



***DISEÑO DE UN PÉPTIDO SINTÉTICO COMO ALTERNATIVA INMUNO
PROFILÁCTICA A LA TOXINA DE TRES DEDOS (3FTx) DE LAS SERPIENTES DEL
GÉNERO MICRURUS EN COLOMBIA. UNA APROXIMACIÓN BIOINFORMÁTICA***

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C OCTUBRE DE 2024**



***DISEÑO DE UN PÉPTIDO SINTÉTICO COMO ALTERNATIVA INMUNO
PROFILÁCTICA A LA TOXINA DE TRES DEDOS (3FTx) DE LAS SERPIENTES DEL
GÉNERO MICRURUS EN COLOMBIA. UNA APROXIMACIÓN BIOINFORMÁTICA***

Juana Valentina Riaño Morales

Luisa Fernanda Romero Ovalle

ASESORES

Diana Marcela Parra Muñoz Muñoz, PhD(c)

Asesora interna

Andrés Camilo González Gómez, Msc.

Asesor externo

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA FACULTAD DE
CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C OCTUBRE DE 2024**



***DISEÑO DE UN PÉPTIDO SINTÉTICO COMO ALTERNATIVA INMUNO
PROFILÁCTICA A LA TOXINA DE TRES DEDOS (3FTx) DE LAS SERPIENTES DEL
GÉNERO MICRURUS EN COLOMBIA. UNA APROXIMACIÓN BIOINFORMÁTICA***

APROBADA _____

JURADOS _____

ASESORES:

Diana Marcela Parra Muñoz, PhD(c)

Andrés Camilo González Gómez, Msc.

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA FACULTAD DE
CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C OCTUBRE DE 2024**

DEDICATORIA

A Dios, por guiar nuestro camino en la ciencia y ser refugio en los momentos de angustia, por su infinita sabiduría y fortaleza, que nos han sostenido siempre, concediéndonos bendiciones a través del esfuerzo, el conocimiento y la perseverancia. Porque en su gracia encontramos la victoria.

A nuestros padres, esta tesis es un sincero tributo a su legado y a la profunda admiración que sentimos por ustedes. Les agradecemos de todo corazón por su sacrificio y apoyo incondicional en cada paso de nuestras vidas. Sus consejos y alientos han sido invaluable, guiándonos siempre a ser mejores. Que nuestros éxitos académicos reflejen en cada logro, su amor y dedicación.

Para Ana María, Natalia y Sebastián, son lo mejor que la vida nos ha dado, quienes con su apoyo incondicional siempre nos motivan a seguir adelante. Gracias por su paciencia en nuestros momentos de crisis y, sobre todo, por compartir su amor y risas con nosotras. Su apoyo y presencia en este momento tan importante de nuestras vidas, significa el mundo para ambas.

AGRADECIMIENTOS

A nuestra Alma mater la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, la pública que nos levantó, nos abrazó, nos llenó de sueños colectivos y nos cambió para siempre. A nuestros queridos profes Diana Marcela y Andrés Camilo, nuestro más sincero agradecimiento por su apoyo incondicional y motivación constante. Nos han inspirado a dar lo mejor de nosotras en cada paso del camino, no solo guiándonos académicamente, sino que también han creído en nuestro potencial en los momentos de mayor duda. Su dedicación y cercanía nos han permitido crecer no solo como profesionales, sino también como personas. Nos sentimos afortunadas de haber compartido este viaje con ustedes, sepan que siempre estarán en nuestros corazones.

A todas las personas que nos acompañaron a lo largo de este camino, incluidos aquellos que, aunque han tomado rumbos distintos, dejaron una huella importante en nuestras vidas. Cada palabra de aliento y cada gesto de cariño han sido un impulso invaluable en nuestra trayectoria. A todos ustedes, ¡gracias de corazón!

Finalmente, a nosotras, porque encontramos una en la otra una amistad sincera y un amor por la academia que nos ha fortalecido en cada paso del camino. Juntas hemos enfrentado desafíos, compartido sueños y celebrado logros, convirtiéndonos en un apoyo incondicional la una para la otra, sabemos que es tan solo el inicio ¡Lo mejor está por venir!

Tabla de contenido

RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
OBJETIVOS	11
1.ANTECEDENTES	12
2 MARCO REFERENCIAL	14
2.1 Generalidades del accidente ofídico.	14
2.2 Causas del accidente ofídico.	15
2.3 Manifestaciones clínicas del accidente ofídico.	16
2.3.1 Fisiopatología y sintomatología	16
2.3.2. Inmunología del accidente ofídico	17
2.4 Accidente micrúrico.	17
2.5 Tratamiento actual empleado.	18
2.6 Importancia en salud pública del accidente ofídico	19
2.7 Situación epidemiológica en Colombia.	20
2.8 Serpientes del género <i>Micrurus</i> en Colombia	22
2.8.1 Especies presentes en el territorio colombiano.	23
2.9 Composición del veneno en serpientes del género <i>Micrurus</i>	24
2.9.1 Neurotoxinas en el veneno de serpientes del género <i>Micrurus</i>	25
2.9.2 Alpha Toxinas	25
2.10 Mecanismos evolutivos	26
2.11 Situación de la producción de antivenenos anti-coral en Colombia	29
2.11.1 Limitaciones: eficacia parcial del suero antiofídico polivalente.	30
3. DISEÑO METODOLÓGICO	31
3.1 universo, población y muestra	31
3.2 hipótesis, variables, indicadores	31
3.2.1 Variables del estudio.	31
3.2.2 Hipótesis Nula	32
3.2.3 Hipótesis Alterna	32
3.2.4 Análisis Estadístico.	32
3.3. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS	32
3.3.1 Búsqueda de secuencias proteicas de <i>3FTx</i>	32
3.3.2 Generación de secuencias consenso de <i>3FTx</i>	33
3.3.3 Estimación de Determinantes Antigénicos en Células B	34
3.3.4 Predicción de epítopes respecto al complejo mayor de histocompatibilidad	34
3.3.5 Conservación e inmunogenicidad de los epítopes	35
3.3.6 Modelo 3D de los epítopes y obtención de modelos 3D de MHC-II	35

3.3.7 Análisis de propiedades alergénicas y fisicoquímicas de los epítopes	36
3.3.8 Análisis de cobertura poblacional	37
3.3.9 Análisis de acoplamiento molecular – Docking	37
4. RESULTADOS	38
4.1. secuencias proteicas de <i>3FTx</i>	38
4.2. secuencias proteicas consenso	41
4.3. Determinantes Antigénicos en Células B	41
4.4. Predicción de epítopes	43
4.5. Conservación e inmunogenicidad de los epítopes	46
4.6. Modelo 3D de los epítopes y MHC-II	47
4.7 Propiedades alergénicas y fisicoquímicas de los epítopes	48
4.8 Cobertura poblacional	51
4.9 Acoplamiento molecular – Docking	53
5. DISCUSIÓN	55
6. CONCLUSIONES	62
7. RECOMENDACIONES Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO	63
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
9. ANEXOS	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Percentiles de incidencia de accidente ofídico por entidad territorial, Colombia, primer semestre 2024	21
Figura 2: Incidencias (*100 000 habitantes) y letalidad, accidente ofídico en Colombia, a primer semestre 2007-2024	22
Figura 3: características de serpientes del género <i>Micrurus</i>	23
Figura 4: Mapa de distribución geográfica de las serpientes <i>Micrurus</i> en Colombia.	24
Figura 5: Diseño metodológico	31
Figura 6: Alineamientos múltiples e identificación de la secuencia consenso	41
Figura 7: Representación gráfica de la antigenicidad de las secuencias de <i>3FTx</i> por especie de <i>Micrurus</i> , con la escala de antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar (1990).	43
Figura 8: Identificación de epítopes en secuencia consenso	44
Figura 9: Modelos tridimensionales de epítopes de <i>3FTx</i> .	48
Figura 10: Modelos tridimensionales de HLADR-B1y HLADRB3	48
Figura 11: Sitios de unión predichos en proteínas HLADR-B1y HLADRB3	52
Figura 12: Análisis de cobertura poblacional por grupo étnico.	53
Figura 13: Mapa de acoplamiento molecular epítope HLA.	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Secuencias de <i>Micrurus</i> Analizadas.	39
Tabla 2: Umbrales de detección antigénica para las secuencias de <i>3FTx</i> de diferentes especies de <i>Micrurus</i> .	42
Tabla 3: Generación de epítopes contra el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH II).	45
Tabla 4: Análisis de conservación e inmunogenicidad de epítopes derivados de <i>3FTx</i> , presente en cada especie de <i>Micrurus</i>	47
Tabla 5: Predicción de propiedades alérgicas y físico-químicas de los epítopes.	49
Tabla 6: Análisis de cobertura poblacional colombiana.	52
Tabla 7: Análisis de Docking molecular HLA DRB1 – DRB3 para los epítopes de <i>3FTx</i> .	54



Diseño de un péptido sintético como alternativa inmuno profiláctica a la toxina de tres dedos (3Ftx) de las serpientes del género Micrurus en Colombia. Una aproximación Bioinformática.

RESUMEN

El accidente ofídico es un problema relevante de salud pública en Colombia, donde las mordeduras de serpientes venenosas provocan muertes y discapacidades. Este trabajo de grado propone desarrollar un péptido sintético como alternativa inmuno profiláctica al tratamiento actual, por lo tanto, se identificaron epítopes altamente inmunogénicos de la toxina 3FTx lo cual permitió generar un antígeno capaz de inducir anticuerpos específicos, con el objetivo de que este péptido sirva como base para un futuro modelo de vacuna que neutraliza las toxinas del veneno en la población colombiana.

Palabras clave: Accidente ofídico, péptido sintético, salud pública, bioinformática, *Micrurus*, evolución.

Juana Valentina Riaño Morales, Luisa Fernanda Romero Ovalle

Diana Marcela Parra Muñoz- Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Andrés Camilo González Gómez- Hospital Universitario Centro Dermatológico Federico

Lleras Acosta

Octubre de 2024

INTRODUCCIÓN

El accidente ofídico es un evento causado por la mordedura de una serpiente venenosa, donde la inoculación de toxinas genera daños en los tejidos y alteraciones fisiopatológicas en los seres humanos. La gravedad de estos accidentes depende de diversos factores, como la especie de serpiente involucrada, la cantidad de veneno inyectado, la ubicación de la mordedura y la rapidez con la que se busca atención médica (1). En Colombia, su relevancia en salud pública está determinada por varios factores, entre estos, el hecho de ser un país tropical con hábitats propicios para una diversidad de serpientes venenosas distribuidas en diversas regiones. Estas regiones no solo presentan condiciones geográficas y climáticas favorables, sino también factores socioculturales que aumentan la susceptibilidad a los accidentes ofídicos (1).

Además, se destaca la vulnerabilidad de las poblaciones rurales, quienes, debido a sus actividades agrícolas, la dificultad de acceso a los servicios de salud, la atención prehospitalaria inadecuada e incluso la recurrencia de prácticas no médicas en algunas culturas ancestrales, se encuentran en mayor riesgo de sufrir mordeduras de serpientes. Como respuesta, desde 2004, Colombia ha clasificado este evento de notificación inmediata obligatoria (2). El tratamiento adecuado y oportuno, que incluye el suministro de suero antiofídico según la evaluación clínica y paraclínica, es esencial para prevenir o mitigar las complicaciones en los pacientes (2).

En Colombia, las serpientes de importancia médica pertenecen a dos familias: Viperidae y Elapidae. Este trabajo se centrará en el grupo de los elápidos, específicamente en las serpientes del género *Micrurus*, debido a la composición neurotóxica de su veneno y la continua evolución de sus toxinas a través de procesos de selección darwiniana (3). Estos procesos afectan los residuos de superficie que interactúan con los receptores nicotínicos de acetilcolina, los cuales

están bajo selección positiva. Esto ocurre a través de la duplicación de genes o "genes parálogos", los cuales acumulan mutaciones adaptativas que aumentan la capacidad de unión a los receptores, incrementando la toxicidad del veneno. Debido a la evolución acelerada de estas toxinas por presión de selección positiva, se generan nuevas funciones, adquiridas por los parálogos a través de fenómenos de neofuncionalización (3). Por esta razón, se propone el uso de la bioinformática como una herramienta clave en la investigación para el desarrollo de una alternativa inmuno profiláctica frente a los accidentes ofídicos causados por las serpientes del género *Micrurus* en Colombia.

OBJETIVOS

Objetivo general

Diseñar un péptido sintético como alternativa inmuno profiláctica para el tratamiento del accidente ofídico ocasionado por serpientes del género *Micrurus* en Colombia mediante una aproximación bioinformática.

Objetivos específicos

- Identificar la conservación y variabilidad de las secuencias consenso de la toxina 3FTx entre las diferentes especies de serpientes del género *Micrurus* en Colombia.
- Evaluar las características fisicoquímicas, de antigenicidad, inmunogenicidad y alergenicidad del péptido sintético desarrollado.
- Evaluar el acoplamiento de los epítopes generados con las moléculas de HLA presentes en la población colombiana.

1. ANTECEDENTES

El envenenamiento por animales ponzoñosos es un problema crítico de salud pública. En particular, las mordeduras de serpientes pueden desencadenar desde síntomas locales hasta reacciones sistémicas graves, y en casos no tratados, incluso la muerte. La selección natural ha sido clave en la evolución de las toxinas presentes en el veneno de serpientes, como las toxinas Three - Finger toxins (*3FTx*) en la familia Elapidae, que ha evolucionado a través de eventos de duplicación génica que generan parálogos con funciones adaptativas seleccionadas en las glándulas de veneno (4). Estos genes siguen un modelo de evolución de nacimiento-muerte, lo que permite la neofuncionalización y mejora la capacidad de unión a blancos diana como los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), bloqueando la transmisión neuromuscular y provocando parálisis en las presas (3). La evolución de estas α -neurotoxinas está influenciada por factores como el hábitat y la presión predador-presa, lo que contribuye a su letalidad superior en comparación con las toxinas de las víboras (5).

En Colombia, la producción de antivenenos se basa en la inmunización de caballos con venenos de diversas especies del género *Micrurus*, destacándose *M. mipartitus*, *M. isozonus*, *M. surinamensis*, *M. medemi*, *M. helleri* y *M. spixii* (6). Este proceso, que involucra sólo seis de las más de treinta especies registradas en el país, da lugar a un antiveneno polivalente producido por el Instituto Nacional de Salud (INS). No obstante, las diferencias en la composición del veneno entre especies pueden afectar la eficacia de neutralización, ya que la proporción de toxinas como las *3FTx* y las fosfolipasas A2 (*PLA2*) varía considerablemente. Por ejemplo, en *M. corallinus* y *M. tschudii*, las *3FTx* representan alrededor del 80% del veneno, mientras que en *M. dumerilli* su proporción es de aproximadamente un 20% (6). Estas variaciones impactan negativamente en la inmunogenicidad del veneno, lo que puede resultar en una neutralización parcial por parte de los

antivenenos existentes. En el estudio de Rodríguez et al (6), se evaluó la reactividad cruzada del antiveneno producido por el INS contra tres especies de *Micrurus* colombianas, donde se determinó que especies como *M.helleri* evidencian una menor capacidad de reconocimiento inmunogénico con solo el 15%, indicando la necesidad de mayor cantidad de antiveneno para lograr una neutralización efectiva en comparación con *M. medemi* y *M. sangilensis*, que contaron con porcentajes entre el 65 y 68% (6), relativamente bajos, de igual manera en la investigación desarrollada por Piedrahita et al (7) con el mismo antiveneno frente a las especies *M. dumerilli* y *M. mipartitus*, que están registradas como las más letales del género, las pruebas de reactividad cruzada evidenciaron un mejor reconocimiento del veneno de *M.dumerilii*, no obstante fue mayor el reconocimiento para las *PLA2* en ambas especies, por lo tanto la neutralización total de *M.dumerilii* puede contribuirse a su bajo porcentaje de *3FTx*, en comparación con *M. mipartitus* que no fue neutralizado, evidenciando la baja especificidad de estos antivenenos.

Por lo tanto, la baja eficacia de los antivenenos anti coral del INS de Colombia representa un desafío crítico en el tratamiento de los envenenamientos por serpientes del género *Micrurus*. Esta situación ha impulsado la búsqueda de alternativas efectivas y seguras para tratar dichos envenenamientos, lo que ha llevado, al desarrollo de péptidos sintéticos, que sean capaces de interactuar de manera específica contra las toxinas presentes en el veneno.

Como se ha evidenciado en el estudio planteado por Castro y colaboradores (8) donde se lograron identificar y caracterizar epítopes que sean reconocidos por células B de las toxinas *3FTx* y *PLA2* del veneno de *M. corallinus*, en el trabajo identificaron secuencias clave en estas toxinas que fueron utilizadas para producir anticuerpos en conejos, los cuales lograron neutralizar la actividad tóxica del veneno crudo de *M. corallinus*, además de analizar la reactividad cruzada con otras especies de *Micrurus*, obteniendo resultados positivos, lo que

demuestra la eficacia de los epítopes sintéticos para mejorar la generación de terapias inmunológicas contra el veneno de serpiente. De igual manera en la investigación planteada por De la Rosa y colaboradores. (9) analizaron ocho secuencias de α -neurotoxinas de cadena larga de elápidos del viejo mundo, en donde se logró determinar una secuencia consenso de α -neurotoxina de cadena larga basándose en alineamiento múltiple de secuencias, por lo tanto, se pudieron sintetizar químicamente dos péptidos funcionales, los cuales fueron probados inmunizando conejos en Nueva Zelanda para poder determinar si estos péptidos tienen la capacidad de generar activación de la respuesta inmune en su organismo y que estos generan anticuerpos protectores contra la toxina caracterizada por su baja inmunidad (9).

Por lo tanto, la creación de péptidos sintéticos es de vital importancia para mejorar la eficacia de los tratamientos contra envenenamientos por serpientes, ya que estos pueden ser diseñados para imitar epítopes específicos de las toxinas presentes en el veneno, logrando una neutralización mayor a la presentada por los antivenenos tradicionales.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 Generalidades del accidente ofídico.

Se denomina accidente ofídico a la mordedura provocada por serpientes venenosas que inoculan sustancias tóxicas, lo que provoca lesiones en los tejidos y desencadena alteraciones fisiopatológicas en la víctima (10). Estas mordeduras son potencialmente mortales, constituyendo un problema médico, social y económico significativo, especialmente en países en vías de desarrollo. La mayoría de los casos se registran en países tropicales debido a las condiciones climáticas que permiten el crecimiento y desarrollo de diversas especies de ofidios. A nivel mundial, se estima que entre 4,5 y 5,4 millones de personas son mordidas por serpientes

cada año, de las cuales entre 1,8 y 2,7 millones desarrollan enfermedades clínicas y entre 81.000 y 138.000 mueren por complicaciones (10). En Colombia, el ofidismo representa un desafío significativo para la salud pública, causando mortalidad en el 8% de los casos y discapacidad en el 10% debido a una atención médica inadecuada (12). Además, el país ocupa el tercer lugar en Latinoamérica en cuanto al número de accidentes ofídicos, después de Brasil y México (11). Según estadísticas del Instituto Nacional de Salud, se registran anualmente entre 2.000 y 3.000 accidentes ocasionados por ofidios, con una incidencia de 6,2 casos por cada 100.000 habitantes en las regiones menos pobladas y de 20 casos por cada 100.000 en las zonas más densamente habitadas. La gran mayoría de estos incidentes (90-95%) son atribuibles a serpientes del género *Bothrops*, siendo Antioquia y Chocó los departamentos más afectados. Se estima que aproximadamente el 1% de los casos son mortales, mientras que el 6% y 10% generan secuelas (1).

2.2 Causas del accidente ofídico.

El riesgo de sufrir una mordedura de serpiente venenosa en Colombia está influenciado por diversos factores. En primer lugar, el país presenta una amplia variedad de pisos térmicos y condiciones ecológicas que brindan un hábitat adecuado para las serpientes, distribuidas desde el nivel del mar hasta aproximadamente 2600 msnm. Las poblaciones rurales son particularmente vulnerables a estos accidentes, ya que la agricultura es la actividad principal en muchas de estas áreas, donde las personas a menudo carecen de herramientas básicas y equipo de protección. Además, es común que transiten descalzas o con calzado abierto, lo que incrementa el riesgo de encuentros con serpientes. Para comprender mejor este fenómeno, es crucial tener en cuenta factores como las actividades diarias de las personas, que incluyen la agricultura, el pastoreo, la pesca y la caza, así como, determinantes de vida como las condiciones de vivienda, la ubicación

geográfica, el limitado acceso a la educación, la falta de atención médica y la edad del paciente, siendo los niños especialmente susceptibles a las consecuencias letales. Finalmente, la falta de educación sobre la prevención y manejo de accidentes ofídicos representa un desafío significativo. A pesar de la rica biodiversidad y la notable presencia de serpientes venenosas en el país, la conciencia pública sobre estos temas es limitada, un problema agravado por la escasa difusión de información precisa y accesible (2).

2.3 Manifestaciones clínicas del accidente ofídico.

2.3.1 Fisiopatología y sintomatología

La fisiopatología de este evento involucra una interacción dinámica entre el veneno de la serpiente y la fisiología del organismo humano, la manifestación clínica se evidencia a través de una amplia gama de síntomas que abarcan señales locales en el sitio de la mordedura tales como edema, dolor y alteraciones en la piel, hasta síntomas sistémicos que involucran funciones vitales como la coagulación, la actividad cardiovascular, nerviosa y renal, las cuales pueden comprometer seriamente la vida del afectado, hecho que lo convierte en una emergencia médica que requiere una comprensión profunda de los mecanismos subyacentes para orientar una intervención clínica eficaz y de esta manera lograr mitigar las consecuencias potencialmente letales.

El envenenamiento por los géneros *Bothrops*, *Lachesis* y *Crotalus* (familia Viperidae) se manifiesta localmente con marca de colmillo, dolor ardiente, hinchazón, parestesia, sangrado leve, hematomas y necrosis (11). Sistémicamente, se presenta cefalea, náuseas, vómitos, hipotensión, fiebre, hemorragias múltiples, falla renal aguda, parálisis flácida progresiva de pares craneanos y extremidades, y puede llevar a coma y la muerte. En contraste, en el

envenenamiento por los géneros *Micrurus* y *Pelamis* (familia Elapidae) se presenta huella de colmillo, dolor leve, edema y parestesia local. A nivel sistémico, se observan parestesias generalizadas, parálisis flácida progresiva, y de igual manera la víctima puede llegar a coma y muerte (12).

2.3.2. Inmunología del accidente ofídico

Cuando el veneno de serpiente ingresa al cuerpo, desencadena una respuesta inmune que involucra tanto la acción de las toxinas como la activación de células del sistema inmunológico, las proteínas del veneno son reconocidas como antígenos por las células presentadoras de antígenos (APCs), que pueden ser macrófagos o las células dendríticas. Estas células procesan el veneno y presentan fragmentos de péptidos en su superficie a través del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II) (13). Esta presentación es crucial para la activación de los linfocitos T helper (Th), que, al reconocer los antígenos, se convierten en células efectoras y de memoria. Los linfocitos T liberan citoquinas que estimulan la proliferación y diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas, que son las células responsables de la producción de anticuerpos específicos para neutralizar las toxinas del veneno (13).

Este proceso de respuesta inmune no sólo busca neutralizar el veneno, sino que también permite al organismo desarrollar memoria inmunológica, que puede ser vital en exposiciones futuras al mismo veneno (13).

2.4 Accidente micrúrico.

El accidente micrúrico es un envenenamiento causado por las mordeduras de serpientes del género *Micrurus*, que representan menos del 0,5% de los accidentes ofídicos en Colombia. A pesar de su baja incidencia, es importante conocerlo debido a su potencial para provocar

insuficiencia respiratoria aguda en las personas afectadas(14). Algunos síntomas incluyen mareos, adormecimiento en el sitio de la mordedura, dolor, náusea, ptosis palpebral y parálisis motora flácida. La clasificación de estos accidentes en estados leve, moderado y grave proporciona un soporte clínico crucial para la intervención médica adecuada y oportuna (15).

2.5 Tratamiento actual empleado.

En Colombia se emplea el uso de suero antiofídico, la dosis a administrar depende de la edad del paciente, en el mercado actual existen dos tipos de sueros antiofídicos, el primero corresponde a los que están compuestos por inmunoglobulinas purificadas que se obtienen a partir del plasma de equinos sanos hiperinmunizados con dosis mínimas de veneno, sin embargo, este tipo de antivenenos son uno de los principales causantes de reacciones alérgicas, debido a la presencia de proteínas heterólogas. El segundo tipo son los faboterápicos, este se diferencia de los primeros debido a que se excluyen los agentes inmunogénicos presentes en las inmunoglobulinas equinas que pueden afectar a los seres humanos; de esta manera se eliminan las probabilidades de presentar reacciones alérgicas graves como el choque anafiláctico (12).

Parte del problema que se presenta con los antivenenos actuales, se debe a las diferentes especies de serpientes que circulan por el país, ya que el INS produce en Colombia los anti - vipéridos que son efectivos contra las especies de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* (1). No obstante, los anti-elapídicos funcionales contra serpientes del género *Micrurus*, son producidos de igual manera por el INS, es un antiveneno polivalente realizado a base de la inmunización a equinos con el veneno de las especies *M. dumerilii*, *M. mipartitus*, *M. surinamensis* y *M. isozonus*, y se ha confirmado su eficacia por reacción cruzada contra venenos de *M. lemniscatus*, *M. spixi* y *M. Medemi* (11), sin embargo las diferencias en la composición del veneno entre especies pueden afectar la eficacia de neutralización, ya que la proporción de toxinas como las 3FTx y la PLA2

varía considerablemente. Estas variaciones impactan negativamente en la inmunogenicidad del veneno, lo que resulta en una neutralización parcial por parte de los antivenenos existentes(6) , diversos autores han realizado pruebas con el antiveneno comercial, se determinó que especies como *M. helleri* y *M. mipartitus* evidencian una menor capacidad de reconocimiento inmunogénico (6,7).

2.6 Importancia en salud pública del accidente ofídico

La relevancia en salud pública del accidente ofídico radica en su impacto socioeconómico, la necesidad de recursos médicos especializados y la importancia de la prevención y educación para reducir su incidencia, su manejo efectivo requiere una colaboración multidisciplinaria entre profesionales de la salud, instituciones gubernamentales y comunidades locales para garantizar un acceso rápido y adecuado al tratamiento, así como, estrategias preventivas que aborden tanto la prevención de las mordeduras como la capacitación en el manejo de emergencias (16).

En Colombia, la notificación de los accidentes ofídicos no se consideraba obligatoria hasta octubre de 2004. Fue en esa fecha cuando se estableció como un evento de interés para la salud pública mediante la circular 092 del mismo año. Hasta el año 2007, se logró obtener una notificación consistente de los casos (16).

Según el análisis de la vigilancia del accidente ofídico, se informa sobre la existencia de dificultades en las estrategias comunicativas para prevenir estos casos, en la oportunidad de ingreso de los pacientes a la institución de salud, la clasificación de la severidad, la disponibilidad y uso de antiveneno, su dilución y administración, así como, en el manejo de reacciones adversas asociadas (2).

La prevención de accidentes ofídicos constituye una prioridad en la promoción de la seguridad y el bienestar de las personas en entornos rurales y silvestres. Estos accidentes representan una

amenaza significativa para la salud pública en diversas regiones de Colombia. Abordar eficazmente este desafío implica la implementación de estrategias preventivas integrales.

2.7 Situación epidemiológica en Colombia.

Hasta el primer semestre del año 2024, el Boletín epidemiológico en la edición de la semana 27, ha reportado 2.588 casos por mordeduras de serpiente. Las entidades territoriales con mayor número de casos incluyen a Antioquia (333 casos), Córdoba (219 casos), Norte de Santander (153 casos), Cesar (145 casos), Meta (143 casos), Bolívar (120 casos), Santander (104 casos) y Caquetá (100 casos) (17). La región más afectada por mordeduras de serpientes en Colombia corresponde a la Amazonía y la Orinoquía, áreas caracterizadas por su baja densidad poblacional y grandes zonas rurales, donde los accidentes ofídicos son más frecuentes. Aunque departamentos como Antioquia tienen un alto número absoluto de casos, la incidencia es mucho mayor en estas regiones (Figura 1), debido a las condiciones geográficas y laborales, que exponen a la población a mayor riesgo, especialmente en actividades agrícolas y rurales (17). Estas zonas concentran la mayoría de los casos graves y reportan las tasas más altas de mordeduras en relación con su población. Además, es importante destacar que la mayoría de los casos de mordeduras son atribuidos a serpientes de la familia Viperidae, las cuales son conocidas por la severidad de su veneno (17).

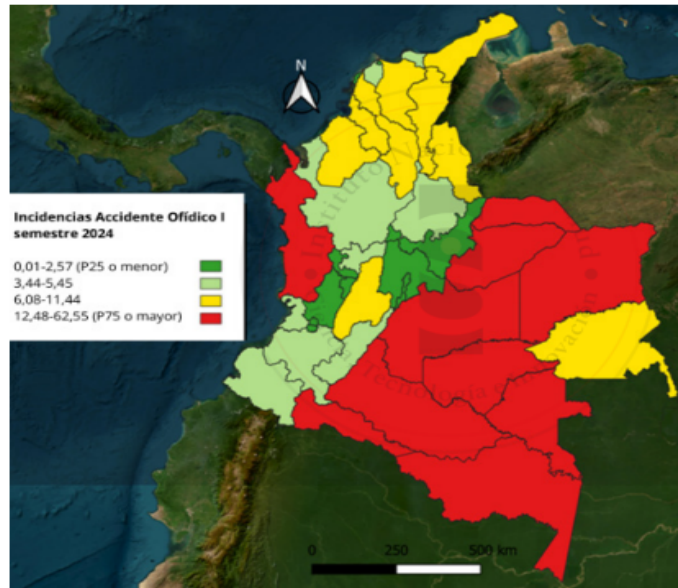


Figura 1 Percentiles de incidencia de accidente ofídico por entidad territorial, Colombia, primer semestre 2024

Fuente: Instituto Nacional de Salud, Colombia, Sivigila 2024

En el primer semestre de 2024, se reportó una tasa de letalidad del 0,27%, (Figura 2) lo cual representa una disminución significativa en comparación con años anteriores, gracias a mejoras en la atención sanitaria. Sin embargo, los desafíos logísticos en áreas remotas dificultan el suministro y la atención oportuna. Los accidentes ofídicos afectan predominantemente a poblaciones rurales y agrícolas, generando un impacto económico y social en las comunidades, ya que muchas personas sufren incapacidades temporales o permanentes que limitan su capacidad de trabajo.

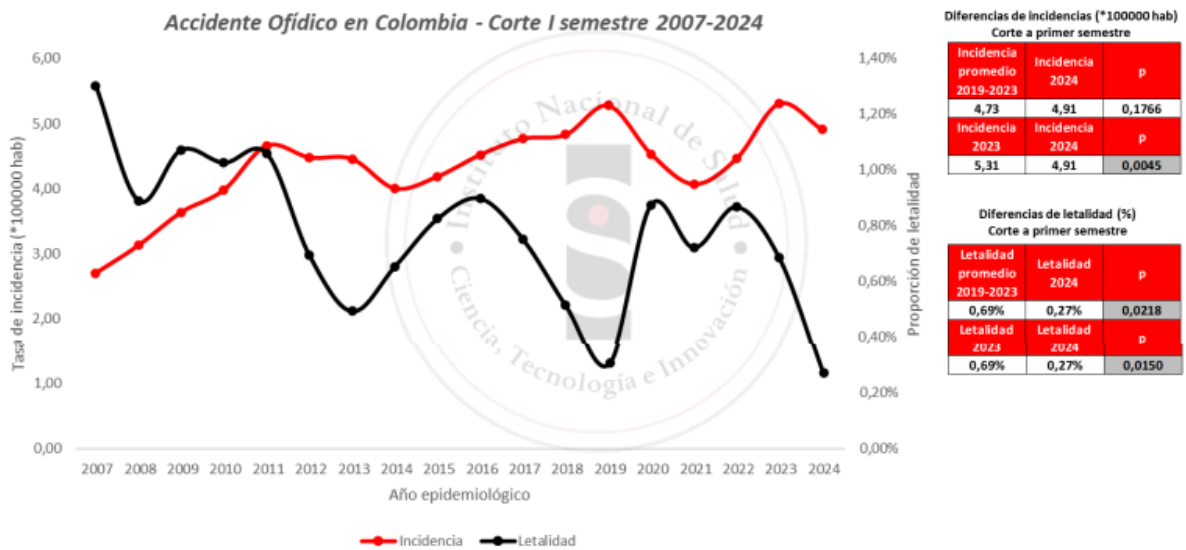


Figura 2. Incidencias (*100 000 habitantes) y letalidad, accidente ofídico en Colombia, a primer semestre 2007-2024

Fuente: Instituto Nacional de Salud, Colombia, Sivigila 2007-2024; proyecciones poblacionales DANE 2007-2024

2.8 Serpientes del género *Micrurus* en Colombia

Las serpientes corales verdaderas, pertenecientes al género *Micrurus*, son coloridas y se caracterizan por su dentición proteroglifa, con colmillos venenosos al frente de la boca, lo que facilita la inyección de veneno. Carecen de un cuello definido, tienen ojos poco diferenciados y no presentan escama loreal. Su patrón de coloración distintivo incluye cuatro variaciones: monadas (anillo negro entre dos rojos o naranjas, con un anillo blanco o amarillo), bicolor (anillos de dos colores, con el negro predominante), triadas (tres anillos negros que separan colores vivos como rojo o naranja) y anillos incompletos, que no se conectan en el dorso. Estos patrones permiten diferenciar las corales verdaderas de las falsas, aunque a veces pueden confundirse 8 (Figura 3) (17,18).

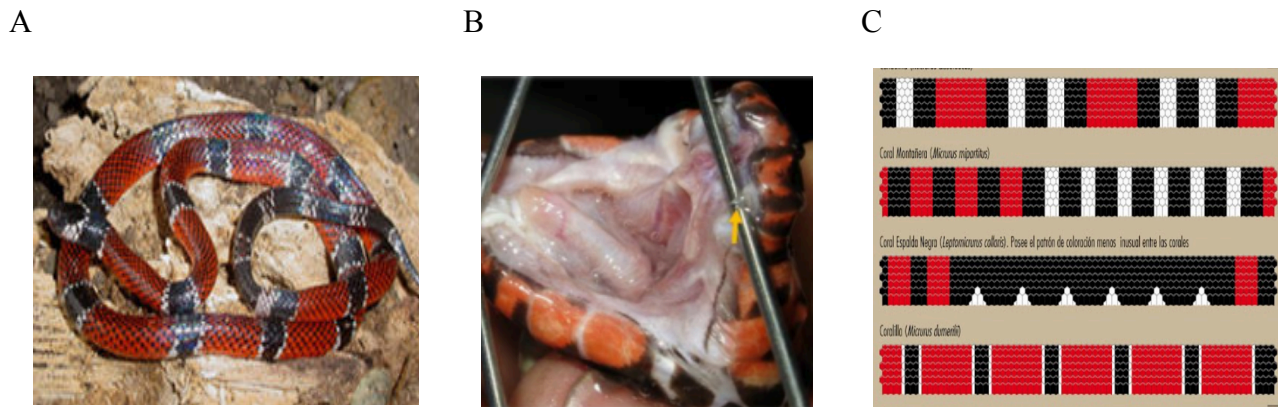


Figura 3 características de serpientes del género *Micrurus*

A-Ejemplar de *Micrurus dumerilli* - fuente serpientes venezuela.org, B- dentición de *Micrurus surinamensis*- fuente: INS, J. P. Hurtado-Gómez, C- Patrones de colores de serpientes *Micrurus*- fuente: Med-tac.

2.8.1 Especies presentes en el territorio colombiano.

Las corales que habitan en el país son principalmente representadas por dos géneros tales como *Micrurus* (corales verdaderas) e *Hydrophis* (serpiente marina) (17). En Colombia, hasta la fecha se reportan 37 especies de la familia Elapidae, de las cuales 35 corresponden al género *Micrurus* (19). Según los datos proporcionados por la base de datos Global Biodiversity Information Facility (GBFI por sus siglas en inglés), al presente año se cuentan con 1.598 especies de *Micrurus* en el territorio, estas serpientes se encuentran dispersas alrededor de todo el territorio colombiano, a lo cual se le suma el hecho de que cada vez se están acercando más al área urbana, debido a desplazamientos de flora y fauna (Figura 4).

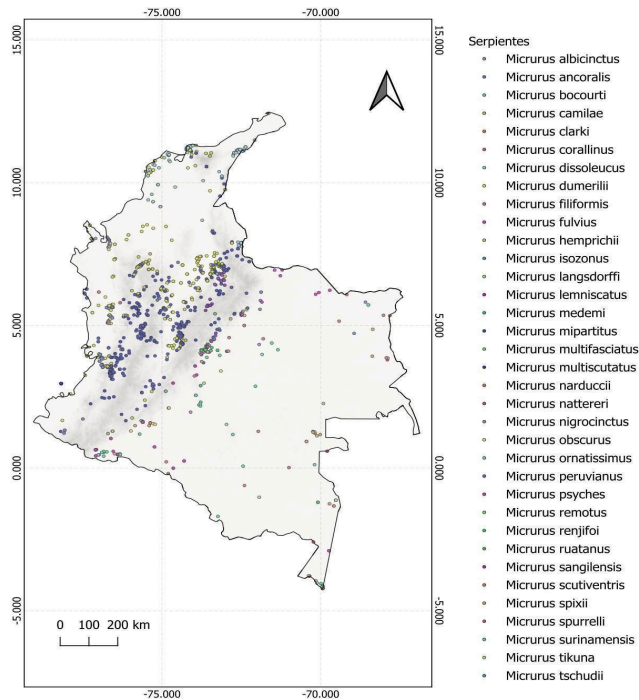


Figura 4 Mapa de distribución geográfica de las serpientes *Micrurus* en Colombia. Elaborado por: Marcela Parra-Muñoz

2.9 Composición del veneno en serpientes del género *Micrurus*

El veneno de las serpientes es saliva altamente modificada que se compone en su gran mayoría por una mezcla de diversos polipéptidos, que incluyen enzimas y toxinas, cuya inoculación mediante mordedura eventualmente causará cuadros de envenenamiento con distintas manifestaciones patológicas y un rango de gravedad variable (21).

Generalmente las serpientes hacen uso de su veneno para atacar a sus presas e inmovilizarlas para luego digerirlas, asimismo, lo utilizan como arma de defensa al encontrarse envueltas en una situación de amenaza. En las serpientes corales, el mecanismo de acción principal de su veneno es en mayor proporción neurotóxico, sin embargo, la composición y cantidad se ve influenciado por diversas variables biológicas, entre ellas la especie de *Micrurus*, dieta, condiciones ambientales y distribución geográfica (22).

El veneno de las serpientes del género *Micrurus* está compuesto por un 25% de sólidos totales, 70% a 90% formado por proteínas y polipéptidos, y entre un 10% y 30% por sustancias de bajo peso molecular, como aminas, iones, aminoácidos y carbohidratos. Este veneno se caracteriza por la predominancia de ciertos elementos que le confieren su principal efecto neurotóxico. En las caracterizaciones proteómicas del veneno de *Micrurus*, destacan tres familias de toxinas: 3FTx, PLA2 y metaloproteasas (svMP), aunque su proporción varía entre las diferentes especies (22).

2.9.1 Neurotoxinas en el veneno de serpientes del género *Micrurus*

La neurotoxicidad del veneno del género *Micrurus* se debe a la presencia de dos componentes principales, los cuales son neurotoxinas de acción presináptica o beta neurotoxinas (β NTx), las cuales forman parte de la familia de las PLA2, y neurotoxinas de acción postsináptica o α -neurotoxinas (α NTx), integrantes de una familia proteica no enzimática 3FTx (23). Ambos tipos de neurotoxinas evitan la contracción de los músculos esqueléticos a nivel de la placa neuromuscular, ya sea bloqueando los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) en el caso de las α NTxs (24), o inhibiendo la liberación del neurotransmisor, que por consiguiente generan una destrucción del botón presináptico en consecuente a la acción de las β NTxs (25).

2.9.2 Alpha Toxinas

Son α -neurotoxinas, que poseen actividad bloqueadora de la transmisión nerviosa mediante la unión a los receptores nicotínicos de acetilcolina presentes en las membranas postsinápticas del músculo esquelético y neuronas, donde la 3FTx compite con la acetilcolina por la unión a los receptores nAChR y el control inhibitorio de la transmisión neuromuscular (3).

Dentro de este grupo, se destaca la toxina *3FTx*, un grupo de polipéptidos no enzimáticos. De manera general poseen un tamaño entre 60 a 74 aminoácidos, cuya estructura es característica por la presencia de tres bucles de láminas beta que se unen mediante cuatro o cinco enlaces disulfuro a un núcleo central que es hidrófobo, dando la apariencia de tener tres dedos. El sitio activo de esta toxina se encuentra en el dedo del medio, sus efectos son a nivel neurológico, celular y cardiaco, sin embargo, la eficacia de su toxicidad está mediada por la afinidad entre el veneno y los receptores nAChR de sus presas (3).

2.10 Mecanismos evolutivos de las *3FTx*

La selección natural es un proceso biológico que constituye uno de los principales motores del cambio evolutivo y el origen de las adaptaciones fenotípicas. Es por esto, que, mediante este mecanismo, diversos componentes tóxicos presentes en los venenos de las serpientes han sido favorecidos en la generación de distintos cambios evolutivos, desarrollando así venenos más potentes (4). En el caso de evolución de la toxina *3FTx*, presente en el veneno de las serpientes de la familia Elapidae, su evolución se atribuye a diversos eventos de duplicación génica basados en la creación de nuevas copias a partir de genes que codifican proteínas ordinarias, estas nuevas copias son conocidas como parálogos, las cuales irán acumulando una serie de sustituciones adaptativas que serán selectivamente expresadas en las glándulas de veneno. Mediante este mecanismo evolutivo, las *3FTx* generan un aumento en la especificidad de unión al blanco diana presente en la presa, incrementando así la toxicidad y letalidad de su veneno (3).

Los genes parálogos, siguen un modelo de evolución conocido como nacimiento–muerte, esto ocurre debido a que tienen la capacidad de duplicarse nuevamente y dar lugar a familias multigénicas (3), gracias a este modelo los genes pueden adquirir funciones diferentes a las previamente conocidas, adquiridas por medio de neofuncionalización (3).

Las toxinas presentes en el veneno de las serpientes corales evidencian tener una actividad más potente y letal, que las toxinas presentes en el veneno de las víboras, es por lo que diversos estudios se han encargado de demostrar cuál es la relación que existe entre el veneno y diversos factores que rodean a la serpiente, tales como; hábitat, alimentación, distribución geográfica, adaptación y supervivencia (5).

Uno de los componentes principales del veneno de las serpientes de la familia Elapidae son las α -neurotoxinas, destacándose en funcionalidad y letalidad, la *3FTx*, perteneciente a una de las superfamilias más importantes de toxinas de serpientes, derivadas de un ancestro en común no tóxico, la superfamilia del antígeno linfocitario 6 y receptores del activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (Ly6/uPAR). Los miembros de esta familia se encuentran presentes en varios cromosomas de especies vertebradas e invertebradas, sin embargo, las *3FTx* son proteínas con funciones tóxicas relativamente “nuevas” que aparecen en esta familia (5). El complejo proteico LY6/uPAR consta de dominios LU de 60 a 90 aminoácidos, con un núcleo β estabilizado por cuatro enlaces disulfuro y tres bucles, es debido a esto que se les denomina proteínas de tres dedos (26).

La diversidad funcional de esta familia está altamente relacionada con la variabilidad de las regiones del bucle en sus secuencias primarias, manteniendo intacta la estructura básica. Dentro de sus funciones se encuentra la capacidad de unirse y modular los receptores nAChRs (26).

Por consiguiente, la aparición de las *3FTx* como un componente tóxico, derivado de esta familia de proteínas, se documenta por primera vez en la superfamilia de serpientes Caenophidia o sin colmillos frontales (NFF), donde se registró una forma ancestral o plesiotípica de la *3FTx*. Adicionalmente la toxicidad es de tipo α -neurotóxico, debido a que ejerce un efecto antagonista con los receptores nAChRs, este tipo de toxina ejerce una mayor potencia, contra aves o reptiles,

que, contra mamíferos; debido a este tipo de especificidad las α -neurotoxinas plesiotípicas o primera forma han sido denominadas como α -neurotoxinas débiles (*WNTX*) (3).

No obstante, se ha confirmado que la toxina también experimenta un tipo de evolución adaptativa, debido a que los residuos estructuralmente importantes están bajo selección negativa, lo que corresponde a la conservación de la estructura de tres dedos en todas las variantes registradas; mientras que las regiones responsables de la función biológica acumulan variaciones en un contexto de competencia evolutiva, esto es debido a que la organización general del gen *3FTx* el cual está altamente conservado y ordenado. Sin embargo, diversos estudios añaden la teoría del "cambio de segmento acelerado en exones para alterar la orientación" (ASSET, por sus siglas en inglés) junto a la selección positiva, como uno de los mecanismos impulsores de la evolución molecular de *3FTx* (27), según esta teoría, durante la evolución del gen codificante para las *3FTx*, los segmentos en regiones exónicas se intercambiaban con otros diferentes, y el resultado de este cambio de segmentos generó la variación de secuencia observada y la diversidad funcional de *3FTx* (27).

Por consiguiente, los cambios presentados en las *3FTx*, no solo corresponden a variaciones estructurales y funcionales, sino que además la aparición de diversas familias multigénicas con diferentes isoformas entre sí, diversos estudios se han encargado de generar evidencia que soporte la hipótesis de evolución adaptativa de las α -neurotoxinas y la constante aparición de isoformas de esta (28).

Uno de los modelos más reportados, son las dietas especializadas en las especies del género *Micrurus*, lo cual sugiere la posibilidad de que los componentes del veneno posean diferentes efectos neurotóxicos dependiendo de la presa, y que el régimen de presión selectiva predador–presa constituye un determinante importante en la composición del veneno y afecte la

evolución de los componentes de este (23,32), por lo que se sugiere la posibilidad de que la selectividad de la presa sea capaz de afectar la evolución de los componentes del veneno (33).

2.11 Situación de la producción de antivenenos anti-coral en Colombia

En Colombia, los antivenenos, incluidos los anti-coral, son sueros biológicos obtenidos a partir de la sangre de animales hiperinmunizados, principalmente caballos. Estos sueros neutralizan las toxinas de serpientes venenosas, mediante un proceso que incluye la extracción de veneno ("ordeño"), la inmunización de los animales y la recolección de su sangre para purificar los anticuerpos. La purificación se realiza mediante técnicas como la centrifugación y el uso de sulfato de amonio o ácido caprílico. En el país, el INS y Laboratorios Probiol son los principales productores de antivenenos polivalentes, además el INS importa antivenenos de México (Bioclon). Sin embargo, los antivenenos específicos para mordeduras de serpientes corales son menos comunes, debido a la rareza de estas mordeduras y la dificultad para recolectar suficiente veneno para su producción (34-36).

Las especies de coral como *M. mipartitus*, *M. dumerilli*, *M. surinamensis* y *M.s isozonus* son responsables de la mayoría de los accidentes ofídicos por corales en Colombia (36). Para producir antivenenos, el INS mantiene ejemplares en cautiverio, pero la captura y el mantenimiento de estas serpientes son complejos debido a su desconocido comportamiento en la naturaleza y su baja esperanza de vida en cautiverio (37,38). Este problema se agrava por las dificultades en la identificación de las especies que causan la mordedura y la falta de disponibilidad de antivenenos específicos. Se estima que en Colombia se requieren aproximadamente 1.000 ampollas de antiveneno coralino al año, basándose en el número de mordeduras (5.000 casos anuales) y el uso promedio de 10 ampollas por tratamiento (34).

El INS produce un antiveneno polivalente que neutraliza el veneno de las especies *M. dumerilli*, *M. isozonus*, *M. mipartitus* y *M. surinamensis*, pero a diferencia de los antivenenos para víboras, que cuentan con dos productores nacionales, el abastecimiento de antisueros coralinos es casi inexistente. En Colombia, se han importado ocasionalmente sueros desde el Instituto Clodomiro Picado en Costa Rica y el Instituto Butantan de Brasil, pero estos no son efectivos contra el veneno de *M. mipartitus* y otras especies endémicas, debido a las diferencias genéticas entre las serpientes (39,40).

2.11.1 Limitaciones: eficacia parcial del suero antiofídico polivalente

Las limitaciones en la eficacia del suero polivalente pueden originarse por la presencia de venenos de diversas especies de serpientes incluidos en su composición, así como, las variaciones en el proceso de producción que pueden influir en su calidad y consistencia.

Además, se deben contemplar las posibles reacciones alérgicas que puede presentar el paciente al momento de emplear el antídoto, pues al hablar de antivenenos se debe tener en cuenta que estos preparados biológicos son moléculas extrañas para el organismo humano que pueden provocar reacciones adversas, tal como la aparición de pápulas urticariformes, mialgias, escalofríos, edema angioneurótico, hipotensión y broncoespasmo (33).

Puesto que el antídoto polivalente es más costo-efectivo que el monovalente, es esencial considerar que su uso en casos de emergencia puede no ser tan efectivo en ciertas situaciones. Por ejemplo, si la intoxicación es causada por una única toxina específica, el antídoto polivalente podría ser menos eficaz que el monovalente que está diseñado para neutralizar esa toxina específica de manera más precisa. Por lo tanto, aunque el antídoto polivalente ofrece ventajas en

términos de costos, su eficacia puede ser puesta en duda en escenarios de intoxicación selectiva (40).

3. DISEÑO METODOLÓGICO

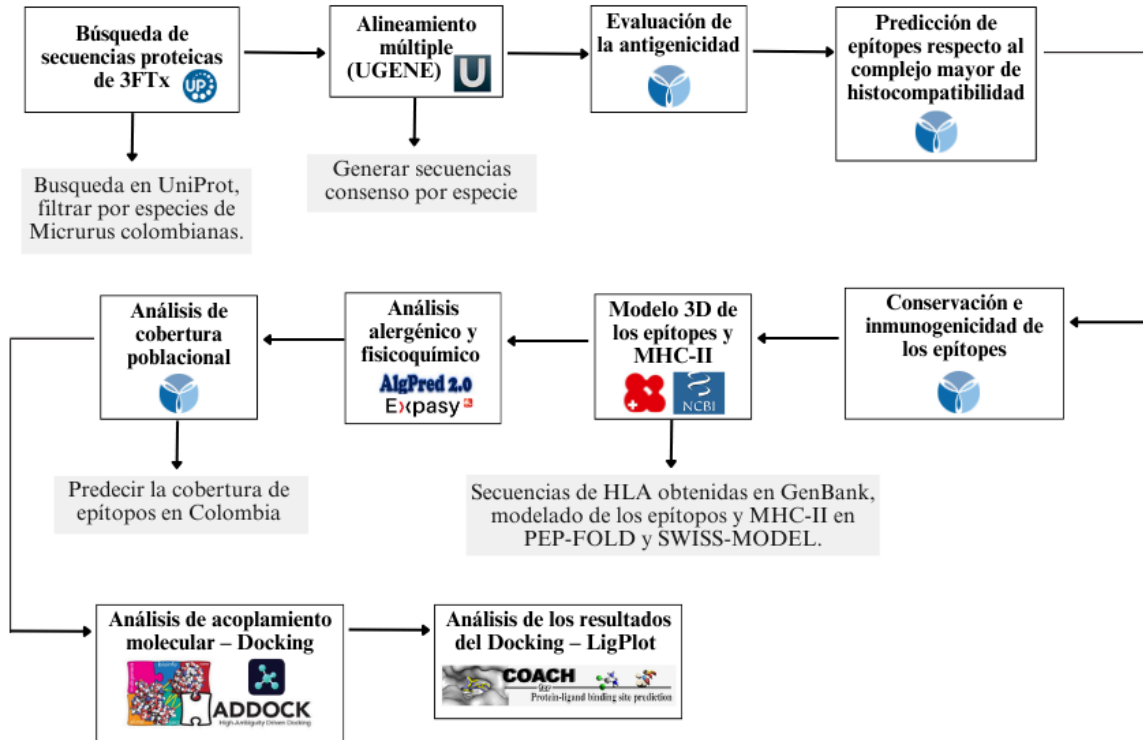


Figura 5 Diseño metodológico

3.1 UNIVERSO, POBLACIÓN Y MUESTRA

El universo son secuencias de aminoácidos de neurotoxinas de tres dedos almacenadas en la base de datos del Uniprot, la población es el grupo de serpientes del género *Micrurus* y la muestra es la cantidad de epítopes diseñados (Muestra a conveniencia).

3.2 HIPÓTESIS, VARIABLES, INDICADORES

3.2.1 Variables del estudio.

Se evaluó la variable independiente (diseño de un péptido sintético basado en la toxina de tres

dedos (*3FTx*) de las serpientes del género *Micrurus*) y una dependiente (eficacia del péptido como inmuno profiláctico).

3.2.2 Hipótesis Nula

El péptido sintético diseñado no tiene ninguna capacidad para inducir una respuesta inmune efectiva contra la toxina *3FTx* de varias especies de serpientes del género *Micrurus*.

3.2.3 Hipótesis Alterna

El péptido sintético diseñado induce una respuesta inmune efectiva contra la toxina *3FTx* de varias especies de serpientes del género *Micrurus*, actuando como una alternativa inmuno profiláctica viable.

3.2.4 Análisis Estadístico.

Se llevó a cabo un análisis de los resultados obtenidos a partir de las predicciones bioinformáticas, usando herramientas como IEDB, Tepi Tool y LigPlot que permitieron evaluar la inmunogenicidad y la interacción de los epítopes con moléculas HLA. Los datos de antigenicidad y conservación de epítopes se analizaron mediante comparación de puntajes y percentiles de inmunogenicidad.

3.3. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

3.3.1 Búsqueda de secuencias proteicas de *3FTx*

Para la obtención de secuencias proteicas de *3FTx* presentes en serpientes del género *Micrurus*, se llevó a cabo una búsqueda exhaustiva en la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org/>) (41), Se utilizaron como términos de búsqueda "*3FTx*" AND "*Micrurus*", filtrando específicamente las secuencias correspondientes a especies de serpientes corales colombianas. Además, se incorporaron dos secuencias adicionales de *M. dumerilli carinicauda* obtenidas del

trabajo de grado de maestría de Andrés González, disponible en el repositorio institucional de la Universidad Nacional de Colombia (3). Las secuencias recopiladas fueron descargadas en formato *fasta* para análisis posteriores. Las secuencias se editaron con el fin de eliminar los aminoácidos correspondientes al péptido señal, manteniendo únicamente las regiones funcionales de la toxina *3FTx*. Este análisis se efectuó utilizando herramientas disponibles en UniProt, garantizando que las regiones de interés estuvieran correctamente seleccionadas.

3.3.2 Generación de secuencias consenso de 3FTx

Con las secuencias de aminoácidos de *3FTx* previamente obtenidas para cada especie de *Micrurus*, se realizó un alineamiento múltiple utilizando el software UGENE (42) (<https://ugene.net/>). A partir de estos alineamientos, se generaron secuencias consenso para las especies con múltiples isoformas de *3FTx*. En los casos de *M. clarki*, *M. spixii* y *M. tschudii*, debido a la disponibilidad de una única isoforma, se utilizó directamente como secuencia consenso. Después de generar las secuencias consenso, se eliminaron los *gaps* y códigos ambiguos para garantizar una representación precisa. Las secuencias finales, depuradas, fueron guardadas en formato *fasta* para su uso en análisis posteriores.

3.3.3 Estimación de Determinantes Antigénicos en Células B

Para evaluar la antigenicidad, se utilizó la herramienta en línea **Antibody Epitope Prediction** disponible en el servidor de IEDB (<http://tools.iedb.org/bcell/>) (43), bajo el parámetro de escala de antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar. (44). Se cargaron las nueve secuencias consenso de *3FTx*, correspondientes a cada una de las 9 especies de *Micrurus* en el panel de entrada de la plataforma, asegurando que se incluyeran todas las variantes relevantes para el análisis. El umbral de antigenicidad se dejó por defecto en un puntaje de 1.034 el cual permitió identificar

los epítopes con un nivel de probabilidad de ser reconocidos por el sistema inmunológico. Además, se ajustó el tamaño de la ventana a 15 pentámeros para el análisis, lo que facilitó la evaluación de secuencias de aminoácidos continuos y permitió una identificación más precisa de los potenciales epítopes.

3.3.4 Predicción de epítopes respecto al complejo mayor de histocompatibilidad

Se llevó a cabo un análisis para la predicción de epítopes dirigidos al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH II) utilizando las secuencias consenso generadas previamente. Para ello, se empleó la herramienta Tepitool (<http://tepitope.org/>) (45), integrada en la base de datos IEDB (Immune Epitope Database & Tools). El análisis se enfocó en la identificación de epítopes específicos para el CMH II, considerando los alelos HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. Los criterios utilizados fueron los siguientes: la predicción se realizó para un conjunto personalizado de alelos mediante una selección manual, escogiendo un total de 674 alelos disponibles en la base de datos. Se eliminaron los epítopes repetidos y se seleccionaron aquellos con una longitud de 15 aminoácidos. Para la predicción, se empleó el método recomendado por el IEDB, y se utilizó un percentil menor o igual a 10 como criterio de selección.

3.3.5 Conservación e inmunogenicidad de los epítopes

La conservación de los epítopes generados en la plataforma **Tepitool**, se analizó mediante la herramienta **Epitope Conservancy Analysis** de IEDB, disponible en (<http://tools.iedb.org/conservancy/>) (46). Los epítopes seleccionados fueron evaluados frente a la

secuencia consenso de *3Ftx* de cada serpiente. Para el análisis, cada epítipo fue ingresado en formato *fasta*, al igual que la secuencia consenso de la neurotoxina. Se seleccionó el análisis de **conservación de secuencias lineales** para determinar la preservación de los epítopes dentro de la secuencia proteica. El umbral de identidad de secuencia se estableció en 70%, asegurando así que los epítopes con un puntaje de inmunogenicidad superior o igual a ese valor se considerarán inmunogénicos.

Para evaluar la inmunogenicidad de los epítopes, se utilizó la herramienta **CD4 T Cell Immunogenicity Prediction** de IEDB, disponible en (<http://tools.iedb.org/CD4episcore/>) (47). Se seleccionó el umbral máximo del puntaje combinado, para incluir todos los péptidos en el análisis. Además, se utilizó el análisis mixto por defecto que ofrece la plataforma, con el fin de obtener resultados más precisos al combinar diferentes enfoques de predicción.

3.3.6 Modelo 3D de los epítopes y obtención de modelos 3D de MHC-II

Los epítopes generados por el software **Tepitool** fueron modelados utilizando el servidor en línea PEP-FOLD 3.5 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3/>) (48), una herramienta de predicción estructural para péptidos cortos. Para llevar a cabo este análisis, se ingresaron las secuencias peptídicas correspondientes en formato *fasta*, asegurando que los datos fueran correctamente interpretados por el sistema. Los datos de entrada incluyen la secuencia de aminoácidos del péptido y se configuraron las siguientes opciones: se etiquetó la corrida como "PEPFOLD", se estableció el número de simulaciones en 100, y los modelos generados se clasificaron según el criterio de sOPEP, el cual considera que tan estables y de buena calidad son las estructuras, basándose en la energía de plegamiento e interacción de los aminoácidos entre sí. El proceso incluyó la selección de parámetros específicos, como la optimización de la energía y la simulación de la conformación, lo que resultó en la obtención de modelos tridimensionales

con alta calidad estructural. Los archivos generados se descargaron en formato PDB, y posteriormente se visualizaron en PyMOL (<https://pymol.org/edu/>) (49) para un análisis detallado de sus estructuras.

En cuanto a las moléculas de MHC-II (HLA), las cuales fueron previamente identificadas como blancos de los epítopes generados a partir de las secuencias de 3FTx. Se realizó una búsqueda en **GenBank** por medio del **NCBI** (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (50) **HLA-DR1** (código de acceso: **P01911.2**) y **HLA-DR3** (código de acceso: **NP_072049**). Las cuales fueron descargadas en formato *fasta* y posteriormente cargadas en el servidor **SWISS-MODEL** (<https://swissmodel.expasy.org/>) (51) lo que permitió obtener modelos tridimensionales refinados y optimizados, adecuados para los análisis estructurales e interacciones con los epítopes.

3.3.7 Análisis de propiedades alergénicas y fisicoquímicas de los epítopes

Se llevó a cabo una predicción exhaustiva de las propiedades alergénicas de los epítopes para evaluar su seguridad en aplicaciones humanas. Para esta predicción, se utilizó la base de datos **AlgPred** (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/algpred/submission.html>) (52), que implementa un enfoque híbrido. Este método combina el mapeo de epítopes de IgE, que identifica regiones potencialmente alergénicas, con la búsqueda en péptidos representativos de alérgenos (ARPs), empleando herramientas bioinformáticas avanzadas como PID (Peptide Identification), MEME (Múltiple EM for Motif Elicitation) y MAST (Motif Alignment and Search Tool). Este enfoque permite una evaluación más precisa del potencial alérgico de los epítopes analizados.

Adicionalmente, se realizó un análisis detallado de las propiedades fisicoquímicas de los epítopes mediante **ProtParam**, disponible en el servidor web de **ExPASy** (<https://web.expasy.org/protparam/>) (53). Este análisis proporcionó información clave sobre

características fundamentales, incluyendo el peso molecular, que es crucial para la estabilidad de la proteína; el punto isoeléctrico (pI teórico), que influye en la solubilidad; la vida media en células, que puede afectar la duración de la respuesta inmune; el índice de inestabilidad, que indica la propensidad de la proteína a descomponerse; el índice alifático, que aporta información sobre la naturaleza hidrofóbica de la proteína; y el promedio general de hidropatía (GRAVY), que evalúa la tendencia de la proteína a interactuar con el entorno acuoso.

3.3.8 Análisis de cobertura poblacional

Se realizó un análisis de cobertura poblacional utilizando la herramienta **Population Coverage** de IEDB (<http://tools.iedb.org/population/>) (54), con el objetivo de predecir el porcentaje de individuos en Colombia que, según su genotipo HLA, podrían reconocer los epítopes predichos para un alelo específico. La predicción se llevó a cabo bajo los siguientes criterios: el número total de epítopes a evaluar fue de 17, consultado mediante el método de etnicidad por área geográfica, aplicado al CMH clase II de manera separada. El análisis se centró en tres principales grupos étnicos del país: amerindios, población afrodescendiente y mestizos.

3.3.9 Análisis de acoplamiento molecular – Docking

Identificación de sitios activos de HLA

Los sitios activos de las moléculas de HLA se identificaron mediante el servidor COACH (meta-server approach to protein-ligand binding site prediction <https://zhanggroup.org/COACH/>) a partir de las estructuras tridimensionales de éstos. Este análisis identifica los sitios activos o sitios de unión de las proteínas, lo cual permitió realizar el análisis de acoplamiento dirigido contra estos residuos.

Docking molecular

Se utilizó el servidor HADDOCK 2.4 (High Ambiguity Driven protein-protein DOCKing <https://rascar.science.uu.nl/haddock2.4/>) para evaluar el acoplamiento molecular entre los epítopes de alfa neurotoxinas con proteínas de HLA DRB1 y DRB3. Para optimizar los parámetros de entrada de HADDOCK se seleccionó la opción de análisis denominada “Protein or Protein-Ligand” y se seleccionaron las estructuras tridimensionales de las moléculas de HLA como macromoléculas (Protein) y las estructuras tridimensionales de los epítopes de *3FTx* previamente diseñadas como ligandos (Protein-Ligand). Los residuos de aminoácidos referentes a los sitios activos de los HLA se seleccionaron como entrada para el análisis, lo que permitió realizar un acoplamiento dirigido sobre los sitios de unión. Asimismo, como control del análisis, se realizó un ensayo de acoplamiento en ciego, es decir, sobre todos los residuos de aminoácidos de los HLA, con el fin de visualizar si los epítopes se acoplaban a una región diferente a las de los sitios activos.

Finalmente, las interacciones entre los HLA y los epítopes de *3FTx* se visualizaron con el software Pymol (<https://www.pymol.org>).

4. RESULTADOS

4.1. Secuencias proteicas de α -neurotoxinas (*3FTx*)

En Colombia se encuentran registradas 35 especies de serpientes del género *Micrurus*. De estas, se obtuvieron datos de solo 10 especies, con un total de 45 secuencias obtenidas a partir de la búsqueda en la base de datos UniProt. Además, se añadieron 2 secuencias adicionales obtenidas de la tesis de maestría de Andrés González (3), obteniendo un total de 47 secuencias (Tabla 1).

Tabla 1 Secuencias de *Micrurus* Analizadas.

Especie de <i>Micrurus</i>	Cantidad de secuencias	Nombre de la toxina	Uniprot ID
		MicTx3	C6JUP3

<i>M.corallinus</i>	7	<i>3FTx-2</i>	C6JUP2
		<i>3FTx-1</i>	C6JUP1
		Alpha-neurotoxin homolog 8	P58370
		<i>3FTx</i>	C6JUP0
		<i>3FTx</i>	C6JUP4
		<i>3FTx</i>	C6JUP5
<i>M.fulvius</i>	14	Fulditoxin	U3FAE1
		Three-finger toxin 3b	U3EPL2
		Three-finger toxin 12	U3FYQ9
		Long chain neurotoxin 7	U3FAB7
		Three-finger toxin 4a	U3FVH8
		Long chain neurotoxin 3	U3EPI1
		Long chain neurotoxin 4	U3F5B1
		Long chain neurotoxin 2	U3FAC0
		Long chain neurotoxin 5	U3FVG5
		Long chain neurotoxin 1b	U3FVG7
		Three-finger toxin 12	U3EPM9
		Long chain neurotoxin 1a	U3F5B5
		Long chain neurotoxin 6	U3FYQ0
		Long chain neurotoxin 1c	U3FYQ1
<i>M.lemniscatus</i>	2	Snake toxin/toxin-like domain-containing protein	A0A2D4H8R7
		Snake toxin/toxin-like domain-containing protein	A0A2D4H8V3
<i>M.mipartitus</i>	7	Mipartoxin-1	B3EWF8
		Micurotoxin 2	C0HJR2
		Micurotoxin 1	C0HJR1
		Mipartoxin-2	A0A2P1BSS9
		Mipartoxin-3	A0A2P1BSU3

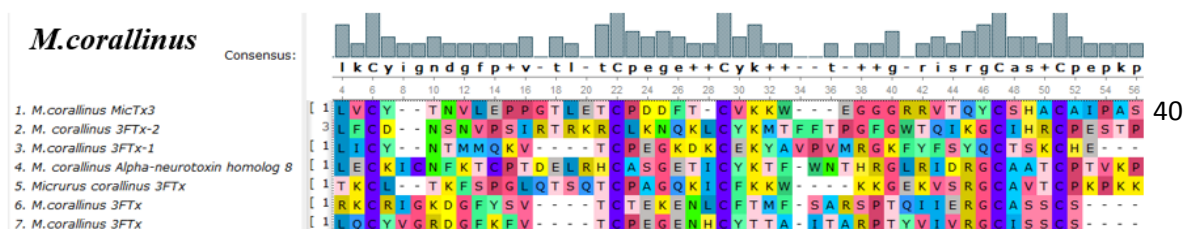
		Mipartoxin-4	A0A2P1BSS8
		Mipartoxin-1A	A0A2P1BST7
<i>M.clarki</i>	1	Clarkitoxin-1	C0HK04
<i>M.spixii</i>	1	Proteína no caracterizada	A0A2D4MS59
<i>M.tschudii</i>	1	Three-finger toxin Tschuditoxin-I	C0HLK3
<i>M.nigrocinctus</i>	4	Three-finger toxin Mnn I	P80548
		Nicotinic acetylcholine receptor-binding protein Mnn-4	Q9PRQ4
		Nicotinic acetylcholine receptor-binding protein Mnn-1A	Q9PRQ2
		Nicotinic acetylcholine receptor-binding protein Mnn-3C	Q9PRQ3
<i>M.surinamensis</i>	8	Short neurotoxin MS11	P86094
		Long neurotoxin MS2	P86096
		Long neurotoxin MS5	P86099
		Three-finger toxin MS1	P86095
		Three-finger toxin MS3	P86097
		Snake toxin/toxin-like domain-containing protein	A0A2D4PD59
		UPAR/Ly6 domain-containing protein	A0A2D4NY04
		Snake toxin/toxin-like domain-containing protein	A0A2D4P2Z1
<i>M.dumerilii</i>	2	*	*

* Secuencias tomadas de la tesis de maestría “Aislamiento de genes codificantes para α -neurotoxinas de acción postsináptica de *Micrurus dumerilii carinicauda*” por Andrés González (3).

4.2. Secuencias proteicas consenso

En total, se obtuvieron 7 secuencias mediante alineamiento múltiple y 3 secuencias únicas.

(Figura 6) ilustra los alineamientos múltiples realizados.



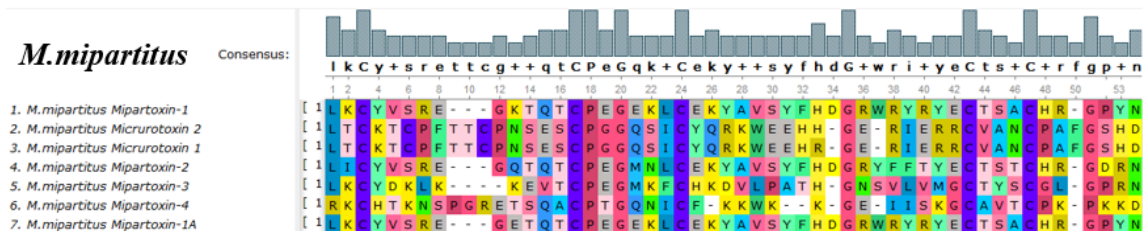
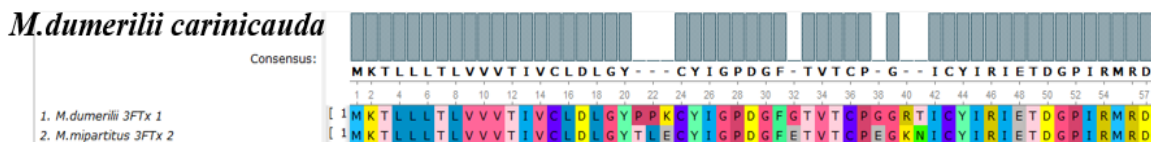


Figura 6 Alineamientos múltiples e identificación de la secuencia consenso. Las figuras para la totalidad de los



alineamientos se muestran en el anexo 1.

4.3 Determinantes Antigénicos en Células B

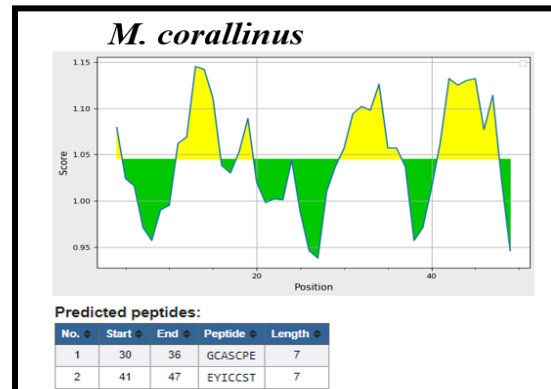
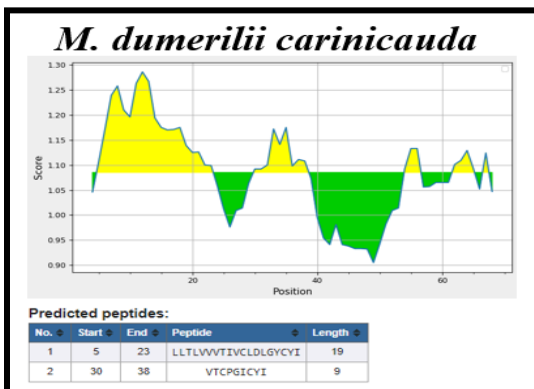
El potencial antigénico de cada secuencia de *3FTx* varió debido a la diversidad en la composición de aminoácidos presentes en las cadenas de cada especie de *Micrurus*. La evaluación de la antigenicidad se realizó considerando las propiedades fisicoquímicas de estos aminoácidos. El software reflejó tres valores del umbral antigénico: un promedio (**Average**), que representa la media de los valores de antigenicidad; un mínimo (**Minimum**), que indica el umbral más bajo donde una secuencia comienza a ser reconocida como antigénica; y un máximo (**Maximum**), que refleja el nivel más alto al que una secuencia puede ser reconocida por el sistema inmunológico. Todas las secuencias presentaron un valor medio cercano a 1.0, lo que sugiere que este es el límite a partir del cual se espera que una secuencia tenga un potencial

óptimo para ser reconocida (Tabla 2). Asimismo, se identificaron posibles epítopes que podrían actuar como determinantes antigénicos en las cadenas.

Las gráficas generadas por el software ilustran la relación entre la antigenicidad y las secuencias de *3FTx*. Se destacan los epítopes de células B predichos con puntajes de antigenicidad superiores al umbral dinámico (~1.0), sugiriendo una alta probabilidad de inducir una respuesta inmunológica. En contraste, las regiones con puntajes por debajo de este umbral indican una menor probabilidad de generar respuestas inmunitarias significativas (Figura 7).

Tabla 2 Umbrales de detección antigénica para las secuencias de *3FTx* de diferentes especies de *Micrurus*.

Especie de <i>Micrurus</i>	Average	Minimum	Maximum
<i>M. spixii</i>	1.034	1.154	0.925
<i>M. corallinus</i>	1.045	1.145	0.938
<i>M. tschudii</i>	1.036	1.188	0.933
<i>M. fulvius</i>	1.062	1.159	0.915
<i>M. surinamensis</i>	1.022	1.168	0.902
<i>M. clarki</i>	1.059	1.143	0.974
<i>M. lemniscatus</i>	1.079	1.286	0.892
<i>M. mipartitus</i>	1.053	1.231	0.897
<i>M. dumerilii</i>	1.085	1.286	0.905



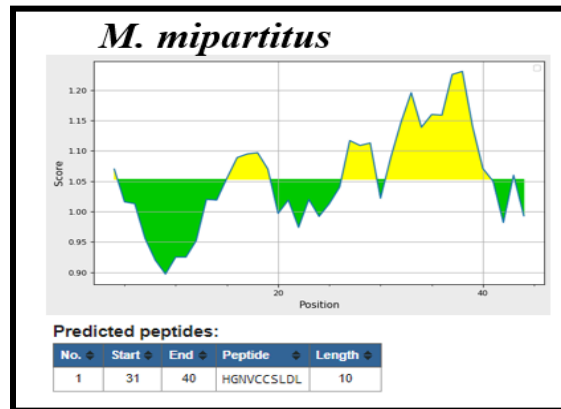


Figura 7 Representación gráfica de la antigenicidad de las secuencias de *3FTx* por especie de *Micrurus*, con la escala de antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar (1990). Las figuras para la totalidad de las gráficas se muestran en el anexo 2.

Las regiones amarillas destacan epítopes de células B con puntajes de antigenicidad $> \sim 1.0$, indicando alta probabilidad de respuesta inmunológica. Las áreas verdes reflejan puntajes inferiores, sugiriendo baja probabilidad de respuestas inmunitarias significativas.

4.4 Predicción de epítopes

Este análisis permitió identificar epítopes específicos dirigidos a los alelos HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP a partir de las secuencias consenso. Se seleccionaron entre uno y dos epítopes por especie, los cuales pueden compartir la misma secuencia de aminoácidos o ser diferentes, dependiendo de los criterios de selección que priorizan aquellos con puntajes cercanos a (~ 10.0), un umbral que permite filtrar los epítopes de alta afinidad, como se muestra en la (Tabla 3). Esto se realizó con el fin de asegurar su unión a distintos alelos de HLA. En total, se detectó una alta especificidad para 15 alelos de HLA-DRB1 y 2 alelos de HLA-DRB3.

Tras la eliminación de duplicados y la aplicación de los criterios de selección, se identificaron 17 epítopes de 15 aminoácidos, de los cuales 12 resultaron ser únicos. Sin embargo, en el caso de *M. nigrocinctus*, no fue posible predecir epítopes debido al tamaño reducido de su secuencia

consenso, que solo tiene 16 aminoácidos. El software Tepitool no puede determinar un epítipo ni identificar regiones inmunogénicas a partir de secuencias tan cortas, por lo que esta especie fue excluida del estudio, trabajando finalmente con 9 especies de serpientes. Además, se identificó a qué parte de la secuencia consenso previamente generada pertenece cada epítipo, como se muestra en (Figura 8).

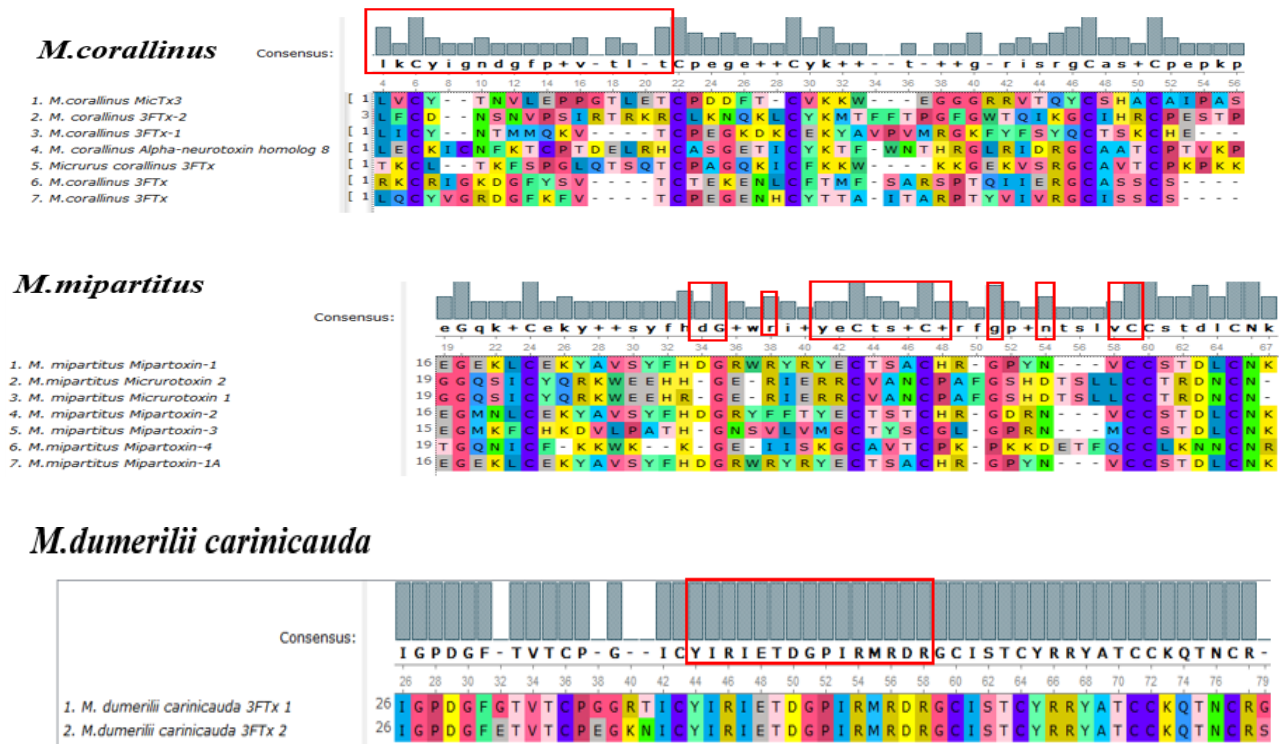


Figura 8 Identificación de epítipes en secuencia consenso. Las figuras para la totalidad de la identificación de epítipes se muestran en el anexo 3 .

Las áreas destacadas en el recuadro rojo corresponden a los aminoácidos presentes en la secuencia consenso, los cuales forman parte de los epítipes generados.

Tabla 3 Generación de epítipes contra el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH II).

Especie de <i>Micrurus</i>	Secuencia consenso	Epítipo	Posición	Puntaje	HLA dirigido
<i>M. spixii</i>	GYTKTCYKYELFLGKTTETCP DEQNLICYKRWHMLAPGRYDI TRGCAATCPIAENHDSVECCA	YEKFLGKTTETCPDE	9-23	10.0	HLA-DRB1* 08:13

	KENCNL	YEKLFGKTTETCPDE	9-23	8.7	HLA-DRB1* 14:15
<i>M.corallinus</i>	LKCYIGNDGFPVTLTCPEGECY KTGRISRGCASCPEPKPGEYICC STDNCNG	LKCYIGNDGFPVTLT	1-15	10.0	HLA-DRB1* 01:21
		LKCYIGNDGFPVTLT	1-15	9.8	HLA-DRB1* 16:14
<i>M.tschudii</i>	MICYNQSQSSEPPTTKTCEGQ CYKKTWSDHRGTIIERGACAP NVKPGVKISCCSSDK	MICYNQSQSSEPPTTK	1-15	10.0	HLA-DRB1* 04:76
		KKTWSDHRGTIIERG	24-38	9.8	HLA-DRB1* 14:68
<i>M.fulvius</i>	RKYGKGRKSVTCPKGEKV CYTFLVGPSQPEKILKWGCA ASCPKVGLGARITCCSTDCNS HR	YTFLVGPSQPEKIL	22-36	10.0	HLA-DRB1* 16:16
		YTFLVGPSQPEKIL	22-36	10.0	HLA-DRB1* 16:11
<i>M.surinamensis</i>	TLCYTQYNEFKTETCPGQNIC YKKWDHRGTREGCAANCPV GKDMVKCCTTDNCNN	YTQYNEFKTETCPGQ	4-18	10.0	HLA-DRB1* 15:28
		YTQYNEFKTETCPGQ	4-18	10.0	HLA-DRB1* 04:50
<i>M.clarki</i>	RICDDSSIPFLRTPQLCPKQD VCYKKTPIVKKFKWLQKKG ASSCPKNGFIKIFKIECCTKDN CI	VKKFKWLQKKGKASS	31-45	10.0	HLA-DRB1* 13:33
		KKTPIVKKFKWLQKK	26-40	9.9	HLA-DRB1* 11:79
<i>M.lemniscatus</i>	EYMGHFAGSREDCKMKALLL TLVVVTIVCLDLGYTRQCYEG KGRKSVTCPEVVCYTFVLVGS PAKVLKWGCAASCPKVGLGA RISCTTDKCNHR	YTFLVGPSAKVLKVG	56-70	10.0	HLA-DRB1* 08:34
		YTFLVGPSAKVLKVG	56-70	9.9	HLA-DRB3* 02:13
<i>M.mipartitus</i>	LKCSYREGTQTEPEAVSYFHD GRYECTSACHGNVCCSLDLC NKDNCN	VSYFHDGRYECTSAC	16-30	10.0	HLA-DRB3* 01:14
		DGRYECTSACHGNVC	21-35	10.0	HLA-DRB1* 01:10
<i>M.dumerilii carinicauda</i>	MKTLTLLTLVVVTIVCLDLGYC YIGPDGFTVTCPGICYRIETDG PIRMRDRCISTCYRRYATCCK QTNCR	YIRIETDGPIMRDR	37-51	10.0	HLA-DRB1* 13:85

4.5. Conservación e inmunogenicidad de los epítopes

El análisis de conservación demostró que cada uno de los epítopes seleccionados presenta una conservación del 100% en relación con la secuencia consenso de 3FTx de cada serpiente. Este

análisis, realizado con un umbral de identidad de secuencia del 70%, confirmó que todos cumplen con los criterios de inmunogenicidad, ya que presentaron puntajes iguales o superiores a este umbral. La eliminación de secuencias duplicadas antes de la ejecución del análisis garantizó la precisión de estos resultados (Tabla 4).

La evaluación de inmunogenicidad reveló puntajes significativos que destacan el potencial inmunogénico de cada epítipo. Se obtuvo un rango de puntajes que oscilan entre 74,6 y 99,3, destacándose un considerable número de ellos con valores superiores al 90%. En particular, los que obtuvieron puntajes de 99,3, 96,6 y 96,7 evidencian una alta probabilidad de generar una respuesta inmunitaria eficiente. Además, el análisis proporcionó información sobre el núcleo peptídico, lo cual es fundamental para comprender su capacidad de interacción con células T CD4+. Estos resultados indican que los epítopes analizados son candidatos prometedores para activar estas células, las cuales son esenciales en la mediación de respuestas inmunitarias efectivas (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de conservación e inmunogenicidad de epítopes derivados de *3FTx*, presente en cada especie de

Micrurus

Epítipo por especie de <i>Micrurus</i>	Conservación (%)	Inmunogenicidad (%)
<i>M. spixii</i> - YEKLFGKTTETCPDE	100	92,8
<i>M. corallinus</i> - LKCYIGNDGFVTLT	100	84,8
<i>M. tschudii</i> - MICYNQQSSEPPPTTK; KKTWSDHRGTIERG	100; 100	99,3; 90,7
<i>M. fulvius</i> - YTTFLVGPSQPEKIL	100	96,7

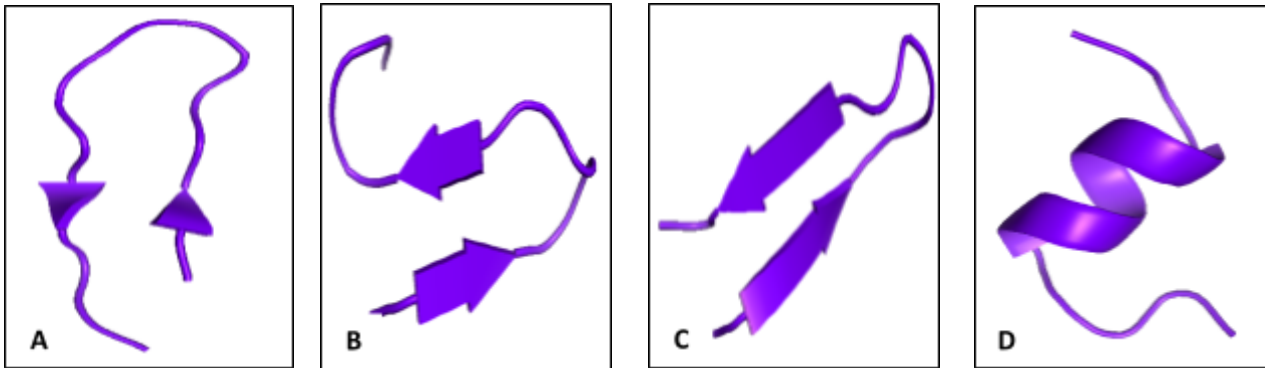
<i>M. surinamensis</i> - YTQYNEFKTETCPGQ	100	74,6
<i>M. clarki</i> - VKKFKWLQKKGCASS; KKTPIVKKFKWLQKK	100	78,3; 91,3
<i>M. lemniscatus</i> - YTFLVGSPAKVLKWG	100	86,4
<i>M. mipartitus</i> - VSYFHDGRYECTSAC; DGRYECTSACHGNVC	100	96,6; 98,3
<i>M. dumerilii</i> - YIRIETDGPIRM RDR	100	92,4

El núcleo peptídico de los epítopes se indica en negrita.

4.6. Modelo 3D de los epítopes y obtención de modelos 3D de MHC-II

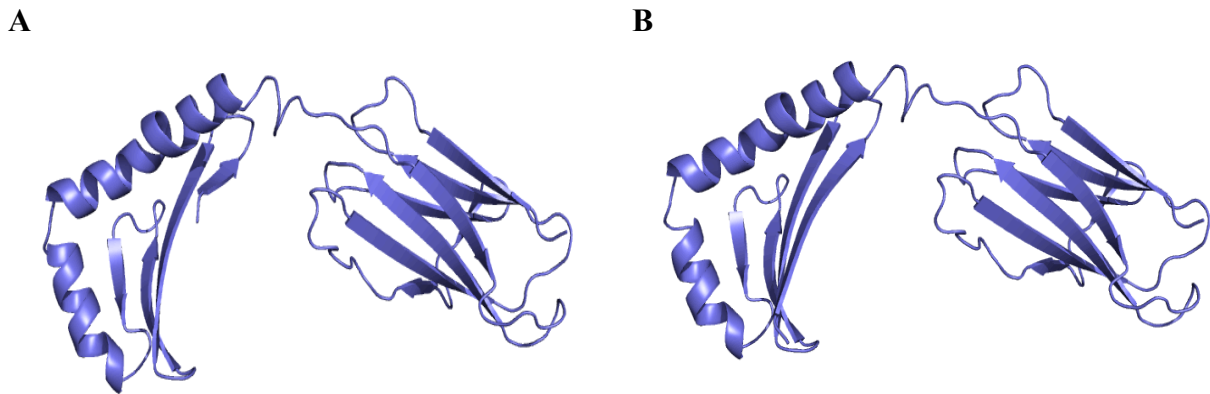
Los modelos de los epítopes se obtuvieron en estructuras tridimensionales de alta calidad a partir de secuencias peptídicas en formato *fasta*. Las estructuras obtenidas se exportaron en formato PDB y se analizaron con el software PyMOL, lo cual permitió una evaluación detallada de su conformación y estabilidad estructural (Figura 9).

Se generaron modelos tridimensionales altamente refinados de las moléculas **HLA-DR1** (código de acceso: **P01911.2**) y **HLA-DR3** (código de acceso: **NP_072049**) utilizando SWISS-MODEL. Estos modelos mostraron una alta calidad estructural, adecuándose para estudios posteriores de interacción con los epítopes generados a partir de las secuencias de *3FTx* (Figura 10). Además, estos modelos fueron visualizados utilizando el software PyMOL, lo que permitió una exploración detallada de las interacciones y conformaciones estructurales.



A) Epítotope de *M. dumerilli* (YIRIETDGPIMRDR), B) Epítotope de *M. corallinus* (LKCYIGNDGFPVTLT), C) Epítotope de *M. mipartitus* (VSYFHDGRYECTSAC) y D) Epítotope de *M. mipartitus* (DGRYECTSACHGNVC).

Figura 9 Modelos tridimensionales de epítotope de *3FTx*. Las figuras para la totalidad de los modelos 3D de epítotope se muestran en el anexo 4.



A) Estructura 3D de HLA-DRB1. B) Estructura 3D de HLA-DRB3

Figura 10 Modelos tridimensionales de HLADR-B1y HLADR3

4.7 Propiedades alergénicas y fisicoquímicas de los epítotope

La predicción de las propiedades alergénicas de los epítotope reveló que ninguno de los péptidos analizados presentó características que representaran un potencial riesgo alergénico, el análisis por mapeo de epítotope de IgE no detectó la presencia de epítotope experimentales previamente asociados a respuestas alérgicas.

Asimismo, la comparación con las secuencias de péptidos representativos de alérgenos no arrojó similitudes significativas con alérgenos conocidos. Por su parte, los análisis adicionales con PID (Peptide Identification) no revelaron la presencia de secuencias relacionadas con alérgenos en ninguno de los péptidos estudiados. Estos resultados, que abarcan múltiples enfoques de predicción, respaldan que los epítopes evaluados son seguros y no alérgicos, lo que los hace viables para aplicaciones sin riesgo de desencadenar respuestas inmunes alérgicas (Tabla 5).

El análisis de las propiedades fisicoquímicas de los epítopes reveló características clave que soportan su estabilidad y funcionalidad en aplicaciones inmunológicas. Además, la predicción del tiempo de vida media de los epítopes en células de mamífero es considerablemente larga para desencadenar una respuesta inmune efectiva. El índice de estabilidad permitió identificar epítopes con mayor resistencia a la degradación en condiciones fisiológicas; en este análisis, se encontraron solo 3 epítopes que resultaron ser inestables. El índice alifático, así como el promedio de hidropatía (GRAVY), muestran una naturaleza hidrofóbica moderada en los epítopes, lo que favorece un balance adecuado en interacciones tanto hidrofílicas como hidrofóbicas, dando un indicio de que se les permite interactuar de manera efectiva en un entorno biológico (Tabla 5).

Tabla 5. Predicción de propiedades alérgicas y fisicoquímicas de los epítopes.

<i>M. spixii</i> - YEKLFGKTTETCPDE						
Alergenicidad	PM	PI teórico	Vida media en célula de mamífero	IE	IA	GRAVY
No alérgico	1760.93	4.41	2.8 horas	13.64	26.00	-1.207
<i>M. corallinus</i> - LKCYIGNDGFPVTLT						
Alergenicidad	PM	PI teórico	Vida media en célula de mamífero	IE	IA	GRAVY

No alergénico	1640.91	5.83	5.5 horas	18.03	97.33	373
<i>M. tschudii</i> - MICYNQQSSEPPTTK; KKTWSDHRGTHIERG						
Alergenicidad	PM	PI teórico	Vida media en célula de mamífero	IE	IA	GRAVY
No alergénico;	1726.94;	5.75; 9.99	30 horas;	97,80* ;	26.00;	-1.100; -1.460
No alergénico	1784.01		1.3 horas	11.63	52.00	
<i>M. fulvius</i> - YTTFLVGPSQPEKIL						
Alergenicidad	PM	PI teórico	Vida media en célula de mamífero	IE	IA	GRAVY
No alergénico	1692.97	6.00	2.8 horas	63.53	97.33	73
<i>M. surinamensis</i> - YTQYNEFKTETCPGQ						
Alergenicidad	PM	PI teórico	Vida media en célula de mamífero	IE	IA	GRAVY
No alergénico	1808.94	4.53	2.8 horas	9.28	0.00	-1.520
<i>M. clarki</i> - VKKFKWLQKKGCCASS; KKTPIVKKFKWLQKK						
Alergenicidad	PM	PI teórico	Vida media en célula de mamífero	IE	IA	GRAVY
No alergénico;	1738.12;	10.20;	100 horas;	34.53;	52.00;	-720;
No alergénico	1900.43	10.78	1.3 horas	21.69	71.33	-1.247
<i>M. lemniscatus</i> - YTFLVGSPAKVLKWG						
Alergenicidad	PM	PI teórico	Vida media en célula de mamífero	IE	IA	GRAVY
No alergénico	1666.00	9.70	2.8 horas	30.14	97.33	447
<i>M. mipartitus</i> - VSYFHDGRYECTSAC; DGRYECTSACHGNVC						
Alergenicidad	PM	PI teórico	Vida media en célula de mamífero	IE	IA	GRAVY
No alergénico;	1737.88;	5.32;	100 horas;	79.60* ;	26.00;	-413;
No alergénico	1614.74	5.32	1.1 horas	88.76*	26.00	-553
<i>M. dumerilii</i> - YIRIETDGPIRMRRDR						
Alergenicidad	PM	PI teórico	Vida media en célula de mamífero	IE	IA	GRAVY
No alergénico	1891.18	8.74	2.8 horas	28.57	78.00	-1.140

*Indica epítopes inestables

4.8 Cobertura poblacional

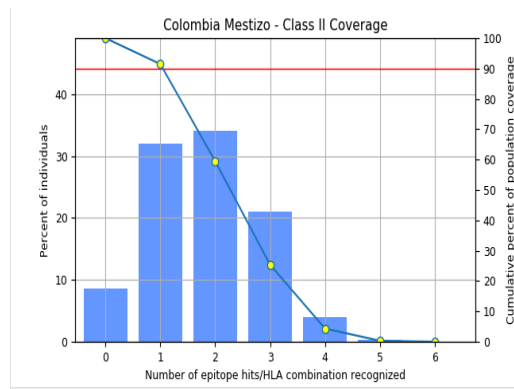
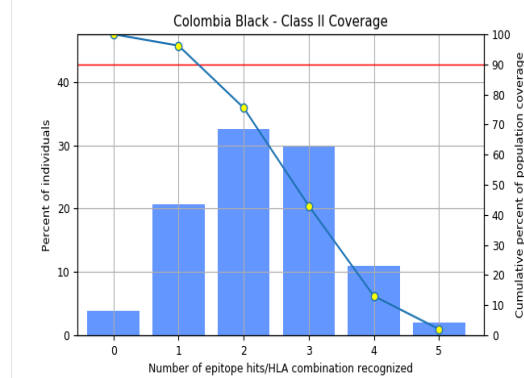
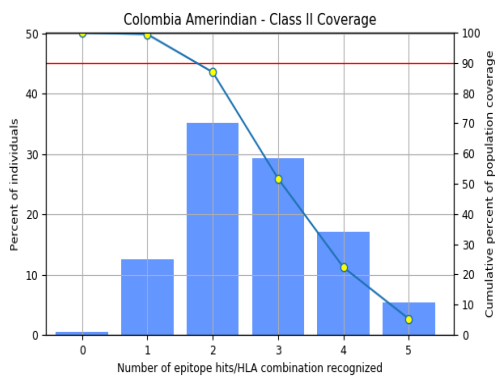
Se estimó la cobertura poblacional en Colombia para los 17 epítopes contra HLA clase II, utilizando la herramienta Population Coverage de IEDB. El software estima varios parámetros clave tomados de las bases de datos de IEDB, como lo son; la cobertura, que es el porcentaje de la población que podría responder a un epítope específico; el promedio de hits, que corresponde al número promedio de veces que un epítope es reconocido por los receptores del sistema inmunológico en un determinado grupo poblacional; y la cobertura porcentual, que estima la capacidad de al menos el 90% de los individuos para reconocer un epítope.

Los resultados obtenidos presentan porcentajes de cobertura superiores al 90%, en términos generales, se evidenció que alrededor del 95,71% de la población podría responder a los epítopes, con un promedio de 2,26 hits por individuo, lo que sugiere que cada persona podría reconocer más de dos combinaciones epítope-HLA. Además, la cobertura porcentual del 90% se situó en 1,37, lo que significa que el 90% de la población podría reconocer al menos 1,37 combinaciones de epítope-HLA. (Tabla 6).

Específicamente, la población amerindia presentó la mayor cobertura, con un 99,45%, seguida de la población afrodescendiente con un 96,21% y los mestizos con un 91,47% (Figura 11). Estos altos porcentajes indican que los epítopes seleccionados podrían ser reconocidos por la gran mayoría de los individuos en cada grupo, lo que sugiere una excelente capacidad de respuesta inmune en la población. Estos resultados indican que una gran parte de la población colombiana podría generar una respuesta inmune frente a los epítopes predichos, un aspecto crucial para futuros estudios sobre el desarrollo de vacunas.

Tabla 6. Análisis de cobertura poblacional colombiana.

Población	Cobertura	Promedio HIT	Cobertura porcentual 90%
Amerindio	99.45 %	2.66	1.75
Afrodescendiente	96.21%	2.3	1.3
Mestizo	91.47%	1.81	1.05
Promedio	95.71%	2.26	1.37



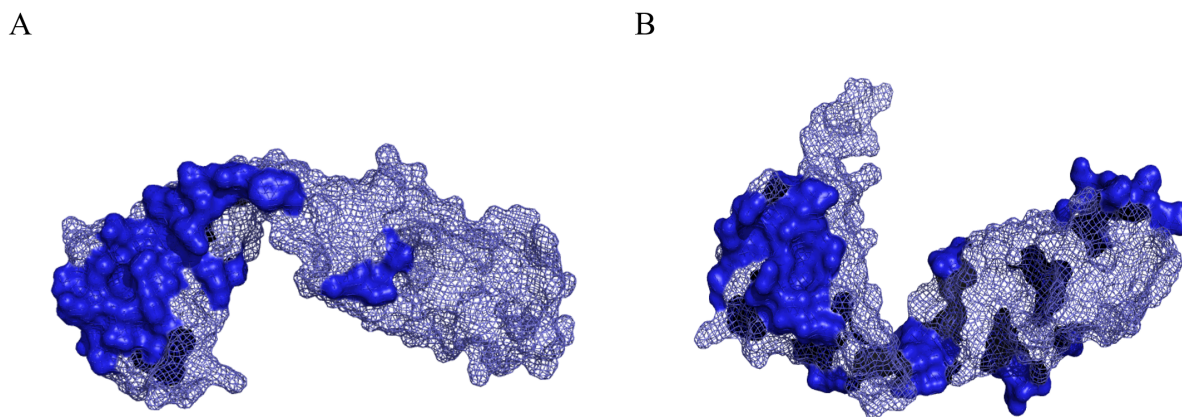
En la población Amerindia de Colombia, se estima el reconocimiento de epítopes con 2 a 4 combinaciones. En la población afrodescendiente de Colombia, se estima el reconocimiento de epítopes basado en 2 a 4 combinaciones. En la población mestiza de Colombia, se estima el reconocimiento de epítopes basado en 1 a 2 combinaciones.

Figura 11. Análisis de cobertura poblacional por grupo étnico.

4.9 Análisis de acoplamiento molecular – Docking

Identificación de sitios activos de HLA

El servidor COACH se utilizó con el fin de identificar los sitios activos de los HLA, esto permitió realizar un Docking dirigido con los epítopes previamente diseñados. La (Figura 12) muestra los sitios activos de las proteínas



Las regiones en esferas de color azul oscuro indican los sitios activos de los HLA con los cuales podrían interactuar los epítopes de las *3FTx*

Figura 12. Sitios activos de las proteínas HLA DRB1 y HLA DRB3

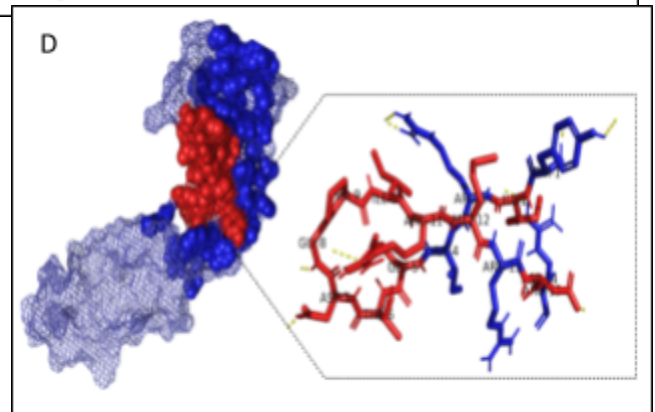
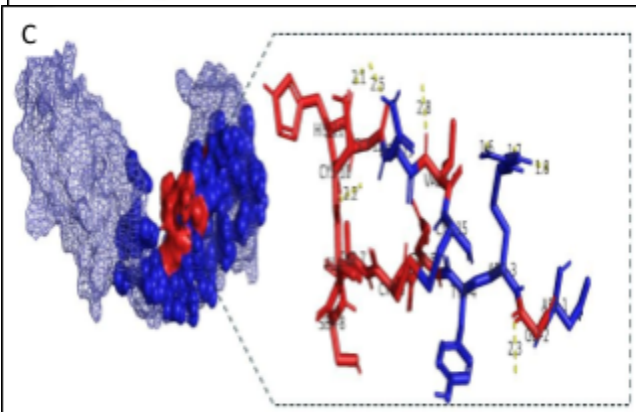
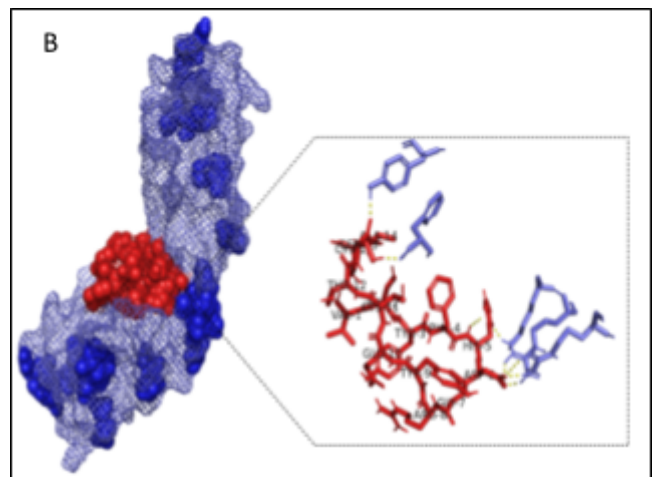
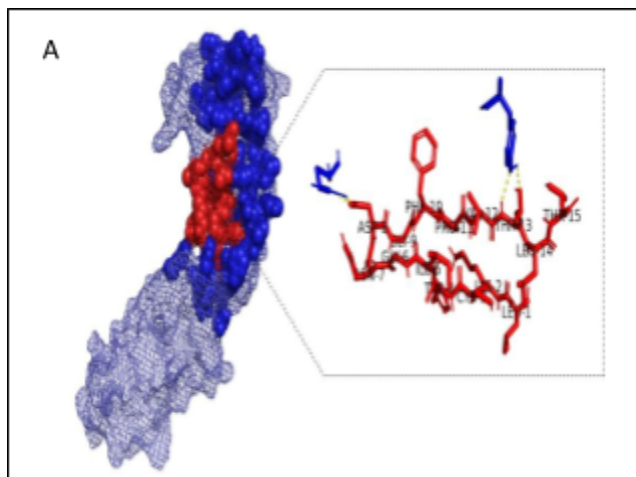
Docking molecular

Los resultados del acoplamiento molecular por medio del Docking se describen en la (Tabla 7) en la cual se visualizan tipos de uniones y las energías de afinidad. Los datos muestran energías de afinidad bajas lo que supone una adecuada interacción entre los epítopes y las proteínas del HLA. Asimismo, la (Figura 13) muestra el sitio de interacción de los epítopes con los HLA y los aminoácidos involucrados en el acoplamiento.

Tabla 7. Análisis de Docking molecular HLA DRB1 – DRB3 para los epítopes de *3FTx*.

Epítope	HLA-DRB1			
	HADDOCK score	Van der Waals energy	Electrostatic energy	Desolvation energy
<i>M. dumerilli</i>	-81.9 +/- 6.4	-61.5 +/- 3.6	-123.0 +/- 25.4	-15.6 +/- 3.6

<i>M. fulvius_2</i>	-71.1 +/- 7.1	-49.9 +/- 5.5	-82.3 +/- 20.0	-24.7 +/- 2.1
<i>M. clarki_2</i>	-93.0 +/- 14.2	-51.8 +/- 7.8	-183.2 +/- 9.8	-21.6 +/- 8.1
<i>M. clarki</i>	-101.2 +/- 5.8	-47.7 +/- 2.0	-276.4 +/- 20.1	-8.3 +/- 2.5
<i>M. tschudii_2</i>	-105.3 +/- 2.2	-60.3 +/- 4.1	-188.2 +/- 17.7	-24.4 +/- 0.8
<i>M. tschudii_1</i>	-78.3 +/- 4.6	-58.4 +/- 5.4	-61.0 +/- 12.7	-22.6 +/- 1.8
<i>M. corallinus_2</i>	-74.7 +/- 6.2	-51.8 +/- 4.8	-89.1 +/- 8.8	-27.0 +/- 5.1
<i>M. mipartitus_2</i>	-66.1 +/- 6.0	-45.1 +/- 3.6	-106.7 +/- 19.5	-20.7 +/- 5.4
<i>M. spixii</i>	-74.7 +/- 9.1	-51.2 +/- 4.3	-95.6 +/- 9.9	-32.9 +/- 3.5
<i>M. lemniscatus</i>	-73.4 +/- 7.6	-46.9 +/- 3.8	-82.9 +/- 42.0	-31.3 +/- 5.3
<i>M. fulvius</i>	-73.0 +/- 4.1	-52.5 +/- 3.8	-29.3 +/- 16.2	-40.1 +/- 3.1
<i>M. surinamensis</i>	-78.2 +/- 7.5	-59.9 +/- 3.9	-53.9 +/- 22.8	-35.2 +/- 2.7
<i>M. corallinus</i>	-71.4 +/- 9.6	-43.1 +/- 5.6	-70.6 +/- 33.2	-31.7 +/- 4.1
<i>M. mipartitus</i>	-92.0 +/- 1.9	-62.3 +/- 1.0	-75.6 +/- 4.9	-28.9 +/- 1.5
Epitope	HLA-DRB3			
<i>M. lemniscatus</i>	-73.4 +/- 7.6	-46.9 +/- 3.8	-82.9 +/- 42.0	-31.3 +/- 5.3
<i>M. mipartitus</i>	-19.1 +/- 12.5	-43.8 +/- 3.5	-112.6 +/- 40.2	-24.7 +/- 2.6



Interacción de epítopes de *3FTx* y HLA. A) *M. corallinus* – *HLADRB1*. B) *M. mipartitus 1* – *HLADRB1*. C) *M. mipartitus 2* – *HLADRB1*. D) *M. dumerilli carinicauda* – *HLADRB1*

Figura 13. Acoplamiento molecular de HLA con epítopes de *Micrurus*. La figura muestra la interacción con algunos epítopes. Las figuras para la totalidad de los epítopes se muestran en el anexo 5

5. Discusión

El objetivo principal de este trabajo, fue diseñar un péptido sintético como alternativa inmuno profiláctica a la toxina *3FTx* presente en el veneno de las serpientes del género *Micrurus* en Colombia mediante una aproximación bioinformática, con el fin de proponer una opción eficaz que pueda funcionar ante esta neurotoxina, la cual puede desencadenar graves daños neurológicos y posteriormente la muerte en la víctima, por lo que desarrollar un péptido que pueda inducir respuesta inmune es crucial para mejorar el tratamiento de las mordeduras en humanos, así como, reducir la mortalidad y las complicaciones asociadas.

En Colombia, se han registrado 35 especies de serpientes del género *Micrurus*, de las cuales se obtuvieron secuencias de *3FTx* para tan solo 10 especies, obteniendo un menos del 30% de representación; esta falta de datos limita el desarrollo de investigaciones, debido a que se espera que al integrar información de diversas especies, se pueda comprender la variabilidad genética existente entre la neurotoxina, la cual evoluciona constantemente, por lo tanto, la escasez de información dificulta los estudios filogenéticos y de biodiversidad relacionados con esta toxina en las especies que aún no han sido estudiadas en el país, no solo obstaculizando el diseño de tratamientos adecuados, sino que también afecta la comprensión general de la diversidad biológica de las serpientes en Colombia, además, es importante destacar que en el país no se han realizado estudios de este tipo.

Para avanzar en este análisis, se llevaron a cabo alineamientos múltiples de las secuencias obtenidas, generando secuencias consenso. Este enfoque es fundamental, debido a que

proporciona una representación más precisa de las características comunes entre *3FTx* de las distintas especies de *Micrurus*. Al generar secuencias consenso, se minimizan las variaciones que podrían interferir en el análisis de las interacciones inmunológicas y potenciales aplicaciones en el desarrollo del péptido. De manera similar, el estudio de De la Rosa y colaboradores (9) en donde emplearon alineamientos múltiples para definir una secuencia consenso de una α -neurotoxina de cadena corta, seleccionando secuencias de especies de mayor relevancia médica y con dosis letales más bajas. Este enfoque resalta la importancia de generar dichas secuencias, ya que permiten comparar las diferentes isoformas de las α -neurotoxinas lo cual es fundamental para comprender la evolución de estas toxinas.

Es importante analizar la variabilidad presente en el potencial antigénico de las secuencias de *3FTx*, ya que refleja la diversidad en la composición de aminoácidos de cada especie de *Micrurus*, puesto que las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos influyen directamente en cómo el sistema inmunológico reconoce y responde a las toxinas. Los resultados muestran que las secuencias con puntajes superiores al umbral de 1.0 tienen un mayor potencial antigénico, lo que sugiere que pueden inducir una respuesta inmunitaria significativa, destacándose los epítopes predichos que podrían actuar como determinantes antigénicos. Estos hallazgos se asemejan al estudio realizado por Chan YW y colaboradores (56) sobre las alfa-neurotoxinas (α -NTXs) de serpientes elapídicas donde también evalúan la capacidad inmunogénica, sin embargo, en el estudio de Chan, las α -NTXs mostraron una baja inmunogenicidad debido a su pequeño tamaño molecular (7–8 kDa) y la composición de aminoácidos no óptimos para la unión con el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II), lo que limita su capacidad para generar una respuesta humoral adecuada. En contraste, las secuencias de *3FTx* de *Micrurus* evidencian una mayor propensión antigénica, lo cual podría

estar relacionado con una configuración favorable de epítopes y una mayor diversidad en las interacciones con el sistema inmunológico.

Los resultados obtenidos en este estudio mediante la predicción de epítopes para MHC II revelaron una notable afinidad para los alelos HLA-DR y HLA-DQ, identificándose así un total de 17 epítopes que sugieren un fuerte potencial inmunogénico en las especies de *Micrurus* evaluadas. Estos hallazgos no sólo subrayan la diversidad inmunológica de las toxinas de *Micrurus*, sino que también destaca su capacidad inmunogénica en comparación con los hallazgos del estudio de Rahmat Grahadi et al.(57) en *Bungarus candidus*, en donde se predijeron varios epítopes, sin embargo, solo uno mostró interacciones favorables tanto con murinos como con MHC-II humano, lo cual fue verificado mediante simulaciones de dinámica molecular. De igual manera, en el mismo estudio de Rahmat, se realizó una evaluación de conservación e inmunogenicidad de los epítopes seleccionados, observándose una alta conservación y puntajes de inmunogenicidad significativos. En este estudio, los epítopes presentaron una conservación del 100% en relación con las secuencias consenso de 3FTx, cumpliendo con un umbral de identidad del 70%, al igual que en *Bungarus candidus*, los epítopes también mostraron una conservación del 100%. Ambos análisis revelan un fuerte potencial inmunogénico, con puntajes prometedores para inducir una respuesta inmunitaria eficiente. Además, tanto en *Micrurus* como en *Bungarus candidus*, los núcleos peptídicos de los epítopes son claves para su interacción con células T CD4+, lo que refuerza su potencial para generar respuestas inmunitarias.

Por consiguiente, los resultados obtenidos en términos de análisis de alergenicidad y las propiedades físico-químicas de los epítopes de *Micrurus* determinan que, junto con el análisis estructural de los epítopes de *Bungarus candidus* (PLA2) realizado en la investigación de

Kurniawan y colaboradores (58), se refuerza la idea de que estos péptidos son seguros y viables inmunológicamente. Tanto el mapeo de epítopes de IgE como la búsqueda BLAST no detectaron similitudes con alérgenos conocidos en *Micrurus*, mientras que el estudio en *Bungarus candidus* mostró que los epítopes formaron complejos estables con moléculas MHC, con bajas energías de unión, sugiriendo un alto potencial inmunogénico sin riesgo de desencadenar respuestas alérgicas. Estos hallazgos son consistentes con la ausencia de características alérgicas en los epítopes analizados en este estudio, lo que respalda su seguridad para terapias y vacunas. Además, el análisis fisicoquímico reveló que los epítopes presentan pesos moleculares adecuados, puntos isoeléctricos favorables y un balance hidrofílico-hidrofóbico óptimo, lo que garantiza su estabilidad y funcionalidad en un entorno biológico. La predicción de un tiempo de vida media prolongado y la resistencia a la degradación en condiciones fisiológicas sugieren que estos epítopes pueden desencadenar respuestas inmunes efectivas y sostenidas.

En contraste, los resultados del análisis de cobertura poblacional en Colombia para los epítopes de HLA clase II presentan diferencias significativas en comparación con el estudio sobre los epítopes PLA2 de *Bungarus candidus* realizado por Kurniawan y colaboradores (58). En su estudio, la cobertura poblacional en el sudeste asiático varía considerablemente entre las comunidades analizadas, estas diferencias resaltan cómo la diversidad genética y las variaciones en las frecuencias alélicas de HLA influyen en la capacidad de respuesta inmune de las distintas poblaciones.

En Colombia, el análisis reveló que la cobertura poblacional para los epítopes de HLA clase II supera el 90% en general, esto indica que, a diferencia de las poblaciones en el estudio de Kurniawan, donde algunas regiones presentan una capacidad de respuesta limitada, la población colombiana muestra una excelente capacidad de reconocimiento de epítopes, además, el estudio

sobre el krait malayo menciona que el MHC es el rasgo más polimórfico en humanos, lo que implica que la capacidad de un epítopo para ser reconocido puede variar entre diferentes grupos poblacionales. La alta cobertura observada en todos los grupos étnicos sugiere que los epítopes evaluados son potencialmente reconocidos por un amplio espectro de la población, lo que podría resultar en respuestas inmunitarias más robustas.

Adicionalmente, los modelos tridimensionales obtenidos a partir de las secuencias peptídicas proporcionan información crucial sobre las interacciones y estabilidad de los epítopes, lo que refuerza la alta calidad estructural de estos modelos, es los bajos niveles de energía de plegamiento y la estabilidad de las interacciones moleculares, por ende, la clasificación de los modelos mediante el criterio sOPEP permitió seleccionar las estructuras más prometedoras, basadas en la predicción de estructuras estables y funcionalmente relevantes. El servidor COACH también identificó sitios de unión potenciales en HLA-DR1 y HLA-DR3 con niveles de confianza elevados, lo que sugiere que estos sitios podrían jugar un papel importante en la modulación o inhibición de la respuesta inmune.

Sin embargo, el análisis de sitios con C-scores menores también es relevante, ya que estos podrían representar zonas de interacción secundarias con funciones menos conocidas, además, la visualización detallada de las estructuras mediante PyMOL permitió examinar las conformaciones de los epítopes y sus interacciones clave dentro de las moléculas HLA, lo que es fundamental para comprender cómo estos epítopes podrían interactuar con el sistema inmunitario, especialmente en el contexto de la respuesta adaptativa. Una vez establecidos los modelos 3D mejor clasificados, se analizaron los resultados del docking molecular para identificar la interacción entre las diferentes especies de *Micrurus* y las proteínas HLA-DRB1 y HLA-DRB3. Los resultados revelaron diferencias significativas en los parámetros energéticos y

estructurales de los complejos obtenidos. El puntaje de HADDOCK más bajo se observó en *M. tschudii_2*, seguido de *M. clarki* y *M. dumerilli*, lo que indica una mayor estabilidad energética en comparación con *M. mipartitus_2*, *M. fulvius* y *M. corallinus_2*, que presentaron valores más altos. Esta tendencia sugiere que el complejo entre *M. tschudii_2* y HLA-DRB1 podría ser el más favorable desde el punto de vista energético.

Al comparar los resultados obtenidos en la presente investigación con los reportados por Kurniawan y colaboradores (58) sobre la simulación de docking de epítopes peptídicos con diferentes moléculas MHC, se observa que ambos estudios destacan la importancia de las interacciones energéticas en la estabilidad estructural del complejo epítoto- MHC. Los resultados obtenidos respecto a estabilidad son similares al caso del epítoto “LPFERATVM” que presentó una energía de enlace de -75.92 kcal/mol. Por otro lado, el complejo entre *M. mipartitus_2* y HLA-DRB1 mostró un puntaje de HADDOCK menos favorable (-66.1 kcal/mol), lo que se asemeja a interacciones de mayor energía de enlace, tales como las presentadas en el estudio con la interacción del epítoto “RTAALCFAK” con 6DIG, que presentó una energía de -65.61 kcal/mol.

Un aspecto clave que se destaca en ambos estudios es la presencia de diferentes tipos de interacciones no covalentes, respecto a dichos parámetros el análisis de las energías de van der Waals y electrostáticas muestra que *M. dumerilli* presenta la energía electrostática más negativa lo cual contribuye significativamente a la estabilidad del complejo. En cambio, *M. mipartitus_2* presentó una energía electrostática menos favorable lo que podría estar relacionado con su puntaje de HADDOCK. En cuanto a la energía de desolvatación, *M. corallinus_2* mostró un valor más bajo en comparación con las otras especies, lo que podría estar indicando un mejor

ajuste hidrofóbico en la interacción, estos resultados evidencian una clara influencia de las energías electrostáticas y de van der Waals en la estabilidad del complejo.

Uno de los parámetros más relevantes en el análisis de la diversidad conformacional fue el tamaño de los clusters, el cual varió considerablemente entre las especies. *M. tschudii_2*, presenta el cluster más grande, lo que sugiere una mayor variabilidad conformacional dentro del complejo. En contraste, *M. corallinus_2* mostró el cluster más pequeño, lo que indica una mayor rigidez conformacional. Esta rigidez podría estar relacionada con su Z-score más negativo, sugiriendo una menor estabilidad del complejo. Los resultados también se correlacionan con la energía de desolvatación, la cual varió significativamente entre especies, evidenciando fluctuaciones energéticas notables, como las observadas en las interacciones peptídicas descritas por Kurniawan y colaboradores (58). Esto sugiere que la variabilidad en las condiciones de solvatación puede tener un impacto crítico en la afinidad de unión de los complejos.

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran el potencial de las herramientas bioinformáticas como una base sólida para el análisis comparativo y la identificación de patrones estructurales y funcionales en las toxinas de *Micrurus*, lo cual es clave para avanzar en el diseño de péptidos terapéuticos capaces de neutralizar la 3FTx. Esto se evidenció a través de la identificación de epítopes inmunogénicos y el análisis estructural y energético de los complejos peptídicos con el MHC II, reforzando la viabilidad de estos péptidos como una opción inmuno-profiláctica prometedora. Además, el análisis de la cobertura poblacional sugiere que una estrategia de vacunación basada en los epítopes seleccionados podría ser efectiva en una amplia franja de la población colombiana. Sin embargo, es necesario realizar estudios experimentales adicionales para validar in vitro la eficacia de los péptidos diseñados.

6. CONCLUSIONES

- La identificación de la conservación y variabilidad de las secuencias consenso de la toxina *3FTx* es fundamental para comprender su composición. Al conocer estas variaciones, se puede contribuir en el desarrollo de enfoques más efectivos para el manejo del accidente ofídico.
- La identificación de epítopes conservados entre diversas especies de *Micrurus* demuestra la viabilidad de crear antivenenos más eficaces que abarcan una mayor cobertura frente a diferentes especies del género, lo que es crucial para un mejor tratamiento.
- Al diseñar un péptido sintético se reduce el riesgo de efectos adversos, como las reacciones alérgicas, que suelen estar asociadas con los antivenenos tradicionales basados en sueros equinos.
- Se logró diseñar un péptido sintético con un alto potencial para inducir una respuesta inmune protectora basado en epítopes de *3FTx* de las serpientes del género *Micrurus* en Colombia, utilizando herramientas bioinformáticas
- El diseño de este péptido representa un avance significativo en la búsqueda de tratamientos más eficaces y seguros para el accidente ofídico en Colombia, contribuyendo a la mejora del tratamiento de envenenamientos por serpientes del género *Micrurus* y, por lo tanto, al bienestar de las comunidades más afectadas.

7. RECOMENDACIONES Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO

- Se recomienda llevar a cabo estudios experimentales que incluyan pruebas *in vitro* e *in vivo* para validar la eficacia de los péptidos sintéticos diseñados, con el fin de confirmar las predicciones bioinformáticas y su capacidad de neutralización.

- Aunque las herramientas bioinformáticas utilizadas son robustas, las predicciones presentan limitaciones en su capacidad para evaluar la interacción real de los péptidos con el sistema inmunológico humano. Además, la baja disponibilidad de información en cuanto a material bioinformático, como las secuencias de toxinas de cada especie, lo que limita la representatividad de los resultados.
- El estudio se centró en un número limitado de especies de *Micrurus*, excluyendo a otras especies cuya variabilidad en la composición del veneno podría influir en la efectividad de los antivenenos.
- La variabilidad genética de los pacientes potenciales puede influir en la eficacia de los tratamientos diseñados, lo que no se puede predecir completamente a partir de análisis bioinformáticos.

8. REFERENCIAS

1. Grupo de vigilancia y control de enfermedades transmisibles. Protocolo de vigilancia de Accidente ofídico. 13 de septiembre de 2010; p1–21.
2. Instituto Nacional de Salud. Protocolo de vigilancia de Accidente ofídico. 2022.
3. González Gómez A. Aislamiento de genes codificantes para α -neurotoxinas de acción postsináptica de *Micrurus dumerilli carinicauda*. [Tesis] Bogotá: Universidad Nacional de Colombia ; 2020.
4. Perfectti F, Picó F, Gómez J. *La huella genética de la selección natural*. Ecosistemas [Internet]. 2009;18(1):10-16. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=54012158003>
5. Teixeira dos Santos N. Ações da β -micrustoxina, uma fosfolipase A2 do veneno da serpente *Micrurus lemniscatus*, sobre a proliferação celular e a apoptose de astrócitos em cultura e os mecanismos envolvidos [tesis]. São Paulo: Instituto Butantan; 2019.
6. Rodríguez-Vargas A, Franco-Vásquez AM, Triana-Cerón M, Alam-Rojas SN, Escobar-Wilches DC, Corzo G, et al. Immunological Cross-Reactivity and Preclinical Assessment of a Colombian Anticoral Antivenom against the Venoms of Three *Micrurus* Species. *Toxins*. 2024;16(2):104. DOI: 10.3390/toxins16020104.
7. Piedrahita JD, Cardona-Ruda A, Perea-Jiménez JA, Rey-Suárez P. In-depth immunorecognition and neutralization analyses of *Micrurus mipartitus* and *M. dumerilii* venoms and toxins by a commercial antivenom. *Biochimie*. 2024;216:120-125. DOI: 10.1016/j.biochi.2023.10.009.
8. Castro KL, Duarte CG, Ramos HR, Machado de Avila RA, Schneider FS, Oliveira D, et al. Identification and characterization of B-cell epitopes of 3FTx and PLA2 toxins from *Micrurus corallinus* snake venom. *Toxicon*. 2015;93:51-60. doi:10.1016/j.toxicon.2014.10.015
9. De la Rosa G, Corrales-García LL, Rodríguez-Ruiz X, López-Vera E, Corzo G. Short-chain consensus alpha-neurotoxin: a synthetic 60-mer peptide with generic traits and enhanced immunogenic properties. *Amino Acids*. 2018 Jul;50(7):885-895. doi: 10.1007/s00726-018-2556-0.
10. hain alpha-neurotoxins: Immunogenicity effect against elapid venoms. *Peptides (NY)*. febrero de 2017;88:80–6.

11. Instituto Nacional de Salud (INS). Etapas para la obtención de antivenenos [Internet]. 2021 [citado 2024 oct 9]. Disponible en:
<https://www.ins.gov.co/Direcciones/Produccion/Paginas/etapas-para-la-obtencion-de-anti-venenos.aspx>
12. Sarmiento K. Aspectos biomédicos del accidente ofídico . *Universitas Médicas* . enero de 2012;53:68–82.
13. Kamal Y, Afrose S, Anwar F, Ullah MF, Rizwan M, Khan MN, et al. The role of venom peptides and proteins in the pathogenesis of snakebite envenomation: A review. *Toxins*. 2023;15(7):410. DOI: 10.3390/toxins15070410.
14. Gómez J. Accidente ofídico: un problema de salud pública en Colombia. Instituto Nacional de Salud; 2022.
15. Sarmiento K, Torres I, Guerra M, Ríos C, Zapata C, Suárez F. Epidemiological characterization of ophidian accidents in a Colombian tertiary referral hospital. Retrospective study 2004-2014. *Revista de la Facultad de Medicina*. 1 de abril de 2018;66(2):153–8.
16. Universidad Nacional de Colombia I de CN, Instituto Nacional de Salud. PROGRAMA NACIONAL PARA LA CONSERVACIÓN DE LAS SERPIENTES PRESENTES EN COLOMBIA . 2016.
17. Informe del evento, Accidente ofídico Colombia . 2024.
18. Ministerio de Salud y Protección Social. Circular 092 de 2004, Colombia [Internet]. Bogotá: Ministerio de Salud y Protección Social; 2004. Disponible en:
https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/CIRCULAR%202004.pdf
19. Serpientes de importancia médica, venenos y manejo prehospitalario del accidente ofídico: Curso básico / Instituto Nacional de Salud. Bogotá D.C., 2020;19.
20. GBIF.org. 6 de marzo de 2024; Disponible en <https://doi.org/10.15468/dl.m8dm5t>
21. González Vega J. Aproximación de una clave taxonómica de las especies Elapidae presentes en Colombia . [Bogotá]: Pontificia Universidad Javeriana; 2022.
22. CAMPOS ARCE J. Caracterización bioquímica y biológica del veneno de la serpiente de coral *Micrurus distans*. [Morelos]: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS; 2022.

23. Bolivar Barbosa, J Caracterización bioquímica parcial del veneno de las especies *Micrurus medemi*, *Micrurus sangilensis* y *Micrurus lemniscatus* de Colombia. 2019. Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá Facultad de Medicina Departamento de Toxicología.
24. Gutiérrez J. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2002;
25. Nirthanan S, Gwee MCE. Three-Finger α -Neurotoxins and the Nicotinic Acetylcholine Receptor, Forty Years On. *J Pharmacol Sci.* 2004;94(1):1–17
26. Casewell NR, Wagstaff SC, Wüster W, Cook DAN, Bolton FMS, King SI, et al. Medically important differences in snake venom composition are dictated by distinct postgenomic mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 24 de junio de 2014;111(25):9205–10.
27. Vasilyeva NA, Loktyushov E V., Bychkov ML, Shenkarev ZO, Lyukmanova EN. Three-finger proteins from the Ly6/uPAR family: Functional diversity within one structural motif. *Biochemistry (Moscow).* 3 de diciembre de 2017;82(13):1702–15.
28. Da Silva Jr NJ, Aird SD. Prey specificity, comparative lethality and composition a differences of coral snake venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.* 2001;128(3):425-56.
29. Sunagar K, Jackson T, Undheim E, Ali Syed, Antunes A, Fry B. Three-Fingered RAVERS: Rapid Accumulation of Variations in Exposed Residues of Snake Venom Toxins. *Toxins (Basel).* 18 de noviembre de 2013;5(11):2172–208.
30. Doley R, Pahari S, Mackessy SP, Kini RM. Accelerated exchange of exon segments in Viperid three-finger toxin genes (*Sistrurus catenatus edwardsii*; Desert Massasauga). *BMC Evol Biol.* 8 de diciembre de 2008;8(1):196.
31. Utkin YN. Last decade update for three-finger toxins: Newly emerging structures and biological activities. *World Journal of Biological Chemistry.* 2019;10(1):17-27.
32. Fry BG, Wuster W, Kini RM, Brusich V, Khan A, Venkataraman D, et al. Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins. *J Mol Evol.* 2003;57(1):110-29.

33. Sarmiento K, Rodríguez A, Quevedo-Buitrago W, Torres I, Ríos C, Ruíz L, et al. Comparación de la eficacia, la seguridad y la farmacocinética de los antivenenos antiofídicos: revisión de literatura. *Universitas Médica*. el 16 de diciembre de 2019;61
34. Espino-Solis GP, Riaño-Umbarila L, Becerril B, Possani LD. Antidotes against venomous animals: State of the art and prospectives. *J Proteomics*. marzo de 2009;72(2):183–99.
35. Ciscotto PHC, Rates B, Silva DAF, Richardson M, Silva LP, Andrade H, et al. Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species. *J Proteomics*. agosto de 2011;74(9):1810–25.
36. Chacón D, Rodríguez S, Arias J, Solano G, Bonilla F, Gómez A. Maintaining Coral Snakes (*Micrurus nigrocinctus*, Serpentes: Elapidae) for venom production on an alternative fish-based diet. *Toxicon*. septiembre de 2012;60(3):249–53.
37. Belmonte SM. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA (DL50) DE CINCO ESPECIES DEL GÉNERO MICRURUS EN ESTADO DE CAUTIVERIO EN NILO–CUNDINAMARCA (COLOMBIA). 2007;
38. Gómez J. Accidente ofídico, Seminario de accidente por animales venenosos. Medellín; 2015.
39. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. . *Revista Baiana de Saúde Pública*,. 2001;76.
40. Otero R. Manual de diagnóstico y tratamiento del accidente ofídico. Medellín; 1994. 81p.
41. The UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res*. 2023;51–D531.
42. Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, UGENE team. Unipro UGENE: un conjunto de herramientas bioinformáticas unificadas. *Bioinformatics*. 2012;28:1166-1167. doi: 10.1093/bioinformatics/bts091.
43. Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, Marcatili P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res (Web Server issue)*. 2017;2:2. PMID: 28472356.
44. Kolaskar AS, Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett*. 1990;276(1-2):172-4. doi:10.1016/0014-5793(90)80535-q.

45. Paul S, Sidney J, Sette A, Peters B. TepiTool: una herramienta para la predicción computacional de candidatos a epítopos de células T. *Curr Protoc Immunol*. 2016;114:18.19.1-18.19.24. PMID: 27479659.
46. Bui H. H, Sidney J, Li W, Füsseder N, Sette A., 2007. Development of an epitope conservancy analysis tool to facilitate the design of epitope-based diagnostics and vaccines. *BMC Bioinformatics* **8(1)**:361. [PMID: 17897458](#)
47. Paul S, Arlehamn CSL, Scriba TJ, Dillon MB, Oseroff C, Hinz D, McKinney DM, Pro SC, Sidney J, Peters B, Sette A. 2015. Development and validation of a broad scheme for prediction of HLA class II restricted T cell epitopes. *Journal of immunological methods*. **422**: 28-34. [PMID: 25862607](#)
48. Lamiable A, Thévenet P, Rey J, Vavrusa M, Derreumaux P, Tufféry P. PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jul 8;44(W1) DOI: 10.1093/nar/gkw329.
49. PyMOL - The PyMOL Molecular Graphics System, Version 3.0 Schrödinger, LLC.
50. National Center for Biotechnology Information. NCBI [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine; [citado 2024 Sep 25]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
51. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, Schwede T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*. 2018;46 doi:10.1093/nar/gky427.
52. Saha, S. and Raghava, G.P.S. (2006) AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. *Nucleic Acids Research*, Volume 34, W202-W209.
53. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*; (In) [John M. Walker \(ed\): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press \(2005\)](#), pp. 571-607
54. Bui HH, Sidney J, Dinh K, Southwood S, Newman MJ, Sette A. Predicting population coverage of T-cell epitope-based diagnostics and vaccines. *BMC Bioinformatics*. 2006;17:153. PMID: 16545123.

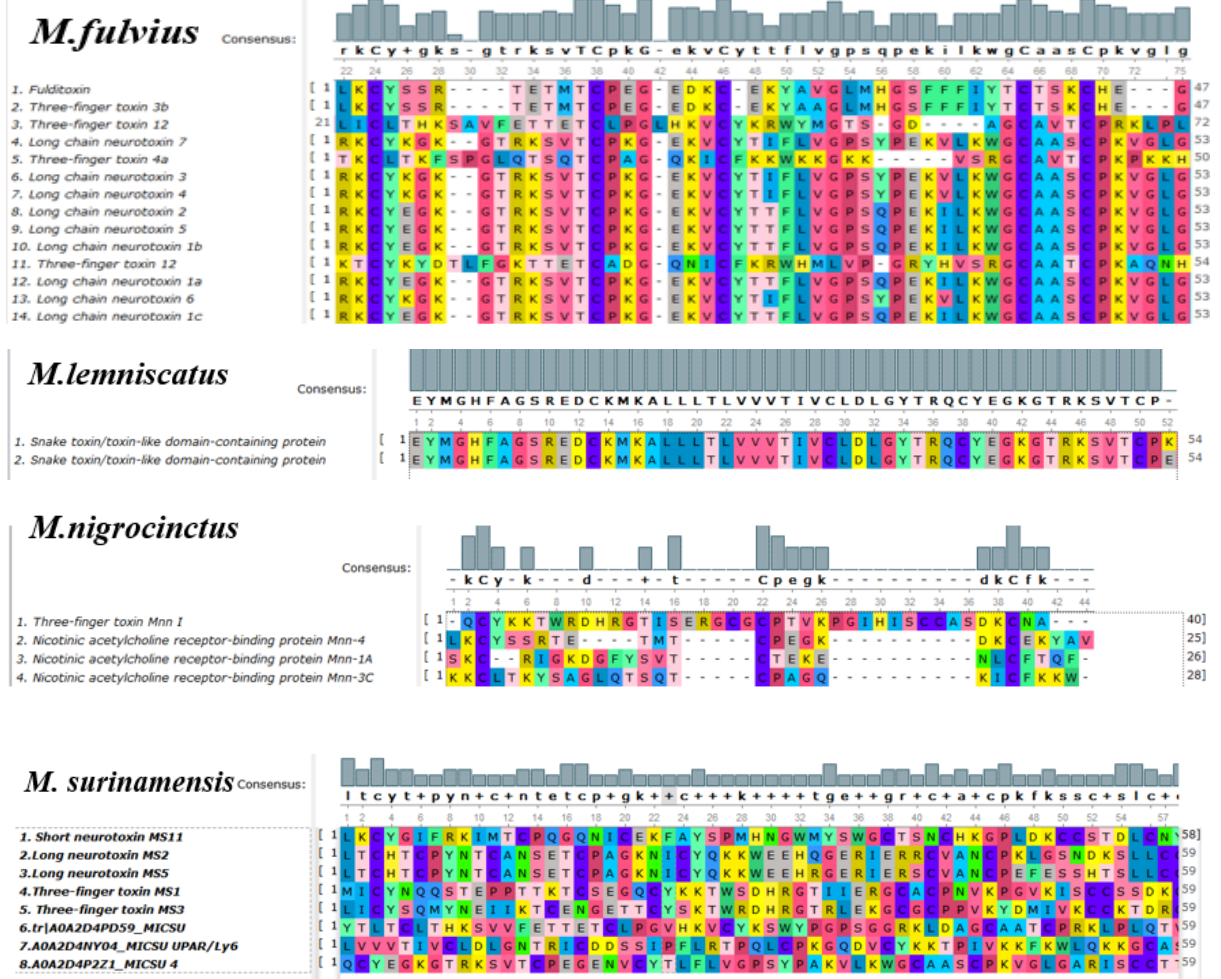
55. Yang J, Roy A, Zhang Y. Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. *Bioinformatics*. 2013;29(20):2588-2595.
56. Chan YW, Khamis A, Khakpoor A, Khuu M, Montalvo E, Valverde R, et al. An immunoinformatic approach to assessing the immunogenic capacity of alpha-neurotoxins in elapid snake venoms. *Front Pharmacol*. 2023 Apr;14:1143437. doi: 10.3389/fphar.2023.1143437.
57. Grahadi R, Rusmili M, Halim S, Makanji A, Ridhwan A, Mohd Ali M. Virtual prediction of potential immunogenic epitope of candoxin protein from Malayan krait (*Bungarus candidus*) venom. *J Pharm Pharmacogn Res*. 2022;10(6):1048-1057. DOI: 10.56499/jppres.v10i6.1239.
58. Kurniawan N, Kurniasari CA, Fatchiyah. In Silico Prediction of Malayan Krait (*Bungarus candidus*) PLA2 Epitope. *Systematic Reviews in Pharmacy*. 2020; 11(10): 537-548. doi: 10.31838/srp.2020.10.81.
59. Khan Academy. Selección natural [Internet]. Available from: <https://www.khanacademy.org/science/biology/her/tree-of-life/a/natural-selection>
60. López Carrascal CE. Los nuevos pilares de la teoría evolutiva a la luz de la genómica. *Acta Biol Colomb* [Internet]. 2011 sept-dic [citado 2024 nov 26];16(3):197-212. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2011000300006
61. Olivares Vergara M. Análisis de la redundancia genética en la ruta de síntesis de alcaloides Bencilisoquinolónicos en *Argemone mexicana* L. Mérida, Yucatán, México; 2016.
62. National Center for Science Education. ¿Qué es homología? [Internet]. 2024 [citado 2024 Oct 9]. Available from: <https://ncse.ngo/que-es-homologia>
63. National Human Genome Research Institute. Fenotipo [Internet]. 2024 [citado 2024 Oct 9]. Available from: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Fenotipo>
64. ICR Cat. Ptosis palpebral o párpado caído [Internet]. Available from: <https://icrcat.com/enfermedades-oculares/ptosis-palpebral-o-parpado-caido/> [citado 2024 Oct 9].

65. Kuri Morales P. NORMA Oficial Mexicana NOM-036-SSA2-2012, Prevención y control de enfermedades. Aplicación de vacunas, toxoides, faboterápicos (sueros) e inmunoglobulinas en el humano. 2012.
66. García GA, García Cardona A. Fosfolipasas A2: Grandes familias y mecanismos de acción. *Revista Repertorio de Medicina y Cirugía*. 1 de diciembre de 2009;18(4):199–209.
67. Hernández-Montoya J, Pérez-Rubio G, Pérez Ramos J, Montaña Ramírez M, Ramos Abraham C, Ramírez Venegas A, et al. Participación de las metaloproteinasas de matriz extracelular en la EPOC. *Neumol Cir Torax* [Internet]. 2014 abr-jun [citado 2024 nov 26];73(2):71-81. Disponible en:
https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0028-37462014000200005
68. Eianez A. Capítulo 4: Inmunidad adaptativa. [Internet]. Universidad de Granada; 2024 [citado 2024 Oct 9]. Available from: https://www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap_04.htm
69. Psiquiatria.com. Acetilcolina (Ach) [Internet]. [citado 2024 Oct 9]. Available from: https://psiquiatria.com/buscar.php?wbusqtxt=acetilcolina®ister_vars%5Bwbusqarea%5D=
70. Manríquez G. Universidad de Chile. Facultad de Medicina. ICBM. Programa de Genética Humana. Facultad de Cs. Sociales. Departamento de Antropología,. 2011. Teorías de evolución.
71. Clínica Universidad de Navarra. Heterodímero [Internet]. [citado 2024 Oct 9]. Available from: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/heterodimero>
72. BIREME. Guía de términos en salud. [Internet]. 2024 [citado 2024 Oct 9]. Available from: <https://decs.bvsalud.org/es/ths/resource/?id=33840>
73. Flórez-Torres F, Gutiérrez-Montes A, Chavarría R. Análisis del comportamiento en el consumo de sustancias psicoactivas en estudiantes universitarios. *Biosalud*. 2021;16(2):9-17
74. Instituto Roche. Gap - Gap [Internet]. Glosario de términos. 2024 [citado 2024 Oct 9]. Available from: <https://www.institutoroche.es/recursos/glosario/gap>

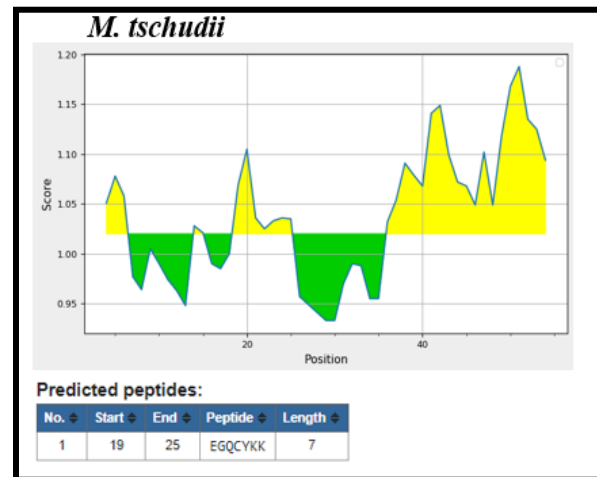
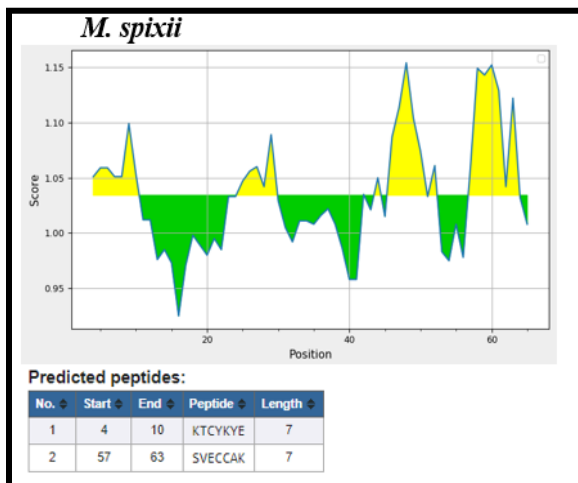
9. Anexos

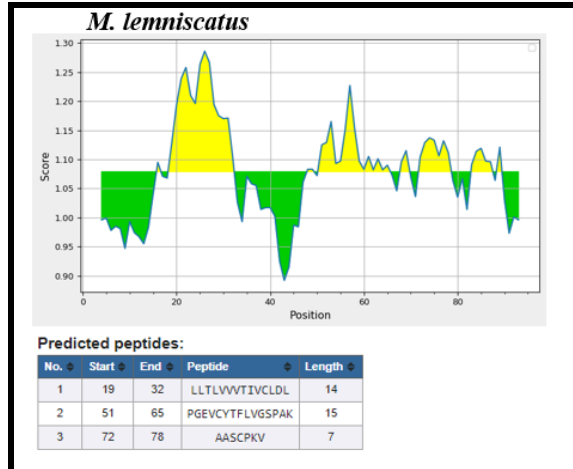
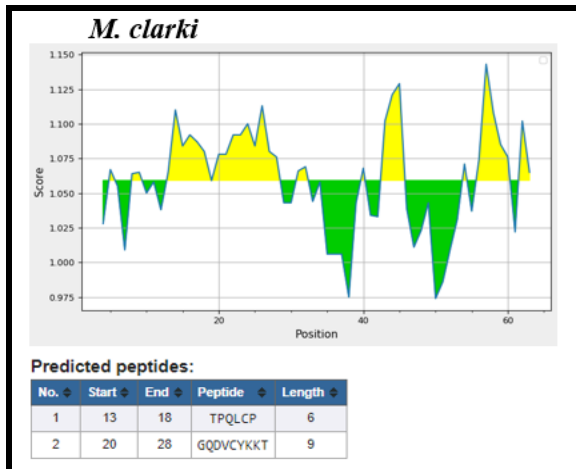
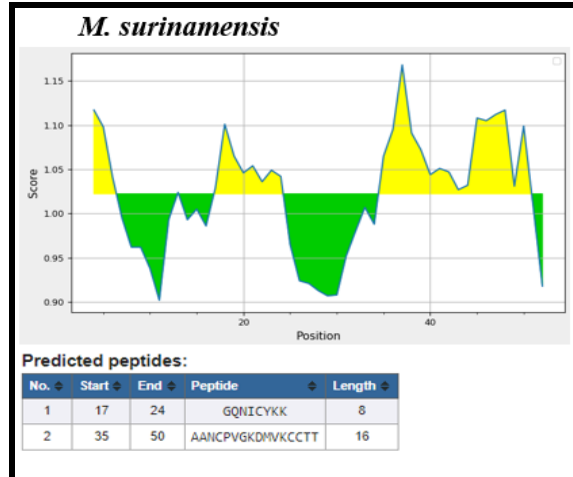
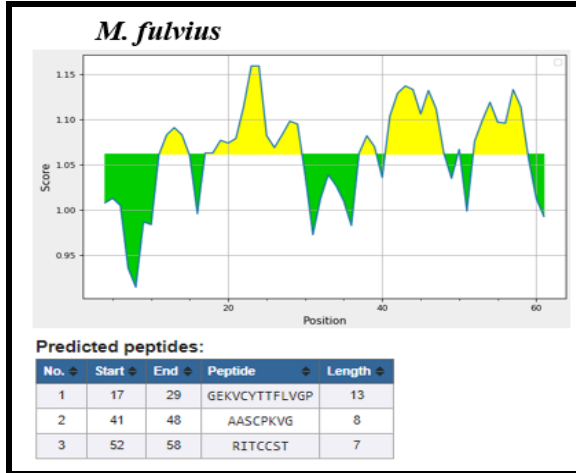
Anexos	
1. Generación de secuencias consenso de 3FTx	Generación de secuencias consenso de 3FTx mediante herramientas bioinformáticas, mostrando el alineamiento entre diferentes especies del género <i>Micrurus</i> .
2. Estimación de Determinantes Antigénicos en Células B	Estimación de los determinantes antigénicos en células B utilizando algoritmos predictivos bioinformáticos, destacando las regiones con mayor potencial inmunogénico en las secuencias analizadas.
3. Identificación de epítopes en secuencia consenso	Identificación de epítopes en la secuencia consenso mediante análisis bioinformático, resaltando las regiones clave con potencial inmunogénico
4. Modelo 3D de los epítopes	Modelo 3D de los epítopes generados a partir de la secuencia consenso, mostrando su estructura espacial.
5. Análisis de los resultados del Docking – LigPlot	Análisis de los resultados del docking molecular mediante LigPlot, ilustrando las interacciones no covalentes entre los epítopes y su receptor.
6. Glosario	Glosario de términos clave utilizados en el estudio, proporcionando definiciones y descripciones para facilitar la comprensión de conceptos bioinformáticos y biológicos
7. Encuentro internacional y XII semana de investigación. modalidad poster - FABA UDES	Incluye la presentación del póster como propuesta de investigación, certificados de ponentes y certificado como ganadoras al mejor póster.
8. Evento El accidente ofídico desde el Enfoque biológico-UCMC	Incluye la agenda del evento desarrollado y certificados como organizadores del evento.

1. Generación de secuencias consenso de 3FTx

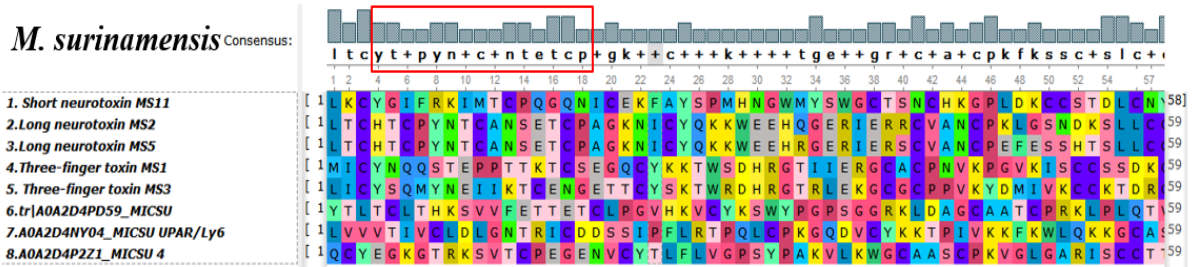


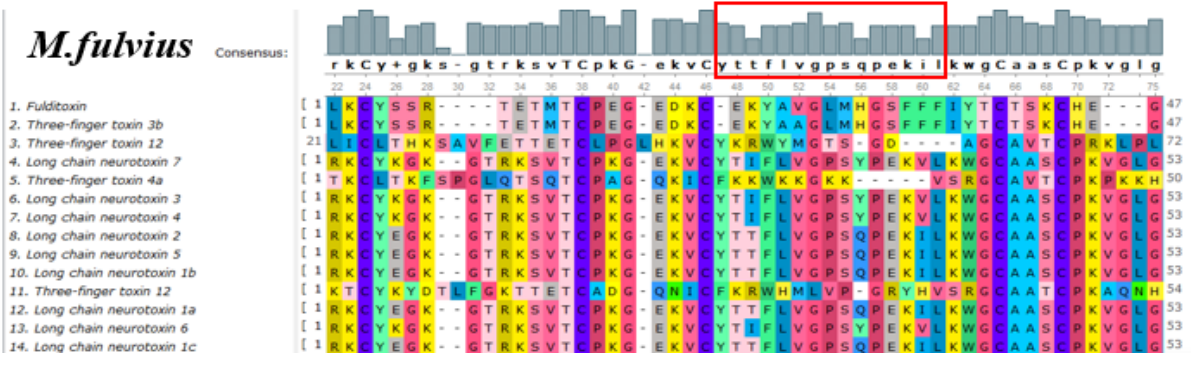
2. Estimación de Determinantes Antigénicos en Células B





3. Identificación de epítomos en secuencia consenso





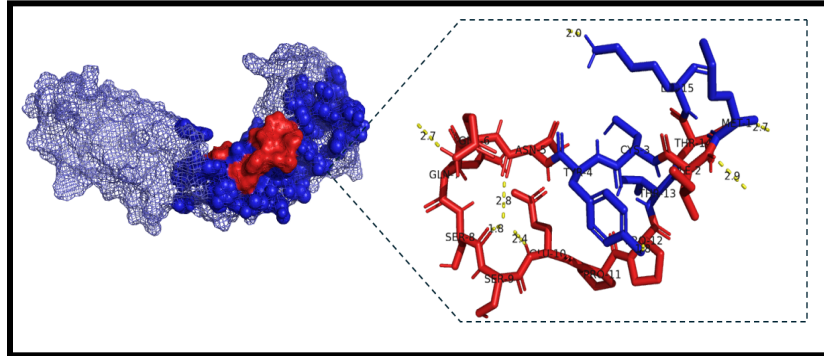
4. Modelo 3D de los epítipes

<p>A</p> <p><i>M. spixii</i></p>	<p>B</p> <p><i>M. tschudii 1</i></p>	<p>C</p> <p><i>M. tschudii 2</i></p>	<p>D</p> <p><i>M. fulvius</i></p>
<p>E</p> <p><i>M. surinamensis</i></p>	<p>F</p> <p><i>M. clarki 1</i></p>	<p>G</p> <p><i>M. clarki 2</i></p>	<p>H</p> <p><i>M. lemniscatus</i></p>

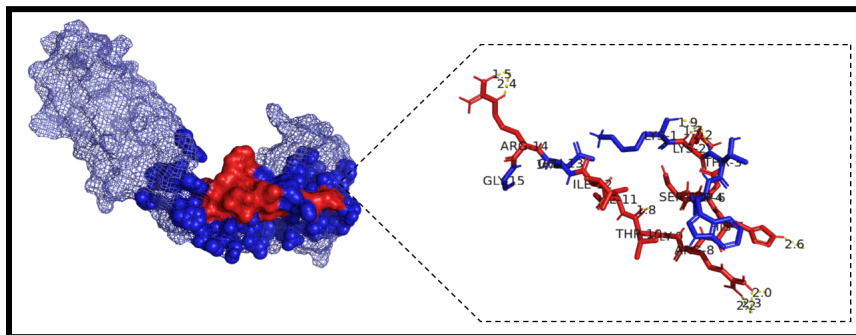
- A. 9-YEKLFGKTTETCPDE-23 B.1-MICYNQQSSEPPTTK-15
 C. 24-KKTWSDHRGTHIERG-38 D. 22-YTTFLVGPSQPEKIL-36
 E. 4-YTQYNEFKTETCPGQ-18 F.31-VKKFKWLQKKGCASS-45
 G. 26-KKTPIVKKFKWLQKK-40 H. 56-YTFLVGSPAKVLKWG-70

5 Análisis de los resultados del Docking – LigPlot

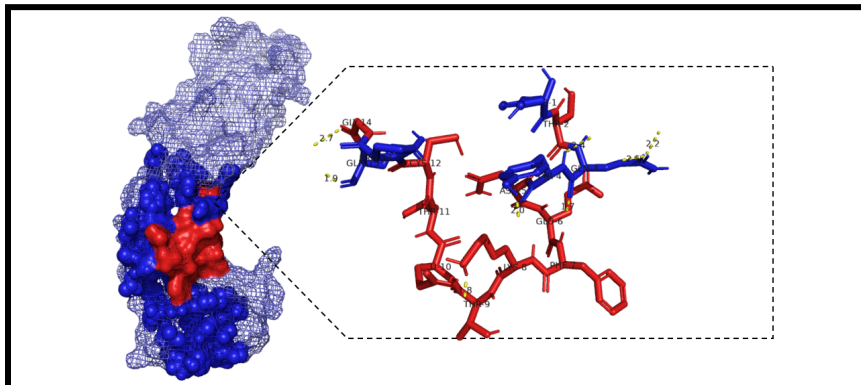
- Acoplamiento molecular de HLA-DRB1 con epítipo 1 de *M. tschudii*



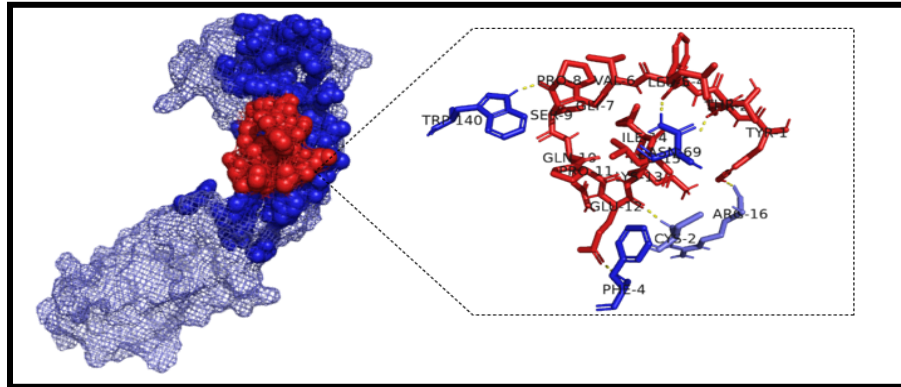
- Acoplamiento molecular de HLA-DRB1 con epítipo 2 de *M. tschudii*



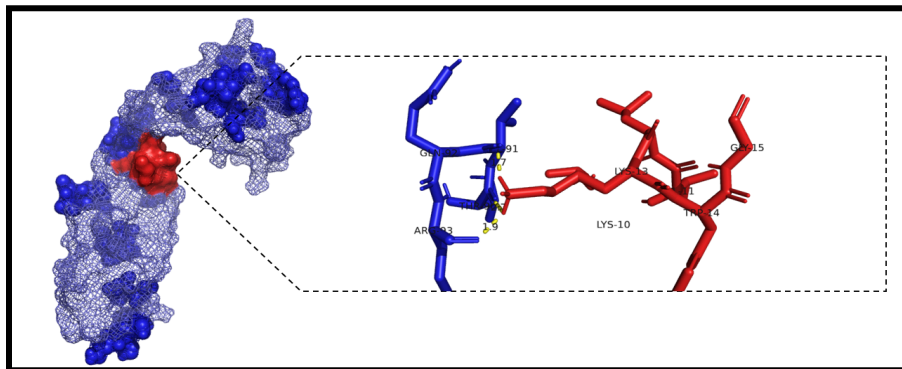
- Acoplamiento molecular de HLA-DRB1 con epítipo de *M. surinamensis*



- Acoplamiento molecular de HLA-DRB1 con epítipo 2 de *M. fulvius*



- Acoplamiento molecular de HLA-DRB3 con epítipo 2 de *M. lemniscatus*



6. Glosario

Selección darwiniana: Proceso evolutivo en el cual la idea de las especies cambian a los largo del tiempo basándose en adaptaciones, se da origen a nuevas especies que comparten un ancestro en común (59).

Neofuncionalización: Una de las copias del gen adquiere una nueva función que lo beneficia y es preservada por selección natural, sin embargo conserva la otra copia de su función original (60).

Parálogo: Dos copias génicas generadas por duplicación pero que no están acompañados de procesos de especiación (60).

Selección positiva: Incremento de polimorfismos benéficos en el gen, fijación de un alelo ventajoso (61).

Homología: rasgo o característica que es compartida por todos los descendientes de un ancestro común, y no compartida con otros grupos (62).

Fenotipo: Rasgo observable a nivel físico en un organismo, tal como tamaño o color (63).

Ptois palpebral: Caída anormal del párpado superior ocasionado por una disfunción del músculo elevador (64).

Faboterápico: tipo de suero heterólogo hiperinmune específico, concentrado, digerido y purificado por acción enzimática con pepsina, en donde se elimina la fracción Fc obteniendo las fracciones F(ab')₂ principalmente (65).

Fosfolipasas A2: grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de ácidos grasos en la posición sn-2 de los fosfolípidos presentes en la membrana de las células (66).

Metaloproteinasas: Son enzimas que degradan componentes de la matriz extracelular y participan en el mantenimiento y remodelación de tejidos, dependen de calcio, actúan a pH neutro, se sintetizan como zimógenos en el núcleo y finalmente se almacenan en los gránulos de los macrófagos y neutrófilos (67).

Fracción Fc: Hace referencia a la región constante de grupos Carbono-Hidrógeno situados en el extremo carboxilo de la molécula de Inmunoglobulina (65).

Inmunogenicidad: Se define como la capacidad que tiene un antígeno de inducir una respuesta inmune (65).

Antigenicidad: capacidad de combinarse con anticuerpos y/o con receptores de células T (TCR) (68).

Acetilcolina: Neurotransmisor implicado en la excitación neuronal y muscular mediante la unión a receptores nicotínicos y muscarínicos (69).

Receptor de acetilcolina: proteína específica presente en la membrana celular de una célula nerviosa o muscular que se activa cuando la acetilcolina se une a él (69).

Selección negativa: Tipo de evolución que trata de conservar intactos los rasgos de una especie (70).

Heterodímero: molécula compuesta por dos componentes diferentes, pero estrechamente relacionados, que se unen para formar una entidad funcional única, como una proteína compuesta por la unión de dos cadenas separadas (71).

Isoformas: Corresponde a distintas formas de una proteína que son originadas de un mismo gen (72).

Antisuero monovalente: Suero específico contra una determinada especie de veneno (73).

Antisuero polivalente: Suero específico contra una amplia gama de especies de venenos (73).

Gaps: Ausencia de una o más bases en una de las hebras del DNA dúplex (74).