



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA

TESIS

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL VENENO DE TRES SERPIENTES DE CASCABEL  
DE MONTAÑA (*Crotalus aquilus*, *C. lepidus klauberi* y *C. lepidus xaquilus*).

PRESENTA

Eric Abdel Rivas Mercado

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS; ÁREA DE TOXICOLOGÍA

TUTOR (ES)

Dr. en C. Eduardo de la Cerda González

COMITÉ TUTORAL

Dr. en C. Francisco Anibal Posadas del Río

M. en C. José Luis Moreno Hernández Duque

Aguascalientes, Ags, Noviembre de 2014.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

**M. en C. José de Jesús Ruiz Gallegos**  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
P R E S E N T E

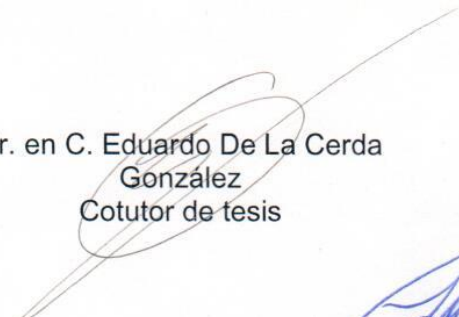
Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **ERIC ABDEL RIVAS MERCADO** con ID 69308 quien realizó el trabajo práctico de tesis titulado: **CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL VENENO DE TRES SERPIENTES DE CASCABEL DE MONTAÑA (*Crotalus aquilus*, *C. lepidus klauberi* y *C. lepidus x aquilus*)**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirlo, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

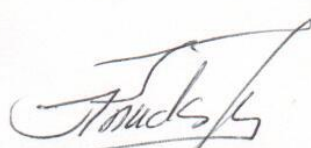
Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.


ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 24 de Octubre de 2014.

  
Dr. en C. Eduardo De La Cerda  
González  
Cotutor de tesis

  
Dr. En C. Francisco Aníbal Posadas  
Del río  
Cotutor de tesis

  
M. en C. José Luis Moreno Hernández Duque.  
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado  
c.c.p.- Jefatura del Depto. de \_\_\_\_\_  
c.c.p.- Consejero Académico  
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

**BIOL. ERIC ABDEL RIVAS MERCADO  
ALUMNO (A) DE LA MAESTRÍA EN  
CIENCIAS EN EL ÁREA DE TOXICOLOGÍA  
P R E S E N T E .**

Estimado (a) alumno (a) Rivas:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: "**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL VENENO DE TRES SERPIENTES DE CASCABEL DE MONTAÑA (*Crotalus aquilus*, *C. lepidus klauberi* y *C. lepidus x aquilus*)**", hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE  
Aguascalientes, Ags., 24 de octubre de 2014  
"SE LUMEN PROFERRE"  
EL DECANO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS



## **AGRADECIMIENTOS.**

A mis padres: Lic. José Reyes Rivas Enríquez y Bertha Alicia Mercado Romo por su esfuerzo e incondicional apoyo brindado.

A mi novia: Kattia Estefanía Aguirre Ramírez, por brindarme un apoyo integral, durante la elaboración de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindar beca de manutención durante el tiempo en que se realizó este trabajo.

A mi comité de tutores: Dr. en C. Eduardo de la Cerda González, Dr. en C. Francisco Anibal Posadas del Río y M. en C. José Luis Moreno Hernández Duque.

Por su importante colaboración para los trabajos de campo y colecta a SEMARNAT, por brindar el permiso de colecta de los organismos.

A mi grupo de apoyo de campo: M en C. Rubén Alonso Carbajal Márquez, Biol. Marco Antonio Domínguez de la Riva, Biol. Juan Daniel Rendón Trinidad, Kattia Estefanía Aguirre Ramírez.

Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano, Investigador Titular “C”.

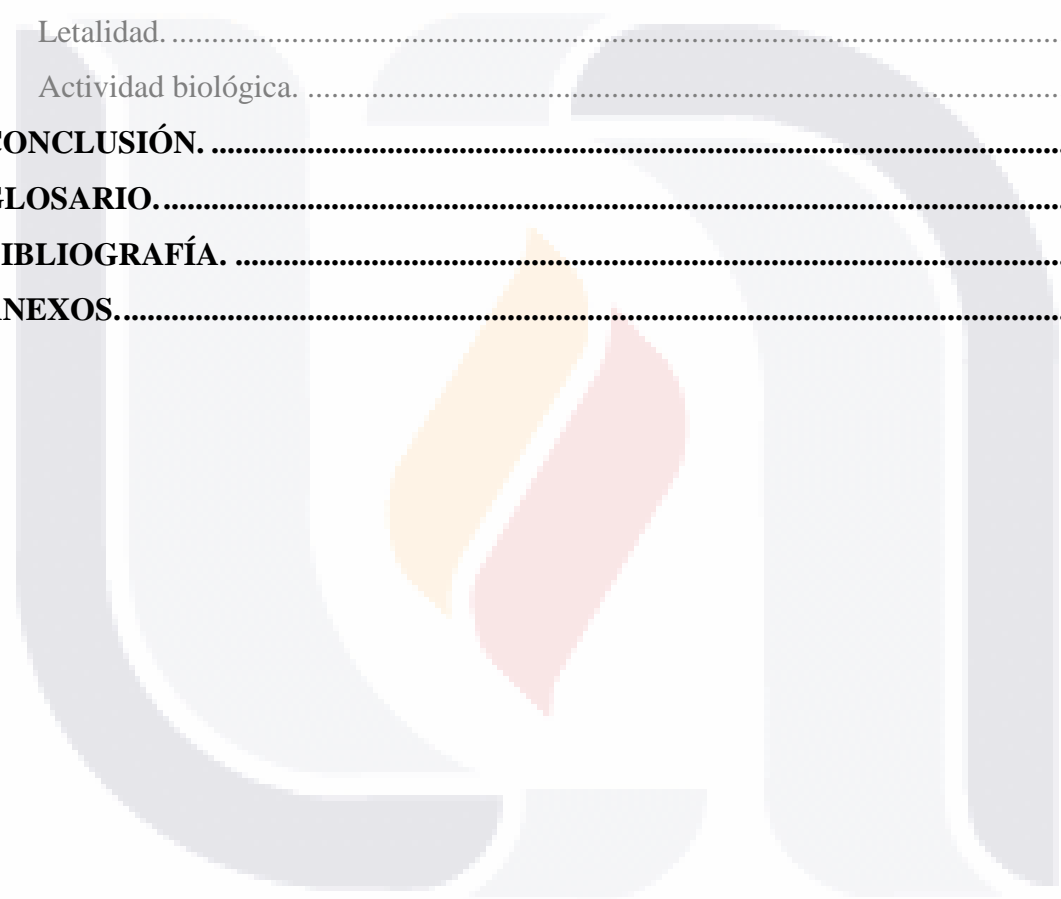
M. en C. Melisa Bénard Valle y M. en C. Edgar Neri, ayudante de investigador Instituto de Biotecnología, UNAM. Por brindarme la posibilidad de llevar a cabo dos estancias de investigación en los laboratorios del IBt UNAM.

## ÍNDICE GENERAL.

<b>ÍNDICE GENERAL.</b> .....	<b>1</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.</b> .....	<b>4</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.</b> .....	<b>5</b>
<b>ACRÓNIMOS.</b> .....	<b>6</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN.</b> .....	<b>10</b>
<b>1. Clasificación taxonómica de los reptiles.</b> .....	<b>12</b>
<b>2. Reptiles venenosos</b> .....	<b>13</b>
<b>3. Aparato inoculador de veneno.</b> .....	<b>14</b>
3.1 Serpientes venenosas en México.....	15
3.2 Serpientes venenosas en el estado de Aguascalientes.....	15
<b>4. Organismos de estudio</b> .....	<b>16</b>
4.1 <i>Crotalus aquilus</i> (Klauber, 1952). .....	16
4.2 <i>Crotalus lepidus klauberi</i> (Kennicott, 1861). .....	17
4.3 <i>Crotalus lepidus x aquilus</i> (Bryson R. W., 2010). .....	19
<b>5. Caso clínico</b> .....	<b>19</b>
<b>6. Veneno de serpientes.</b> .....	<b>22</b>
6.1 Características del veneno de serpientes y sus efectos.....	22
6.2 Principales componentes del veneno de serpientes.....	23
Metaloproteasas (SVMP's). .....	24
Serin proteasas tipo trombina (SVSPs). .....	25
Nucleasas, nucleotidasas y fosfomonoesterasas.....	25
Fosfolipasas A <sub>2</sub> . .....	26
Acetilcolinesterasa.....	27
L-Aminoácido oxidasas.....	28

Agentes anti – agregación plaquetaria.....	29
6.3 Toxinas como agentes terapéuticos.....	30
Agentes pro y anti – coagulantes.....	34
Agentes anti – cáncer.....	34
Desintegrinas.....	35
Crotoxina.....	37
<b>7. Hipótesis.....</b>	<b>39</b>
<b>8. Ojetivos.....</b>	<b>39</b>
8.1 Objetivo general.....	39
8.2 Objetivos particulares.....	39
<b>9. Materiales y metodología.....</b>	<b>40</b>
9.1 Trabajo de campo; colecta de los ejemplares de víbora de cascabel.....	40
9.2 Extracción y liofilización del veneno.....	41
9.3 Cuantificación de proteína por el método del ácido bicinconónico (BCA).....	41
9.4 Cuantificación de proteína por absorbancia a 280 nm.....	42
9.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de Dodecil sulfato sódico (SDS – PAGE).....	42
9.6. Cromatografía líquida de alta resolución, fase reversa (RP-HPLC).....	43
9.7 Dosis letal media (DL <sub>50</sub> ).....	44
9.8 Actividad procoagulante.....	45
9.9 Actividad proteolítica sobre azocaseína.....	45
9.10 Detección de crotoxina: Western blot semi – seco.....	46
9.11 Detección y cuantificación de crotoxina mediante ELISA.....	47
<b>10. Resultados.....</b>	<b>49</b>
10.1 Trabajo de campo; colecta de los ejemplares de víboras de cascabel.....	49
10.2 Extracción, liofilización y cuantificación de proteína del veneno de cada serpiente, peso en mg/ordeña, BCA y absorbancia a 280nm.....	49
10.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS - PAGE).....	50
10.4 Cromatografía líquida de alta resolución, fase reversa (RP-HPLC).....	52

10.5 Dosis letal media (DL <sub>50</sub> ). .....	54
10.6 Actividad pro coagulante. ....	55
10.7 Actividad proteolítica sobre azocaseína. ....	56
10.8 Detección de Crotoxina por RP – HPLC. ....	57
10.9 Detección de crotoxina: Western blot semi – seco. ....	58
10.10 Detección y cuantificación de Crotoxina mediante ELISA. ....	59
<b>11. Discusiones.....</b>	<b>60</b>
Letalidad. ....	62
Actividad biológica. ....	64
<b>CONCLUSIÓN. ....</b>	<b>67</b>
<b>GLOSARIO.....</b>	<b>68</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA. ....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>86</b>



**ÍNDICE DE TABLAS.**

**Tabla 1.** Horarios de los recorridos para colecta en campo de serpientes. ....40

**Tabla 2.** Gradiente de elución. ....43

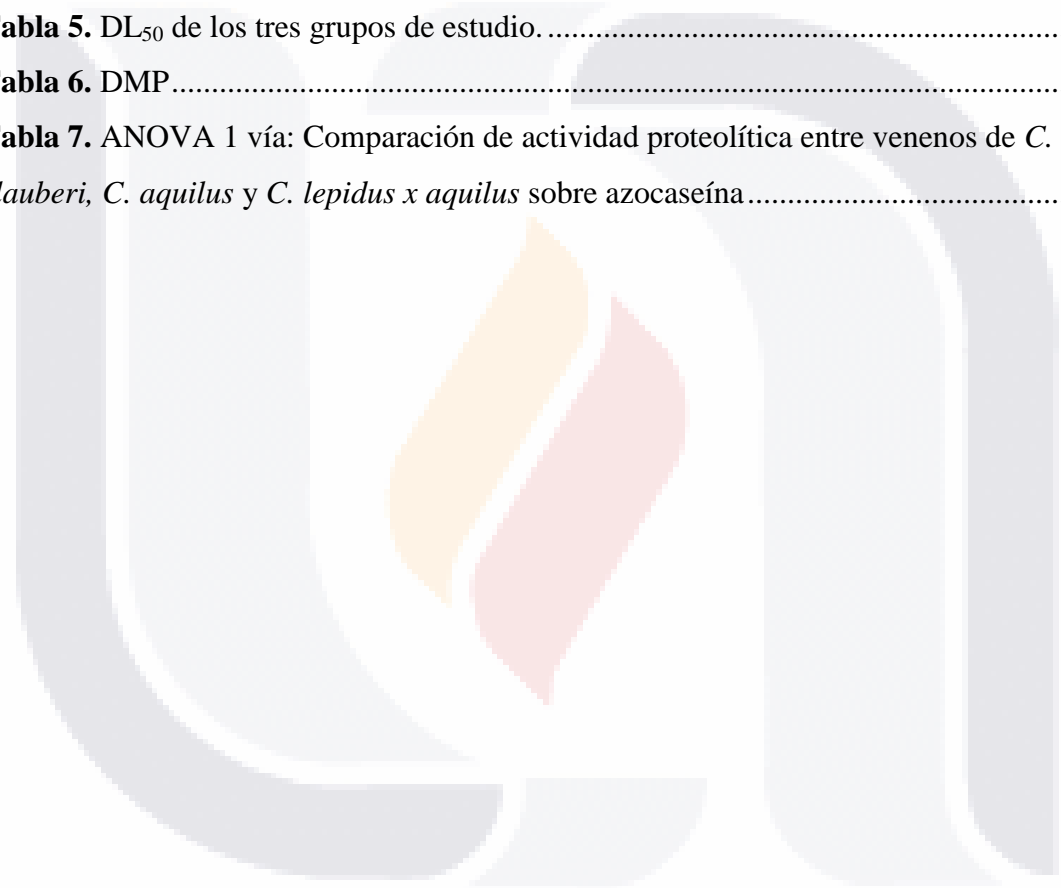
**Tabla 3.** Cuantificación de proteína en mg/ordeña, BCA y .....49

**Tabla 4.** Cuantificación de proteína de los “pool” de veneno de los tres grupos de serpientes en estudio; por peso seco y BCA. ....50

**Tabla 5.** DL<sub>50</sub> de los tres grupos de estudio. ....54

**Tabla 6.** DMP.....55

**Tabla 7.** ANOVA 1 vía: Comparación de actividad proteolítica entre venenos de *C. l. klauberi*, *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus* sobre azocaseína.....56





**ÍNDICE DE FIGURAS.**

**Figura 1.** Morfología de la dentición en serpientes (Lee, 2013)..... 14

**Figura 2.** Víboras de cascabel pigmea *Crotalus aquilus*; localidad del macho: Sierra el Laurel, Aguascalientes. Hembra: Nochistlan, Zacatecas..... 17

**Figura 3.** Víboras de cascabel bandeada de las rocas *Crotalus lepidus klauberi*, macho y hembra, localidad; Montoro, Aguascalientes. .... 18

**Figura 4.** Ejemplar macho adulto de cascabel de montaña *C. lepidus x aquilus*, localidad: Palo Alto, Aguascalientes..... 19

**Figura 5.** (A) Brazo izquierdo del paciente después de una hora de haber sido mordido por una cascabel *C. l. lepidus*. (B) Equimosis en el brazo donde ocurrió la mordedura al cuarto día (fotos tomadas por el paciente). ..... 21

**Figura 6.** Conformación de la cámara semi-seca para la transferencia de proteínas del gel SDS – PAGE a la membrana de nitrocelulosa..... 47

**Figura 7.** SDS-PAGE de venenos individuales y pool en condiciones reductoras..... 51

**Figura 8.** RP – HPLC. Perfiles de elución de los tres pool de veneno. .... 53

**Figura 9.** Gráfica de letalidad con los valores arrojados por los tres pool de veneno ..... 54

**Figura 10.** Actividad procoagulante en el veneno de *C. lepidus x aquilus*..... 55

**Figura 11.** Actividad proteolítica del veneno de las víboras de cascabel (individual y pool); *C. l. klauberi*, *C. aquilus*, *C. lepidus x aquilus* sobre azocaseína. .... 56

**Figura 12.** RP – HPLC. Perfil de elución de Ctx purificada..... 57

**Figura 13.** Detección de Ctx por Western blot ..... 58

**Figura 14.** Cuantificación de Ctx por ELISA. .... 59

## ACRÓNIMOS.

<b>ABTS</b>	Ácido 2,2' – azinobis (3-etilbenzotiazolín) -6-sulfónico
<b>ACE</b>	Enzimas convertidoras de angiotensina.
<b>AChE</b>	Acetilcolinesterasa.
<b>ACh</b>	Acetil colina.
<b>ADAM</b>	Familia de proteínas de membrana multidominio (dominio desintegrina y metaloproteasa).
<b>BCA</b>	Ácido bicinconónico
<b>BChE</b>	Butirilcolinesterasa.
<b>BPP</b>	Péptidos potenciadores de bradiquidinas.
<b>Ctx</b>	Crotoxina.
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis letal media.
<b>DMP</b>	Dosis mínima procoagulante.
<b>ECD</b>	Ácido glutámico, Cisteína, Ácido aspártico.
<b>ECM</b>	Matriz extra celular.
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético.
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
<b>FAD</b>	Flavín Adenín Dinucleótido.
<b>FDA</b>	Administración de fármacos y alimentos de Estados Unidos de América.
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
<b>i.p.</b>	Vía de administración (veneno) intra peritoneal.
<b>i.v.</b>	Vía de administración (veneno) intra venosa.
<b>KGD</b>	Lisina, Glicina, Ácido aspártico.
<b>KTS</b>	Lisina, Treonina, Serina.
<b>M</b>	Molar.
<b>MDG</b>	Metionina, Ácido aspártico, Glicina.
<b>Mg</b>	Miligramo.
<b>Min</b>	Minutos.

<b>mmHg</b>	Milímetros de mercurio.
<b>mM</b>	Milimolar.
<b>mL</b>	Mililitro.
<b>µg</b>	Microgramos.
<b>µL</b>	Microlitro.
<b>MLD</b>	Metionina, Leucina, Ácido aspártico.
<b>MVD</b>	Metionina, Valina, Ácido aspártico.
<b>Nm</b>	Nanómetros.
<b>NOM</b>	Norma oficial mexicana.
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipasas A <sub>2</sub> .
<b>RGD</b>	Arginina, Glicina, Ácido aspártico.
<b>RP – HPLC</b>	Cromatografía líquida de alto rendimiento, fase reversa.
<b>Rpm</b>	Revoluciones por minuto.
<b>RTS</b>	Arginina, Treonina, Serina.
<b>SDS – PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de dodecil sulfato sódico.
<b>SEMARNAT</b>	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
<b>SVMP</b>	Metaloproteasas del veneno de serpientes.
<b>SVSP</b>	Serín proteasas del veneno de serpientes.
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético.
<b>TFT</b>	Toxinas tres dedos.
<b>TLE</b>	Enzimas tipo trombina.
<b>TL- SVSP</b>	Serín proteasa tipo trombina.
<b>VGD</b>	Valina, Glicina, Ácido aspártico.
<b>VIH</b>	Virus de inmunodeficiencia humana.

## RESUMEN.

Existe una cantidad relativamente baja de estudios con enfoque toxicológico y con respecto a las actividades biológicas que poseen los diferentes péptidos presentes en el veneno de las víboras de cascabel de montaña. Debido a esto y al hecho de que la composición del veneno puede variar de una región geográfica a otra, en el presente trabajo se analizaron los venenos de tres grupos de víboras de cascabel (*Crotalus lepidus klauberi*, *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus*), presentes en el estado de Aguascalientes y Zacatecas(México). Esto con la finalidad de observar si existen diferencias importantes en la composición de los venenos de estos tres grupos de serpientes, así como en las actividades biológicas de los péptidos que los componen. La composición de los venenos fue similar, sin embargo, se demostró la presencia de crotoxina en el veneno de *C. l. klauberi* así como actividad procoagulante en el veneno de *C. lepidus x aquilus*. El veneno de *C. aquilus* posee un porcentaje mayor de péptidos de bajo peso molecular (desintegrinas).

## ABSTRACT.

There is relatively small amount of toxicological and biological activities approach studies of mountain rattlesnake venom. Because of this and the fact snake venom composition can vary from each geographic region, in the present work three rattlesnake venoms: *Crotalus lepidus klauberi*, *C. aquilus* and intergrade *C. lepidus x aquilus* from Aguascalientes and Zacatecas (Mexico) were analyzed. The aim of this study was to make a biochemical, toxicological and biological activities analysis of each individual and pooled venoms in order to observe differences at the subspecies and intraspecies levels.

Biochemical composition of the individual and pooled venoms were similar, however the ELISA showed the presence of crotoxin in *C. l. klauberi* venom, and procoagulant activity was observed only in *C. lepidus x aquilus* venom, on the other hand low molecular mass peptides were relatively more abundant in *C. aquilus* venom.

## INTRODUCCIÓN.

Los venenos han evolucionado por millones de años, a través del reino animal (Casewell et al., 2013). Así mismo los sistemas de inoculación de veneno han evolucionado independientemente entre los vertebrados (Jackson, 2003).

Uno de los aspectos fascinantes de los animales venenosos es el hecho de que pequeñas cantidades de este material tóxico, cuando es inoculado en el cuerpo de la presa o de los depredadores puede causar dolor intenso, hinchazón, edema, hemorragias, necrosis, alteración en la coagulación sanguínea, caída en la presión sanguínea o la muerte (Meebs, 2002).

Las serpientes venenosas tienen en común la capacidad de inocular veneno a través de dientes especializados llamados colmillos (Costa & Giordano, 2014), éstas utilizan sus venenos para matar y algunas veces inmovilizar a sus presas (en la mayoría de los casos vertebrados) así como para defensa en contra de depredadores (Lomonte et al., 2014). Los venenos de serpiente son mezclas complejas de moléculas biológicas que perturban los sistemas fisiológicos vitales de manera efectiva, en especial aquellos relacionados con el movimiento, la respiración y circulación (Das, et al. 2011; Koh & Manjunatha, 2011).

Estos venenos ofrecen percepciones interesantes y con frecuencia únicas dentro de campos biológicos como la farmacología (descubrimiento de drogas) (King, 2011), inmunología (terapias para envenenamientos) (Harrison et al., 2011; Williams et al., 2011), y biología estructural (unión e interacción de proteínas) (Dutertre & Lewis, 2010). La investigación de la composición de estos venenos y la caracterización de sus componentes tóxicos, es de vital importancia en la comprensión de la fisiopatología de los envenenamientos y por lo tanto el desarrollo de tratamientos adecuados (Bénard – Valle et al., 2014), esto es de particular relevancia para las poblaciones de serpientes de diferentes áreas geográficas con componentes hemorrágicos y/o neurotóxicos en sus venenos (Martínez – Romero et al., 2013).

Datos de epidemiología muestran que aunque los envenenamientos por mordedura de serpiente no son sistemáticamente reportadas en la mayoría de los países (Gutiérrez et al., 2010; Chipaux, 1998). Se estima que hay alrededor de 125,000 muertes y 3,000,000 de casos de envenenamiento por mordedura de serpientes anualmente alrededor del mundo, lo cual hace de la mordedura de serpiente un accidente de importancia médica a nivel mundial (Mackessy, 2010). Los datos de mortalidad y morbilidad por continente se presentan en el **Anexo A**. Otros trabajos estimaron 421,000 casos de envenenamientos y 20,000 muertes en todo el mundo anualmente. Sin embargo estas cifras podrían incrementarse a 1,841,000 envenenamientos y 94.000 muertes, esto debido a que muchas víctimas no buscan atención médica y prefieren remedios tradicionales, algunos pueden morir en sus hogares y sus muertes quedan sin registro (Chipaux, 1998).

En México se estiman 28,000 casos de envenenamientos por mordedura de serpiente anualmente (Kasturiratne et al., 2008). Entre estos casos, los envenenamientos causados por mordeduras de serpientes cascabel de montaña, en especial, especies del grupo *Crotalus lepidus* son raras, no parece haber reporte de mordeduras en la literatura, excepto por el reportado por Norris, (2005).

En el presente estudio se trabajó con el veneno de tres grupos de serpientes de cascabel de montaña (*C. l. klauberi*, *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus*) a nivel individual y a nivel de grupo, esto con el objetivo de caracterizar los principales componentes en sus venenos y realizar un análisis comparativo de cada veneno así como la comparación entre sus letalidades y actividades biológicas.

## 1. Clasificación taxonómica de los reptiles.

Los reptiles, clase Reptilia, son un grupo de vertebrados que se caracterizan por vivir preferentemente en la tierra; en el caso de sus estrategias reproductivas, están desligados del agua, es decir, sus huevos se incuban en la tierra. La palabra reptil deriva del latín *reptere*, que significa reptar o arrastrarse. A este grupo pertenecen las tortugas, cocodrilos, lagartos, serpientes, y las únicas dos especies de tuataras que viven en Nueva Zelanda (Vázquez & Quintero, 2005).

Actualmente (agosto 2014) existen 10,038 especies de reptiles ([www.reptile-database.org](http://www.reptile-database.org)). Tradicionalmente se dividen en cuatro órdenes:

1. **Orden *Chelonia* o *Testudines*.** (Tortugas y galápagos), especies terrestres y acuáticas. En México se presentan  $\approx$  19 géneros y 32 especies, (Vázquez & Quintero, 2005; Flores & García, 2014).
2. **Orden *Crocodylia*.** (Cocodrilos, caimanes y gaviales), en México se encuentran 2 géneros y 3 especies, (Flores & García, 2014).
3. **Orden *Sphenodontia*.** (Tuátaras), grupo de lepidosaurios parecidos a lagartos, carecen de tímpano. Las dos especies habitan islas aledañas a Nueva Zelanda; *Sphenodon punctatus* y *S. guntheri*. No existe ningún representante de este grupo en el resto del mundo.
4. **Orden *Squamata*.** (Lagartos o lagartijas y serpientes), es el grupo con mayor número de especies, también conocidos como saurios. Las serpientes carecen de extremidades (Lazcano et al., 2010). Las mandíbulas están unidas al frente por tejido elástico, en la base de éstas un hueso conocido como “cuadrado” actúa como una bisagra doble que les permite abrir desmesuradamente la boca, para poder tragar enteras a sus presas, el cráneo es muy articulado y poco osificado, no presentan párpados móviles, el ojo está recubierto por una escama transparente a manera de lente. Para el país este grupo en la actualidad está representado por 48 géneros y 417 especies (lagartijas), 89 géneros y 393 especies (serpientes), (Flores-Villela & García-Vázquez, 2014).



## 2.Reptiles venenosos.

Los reptiles incluyen el grupo más numeroso de vertebrados venenosos. Especies productoras de veneno se encuentran en distintos grupos de reptiles incluyendo a las familias **Atractaspididae**, **Elapidae**, **Viperidae** y el grupo polifilético **Colubridae**, así como en la familia de lagartos **Helodermatidae** (Mackessy, 2010). El grado de toxicidad del veneno es variable, siendo capaz de matar desde pequeñas hasta grandes presas, por lo que pueden llegar a representar un daño para los humanos (Canseco & Gutiérrez, 2010).

La familia **Viperidae** está formada por serpientes de cabeza grande de forma triangular. Poseen un aparato venenoso altamente especializado, que se caracteriza por la presencia de dos grandes colmillos móviles, que pliegan cuando la boca está cerrada y despliegan cuando se disponen a morder (condición solenoglifa), los colmillos, completamente tubulares están conectados directamente con las glándulas del veneno, situadas detrás de los ojos. El gran desarrollo de sus glándulas venenosas da a la cabeza de estas serpientes su forma característica (Meebs, 2002).

En el nuevo mundo solo dos especies de lagartos, familia **Helodermatidae** son venenosas, el “Monstruo de Gila” (*Heloderma suspectum*) y el “Lagarto de Cuentas” (*Heloderma horridum*), ambas especies habitan en México. Mientras que en el viejo mundo la familia **Varanidae**, con su único género *Varanus*, todas sus especies producen toxinas, a este grupo pertenece el Dragón de Komodo (*Varanus komodiensis*), el lagarto más grande del mundo, excediendo los 3m de longitud y los 150kg de peso (Lazcano et al., 2010).

Se sabe que de las más de 3,458 especies de serpientes, aproximadamente 677 especies son venenosas (www.reptile-database.org), aquí se incluyen serpientes que producen veneno pero que rara vez causan envenenamiento a los humanos. Incluso la serpiente europea *Natrix tessellata*, generalmente considerada como no venenosa tiene glándulas en la mandíbula superior que producen veneno. Si la serpiente es venenosa o no venenosa, con frecuencia será elucidado sólo con una examinación anatómica, (Meebs, 2002).

### 3. Aparato inoculador de veneno.

Algunas serpientes como las constrictoras, matan a su presa con el uso de la fuerza. Las serpientes venenosas inyectan a sus presas una mezcla de toxinas las cuales usualmente matan a la presa en cuestión de minutos. Con sus dientes agudos y curvados hacia atrás, las serpientes son incapaces de aplastar o moler a sus presas así que deben tragarla completa.

En adición a la inyección de veneno estos dientes han evolucionado para sujetar y empujar a la presa hacia el esófago. Los maxilares inferiores están conectados entre sí por ligamentos. Estos se mueven de manera independiente cuando la serpiente está tragando a su presa. Para inmovilizar y matar a sus presas, las serpientes venenosas han evolucionado un aparato venenoso muy elaborado, glándulas especiales están localizadas a ambos lados y a lo largo de los maxilares superiores, estas son las glándulas del veneno, homologas a una glándula salival, las cuales producen una secreción tóxica, el veneno. Este es inyectado a la presa mediante el uso de dientes modificados. La evolución del aparato de veneno ocurrió independientemente entre los grupos de serpientes venenosas. Sin embargo la morfología de los dientes y su localización en el maxilar superior permite la distinción de ciertos tipos en el desarrollo del aparato de veneno (Figura 1) (Meebs, 2002).

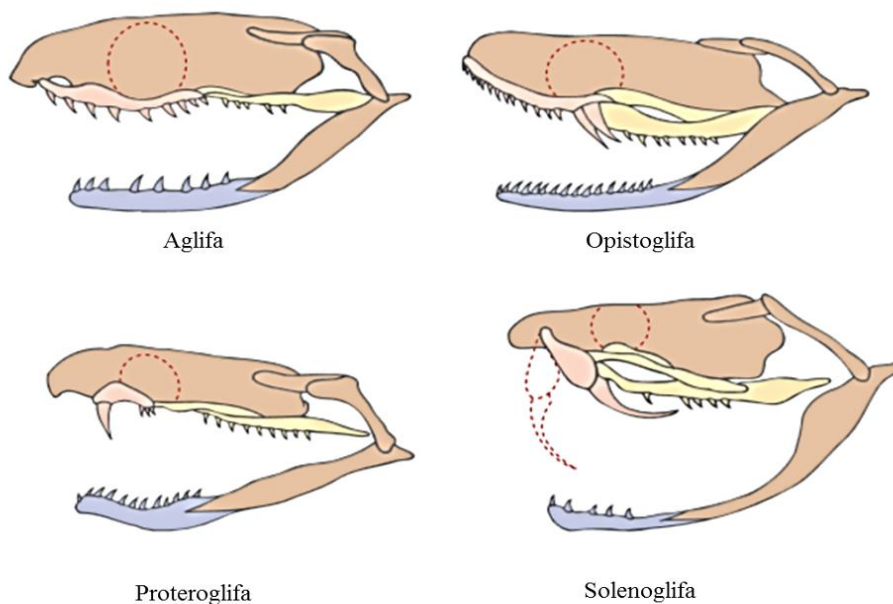


Figura 1. Morfología de la dentición en serpientes (Lee, 2013).

### 3.1 Serpientes venenosas en México.

El conocimiento de la herpetofaunamexicana tiene raíces antiguas, sin embargo su estudio es reciente, (Vázquez & Quintero, 2005). México se localiza en la porción norte del continente americano entre los paralelos 14° 32' 27" y 32° 43' 06" Latitud Norte y los meridianos 86° 42' 36" y 118° 27' 24" Longitud Oeste. Cuenta con una extensión territorial de 1 958 201 Km<sup>2</sup> de los cuales 1,953 128 Km<sup>2</sup> son superficie continental y 75,073 Km<sup>2</sup> corresponden a superficie insular (INEGI, 1991), son divididos en dos partes iguales por el trópico de cáncer 23° 27' de latitud norte (Challenger, 1998), que marca una franja de transición entre el clima árido y semiárido del país del clima húmedo y subhúmedo del sur. La ubicación geográfica de México, así como la variedad de climas, aunado a la compleja topografía del territorio mexicano, contribuyeron a formar un mosaico de condiciones ambientales y microambientales que han permitido el desarrollo de una gran variedad de hábitats y formas de vida (Canseco & Gutiérrez, 2010).

En México la familia **Elapidae** está representada por tres géneros: *Pelamis*, con una especie, *Micruroides*, con una especie, y *Micrurus*, con 18 especies. La familia **Viperidae** está representada en México por nueve géneros y 59 especies, 39 de ellas son endémicas del país, (Vázquez & Quintero, 2005; Uetz, 2013).

### 3.2 Serpientes venenosas en el estado de Aguascalientes.

Con 71 especies, la herpetofauna del estado de Aguascalientes está compuesta por 16 especies de anfibios. Los reptiles suman 55 especies de las cuales 36 corresponden a serpientes, 17 a lagartijas y dos son tortugas. La herpetofauna de Aguascalientes representa el 6.8% de las 1,164 especies de anfibios y reptiles conocidos en México. Las 71 especies no es una cifra definitiva ya que más de la mitad del territorio estatal permanece sin estudios, en este campo de la investigación biológica. En Aguascalientes las serpientes venenosas están representadas principalmente por dos familias; **Elapidae** y **Viperidae**. Al menos una especie de elárido se encuentra en Aguascalientes, La serpiente coral (*Micrurus distans*). Lo más distintivo de las coralillos son sus vistosos patrones de coloración,

principalmente conformados por anillos de colores, los más comunes; rojo – amarillo – negro – amarillo – rojo. La familia **Viperidae** está representada por seis especies; *Crotalus aquilus*, *C. lepidus klauberi*, *C. molossus nigrescens*, *C. polystictus*, *C. pricei* y *C. scutulatus scutulatus*. De las anteriores sólo *C. aquilus* y *C. polystictus* son endémicas de México, (Vázquez & Quintero, 2005).

#### **4. Organismos de estudio.**

##### **4.1 *Crotalus aquilus* (Klauber, 1952).**

Nombre común: cascabel pigmea de Querétaro.

Situación: sujeta a protección especial (NOM-059-SEMARNAT-2010).

Esta especie ha oscilado en su clasificación, siendo catalogada originalmente como subespecie de *C. triseriatus*, ha pasado a ser elevada al nivel de especie, y se considera muy relacionada con *C. lepidus* (Bryson, 2010). Es una pequeña víbora que alcanza los 62 cm de longitud, las hembras son de color gris oscuro y los machos presentan tonos verdosos (dimorfismo sexual), el dorso es recorrido por una serie de manchas casi negras de forma rectangular, más largas que anchas, siendo sus bordes intensamente oscuros. Su vientre es grisáceo y moteado (**Figura 2**).

Es de actividad diurna y crepuscular. Se alimenta principalmente de lagartijas que incluyen al género *Sceloporus* y *Gerrhonotus*, ranas y salamandras, pequeños ratones y pequeños invertebrados.

Esta víbora de cascabel es endémica de México y su distribución se localiza principalmente en el centro del país. En Aguascalientes sólo se ha observado en las partes altas de la Sierra El Laurel, en los límites entre el estado de Aguascalientes y Jalisco, (Vázquez & Quintero, 2005).



**Figura 2.** Pareja de ejemplares adultos de víbora de cascabel pigmea *Crotalus aquilus*; localidad del ejemplar macho (izquierda): Sierra el Laurel, Aguascalientes. Hembra (derecha), Nochistlan, Zacatecas.

#### **4.2 *Crotalus lepidus klauberi* (Kennicott, 1861).**

Nombre común: Víbora de cascabel bandeada de las rocas.

Situación: sujeta a protección especial (NOM-059-SEMARNAT-2010).

La víbora de cascabel bandeada de las rocas *Crotalus lepidus*, es una víbora de talla mediana, que rara vez supera los 80 cm de longitud. El patrón de coloración de esta especie consiste en bandas transversales oscuras, siendo anchas en el dorso y angostas en los costados; estas manchas se encuentran ampliamente separadas entre ellas. Existe dimorfismo sexual en esta especie, las hembras son de color grisáceo a café grisáceo, en tanto que los machos poseen un color verdoso. En la cabeza tienen una línea delgada, que va del ojo al ángulo de la mandíbula (**Figura 3**). Es una serpiente de carácter tranquilo, sobre todo los ejemplares jóvenes, en tanto que los adultos suelen ser nerviosos, aunque, ante la presencia de un intruso, prefieren retirarse y ocultarse en su refugio.

Habita zonas de encino – pino y zacatecales de estos bosques, generalmente en zonas accidentadas y casi siempre asociadas a las cercanías de arroyos. Es una especie con amplia distribución en la República Mexicana, a través de la porción oeste del Altiplano Mexicano y la Sierra Madre Occidental hasta el norte de Jalisco (Campbell & Lamar, 1989; Dorcas, 1992). En Aguascalientes está limitada al conjunto de sierras que conforman Sierra Fría en los municipios de San José de Gracia, Jesús María y Calvillo (Vázquez & Quintero, 2005).



Figura 3. Ejemplares adultos de víbora de cascabel bandeada de las rocas *Crotalus lepidus klauberi*, macho y hembra, localidad; Montoro, Aguascalientes.

Se han registrado cuatro subespecies; *Crotalus lepidus lepidus*, *C. l. klauberi*, *C. l. morulus*, *C. l. macuosus*. El periodo de actividad de *C. lepidus* varía considerablemente y es influenciado por la estación del año, clima, elevación y latitud. (Campbell & Lamar, 2004).

Se ha obtenido información acerca del veneno de esta especie, aunque no es mucha, se sabe que los venenos de *C. l. lepidus* y *C. l. klauberi* son reportados como altamente hemorrágicos con presencia de necrosis en los tejidos. Algunas poblaciones poseen componentes neurotóxicos conocidos como “crotoxina” o también como “toxina Mojave” (Rael et al., 1992). Por ejemplo poblaciones de *C. l. lepidus* en Texas tienen una toxicidad de 0.72 – 2.20 mg/kg i.v. en ratón. En los venenos de *C. l. klauberi* de Arizona, Nuevo México (E. U. A.) así como de Chihuahua y Durango (México), los cuales contienen toxina Mojave (**Anexo J**), tienen LD<sub>50</sub> de 0.63 mg/kg. Por otra parte, los venenos de *C. l. klauberi*, poblaciones de Aguascalientes, Nuevo León y Zacatecas que carecen de toxina Mojave tienen LD<sub>50</sub> de 2.6 mg/kg i.p. (Weinstein et al., 1985; Martínez – Romero et al., 2013).

### 4.3 *Crotalus lepidus x aquilus* (Bryson R. W., 2010).

El grupo de las serpientes de cascabel de montaña conforma el 40% del total de las especies de cascabeles reconocido hasta el momento y se encuentran distribuidas en la mayoría de las regiones montañosas de México. Estas especies comúnmente relacionadas al grupo *Crotalus triseriatus* (*C. triseriatus*, *C. aquilus*, *C. lepidus*, *C. pusillus* y *C. ravus*) son especialmente difíciles de clasificar. El grupo de cascabeles *C. lepidus x aquilus* pertenecientes a la localidad de Palo Alto, Aguascalientes no es la excepción, presenta características morfológicas que las ubican en ambas especies (*C. lepidus* y *C. aquilus*) y su relación filogenética es un tema actual de estudio. Para el presente trabajo este grupo será referido como *Crotalus lepidus x aquilus* (**Figura 4**), (Bryson, 2010).



**Figura 4.** Ejemplar macho adulto de cascabel de montaña *C. lepidus x aquilus*, a partir del cual se extrajo una de las cuatro muestras de veneno para el estudio de este grupo. Localidad: Palo Alto, Aguascalientes.

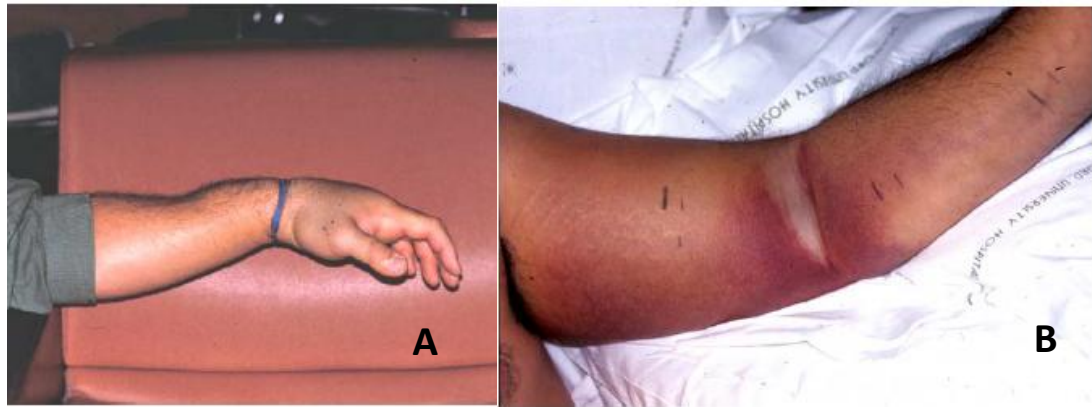
## 5. Caso clínico.

Las mordeduras de esta especie son raras, no parece haber reporte de mordeduras por esta subespecie en la literatura, Norris (2005), hace el primer reporte de mordedura de un ejemplar de 46 cm de longitud mantenido en cautiverio de *C. l. lepidus*, la mordedura fue a un hombre caucásico de 30 años de edad, un coleccionista privado, este fue mordido en la mano mientras manipulaba a la serpiente. La mordedura fue en el dedo pulgar de la mano izquierda, en minutos desarrolló una hinchazón y dolor intenso en la zona de la mordida. Se aplicó una banda de constricción en la muñeca (**Figura 5-A**) y condujo al hospital, llegando 60 minutos después de la mordedura, para este momento el dolor y la hinchazón se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

extendieron a todo su brazo izquierdo, sin embargo no presentó síntomas sistémicos. Con una historia clínica positiva los resultados de sus exámenes arrojaron una presión sanguínea de 141/89 mmHg. Un pulso de 103 latidos por minuto, 18 respiraciones por minuto. Su extremidad izquierda reveló dos marcas punzantes de aproximadamente un centímetro sobre el dorso de su dedo pulgar cercanas a la primera articulación metacarpofalangeal. Presento hinchazón moderada en el área de la muñeca e incapacidad de juntar las puntas del dedo índice y pulgar debido a la hinchazón. Los análisis iniciales completos de sangre fueron normales. Al momento de su caso solo estaba disponible el Antivenin, suero anticrotálico polivalente, pero el paciente rechazó la administración del antídoto. A las 2.25 horas se le administró 1 g de cefazolin vía intravenosa intentando prevenir infección. También se le dieron 2 mg de sulfato de morfina a las tres horas de la mordida, a los 15 minutos se empalideció, se presentó sudor y vómito, sus signos vitales en ese momento: presión sanguínea 105/61 mmHg, ritmo cardiaco 91 latidos por minuto, ventilación a un ritmo de 20 respiraciones por minuto, lo anterior se atribuyó al efecto de la morfina. Se mantuvo bajo observación manteniendo siempre el brazo alzado, mejoró rápidamente con la administración de líquidos intravenosos, recibió un total de dos litros de solución salina normal intravenosa. Por los siguientes dos días desarrolló equimosis en la cara posterior medial del brazo(**Figura 5-B**). Sus estudios de coagulación permanecieron normales aunque se presentó un descenso en sus plaquetas (117,000/mL. cuarto día en el hospital), hematocrito en el 5to día de hospitalización fue de 36,3%, fue dado de alta al quinto día, sin recibir antídoto, se mantuvo la vigilancia del caso por dos años sin que se presentaran complicaciones (Norris, 2005).





**Figura 5.(A) Brazo izquierdo del paciente después de una hora de haber sido mordido por una cascabel *C. l. lepidus*, notese las marcas de colmillos, el edema y la banda de constricción aplicada por el paciente inmediatamente después de la mordida. (B) Equimosis en el brazo donde ocurrió la mordedura al cuarto día (fotos tomadas por el paciente).**

Al igual que muchos venenos de víboras de cascabel, el grupo de cascabeles de las rocas (*C. l. lepidus*, *C. l. klauberi*, *C. l. morulus* y *C. l. maculosus*) de diferentes localidades geográficas parece tener una variabilidad significativa tanto en la composición de sus venenos como en su toxicidad. Mientras que algunos especímenes de *C. lepidus* parecen tener un componente en su veneno que está cercanamente relacionado a la toxina Mojave encontrada en la víbora de cascabel del Mojave *C. scutulatus*. Este paciente no mostró sintomatología que sugiriera la presencia de neurotoxicidad. Entre otros pocos casos Hardy (1992) reporta una mordedura por *C. l. klauberien* la cual el paciente también desarrolló hinchazón y ampollas hemorrágicas, y aunque en ninguno de los casos se presentó necrosis del tejido, está documentada en modelos animales, por lo que sigue siendo una posibilidad en humanos.

Los colmillos de esta especie son relativamente cortos (3.2 – 3.6 mm), se obtienen en promedio 30 mg de veneno por extracción, esta cantidad es significativamente menor al de víboras de cascabel de mayor talla, tales como la cascabel diamante del oeste *C. atrox* que habita las mismas zonas que *C. lepidus*. La cantidad de veneno extraída de *C. atrox* es mayor a un gramo (Norris, 2005).

## **6. Veneno de serpientes.**

El veneno es la secreción producida en las glándulas ubicadas a lo largo del maxilar superior (glándula de veneno o de Duvernoy) de serpientes venenosas y “no venenosas”, estos compuestos son uno de los productos naturales más potentes conocidos. El veneno crudo de serpiente es un líquido viscoso incoloro o amarillento (50 a 90% de su contenido es agua) que mediante procesos de liofilizado se transforma en un polvo que puede ser blanco o de color amarillo, este puede permanecer estable (no pierde sus actividades biológicas) por décadas almacenado en seco o congelado. El 90% del veneno seco son proteínas y otros polipéptidos, mientras que los nucleosidos (por ejemplo la adenosina), elementos traza (zinc, calcio, aluminio, etc.), péptidos pequeños, aminoácidos y carbohidratos representan cerca del 10% (Meebs, 2002). El veneno de serpientes es una compleja mezcla de proteínas, péptidos, carbohidratos, lípidos, iones metálicos y componentes orgánicos estos pueden ser neurotoxinas, enzimas proteolíticas, fibrinolíticas, mionecróticas, hemorrágicas, hemolíticas, cardiovasculares y citolíticas, además de fosfolipasas, (Lomonte et al., 2014; Serrano et al., 2005; Georgieva et al., 2008; Bottrall et al., 2010; Debnath et al., 2010; Das et al., 2011).

Los venenos de serpiente afectan funciones vitales en su presa y actúan rápidamente, particularmente en roedores, a quienes producen parálisis muscular o producen fallas en la circulación. (Meebs, 2002; Canseco & Gutiérrez, 2010).

### **6.1 Características del veneno de serpientes y sus efectos.**

Una de las principales características del veneno de serpientes es su alta complejidad y variabilidad. La variación en la composición del veneno es algo común entre las serpientes y ocurre en todos los niveles taxonómicos (Barlow et al., 2009). La composición del veneno, en algunos casos, puede ser variable entre las especies de serpientes, poblaciones e incluso entre las mismas serpientes. Aparte de la carga genética, otros factores como la distribución geográfica, la edad, preferencia alimenticia, condiciones de mantenimiento, esto cuando las serpientes son mantenidas en cautiverio (granjas de serpientes), etc. Pueden causar variabilidad en la composición del veneno (Meebs, 2002). Las diferencias entre los venenos

de serpientes han atraído interés porque estas diferencias afectan la patología y por lo tanto el tratamiento clínico en víctimas envenenadas por mordedura de serpientes.

Los diversos componentes presentes en el veneno, de los cuales se habla en el tema 6.2 sean enzimas, toxinas o la combinación de ambos, producen varios síntomas de envenenamiento característicos para cada especie de serpiente, dependiendo de su actividad, especificidad, concentración, un síntoma en particular puede prevalecer, pero también puede ser reprimido o enmascarado por la acción de otros componentes del veneno. Aunque el veneno de las serpientes así como sus toxinas y su modo de acción, han sido investigadas ampliamente, aún hay mucho por descubrir (Meebs, 2002). El **Anexo B** resume los principales efectos o síntomas del envenenamiento por mordedura de serpientes.

## **6.2 Principales componentes del veneno de serpientes.**

En general los componentes proteicos pueden ser divididos en dos grupos:

1. **Polipéptidos** (no enzimáticos) Estas son toxinas con actividad específica hacia estructuras nerviosas y membranas celulares, péptidos con propiedades inhibitorias hacia enzimas (proteasas, acetilcolinesterasas), efectos sobre canales iónicos, péptidos que exhiben efectos sinérgicos con otros componentes no tóxicos, o péptidos con actividad aún desconocida (Meebs, 2002).
2. **Enzimas.** (metaloproteasas, serin proteasas tipo trombina, nucleasas, nucleotidasas y fosfomonoesterasas, fosfolipasas  $A_2$ ). Estas son en su mayoría hidrolasas, aminoácido-oxidasas, estas tienen función digestiva. Sin embargo, existe un fenómeno, que es raro en la naturaleza, por lo cual las enzimas pueden convertirse en toxinas funcionales. Esto incluye fosfolipasas  $A_2$ , que pueden ejercer efectos altamente específicos sobre estructuras nerviosas y algunas enzimas, las cuales pueden afectar la coagulación sanguínea o causar daño a los tejidos (miotoxinas, hemorraginas) (Meebs, 2002).

### **Metaloproteasas (SVMP's).**

Las metaloproteasas del veneno de serpiente (**SVMP's**), comprenden una serie de enzimas dependientes de zinc, de pesos moleculares variados. Estas son responsables del efecto hemorrágico característico en envenenamientos por vipéridos (Gutiérrez & Rucavado, 2000). Estas enzimas han recibido particular atención debido a su asociación con síntomas notables como la hemorragia sistémica. La subfamilia M12 de metaloproteasas está formada por las **SVMP's** y **ADAM's** (dominio tipo desintegrina y metaloproteína), estos son dos grupos de proteínas que comparten ciertas características estructurales incluyendo un dominio metaloproteasa homólogo, así como, en algunos casos estructuras de dominio carboxi para el dominio proteasa. La familia de proteasas **ADAM's** representan una familia estructuralmente diversa de proteínas con una variedad de características funcionales (Mackessy, 2010).

Las **SVMP's** poseen una relativamente alta actividad proteolítica, la cual pudo ser inhibida efectivamente mediante agentes quelantes como el EDTA. Estas son dependientes de zinc para su actividad catalítica. Además se demostró en muchos casos que estas proteínas causaban hemorragia, se les conoce como factores hemorrágicos. Ahora se sabe que las **SVMP's** poseen otras actividades aparte de causar hemorragias (Mackessy, 2010).

Las **SVMP's** que constan solo con un dominio metaloproteasa son clasificadas como **SVMP's P-I**. Las **SVMP P-II** se caracterizan por presentar en su forma naciente un dominio tipo desintegrina que en la mayoría de los casos presenta el canónico motivo RGD, el cual es procesado proteolíticamente, dando lugar a la liberación de una desintegrina. En las **SVMPs P-IIb**, el dominio desintegrina no se escinde, permanece formando parte de la estructura de la metaloproteasa. Las **SVMPs P-IIc** son la forma dimérica de las **P-IIb**. La clase **P-IId** es la representación de una forma precursora que da lugar a las desintegrinas homodiméricas observadas en los venenos, mientras que las clase **P-IIe** son las **P-II** que liberan desintegrinas con motivos RGD heterodiméricas. Existen cuatro subclasificaciones de las **SVMPs** clase **P-III**, todas ellas presentan dominios desintegrina en su forma naciente y dominios ricos en cisteína. Estos dominios desintegrina con motivos RGD difieren de los de la clase **P-II** en la estructura de sus puentes bisulfuro en la ubicación del sitio de unión a integrina (RGD). En la subclase **P-IIIa** los dominios tipo desintegrina y los

dominios ricos en cisteína no son procesados de la proteasa, mientras que en la clase **P-IIIb** el “espaciador”, los dominios tipo desintegrina y los dominios ricos en cisteína son procesados proteolíticamente del dominio metaloproteasa. La subclase **P-IIIc** es una forma dimerica de la clase **P-IIIa**, mientras que la **P-III d** está compuesta por la estructura de la **P-IIIa** con la adición de dominios tipo lectina unidos por dos puentes bisulfuro, acoplados postraduccionalmente a la estructura **P-IIIa**. Estas proteínas poseen principalmente actividad hemorrágica, proteolítica, fibrinolítica, apoptótica, inhibición de agregación plaquetaria, activación de macrófagos, activación del factor X y protrombina (Mackessy, 2010). Para *C. lepidus* se reportan **SVMP's** probablemente **P – III** basado en peso molecular (Martínez – Romero, et al., 2013).

#### **Serin proteasas tipo trombina (SVSPs).**

Las **SVSP's** comprenden un grupo creciente de enzimas que catalizan un amplio número de reacciones que involucran la cascada de coagulación, sistema de complemento, células endoteliales y plaquetas. **SVSP's** individuales catalizan una o algunas de muchas reacciones envueltas en estos procesos. Un subgrupo de **SVSP's**, las tipo trombina o “trombin like” **SVSP's** (**TL- SVSP's**) contienen proteasas funcionalmente relacionadas con la trombina. Sus actividades biológicas se relacionan con la agregación plaquetaria, activación del factor VIII, son principalmente fibrinogenolíticas (Mackessy, 2010). Algunas de estas **TL – SVSP's** tienen usos terapéuticos por ejemplo el Reptilase® se utiliza en el diagnóstico para disfibrinogenemia (Stocker, 1998).

#### **Nucleasas, nucleotidasas y fosfomonoesterasas.**

Los componentes del veneno de serpientes actuando en conjunto dentro de la presa, causan inmovilización e inician la digestión. Ciertas actividades farmacológicas han evolucionado entre algunas enzimas hidrolíticas de los venenos de serpientes, las cuales interfieren con numerosos procesos fisiológicos de la presa. Sin embargo las enzimas hidrolíticas como las nucleasas (DNasa, RNasa y fosfodiesterasa), nucleotidasas (5' nucleotidasa, ATPasa y ADPasa), y fosfomonoesterasas (fosfomonoesterasas alcalinas y

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ácidas) no han sido estudiadas exhaustivamente y sus roles farmacológicos en los venenos no están claramente definidos. También muestran especificidades traslapadas y otras propiedades bioquímicas en común, causando incertidumbre acerca de su identidad en los venenos. Por ejemplo, las DNasas, RNasas y fosfodiesterasas comparten propiedades similares en la hidrólisis de sustratos pero difieren en su pH óptimo y el requerimiento del ion metálico para su actividad (Mackessy, 2010).

### **Fosfolipasas A<sub>2</sub>.**

Las fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), son enzimas esterolíticas encontradas abundantemente en la naturaleza. Las PLA<sub>2</sub> de bajo peso molecular (13 – 18 kDa) constituyen una familia de proteínas estructuralmente relacionadas que hidrolizan fosfolípidos en la posición *sn* – 2 en una manera dependiente de calcio, liberando ácidos grasos y lisofosfolípidos (Dennis, 1994). Son clasificadas en diferentes grupos de acuerdo a su estructura tridimensional, secuencia de aminoácidos, especificidad catalítica, y sitio de expresión, esta familia de enzimas se está expandiendo rápidamente.

Las PLA<sub>2</sub> presentes en venenos de serpientes pertenecen a los grupos I y II de PLA<sub>2</sub>. (Mackessy, 2010). Las PLA<sub>2</sub> de los venenos de serpientes son similares a las enzimas presentes en mamíferos en sus estructuras primaria y secundaria, pero éstas inducen varios efectos farmacológicos en las presas. Estas enzimas se encuentran en los venenos comúnmente como monómeros y en ocasiones formando complejos con otras PLA<sub>2</sub> o con otras proteínas mediante uniones covalentes o no covalentes (Mackessy, 2010).

Los venenos de serpientes usualmente contienen muchas isoenzimas, por lo tanto se debe de tener cuidado a la hora de su purificación. Estas isoenzimas pueden inducir diferentes efectos farmacológicos a través de su interacción con receptores/aceptores en proteínas. Esta interacción específica con su proteína blanco está mediada por sitios farmacológicos específicos en la superficie molecular (Mackessy, 2010). Una vez unido a su molécula blanco, éstas inducen sus efectos, los cuales pueden ser dependientes o independientes de su actividad enzimática (Mackessy, 2010).

Las **PLA<sub>2</sub>**son conocidas por haber evolucionado a partir de una forma ancestral no tóxica(Mackessy, 2010).

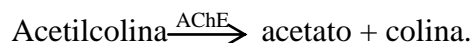
En serpientes de cascabel, todas las especies que producen veneno altamente toxico se presenta la expresión del gen para crotoxina/toxina Mojave; esta neurotoxina presináptica es muy potente y le brinda mayor toxicidad al veneno(Da Silva et al., 2014; Hayes & Mackessy, 2010). La crotoxina (**Ctx**), un componente principal en el veneno de la cascabel *C. durissus terrificus*, es un heterodímero formado por una subunidad básica: CB, y una ácida (crotopotina), CA. CB es una **PLA<sub>2</sub>** Asp 49 que depende de la CA para unirse específicamente a la membrana celular (Bon et al., 1979).

Trabajando con ejemplares de cascabel de Mojave, *C. scutulatus scutulatus* se ha mostrado que la mayoría de los venenos muestreados hasta el momento poseen toxina Mojave. Estos venenos, si carecen de actividad hemorrágica, se denominan **venenos tipo A**. Por otra parte, algunas serpientes de esta misma especie capturadas en Arizona central, no poseen toxina Mojave, pero son capaces de producir hemorragia en animales de experimentación, estos venenos son referidos como **venenos tipo B**. Hay un tercer tipo de veneno que contiene tanto actividad hemorrágica como toxina Mojave, a estos venenos se les conoce como **venenos tipo A + B**(Rael & Lieb, 1993).En el **Anexo C**se presenta una escala con especies de serpientes de la familia Viperidae principalmente víboras de cascabel en orden de mayor a menor porcentaje de **Ctx** en estos venenos.

#### **Acetilcolinesterasa.**

Las acetilcolinesterasas(**AChE**) pertenecen a una familia distinta de serín hidrolasas y pueden ser sinápticas y no sinápticas. En la sinapsis juega el papel principal en la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (**ACh**), mientras que en tejido no sináptico su función no está clara. Esta enzima es muy importante para la comunicación entre las células excitables, particularmente entre nervios y músculo. El veneno de serpientes, particularmente de la familia Elapidae son una fuente común de **AChE** no sinápticas, con la notable excepción de las mambas, las cuales poseen fasciculinas.

La **AChE** está presente en todos los vertebrados, particularmente en los tejidos muscular y nervioso y como ya se mencionó juega un papel importante en la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina:



Estructural y funcionalmente tanto la **AChE** y **BChE**, son serín hidrolasas pertenecientes a la familia de las esterasas. La eficacia con la que la **AChE** controla el tiempo de vida del neurotransmisor en el espacio sináptico depende no solo de su actividad enzimática sino también de su densidad y ubicación relativa con respecto de los receptores de acetilcolina. La **AChE** también se encuentra en ubicaciones no sinápticas tales como las células sanguíneas como eritrocitos y linfocitos.

Venenos de diferentes tipos de serpientes de los géneros *Bungarus*, *Hemachatus*, *Naja*, y *Ophiophagus*(familia **Elapidae**)son fuentes comunes de **AChE** no sinápticas, aunque su función durante el envenenamiento no está claramente definida. (Mackessy, 2010).

### **L-Aminoácido oxidasas.**

Las L-Aminoácido oxidasas (**LAAO**) se encuentran ampliamente en los venenos de serpientes, esta enzima es altamente específica para L-Aminoácidos y generalmente los aminoácidos hidrófobos son los mejores sustratos. Las **LAAO's** son flavoproteínas que consisten de dos subunidades idénticas, cada una con un peso molecular de 57 a 68 kDa. Las enzimas purificadas son glicoproteínas (3 a 4% carbohidratos). La desglicosilación de la enzima no altera su actividad enzimática, pero parece alterar su actividad farmacológica. La secuencia de aminoácidos de las **LAAO's** del veneno de serpientes muestra un alto grado de homología (Mackessy, 2010).

Un análisis estructural mediante el uso de rayos X de las **LAAO's** revela un sitio activo dinámico y la presencia de tres dominios: un dominio de unión a FAD, un dominio de unión al sustrato, y un dominio helicoidal. Estudios recientes muestran que estas **LAAO's** son enzimas multifuncionales, siendo inductoras de edemas, inductoras o inhibidoras de



agregación plaquetaria, inductoras de canal, así como efectos anti-bacteriales, anticoagulantes y anti VIH (Mackessy, 2010).

Las **LAAO** pueden ser encontradas en venenos de la mayoría de los géneros de serpientes. La fuente más importante de **LAAO** son los venenos de las serpientes de la subfamilia crotaline. Esta enzima constituye del 1 al 4% del veneno(Mackessy, 2010).

### **Agentes anti - agregación plaquetaria.**

Es importante para la hemostasia la detención espontánea de la pérdida de sangre de vasos rotos, esto implica la interacción de varios procesos, tales como la vasoconstricción, activación y agregación de plaquetas, coagulación de la sangre y fibrinólisis. En respuesta a una lesión vascular, las plaquetas se adhieren de manera instantánea al tejido sub-endotelial a través de la presencia del colágeno expuesto, fibronectina y el factor Von Willebrand, vía sus receptores en plaquetas; integrina  $\alpha 2 \beta 1$ , integrina  $\alpha 5 \beta 1$ , y glicoproteína Ib-IX. La agregación plaquetaria ocurre a través de la interacción entre el receptor de integrina  $\alpha IIb \beta 3$  y fibrinógeno, llevando a la formación de un trombo plaquetario, el cual cubre los vasos expuestos. En adición las plaquetas activadas también proveen superficies para la activación de múltiples pasos en la coagulación sanguínea (Koh & Manjunatha, 2011).

Muchos factores exógenos aislados del veneno de serpientes y otros animales afectan la función de las plaquetas. Muchos han sido usados como bases para estudiar la función plaquetaria y diseñar agentes antiplaquetarios (Koh & Manjunatha, 2011).

Estas moléculas pertenecen a diferentes clases estructurales de toxinas de veneno de serpientes y actúan a través de diferentes mecanismos. Éstas moléculas incluyen; desintegrinas, proteínas tipo lectinas C, **TFT**, **PLA<sub>2</sub>**, **SVSPs**, **SVMPs**, nucleotidasas, y **LAAOs**. Estos componentes del veneno pueden cumplir un papel similar (Lomonte et al., 2009), éste está relacionado con la inmovilización de las presas de estos reptiles (Camacho et al, 2014), debido a que evolucionaron para interferir en procesos fisiológicos claves de las presas(Fry et al., 2008); Por ejemplo, la digestión de los tejidos de la presa, se hapensado

generalmente que es realizada por proteasas, especialmente **SVMP**. Sin embargo existe la posibilidad de que toxinas que inducen necrosis muscular sistémica como la **PLA<sub>2</sub>** o la **Ctx**, pueden contribuir a la digestión de masa muscular haciendo que sea digerida más fácilmente por proteasas intracelulares así como por secreciones gástricas y pancreáticas (Lomonte et al., 2009). La naturaleza diversa de su estructura, potencia y especificidad, provee múltiples posibilidades para el desarrollo de agentes antiplaquetarios. El mayor de los esfuerzos en el desarrollo de agentes antiplaquetarios a partir de veneno de serpientes se ha concentrado en las desintegrinas, que se describen en el siguiente capítulo (Koh & Manjunatha, 2011).

### **6.3 Toxinas como agentes terapéuticos.**

A principios del siglo XX, emergió la idea de utilizar toxinas purificadas como fuente de agentes terapéuticos. La primera droga exitosa desarrollada a partir de toxinas aisladas ocurrió en 1975, el agente hipotensivo captopril, se creó basado en la estructura de los péptidos potenciadores de bradiquininas (**BPPs**), aislados del veneno de *Bothrops jararaca*, como se detalla más adelante (Koh & Manjunatha, 2011).

Los venenos poseen una multitud de componentes farmacológicamente activos, que son usados para la captura de sus presas (Hodgson & Wickramaratna, 2002). Por otra parte, los venenos y toxinas de reptiles tienen un potencial tremendo para el tratamiento de enfermedades humanas y parte de este potencial se ha utilizado en la producción de fármacos basados o modelados a partir de toxinas del veneno. Los venenos de reptiles contienen toxinas que pueden ser dirigidas a cánceres humanos, desordenes hemostáticos o incluso diabetes, debido a que muchas toxinas interactúan con receptores / ligandos con un alto grado de especificidad, son también una fuente de nuevas drogas (Mackessy, 2010).

La toxicidad de las toxinas animales es debida a su alta especificidad a receptores celulares en células de tejidos particulares. Por ejemplo las neurotoxinas, se pueden clasificar de acuerdo al sitio donde éstas actúan o incluso de acuerdo a su sitio de unión en un canal iónico. Las toxinas serían las drogas ideales por su toxicidad altamente selectiva,

dejando otros órganos ilesos. Sin embargo es la alta letalidad de estos productos la cual disuade a las industrias de las drogas acerca de la exploración de sus aplicaciones potenciales. Con todas las precauciones que son consideradas al día de hoy, glucósidos digitalizados, drogas indispensables para el tratamiento de corazones enfermos, podría estar fuertemente aceptado en el mercado de las drogas. Esta pequeña ventana terapéutica, tiene el riesgo de ciertos efectos laterales. Las toxinas de venenos de animales se han convertido en reactivos importantes en la investigación neurofisiológica. Por ejemplo, mediante el uso de la  $\alpha$  – bungarotoxina, una neurotoxina en el veneno del búngaro chino *Bungarus multicinctus*, el primer neuro – receptor; el receptor de acetil colina, se hizo “visible”, y su estructura elucidada. Por casualidad, esta investigación produjo un importante entendimiento en la patogénesis de una forma especial de distrofia muscular, miastenia gravis. Aquí el sistema inmune del mismo paciente genera anticuerpos contra sus propios receptores de acetil colina, los cuales se destruyen y los músculos se degeneran. Las enzimas del veneno de serpientes también son reactivos de diagnóstico importantes para la hemostasia; Reptilasa – R®, Bothrocetin®, Stypven®, Ecarin®, Protac®. El número de los componentes de venenos (en particular toxinas), que son utilizados para investigación se ésta incrementando (Meebs, 2002).

Las enzimas coagulantes del veneno de serpientes se han usado para tratar enfermedades tromboembólicas. Ancrod®, también conocido como Arvin®, del veneno de la víbora malaya de fosetas *Callocelesmarhodostoma*, causa un decremento dosis – dependiente en el nivel de fibrinógeno y disminuye la viscosidad de sangre y plasma. La sangre fluye, y la perfusión de los vasos ocluidos se supera. La enzima libera el fibrinopeptido A, mas no el B, del fibrinógeno, llevando a la polimerización de la fibrina disfuncional, la cual es rápidamente disuelta por plasmina. Este fármaco ha sido retirado del mercado, pero puede que sea introducido para el tratamiento del accidente cerebrovascular isquémico agudo. La aplicación repetida de Ancrod® induce la formación de anticuerpos, la cual reduce su eficacia. Es posible que otra preparación de enzimas pueda ser utilizada. La Defibrasa®, enzima coagulante (también llamada batroxobin) del veneno de la víbora brasileña cabeza de lanza *Bothrops moojeni*, la cual es también un ingrediente de Reptilasa® (Meebs, 2002).

Una nueva y prometedora aplicación del batroxobin se ha encontrado en el desarrollo de un “pegamento de fibrina” el cual es usado en cirugía para detener el sangrado difuso de hígado o pulmón mediante el cubrimiento de la superficie con una capa delgada de fibrina. Se ha desarrollado un elegante procedimiento, utilizando la sangre del propio paciente durante la operación, aplicando batroxobin (ConvaTec; Bristol – Myers – Squibb Co., UK). Desde 120 mL de sangre del paciente, se separa el plasma y el batroxobin es adherido, produciendo una fibrina atípica, la cual es soluble en soluciones ácidas (pH 4). Esto permite la eliminación del batroxobin, el cual es unido a la biotina (vitamina H) y removido de la solución con la ayuda de la avidina. Cuando esto es acoplado con agarosa, se forma un complejo insoluble avidina – biotina – batroxobin que es separado mediante centrifugación. Mediante la adición de una solución buffer alcalina, la fibrina polimeriza y puede ser roseada en el área de la lesión (Meebs, 2002).

Productos naturales, incluidas las toxinas pueden fungir como acarreadores de sustancias y pueden ser más compatibles con la “aplicación clínica” después de una modificación química. Los inhibidores de enzimas convertidores de angiotensina (**ACE**), tales como el captopril y ramipril (Delix®, Hoechst Marion Rousel), que inhiben específicamente la actividad de ésta enzima, son utilizados de manera exitosa en el tratamiento de hipertensión y falla cardíaca. Estas drogas están basadas en la investigación hecha por dos farmacólogos brasileños; Ferreira y Rocha da Silva, quienes aislaron péptidos a partir del veneno de la víbora cabeza de lanza *Bothrops jararaca*, estos péptidos potencian el efecto de la bradiquinina, un péptido que disminuye la presión sanguínea. Estos péptidos potenciadores de bradiquininas (**BPP**) constan de cinco a 13 aminoácidos y se ha encontrado que son inhibidores específicos de las enzimas que convierten angiotensina I, un decapeptido en angiotensina II, un octapeptido con alta actividad en el incremento de la presión sanguínea. Sin embargo estos péptidos no son tan efectivos mediante aplicaciones orales porque son rápidamente inactivados en el tracto digestivo. Por lo tanto se han sintetizado nuevas sustancias basadas en estos inhibidores presentes en estos venenos, los cuales pueden ser tomados como medicamentos orales. El captopril fue el primer inhibidor **ACE** sintético introducido para uso terapéutico, seguido por el ramipril

(Meebs, 2002), el **Anexo D** resume los principales fármacos hechos a partir de componentes en el veneno de serpientes.

Opiáceos como la morfina son drogas importantes para el tratamiento del dolor intenso. Sin embargo tienen un alto potencial de efectos colaterales, incluyendo la dependencia física a esta droga que es uno de los mayores inconvenientes en su uso. Un alcaloide de la piel de la rana flecha venenosa *Epipedobates tricolor*, nombrado epibatidina, exhibe un fuerte efecto analgésico en animales experimentales, similar al producido por la morfina. Este parecía ser un modelo interesante para el desarrollo de nuevos analgésicos, pero la alta toxicidad de este alcaloide ha impedido su uso parcial. Incluso en dosis bajas, aunque todavía analgésico, causa una caída en la presión sanguínea, parálisis y convulsiones. Utilizando un compuesto similar sintetizado que fue creado (ABT-594), no se observaron efectos secundarios y seguía exhibiendo la misma eficacia analgésica similar a la morfina. Es de resaltar que aplicaciones repetidas de esta sustancia parece no causar dependencia física a ésta misma, porque ésta actúa sobre los receptores nicotínicos de acetilcolina, en vez de los receptores opiáceos del cerebro. (Meebs, 2002).

Estos son algunos ejemplos que demuestran el alto valor del potencial terapéutico de las toxinas de origen animal. Todavía existen tantas posibilidades para explorar nuevas toxinas utilizables como la diversidad de péptidos en el veneno de los caracoles cono. Con cada toxina nueva encontrada, la cuestión sería; ¿Cómo ésta podría ser utilizada en medicina para el tratamiento de enfermedades? Quizá mediante una versión modificada químicamente (Meebs, 2002). El aislamiento y estudio de los componentes individuales del veneno de serpiente lleva a una contribución potencial a la mejora de modalidades terapéuticas y ajustes clínicos, también abre posibilidades para el descubrimiento de nuevas toxinas que pueden ser de utilidad para dilucidar procesos celulares y moleculares de importancia biomédica (Yamileth & Lomonte, 2009).

El veneno de las lagartijas de la familia **Helodermatidae** también contiene péptidos, toxinas conocidas como exendinas, de las cuales, La Exanatida, se ha convertido en el pilar para el desarrollo de nuevos fármacos a partir del veneno de los reptiles. Con el fin de

aprovechar un enfoque nuevo en las investigaciones del veneno de manera racional y efectiva, es importante comprender las bases de cómo los organismos venenosos utilizan su veneno en un contexto natural predador – presa, (Mackessy, 2010).

#### **Agentes pro y anti – coagulantes.**

Los desórdenes hemorrágicos son típicamente debidos a deficiencias congénitas de factores de coagulación de la sangre u otros traumas físicos o cirugías. La trombosis es provocada por la ruptura de placas arterioscleróticas, alterando las paredes de los vasos. Las bases para el tratamiento de estos desórdenes son sencillas: promover la coagulación sanguínea en pacientes hemofílicos con pro – coagulante, y prever la coagulación sanguínea durante la trombosis con anti – coagulante. Los agentes pro – coagulantes en los venenos de serpientes son usualmente enzimas que activan mediante proteólisis algunos de los factores de coagulación. Por lo tanto las moléculas suelen ser agrupadas de acuerdo con sus funciones. Algunos de las mayores clases de pro – coagulantes de veneno de serpiente incluyen: Enzimas tipo trombina (**TLE**), activadores de protrombina, activadores FX y activadores FV. En contraste los anti – coagulantes consisten de ambos, enzimáticos (**PLA<sub>2</sub>**, **SVMP's**, **SVSP's** y **LAAO's**) y no enzimáticos (proteínas tipo lectinas tipo C, toxinas de tres dedos) (Koh & Manjunatha, 2011).

#### **Agentes anti – cáncer.**

Calvette arrojó en 1933, el primer reporte científico acerca de las propiedades anti cáncer del veneno(Debnath et al., 2010).

La mortalidad del cáncer con frecuencia es debida a la metástasis, se requieren las desintegrinas apropiadas para interactuar con ciertas moléculas de matriz extracelular (**ECM**). Cuando estas interacciones cambian resulta en un crecimiento incontrolado del tumor, invasión a tejidos adyacentes y metástasis(Galán et al., 2008).

Las integrinas juegan un papel múltiple e importante en la patología de cáncer incluyendo la proliferación celular en tumores, angiogénesis, invasión y metástasis. Por

ejemplo las integrinas  $\alpha v \beta 3$ ,  $\alpha v \beta 5$  y  $\alpha 5 \beta 1$ , son los factores clave en la formación de vasos sanguíneos nuevos para abastecer a las células tumorales (angiogénesis tumoral). Aunque muchos otros como:  $\alpha 1 \beta 1$ ,  $\alpha 2 \beta 1$ ,  $\alpha 4 \beta 1$ ,  $\alpha 6 \beta 1$ ,  $\alpha 6 \beta 4$  y  $\alpha 9 \beta 1$ , también están involucrados (Koh & Manjunatha, 2011).

La inhibición de la angiogénesis es una de las opciones de tratamiento más altamente exploradas para el cáncer. Las desintegrinas del veneno de serpientes representan una biblioteca de moléculas con diferente estructura, potencia y especificidad y son buenos puntos de inicio para el desarrollo de terapias anti – angiogénesis (Koh & Manjunatha, 2011).

### **Desintegrinas.**

Las desintegrinas son una familia de proteínas ricas en cisteína, de bajo peso molecular, inicialmente aisladas a partir del veneno de serpientes de la familia **Viperidae**, que usualmente contienen los motivos de unión a integrina RGD. Estudios recientes han mostrado la presencia de otras secuencias tripeptídicas tales como KGD, MVD, MLD, VGD, ECD, MDG y KTS. Las secuencias de tri-peptidos RGD y KGD son los principales sitios de unión para el receptor de integrina  $\alpha IIb \beta 3$ , la unión de la desintegrina al  $\alpha IIb \beta 3$ , previene así la unión del fibrinógeno al receptor y por lo tanto la agregación plaquetaria. Dos drogas Tirofiban (Aggrastat®) y Eptifibatide (Integrilin®), fueron diseñadas, basados en las desintegrinas del veneno de serpientes y están disponibles en el mercado como agentes antiplaquetarios. Tirofiban, el antagonista de  $\alpha IIb \beta 3$  fue diseñado basándose en el farmacóforo RGD. Basado en la distancia que separa las cadenas laterales de Arg y Asp en los motivos RGD de la echistatina, una desintegrina aislada del veneno de *Echiscarinatus*. El desarrollo de eptifibatide tiene incluso vínculos más cercanos con las desintegrinas del veneno de serpientes. Para descubrir una desintegrina para  $\alpha IIb \beta 3$ , se analizaron 62 venenos de serpientes, llevando a la identificación del barbourin en el veneno de *Sistrurus miliarius barbouri*, este se une al receptor  $\alpha IIb \beta 3$  mediante su motivo KGD, y la sustitución de Lys a Arg, conlleva al incremento en la especificidad a  $\alpha IIb \beta 3$ , el eptifibatide se diseñó tomando lo anterior como base. Desde que fue descubierto que las

integrinas median las interacciones célula – célula, célula – matriz, importantes en los procesos de adhesión celular, migración celular, organización del tejido, crecimiento celular, hemostasia, y respuestas inflamatorias. Éstas han sido de interés para el desarrollo de nuevas drogas.

El Triflavin, una desintegrina que contiene RGD, aislada del veneno de *Trimeresurus flavoviridis*, fue la primera en mostrar inhibición de adhesión celular, migración y angiogénesis. Las secuencias RGD, son conocidas por tener como objetivo integrinas como:  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3,  $\alpha$ v  $\beta$ 3, y  $\alpha$ 5  $\beta$ 1, y estas últimas tres son claves en el proceso de angiogénesis. Subsecuentemente, muchas otras desintegrinas que contienen RGD, tales como la acutina, salmosina, contortrostatina y rhodostomina, también inhiben angiogénesis tumoral y metástasis. Cuando son inyectadas simultáneamente con células de melanoma en ratón estas reducen significativamente la colonización del tumor en pulmón (Oliva et al., 2007). Otras desintegrinas no – RGD, especialmente las que contienen KTS o RTS como la obtustatina, viperistatina, lebestatina y jerdostatina, cuyo objetivo es la integrina  $\alpha$ 1  $\beta$ 1, también bloquearon angiogénesis tumoral y metástasis.

Entre todas ellas, la contortrostatina, una desintegrina homodimérica de 13.5 kDa hizo el mayor progreso. Las cadenas monoméricas de la contortrostatina (conteniendo el motivo RGD) se unieron a las integrinas:  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3,  $\alpha$ v  $\beta$ 3,  $\alpha$ v  $\beta$ 5,  $\alpha$ 5  $\beta$ 1, y fueron efectivas en la inhibición del crecimiento del tumor, angiogénesis y metástasis en modelos de cáncer de seno y ovario. La contortrostatina se puede administrar vía intravenosa (i.v), esta proteína encapsulada en liposomas es un sistema de entrega más ventajoso y resulta en la prolongación de la vida media e incrementa el consumo de la desintegrina en el sitio del tumor. En adición la actividad antiplaquetaria es disminuida (mientras la desintegrina es protegida dentro de los liposomas mientras está en circulación), pero el efecto antitumoral es mantenido (a medida que los liposomas se acumulan en los sitios del tumor y liberan la contortrostatina activa). Además se diseñó una variante en la cual la porción C terminal de la echistatina fue insertado sobre la contortrostatina. Se reportó que esta secuencia C terminal mejoró la unión a la integrina  $\alpha$ 5  $\beta$ 1, la cual es la base de este diseño. Por lo tanto



la contortostatina parece ser uno de los precursores más importantes en el desarrollo de agentes terapéuticos derivados del veneno de serpientes (Koh & Manjunatha, 2011).

Las desintegrinas y proteínas tipo desintegrinas son moléculas encontradas en el veneno de cuatro familias de serpientes (**Atractaspididae, Elapidae, Viperidae, y Colubridae**). Estas inhiben interacciones célula- célula, interacciones célula – matriz y transducciones de señal. Estas proteínas pueden tener un potencial en el tratamiento de ataques cardíacos, cánceres, osteoporosis, y diabetes. Las desintegrinas son obtenidas de un proceso de proteólisis de proteínas como **SVMP P-II** o **P-III**, estas existen en ambas formas monomérica o dimérica (homo o hetero), y ejercen su acción interactuando con los receptores de integrina. Las desintegrinas pueden interactuar también con varios tipos de células con cáncer. Se han caracterizado alrededor de 90 desintegrinas encontradas en los venenos de serpientes. Muchas de estas desintegrinas son extremadamente conservadas; sin embargo hay diferencias mayores en su afinidad por integrinas. Esta diferencia se debe a distintos motivos de unión (RGD, KGD, MVD, MGD, WGD y VGD) que inhiben la unión de los ligandos naturales, como fibrinógeno, fibronectina y vitronectina (Sánchez et al., 2008), el **Anexo E** resume las principales desintegrinas obtenidas de veneno de serpientes y sus efectos.

### **Crotoxina.**

Varios estudios han demostrado actividades antitumorales *in vitro* e *in vivo* para la **Ctx**. Interfiere con el crecimiento del tumor mediante la modificación de procesos celulares selectivos asociados con el crecimiento celular (Cura et al., 2002). La **Ctx** sola o en combinación con cardiotoxina (VRCTC – 310) es citotóxica para algunas líneas humanas de células tumorales (leucemia, así como pulmón, colon, renales, de ovario y carcinoma ductal mamario, melanoma y tumor cerebral) y en ratón (sarcoma, eritroleucemia) (Rudd et al, 1994).

La citotoxicidad de la **Ctx** es mediada inicialmente por la interacción con sitios de unión de alta afinidad en la superficie de la célula (Montecucco et al., 2008) que involucran la actividad **PLA<sub>2</sub>** de la toxina (Corin et al., 1993). Mas recientemente Yan et al.,

(2006) demostró que la **Ctx** causa un colapso en el potencial de membrana de la mitocondria, la liberación del citocromo c y la activación de la caspasa – 3 en líneas celulares de leucemia mieloide crónica (células K562), sugiriendo la participación de mecanismos apoptóticos en la muerte celular inducida por **Ctx**.

En adición a la actividad de **Ctx** en líneas celulares cultivadas, la actividad antitumoral ha sido observada *in vivo*. Inyecciones i.m. diarias de **Ctx** inhibieron el crecimiento del carcinoma de pulmón de Lewis y carcinoma mamario humano MX – 1 en 83 y 69% respectivamente (Cura et al., 2002).

En un modelo experimental de dolor por cáncer inducido mediante la inyección intraplantar de células carcinoma Walker 256, la **Ctx** redujo el crecimiento del tumor y produjo analgesia (Brigatte et al., 2007).

En 1995 la FDA aprobó el estudio en fase I en pacientes con tumores sólidos refractarios en terapia convencional. En este estudio, la administración i. m. de **Ctx** por 30 días produjo una reducción de la masa del tumor mayor al 50% en algunos pacientes, con una regresión completa de la masa primaria del tumor en un paciente (Cura et al., 2002). Los resultados de los ensayos clínicos correspondientes a la fase II no han sido publicados (Sampaio et al., 2010).

## 7. Hipótesis.

El veneno de las víboras de cascabel de montaña del complejo *C. triseriatus* (*C. l. klauberi*, *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus*) de Aguascalientes y Zacatecas, poseen componentes tóxicos de naturaleza proteolítica que alteran la coagulación, así como proteínas ricas en cisteína, de bajo peso molecular. Estos venenos, a pesar de que pertenezcan a especies evolutivamente cercanas, presentan variación en sus venenos. Por lo tanto, existen diferencias con respecto a sus  $DL_{50}$ , actividades biológicas; como actividad proteolítica y actividad procoagulante.

## 8. Ojetivos.

### 8.1 Objetivo general.

Caracterizar los componentes principales del veneno de las víboras de cascabel *C. l. klauberi*, *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus*, para observar las diferencias en la composición de sus venenos y sus actividades biológicas.

### 8.2 Objetivos particulares.

- Llevar a cabo el fraccionamiento de las proteínas mediante cromatografía en fase reversa (RP-HPLC).
- Separación de proteínas por peso molecular, mediante electroforesis (SDS – PAGE).
- Calcular las  $DL_{50}$  de los tres grupos de venenos (*C. l. klauberui*, *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus*) observando sintomatología.
- Calcular actividad proteolítica en los tres grupos de venenos.
- Evaluar actividad procoagulante mediante la dosis mínima procoagulante (DMP).

## 9. Materiales y metodología.

### 9.1 Trabajo de campo; colecta de los ejemplares de víbora de cascabel.

Se hizo el trámite correspondiente ante SEMARNAT; permiso de colecta de partes o derivados de vida silvestre con fines de investigación científica modalidad B, Oficio: SGPA/DGVS/06483/13.

Las salidas de campo se hicieron a partir del día 16 de julio hasta el día 19 de octubre de 2014. Se hicieron un total de 36 muestreos en las áreas naturales del estado de Aguascalientes, y sus límites con los estados de Zacatecas y Jalisco; abarcando los municipios de San José de Gracia, Calvillo y Aguascalientes.

Se hizo colecta directa de los organismos, utilizando la metodología descrita por Manzanilla & Péfaur (2000). Utilizando material especializado para el área de herpetología, el cual incluye ganchos, pinzas y tubos herpetológicos.

Se hicieron recorridos para mayor eficiencia en la cobertura de área de muestreo, éstos se aplicaron con los horarios marcados en la **tabla 1**.

<b>Tabla 1. Horarios de los recorridos para colecta en campo de serpientes.</b>	
Recorrido diurno	9:00 a 14 horas
Recorrido nocturno	18:00 a 23:00 horas

Cinco ejemplares *C. lepidus x aquilus* fueron donados por la Asociación para la Conservación de la Biodiversidad del Centro de México A. C.

## **9.2 Extracción y liofilización del veneno.**

El veneno se obtuvo mediante extracción manual, sujetando a las serpientes por la parte posterior de la cabeza y permitiéndoles morder sobre un tubo falcon de 50mL cubierto con parafilm.

Una vez extraído el veneno de cinco ejemplares de *C. l. klauberi*, cinco ejemplares de *C. aquilus*, y cuatro ejemplares de *C. l. klauberi x aquilus*, éste se mezcló con acetato de amonio ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) 20 mM pH4.7 y se centrifugó por 3 min a 12000 rpm. Para desechar detritus celulares (pastilla), se congeló a  $-70^\circ\text{C}$  hasta ser colocado en el liofilizador durante toda la noche. El acetato de amonio se volatilizó durante la liofilización quedando sólo el veneno seco. El veneno se congeló una hora a  $-70^\circ\text{C}$ , posteriormente se colocó en un liofilizador a  $-50^\circ\text{C}$  y 25pa. Durante toda la noche.

## **9.3 Cuantificación de proteína por el método del ácido bicinonómico (BCA).**

### **Procedimiento para microplacas marca Falcon.**

El procedimiento para la preparación de los reactivos se presenta en el **Anexo F**.

Para las diluciones se tomaron 3 mg de veneno (peso seco) y se resuspendió en 1 mL de solución salina (NaCl 150 mM) dilución 1 en 20  $\mu\text{L}$  de muestra en placa.

1. Se transfirieron 20 $\mu\text{L}$  de cada ST y MP, 3mg en diferentes pozos, incluidos dos blancos los cuales llevan sólo el buffer (NaCl 150 mM) en el que se encuentran diluidas las muestras y los estándares.
2. Se añadieron 200 $\mu\text{L}$  de MR a cada pozo y se mezclaron en el lector de ELISA por 30 segundos.
3. Se cubrió la placa con una tapa y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  por dos horas.

4. Se Leyó absorbancia en el lector de ELISA con un filtro de 570 nm utilizando el método de BCA que se encuentra en el software Magellan.

#### **9.4 Cuantificación de proteína por absorbancia a 280nm.**

Se hizo la cuantificación por absorbancia a 280 nm de las muestras de cada uno de las ejemplares.

1. Se hicieron diluciones de la muestra en PBS.
2. Se tomó absorbancia a 280 nm del blanco (PBS).
3. Se tomó absorbancia a 280 nm de las muestras.
4. El valor de la absorbancia se multiplicó por la dilución que se utilizó para dichas muestras. Esto tomando como fundamento la ley de Lambert y Beer expresada y despejada en el **Anexo F**.

Se utilizaron las diluciones 1:20 hechas previamente para BCA, y los pool 1mg/mL de *C. l. klauberi*, *C. aquilus*, y *C. lepidus x aquilus*. Posteriormente se midió absorbancia a 280 nm, en espectrofotómetro UV. Eppendorf Biophotometer.

#### **9.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de Dodecil sulfato sódico (SDS – PAGE).**

Los reactivos y el procedimiento para formar las diluciones necesarias para los geles concentrador y separador, son descritos en el **Anexo G**.

Se cargaron 25 µg de veneno de *C. l. klauberi*, *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus*, muestras individuales (5) y en pool de cada grupo de estudio, así mismo, se cargaron 25 µg del marcador de peso molecular en SDS-PAGE en condiciones reductoras (β – mercaptoetanol) . Se corrió a 200 V por 45min.

Se hizo la tinción durante toda la noche con azul de Coomassie, desteñado con 10% metanol + 10% ácido acético en agua desionizada (**Anexo G**).

Los geles fueron escaneados para su análisis(**Figura 7**).

### **9.6. Cromatografía líquida de alta resolución, fase reversa(RP-HPLC).**

Para las corridas cromatográficas se cargó 1 mg de venenode cada pool (*C. l. klauberi*, *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus*) a partir de una solución de 3 mg/mL de veneno en NaCl 150 mM, se centrifugó la muestra a 12,000 rpm por 5 min para retirar impurezas antes de su inyección en la columna C<sub>18</sub>.

#### **Fase móvil:**

a). **Solución A:** Agua + 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA).

b). **Solución B:** Acetonitrilo + 0.1% de TFA.

#### **Fase estacionaria:**

Columna C<sub>18</sub>analítica.

Previo a la inyección de la muestra, la columna se lavó con 100% de la solución B durante 15 min y se estabilizó con 100% de la solución A durante 15 min.

**Tabla 2. Gradiente de elución.**

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Flujo (mL/min)</b>	<b>%A</b>	<b>%B</b>
0	1	100	0
5	1	100	0
15	1	85	15
75	1	55	45
85	1	30	70
94	1	30	70

### 9.7 Dosis letal media (DL<sub>50</sub>).

Se utilizaron ratones ICR de 18 a 20 g de peso, sin importar el sexo.

1. Se seleccionaron dosis de veneno, asegurándose de obtener un 100% de supervivencia y 100% de mortalidad. Se formaron grupos de 3 ratones por dosis de veneno. Como control se inyectaron tres ratones con NaCl 150 mM.
2. Teniendo el rango de 100% de supervivencia y 100% mortalidad, se seleccionaron al menos 5 dosis intermedias y fueron inyectadas en grupos de 3 ratones para cada una de las cantidades.
3. Se registró el porcentaje de mortalidad a las 24 horas posteriores a la inoculación.
4. Los datos se procesaron con el software GraphPad Prism 4.

Se realizó la inyección intravenosa, utilizando la vena caudal de cada ratón. Las dosis se administraron de la siguiente manera:

*C. l. klauberi*: 7, 10, 16, 19, 22, 25, 50 µg/ratón.

*C. aquilus*: 25, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 75, 100 µg/ratón.

*C. lepidusxaquilus*: 50, 75, 100, 115, 125, 130, 135 µg/ratón.

Para obtener la DL<sub>50</sub> se graficó el porcentaje de mortalidad en función del logaritmo de la dosis de veneno inyectado por grupo. Estos datos fueron analizados utilizando una regresión no lineal (Curva dosis-respuesta de pendiente variable) en el software Graphpad Prism 4.0. La DL<sub>50</sub> fue definida como la dosis de veneno que causa la muerte a la mitad de la población de ratones (Theackston & Reid, 1983).



### **9.8 Actividad procoagulante.**

1. Se tomaron 15 mL de sangre de un donador voluntario sano y se mezclaron con 5 mL de citrato de potasio ( $C_6H_5K_3O_7$ ) 0.5M.
2. Se centrifugó a 3000 rpm. Por 15 min.
3. En 15 tubos de ensayo de vidrio, se colocaron 200  $\mu$ L de plasma a cada tubo y se incubaron por 3 min a 37°C.
4. Se añadieron 20  $\mu$ L (concentración: 3.2  $\mu$ g/ $\mu$ L) de veneno de *C. l. klauberi*, *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus* a cada muestra y se midió el tiempo transcurrido desde la inyección del veneno hasta la formación del coagulo. Se utilizó veneno de *Bothrops asper* como control positivo.

La dosis mínima procoagulante (DMP). Se define como la cantidad de veneno necesaria para evidenciar la formación de un coagulo en 60 segundos (Theakston & Reid, 1983; Gené et al., 1989).

### **9.9 Actividad proteolítica sobre azocaseína.**

1. Se preparó solución de azocaseína (Sigma A2765) de 10 mg/mL en buffer Tris – HCl 50 mM, NaCl 0.15 M y  $CaCl_2$  5 mM, pH 8.0.
2. Se mezclaron 100  $\mu$ L de azocaseína con 20  $\mu$ L de la toxina o el veneno a probar, diluido en el mismo buffer (NaCl 150mM). Se hicieron triplicados de cada muestra y se utilizó buffer de dilución de la toxina como control negativo.
3. Se Incubó cada muestra por 90 min a 37°C.

4. Se agregaron a cada tubo 200  $\mu$ L de ácido tricloroacético ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ) al 5%, se mezclaron y centrifugaron por 5 min a 15000 rpm. (para microplaca se agregaron 180  $\mu$ L de ácido tricloroacético).
5. Se mezclaron 150  $\mu$ L del sobrenadante con 150  $\mu$ L de NaOH 0.5M. (en placa de ELISA).
6. Se midió absorbancia a 405nm.

### **9.10 Detección de crotoxina: Western blot semi – seco.**

La preparación de los buffers de transferencia y ABTS se muestra en el **Anexo H**. Se cargaron 5mg de muestra por carril (1. Marcador de peso molecular, 2. Crotoxina pura, 3. Veneno de *C. s. scutultus* A, 4. *C. s. scutulatus* B, 5. Poolde venenode *C. l. klauberi*, 6. *C. aquilus*, 7. *C. lepidus x aquilus*) en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Una vez que el gel terminó de correr, se sacó éste de la cámara de electroforesis y fue transferido a una membrana de nitrocelulosa.

Se utilizaron anticuerpos monoclonales anti – crotoxina (anticuerpo primario) en una dilución 1:1000 (Hernández, 2013).

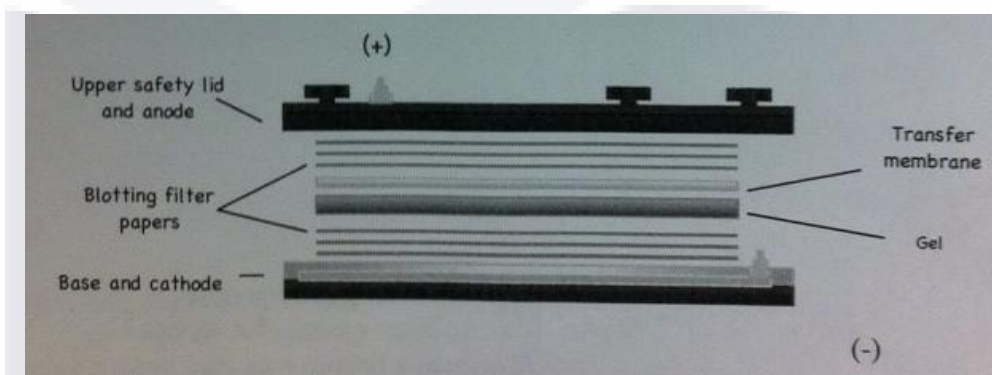
Se utilizaron anticuerpos anti-conejo marcados con peroxidasa de rábano en dilución 1:1000 (Hernández, 2013).

#### **Cámara semi-seca:**

- Se hizo un “sándwich”:
  - Se colocaron 3 papeles filtro (3M) del tamaño del gel sobre la cámara.
  - Se colocó el gel.
  - Luego fue colocado el papel de nitrocelulosa.
  - Finalmente se agregaron otros 3 papeles filtro (3M).

**NOTA:** Todos los papeles del sándwich estuvieron previamente sumergidos en buffer de transferencia, el sándwich debe quedar bien mojado y sin burbujas.

Se tapó la cámara y se aplicó corriente constante a 400 mAmps. Se dejó la transferencia durante 1 hora(**Figura 6**).



**Figura 6. Conformación de la cámara semi-seca para la transferencia de proteínas del gel SDS – PAGE a la membrana de nitrocelulosa.**

### **9.11 Detección y cuantificación de crotoxina mediante ELISA.**

1. Se sensibilizaron placas NUPEC con el anticuerpo 4F6 anti-crotoxina(Hernández, 2013) y solución de sensibilizado (Buffer de bicarbonatos pH 9.5) a una concentración de 1 mg/mL, incubando durante una hora a 37°C.
2. Al término de la incubación se desechó el sobrenadante y se agregaron 200 µL de solución de lavado (Tris 1M pH 8 + NaCl 5M + Tween 20). Se repitió tres veces.
3. Los pozos se bloquearon con gelatina (Tris 1M pH 8 + gelatina + Tween 20) agregando 200 µL a cada pozo e incubando 2 horas a 37°C.
4. Se hicieron 3 lavados.

5. Se agregaron 100  $\mu$ L de solución de reacción (**SR**: Tris 1M pH 8 + NaCl 5M + Gelatina + Tween 20) a las columnas 2 – 12 y filas A – H. Posteriormente se agregaron 150  $\mu$ L de una concentración de 2 $\mu$ g/mL de crotoxina (**Ctx**: para la curva estándar), y diferentes concentraciones de los venenos problema (**C. l. k**: veneno de *C. l. klauberi*, **C. a**: *C. aquilus*, **C. lxa**: *C. lepidus x aquilus*, **C -**: veneno de *C. s. scutulatus* tipo B utilizado como control negativo) con solución de reacción al pozo 1A a 1H a partir de estos se tomaron 50  $\mu$ L de sobrenadante y se transfirieron al siguiente pozo, de manera sucesiva hasta llegar al pozo 10, en el **Anexo I** se muestra una descripción gráfica de éste procedimiento.
6. Se incubó una hora a 37°C.
7. Se aplicaron 3 lavados.
8. Se incubó 1 hora a 37°C con una concentración de 1  $\mu$ g/mL, dilución 1:1000 del anticuerpo monoclonal de conejo anti – crotoxina (Hernandez, 2013).
9. Se preparó una dilución 1:1000 de anticuerpos anti-conejo conjugados con peroxidasa de rábano y solución de reacción, se agregaron 100  $\mu$ L a cada pozo y se incubó una hora a 37°C (Hernández, 2013).
10. Se hicieron 3 lavados.
11. Se realizó el revelado con una mezcla de 1 mL de buffer para Ácido 2,2' – azinobis (3-etilbenzotiazolín) -6-sulfónico (ABTS). 75  $\mu$ L de ABTS, aforando a 10 mL de agua destilada.

## 10. Resultados.

### 10.1 Trabajo de campo; colecta de los ejemplares de víboras de cascabel.

Se colectaron un total de 18 ejemplares (4 hembras y 11 machos adultos, 3 crías 2013) de cascabel bandeada de las rocas *C. l. klauberi* (Montoro – Aguascalientes) así como un ejemplar de cascabel pigmea *Crotalus aquilus* (Sierra el Laurel – Aguascalientes) y 4 *C. aquilus* (Nochistlan – Zacatecas).

### 10.2 Extracción, liofilización y cuantificación de proteína del venenode cada serpiente, peso en mg/ordeña, BCA y absorbancia a 280nm.

Los resultados obtenidos de las extracciones, y la cuantificación de proteína se muestran en la tabla 5. Donde los ejemplares marcados con asterisco (\*) son animales cuya longitud del cuerpo es mayor a 40 cm.

**Tabla 3. Cuantificación de proteína en mg/ordeña, BCA y abs a 280 nm.**

Muestra	mg/ordeña	BCA	C mg/mL
<i>C. l. klauberi</i> 1*	58	2.98	3.6
<i>C. l. klauberi</i> 2	22.3	2.52	2.58
<i>C. l. klauberi</i> 3	16.3	2.34	3.28
<i>C. l. klauberi</i> 4	10	2.54	3.78
<i>C. l. klauberi</i> 5	14.3	2.52	2.82
<i>C. aquilus</i> 1*	52.2	2.9	3.4
<i>C. aquilus</i> 2	8.1	2.66	3.12
<i>C. aquilus</i> 3	14.6	1.93	2.96
<i>C. aquilus</i> 4	2.9	2.43	2.62
<i>C. aquilus</i> 5	1.6	1.62	1.54
<i>C.lepidus x aquilus</i> 1*	67.1	3.83	3.22
<i>C.lepidus x aquilus</i> 2	11.9	2.99	3.44
<i>C.lepidus x aquilus</i> 3*	126.6	2.82	3.42
<i>C.lepidus x aquilus</i> 4	28.9	2.95	3.7

De un ejemplar adulto se pueden extraer hasta 126.6 mg de veneno (peso seco). Aunque en promedio la cantidad que se les puede extraer es de 76 mg de veneno (peso seco). Mientras

que de los ejemplares jóvenes (> 30 cm de longitud del cuerpo) en promedio se les extrajeron 2.25 mg de veneno (peso seco).

Posteriormente se hicieron los pool pesando 3 mg de veneno de cada ejemplar y se colocaron en tubos ependorff (un tubo para cada grupo de estudio), una vez colocado el veneno en los tubos se resuspendió con 1 mL de NaCl 150mM. Estos tres pool fueron cuantificados por BCA y a partir de ésta cuantificación se hicieron las pruebas de actividad biológica y caracterización bioquímica.

**Tabla 4. Cuantificación de proteína de los “pool” de veneno de los tres grupos de serpientes en estudio; por peso seco y BCA.**

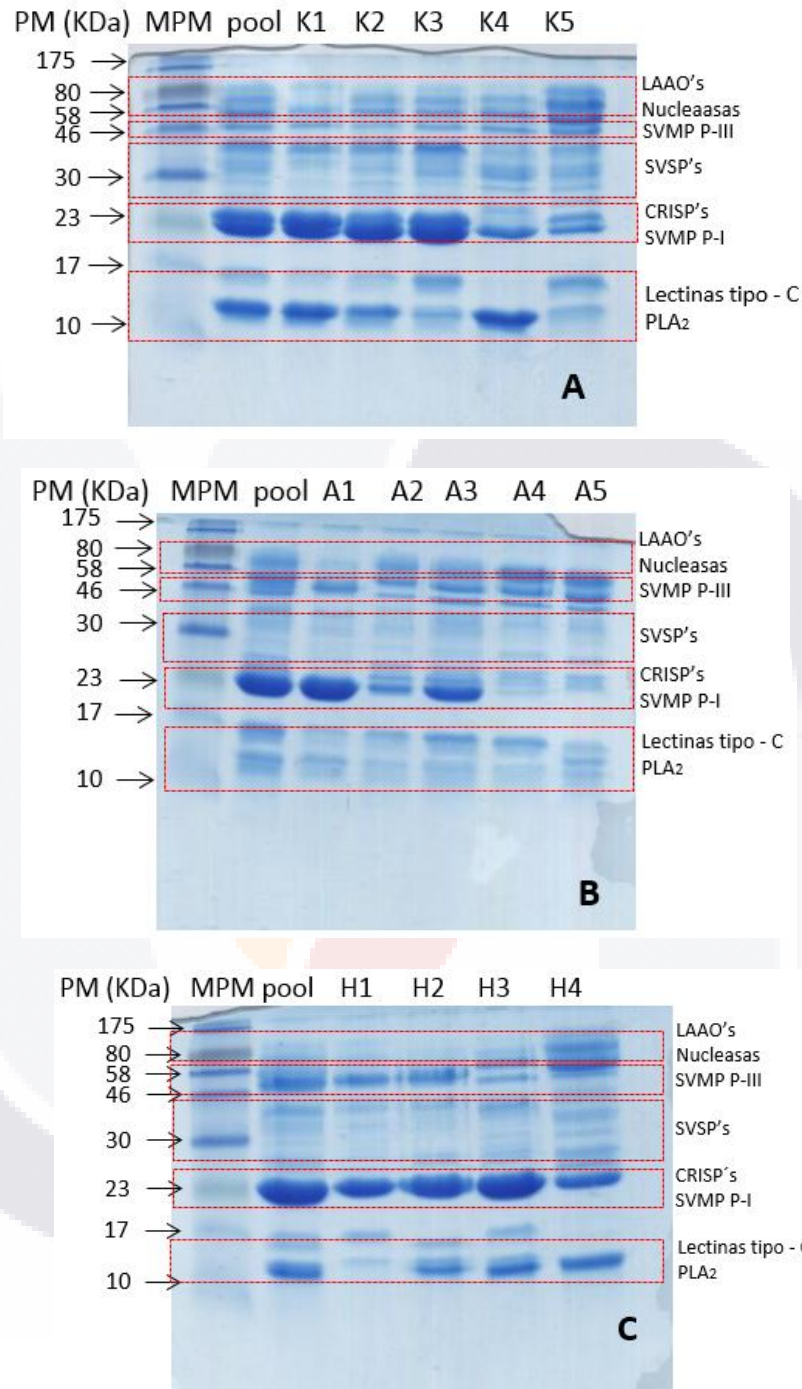
Veneno “Pool”	Peso seco	BCA
Pool <i>C. l. klauberi</i>	18.3	11.6
Pool <i>C. aquilus</i>	8.8	6.29
Pool <i>C. lepidus x aquilus</i>	12.1	6.13

Basados en las concentraciones obtenidas mediante el BCA, se aplicaron los ensayos posteriores.

### **10.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS - PAGE).**

Se obtuvieron tres geles, con perfiles similares de bandeo; tanto de los pool como de las muestras individuales de veneno de los tres grupos de estudio (*C. l. klauberi*, *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus*). En la **Figura 7**. Se aprecia la separación electroforética; las familias de proteínas fueron asignadas tomando en cuenta sólo sus pesos moleculares.

Tanto el grupo de *C. lepidus x aquilus* como *C. l. klauberi* poseen **PLA<sub>2</sub>** (~14 kDa) mientras que *C. aquilus* posee concentraciones menores. Los tres grupos de las dos especies y *C. lepidus x aquilus* poseen concentraciones importantes de posibles metaloproteasas (~23 kDa). Éste peso molecular coincide con el que poseen las **SVMPP-I** (Mackessy, 2010). No se presentó una diferencia marcada en la región en la cual aparecen las **SVMPP-III**, los tres grupos de estudio poseen cantidades similares de estas proteínas.



**Figura 7. SDS-PAGE en condiciones reductoras; (MPM) marcador de peso molecular. (Pool) pool de veneno de cada grupo. (A) *C. l. klauberi*, los carriles K1 a K5 representan el veneno de cinco ejemplares de esta especie. (B) *C. aquilus*, los carriles A1 a A5 representan muestras de cinco ejemplares, de las cuales A4 y A5 son crías de 2 meses de edad. (C) *C. lepidus x aquilus*, carriles H1 a H4 corresponden a muestras de veneno de cuatro ejemplares. A la derecha las Familias de proteínas (Mackessy, 2010).**

#### 10.4 Cromatografía líquida de alta resolución, fase reversa (RP-HPLC).

Se cargó 1mg del pool de veneno de cada uno de los grupos de estudio (*C. l. klauberi*, *C. aquilus* y *C. lepidusxaquilus*) en una columna C<sub>18</sub> (características descritas en material y metodología).

Se obtuvo el perfil de elución de la separación del veneno de los tres grupos de estudio, mostrando mayor similitud entre los perfiles de *C. l. klauberi* y *C. lepidusxaquilus*. Ambos muestran picos bien definidos en los tiempos de retención del minuto 55 al minuto 94, por los tiempos en los que eluyeron las fracciones podemos inferir que se trata principalmente de **SVMP's, PLA<sub>2</sub>, SVSP's** principalmente.

Los cromatogramas correspondientes al pool de cada uno de los tres grupos de venenos estudiados se presentan en la **figura 8**.



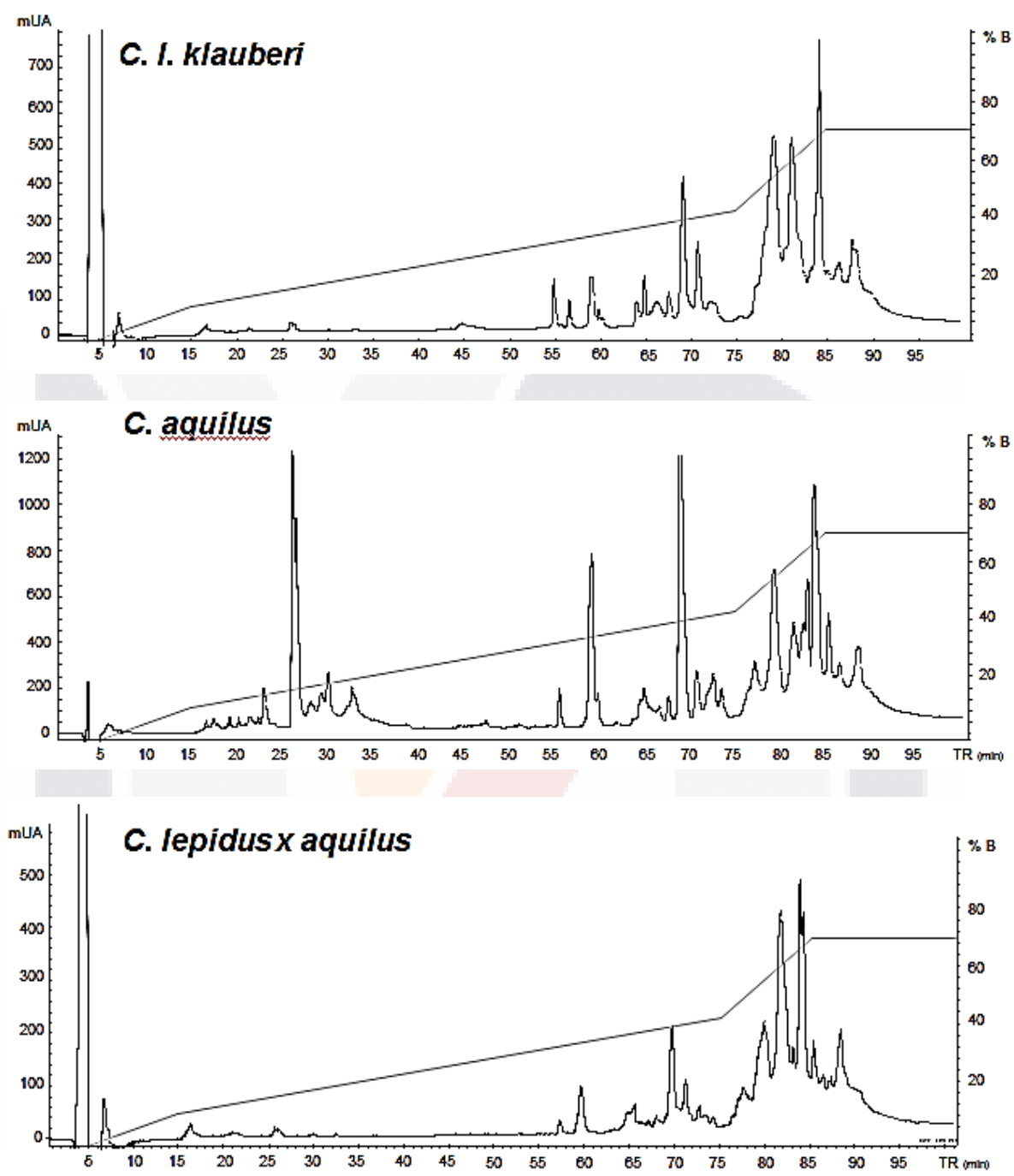


Figura 8.RP – HPLC.Perfiles de elución de proteínas por muestra; Pool de veneno de *C. l. klauberi*,*C. aquilus*,*C. lepidus x aquilus*. Se cargó 1 mg de veneno en una columna C<sub>18</sub> Grace Vydac (250 X 4.6mm, partícula 5µm) como se describe en material y métodos. Eje X: unidades de miliabsorbancia (mUA). Eje Y: tiempo de retención (TR).

### 10.5 Dosis letal media (DL<sub>50</sub>).

Los valores obtenidos de DL<sub>50</sub> se reportan en la tabla 5.

Grupo	DL <sub>50</sub> μg/ratón	Intervalo de confianza 95%	R <sup>2</sup>
<i>C. l. klauberi</i>	12.24	10.42 a 14.39	0.9614
<i>C. aquilus</i>	44.86	42.58 a 47.26	0.9471
<i>C. lepidusxaquilus</i>	117.6	109.1 a 126.7	0.8025

Los resultados de los tres grupos de venenos analizados semuestran en la figura 9.

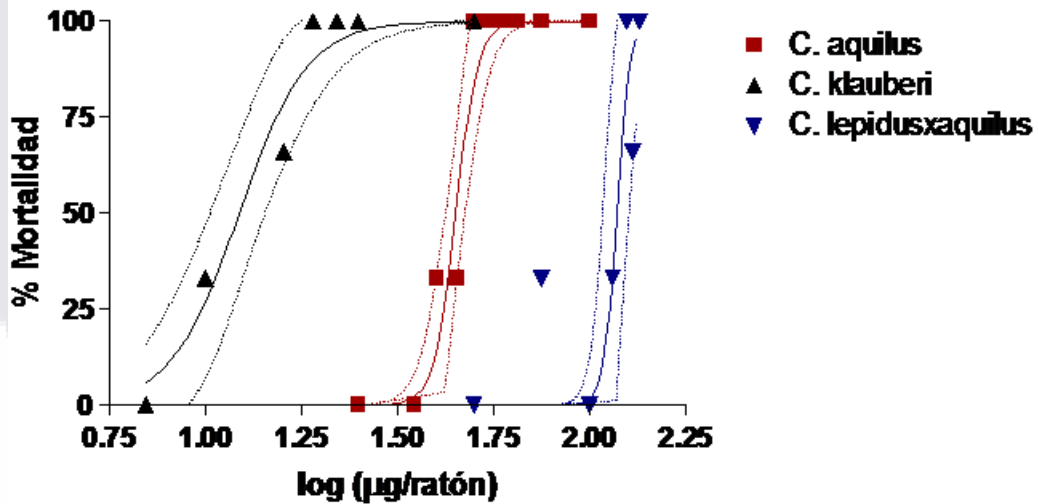


Figura 9. Se muestra la gráfica de letalidad con los valores arrojados por los tres pool de veneno. Se hicieron grupos de tres ratones por cada dosis, y se registraron muertes a las 24 horas como se explica en material y metodología.

### 10.6 Actividad pro coagulante.

La actividad procoagulante (**Figura 10**), se evaluó mediante la dosis mínima procoagulante (DMP), ésta se define como la cantidad de veneno necesaria para evidenciar la formación de un coagulo en 60 segundos (Theakston & Reid, 1983; Gené et al., 1989). Sólo se detectó actividad procoagulante en el veneno de *C. lepidus x aquilus* a dosis mayores a 100 µg.

Veneno	DMP
<i>Bothrops asper</i> (control +)	2.3 µg
<i>C. l. klauberi</i>	No presentó
<i>C. aquilus</i>	No presentó
<i>C. lepidus x aquilus</i>	175.5 µg

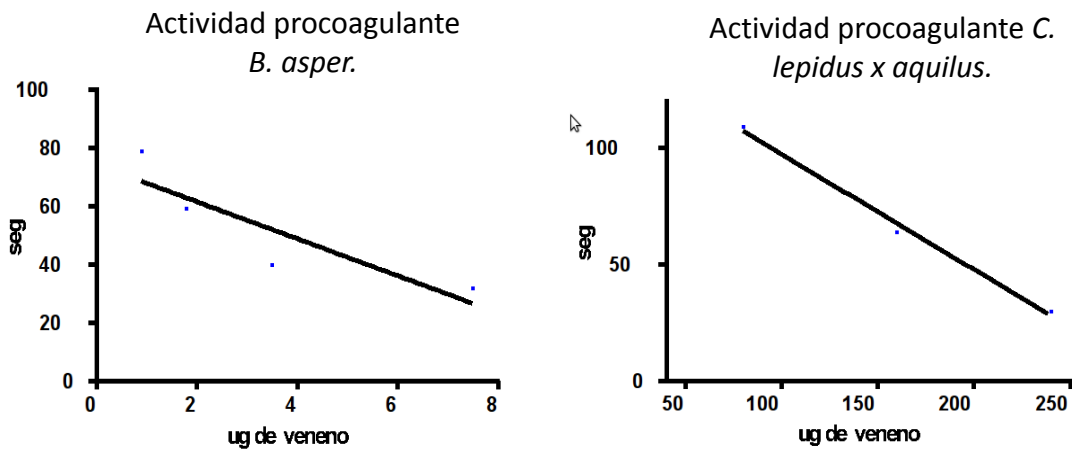
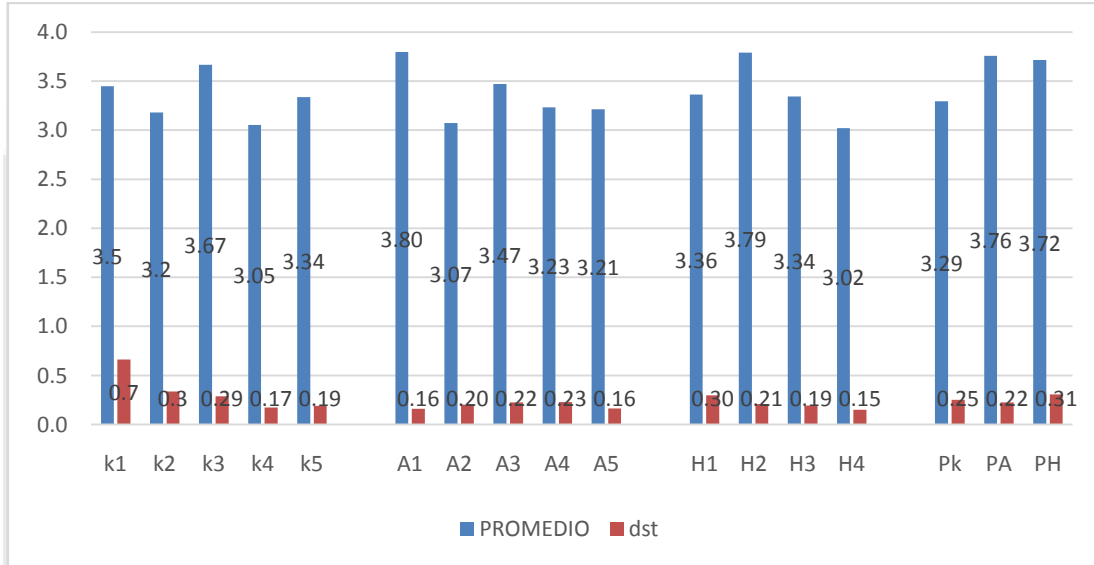


Figura 10. Actividad procoagulante en el veneno de *C. lepidus x aquilus*; interpolando al segundo 60 se observan las DMP de cada veneno. Se utilizó veneno con alta actividad procoagulante; *B. asper*; como control.

### 10.7 Actividad proteolítica sobre azocaseína.

Una unidad de actividad proteolítica se define como el cambio en 0.2 unidades de absorbancia por minuto (Gutierrez et al., 2008). Los resultados obtenidos de actividad proteolítica sobre azocaseína se muestran gráficamente en la **figura 11**.



**Figura 11.** Actividad proteolítica del veneno de las víboras de cascabel; *C. l. klauberi* (k1, k2, k3, k4, k5), *C. aquilus* (A1, A2, A3, A4, A5), *C. lepidus x aquilus* (H1, H2, H3, H4), pool de *C. l. klauberi* (Pk), pool de *C. aquilus* (PA), pool de *C. lepidus x aquilus* (PH), sobre azocaseína.

Se observan pequeñas diferencias en las actividades proteolíticas de cada veneno, la proteólisis es mayor en los venenos de *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus* que en *C. l. klauberi*, la cual posee  $3.29 \pm 0.25$  unidades de actividad enzimática, sin embargo esta diferencias no son estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ). **Tabla 7.**

**Tabla 7. ANOVA 1 vía: Comparación de actividad proteolítica entre venenos de *C. l. klauberi*, *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus* sobre azocaseína (Diferencias significativas si:  $P < 0.05$ ). Excel 2013.**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	P	Valor crítico para F (tabla)
Entre grupos	0.001617857	2	0.000808929	0.01027181	0.989790245	3.982297957
Dentro de los grupos	0.866275	11	0.078752273			
Total	0.867892857	13				

## 10.8 Detección de Crotoxina por RP – HPLC.

Se hicieron corridas en HPLC utilizando el pool de venenode *C. l. klauberi* Ctx purificadadel veneno de *C. durissus terrificus* (control positivo).

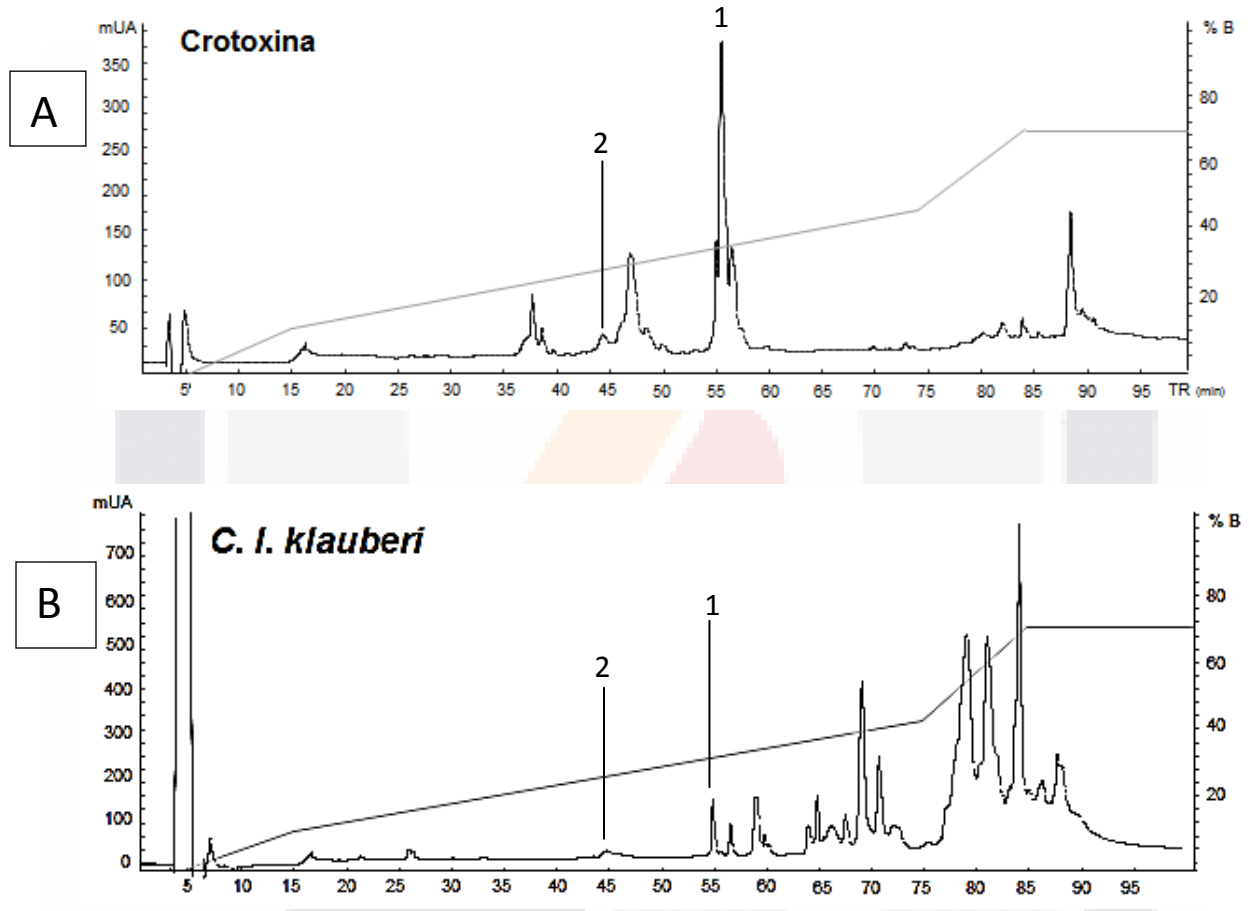
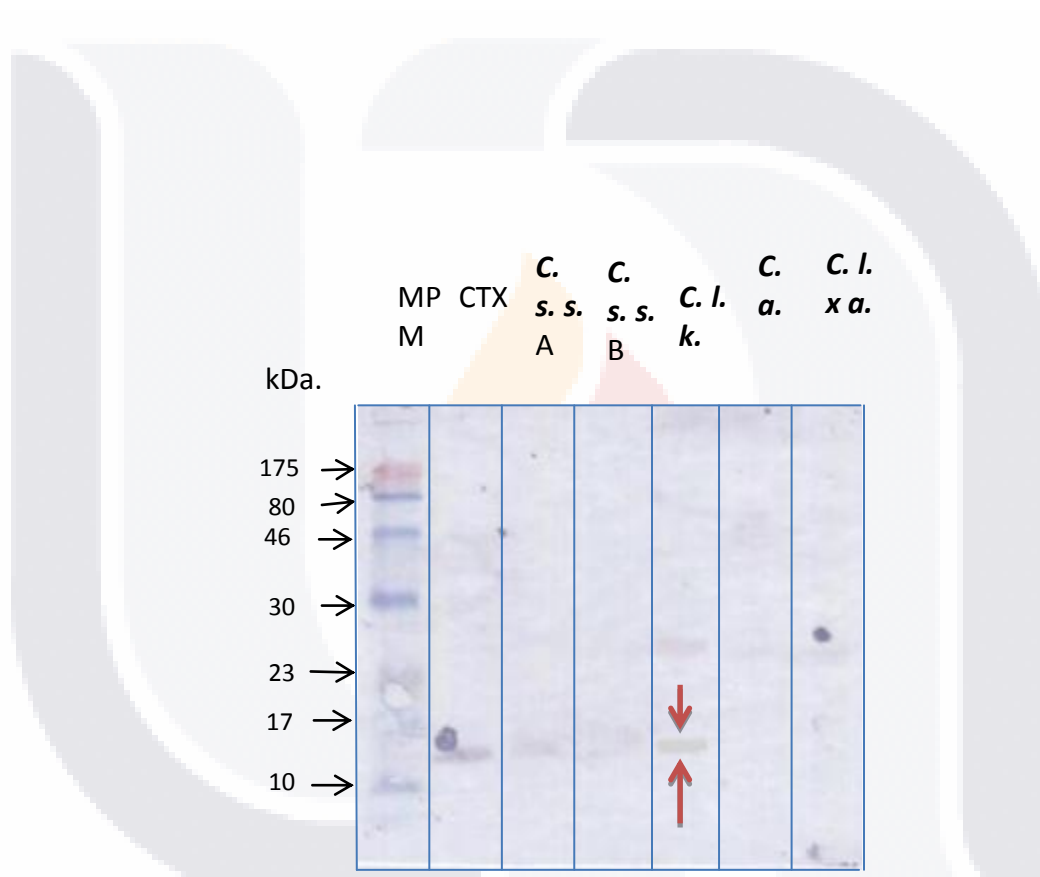


Figura 12.RP – HPLC. Perfil de elución de Ctx pura (A). Veneno de *C. l. klauberi* a 3mg/mL en NaCl 150 mM. (B). Se inyectó 1mg de veneno en la columna C<sub>18</sub>. El pico 1 representa la subunidad ácida, el pico 2 representa la subunidad básica de la Ctx.

### 10.9 Detección de crotoxina: Western blot semi – seco.

El Western blot aplicado sobre los venenos de los tres grupos de estudio, arrojó un reconocimiento por parte de los anticuerpos monoclonales 4F6 anti-crotoxina hacia este componente neurotóxico presente en el veneno de la víbora de cascabel bandeada de las rocas *C. l. klauberi*. Mientras que los otros dos venenos (*C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus*) poseen **PLA<sub>2</sub>** que no son **Ctx**, como se aprecia en el SDS – PAGE, y RP – HPLC.



**Figura 13. Western blot (5 mg).** Se muestra la membrana de nitrocelulosa donde se aprecia la transferencia y el reconocimiento de bandas (péptidos) por los anticuerpos monoclonales anti – crotoxina. (MPM) Marcador de peso molecular; (CTX) Crotoxina; (C. s. s. A) Veneno de *C. s. scutulatus* tipo A; (C. s. s. B) *C. s. scutulatus* tipo B; (C. l. k.) Veneno de *C. l. klauberi*; (C. a.) *C. aquilus*; (C. l. x a.) *C. lepidus x aquilus*. Las flechas rojas indican un reconocimiento de los anticuerpos anti – crotoxina hacia la crotoxina en el veneno de *C. l. klauberi*.

### 10.10 Detección y cuantificación de Crotoxina mediante ELISA.

Mediante la técnica de detección y cuantificación de **Ctx** en los pool de venenos de los tres grupos de estudio (*C. l. klauberi*, *C. aquilus* y *C. lepidusxaquilus*) por ELISA tipo “sándwich” sólo se obtuvo una reacción positiva para el veneno de *C. l. klauberi*.

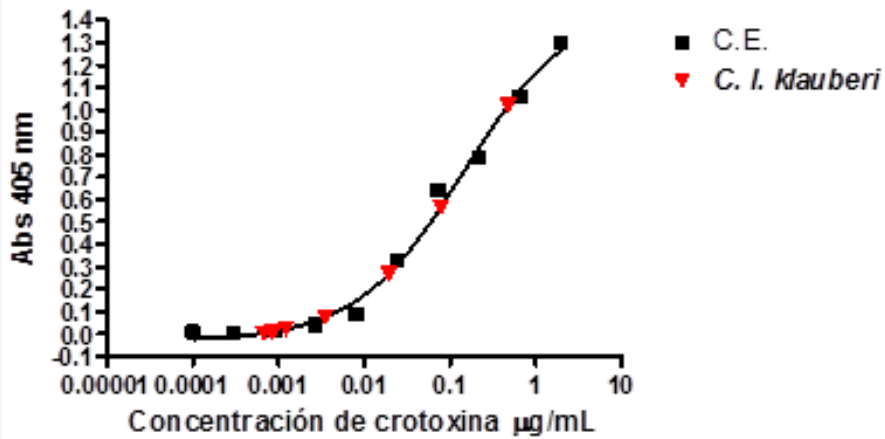


Figura 14. La gráfica muestra la (C. E.) curva estándar, así como los valores de absorbancia (abs) a 405nm interpolados del veneno de *C. l. klauberi*.

Se calculó que el 10.8 % de la composición proteica del veneno de *C. l. klauberi* es **Ctx** (intervalo de confianza: 95%).

## 11. Discusiones.

Los resultados obtenidos con respecto a la colecta de los organismos tomando como base las horas de mayor actividad de esta especie reportadas por Beaupre, citado por (Campbell & Lamar, 2004), en las zonas reportadas por (Vázquez & Quintero, 2005) donde ocurren las especies de víboras de cascabel estudiadas *C. l. klauberi* *C. aquilus* coinciden. El grupo de víboras de cascabel *C. lepidusxaquilus* corresponde a una población en actual estudio con respecto a su taxonomía (Bryson, 2010).

El volumen de veneno de las víboras ordeñadas en promedio fué de 76 mg. Se llegaron a obtener hasta 126 mg de veneno de un ejemplar de *C. lepidusxaquilus* (longitud 54 cm). Para *C. aquilus* (longitud 36 cm) la mayor cantidad de veneno obtenida de una sola extracción fue de 52 mg., así mismo se obtuvieron hasta 58 mg de veneno de un solo ejemplar del grupo *C. l. klauberi* (longitud 64 cm), estos datos difieren de los reportados por (Norris, 2005) que reporta un valor de 30 mg el cual es menor a los obtenidos en este estudio. Sin embargo para víboras de mayor tamaño (con respecto a *C. lepidus x aquilus*) como *C. r. ruber* (longitud 96 cm), se reportó menor cantidad de veneno (117 mg) comparado con *C. lepidus x aquilus*. Estos datos contrastan con los de especies como *C. viridis caliginis* 19 mg, *C. catalinensis* 21 mg (Glenn & Straight, 1985). A la cascabel diamante del oeste *C. atrox* se le extrajo hasta 1 gramo de veneno, esta especie puede llegar a 1.8 m de longitud y se encuentra en zonas donde habita *C. lepidus* (Klauber, 1956), lo que favorece el supuesto de que conforme crece la serpiente, aumenta la cantidad de veneno que puede almacenar en sus glándulas (Klauber, 1972; Mackessy, 2003), lo que a su vez influye en la cantidad de veneno que estas inyectan cuando muerden (Hayes et al., 2002; Hayes, 2008). Se ha demostrado un alto nivel de variación en cuanto a la cantidad de veneno inoculado por serpientes en ataques predatorios y defensivos (Smith et al., 2014)

Lo que se muestra aquí es el alto grado de variación que puede haber en cuanto a cantidad de veneno que produce cada serpiente independientemente que pertenezcan a la misma especie y/o a la misma población o región geográfica (Daltry et al., 1996). La producción de veneno conlleva costos energéticos potencialmente altos y estos influyen en su tasa de producción (Mirtschin et al., 2002), sin embargo, los resultados de un estudio



hecho con *Acantophis antarcticus* sugieren que los costos energéticos totales de la producción de veneno son relativamente pequeños cuando se comparan a los costos energéticos del proceso de digestión y ecdisis (Pintor et al., 2010).

Además de la variación en la producción de veneno (cantidad), éste también puede variar en su composición. Las proteínas en el veneno de serpiente pueden mostrar altos niveles de variación a nivel individuo, pero los mecanismos ambientales y moleculares que generan esta diversidad aún no se han esclarecido (Gibs et al., 2011).

La separación de proteínas del veneno mediante SDS – PAGE, mostró pocas diferencias marcadas en la composición de estos tres grupos de venenos, estas diferencias para el caso de *C. aquilus*, podrían ser explicadas mediante el fenómeno de variación ontogenética, sin embargo se muestran pequeñas diferencias en los venenos de los dos últimos ejemplares analizados de *C. l. klauberi* (Figura 7, carriles k4 y k5) que no se pueden explicar por este proceso debido a que los ejemplares de los que se obtuvo el veneno son ejemplares adultos. Existe evidencia indirecta de que la variación puede estar sujeta a control genético (Chippaux et al., 1982). En los tres grupos de venenos analizados se encontró que hay relativa abundancia de probablemente **SVMP P-I** (~23kDa) y **P-III** (~54 kDa) en base al peso molecular. Así como una presencia importante de **PLA<sub>2</sub>** (~14 kDa) en los venenos de *C. l. klauberi* y *C. lepidus x aquilus*. El veneno de *C. aquilus* presenta bandas menos conspicuas en este rango de pesos moleculares, se puede inferir que las **PLA<sub>2</sub>** no son abundantes en el veneno de *C. aquilus* con respecto a los otros dos grupos de estudio. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por (Martínez – Romero et al., 2013), sin embargo hace falta una caracterización de **PLA<sub>2</sub>** para poder aseverar la carencia de esta enzima en el veneno de *C. aquilus*, ya que los pesos moleculares pueden variar.

El RP – HPLC de los pool de veneno de los tres grupos de estudio arrojó perfiles de elución similares con excepción del perfil de *C. aquilus*, en éste, los picos en los tiempos de retención que van del minuto 15 al minuto 35 son evidentes, pero en *C. l. klauberi* y *C. lepidus x aquilus* no son tan evidentes o están ausentes, en estos tiempos de retención generalmente eluyen desintegrinas (Sánchez et al., 2005; Galán et al., 2008; Sánchez et al., 2008; Lomonte et al., 2012). Por otra parte los tres venenos mostraron picos a los tiempos

de retención en los cuales con frecuencia son eluidas las **PLA<sub>2</sub>**(Mackessy, 2010; Vargas et al., 2012), estos resultados son congruentes con el SDS – PAGE ya que éste no mostró presencia importante de **PLA<sub>2</sub>** en el veneno de *C. aquilus*, sin embargo en el cromatograma de ésta, aparecen picos que probablemente corresponden a **PLA<sub>2</sub>**. Los picos en la región donde generalmente eluyen **SVSPs**, **LAAOs** y **SVMPs**(Lomonte et al., 2012; Bernardes et al., 2013) están presentes en los tres pool de veneno analizados (**Figura 8**).

### **Letalidad.**

La DL<sub>50</sub> ha ganado amplia aceptación como una medida de toxicidad aguda de todo tipo de sustancias (DePass, 1989). En este estudio los valores de éste parámetro difieren de los reportados por Martínez-Romero et al., (2013), donde se trabajó con muestras de veneno de *C. l. klauberi* de Aguascalientes, Chihuahua y Zacatecas; *C. l. lepidus* de Coahuila y Nuevo León, éstas tienen DL<sub>50</sub> i.v. de 25.5 y 28.22 µg/ratón respectivamente. En el presente estudio *C. l. klauberi* tiene una letalidad mayor (**Tabla 5**) con respecto a la reportada por Martínez-Romero et al., (2013) y a los venenos de: *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus*. Hay una diferencia de 32.62 µg entre las DL<sub>50</sub> de los venenos de *C. l. klauberi* y *C. aquilus*, la mayor diferencia se da en el valor obtenido del veneno de *C. lepidus x aquilus* (117.6 µg/ratón). Este resultado se contrapone a la hipótesis de que estas especies pertenecientes al grupo *C. triseriatus* conocidas como cascabeles de montaña (Bryson, 2010), poseen venenos con DL<sub>50</sub> iguales. Neri et al., (2013) ha reportado diferencias a niveles de subespecie entre letalidades del complejo *C. simus* (*C. simus simus*, *C. simus culminatus*, y *C. s. tzabcan*), el veneno de *C. s. simus* es el de mayor letalidad (DL<sub>50</sub> i.v. 3.99 µg/ratón), mientras que *C. s. culminatus* es el de menor letalidad (170.24 µg/ratón), este patrón de variación de DL<sub>50</sub> es similar al observado en *C. l. klauberi*, *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus*, y puede ser explicado por la presencia de **Ctx** en el veneno de mayor letalidad (*C. l. klauberi*) así como en el veneno de mayor letalidad de las subespecies de *C. simus* (**Anexo C**).

Al observar sintomatología durante la DL<sub>50</sub> se observó parálisis flácida (parálisis en músculos de extremidades posteriores) en los ratones inyectados con el veneno de *C. l.*

*klauberi*, esto sugiere la presencia en este veneno de **Ctx** (Brazil et al., 1966; Sampaio et al., 2010). La presencia de **Ctx** puede explicar la letalidad (valor menor de  $DL_{50}$ ) observada en el veneno de *C. l. klauberi* como afirma Glenn et al., (1983), Algunos venenos son significativamente más letales que otros, debido principalmente a la presencia de neurotoxinas. Los resultados de este estudio proveen evidencia a favor de una relación entre la presencia de **Ctx** en un veneno y su  $DL_{50}$ , esta relación también es evidente en los venenos de *C. s. simus* reportados por Neri et al., (2013) y *C. s. scutulatus* Glenn et al., (1983). Esta toxina fue detectada de manera cualitativa con RP-HPLC y Western blott (**Figura 12, 13**), donde se aprecia el reconocimiento por parte de los anticuerpos 4F6 anti-crotoxina a una banda de ~14 kDa en el veneno de *C. l. klauberi*. Sin embargo, la prueba de ELISA arrojó no solo la detección, también la cuantificación de **Ctx** en el veneno de *C. l. klauberi*, éste posee un 10.8% de esta neurotoxina, un valor relativamente bajo si se compara con el de *Crotalus durissus cascavellade* 72.5% (**Anexo C**), sin embargo no todas las poblaciones de *C. l. klauberi* poseen esta toxina. Glenn & Straight (1982), afirman que el veneno de *C. l. klauberi* de Aguascalientes, Nuevo León y Zacatecas carecen de **Ctx**. Martínez – Romero et al., (2013), reportaron presencia de **PLA<sub>2</sub>** en los venenos de *C. l. lepidus* y *C. l. klauberi*, pero no identificaron si formaban parte de **Crtx**, por lo tanto, los resultados del Western blott y ELISA, contradicen los resultados de (Glenn & Straight, 1982) con respecto al veneno de *C. l. klauberi* de Aguascalientes y complementan los reportados por Martínez – Romero et al., (2013). Sin embargo, son necesarios estudios acerca de la distribución geográfica de **Crtx** en el veneno de *C. l. lepidus* y *C. l. klauberi* (en el **Anexo J** se muestra el mapa de distribución de **Ctx** en las poblaciones de *C. l. klauberi* que la presentan en sus venenos), ya que tienen relevancia al momento de la selección de los venenos para la obtención de antivenenos específicos. Weinstein et al., (1985) menciona que esta neurotoxina en las serpientes de cascabel se distribuye a manera de mosaico, esto concuerda con los resultados obtenidos en este estudio y los reportados por Glenn & Straight, (1982). Con respecto a la variación en la composición de los venenos Calvete, (2010), Calvete et al., (2009), Gutiérrez et al., (2009), afirman que la heterogeneidad intraespecífica en la composición de los venenos puede explicar la diferencia en los síntomas clínicos observados en los casos de envenenamiento en humanos y pueden afectar la capacidad de neutralización de los antivenenos. Además, para

los fabricantes, quienes buscan optimizar la producción de antiveneno, las diferencias intraespecíficas en la composición de los venenos podría ser muy relevante al momento de decidir si los pool de veneno de diferentes regiones deberían de ser considerados o si el veneno de una región es representativo de la especie. Neri et al., (2013), menciona que el complejo patrón de variación intraespecífica del veneno en las subespecies del complejo *C. simus* provee valiosa información para el diagnóstico y el tratamiento clínico de los envenenamientos por esta especie en México, así como para la preparación de los pool de veneno para el control de producción y calidad de antivenenos. Esta información puede ser de utilidad en la comprensión de la fisiopatología de los envenenamientos. También se ha demostrado el efecto antitumoral de la Ctx (Rudd et al, 1994) y efecto analgésico (Brigatte et al., 2007), por lo tanto, esta toxina una vez aislada, podría ser de utilidad para el tratamiento de enfermedades humanas.

#### **Actividad biológica.**

Los venenos presentes en la familia Viperidae contienen abundantes proteasas que afectan la cascada de coagulación a través de mecanismos pro y anti coagulantes (Zingali, 2007). En el presente estudio, sólo el veneno de *C. lepidus x aquilus* mostró actividad procoagulante, éste tuvo una DMP mayor a 100 µg, en comparación con la DMP de especies como *Bothrops asper* (tabla 6), se puede decir que el veneno de *C. lepidus x aquilus* tiene poca actividad procoagulante. Rael et al., (1992) reporta los venenos de *C. l. lepidus* y *C. l. klauberi* como altamente hemorrágicos, lo que concuerda con Martínez – Romero et al., (2013) que reporta actividad anticoagulante en el veneno de *C. l. klauberi*, (DMH 0.25 µg), así mismo los venenos de tres subespecies de *C. lepidus* (*C. l. lepidus*, *C. l. klauberi* y *C. l. morulus*) indujeron mionecrosis y hemorragia después de la inyección de veneno en tejido muscular de ratón, seguido de una reacción inflamatoria local caracterizada por infiltrado celular abundante (Martínez – Romero et al., 2013). La fisiopatología que conlleva al edema tisular es multifactorial, las citotoxinas y enzimas proteolíticas (digestivas) que causan lesión tisular y filtración capilar están entre los principales contribuyentes. Las anormalidades en la coagulación usualmente se manifiestan clínicamente con trombocitopenia y desfibrinación, la cual puede llevar a sangrado local o en raras ocasiones sangrado difuso o coagulación. Las anormalidades hematológicas son

debidamente principalmente a enzimas tipo trombina y fibrinogenasas (Norris & Bush, 2001). Muchos de los componentes que inducen estos patrones de lesión, son **SVMPs**(French et al., 2004). Según Fox & Serrano, (2009); McCue, (2005); French et al., (2004), el daño local en los tejidos es una de las características más obvias del envenenamiento por serpientes de la familia **Viperidae**, involucrando efectos patológicos complejos como hemorragia local, degradación de matriz extracelular, ampollas y necrosis provocadas por las **SVMP's**, lo que concuerda con la sintomatología reportada por Norris (2005), estas **SVMP's** probablemente fueron observadas (con base en el peso molecular) en los geles SDS – PAGE de los tres pool de veneno analizados, por lo tanto es factible que el envenenamiento causado por estas especies, produzca la sintomatología ya mencionada.

Con respecto a la actividad proteolítica. Los venenos de *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus*, pueden considerarse menos proteolíticos con respecto a *C. l. klauberi*, sin embargo estas diferencias no son estadísticamente significativas (**Tabla 7**). Martínez – Romero et al., (2013), reporta mayor actividad proteolítica sobre caseína en el veneno de *C. l. morulus*, comparados con *C. l. lepidus* y *C. l. klauberi*. Un aspecto interesante es que Bryson et al., (2010), propone que *C. l. lepidus* y *C. l. klauberi* están estrechamente emparentados mientras que *C. l. morulus* está ubicado dentro del taxón de *C. aquilus*. En el presente estudio *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus* presentan mayor actividad proteolítica que *C. l. klauberi*, estos datos con respecto a proteólisis coinciden con los reportados por Martínez – Romero et al., (2013) y proveen evidencia a favor de la relación más cercana entre *C. l. morulus* con *C. aquilus* propuesta por Bryson et al., (2010), al menos desde el punto de vista toxicológico.

Dentro de la variación en el veneno de serpientes, se han identificado patrones recurrentes. En el caso de los venenos de *C. s. scutulatus* se dan tres: **tipo A**, los cuales poseen cantidades altas de toxina Mojave y muestran efectos neurotóxicos mientras que el **tipo B** tiene cantidades altas de **SVMP** y muestra efectos hemorrágicos y el **tipo A + B**, que es una combinación de ambos y despliega ambos efectos, tanto neurotóxicos como hemorrágicos (Glenn & Straight, 1989), lo que concuerda con Hardy, (1983), que reporta efectos mezclados (neurotoxicidad, daño a los tejidos y alteraciones de la coagulación) en envenenamientos por mordida de *C. s. scutulatus* (Veneno A + B) y *C. helleri*. Por otra

parte Rokyta et al., (2013), reporta venenotipo **A**, venenotipo **B**, venenotipo **A+B** y venenotipo **C**; el cual no presenta toxina “canebrake” (neurotoxina) ni actividad hemorrágica. French et al., (2004), reportó un individuo de *C. hellerique* carece de actividad hemorrágica y de toxina Mojave, éste también coincide con un venenotipo **C**. Aunque French et al., (2004) menciona que hay poca cantidad o ausencia de **SVMP** en venenos que contienen toxina Mojave, los venenos **A + B** parecen ser una excepción. Mackessy, (2008) reporta una clasificación general para el veneno de cascabeles; venenos **tipo I** y **II**, ésta enfatiza en una relación inversa entre la toxicidad y la actividad de **SVMP** vista en muchas especies de víboras de cascabel. Los resultados muestran que el veneno de *C. l. klauberi*, posee tanto **Ctx** como **SVMP**, estos ubicarían al veneno de ésta subespecie como un venenotipo **A + B** de la clasificación propuesta para *C. s. scutulatus* por (Glenn & Straight, 1989) aunque no se ha reportado neurotoxicidad por envenenamientos en humanos debido a lo raro de las mordeduras por esta subespecie en Aguascalientes. Conforme a Mackessy, (2008), se aproxima más al venenotipo **II**, sin embargo en este estudio *C. l. klauberi* tuvo una actividad proteolítica media de  $3.29 \pm 0.25$  unidades de actividad proteolítica, la cual comparada con *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus* tiende a ser menor, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa.

## CONCLUSIÓN.

Los venenos de *C. l. klauberi*, *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus* tienen patrones electroforéticos y cromatográficos similares, las diferencias radican en la abundancia relativa de cada componente en sus venenos. Los tres grupos de víboras de cascabel estudiadas poseen los componentes típicos a las serpientes de la familia Viperidae (Nucleasas, **LAAO**, **CRISP**, **SVMP**, **SVSP**, **PLA<sub>2</sub>**, Desintegrinas) esto con base en el peso molecular de las principales familias de proteínas reportadas por Mackessy, (2010). Con respecto al RP – HPLC, hay una alta probabilidad de que uno de los picos en el cromatograma de *C. aquilus* ubicados entre los tiempos de retención 15 a 35 min., corresponda a desintegrinas, sin embargo, hace falta hacer una caracterización bioquímica con mayor profundidad, la cual permita obtener las secuencias de los principales péptidos y proteínas en el veneno de estos tres grupos. No obstante la similitud entre los venenos; los venenos de *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus* son ligeramente más proteolíticos que el de *C. l. klauberi*, la proteólisis se debe principalmente a la acción de las **SVSP** y **SVMP**. El veneno de *C. l. klauberi* tiene un valor menor de DL<sub>50</sub> que el de *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus*, este grado de letalidad mayor se debe a la presencia de **Ctx** en el veneno de ésta subespecie. El veneno de *C. l. klauberi* de la localidad Mesa Montoro, en el estado de Aguascalientes presenta **Ctx** y **SVMP's**, por lo que se puede concluir que este es un veneno tipo A + B, mientras que los venenos de *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus* son venenos tipo B según la clasificación de (Glenn & Straight, 1989). La **Ctx** en el veneno de *C. lepidus* está reportada para Arizona, Nuevo México (E.U.A.), Chihuahua, Durango (Glenn & Straight, 1982) y Aguascalientes (México).

Las diferencias biológicas encontradas en los venenos estudiados son el resultado de factores múltiples inherentes a cada subespecie, como la variación regional en dieta o características geográficas. Un entendimiento más profundo acerca de las implicaciones adaptativas de las diferencias en los venenos de estas especies requiere de información más detallada acerca de su historia natural.

## GLOSARIO.

### A

**Acetilcolinesterasa.**

Enzima que hidroliza la acetilcolina en colina y acetato, 26, 30

**Angiogénesis.**

Formación de vasos sanguíneos nuevos., 38, 39, 89

**Antagonista.**

(1). Sustancia que disminuye o invierte el efecto inducido por un agonista. (2). Sustancia que se une y bloquea los receptores celulares que normalmente se enlazan a sustancias naturales en su acción fisiológica. Una molécula que se une a una proteína receptora pero que no dispara la vía de señalización., 38

**Anticuerpo.**

Molécula proteica (inmunoglobulina) producida por el sistema inmunitario, se une específicamente a la molécula (antígeno o hapteno) que induce su síntesis., 49

**Anticuerpo monoclonal.**

Anticuerpo derivado de un clon. Un gran número de células descendientes de la misma célula y tienen propiedades idénticas., 48, 49

**Apoptosis.**

Proceso fisiológico previsto de muerte y desintegración de tejidos dentro del desarrollo normal de los seres vivos., 32

### C

**Canal.**

Proteína de pasaje que es continua y que permite el flujo de iones rápidamente a través de una membrana eucariótica desde un compartimiento de concentración más alto a un compartimiento más bajo. Generalmente compuestos de cuatro a seis subunidades o dominios y son estimulados por el potencial de membrana, efectores alostéricos o modificación covalente., 34

**Cáncer.**

Denominación de las tumoraciones malignas. Los carcinomas se originan en las células epiteliales carcinoma, epitelioma, sarcoma. *Término relacionado*  
neoplasia, tumor. Un crecimiento descontrolado de células anormales, creando un tumor que puede invadir los

tejidos que lo rodean y puede dispersarse (metástasis) a órganos distantes., 5, 7, 8, 18, 37, 38, 39, 40, 89

**Cefazolin.**

Antibiótico del grupo de las cefalosporinas de primera generación., 23

**Concentración.**

Cantidad de una sustancia, expresada en peso o en moles (S), por unidad de peso o volumen del medio en que se encuentra. Puede expresarse como porcentaje. No es sinónimo de dosis., 7, 26, 46, 48, 49, 89, 90

**Conjugados.**

Compuesto producido por la unión de dos o más sustancias, como los conjugados de los anticuerpos con los fluorocromos, enzimas, radioisótopos, entre otros., 49

**Conspicuo.**

Sobresaliente, notorio., 63

**Control.**

(1). Caso, grupo o individuo seleccionado para usarlo como referencia en un estudio por sus características específicas, como edad, sexo, raza, estatus económico, etc. (2). Sustancia o preparación conocida que se utiliza como referencia o testigo en las determinaciones cualitativas y cuantitativas, para detectar interferencias o errores analíticos., 7, 45, 46, 49, 57, 59, 63, 66, 79, 93

**Crotoxina.**

Heterodímero compuesto de una subunidad ácida (no tóxica, no enzimática) llamada crotopotina (CA) y una subunidad básica fosfolipasa A2 de poca toxicidad (CB)., 6, 7, 11, 21, 30, 47, 48, 49, 60, 61, 65, 87

### D

**Desfibrinación.**

Destrucción o separación de fibrina de la sangre., 66

**Detritus celulares.**

Restos de la desintegración de tejidos vegetales o animales., 42

**Dimorfismo sexual.**

Diferencia en formas, coloración y tamaños entre machos y hembras de una misma especie., 19, 21

**Disfibrinogenemia.**



Deficiencia hereditaria de la coagulación caracterizada por la alteración de la fibrinogénesis., 28

**Dominio.**

Región de una proteína con interés biológico funcional o estructural. Es una región de la estructura tridimensional de una proteína con una función concreta., 10, 27, 28, 32

**Dosis.**

Cantidad de sustancia administrada o absorbida por un individuo en proporción a su peso o volumen corporal. Se suele expresar en mg/Kg, 34, 36, 45, 46, 57, 88

**Dosis letal media.**

(DL50) Dosis, calculada estadísticamente de un agente químico o físico (radiación) que se espera que mate a 50% de los organismos de una población bajo un conjunto de condiciones definidas., 6, 45, 56

**Dosis mínima procoagulante.**

(DMP). Cantidad de veneno necesaria para evidenciar la formación de un coagulo en 60 segundos., 46, 57

**E**

**Edema.**

Inchazón causada por la acumulación de líquido en los tejidos del cuerpo., 13, 66, 86, 87

**Efectos sinérgicos.**

Fenómeno en el cual el efecto de la influencia o trabajo de dos o más agentes actuando en conjunto es mayor al esperado considerando a la suma de las acciones de los agentes por separado., 26

**ELISA.**

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas para la cuantificación de la presencia de un antígeno usando una enzima enlazada a un anticuerpo para el antígeno., 6, 7, 9, 42, 43, 47, 48, 61, 65, 89, 93

**Endémicas.**

Termino utilizado en biología que describe la tendencia de especies de plantas y animales a limitarse de manera natural a una zona determinada, dentro de la cual se dice que son endémicos., 19

**Enzima.**

Catalizador de las reacciones bioquímicas, que facilita la transformación de los sustratos.

Macromoléculas biológicas que actúan como catalizadores para reacciones bioquímicas, 30, 31, 32, 34, 35, 63

**Epidemiología.**

Estudio de la distribución de estados de salud y sus determinantes en las poblaciones y la aplicación de este estudio al control de problemas sanitarios., 14

**Equimosis.**

Lesión subcutánea caracterizada por depósitos de sangre debajo de la piel o un hematoma, comúnmente llamado moretón., 23

**F**

**Fármaco.**

Cualquier producto que puede ser absorbido por un organismo, difundirse en él y producirle cambios, favorables o no. Los fármacos empleados para el tratamiento de enfermedades son los medicamentos., 34

**Fasciculinas.**

Polipéptidos producidos por mambas (*Dendroaspis spp*) inhibidores de la AChE, denominados así por producir fasciculaciones prolongadas, durante 5 a 7 horas administradas a ratones en dosis de 0,05 - 3 mg/Kg peso vía i.p., 31

**Fibrinólisis.**

Proceso corporal que impide que los coágulos sanguíneos que ocurren de forma natural crezcan y causen problemas., 32

**Filogenética.**

Parte de la biología que estudia la evolución de las especies de forma global, en contraposición a la ontogenia que estudia la evolución del individuo., 22

**Flavoproteínas.**

Proteínas que contienen un nucleótido derivado de la vitamina B2 flavín adenín dinucleótido (FAD) o flavín mononucleótido (FMN)., 31

**Fosfolipasas.**

Clase de enzimas de especificidad variante que cataliza la degradación de los fosfolípidos, 25, 26, 29, 86

**H**

**Hematocrito.**

proporción del volumen de sangre que forman los glóbulos rojos., 23

**Hemorragias.**

Pérdida de sangre. Puede ser interna o externa., 13, 27

**Hemostasia.**

Fenómeno fisiológico que detiene el sangrado., 32, 34, 39, 88

**Herpetofauna.**

Corresponde a reptiles y anfibios, 18, 19

**Historia clínica.**

(HC), documento médico legal que se caracteriza por ser objetivo y comprensible por terceros, y no sólo por quien lo escribe, 23

**Homólogo.**

En biología, se refiere al vínculo de correspondencia que mantienen entre sí aquellas partes que, en diferentes organismos, cuentan con idéntico origen pero que desarrollan una función que resulta distinta. En bioquímica, las moléculas (o partes de ellas) que tienen un origen y una función análogas pero que son distintas mantienen un nexo de correspondencia que también se define como homólogo., 27

**I**

**Insular.**

Relativo a isla, 18

**Isoenzimas.**

Son distintas formas moleculares de una misma enzima que muestran especificidad por el mismo sustrato., 29

**L**

**Lepidosaurios.**

super orden que incluye al orden squamata al que pertenecen lagartos y serpientes., 15

**Liofilizado.**

Método de desecación en el que se elimina el agua por congelación del producto húmedo y posterior sublimación del hielo en condiciones de vacío., 25

**Liposomas.**

Vesículas esféricas, de 20 a 30 nm de diámetro. Están rodeadas por una membrana compuesta de un fosfolípido y un colesterol bicapa, que envuelve una sustancia acuosa, sirven para transporte de estas sustancias., 39, 40

**M**

**Membranas.**

Estructuras parecidas a láminas compuestas de lípidos y proteínas, usualmente sólo unas pocas moléculas gruesas, que forman fronteras cerradas entre diferentes compartimentos, 26

**Metacarpofalangeal.**

Articulaciones formadas entre las cabezas convexas de los metacarpianos y las fosillas articulares de las bases de las falanges proximales., 23

**Metástasis.**

Movimiento o diseminación de las células cancerosas de un órgano o tejido a otro., 38, 39, 89

**Mionecrosis.**

Necrosis de tejido muscular., 66

**Morbilidad.**

Proporción de personas que enferman en un lugar durante un periodo de tiempo determinado en relación con la población total de ese lugar., 8, 9, 14, 85

**Mortalidad.**

Número de muertes por lugar, intervalo de tiempo y causa., 14, 38, 45

**Motivos de unión.**

Elementos conservados en la secuencia de aminoácidos, habitualmente asociados con una función concreta., 38, 40

**N**

**Necrosis.**

Muerte del tejido corporal, ocurre cuando no llega suficiente sangre al tejido., 13, 21, 24, 33, 67, 86

**Neurotoxicidad.**

Conjunto de efectos sobre el sistema nervioso, que pueden afectar al cerebro o a la médula espinal (neurotoxicidad central) o a las raíces nerviosas, plexos o nervios (neurotoxicidad periférica)., 24, 67

**P**

**Patología.**

Rama de la medicina que estudia los trastornos anatómicos y fisiológicos de los tejidos y los órganos enfermos, así como los síntomas y signos a través de los cuales se manifiestan las

enfermedades y las causas que las producen., 26, 38

**Poblaciones.**

En ecología, es un conjunto de individuos de la misma especie que viven en la misma área geográfica., 13, 21, 22, 25, 65

**Pool.**

Muestra representativa de un grupo de estudio, esta contiene las muestras individuales de cada ejemplar que forma un grupo de estudio., 9, 43, 44, 47, 52, 54, 59, 61, 63, 64, 66

**Proteasas.**

Enzimas que degradan proteínas por la separación de uniones peptídicas, 5, 10, 26, 27, 28, 33, 66

**Proteínas.**

Macromoléculas biológicas compuesta de un arreglo lineal de aminoácidos unidos por uniones peptídicas, 9, 10, 13, 25, 27, 28, 29, 32, 37, 38, 40, 52, 63, 68, 86, 87

**R**

**Receptor.**

Sitio de unión (ligando) de gran afinidad por un determinado tóxico, de cuya unión se derivará un efecto., 32, 34, 38, 39

**S**

**Síntoma.**

Evidencia subjetiva de una afección o enfermedad, percibida por el propio sujeto que la sufre (por ejemplo náuseas, dolor, jaqueca). *Término relacionado* signo., 7, 8, 23, 26, 27, 65, 86, 87

**Sintomatología.**

Descripción general de los signos y síntomas que experimenta un enfermo. *Término relacionado* síndrome., 24, 64

**Sistema de complemento.**

Conjunto de moléculas plasmáticas implicadas en distintas cascadas bioquímicas, cuyas funciones son potenciar la respuesta inflamatoria, facilitar la fagocitosis y dirigir la lisis de células incluyendo la apoptosis., 28

**Sistémico.**

Med. De la circulación general de la sangre o relativo a ella. Del organismo en su conjunto o relativo a él., 23

**Sulfato de morfina.**

Alcaloide fenantreno del opio siendo preparado el sulfato por neutralización con ácido sulfúrico. Ésta es una sustancia controlada agonista utilizada en anestesia, analgesia, tratamiento del dolor asociado a la isquemia miocárdica y para la disnea asociada al fracaso ventricular izquierdo agudo y edema pulmonar., 23

**Sustrato.**

Un reactante en una reacción química. Una enzima cataliza una sola reacción química o un conjunto de reacciones cercanamente relacionadas y los componentes de aquellas reacciones son llamados sustratos., 32

**T**

**Topografía.**

Conjunto de características que presenta la superficie o el relieve de un terreno, 18

**Toxicidad.**

Capacidad para producir daño a un organismo vivo, en relación con la cantidad o dosis de sustancia administrada o absorbida, la vía de administración y su distribución en el tiempo (dosis única o repetidas), tipo y severidad del daño, tiempo necesario para producir éste, la naturaleza del organismo afectado y otras condiciones intervinientes., 16, 22, 30, 34, 36, 64, 68

**Toxicidad aguda.**

Capacidad de una sustancia para producir efectos adversos dentro de un corto plazo de tiempo (usualmente hasta 14 días) después de la administración de una dosis única (o una exposición dada) otras dosis o exposiciones múltiples en 24 horas., 64

**Toxinas.**

Sustancias venenosas producidas por organismos (microbio, animal o planta)., 16, 17, 26, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 86

**Trombina.**

Peptidasa. No es un componente de la sangre, sino que se forma como parte del proceso de coagulación sanguínea. Ayuda en la degradación del fibrinógeno a monómeros de fibrina., 5, 26, 28, 35, 37, 66

**Trombo.**

Coágulo sanguíneo que se forma en un vaso y permanece allí., 32, 88

**Trombocitopenia.**

Es cualquier trastorno en el cual hay una cantidad anormalmente baja de plaquetas., 66

**Tumor.**

(1). Inflamación (bulto) o crecimiento anormal de un tejido, ya sea benigno o maligno. (2).

Crecimiento anormal, en velocidad y estructura a partir del tejido normal, sin utilidad fisiológica., 38, 39, 40, 78

**U**

**Unidad de actividad proteolítica.**

Es el cambio en 0.2 unidades de absorbancia por minuto., 58

**V**

**Variación intraespecífica.**

Nivel de variación que se da entre individuos de una misma especie., 66

**Vasoconstricción.**

Disminución del calibre de los vasos sanguíneos y, por tanto, del aporte sanguíneo al tejido., 32

**Veneno.**

(1). Toxina animal utilizada para autodefensa o depredación y liberada normalmente por mordedura o picadura. (2). Tóxico usado intencionalmente., 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16,

17, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 49, 51, 52, 54, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 87, 88, 89, 90, 93

**Vida media.**

Tiempo requerido para que la cantidad de una sustancia presente en un sistema biológico se reduzca a la mitad, predominantemente por procesos biológicos, cuando el ritmo de eliminaciones aproximadamente exponencial. El tiempo requerido para eliminar una mitad de la cantidad de una sustancia desde el cuerpo., 39

**W**

**Western blot.**

Técnica de inmunoensayo utilizada para detectar una proteína específica en una célula o en un fluido corporal. Una muestra es sometida a electroforesis en un gel de poliacrilamida - SDS, las proteínas resueltas son transferidas a una lámina de polímero y entonces un anticuerpo específico para la proteína de interés es incubado con la muestra transferida; otros anticuerpos o marcadores radiactivos pueden ser utilizados para ayudar a visualizar el complejo antígeno - anticuerpo deseado. , 6, 7, 9, 47, 60, 92

## BIBLIOGRAFÍA.

Barlow A., Pook C. E., Harrison R. A., Wüster W. 2009. Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. *Proceedings of the Royal Society B.* 276, 2443 – 2449.

Bénard – Valle M., Carbajal – Saucedo A., Roodt A., López – Vera E., Alagón A. 2014. Biochemical characterization of the venom of the coral snake *Micrurus tener* and comparative biological activities in the mouse and a reptile model. *Toxicon.* 77, 6 – 15.

Bernardes C. P., Menaldo D. L., Camacho E., Rosa J. C., Escalante T., Rucavado A., Lomonte B., Gutiérrez J. M., Sampaio S. V. 2013. Proteomic analysis of *Bothrops pirajai* snake venom and characterization of BpirMP, a new P-I metalloproteinase. *Journal of Proteomics.* 80, 250 – 267.

Bon C., Changeux J. P., Jeng T. W., Fraenkel – conrat H. 1979. Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. *European Journal of Biochemistry.* 99, 471 – 478.

Bottrall L. J., Madaras F., Biven D. C., Venning M. G., Mirtschin P. J. 2010. Proteolytic activity of elapid and viperid Snake venoms and its implication to digestion. *J Venom Research.* 1, 18-28.

Boldrini – França J., Corrêa – Netto C., Silva M. S., Rodrigues R. S., De La Torre P., Pérez A., Soares M. A., Zingali R. B., Nogueira R. A., Rodrigues V. M., Sanz L., Calvete J. J. 2010. *Journal of proteomics.* 73, 1758 – 1776.

Brazil V. O., Prado-Franceschi J., Waisbich E. 1966. Pharmacology of crystalline crotoxin – toxicity. *Memories Instituto Butantan.* 33, 973 – 980.

Brigatte P., Sampaio S. C., Gutiérrez V. P., Guerra J. L., Sinhorini I. L., Curi R., Cury Y. 2007. Walker 256 tumor – bearing rats as a model to study cancer pain. *Journal of Pain*. 8, 412 – 421.

Bryson R. W., Murphy R. W., Lathrop A., Lazcano V. D. 2010. Evolutionary drivers of phylogeographical diversity in the highlands of Mexico: a case study of the *Crotalus triseriatus* species group of montane rattlesnakes. *Journal of Biogeography*. 1, 1 – 14.

Calvete J. J., Pérez A., Lomonte B., Sánchez E. E., Sanz L. 2012. Snake Venomics of *Crotalus tigris*. Evolutionary clues for generating a pan-specific antivenom against crotalid type II venoms. *Toxicon*. 4, 225.

Calvete J. J. 2010. Antivenomics and venom phenotyping: a marriage of convenience to address the performance and range of clinical use of antivenoms. *Toxicon*. 56, 1284 – 1291.

Calvete J. J., Sanz L., Angulo Y., Lomonte B., Gutiérrez J. M. 2009. Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Letters*. 11, 1736 – 1743.

Camacho E., Villalobos E., Sanz L., Pérez A., Esclante T., Lomonte B., Calvete J. J., Gutiérrez J. M., Rucavado A. 2014. Understanding structural and functional aspects of PII snake venom metalloproteinases: Characterization of BlatH1, a hemorrhagic dimeric enzyme from the venom of *Bothriechis lateralis*. *Biochimie*. 101, 145 – 155.

Campbell A. J. and Lamar W. W. 2004. The venomous reptiles of the western hemisphere. Comstock Publishing Associates. U.S.A. Vol. 2. 870pp.

Canseco L. M. y Gutierrez Ma. G. M. 2010. Anfibios y reptiles del valle de Tehuacán – Cuicatlán. CONABIO. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México. 302pp.

Casewell N. R., Wüster W., Vonk F. J., Harrison R. A., Fry B. G. 2013. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Trends in ecology and evolution*. 28, 219 – 229.

Chippaux J. P., Williams V., White J. 1991. Snake venom variability: methods of study results and interpretation. *Toxicon*. 29, 1279 – 1303.

Chippaux J. P., Boche J., Courtois B. 1982. Electrophoretic patterns of the venoms from a litter of *Bitis gabonica* snakes. *Toxicon*. 20, 521 – 522.

Corin R. E., Viskatis L. J., Vidal J. C., Etcheverry M. A. 1993. Cytotoxicity of crotoxin on murine erythroleukemia cells *in vitro*. *Investigational New Drugs*. 11, 11 – 15.

Costa L. G., Giordano G. 2014. *Encyclopedia of the neurological sciences* (second edition). Elsevier. 227 pp.

Cura J. E., Blanzaco D. P., Brisson C., Cura M. A., Cabrol R., Larrateguy L., Mendez C., Sechi J. C., Silveira J. S., Theiller E., Roodt A. R., Vidal J. C. 2002. Phase I and pharmacokinetics study of crotoxin (cytotoxic PLA<sub>2</sub> NSC – 624244) in patients with advanced cancer. *Clinical Cancer Research*. 8, 1033 – 1041.

Da Silva R. L., De Faria P. C., Da Silva C. N., Tunes P. A., Costa S. O. D., Fortes Dias L. C., Assis G. D., De Lima M. 2014. Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom induces the release of glutamate from cerebrocortical synaptosomes via N and P/Q calcium channels. *Toxicon*. 85, 5 – 16.

Das T., Bhattacharya S., Halder B., Biswas A., Das Gupta S., Gomes A. 2011. Cytotoxic and antioxidant property of a purified fraction (NN-32) of Indian *Naja naja* venom on Ehrlich ascites carcinoma in BALB/c mice. *Toxicon*. 57, 1065 – 1072.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Daltry J. C., Wüster W., Thorpe R. S. 1996. Diet and snake venom evolution. *Nature*. 379, 537 – 540.

Debnath A., Saha A., Gomes A., Biswas S., Chakrabarti P., Giri B., Biswas A. K., Gupta S. 2010. A lethal cardiotoxic–cytotoxic protein from the Indian monocellate cobra (*Naja kaouthia*) venom. *Toxicon*. 56, 569 – 579.

Dennis, E.A. 1994. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *Journal of Biological chemistry*. 269. 18, 13057–13060.

DePass L. R. 1989. Alternative approaches in median lethality (LD<sub>50</sub>) and acute toxicity testing. *Toxicology Letters*. 49, 159 – 170.

Dutertre S. & Lewis R. J. 2010. Use of venom peptides to probe ion channel structure and function. *Journal of Biological chemistry*. 285, 13315 – 13320.

Forstner M. R. J., Hilsenbeck R. A., and Scudday J. F., 1997. Geographic Variation in whole venom profiles from the mottled rock rattlesnake (*Crotalus lepidus lepidus*) in Texas. *Journal of herpetology*. 31. 2, 277-287.

Fox J. W., Serrano S. M. 2009. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. *Journal of Proteomics*. 72, 200 – 209.

French W. J., Hayes W. K., Bush S. P., Cardwell M. D., Bader J. O., Rael E. D. 2004. Mojave toxin in venom of *Crotalus helleri* (Southern pacific rattlesnake): molecular and geographic characterization. *Toxicon*. 44, 781 – 791.

Fry B. G., Scheib H., van der Weerd L., Young B., McNaughtan J., Ramjan S. F. R. 2008. Evolution of an arsenal: structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). *Molecular & Cell Proteomics*. 7, 215 – 246.



Galán J. A., Sánchez E. E., Rodríguez – Acosta A., Soto J. G., Bashir S., McLane M. A., Paquette – Straub C., Pérez J. C. 2008. Inhibition of lung tumor colonization and cell migration with the disintegrin crotatroxin 2 isolated from the venom of *Crotalus atrox*. *Toxicon*. 51, 1186 – 1196.

Gené J. A., Roy A., Rojas G., Gutiérrez J. M., Cerdas L. 1989. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*. 27, 841 – 848.

Georgieva D., Arni R. K., Betzel C. 2008. Proteome analysis of snake venom toxins: pharmacological insights. *Expert Review of Proteomics*. 5, 787 – 797.

Glenn J. L., Sraight R. C. 1989. Intergradation of two different venom populations of the Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) in Arizona. *Toxicon*. 27. 4, 411 – 8.

Glenn J. L., Straight R. C. 1985. Venom properties of the rattlesnakes (*Crotalus*) inhabiting the Baja California región of México. *Toxicon*. 23, 769 – 775.

Glenn J. L., Straight R. C., Wolfe M. C., Hardy D. L. 1983. Geographical variation in *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave toxin) venom properties. *Toxicon*. 21, 119–130.

Glenn J. L., Straight R. C. 1982. The rattlesnakes and their venom yield and lethal toxicity. *Rattlesnake Venoms: Their Actions and Treatment*. Marcel Dekker, Inc., New York. 3–119.

Gibbs H. L., Sanz L., Chiucchi J. E., Farrell T. M., Calvete J. J. 2011. Proteomic analysis of ontogenetic and diet-related changes in venom composition of juvenile and adult Dusky Pigmy rattlesnakes (*Sistrurus miliarius barbouri*). *Journal of proteomics*. 74, 2169 – 2179.

Gibbs H. L., Mackessy S. P. 2009. Functional basis of a molecular adaptation: prey – specific toxic effects of venom from *Sistrurus* rattlesnakes. *Toxicon*. 53, 672 – 679.

Gonçalves P. C., Lira N. E., Camara F. V., Dias da Silva W., Suarez-Kurtz G. 2010. Inhibition of the myotoxic activities of three African Bitis venoms (*B. rhinoceros*, *B. arietans* and *B. nasicornis*) by a polyvalent antivenom. *Toxicon*. 55, 536 – 540.

Gutiérrez J. M., Williams D., Wen Fan H., Warrell D. A. 2010. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon*. 56, 1223 – 1235.

Gutiérrez J. M., Sanz L., Escolano J., Fernández J., Lomonte B., Angulo Y. 2008. Snake venomomics of the Lesser Antillean pit vipers *Bothrops caribbaeus* and *Bothrops lanceolatus*: correlation with toxicological activities and immunoreactivity of a heterologous antivenom. *Proteome Research*. 7, 396 – 408.

Gutiérrez J. M., Lomonte B., León G., Alape-Girón A., Flores-Días M., Sanz L., Angulo Y., Calvete J. J. 2009. Snake venomomics and anti – venomomics: proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *Journal of Proteomics*. 72, 165 – 182.

Gutiérrez J. M., Rucavado A. 2000. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*. 82, 841 – 850.

Hardy D. L. 1983. Envenomation by the Mojave rattlesnake *Crotalus scutulatus scutulatus* in southern Arizona, USA. *Toxicon*. 21, 111 – 118.

Harrison R. A., Cook D. A., Renjifo C., Casewell N. R., Currier R. B., Wagstaff S. C. 2011. Research strategies to improve snake bite treatment: challenges and progress. *Journal of Proteomics*. 74, 1768 – 1780.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Hayes W. K., Beaman K. R., Cardwell M. D., Bush S. P. 2008. The snake venom-metering controversy: levels of analysis, assumptions, and evidence. *The Biology of Rattlesnakes*. Loma Linda, CA: Loma Linda University Press. 191–220.

Hayes W. K., Herbert S. S., Rehling G. C., Gennaro J. 2002. Factors that influence venom expenditure in viperids and other snake species during predatory and defensive contexts. *Biology of the Vipers*. Eagle Mountain, UT: Eagle Mountain Publishing. 207–233.

Hernández D. A. 2013. Crotoxina en el veneno de la serpiente de cascabel *Crotalus simus* en México: su relación con la toxicidad y distribución geográfica. Tesis (Maestría en Ciencias Bioquímicas). Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biotecnología UNAM. México D. F. 81 pp.

Hodgson W. C. and Wickramaratna J. C. 2002. *In vitro* neuromuscular activity of snake venoms. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 29, 807 – 814.

Jackson K. 2003. The evolution of venom delivery systems in snakes. *Zoological Journal of Linnean Society*. 137, 337 – 354.

Kaiser I., Aird S. D. 1987. A crotoxin homolog from the venom of the Uracoan rattlesnake (*Crotalus vegrandis*). *Toxicon*. 25, 1113 – 1120.

Kasturiratne A., Wickremasinghe A. R., de Silva N., Gunawardena N. K., Pathmeswaran A., Premaratna R., Savioli L., Lalloo D. G., de Silva H. J. 2008. The global burden of snake bite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLOS. Medicine*. 11, 1591 – 1604.

King G. F. 2011. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 11, 1469 – 1484.

Klauber LM. 1972. Rattlesnakes: Their Habits, Life Histories and Influence on Mankind. 2nd ed. Berkeley, CA: University of California Press.

Koh, C. Y., and Manjunatha Kini, R. 2011. From snake venom toxins to therapeutics. Cardiovascular examples. *Toxicon*. 59, 497–506.

Lazcano D.V., Banda J. L., et al. 2010. Serpientes de Nuevo León. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, México. 502pp.

Lee S. Y. 2013. Serpentes (Snakes). Ltd: Chichester. [www.els.net](http://www.els.net).

Lomonte B., Fernández J., Sanz L., Angulo Y., Sasa M., Gutiérrez J. M., Calvete J. J. .2014. Venomous snakes of Costa Rica: Biological and medical implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of snake venomomics. *Journal of Proteomics*. 105, 323 – 339.

Lomonte B., Tsai W. C., Bonilla F., Solórzano A., Solano G., Angulo Y., Gutiérrez J. M., Calvete J. J. 2012. Snake venomomics and toxicological profiling of the arboreal pitviper *Bothriechis supraciliaris* from Costa Rica. *Toxicon*. 59, 592 – 599.

Lomonte B., Angulo Y., Sasa M., Gutiérrez J. M. 2009. The phospholipase A<sub>2</sub> homologues of snake venoms: biological activities and their possible adaptive roles. *Protein and peptide Letters*. 16, 860 – 876.

Mackessy S. P. 2010. The handbook of venoms and toxins of reptiles. CRCpress. U.S.A. 521pp.

Mackessy S. P. 2008. Venom composition in rattlesnakes: trends and biological significance. In *The Biology of Rattlesnakes*. Edited by Hayes W K, Beaman K R, Cardwell M D, Bush S P. Loma Linda, CA: Loma Linda University Press. 495–510.

Mackessy S. P., Williams K., Ashton K. G. 2003. Ontogenetic variation in venom composition and diet of *Crotalus oreganus concolor*: a case of venom paedomorphosis? *Copeia*. 769 – 782.

Manzanilla J. y Péfaur J. E. 2000. Consideraciones sobre métodos y técnicas de campo para el estudio de anfibios y reptiles. *Revista de ecología latinoamericana*. 7. 1-2, 17-30.

Martínez – Romero G., Rucavado A., Lazcano D., Gutiérrez J. M., Borja M., Lomonte B., Garza – García Y., Zugasti Cruz A. 2013. Comparison of venom composition and biological activities of the subspecies *Crotalus lepidus lepidus*, *Crotalus lepidus klauberi* and *Crotalus lepidus morulus* from Mexico. *Toxicon*. 71, 84 – 95.

Massey D. J., Calvete J. J., Sánchez E. E., Sanz L., Richards K., Curtis R., Boesen K. 2012. Venom variability and envenoming severity outcomes of the *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) from southern Arizona. *Journal of Proteomics*. 75, 2576 – 2587.

McCue M. D. 2005. Enzyme activities and biological functions of snake venoms. *Applied Herpetology*. 2, 109 – 123.

Meebs D. 2002. *Venomous and Poisonous Animals*. CRCpress. Germany. 339pp.

Mirtschin P. j., Shine R., Nias T. J., Dunstan N. L., Hough B. J., Mirtschin M. 2002. Influences on venom yield in Australian tigersnakes (*Notechis scutatus*) and brownsnakes (*Pseudonaja textilis*: Elapidae, Serpentes). *Toxicon*. 40, 1581 – 1592.

Montecucco C., Gutiérrez J. M., Lomonte B. 2008. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65, 2897 – 2912.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Murphy R. W. and C. B. Crabtree. 1988. Genetic identification of a natural hybrid rattlesnake: *Crotalus scutulatus scutulatus* x *C. viridis viridis*. *Herpetológica*. 1. 44, 119-123.

Neri C. E., Lomonte B., Gutiérrez M. C. Alagón A., Gutiérrez J. M. 2013. Intraspecies variation in the venom of the rattlesnake *Crotalus simus* from Mexico: Different expression of crotoxin results in highly variable toxicity in the venoms of three subspecies. *Journal of Proteomics*. 87, 103 – 121.

Norris L. R. 2005. First report of a bite by the mottled rock rattlesnake (*Crotalus lepidus lepidus*). *Toxicon*. 46, 414 – 417.

Norris L. R., Bush S. P. 2001. North American venomous reptile bites. *Wilderness Medicine*, fourth edition. Mosby, Inc., St. Louis. 896 – 926.

Oliva B. I., Coelho M. R., Barcellos G. G., Saldanha – Gama R., Wermelinger S. L., Marcinkiewicz C., Zingali R. B., Barja-Fidalgo C. 2007. Effect of RGD-disintegrins on melanoma cell growth and metastasis: Involvement of the actin cytoskeleton, FAK and c-Fos. *Toxicon*. 50, 1053 – 1063.

Pintor F. V., Winter L. K., Krockenberger A. K., Seymour J. E. 2011. Venom physiology and composition in a litter of Common Death Adders (*Acanthophis antarcticus*) and their parents. *Toxicon*. 57, 68 – 75.

Rael E. D., Lieb C. S., Maddux N., Varela - Ramírez A., Pérez J. 1993. Hemorrhagic and Mojave toxins in the venoms of the offspring of two Mojave rattlesnakes (*Crotalus scutulatus scutulatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 106-B. 3, 595 – 600.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Rael E. D., Johnson J. D., Molina O., McCrystal H. K. 1992. Distribution of Mojave toxin like protein in rock rattlesnake (*Crotalus lepidus*) venom. In: Campbell J. A., Brodie Jr., E. D. (Eds.). Biology of the pit vipers. Selva, Tyler, Texas. 163 – 168.

Rockyta D. R., Wray K. P., Margres M. J. 2013. The génesis of an exceptionally lethal venom in the timber rattlesnake (*Crotalus horridus*) revealed through comparative venom gland transcriptomics. BMC genomics. 14, 394.

Rudd C. J., Viskatis L. J., Vidal J. C., Etcheverry M. A. 1994. *In vitro* comparison of cytotoxic effects of crotoxin against three human tumors and a normal human epidermal keratinocyte cell line. Investigational New Drugs. 12, 183 – 184.

Sampaio S. C., Hyslop S., Fontes R. M., Prado-Franceschi J., Zambelli V. O., Magro A. J., Brigatte P., Gutierrez V. P., Cury Y. 2010. Crotoxin: Novel activities for a classic  $\beta$ -neurotoxin. Toxicon. 55, 1045 – 1060.

Sánchez, E. E., Rodríguez-Acosta, A., Palomar, R., Lucena, S. E., Bashir, S., Soto, J. G., y otros. 2008. Colombistatin: a disintegrin isolated from the venom of the South American snake (*Bothrops colombiensis*) that effectively inhibits platelet aggregation and SK-Mel-28 cell adhesion. Archives of Toxicology. 3. 83, 271–279.

Serrano S. M. T., Shannon J. D., Wang D., Camargo A. C., Fox J. W. 2005. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two – dimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. Journal of Proteomics. 5, 501 – 510.

Smith M. T., Ortega J., Beaupre S. J. 2014. Metabolic cost of venom replenishment by Prairie Rattlesnakes (*Crotalus viridis viridis*). Toxicon. 86, 1 – 7.

Stocker K. F. 1998. Research, diagnostic and medicinal uses of snake venom enzymes. In enzymes from snake venoms, ed. G. S. Bailey. 705 – 72.

Thakston R. D. G., Reid H. A. 1983. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. Bulletin of the world health organization. 61, 949 – 956.

Utkin Y. N. 2013. Three-finger toxins, a deadly weapon of elapid venom – Milestones of discovery. Toxicon. 62, 50 – 55.

Vázquez D. J. y Quintero D. G. 2005. Anfibios y reptiles de Aguascalientes. CONABIO. CIEMA. México. 318pp.

Vargas L. J., Londoño M., Quintana J. C., Rua C., Segura C., Lomonte B., Nuñez V. 2012. An acidic phospholipase A<sub>2</sub> with antibacterial activity from *Porthidium nasutum* snake venom. Comparative Biochemistry and physiology. 161-B. 341 – 347.

Wang W. J., Shih C. H., Huang T. F. 2004. A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkislisin, from *Agkistrodon acutus* venom. Biochemical and Biophysical Research Communications. 324, 224 – 230.

Weinstein S. A., Minton S. A., Wilde C. E. 1985. The distribution among ophidian venoms of a toxin isolated from the venom of the Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*). Toxicon. 23, 825 – 844.

Williams D. J., Gutiérrez J. M., Calvete J. J., Wüster W., Ratanabanangkon K., Paiva O., Brown N. I., Casewell N. R., Harrison R. A., Rowley P. D., O'shea M., Jensen S. D., Winkel K. D., Warrell D. A. 2011. Ending the drought: New strategies for improving the flow of affordable, effective antivenoms in Asia and Africa. Journal of Proteomics. 74, 1735 – 1767.

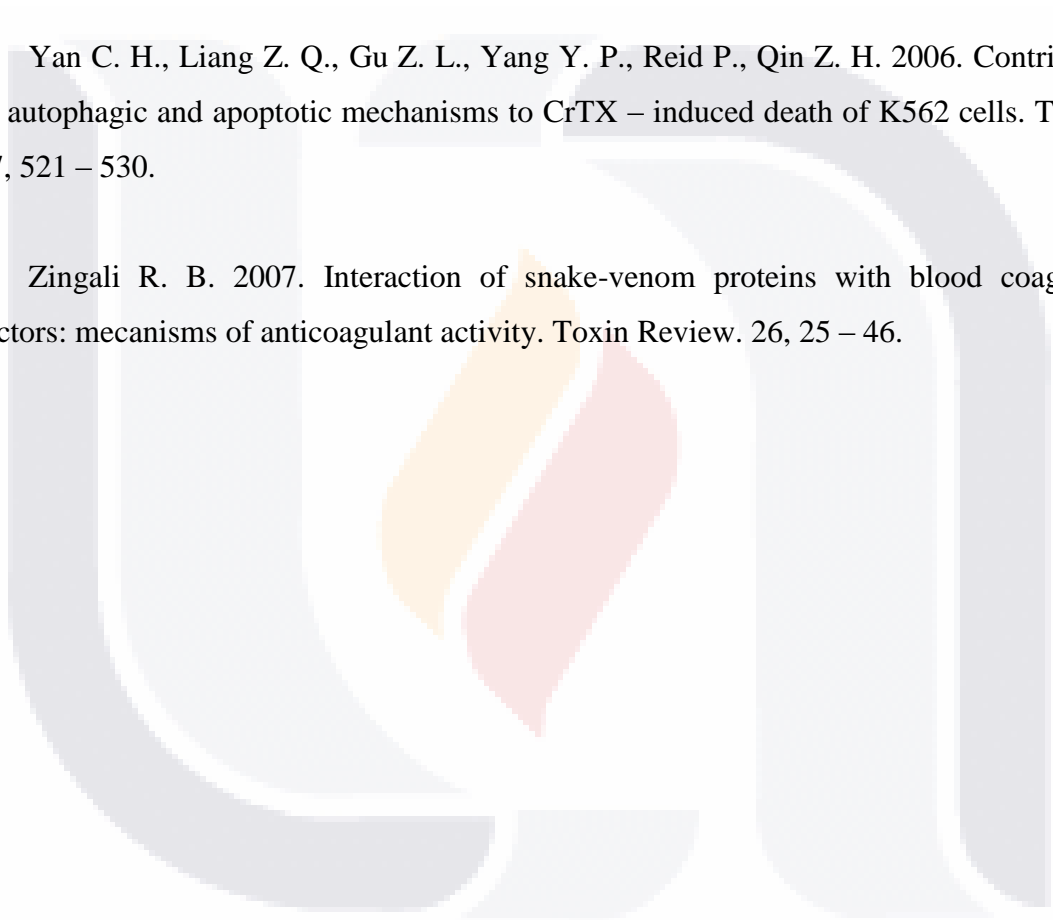


Yamileth A. and Lomonte B. 2009. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon*. 54, 949–957.

Yamanouye N., Kerchove C. M., Moura-da-Silva A. M., Carneiro S. M., Markus R. P. 2007. Long-term primary culture of secretory cells of *Bothrops jararaca* venom gland for venom production in vitro. *Nature Protocols*.1, 2763 – 2766.

Yan C. H., Liang Z. Q., Gu Z. L., Yang Y. P., Reid P., Qin Z. H. 2006. Contributions of autophagic and apoptotic mechanisms to CrTX – induced death of K562 cells. *Toxicon*. 47, 521 – 530.

Zingali R. B. 2007. Interaction of snake-venom proteins with blood coagulation factors: mechanisms of anticoagulant activity. *Toxin Review*. 26, 25 – 46.



## ANEXOS.

**Anexo A:** Evaluación global de mordeduras de serpiente, tomada de J. P. Chippaux, (1998); Distribución global de morbilidad por mordedura de serpiente.

**Anexo B:** Principales efectos o síntomas de envenenamiento por mordedura de serpiente (Meebs, 2002) modificado.

**Anexo C.** Contenido de crotoxina en venenos de serpientes de la familia Viperidae.

**Anexo D:** Fármacos hechos a partir de componentes en el veneno de serpientes.

**Anexo E:** Desintegrinas y sus principales efectos sobre cáncer.

**Anexo F:** Cuantificación de proteína por BCA; Formula de la ley de Lambert y Beer utilizada para calcular la concentración de proteína en cada muestra de veneno.

**Anexo G:** Preparación de diluciones y preparación de los geles separador y concentrador para SDS – PAGE.

**Anexo H:** Western blot: Preparación de los buffers de transferencia y TBST.

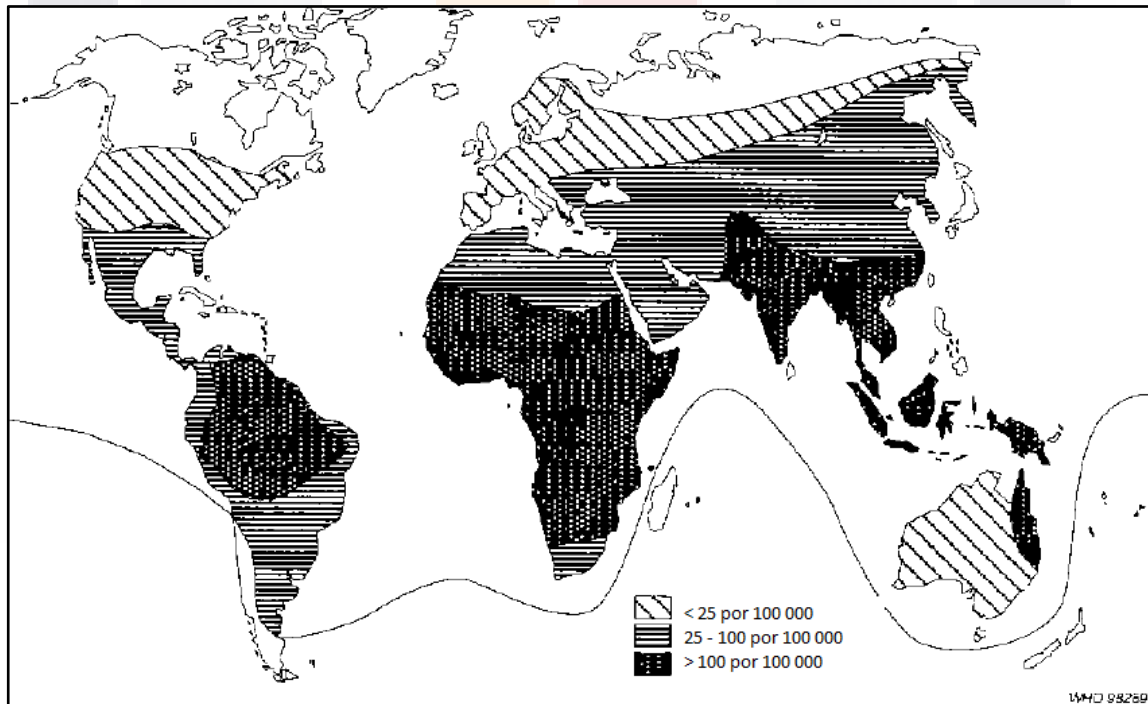
**Anexo I:** Esquema del procedimiento de diluciones seriadas para ELISA; (SR) solución de reacción, (C.l.k) veneno de *C. l. klauberi*, (C. a) *C. aquilus*, (C. lxa) *C. lepidus x aquilus*, (C-) control negativo.

**Anexo J:** Distribución geográfica, distribución de *C. l. klauberi* con Ctx en sus venenos.

**Anexo A: Evaluación global de mordeduras de serpiente, tomada de J. P. Chippaux, (1998); Distribución global de morbilidad por mordedura de serpiente.**

	Población (x10 <sup>6</sup> )	Número total de mordidas	Numero de envenenamientos	Número de muertes
Europa	730	25,000	8,000	30
Medio Oriente	160	20,000	15,000	100
E. U. A. y Canadá	270	45,000	6,500	15
Centro y Sudamérica	400	300,000	150,000	5,000
África	760	1,000,000	500,000	20,000
Asia	3,500	4,000,000	2,000,000	100,000
Oceanía	20 <sup>a</sup>	10,000	3,000	200
Total	5,840	5,400,000	2,682,500	125,345

<sup>a</sup> Población en riesgo



**Anexo B: Principales efectos o síntomas de envenenamiento por mordedura de serpiente (Meebs, 2002) modificado.**

Sintoma	Familia	Efectos.
<b>Neurotoxicidad.</b>	Crotoxina (Da Silva et al., 2014) Toxinas de tres dedos (TFT's) (Utkin, 2013)	Hay bloqueo de transmisión neuromuscular en el botón terminal de la neurona motora (sinapsis). Síntomas de parálisis: oftalmoplejía, ptosis (parálisis del párpado superior), parálisis de los músculos faciales. Parálisis progresiva de los músculos respiratorios, lo que puede llevar a la muerte por falla respiratoria.
<b>Daño al musculo esquelético.</b>	Fosfolipasas A <sub>2</sub> (Costa et al., 2008) SVMP's (Gutierrez & Rucavado, 2000)	Afectan y lisan los músculos estriados, dolor y debilidad muscular, mioglobinuria, incremento masivo de creatin kinasa (CK), potasio, falla renal, complicaciones cardiacas.
<b>Trastornos hemostáticos.</b>	SVSP's (Mackessy, 2010) LAAO (Mackessy, 2010) Desintegrinas, proteínas tipo lectinas C, toxinas tres dedos (TFT's), fosfolipasas A <sub>2</sub> , SVMP's, nucleotidasas (Koh y Manjunatha, 2011)	Tiempo de coagulación prolongado el cual se puede extender hacia una completa incapacidad de coagulación de la sangre, esto debido a la activación de factores de coagulación como el factor X y el factor Xa. O por la hidrolisis de fibrinógeno y su consecuente transformación en fibrina, sangrado sistémico, que puede conllevar a la muerte.
<b>Hinchazón, edema, hemorragia y necrosis.</b>	LAAO (Mackessy, 2010) SVMP's (Gutierrez & Rucavado, 2000) Fosfolipasas A <sub>2</sub> (Teixeira et al., 2003)	En el área de la mordida, la mayoría síntomas locales. Daño a las paredes de los vasos sanguíneos, inflamación, desarrollo de edema (extensivo, hasta tres litros de líquido), ampollas, sangrado subcutáneo, que puede llevar a necrosis del tejido y a la perdida de una extremidad.

<b>Síntomas cardiovasculares.</b>	Cardiotoxina de <i>Naja kaouthia</i> NK-CT1 (Debnath et al., 2010) péptidos potenciadores de bradiquininas (BPPs) (Koh y Manjunatha, 2011)	Caída rápida de presión sanguínea, debida a la habilidad del veneno de los vipéridos de liberar péptidos hipotensivos de las proteínas del plasma. Los síntomas de shock son debidos a la pérdida de fluidos de la circulación debido a la formación del edema y el sangrado.
---------------------------------------	--	---

### Anexo C. Contenido de crotoxina en venenos de serpientes de la familia Viperidae.

Especie	País (localidad)	Crotoxina (%)	Referencia
<i>Crotalus durissus cascavella</i>	Brasil	72.5	Boldrini – França et al., 2010
<i>C. d. collineatus</i>	Brasil	67.4	Boldrini – França et al., 2010
<i>C. tigris</i>	-----	66	Calvete et al., 2012
<i>C. d. terrificus</i>	Brasil	60	Gutiérrez et al., 2009
<i>C. scutulatus scutulatus</i>	E. U. A. (Arizona, C*)	44.38	Massey et al., 2012
<i>C. s. scutulatus</i>	E. U. A. (Arizona, P*)	18.3	Massey et al., 2012
<i>C. simus simus</i>	México	14.3	Neri et al., 2013
<i>C. lepidus klauberi</i>	México	10.8	Presente estudio
<i>C. simus simus</i>	Costa Rica	4	Gutiérrez et al., 2009
<i>C. helleri</i>	E. U. A. (California R*)	(+)	French et al., 2004
<i>C. s. scutulatus</i>	E. U. A. (Arizona Y*)	(+)	Weinstein et al., 1985
<i>C. s. scutulatus</i>	E. U. A. (Arizona M*)	(+)	Weinstein et al., 1985
<i>C. s. scutulatus</i>	E. U. A. (New Mexico)	(+)	Weinstein et al., 1985
<i>C. s. scutulatus</i>	E. U. A. (Texas BB*)	(+)	Weinstein et al., 1985
<i>C. viridis concolor</i>	-----	(+)	Weinstein et al., 1985
<i>C. horridus</i>	E. U. A. (Valdosta Georgia)	(+)	Weinstein et al., 1985
<i>C. atrox</i>	E. U. A. (Arizona M*)	(+)	Weinstein et al., 1985
<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	-----	(+)	Weinstein et al., 1985
<i>Sistrurus catenatus catenatus</i>	E. U. A. (Ohio W*)	(+)	Gibbs & Mackessy, 2009
<i>C. vegrandis</i>	-----	(+)	Kaiser & Aird, 1987

Las letras con (\*), corresponden a los condados: C\* Cochise; P\* Pima; R\* Mt San Jacinto, Riverside; Y\* Yuma; M\* Maricopa; BB\* Big bend; W\* Wyandot. Los signos (+) indican la presencia de toxina Mojave/Crotoxina en los venenos.

**Anexo D: Fármacos hechos a partir de componentes en el veneno de serpientes.**

<b>ESPECIE</b>	<b>FÁRMACO</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
<i>Bothrops jararaca</i>	Captopril, Ramipril	Agentes hipotensivos (1975). Basado en estructura de péptidos potenciadores de bradiquidina (BPPs). Inhibidores de enzimas convertidores de angiotensina (ACE), son utilizados de manera exitosa en el tratamiento de hipertensión y falla cardiaca.
<i>Bothrops moojeni</i>	Reptilasa® Bothrocetin®, Stypven®, Ecarin®, Protac®	Reactivos de diagnóstico importantes para la hemostasia.
<i>Bothrops moojeni</i>	Defibrasa®	Enzima coagulante (también llamada batroxobin), “pegamento de fibrina” usado en cirugía para detener sangrado difuso de hígado o pulmón mediante el cubrimiento de la superficie con una capa delgada de fibrina.
<i>Calloselasma rhodostoma</i>	Ancrod® ó Arvin®	Enzimas coagulantes del veneno de serpientes utilizadas para tratar enfermedades trombo- embolicas. Decremento dosis – dependiente en nivel de fibrinógeno, disminuye viscosidad de sangre y plasma. Formación de anticuerpos.

**Anexo E: Desintegrinas y sus principales efectos sobre cáncer.**

DESINTEGRINA	EFEECTO	ESPECIE DE DONDE SE AISLO
Triflavin	Inhibición de adhesión celular, migración y angiogénesis.	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>
Acutina, salmosina, contortrostatina y rhodostomina, obtustatina, viperistatina, lebestatina y jerdostatina.	Inhiben angiogénesis tumoral y metástasis.	<i>Deinagkistrodon acutus.</i> <i>Gloydius ussuriensis.</i> <i>Agkistrodon contortrix.</i> <i>Calloselasma rhodostoma.</i> <i>Vipera lebetina obtusa.</i> <i>Vipera palestinae.</i> <i>Protobothrops jerdonii.</i>

**Anexo F: Cuantificación de proteína por BCA; Formula de la ley de Lambert y Beer utilizada para calcular la concentración de proteína en cada muestra de veneno.**

**Reactivo A:** carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), BCA ( $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$ ), y tartrato de sodio ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_6$ ) en hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) 0.01M.

**Reactivo B:** 4% de sulfato cúprico ( $\text{CuSO}_4$ ).

Albúmina sérica bovina (BSA): solución stock a 2 mg/mL en 0.9% NaCl y 0.05% de azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ).

Lector de ELISA con filtro de 570nm.

Microplacas para ELISA de 96 pozos marca Falcon.

**Preparación de estándares (ST).**

1. Se prepararon cinco estándares de albúmina sérica bovina en buffer PBS 1x con las siguientes concentraciones:

- (1) 320 µg/mL
- (2) 160 µg/mL
- (3) 80 µg/mL
- (4) 40 µg/mL
- (5) 20 µg/mL

**Preparación de la muestra problema (MP).**

1. Una vez decidida la dilución, se preparó la solución problema (veneno) para que se encuentre dentro del rango de la curva estándar (20 a 320 µg/mL), en un volumen suficiente para que se hicieran duplicados. Considerando 25µL por pozo.

**Preparación de la mezcla de reacción (MR).**

1. Se preparó MR mezclando 50 partes del reactivo A con una parte del reactivo B.

$A = (\alpha) (l) (c) \text{ despejando } c: c = A / (\alpha) (l)$ $\text{Como } \alpha = 1 \text{ y } l = 1 \text{ entonces: } c = A / (\cancel{\alpha})(\cancel{l})$ $\text{Quedando: } c = A$
<p>Dónde: A = absorbancia; <math>\alpha</math> = coeficiente de extinción molar; l = ancho de la celdilla; c = concentración.</p>



## **Anexo G: Preparación de diluciones y preparación de los geles separador y concentrador para SDS – PAGE.**

**Solución de acrilamida** 30% de acrilamida + 0.8% de bis-acrilamida.

**Amortiguador inferior** “Lower buffer” (buffer tris 1.5 M, SDS 0.4%). Se disolvieron 18.7 g de tris en 50 mL de agua desionizada y se adicionaron 2 mL de SDS al 20%. Se ajustó el pH a 8.8 con HCl concentrado y se aforó a 100 mL.

**Amortiguador superior** “Upper buffer” (buffer tris 0.5 M, SDS 0.4%). Se disolvieron 6.06 g de tris en 50 mL de agua desionizada y se adicionaron 2 mL de SDS al 20%. Se ajustó pH a 6.8 con HCl concentrado, posteriormente se aforó a 100 mL.

**Amortiguador de corrida** (buffer tris 0.25 M, glicina 0.19 M, SDS 0.1%). Para una solución 10X, se disolvieron 15.2 g de tris y 72.1 g de glicina en 300 mL de agua desionizada, se adicionaron 25 mL de SDS al 20% y se ajustó pH a 8.6 con NaOH a 10 M, y se aforó a 500 mL.

**Amortiguador de corrida desnaturalizante 5X** (10% glicerol + 2.5% SDS + 50 mM tris – HCl pH 6.8 + 5% 2 – mercaptoetanol + 0.002% azul de bromofenol). En un tubo marca Falcon de 15 mL, se mezclaron los siguientes volúmenes: 2.5 mL de glicerol, 3.125 mL de SDS al 20%, 1.25 mL tris – HCl 1 M pH 6.8, 1.25 mL de  $\beta$  – mercaptoetanol, 0.5 mL de 1% azul de bromofenol, se aforó a 10 mL con agua desionizada.

**Persulfato de amonio al 10%** (catalizador). Se disolvieron 0.1 g de persulfato de amonio en 1 mL de agua desionizada.

**Solución de tinción** (25% isopropanol + 10% ácido acético + 0.2% de azul de Coomasie R – 250). Se disolvió 1 g de azul de Coomasie R – 250 en 125 mL de isopropanol, 50 mL de ácido acético y se aforó a 500 mL con agua desionizada.

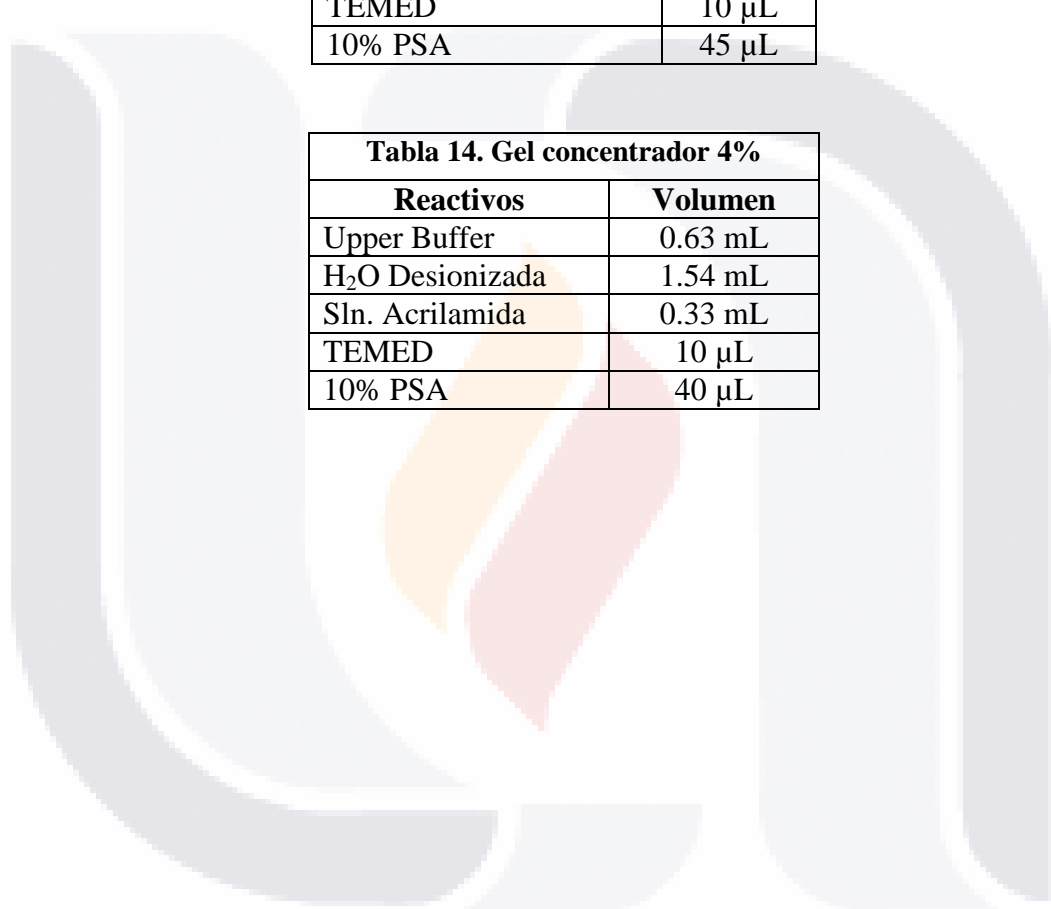
**Solución para desteñir** (10% metanol + 10% ácido acético). Se mezclaron 400 mL de agua desionizada, 50 mL de metanol y 50 mL de ácido acético.

**Tabla 13. Gel separador 15%**

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen</b>
Lower Buffer	1.5 mL
Sln Acrilamida	3.0 mL
H <sub>2</sub> O desionizada	1.5 mL
TEMED	10 µL
10% PSA	45 µL

**Tabla 14. Gel concentrador 4%**

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen</b>
Upper Buffer	0.63 mL
H <sub>2</sub> O Desionizada	1.54 mL
Sln. Acrilamida	0.33 mL
TEMED	10 µL
10% PSA	40 µL



**Anexo H: Western blot: Preparación de los buffers de transferencia y TBST.**

**Buffers:**

**Buffer de transferencia (Nitrocelulosa) para 500 mL:**

- Glicina 39 mM ----- 1.45 gr.
- Tris Base 48 mM----- 2.9 gr.
- SDS 0.037 % ----- 0.185 gr.
- Metanol 20% ----- 100 mL.

**Buffer de transferencia CAPS (inmobilon-P) para 1.2Lts.**

2.65 gr. de CAPS 10 mM ajustado a pH 11 con NaOH (10 N) y llevado a 1.08 Lts. Se agregaron 120 mL de metanol.

**TBST para 500 mL:**

Tris – HCl 1M pH 7.5 -----5 mL  
NaCl 5M -----15 mL  
Tween 20 0.2% ----- 250  $\mu$ L2.5 mL

**TBST 10X 500 mL:**

50 mL  
150 mL

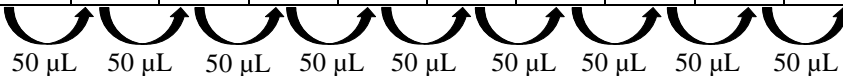
**Anexo I: Esquema del procedimiento de diluciones seriadas para ELISA;  
(SR) solución de reacción, (C.l.k) veneno de *C. l. klauberi*, (C. a) *C. aquilus*, (C. lxa) *C. lepidus x aquilus*, (C-) control negativo.**

a). Placa 1.

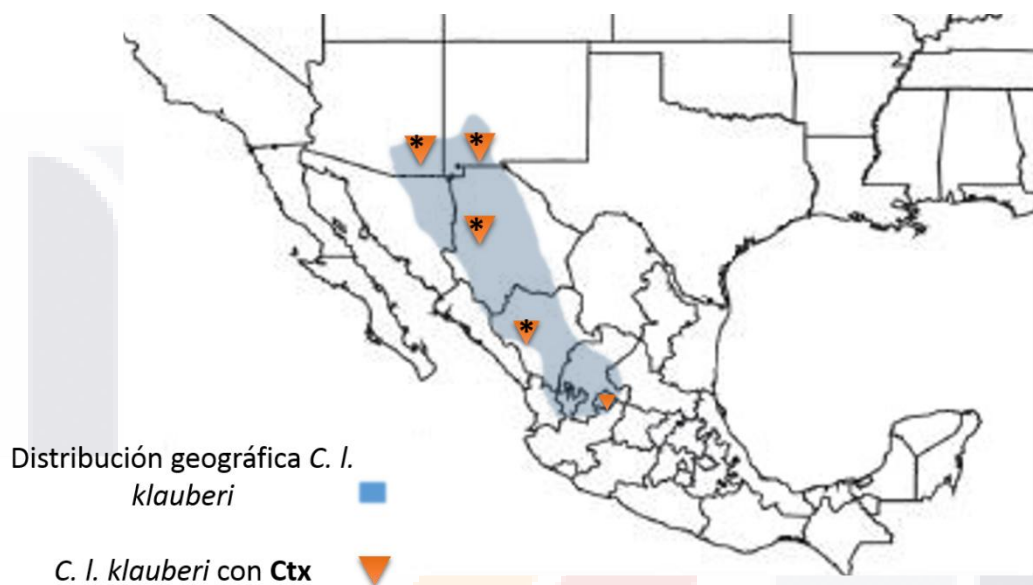
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx
<b>B</b>	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx
<b>C</b>	SR <i>C. l. k</i>	SR <i>C. l. k</i>	SR <i>C. l. k</i>	SR <i>C. l. k</i>	SR <i>C. l. k</i>	SR <i>C. l. k</i>	SR <i>C. l. k</i>	SR <i>C. l. k</i>	SR <i>C. l. k</i>	SR <i>C. l. k</i>	SR <i>C. l. k</i>	SR <i>C. l. k</i>
<b>D</b>	SR <i>C. l. k</i>	SR <i>C. l. k</i>	SR <i>C. l. k</i>	SR <i>C. l. k</i>	SR <i>C. l. k</i>	SR <i>C. l. k</i>	SR <i>C. l. k</i>	SR <i>C. l. k</i>	SR <i>C. l. k</i>	SR <i>C. l. k</i>	SR <i>C. l. k</i>	SR <i>C. l. k</i>
<b>E</b>	SR <i>C. a</i>	SR <i>C. a</i>	SR <i>C. a</i>	SR <i>C. a</i>	SR <i>C. a</i>	SR <i>C. a</i>	SR <i>C. a</i>	SR <i>C. a</i>	SR <i>C. a</i>	SR <i>C. a</i>	SR <i>C. a</i>	SR <i>C. a</i>
<b>F</b>	SR <i>C. a</i>	SR <i>C. a</i>	SR <i>C. a</i>	SR <i>C. a</i>	SR <i>C. a</i>	SR <i>C. a</i>	SR <i>C. a</i>	SR <i>C. a</i>	SR <i>C. a</i>	SR <i>C. a</i>	SR <i>C. a</i>	SR <i>C. a</i>
<b>G</b>	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -
<b>H</b>	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -

b). Placa 2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx
<b>B</b>	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx	SR Ctx
<b>C</b>	SR <i>C. lxa</i>	SR <i>C. lxa</i>	SR <i>C. lxa</i>	SR <i>C. lxa</i>	SR <i>C. lxa</i>	SR <i>C. lxa</i>	SR <i>C. lxa</i>	SR <i>C. lxa</i>	SR <i>C. lxa</i>	SR <i>C. lxa</i>	SR <i>C. lxa</i>	SR <i>C. lxa</i>
<b>D</b>	SR <i>C. lxa</i>	SR <i>C. lxa</i>	SR <i>C. lxa</i>	SR <i>C. lxa</i>	SR <i>C. lxa</i>	SR <i>C. lxa</i>	SR <i>C. lxa</i>	SR <i>C. lxa</i>	SR <i>C. lxa</i>	SR <i>C. lxa</i>	SR <i>C. lxa</i>	SR <i>C. lxa</i>
<b>E</b>	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
<b>F</b>	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
<b>G</b>	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -
<b>H</b>	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -	SR C -



**Anexo J: Distribución geográfica de *C. l. klauberi* con crotoxina en sus venenos.**



\* Poblaciones de *C. l. klauberi* que expresan Ctx (Gleen & Straight, 1982).