009). Efecto Adverso por Suero Antiofídico. *Revista Medica Uruguaya* .
- Roggen, E. L. (2008). Models for prediction of immunogenicity. *AAPS Press* , 75-95.

- Rucavado, A., Escalante, T., Chaves, F., & Leon, F. (2000). Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by Bothrops asper snake venom: effectiveness of early in situ administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor Batimastat and the chelating agent CaNa₂EDta. *Am J Trop. Med Hyg* , 313-319.
- Sampaio, S., & Hyslop, S. (2010). Crotoxin: Novel activities for a classic b-neurotoxin. *Toxicon* 55 , 1045–1060.
- Singh, H., & Raghava, G. P. (2001). ProPred: Prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics*,17(12), , 1236-37.
- Soares, A. M., & Giglio, J. (2003). Chemical modifications of phospholipases A2 from snake venoms:effects on catalytic and pharmacological properties. *TOXICON* , 855–868.
- Soares, A. M., Rodrigues, V. M., & Borges, M. H. (1997). Inhibition of Proteases, Myotoxins and Phospholipases A2 from Bothrops Venoms by the Heteromeric Protein Complex of. *Mol Biol* , 1091-1099.
- Southwood, S., Sidney, J., Kondo, A., & del Guercio, M. F. (1998). Several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires,. *Journal of Immunology* , 3363–3373.
- Stabeli, R. G., & Pimenta Magalhaes, L. M. (2005). Antibodies to a fragment of the Bothrops moojeni L-amino acid. *TOXICON* , 308-317.
- Takeda, S. (2011). Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochim. Biophys. Acta* .
- Takeda, S., Igarashi, T., & Mori, H. (2006). Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. *EMBO Journal* , 2388-2396.
- Takeya, H., & Iwanaga, S. (1998). Proteases that induce hemorrhage, in: G.S. Bailey (Ed.), 662. *Enzymes from Snake Venom, Alaken, Colorado* , 11-38.
- Tsodikov, O., & Sergeev, Y. (2002). A novel computer program for fast exact calculation of accessible and molecular surface areas and average surface curvature. *Journal of computational Chemistry* , 600-609.

- Tu, A. T. (1991). Structure function and mode of action of snake venom and other phospholipases A₂. *Reptile Venoms and Toxins* , 107–145.
- Valdes-Rodriguez, Y., Bilbao-Diaz, M., & Leon-Alvarez, J. (2002). Origen e Importancia de la Fosfolipasa A₂. *Rev Cubana Farm* , 121-128.
- van de Weert, M., & Møller, E. H. (2008). Immunogenicity of Biopharmaceuticals. *AAPS Press, Springer, New York* .
- Wagstaff, S. C., Laing, G. D., Papaspyridis, C., & Harrison, R. A. (2006). Bioinformatics and Multiepitope DNA. *PLoS Medicine* | www.plosmedicine.org , 832-844.
- Webber, C., & Arditto, M. (2009). T cell epitope: Friend or Foe? Immunogenicity of biologics in context. *Advanced Drug Delivery Reviews* , 965–976.
- Zavaleta, A. (2004). Mordedura de serpiente (Ofidismo): un problema de salud en el Perú. *Rev Med Hered*, vol 15 , 61-63.