

Ingrid Denise Schwesig  
Trabajo Final de Graduación  
2025



Imagen de Andrew Pauly  
Yarará chica (*Bothrops diporus*)  
Disponible en ArgentiNat  
Licencia CC-BY-NC  
Imagen recortada  
Registrada en Santa Cruz, Bolivia  
(Noviembre, 2024)



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Exactas Naturales y Agrimensura

Corrientes – Argentina

Licenciatura en Ciencias Biológicas

## **TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN**

**TÍTULO:** Acción *in vitro* de moléculas orgánicas como inhibidores de las metaloproteinasas del veneno de *Bothrops diporus*

**AUTOR:** Ingrid Denise Schwesig

**DIRECTORA:** Claudia Carolina Gay

**CO-DIRECTORA:** Silvina Margarita Echeverría

**LUGAR DE TRABAJO:** Laboratorio de Investigación en Proteínas (LabInPro) de FaCENA, UNNE

**AÑO:** 2025

Índice

|                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN .....                                                                                                                                 | 6  |
| 1 INTRODUCCIÓN .....                                                                                                                          | 7  |
| 1.1 Generalidades del género <i>Bothrops</i> .....                                                                                            | 7  |
| 1.2 Clasificación taxonómica (ITIS - Report: <i>Bothrops diporus</i> , 2017) .....                                                            | 7  |
| 1.3 Especie <i>Bothrops diporus</i> .....                                                                                                     | 8  |
| 1.4 Distribución geográfica en la Argentina .....                                                                                             | 8  |
| 1.5 Composición del veneno de <i>B. diporus</i> .....                                                                                         | 9  |
| 1.6 Tratamientos actuales y nuevas terapias contra el envenenamiento botrópico .....                                                          | 10 |
| 1.7 Moléculas de interés en el presente TFG .....                                                                                             | 11 |
| 2 OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....                                                                                                                  | 12 |
| 2.1 Objetivos .....                                                                                                                           | 12 |
| 2.2 Hipótesis .....                                                                                                                           | 12 |
| 3 MATERIALES Y MÉTODOS.....                                                                                                                   | 13 |
| 3.1 Materiales.....                                                                                                                           | 13 |
| 3.1.1 Veneno .....                                                                                                                            | 13 |
| 3.1.2 Inhibidores.....                                                                                                                        | 13 |
| 3.2 Evaluación de la capacidad neutralizante de los inhibidores de actividades proteolítica <i>in vitro</i> por método de pre-incubación..... | 13 |
| 3.2.1 Métodos cualitativos .....                                                                                                              | 13 |
| 3.2.2 Métodos cuantitativos .....                                                                                                             | 14 |
| 3.3 Inhibición de la actividad hemolítica indirecta.....                                                                                      | 15 |
| 3.4 Análisis estadístico .....                                                                                                                | 15 |
| 4 RESULTADOS.....                                                                                                                             | 16 |
| 4.1 Elección de mezcla solvente orgánico y tampón para ensayos con quercetina. ....                                                           | 16 |
| 4.2 Actividad proteolítica por SDS-PAGE.....                                                                                                  | 16 |
| 4.3 Zimografía.....                                                                                                                           | 18 |
| 4.4 Actividad proteolítica sobre caseína en placas de agar leche.....                                                                         | 19 |
| 4.5 Actividad azocaseinolítica .....                                                                                                          | 22 |
| 4.6 Actividad hemolítica indirecta.....                                                                                                       | 23 |
| 5 DISCUSIÓN.....                                                                                                                              | 25 |
| 6 CONCLUSIONES .....                                                                                                                          | 28 |
| BIBLIOGRAFÍA .....                                                                                                                            | 29 |

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, me gustaría darle las gracias a la Universidad Nacional del Nordeste, por darme el espacio en el que, a lo largo de estos seis años tuve la posibilidad de formarme, coincidir y relacionarme con gente increíble en los distintos ámbitos que ocupan. Asimismo, por tenerme en su consideración cuando necesité una mano y por siempre buscar brindarnos la mejor atención respecto a sus instalaciones para que podamos sentirnos más a gusto a la hora de realizar nuestros estudios. No solo en cuanto a la parte formativa de lo que conlleva una carrera, sino también, a los pequeños espacios que, sin proponérselo me hicieron sentir más cálido mi paso por esta etapa: las pausas compartidas entre mates, las mesitas en el patio en las que siempre atinábamos a guardar lugar para estudiar, y a aquellos rincones en los que, de algún modo se volvían un refugio para los últimos repasos o para un respiro cuando las cosas no salían bien.

Al Laboratorio "LabInPro" por permitirme formar parte durante la elaboración de mi tesis, a mi directora Dra. Carolina Gay y a mi Co-directora Dra. Silvina Echeverría por enseñarme todo lo necesario y disponible a su alcance siempre con la mejor predisposición, con paciencia y sobretodo con el profesionalismo que las caracteriza sin dejar de lado su calidez humana, que fue a su vez, lo que me ayudó a sobrellevar los momentos en los que la frustración o el desconcierto por dificultades para entender ciertos pasos me sobrepasaban. Así también, quiero darle las gracias a todo el equipo que forma parte de este espacio, por su amabilidad, su compromiso y la ayuda o consejos, que, sin necesidad me dieron.

Finalmente quiero agradecer a Dios por siempre ser mi guía y mi motor, y a quienes fueron mis pilares durante el transcurso en esta carrera, mis papás Mariel y Fabio, mi hermano y mi pareja, siendo los que más me vieron: callada, cansada, llorando, abrumada pero también feliz, ansiosa y determinada a seguir, por siempre ofrecerme su hombro, una salidita cuando no daba más, un respiro, pero, sobre todo, su apoyo. También a ese grupo de amigos que siempre estuvo firme al pie de cañón dándome palabras de aliento, de amor y de consuelo cuando más lo necesité.

Gracias

## RESUMEN

Las serpientes del género *Bothrops*, son las responsables del mayor número de accidentes ofídicos en Argentina, cuyo envenenamiento se caracteriza por efectos proteolíticos, coagulantes y hemorrágicos. *Bothrops diporus*, Cope, 1862 ("yarára chica") corresponde a una de las principales especies de importancia sanitaria en la región. El proteoma de este veneno comprende toxinas pertenecientes a catorce familias, siendo las más abundantes las metaloproteinasas de venenos de serpientes (SVMPs). El tratamiento de los accidentes ofídicos consiste en la administración del antiveneno específico. En los últimos años se ha propuesto la terapia combinatoria, anticuerpos e inhibidores (moléculas orgánicas pequeñas). En este trabajo se evaluó el potencial de tres moléculas orgánicas (MOs) [ácido ascórbico (AA), rojo de alizarina S (Az) y quercetina (Q)] para inhibir la actividad proteolítica *in vitro* del veneno de *B. diporus*. Se prepararon mezclas de veneno: MOs y se ensayaron dos métodos cualitativos, electroforesis en geles de poliacrilamida y zimografía y, dos cuantitativos, placas de agar-leche y actividad azocaseinolítica, para evaluar la inhibición por método de pre-incubación. Se realizó, el ensayo de actividad hemolítica indirecta para medir si estas moléculas eran capaces de inhibir las fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s), segunda familia más abundante de este veneno. Se realizó un análisis densitométrico (*ImageJ*) y estadístico mediante ANOVA (*Infostat*). El análisis electroforético evidenció que las tres moléculas mostraron un efecto protector parcial frente a la degradación proteolítica de la caseína. Se pudo observar que tanto AA como Q duplicaron la intensidad de la banda  $\alpha$ s1 de la caseína ( $\alpha$ s1-CN) respecto al veneno. Sin embargo, la relación (masa:masa, m:m) de veneno:AA utilizada fue 10 veces más alta a la de veneno:Q. Asimismo, la relación más alta de veneno:Az (1:20), mostró que la intensidad dicha banda aumentó 26 veces respecto al control. Este resultado muestra un efecto inhibitorio mayor de Az, seguido de Q y AA. Se observaron dos bandas claras de degradación, que corresponden a zonas donde se posicionaron las SVMPs del veneno, por zimografía. Si bien se puede ver una leve disminución de las bandas en presencia de Q, no fue posible determinar una diferencia significativa por densitometría. Por otro lado, el método cuantitativo en placas de agar leche, mostró que la mayor inhibición observada fue también con Az, lo que permitió calcular la Concentración Inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>), dando un valor tres veces mayor (CI<sub>50</sub>= 11,1 mM) al previamente reportado para el veneno de *B. alternatus* con Az (CI<sub>50</sub>= 3,6 mM). El mayor valor de CI<sub>50</sub> obtenido para *B. diporus*, probablemente se deba a que la Az se una mejor al sitio catalítico de las SVMPs PIII (mayoritarias en el veneno de *B. alternatus*) que al de la clase PI. Sin embargo, este método resultó poco sensible para evaluar AA o Q, debido a variaciones de pH o solubilidad de las mezclas. La actividad azocaseinolítica, permitió ensayar relaciones más altas de veneno:Q (1:0,75), observándose una reducción del 42% de la actividad del veneno. Sin embargo, este método no resultó adecuado para Az y AA debido a interferencias metodológicas. Finalmente, se evaluó la inhibición de la actividad hemolítica indirecta del veneno de *B. diporus*, sin observarse inhibición significativa con ninguna de las moléculas, bajo las condiciones ensayadas. Si bien estudios previos reportaron efectos inhibitorios de Q y AA sobre PLA<sub>2</sub>s de otros venenos, estas discrepancias podrían deberse a variaciones interespecíficas en la composición y tipo de isoformas. En este sentido, el estudio de compuestos naturales (o sintéticos) como potenciales inhibidores de las SVMPs, abre un nuevo abanico de posibilidades para explorar alternativas para el tratamiento complementario de los accidentes ofídicos.

## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 Generalidades del género *Bothrops*

*Bothrops*, el nombre de este género, deriva de *bothros* que significa «fosa o foseta» y *ops* «rostro» que significa «con una fosa en el rostro» en referencia a la foseta termorreceptora que poseen. Es un género compuesto por aproximadamente 45 especies de características muy diversas y que viven en un amplio espectro de hábitats, desde bosques y selvas tropicales y subtropicales hasta regiones áridas, semiáridas y desérticas, desde el nivel del mar hasta más de 3000 msnm, siendo algunas endémicas de islas oceánicas (Carrasco et al., 2012). El veneno es secretado por glándulas especiales localizadas a lo largo de la parte posterior y superior del labio superior. Son glándulas salivales modificadas que secretan una mezcla de diferentes sustancias, algunas de función digestiva y otras tóxicas. La principal función de las toxinas es la inmovilización y muerte de la presa, y al mismo tiempo, comenzar la digestión de la misma (Scrocchi et al., 2006). Las glándulas se conectan por un conducto glandular a dientes especializados o “colmillos” para la inoculación del mismo (Kardong, 1983). La dentición solenoglifa de este género, está compuesta por colmillos huecos (el conducto es cerrado similar a una aguja hipodérmica) y están fijados a un hueso maxilar móvil.

El género *Bothrops* ha adquirido relevancia en el estudio de accidentes ofídicos al ser responsable del mayor número de accidentes ofídicos en Argentina (Maruñak et al., 2010). El veneno botrópico posee principalmente efectos proteolítico, coagulante y hemorrágico. La característica del envenenamiento es el prominente daño tisular local en el sitio de la mordedura, el cual se desarrolla rápidamente luego del accidente y puede resultar en secuelas permanentes (Ribeiro & Tanús, 1997). Al comparar las distintas especies, se pueden observar diferencias en la composición de sus venenos, incluso dentro de una misma especie existen variaciones entre poblaciones (regionales) y entre individuos de la misma especie de distintas edades e incluso en aquellas que difieren en el tamaño, ya que hay factores que pueden influir, como la alimentación (Casewell et al., 2020). Esto puede explicarse debido a la ontogenia del organismo inoculador, condicionando significativamente la toxicología del veneno (Saldarriaga et al., 2003). Asimismo, la severidad y el tipo de síntomas estará estrechamente vinculado con el estado de salud, tamaño y comorbilidades de la víctima, siendo capaces de modular las respuestas al envenenamiento (Bryan-Quirós et al., 2019).

### 1.2 Clasificación taxonómica (ITIS - Report: *Bothrops diporus*, 2017)

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Clase: Reptilia

Orden: Squamata

Familia: Viperidae

Subfamilia: Crotalinae

Género: *Bothrops*

Especie: ***Bothrops diporus***

### 1.3 Especie *Bothrops diporus*, Cope, 1862

La serpiente *B. diporus*, conocida como “yarára chica” corresponde a una de las principales especies de serpientes responsables de accidentes ofídicos debido a su abundancia y amplitud de distribución en Argentina. Tienen un tamaño relativamente pequeño, comparado a otras especies de *Bothrops*, y de complexión mediana (los machos adultos tienen una longitud total promedio de 60 a 70 cm, y las hembras adultas pueden llegar a medir hasta 100 a 110 cm). Una de las características que las vuelven distinguibles a simple vista, aunque no es exclusiva de esta especie, sino más bien, considerada más representativa de los alethinophidia son las escamas quilladas (parte longitudinal saliente de la misma) que recubren su dorso y parte de su cabeza, diferenciándose de las ventrales por ser lisas (Fig. 1. A-B). Sin embargo, estudios realizados por Moore y Jackson, (2010) mencionan que no hay un patrón universal, en cambio, la ausencia o presencia de las escamas quilladas en el dorso varía considerablemente entre familias, géneros y especies. Esta especie es apreciable visualmente por su distinto color de fondo que varía dentro de una escala que va desde distintos tonos de marrón, alcanzando incluso, tonos grisáceos, destacándose por el contraste existente frente al patrón de manchas subtriangulares de color oscuro que se encuentran a ambos lados de la línea vertebral, en contacto con el límite de la cabeza marcada por un patrón de manchas irregulares también de color oscuro, sin dejar de mencionar el par de ocelos con el que cuentan en ambos extremos de su base (Stazzonelli et al., 2018).

A



B



**Figura 1. (A)** Escamas quilladas del dorso de *B. diporus*. **(B)** Detalle de la cabeza. Se aprecian las escamas lisas y quilladas (extraído de Stazzonelli et al., 2018).

### 1.4 Distribución geográfica en la Argentina

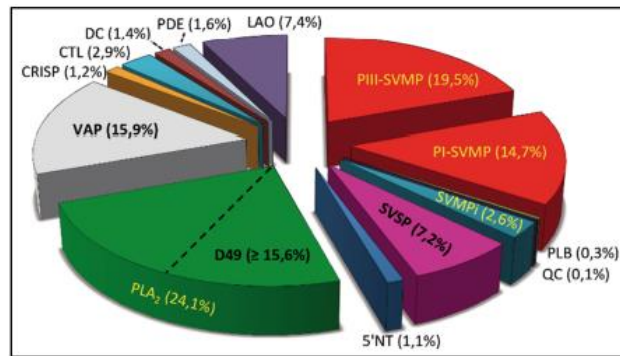
*B. diporus*, está ampliamente distribuida en todo el país, llegando hasta el norte de la Patagonia. En la Figura 2 se muestra la distribución en Argentina (Stazzonelli, et al., 2018). Teniendo en cuenta la amplia distribución, se han llevado a cabo estudios para evaluar la toxicidad del veneno de *B. diporus* en distintas regiones del país. Un trabajo realizado por Maruñak et al. (2010) reportó que especímenes del noroeste argentino presentaron un veneno más tóxico que los del nordeste argentino, con valores de dosis letal cincuenta ( $DL_{50}$ ) de 26,60 y 38,18  $\mu$ g/20 g ratón, respectivamente.



**Figura 2.** Distribución de *B. diporus* en Argentina. Las regiones coloreadas en naranja representan los sitios en los que se registró su presencia (extraído de Stazzonelli, et al., 2018).

### 1.5 Composición del veneno de *B. diporus*

El proteoma de este veneno comprende toxinas pertenecientes a catorce familias de proteínas, siendo las más abundantes aquellas pertenecientes a las familias de las metaloproteinasas de venenos de serpientes (SVMP, de sus siglas en inglés), fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s), péptidos similares a BPP (péptidos potenciadores de bradiquinina), L-aminoácido oxidasas y serina proteinasas (Gay et al. 2015). Este perfil de toxinas (Fig. 3). explica en gran medida los efectos fisiopatológicos característicos de las mordeduras de serpientes botrópicas observadas en pacientes envenenados por *B. diporus*. Las SVMP se pueden dividir en tres clases (PI a PIII) según la extensión de varios dominios estructurales. Las enzimas clase PI comprenden únicamente el dominio metaloproteinasa, las enzimas PII contienen un dominio desintegrina después del dominio metaloproteinasa, y las enzimas de la clase PIII contienen un dominio carboxilo terminal adicional rico en cisteína. La clase PIII es la más importante de las clases de SVMPs en cuanto a su contribución a la complejidad del veneno (Fox et al., 2008).



**Figura 3.** Composición relativa del veneno de *B. diporus* (% de las distintas familias). Las metaloproteasas (SVMPs) representan el 34,2% de la composición total, distribuidas en dos clases: PI y PII (Extraído de Gay et al., 2015).

Las SVMPs constituyen la familia más abundante de este veneno (34,2%), distribuidas en dos clases, tipo PI (14,7%) y PII (19,5%) (Gay C., et al., 2015). Las SVMPs tipo P-I son enzimas fibrino(geno)líticas, es decir, capaces de escindir distintas cadenas  $\alpha$  del fibrinógeno y con actividad hemorrágica casi nula a diferencia de las P-III que son hemorrágicas (Van de Velde, 2017; Gay, et al., 2005). Las SVMPs PIII hemorrágicas son capaces de degradar el colágeno tipo IV, clave para la estabilidad de los componentes de la membrana basal de capilares sanguíneos, (Gutiérrez et al., 2016) y factores de coagulación sanguínea, incluyendo el fibrinógeno y el factor de von Willebrand (Marcussi et al., 2007). Debido al alto porcentaje de las SVMPs en el proteoma de *B. diporus* y, a su marcada contribución en la patogenicidad del veneno, resultan un blanco atractivo al que deben apuntar el estudio y desarrollo de las nuevas terapias antiofídicas.

### 1.6 Tratamientos actuales y nuevas terapias contra el envenenamiento botrópico

En Argentina se produce un antiveneno bivalente, que es una solución estéril y apirógena de Fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de inmunoglobulinas equinas purificadas, a partir de plasma equino hiperinmune para neutralizar venenos de *B. alternatus* y de especies del grupo *B. neuwiedi* (*B. diporus* y afines), obtenidas por termocoagulación, precipitación salina y digestión enzimática (Ministerio de Salud de la República Argentina, Dirección de Epidemiología, 2025). El fundamento del uso de derivados de plasma equino, se basa en su alta tolerancia hacia las toxinas pertenecientes a distintas especies de serpientes, y luego de ser inmunizados, se obtienen los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> por digestión con pepsina de las inmunoglobulinas (Dias da Silva et al., 2022). Las nuevas terapias apuntan a una modalidad combinatoria que comprenda diferentes mecanismos de inhibición a fin de garantizar la neutralización de un amplio rango de toxinas. La tendencia actual en la investigación de la próxima generación en terapia antiofídica es mejorar su eficacia y seguridad. En los últimos años debido al descubrimiento de fármacos inhibidores, se ha propuesto la terapia combinatoria, anticuerpos e inhibidores (moléculas orgánicas pequeñas) como un nuevo enfoque en el tratamiento, de manera de aumentar la eficacia y disminuir la toxicidad (Knudsen et al., 2019; Albulescu et al., 2020).

### 1.7 Moléculas de interés en el presente TFG

Proponemos tres moléculas orgánicas (ácido ascórbico, quercetina y un derivado de la alizarina) potencialmente inhibidoras de SVMs para ensayar su capacidad neutralizante de la actividad proteolítica del veneno de *B. diporus*. A continuación, se describen algunas características de las mismas:

Quercetina: la quercetina es un flavonol que pertenece al grupo de los flavonoides y generalmente se presenta como glucósido (Salehi et al., 2020). Presenta actividad antiinflamatoria y antioxidante, representando un complemento que favorece la eliminación de especies reactivas del oxígeno (ERO), causantes del daño oxidativo (Vlachodimitropoulou et al., 2011). Asimismo, algunos autores reportaron actividad anti-veneno de extractos de *Nectandra angustifolia*, rico en derivados glicosilados de quercetina, sobre enzimas de veneno de serpientes (Torres et al., 2023).

Ácido ascórbico: conocido como vitamina C, desde un punto de vista químico, una cetolactona hidrosoluble con dos grupos hidroxilo ionizables. A pH fisiológico, el monoanión ascorbato es la forma predominante, actuando como agente reductor mediante oxidación de un electrón a radical ascorbato y deshidroascórbico (Mastrangelo et al., 2018). El ácido ascórbico, además de su papel como antioxidante fisiológico, ha sido descrito como un modulador de enzimas metalodependientes debido a su capacidad de actuar como agente reductor. En el contexto del veneno de *B. diporus*, el ascorbato podría interferir en la actividad catalítica de las SVMs [cuya función enzimática depende de la presencia de un ion metálico ( $Zn^{2+}$ )] pudiendo alterar la reactividad de ese ion indispensable para la proteólisis. Además, la capacidad del ácido ascórbico de donar electrones y participar en reacciones redox, hace que pueda interactuar con los radicales libres generados en consecuencia del proceso inflamatorio propio de la intoxicación (Shen et al., 2021). De esta manera, el ácido ascórbico podría contribuir a la inhibición parcial de la actividad proteolítica de dichas enzimas, reduciendo consecuentemente los procesos de degradación de proteínas y daño tisular asociados al envenenamiento.

Alizarina: molécula proveniente de la raíz de una planta del género *Rubia*. *Rubia cordifolia* L. es una planta trepadora herbácea perenne de la familia Rubiaceae, que está ampliamente distribuida en India, Corea, África, Asia tropical, Malasia, Europa y China (Humbare et al., 2022; Wen M. et al., 2022). Esta molécula corresponde a una antraquinona, capaz de aceptar y donar electrones fácilmente, lo que la vuelve sumamente importante para las reacciones redox que ocurren en presencia de agentes oxidantes, como EROs producidas por el mismo veneno o por células inflamatorias (Zhang et al., 2024).

## **2 OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

### **2.1 Objetivos**

#### **Objetivo general**

Evaluar la capacidad neutralizante de moléculas orgánicas de la actividad proteolítica *in vitro* inducida por el veneno de *B. diporus*.

#### **Objetivos particulares**

- Ensayar diferentes proporciones de mezclas de solventes orgánicos (etanol, dimetilsulfóxido) y de tampón de fosfatos, donde mejor se disuelvan los compuestos tipo flavonoides (quercetina).
- Evaluar la capacidad neutralizante de ácido ascórbico, quercetina o alizarina, de la actividad proteolítica *in vitro*, utilizando métodos cualitativos, inducida por el veneno de *B. diporus* por método de pre-incubación.
- Evaluar la capacidad neutralizante de ácido ascórbico, quercetina o alizarina, de la actividad proteolítica *in vitro*, utilizando métodos cuantitativos, inducida por el veneno de *B. diporus* por método de pre-incubación.

### **2.2 Hipótesis**

Moléculas orgánicas inhibidoras de SVMPs neutralizan la actividad proteolítica característica de la intoxicación inducida por el veneno de *B. diporus*.

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales

##### 3.1.1 Veneno

El veneno de cinco especímenes de *B. diporus* fue suministrado por el Serpentario CEPSAN, dependiente del Ministerio de Producción de la Provincia de Corrientes, ubicado en el Centro de Conservación Aguará (Paso de la Patria, Corrientes, Argentina). El veneno desecado se conservó en freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Al momento de ser usado, fue diluido en solución de tampón A (Tris-HCl 0,1 M;  $\text{CaCl}_2$  0,5 mM;  $\text{NaN}_3$  0,02 %; pH 8,0), y para los ensayos de hemólisis indirecta se empleó solución salina de tampón de fosfatos (PBS) pH 7.2. El material insoluble se centrifugó y se trabajó a partir del sobrenadante. También se llevó a cabo la cuantificación de la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976).

##### 3.1.2 Inhibidores

Los inhibidores que se utilizaron fueron: quercetina (3, 5, 7, 3'-4'-pentahidroxi-flavona), ácido L-ascórbico [(R)-5-[(S)-1,2-dihidroxi-etil]-3,4-dihidroxi-5-(H)-furan-2-onal] y rojo de alizarina S (sal sódica del ácido 3,4-dihidroxi-9,10-dioxo-2-antracenosulfónico). Las soluciones de ácido L-ascórbico (AA) y rojo de alizarina (Az) se disolvieron en agua y/o en tampón A. Por otro lado, la quercetina (Q) es una molécula orgánica que debe ser disuelta en un solvente orgánico previo a la mezcla con el tampón de trabajo. Esta molécula tiene una mayor solubilidad en DMSO (dimetilsulfóxido) que, en etanol, por lo cual se utilizó el primer solvente. Las soluciones de Q se prepararon por sonicación en mezclas DMSO y tampón A o PBS. Se determinó la proporción de DMSO-tampón A (5, 10, 12,5 y 20% de DMSO) en la que no se compromete la actividad proteolítica del veneno por electroforesis SDS-PAGE 12% utilizando caseína como sustrato (según método descrito más adelante en el ítem 3.2.1.1).

#### 3.2 Evaluación de la capacidad neutralizante de los inhibidores de actividades proteolítica *in vitro* por método de pre-incubación

Se prepararon mezclas que contienen una cantidad fija de veneno "dosis de reto" en base a resultados previos obtenidos por el grupo de trabajo y se ensayaron por diferentes métodos cuali- y cuantitativos. Disponer de diferentes métodos cualitativos permite por un lado conocer el perfil electroforético de la actividad proteolítica sobre un sustrato determinado, y conocer el tipo de proteasa presente en el veneno que actúa sobre un sustrato proteico (zimografía). Asimismo, contar con diferentes métodos cuantitativos permite tener opciones de medir actividad proteolítica teniendo en cuenta la coloración que puedan presentar algunas moléculas orgánicas.

##### 3.2.1 Métodos cualitativos

###### 3.2.1.1 Actividad proteolítica sobre caseína (SDS-PAGE)

El clivaje específico de caseína se ensayó por SDS-PAGE al 12% (m/v). Cien microlitros de caseína (Sigma) (5 mg/ml, previamente hervida a  $100^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos y filtrada) se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos con 100  $\mu\text{L}$  de veneno (0,25 mg/ml) en tampón A, correspondiente a una relación caseína / veneno de 20:1 (m/m). Las muestras se desnaturalizaron y redujeron por ebullición durante 5 minutos con solución desnaturalizante enriquecida en SDS (urea 5%, SDS 4% y 1% 2-mercaptoetanol en tampón de fosfatos 35 mM, pH 7,0) y se

realizó la corrida electroforética. Para los estudios de inhibición el veneno se pre-incubó con diferentes relaciones veneno: moléculas orgánicas (AA, Az, Q) en un rango de 1:4 - 1:20 (m/m) y hasta 1:100 (para AA) por 30 minutos a 37°C antes de la electroforesis. Se utilizó el software *ImageJ* ( <https://imagej.net/ij/> ), para realizar el análisis densitométrico de las bandas de caseína.

#### 3.2.1.2 Actividad proteolítica sobre gelatina (zimografía)

Se ensayó la actividad proteolítica de soluciones de veneno de *B. diporus* (16 µg/pocillo). Se preparó un gel de poliacrilamida 12% (m/v) al cual se adicionó una solución de gelatina (0,1 mg/ml) en el gel de corrida. Las muestras se mezclaron con tampón de muestra sin 2-mercaptoetanol. Se realizó la corrida electroforética y, al finalizar la misma, se colocó el gel en solución de Triton X-100 2,5% (v/v) durante 15 min a temperatura ambiente, repitiendo este paso 2 veces. Se removi6 parcialmente el Triton X-100, dejándose 2-3 ml en la cuba. Se adicionarán 20 ml de tampón de revelación [Tris 50 mM; CaCl<sub>2</sub> 5 mM; NaN<sub>3</sub> 0,02% (m/v); pH 8,0], con agitación durante 15 min a temperatura ambiente, y se incubó a 37 °C durante 16 h. Para los estudios de inhibición, se agregó al tampón de revelación diferentes relaciones veneno: moléculas orgánicas (m/m), 1:3,75 (Bd:AA), 1: 0,93 (Bd:Az) y 1: 0,75 (Bd:Q). Finalmente, el gel se tiñó con Azul de Coomassie R250. Se observaron los diferentes patrones de bandas obtenidos para evaluar la actividad proteolítica con el software *ImageJ*.

#### 3.2.2 Métodos cuantitativos

##### 3.2.2.1 Actividad proteolítica en placas agar-leche

Se prepararon soluciones de leche descremada al 1% (0,25 g de leche descremada en 12,5 ml) en tampón A. Se agregó el mismo volumen de una solución caliente (T° 55° aprox.) previamente preparada de agar al 1% (0,25 g en 12,5 ml) en el mismo tampón y se agregó una pizca de azida de sodio. La mezcla se volcó inmediatamente sobre una placa de acrílico, se dejó solidificar y se realizaron pocillos con un micro-sacabocado conectado a bomba de vacío. Para los estudios de inhibición, el veneno (30 mg/ml) se pre-incubó con diferentes relaciones veneno: moléculas orgánicas, en un rango de 1:0,03 – 1:1 (m/m) por 30 minutos a 37°C, y luego se realizó la siembra de 12 µl de las mezclas en los diferentes pocillos por duplicado. Se realizarán los controles correspondientes de veneno y de solventes utilizados. Se incubó la placa por 18 horas en estufa a 37° C y se leyeron los diámetros de los halos de proteólisis. Se determinó la concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) como aquella concentración de inhibidor capaz de reducir un 50% el halo de proteólisis inducido por el veneno entero (sólo para Az). Antes de dar comienzo a los ensayos orientados a evaluar la capacidad inhibitoria de las moléculas orgánicas frente al veneno, se realizó un ensayo empleando distintas concentraciones del veneno (5, 10, 23 y 30 mg/ml), con el fin de seleccionar la concentración óptima para los ensayos siguientes. Asimismo, al utilizar concentraciones elevadas de veneno, se controló el pH de las mezclas de veneno:AA, para que este no interfiera en la actividad enzimática.

##### 3.2.2.2 Actividad azocaseinolítica

Se pre-incubó el veneno de *B. diporus* (2 mg/ml) con diferentes relaciones veneno: querecetina, 1:0,18 a 1:0,75 (m/m) por 30 minutos a 37°C. La actividad proteolítica sobre azocaseína (Wang y Huang, 2002) se midió empleando como control de 100% de actividad veneno disuelto en tampón A. Este método sólo se utilizó para Q debido a limitaciones metodológicas con Az (color) y AA (sensibilidad).

### 3.3 Inhibición de la actividad hemolítica indirecta

Si bien no estaba contemplado en el plan original, se decidió ensayar si estas moléculas son capaces de inhibir las PLA<sub>2</sub>s presentes en el veneno de *B. diporus*, segunda familia de importancia luego de las SVMPS. Se realizó el método en placas de agar-sangre sugerido por Gutiérrez et al. (1988) para medir si las moléculas orgánicas son capaces de inhibir las fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), las cuales constituyen la segunda familia más importante del veneno de *B. diporus*. La inhibición se indicó por la reducción de los halos de hemólisis que se obtuvieron al comparar los halos producidos por una cantidad determinada de veneno entero (0,5 mg/ml) y la misma cantidad de veneno pre-incubada (30 min a 37°C) con moléculas orgánicas. Se utilizaron las relaciones veneno: moléculas orgánicas más altas teniendo en cuenta la solubilidad de las mismas (1:10 para AA, 1:2,5 para Q y 1:4 para Az). En las placas de agar sangre se sembraron 12 µl de las soluciones de veneno entero o mezclas de veneno: moléculas orgánicas. Se midieron los diámetros de los halos de hemólisis luego de 18 hs de incubación a 37°C en cámara húmeda.

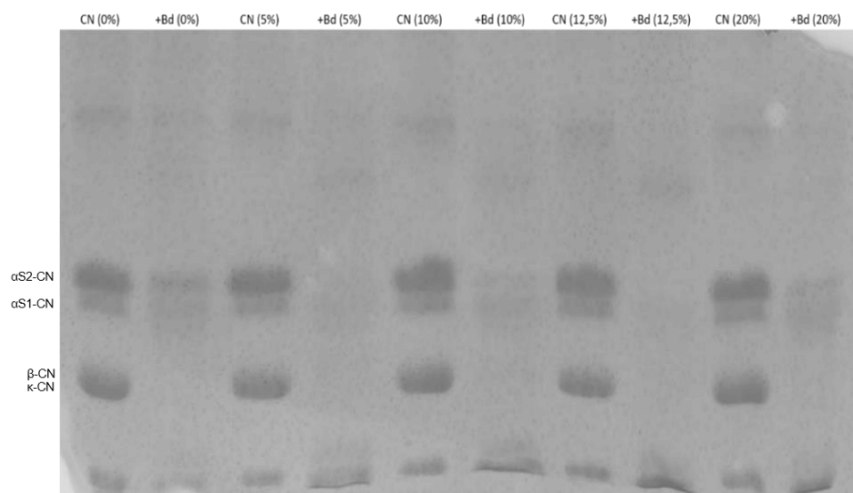
### 3.4 Análisis estadístico

Para los ensayos cuantitativos se realizó el análisis estadístico mediante ANOVA seguido de la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ) utilizando el software Infostat ( <https://www.infostat.com.ar/> ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Elección de mezcla solvente orgánico y tampón para ensayos con quercetina.

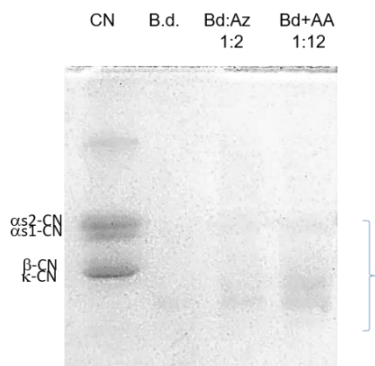
Se determinó la proporción de DMSO-tampón A en la que no se compromete la actividad proteolítica del veneno por electroforesis SDS-PAGE utilizando caseína como sustrato (Fig. 4). Se decidió utilizar una proporción que no supere el 20% DMSO en el tampón de trabajo.



**Figura 4.** Análisis electroforético (SDS-PAGE 12%) de la degradación de CN por el veneno de *B. diporus* utilizando diferentes proporciones de DMSO (%) disuelto en tampón A.

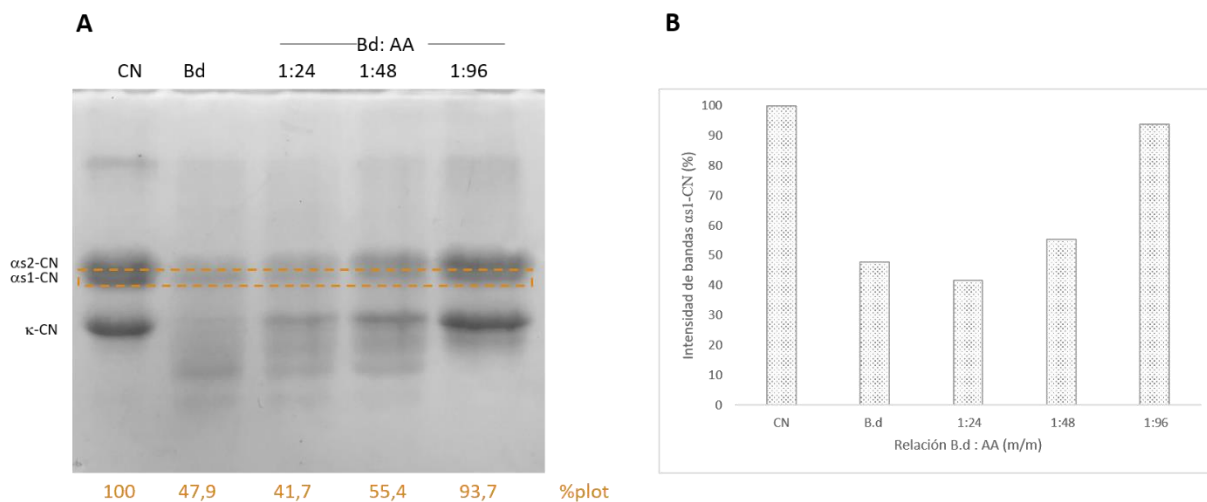
### 4.2 Actividad proteolítica por SDS-PAGE

Los resultados del *screening* para el control de la actividad proteolítica del veneno utilizando una solución de caseína (CN) con los dos inhibidores hidrosolubles (Fig. 5), AA y Az, mostraron, bajo las condiciones ensayadas, una leve inhibición por ambas moléculas de la degradación de las bandas de caseína respecto al control de veneno, lo que se decidió ensayar mayores concentraciones de AA y Az.



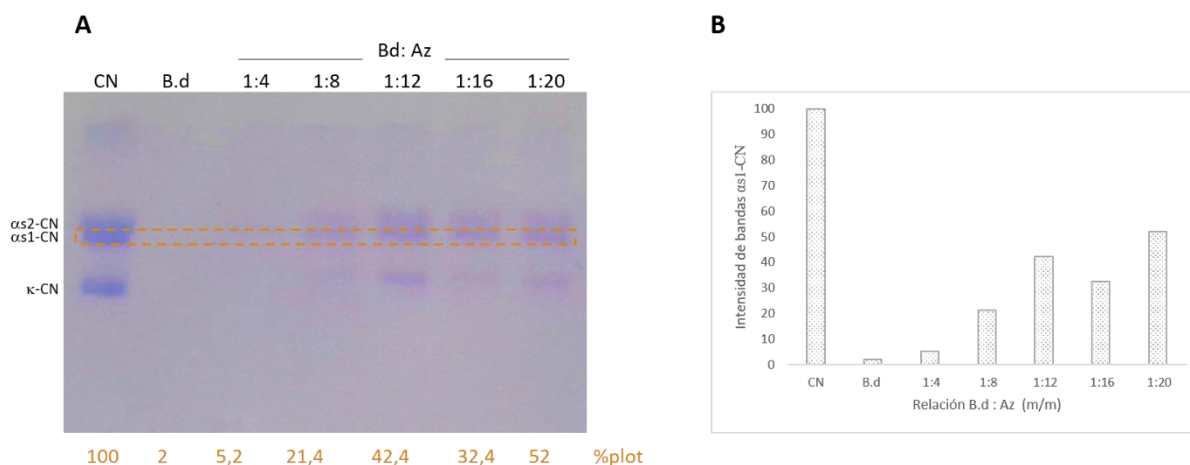
**Figura 5.** Análisis electroforético de la degradación de CN por el veneno de *B. diporus* pre-incubado con Az y AA. SDS-PAGE 12%. La llave indica las bandas características de CN.

En la Figura 6 se muestra el perfil electroforético del efecto de AA sobre la degradación de caseína por el veneno. Se observó que en la relación más alta ensayada Bd: AA 1:96 (m:m), la intensidad de banda de  $\alpha$ s1-CN fue de 93,7%, respecto al control de veneno (47,9%). Este ensayo, debido a la baja concentración de veneno utilizada (0,25 mg/ml), permitió probar relaciones altas de veneno: AA (1:96; m:m), sin comprometer el pH de la mezcla.



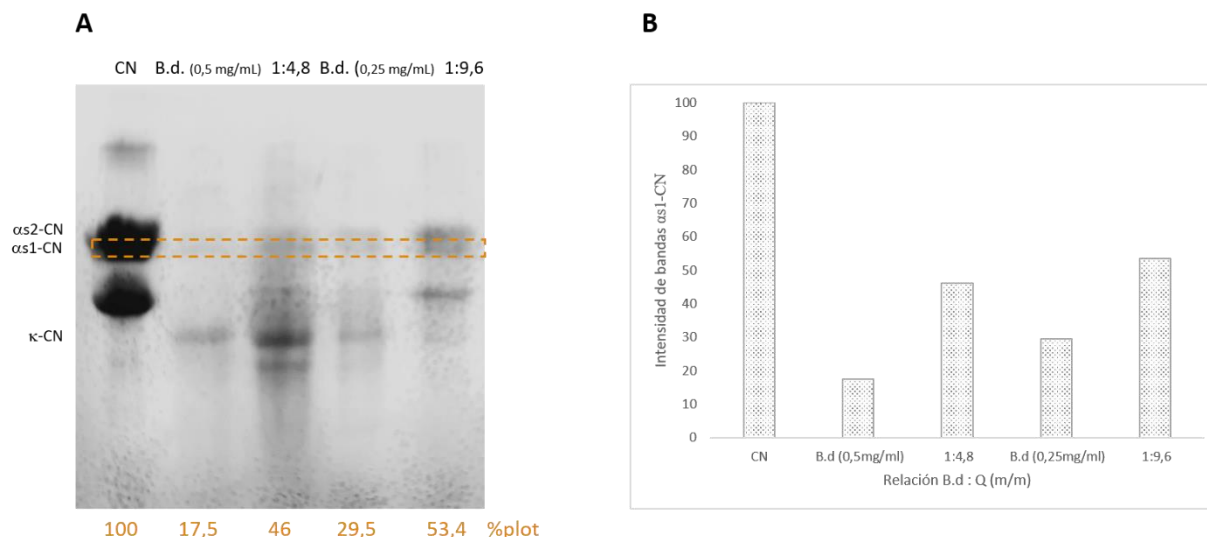
**Figura 6.** Análisis del patrón electroforético (SDS-PAGE 12%) de proteínas caseína digeridas por el veneno de *B. diporus* en presencia y ausencia del inhibidor AA. **A.** Análisis de intensidad de banda con software *imageJ*. **B.** Densidad relativa de banda  $\alpha$ s1-CN en función de la relación veneno: AA.

El ensayo de inhibición de veneno de *B. diporus* pre-incubado con diferentes relaciones de Az (Fig. 7), mostró que a la relación más alta ensayada Bd: Az 1:20 (m:m), la intensidad de banda de  $\alpha$ s1-CN fue de 52%, respecto al control de veneno (2%).



**Figura 7.** Análisis del patrón electroforético (SDS-PAGE 12%) de proteínas caseína digeridas por el veneno de *B. diporus* en presencia y ausencia del inhibidor Az. **A.** Análisis de intensidad de banda con software *imageJ*. **B.** Densidad relativa de banda  $\alpha$ s1-CN en función de la relación veneno: Az.

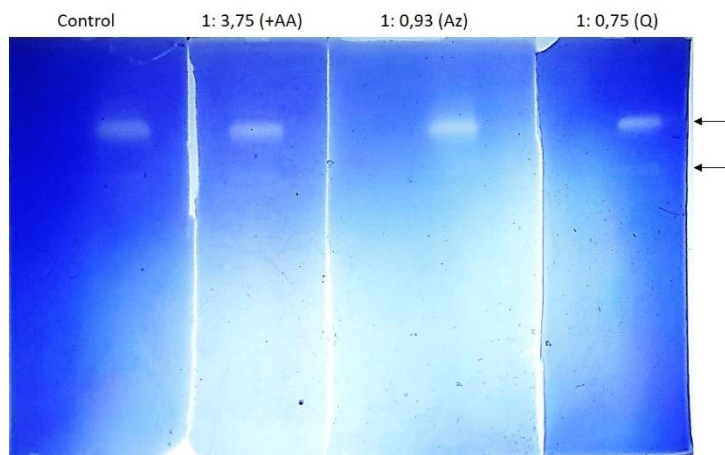
El perfil electroforético de la degradación de caseína por el veneno pre-incubado Q, se muestra en la Figura 8. Se observó que a la relación más alta ensayada Bd:Q 1:9,6 (m:m) la intensidad de banda de  $\alpha$ s1-CN fue 53,4%, respecto al control de veneno de (29,5%).



**Figura 8.** Análisis del patrón electroforético (SDS-PAGE 12%) de proteínas caseína digeridas por el veneno de *B. diporus* en presencia y ausencia del inhibidor Q. **A.** Análisis de intensidad de banda con software *imageJ*. **B.** Densidad relativa de banda  $\alpha$ s1-CN en función de la relación veneno: Q.

### 4.3 Zimografía

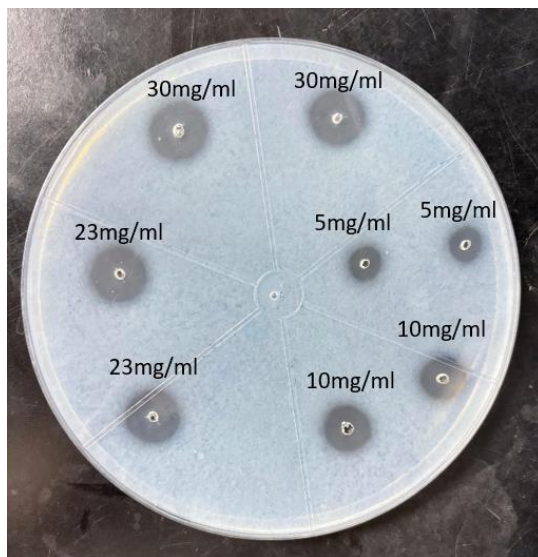
La zimografía utilizando gelatina como sustrato se muestra en la Figura 9. Se pueden observar dos bandas claras de degradación del sustrato, una superior y una inferior, más tenue, en todas las calles (veneno y veneno pre-incubado con las MOs). Si bien se puede ver una leve disminución de las bandas en la calle que contiene el veneno pre-incubado con Q, no fue posible determinar una diferencia significativa con el software *ImageJ*.



**Figura 9.** Análisis por técnica de zimografía de la actividad proteolítica de SVMPs presentes en el veneno de *B. diporus*. Control: veneno de *B. diporus* en ausencia de inhibidor. Las flechas indican zonas de degradación del sustrato gelatina.

#### 4.4 Actividad proteolítica sobre caseína en placas de agar leche

En la Figura 10 se observan los resultados del *screening* de la actividad proteolítica en placas de agar-leche llevado a cabo con cuatro concentraciones diferentes de veneno. En la Tabla 1 se muestran los halos de proteólisis medidos para cada concentración ensayada.

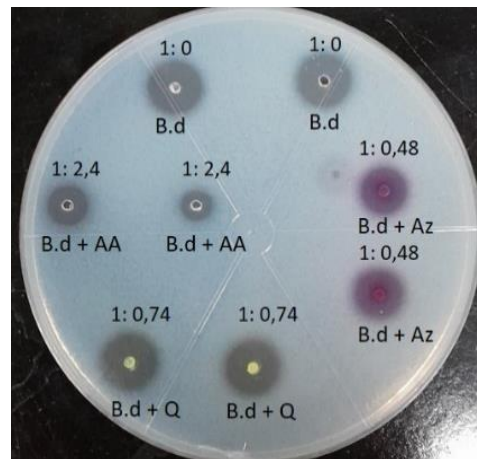


**Figura 10.** Actividad proteolítica en placas agar leche en función de la concentración del veneno de *B. diporus*.

**Tabla 1.** Medición de halos (mm) de la actividad proteolítica en placa agar leche función de la concentración del veneno de *B. diporus*.

| Halos (mm)            |           |           |
|-----------------------|-----------|-----------|
| Concentración (mg/ml) | Pocillo 1 | Pocillo 2 |
| 30                    | 16        | 16        |
| 23                    | 15        | 15        |
| 10                    | 13        | 13        |
| 5                     | 9         | 9         |

Se seleccionó la concentración de veneno de 30 mg/mL y se realizó un *screening* utilizando con las MOs en estudio (Fig. 11; Tabla 2). Se observó que la mezcla veneno: Q en la proporción ensayada, 1:0,74 (m:m) mostró un precipitado, por lo que se decidió continuar con concentraciones más bajas.

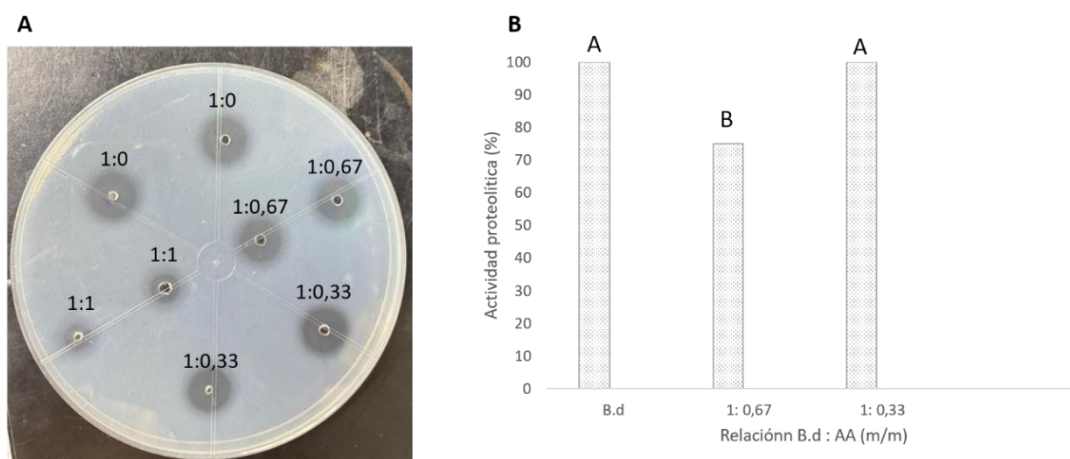


**Figura 11.** Screening de la actividad proteolítica en placas agar leche con diferentes relaciones veneno: molécula orgánica.

**Tabla 2.** Screening de la actividad proteolítica en placa agar leche de diferentes relaciones veneno: molécula orgánica.

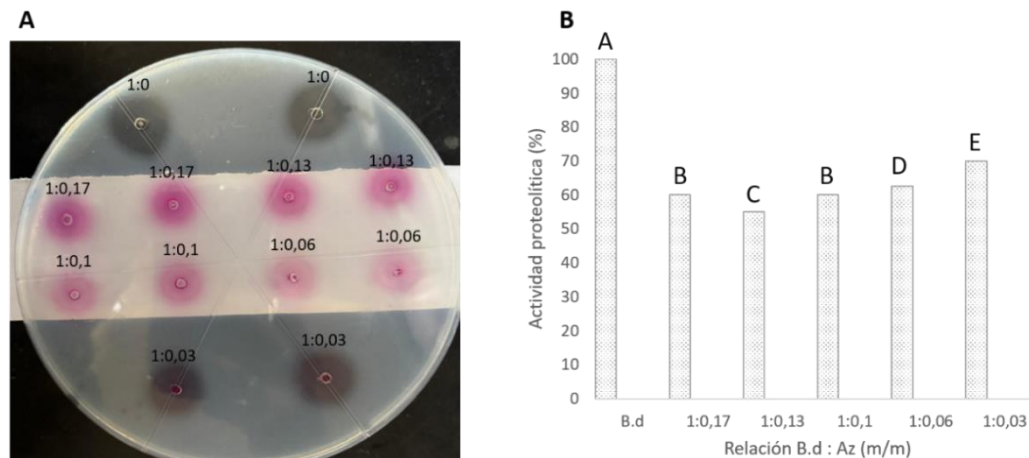
| Halos (mm)           |           |           |
|----------------------|-----------|-----------|
| Bd:molécula orgánica | Pocillo 1 | Pocillo 2 |
| Bd control           | 16        | 16        |
| B.d:AA (1:2,4)       | 12        | 10        |
| B.d + Q (1:0,74)     | 15        | 15        |
| B.d + Az (1:0,48)    | 13        | 13        |

Los resultados de la actividad proteolítica en placas de agar leche para el veneno veneno pre-incubado con AA se muestran el Figura 12. Se observó que la mayor relación ensayada de veneno: AA (1:0,67, m:m) inhibió el halo de proteólisis respecto al control en un 25%, sin que se afecte el pH de la reacción.



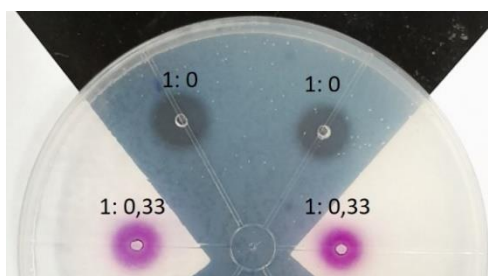
**Figura 12.** Potencial inhibitorio de AA contra la actividad proteolítica del veneno de *B. diporus* en placas con agar-leche como sustrato. **A.** Actividad proteolítica medida en mm (halos; relación Bd:AA; m:m). **B.** Actividad proteolítica (%) en función de la relación Bd:AA (m:m). No se consideró la relación 1:1 en el gráfico de barras ya el pH de la mezcla disminuyó. Letras distintas (A-B) indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En la placa donde se enfrentó el veneno a Az (Fig. 13) se observó que la mayor relación ensayada veneno: Az (1:0,17; m:m) inhibió el halo de proteólisis respecto al control del veneno sin inhibidor, en un 40%.



**Figura 13.** Potencial inhibitorio de Az contra la actividad proteolítica del veneno de *B. diporus* en placas con agar-leche como sustrato. **A.** Actividad proteolítica medida en mm (halos; relación Bd:Az; m:m). **B.** Actividad proteolítica (%) en función de la relación Bd:Az (m:m). Letras distintas (A-E) indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Se realizó en otra placa con el mismo control de veneno, usando una relación mayor de veneno: Az (1:0,33; m:m) de manera de poder calcular la  $CI_{50}$  para esta molécula (Fig. 14). La  $CI_{50}$  para Az fue calculada a partir de los datos de las placas de las figuras 13 y 14 (Tabla 3).

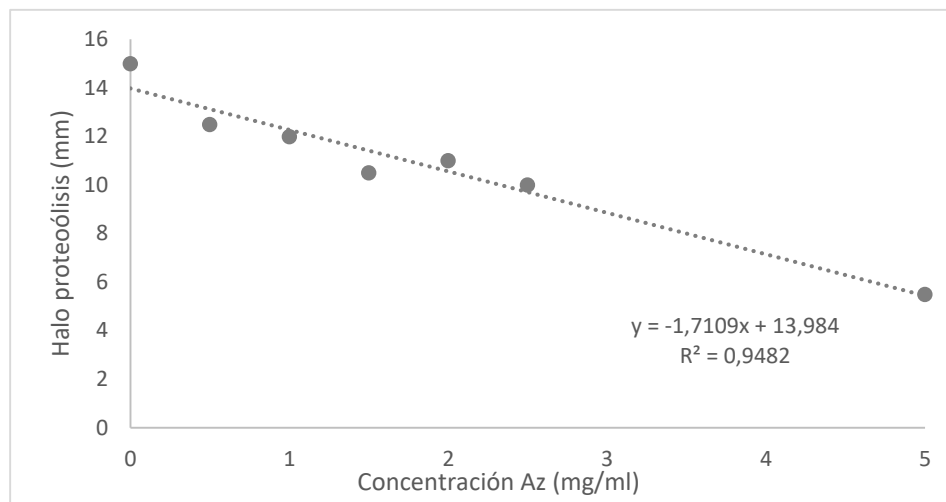


**Figura 14.** Potencial inhibitorio de Az contra la actividad proteolítica del veneno de *B. diporus* en placas con agar-leche como sustrato. Actividad proteolítica medida en mm (halos; relación Bd: Az; m: m)

**Tabla 3.** Análisis de la actividad proteolítica en placa agar leche de diferentes relaciones veneno: molécula orgánica. Medición de halos (mm) junto con sus correspondientes promedios y concentración de Az.

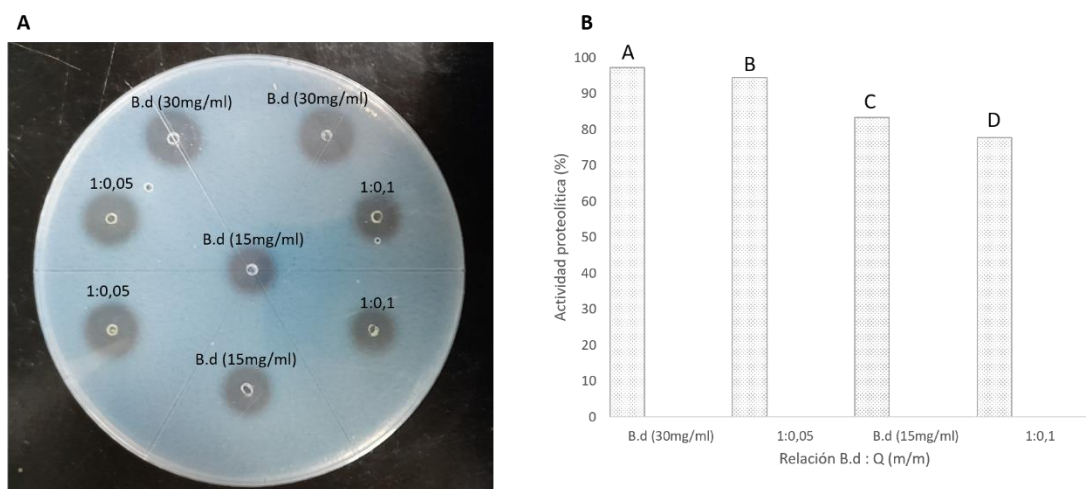
| Halos (mm)   |           |           |          |                          |
|--------------|-----------|-----------|----------|--------------------------|
| Muestras     | Pocillo 1 | Pocillo 1 | Promedio | Concentración Az (mg/ml) |
| Bd control   | 15        | 15        | 15       | 0                        |
| Bd + 1mg/ml  | 12        | 13        | 12,5     | 0,5                      |
| Bd + 2mg/ml  | 12        | 12        | 12       | 1                        |
| Bd + 3mg/ml  | 11        | 10        | 10,5     | 1,5                      |
| Bd + 4mg/ml  | -         | 11        | 11       | 2                        |
| Bd + 5mg/ml  | 10        | 10        | 10       | 2,5                      |
| Bd + 10mg/ml | 6         | 5         | 5,5      | 5                        |

En la Figura 15 se muestra la curva de los halos de proteólisis en función de la concentración de Az, de la cual se obtuvo un valor de  $CI_{50}$  de 3,79 mg/ml (11,1 mM).



**Figura 15.** Relación entre la concentración de Az y la actividad proteolítica del *B. diporus* respecto del valor promedio de los halos (mm).

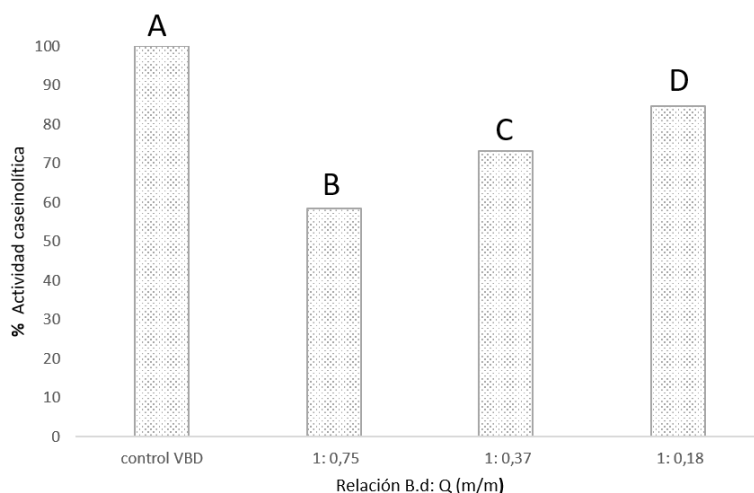
Finalmente, se enfrentó veneno a Q (Fig. 16) y se observó que la mayor relación ensayada veneno: Q (1:0,1; m:m) inhibió el halo de proteólisis respecto al control del veneno sin inhibidor (15 mg/ml), en un 5,6%.



**Figura 16.** Potencial inhibitorio de Q contra la actividad proteolítica del veneno de *B. diporus* en placas con agar-leche como sustrato. **A.** Actividad proteolítica medida en mm (halos; relación Bd:Q; m:m). **B.** Actividad proteolítica (%) en función de la relación Bd:Q (m:m). Letras distintas (A-D) indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5 Actividad azocaseinolítica

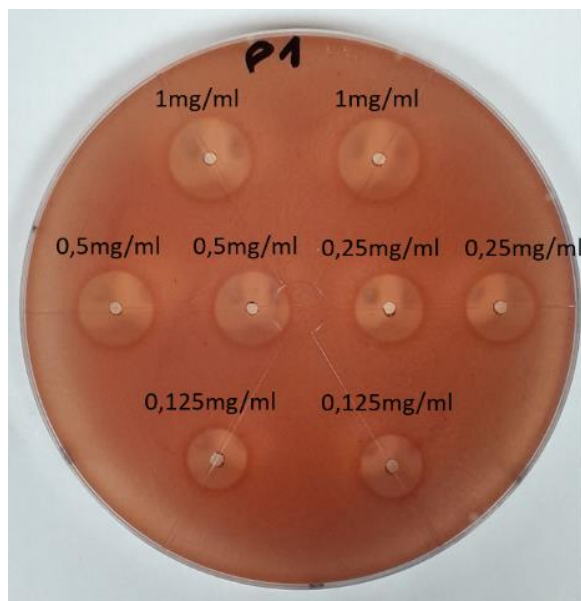
Se observó que la mayor concentración ensayada de veneno Q (1:0,75; m:m) a través de este método (más sensible) y, teniendo en cuenta su máxima solubilidad (6 mg/ml) en DMSO 20% (v:v) disuelto en tampón A, Q inhibió la actividad azocaseína del veneno en un 42% (Fig. 17).



**Figura 17.** Actividad azocaseinolítica (%) de *B.diporus* pre-incubado con Q en diferentes relaciones (m:m). Letras distintas (A-D) indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 4.6 Actividad hemolítica indirecta

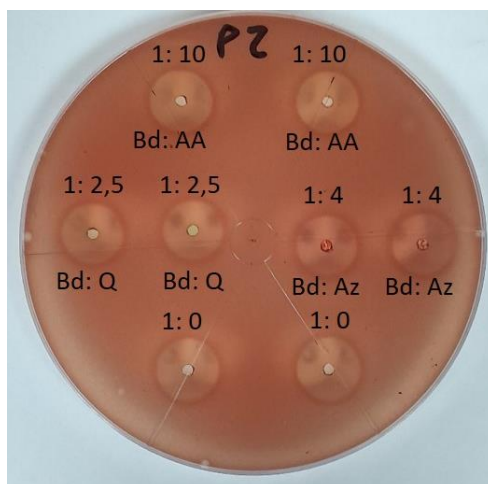
El diámetro de los halos de hemólisis en placa de agar-sangre, de las distintas concentraciones de veneno ensayadas como *screening*, previo a la incubación con las MOs, se muestra en la Figura 18 y en la Tabla 4. Con la concentración de veneno elegida (0,5 mg/ml) se ensayaron las relaciones veneno: MOs (m:m) más altas teniendo en cuenta la solubilidad de las mismas (1:10 para AA, 1:2,5 para Q y 1:4 para Az), y no se observó inhibición con ninguna de las relaciones testeadas (Fig. 19; Tabla 5).



**Figura 18.** Actividad hemolítica indirecta en placas de agar sangre en función de la concentración del veneno de *B. diporus*.

**Tabla 4.** Halos de hemólisis (mm) para diferentes concentraciones de veneno.

| Halos (mm)      |           |           |
|-----------------|-----------|-----------|
|                 | Pocillo 1 | Pocillo 2 |
| Bd (1mg/ml)     | 20        | 20        |
| Bd (0,5mg/ml)   | 19        | 18        |
| Bd (0,25mg/ml)  | 17        | 17        |
| Bd (0,125mg/ml) | 15        | 15        |



**Figura 19.** Actividad hemolítica indirecta en placas de agar sangre en función de la relación veneno de *B. diporus*: MO.

**Tabla 5.** Halos de hemólisis (mm) a partir de la concentración de veneno seleccionada (0,5 mg/ml) pre-incubado con las distintas MOs.

| Halos (mm)         |           |           |
|--------------------|-----------|-----------|
| Muestras           | Pocillo 1 | Pocillo 2 |
| Bd (0,5mg/ml)      | 19        | 19        |
| Bd (0,5mg/ml) + AA | 19        | 19        |
| Bd (0,5mg/ml) + Q  | 19        | 19        |
| Bd (0,5mg/ml) + Az | 19        | 19        |

## 5 DISCUSIÓN

En este trabajo final de graduación (TFG) nos propusimos evaluar la capacidad neutralizante de moléculas orgánicas de la actividad proteolítica *in vitro* inducida por el veneno de *B. diporus*, especie de importancia sanitaria en la región nordeste de Argentina. Se seleccionaron tres moléculas orgánicas pequeñas, la vitamina C (ácido L-ascórbico), un colorante rojo S de alizarina, y un flavonoide, la quercetina. Todas son moléculas de origen natural, aunque la forma hidrosoluble del colorante natural alizarina, es la sal sódica obtenida sintéticamente.

Tanto el rojo de alizarina S como el ácido L-ascórbico, son moléculas hidrosolubles que se disolvieron sin problemas en los tampones empleados para el desarrollo de este TFG. Sin embargo, la quercetina (una pentahidroxiflavona) es una aglicona (también conocida como genina), que representa la fracción no azucarada de glucósidos (*Clínica Universidad de Navarra*, 2024), insoluble en agua, y soluble en solventes orgánicos. Por esta razón se seleccionó el solvente dimetilsulfóxido (DMSO) en el que su solubilidad es mayor (aproximadamente 30 mg/ml). El DMSO es un líquido transparente e inodoro, producido a bajo costo como subproducto de la industria de la pulpa de madera. Sus propiedades químicas únicas le permiten una amplia gama de aplicaciones (ejemplo en problemas cutáneos). Penetra y se difunde fácilmente a través de las membranas biológicas y presenta un nivel de toxicidad relativamente bajo (Karim et al., 2023). En este trabajo se utilizó en proporción menor al 20% de DMSO disuelto en los tampones de trabajo (v/v) y se lograron obtener soluciones homogéneas de quercetina (en concentraciones finales no mayores a 6 mg/ml), sin que interfiriera en la actividad enzimática de las proteasas del veneno.

Se utilizaron métodos cualitativos (SDS-PAGE, zimografía) y cuantitativos (placas agar-leche, actividad azocaseinolítica) para ensayar la acción inhibitoria de la actividad proteolítica del veneno de *B. diporus* pre-incubado con las tres moléculas. Se eligieron cuatro métodos para tener diferentes opciones en cuanto a sensibilidad o interferencias debido a la coloración de las moléculas ensayadas.

El análisis electroforético evidenció que las tres moléculas ensayadas mostraron un efecto protector parcial frente a la degradación proteolítica de la caseína inducida por el veneno de *B. diporus*. Midiendo la intensidad de la banda  $\alpha$ 1-CN por densitometría, se pudo observar que tanto AA como Q mostraron un incremento de aproximadamente el doble en la intensidad de dicha banda frente a los respectivos controles de veneno (a las dosis más altas de veneno: molécula orgánica ensayadas). Sin embargo, la relación de veneno: AA utilizada fue 10 veces más alta a la de veneno: Q, mostrando un mayor poder inhibitor de Q respecto al AA.

Asimismo, los resultados correspondientes al análisis electroforético de la degradación de caseína muestran que a la relación más alta ensayada para veneno: Az (1:20), la intensidad de la banda  $\alpha$ 1-CN aumentó 26 veces respecto al control de veneno sin inhibidor. Este resultado muestra un efecto inhibitorio mayor de Az sobre la hidrólisis de caseína por el veneno entero, respecto a AA y Q. El ensayo de degradación de sustratos específicos (caseína, fibrinógeno, gelatina, colágeno) de las SVMPs por electroforesis SDS-PAGE, ha sido ampliamente utilizado para estudios de inhibición de la actividad proteolítica de venenos ofídicos (Yee et al., 2016; Saravia Otten et al., 2021).

Por otro lado, los ensayos realizados por el método cuantitativo en placas de agar leche permitieron expresar en valores numéricos la reducción del halo de proteólisis por los diferentes inhibidores, respecto del veneno

control. Nuevamente la mayor inhibición observada, fue con Az que redujo en un 63% el halo de proteólisis del veneno, a la mayor relación veneno:Az ensayada (1:0,33). Esto permitió que se pudiera calcular la  $CI_{50}$ , dando un valor tres veces mayor ( $CI_{50}= 11,1$  mM) al reportado por Echeverría et al. 2025, para inhibir la actividad proteolítica del veneno de *B. alternatus* pre-incubado con Az ( $CI_{50}= 3,6$  mM), utilizando el mismo método de placas agar-leche. El mayor valor de  $CI_{50}$  (mayor concentración para inhibir el 50% de la actividad) obtenido en este TFG para el veneno de *B. diporus*, probablemente se deba a que Az se une mejor al sitio catalítico de las SVMPs de la clase PIII que al de la clase PI. Las SVMPs PIII constituyen la principal familia del veneno de *B. alternatus*, representando el 43,1% de sus componentes (Ölher et al., 2010). Sin embargo, el veneno de *B. diporus* contiene SVMPs de la clase PIII y de la clase PI, constituyendo un 19,5 y 14,7% de sus componentes, respectivamente (Gay et al., 2015). Echeverría et al. (2025), a través de estudios *in silico*, reportaron que Az se une a través de numerosos enlaces a residuos clave y al ion  $Zn^{2+}$  involucrado en el sitio catalítico de las SVMPs PIII. Si bien ambas clases de SVMPs comparten el dominio catalítico, los dominios adicionales presentes en las PIII (tipo desintegrina y rico en cisteínas) influyen en la conformación final de estas proteasas y en su unión a moléculas.

El método de difusión en agar resultó poco sensible (se necesitaron altas concentraciones del veneno para obtener un óptimo halo de proteólisis), para evaluar las capacidades de AA o Q, limitando las relaciones de veneno: molécula a ensayar, sin comprometer el pH de la mezcla (AA) o la solubilidad de las moléculas (Q). AA y Q inhibieron en un 25% y 5,6% la actividad proteolítica del veneno a las mayores relaciones veneno: inhibidor ensayadas, respectivamente. Oliveira et al. (2016) pudieron demostrar que el AA (relación veneno: AA 1:10) fue capaz de inhibir el 100% de la actividad proteolítica del veneno de otra especie de importancia sanitaria en el país como *B. alternatus* (yarárá grande o víbora de la cruz), utilizando placas con medio sólido conteniendo azocaseína como sustrato en vez de leche descremada.

Las diferencias observadas en cuanto a sensibilidad del método, proteasas o sustratos/inhibidores usados, pueden atribuirse a la naturaleza difusiva del sistema en el medio agar/sustrato, donde el contacto entre el veneno y el inhibidor depende del gradiente de difusión y del tiempo de exposición, lo que limita la formación completa del complejo enzima-inhibidor. Algunos estudios que emplean sustratos sintéticos han demostrado que la incorporación de DMSO como solvente puede introducir ciertas restricciones experimentales asociadas a la solubilidad (Zia, 2012; Bastos et al., 2016), lo que explicaría las limitaciones de este método para evaluar a quercetina.

Sin embargo, los métodos de difusión radial en agar han sido utilizados previamente para demostrar el efecto inhibitor de otros sistemas proteasas/sustratos. Se utilizó este método para demostrar un claro efecto inhibitor de *soybean trypsin inhibitor* frente a tripsina (Shukle R. H., Murdock L. L., 1983). En ese caso, los autores demostraron que los ensayos de difusión radial en agar presentan ventajas sobre aquellos que implican la separación electroforética, los cuales requieren cantidades mayores del inhibidor para que el efecto sea visible (bandas de degradación en SDS-PAGE), y en otros, como la zimografía, donde la actividad enzimática debe resistir condiciones de separación, efecto del detergente SDS o alto voltaje.

Con el fin de evaluar cuantitativamente la actividad proteolítica del veneno de *B. diporus* frente a Q y ensayar mayores relaciones de veneno:inhibidor, se utilizó el ensayo de actividad azocaseinolítica (medio líquido). La

mayor sensibilidad de este método, que cuantifica espectrofotométricamente la liberación de fragmentos azo-peptídicos solubles, (productos de la degradación proteolítica por las SVMPs del veneno), permitió demostrar que Q produjo una reducción significativa (42%) de la actividad proteolítica del veneno. Se ha descrito la capacidad de diferentes grupos de flavonoides para inhibir la actividad hemorrágica de venenos de serpiente o de sus SVMPs purificadas de los mismos, entre ellos isoquercitrina, y la quercetina-3-O-ramnósido aisladas de diferentes especies vegetales (Vale et al., 2011; Gómez-Betancur et al., 2014, Gopi et al., 2016). Se reportó, además, que otro flavonoide como la miricetina, fue capaz de inhibir la actividad proteolítica y hemorrágica del veneno de *B. atrox* (Preciado et al., 2018).

Este método, sin embargo, no pudo ser usado para evaluar la capacidad proteolítica de AA y Az por interferencias metodológicas. La baja fiabilidad observada para el AA podría deberse a su capacidad reductora, que interfiere en ensayos colorimétricos basados en la detección de compuestos azo. Se ha descrito que el ascorbato puede revertir el color de los indicadores al reducir sus formas oxidadas (White-Stevens, 1982) lo cual podría explicar la pérdida de linealidad o la subestimación de la actividad proteolítica observada. Por su parte, la Az, con una estructura conjugada altamente cromófora (Springsteen & Wang, 2001), absorbe en un rango espectral lo suficientemente amplio (430-527nm dependiendo de las fluctuaciones del pH) (Jeliński et al., 2013) como para generar un solapamiento con la absorbancia de los fragmentos azo liberados durante la hidrólisis de la azocaseína. Esta interferencia espectral dificulta distinguir el color derivado de la actividad proteolítica del color intrínseco del inhibidor, afectando así la linealidad de las mediciones. En cambio, la Q, compuesto fenólico que presenta una absorción máxima desplazada hacia el rango de 370–380 nm, permite una lectura más estable y representativa de la actividad proteolítica real al no generar una interferencia con los picos de lectura generados por los grupos azo ( $\approx 450\text{nm}$ ), pudiendo utilizar sin inconvenientes esta técnica.

En relación con la actividad hemolítica indirecta inducida por el veneno de *B. diporus*, no se observó inhibición por ninguna de las tres moléculas, en las condiciones ensayadas. Otros autores, sin embargo, reportaron inhibición de actividades inducidas por las PLA<sub>2</sub>s presentes en otros venenos. Un estudio evaluó los efectos de Q sobre una PLA<sub>2</sub> de *Crotalus durissus terrificus* (Cotrim et al., 2011). La Q inhibió la actividad enzimática y algunas actividades farmacológicas de esta PLA<sub>2</sub>, incluyendo su actividad antibacteriana, su capacidad para inducir la agregación plaquetaria y su miotoxicidad 40%, pero no logró reducir las actividades inflamatorias y neurotóxicas. Por otro lado, De Moura et al. (2016), reportaron una reducción del 30 % de la actividad fosfolipásica del veneno *B. alternatus* en proporciones de veneno:AA superiores a 1:15. Estas diferencias podrían atribuirse a una variabilidad interespecífica en la composición y tipo de isoformas de PLA<sub>2</sub> presentes en cada veneno, ya que la familia de estas enzimas incluye múltiples grupos con diferencias estructurales y funcionales que pueden influir en la afinidad del inhibidor por el sitio activo (Barrera-Luna & Cazar, 2023).

## 6 CONCLUSIONES

- En el presente trabajo se demostró la inhibición parcial de la actividad proteolítica *in vitro* inducida por el veneno de *B. diporus* mediante el empleo de tres moléculas orgánicas pequeñas: dos compuestos hidrosolubles (AA y un derivado sintético del colorante natural rojo de alizarina S) y un flavonoide soluble en solventes orgánicos (Q).
- Se determinó que el dimetilsulfóxido (DMSO) constituye un solvente adecuado para los ensayos con Q, estableciéndose la proporción solvente/tampón óptimo para mantener la solubilidad del compuesto en las condiciones experimentales ensayadas. Dadas sus propiedades químicas y su baja toxicidad, el DMSO podría considerarse en futuros estudios *in vivo*.
- Se aplicaron exitosamente cuatro metodologías complementarias para la determinación de la actividad proteolítica en presencia y ausencia de las moléculas ensayadas, lo que permitió disponer de alternativas metodológicas ante posibles interferencias asociadas a la solubilidad, el color o el pH de las mezclas veneno/inhibidor. Se utilizó un método cualitativo, la electroforesis SDS-PAGE, que permitió evaluar por densitometría la degradación de la caseína, sustrato de referencia de las SVMPs, y fue más sensible que la zimografía. Además, se implementaron dos métodos cuantitativos: la difusión radial en placas de agar-leche (medio sólido) y la actividad azocaseinolítica (medio líquido).
- El análisis electroforético evidenció que las tres moléculas ensayadas ejercieron un efecto protector parcial frente a la degradación proteolítica de la caseína inducida por el veneno, siendo Az la más efectiva, seguida de Q y AA. Asimismo, el método de difusión en agar-leche confirmó que Az produjo la mayor reducción del halo de proteólisis, permitiendo calcular una  $CI_{50}$  de 11,1 mM, valor aproximadamente tres veces superior al previamente reportado para la inhibición del veneno de *B. alternatus* ( $CI_{50} = 3,6$  mM).
- Por su parte, la actividad azocaseinolítica, permitió demostrar que Q produjo una disminución significativa (42 %) de la actividad proteolítica del veneno a la mayor relación veneno:inhibidor evaluada, sin comprometer su solubilidad. Sin embargo, este método no resultó adecuado para Az y AA debido a interferencias metodológicas, tales como la reducción de compuestos azo y la interferencia espectral por coloración, respectivamente.
- El estudio de compuestos naturales (o sintéticos) como potenciales inhibidores de las SVMPs, abre un nuevo abanico de posibilidades para explorar alternativas para el tratamiento complementario de los accidentes ofídicos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Albulescu, L.-O., Hale, M. S., Ainsworth, S., Alsolaiss, J., Crittenden, E., Calvete, J. J., Evans, C., Wilkinson, M. C., Harrison, R. A., and Kool, J. (2020). Preclinical validation of a repurposed metal chelator as an early-intervention therapeutic for hemotoxic snakebite. *Science translational medicine* 12. <<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay8314>>.
- Barrera L., & Cazar, M.-E. (2023). Inhibición de enzimas fosfolipasas A2 de venenos totales de serpientes como estrategia en la búsqueda de nuevos fármacos. *REVISTA CON-CIENCIA*, 11(1), 45–61.
- Bastos, V., Gomes-Neto, F., Perales, J., Neves-Ferreira, A., & Valente, R. (2016). Natural Inhibitors of Snake Venom Metalloendopeptidases: History and Current Challenges. *Toxins*, 8(9), 250–250. <<https://doi.org/10.3390/toxins8090250>>.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of protein-dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254. <[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)>.
- Bryan-Quirós, W., Fernández J., Gutiérrez J. M, Lewin, M. R., & Lomonte, B. (2019). Neutralizing properties of LY315920 toward snake venom group I and II myotoxic phospholipases A2. *Toxicon*, 157, 1–7. <<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.11.292>>.
- Carrasco P., C. Mattoni, G. C. Leynaud y G. J. Scrocchi. (2012). Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). *Zoologica Scripta*: 1–16. <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-6409.2011.00511.x>>.
- Casewell, N. R., Jackson, T. N. W., Laustsen, A. H., & Kartik Sunagar. (2020). Causes and Consequences of Snake Venom Variation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 41(8), 570–581. <<https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.05.006>>.
- Clínica Universidad de Navarra. (2024). *Aglicona: qué es y definición médica*. Diccionario médico. <<https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/aglicona>>. [Acceso: Octubre 2025]
- Cotrim, C. A., de Oliveira, S. C. B., Diz Filho, E. B. S., Fonseca, F. V., Baldissera, L., Antunes, E., Ximenes, R. M., Monteiro, H. S. A., Rabello, M. M., Hernandez, M. Z., de Oliveira Toyama, D., & Toyama, M. H. (2011). Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A2. *Chemico-Biological Interactions*, 189(1-2), 9–16. <<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.10.016>>.
- De Moura O. C. H. (2016). Inhibitory effects of ascorbic acid, vitamin E, and vitamin B-complex on the biological activities induced by Bothrops venom. *Pharmaceutical Biology*. <<https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1087038>>.
- Dias da Silva, W., De Andrade, S. A., Megale, Â. A. A., De Souza, D. A., Sant'Anna, O. A., Magnoli, F. C., Guidolin, F. R., Godoi, K. S., Saladini, L. Y., Spencer, P. J., & Portaro, F. C. V. (2022). Antibodies as Snakebite Antivenoms: Past and Future. *Toxins*, 14(9), 606. <<https://doi.org/10.3390/toxins14090606>>
- Echeverría, S. M., Blanco, G. C., Gauna P., M. C., Maruñak, S. L., Ferreras, J.M. y Gay, C. C. (2025). Inhibition of proteolytic activity of Bothrops alternatus venom by two small molecules and docking analysis against a snake venom metalloproteinase. *Biochimie*. <<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2025.08.009>>

- Fox, J. W y Serrano, M. (2008). Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS J.* 275 (12) 3016–3030. <<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06466.x>>.
- Gay, C. C., Leiva, L. C., Marunak, S., Teibler, P., and Acosta de Perez, O. (2005). Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. *Toxicon* 46, 546-54. <<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.06.019>>.
- Gay, C., Sanz, L., Calvete, J. J., & Pla, D. (2015). Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops diporus*, a medically important pitviper in northeastern Argentina. *Toxins*, 8(1), 9. <<https://doi.org/10.3390/toxins8010009>>.
- Gómez-Betancur, I., Benjumea, D., Patiño, A., Jiménez, N., & Osorio, E. (2014). Inhibition of the toxic effects of *Bothrops asper* venom by pinostrobin, a flavanone isolated from *Renealmia alpinia* (Rottb.) MAAS. *Journal of Ethnopharmacology*, 155(3), 1609–1615. <<https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.08.002>>.
- Gopi, K., Anbarasu, K., Renu, K., Jayanthi, S., Vishwanath, B. S., & Jayaraman, G. (2016). Quercetin-3-O-rhamnoside from *Euphorbia hirta* protects against snake Venom induced toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1860(7), 1528–1540. <<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.03.031>>.
- Gutiérrez, J. M., Avila, C., Rojas, E., & Cerdas, L. (1988). An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*, 26, 411-413. <[https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90010-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90010-4)>.
- Gutiérrez, J., Escalante, T., Rucavado, A., Herrera, C., and Fox, J. (2016). A comprehensive view of the structural and functional alterations of extracellular matrix by snake venom metalloproteinases (SVMPs): novel perspectives on the pathophysiology of envenoming. *Toxins* 8, 304. <<https://doi.org/10.3390/toxins8100304>>.
- Humbare, R. B., Sarkar, J., Kulkarni, A. A., Juwale, M. G., Deshmukh, S. H., Dinesh A., Manohar C., Albertini, M. C., Marco, Kamble, S. C., & Ramakrishna, S. (2022). Phytochemical Characterization, Antioxidant and Anti-Proliferative Properties of *Rubia cordifolia* L. Extracts Prepared with Improved Extraction Conditions. *Antioxidants*, 11(5), 1006–1006. <<https://doi.org/10.3390/antiox11051006>>.
- ITIS - Report: *Bothrops diporus*. (2017). Itis.gov. <[https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=1058499#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=1058499#null)>.  
[Acceso: Octubre 2025]
- Jeliński, T., Cysewski, P., & Makarewicz, E. (2013). Application of alizarin colorimetric measurements for quantification of amine extraction by model food simulants from epoxy polymer. *SpringerPlus*, 2(1). <<https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-593>>.
- Kardong, K.V., (1983). The evolution of the venom apparatus in snakes from colubrids to viperids and elapids. *Memórias do Instituto Butantan* 46, 105-118.

- Karim, M., Boikess, R. S., Schwartz, R. A., & Cohen, P. J. (2023). Dimethyl sulfoxide (DMSO): a solvent that may solve selected cutaneous clinical challenges. *Archives of dermatological research*, 315(6), 1465-1472. <<https://doi.org/10.1007/s00403-022-02494-1>>.
- Knudsen, C., Ledsgaard, L., Dehli, R. I., Ahmadi, S., Sørensen, C. V., and Laustsen, A. H. (2019). Engineering and design considerations for next-generation snakebite antivenoms. *Toxicon* 167, 67-75. <<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.06.005>>.
- Macías Villamizar, V. E., Cuca Suárez, L. E. y Coy Barrera, E. D. (2015). Genus Nectandra: "Phytochemistry and Biological Activity". *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 14 (4): 317 – 342. <<https://www.redalyc.org/pdf/856/85641104007.pdf>>. [Acceso: Noviembre 2025]
- Marcussi, S., Bernardes, C. P., Santos-Filho, N. A., Mazzi, M. V., Oliveira, C. Z., Izidoro, L. F. M., Fuly, A. L., Magro, A. J., Braz, A. S. K., Fontes, M. R. M., Giglio, J. R., & Soares, A. M. (2007). Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom with antiplatelet activity. *Peptides*, 28(12), 2328–2339. <<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.10.010>>.
- Maruñak, S., Nuñez, S., Fernandez, C., Leiva, L., & Acosta de Pérez, O. (2010). Acción del veneno de *Bothrops diporus* (yará chica) del nordeste argentino sobre la hemostasia en diferentes mamíferos. *Revista Veterinaria*, 21(1), 43. <<https://doi.org/10.30972/vet.2111849>>.
- Mastrangelo, D., Pelosi, E., Castelli, G., Lo-Coco, F., & Testa, U. (2018). Mechanisms of anti-cancer effects of ascorbate: Cytotoxic activity and epigenetic modulation. *Blood Cells Molecules and Diseases*, 69, 57–64. <<https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2017.09.005>>.
- Ministerio de Salud de la República Argentina, Dirección de Epidemiología. (2025). *Boletín Epidemiológico Nacional* N° 760, SE 23. <[https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2025/01/ben\\_760\\_se\\_23\\_19625.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2025/01/ben_760_se_23_19625.pdf)>. [Acceso: Octubre 2025]
- Moore, K., & Jackson, K. (2010). A quantitative analysis of two scale characters in snakes. *Amphibia-Reptilia*, 31(2), 175–182. <<https://doi.org/10.1163/156853810791069010>>
- Ölher, M., Georgieva, D., Seifert, J., von Bergen, M., Arni, R.K., Genov, N., Betzel, C. (2010). The venomics of *Bothrops alternatus* is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities. *Journal of Proteome Research* 9, 2422-2437. <<https://doi.org/10.1021/pr901128x>>.
- Oliveira, C. H. D. M., Assaid Simão, A., & Marcussi, S. (2016). Inhibitory effects of ascorbic acid, vitamin E, and vitamin B-complex on the biological activities induced by *Bothrops* venom. *Pharmaceutical biology*, 54(5), 845-852. <<https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1087038>>.
- Preciado, L. M., Comer, J., Núñez, V., Rey-Suárez, P., & Pereañez, J. A. (2018). Inhibition of a snake venom metalloproteinase by the flavonoid myricetin. *Molecules*, 23(10), 2662. <<https://doi.org/10.3390/molecules23102662>>.
- Ribeiro, L. A. and Tanús, J. M. (1997). Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 30: 475-480 <<https://doi.org/10.1590/S0037-86821997000600006>>.

- Saldarriaga, M. M., Otero, R., Núñez, V., Toro, M. F., Díaz, A., & Gutiérrez, J. M. (2003). Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon*, 42(4), 405– 411. <[https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(03\)00171-5](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(03)00171-5)>.
- Salehi, B., Machin, L., Monzote, L., Sharifi-Rad, J., Ezzat, S. M., Salem, M. A., Merghany, R. M., El Mahdy, N. M., Kılıç, C. S., Sytar, O., Sharifi-Rad, M., Sharopov, F., Martins, N., Martorell, M., & Cho, W. C. (2020). Therapeutic Potential of Quercetin: New Insights and Perspectives for Human Health. *ACS Omega*, 5(20), 11849–11872. <<https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01818>>.
- Saravia-Otten, P., Hernández, R., Marroquín, N., García, G., Nave, F., Rochac, L., Genovez, V., Mérida, M., Cruz, S. M., Cáceres, A., & Gutiérrez, J. M. (2021). Inhibición de las actividades proteolítica y fosfolipasa A<sub>2</sub> del veneno de *Bothrops asper* por el extracto etanólico de *Neurolaena lobata* (L.) Cass. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 8(1), 1–14. <<https://doi.org/10.36829/63CTS.v8i1.865>>
- Scrocchi, G.J., Moreta, J.C., Kretzschmar, S. (2006). Serpientes del Noroeste Argentino. San Miguel de Tucumán, Argentina.
- Shen, J., Griffiths, P. T., Campbell, S. J., Utinger, B., Kalberer, M., & Paulson, S. E. (2021). Ascorbate oxidation by iron, copper and reactive oxygen species: review, model development, and derivation of key rate constants. *Scientific Reports*, 11(1). <[https://www.nature.com/articles/s41598-021-86477-8?utm\\_source=chatgpt.com](https://www.nature.com/articles/s41598-021-86477-8?utm_source=chatgpt.com)>. [Acceso: Octubre 2025]
- Shukle R. H., Murdock L. L. (1983). Determination of Plant Proteinase Inhibitors by Agar Gel Ray Diffusion Assay. *Environ. Entomol.* 12: 255-259 (1983) <<https://doi.org/10.1093/ee/12.1.255>>.
- Springsteen, G., & Wang, B. (2001). Alizarin Red S. as a general optical reporter for studying the binding of boronic acids with carbohydrates. *Chemical Communications*, 17, 1608–1609. <<https://doi.org/10.1039/b104895n>>.
- Stazonelli J. C., Cabrera P. y Scrocchi G. J. (2018). *Bothrops diporus*. Yará, yará chica. *Universo Tucumano*, 6, p. 9. <<https://www.lillo.org.ar/revis/universo-tucumano/2018/2018-ut-v06.pdf>>. [Acceso: Octubre 2025]
- Torres A. M., Ojeda G. A., Angelina E., Bustillo S., Peruchena N., Tonidandel L., Larcher R., Nardin T., Dellacassa E. (2023). The anti-snake activity of *Nectandra angustifolia* flavonoids on phospholipase A<sub>2</sub>: In vitro and in silico evaluation. *Journal of Ethnopharmacology*, 302, 115889. <<https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115889>>.
- Vale, H.F.; Mendes, M.M.; Fernandes, S.R.; Costa, R.T.; Hage-Melim, I.L.; Sousa, A.M.; Hamaguchi, A.; Homs-Brandeburgo, I.M.; Franca, C.S.; HTP Silva, C., Pereira, S. P., Soares, A. & Rodrigues, M. V. (2011). Protective effect of *Schizolobium parahyba* flavonoids against snake venoms and isolated toxins. *Curr. Top. Med. Chem.* 2011, 11, 2566–2577. <<https://doi.org/10.2174/156802611797633438>>.
- Van de Velde A. C., Leiva L. C. y Gay C. C. (2017). Rol de las metaloproteinasas hemorrágicas en las alteraciones hemostáticas inducidas por el veneno de *Bothrops alternatus*. [Tesis doctoral. Universidad Nacional del Nordeste] Corrientes, Argentina. 133 p. <[https://repositorio.unne.edu.ar/bitstream/handle/123456789/1475/RIUNNE\\_TD\\_VandeVelde\\_AC.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unne.edu.ar/bitstream/handle/123456789/1475/RIUNNE_TD_VandeVelde_AC.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>. [Acceso: Octubre 2025]

- Vlachodimitropoulou, E., Sharp, P. A., & Naftalin, R. J. (2011). Quercetin–iron chelates are transported via glucose transporters. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(8), 934–944. <<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.005>>.
- Wang, W. J., and Huang, T. F. (2002). Purification and characterization of a novel metalloproteinase, acurhagin, from Agkistrodon acutus venom. *Thromb Haemost* 87, 641-50. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12008947/>>. [Acceso: Octubre 2025]
- Wen, M., Chen, Q., Chen, W., Yang, J., Zhou, X., Zhang, C., Wu, A., Lai, J., Chen, J., Mei, Q., Yang, S., Lan, C., Wu, J., Huang, F., & Wang, L. (2022). A comprehensive review of *Rubia cordifolia* L.: Traditional uses, phytochemistry, pharmacological activities, and clinical applications. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.965390>>.
- White-Stevens, R. H. (1982). Interference by ascorbic acid in test systems involving peroxidase. I. Reversible indicators and the effects of copper, iron, and mercury. *Clinical Chemistry*, 28(4), 578–588. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7074824/>>. [Acceso: Octubre 2025]
- Yee, K. T., Pitts, M., Tongyoo, P., Rojnuckarin, P., & Wilkinson, M. C. (2016). Snake venom metalloproteinases and their peptide inhibitors from Myanmar Russell's viper venom. *Toxins*, 9(1), 15. <<https://doi.org/10.3390/toxins9010015>>.
- Zhang, Z., Hu, W., Yu, A., Kuang, H., & Wang, M. (2024). Hemostatic bioactivity and mechanism of *Rubia cordifolia* L.-derived Carbon dots. *Nanoscale Advances*. <<https://doi.org/10.1039/D4NA00619D>>.
- Zia, A. (2012). *Identification and Kinetic Characterization of Inhibitory Compounds Targeting O-Acetylpeptidoglycan Esterase 1 from Neisseria gonorrhoeae*. [Tesis de Máster, University of Guelph] <<https://atrium.lib.uoguelph.ca/server/api/core/bitstreams/4fde89bf-9e14-4734-9ec1-dc52e8e8f7c0/content>>. [Acceso: Octubre 2025]