

11661
1



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA

**INTERFERENCIA DE UNA FRACCIÓN HEMOAGLUTINANTE DEL
VENENO CROTÁLIDO EN LA ADSORCIÓN DEL VIRUS DE
PARAINFLUENZA-3 (VPIB-3)**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
"MAESTRO EN CIENCIAS"**

**TESISTA
ARCELIA ALVARADO ISLAS**

**DIRECTOR DE TESIS
JOSÉ ALVARO AGUILAR SETIÉN**

**TUTORES
BLANCA LILIA BARRÓN
PABLO CORREA GIRÓN
ALEJANDRO MARTÍNEZ C.**

México, D. F., Marzo del 2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

***A mis padres
Jorge y Arcelia***

B

AGRADECIMIENTOS

**Octavio de Paz Villafán
Arturo García Fraustro
Germán Colmenares Viladomat
Del Instituto Nacional de Investigaciones
Disciplinarias en Microbiología,
INIFAP-SARH**

**Roberto R.P. Kretschmer Schmid
Alvaro Aguilar Setián
Yolanda León Campos
Leticia Ramos Ramírez
Emma Lucía Espinosa Larios
Ma. Esther Morales Martínez
Ma. Guadalupe Rico Rosillo
De la Unidad de Investigación Médica
en Inmunología
Hospital de Pediatría
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS**

**Eliseo Hernández Baumgarten
Sofía González Gallardo
Del Laboratorio de Microscopía Electrónica
Coordinación General de Estudios de Posgrado
FES-Cuautitlán, Campo 1, UNAM**

**Cynthia González Ruiz
Del Laboratorio de Patología
Departamento de Ciencias de la Salud Animal
FES-Cuautitlán, Campo 4, UNAM**

**Jerónimo Bello
Laboratorios Beckman**

**José Ángel Gutiérrez Pabello
Pablo Correa Girón
Blanca Lilia Barrón
Alejandro Martínez C
Álvaro Aguilar Setián
Comité de Jurado**

RESUMEN

Se evaluó la actividad antiviral de una fracción hemoaglutinante de veneno crotálico hacia el virus de Parainfluenza-3 (VPIB-3). Entre los venenos de las serpientes crotálicas: *Agkistrodon piscivorus*, *Agkistrodon Contortix* y *Crotalus scutulatus*; *A piscivorus* mostró mayor capacidad hemoaglutinante (64, 32 y 2 unidades, respectivamente). La dosis máxima no letal para ratón fue de 1.75 mg/30g de peso corporal para *C scutulatus*; mientras que para los restantes fue \geq a 4.0 mg/30g de peso corporal. Macroscópicamente, *A piscivorus* y *A contortix* causaron edema masivo e infiltración sanguínea; Microscópicamente, los tres causaron miositis aguda con diversos grados de severidad. La inoculación de cultivos MDBK con los venenos en dosis superiores a los 0.006, 0.012 y 0.195 mg/ml respectivamente, causaron desprendimiento de la monocapa o aglutinación. Por su mayor actividad biológica se aisló, mediante HPLC-RP, la fracción hemoaglutinante del veneno de *A piscivorus*. La inoculación de ratones con esta fracción, en dosis de 4.25 μ g/0.2ml, no causó daño ni macroscópico ni microscópico y no alteró el metabolismo de células MDBK hasta la concentración de 1.062 μ g/ml. La fracción hemoaglutinante como bloqueador de receptores celulares (1.062 μ g/ml) impidió la infección con el VPIB-3 y mantuvo la viabilidad celular entre el 69.34 y 84.86%. Por otra parte se observó (microscopio electrónico), que la fracción destruyó a las partículas virales reduciendo el título viral de $10^{5.6}$ a $10^{2.0}$ DICC_{50%}. Un suero hiperinmune anti-veneno de *A piscivorus* reconoció una proteína de 20.99 kDa común a la fracción crotálica y al VPIB-3. Los resultados muestran que la purificación de la fracción hemoaglutinante del veneno, elimina los daños causados por los otros componentes, posibilitando su empleo como antiviral.

Palabras Clave: Venenos Crotálicos, Virus de Parainfluenza-3 (VPIB-3), Antivirales, Lectinas, Fracciones Hemoaglutinantes

SUMMARY

An hemagglutinant fraction antiviral activity of crotalid venom against Parainfluenza virus (VPIB-3) was evaluated from crotalid serpents: *Agkistrodon piscivorus*, *Agkistrodon contortix* and *Crotalus scutulatus*. *Agkistrodon piscivorus* venom showed the greatest hemagglutinant capacity with 64 units. The nonlethal maximum permissible IM dose of the three venoms was 1,75 mg/30 g in mouse. *Agkistrodon piscivorus* and *Agkistrodon contortix* caused massive edema and sanguineous infiltration in muscle; microscopic lesions were acute myositis in various severity degrees with the three different venoms. Loosening of monolayer or agglutination in MDBK cells was observed with each one of venoms in doses higher than 0.006, 0.012 and 0.195 mg/milliliter, respectively. The highest hemagglutinant activity fraction was isolated from *Agkistrodon piscivorus* venom by HPLC-RP. Mice IM inoculation with this fraction (4,25 μ g/0,2 milliliter), caused no macroscopic or microscopic damage and MDBK cells metabolism was not altered with concentrations bellow 1,062 μ g/milliliter. Also the hemagglutinant fraction prevented the infection with VPIB-3, and kept between 63.34 and 84.86% the cellular viability. On the other hand, it was observed (electron microscope), that hemagglutinant fraction destroyed the viral particles. Finally, a common protein (20,99 kDa) to *Agkistrodon piscivorus* venom and VPIB-3 was recognized by an anti-venom serum. The results show that the purification of the hemagglutinant fraction of the venom, eliminates the damage caused by the others components, making possible their use like antiviral compound.

INDICE

TITULO	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	4
- Venenos Crotálidos	4
- Virus de la Parainfluenza-3	9
- Antivirales	11
JUSTIFICACIÓN	12
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	15
MATERIAL Y MÉTODOS	16
1.- Selección de venenos	16
2.- Determinación del daño celular " <i>in vivo</i> " de los venenos crotálidos	17
2.1.- Determinación de la dosis máxima no letal 50%	17
2.2.- Inoculación en ratones con dosis no letal	17
2.3.- Estudio histopatológico	17
3.- Determinación del daño celular " <i>in vitro</i> " de los venenos crotálidos	17
4.- Aislamiento de la fracción con actividad hemoaglutinante del veneno crotálido	18
4.1.- Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)	18
4.2.- Evaluación de la actividad biológica de la fracción aislada	19
5.- Determinación del daño celular " <i>in vivo</i> " producido por la fracción aislada	19
6.- Determinación del daño celular " <i>in vitro</i> " producido por la fracción aislada	20
7.- Determinación del efecto " <i>in vitro</i> " del virus de la Parainfluenza-3	20
7.1.- Viabilidad celular	20

F

7.2.- Titulación	21
8.- Determinación " <i>in vitro</i> " de la capacidad de la fracción hemoaglutinante para bloquear la adherencia del virus de la Parainfluenza-3	21
9.- Determinación " <i>in vitro</i> " de la capacidad de la fracción hemoaglutinante del veneno crotálico para unirse a las proteínas del virus de la Parainfluenza-3 y evitar la infección viral	22
9.1.- Microscopía electrónica	22
9.2.- Determinación de la actividad viral posterior a la incubación con la fracción hemoaglutinante	22
10.- Comprobación del reconocimiento de las proteínas virales y la fracción hemoaglutinante crotálica por sueros anticrotálicos	23
10.1.- Obtención del suero hiperinmune	23
10.2.- Determinación del nivel de anticuerpos mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación	24
10.3.- Extracción de la membrana celular	24
10.4.- Concentración del virus de la Parainfluenza-3	25
10.5.- Electroforesis y electrotransferencia	25
10.6.- Pruebas de "western blot"	26
RESULTADOS	28
1.- Selección de venenos	28
2.- Daño " <i>in vivo</i> " de los venenos crotálicos	28
2.1.- Dosis máxima no letal 50%	28
2.2.- Daño de tejidos	28
2.3.- Estudio histopatológico	29
3.- Daño producido " <i>in vitro</i> " por los venenos crotálicos	29
4.- Aislamiento de la fracción con actividad hemoaglutinante a partir del veneno crotálico	30
4.1.- Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)	30
4.2.- Actividad biológica de la fracción aislada	30

5.- Daño " <i>in vivo</i> " producido por la fracción aislada	31
6.- Daño " <i>in vitro</i> " producido por la fracción aislada	31
7.- Daño " <i>in vitro</i> " producido por el virus de la Parainfluenza-3	32
8.- Capacidad de la fracción hemoaglutinante para bloquear la adherencia del VPIB-3	32
9.- Capacidad de unión de la fracción hemoaglutinante crotálica hacia la proteína del VPIB-3 y evasión de la infección viral	33
9.1.- Microscopía electrónica	33
9.2.- Actividad viral posterior a la exposición con la fracción hemoaglutinante	33
10.- Reconocimiento de las proteínas virales y la fracción hemoaglutinante crotálica por sueros anticrotálicos	33
10.1.- Obtención de suero hiperinmune	33
10.2.- Determinación de pesos moleculares	34
10.3.- "Western blot"	34
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIÓN	42
CUADROS Y FIGURAS	43
ANEXO 1	52
CITAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE CUADROS

**Cuadro 1.- Resumen de las características principales de los
venenos de serpientes crotálicas y del saurio
Heloderma**

45

II

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Capacidad hemoaglutinante de los venenos crotálidos y no crotálidos	43
Figura 2.- Daño "in vivo" causado por los venenos crotálidos	43
Figuras 3 a 6.- Cortes histológicos de músculo tibial de ratones inoculados con los diferentes venenos	44
Figuras 7 a 9.- Daño celular "in vitro" causado por los venenos crotálidos	46
Figura 10.- Pruebas de aglutinación de proteínas aisladas de <i>A piscivorus</i>	47
Figura 11.- Daño "in vivo" causado por la fracción hemoaglutinante aislada de <i>A piscivorus</i>	47
Figuras 12 a 13.- Cortes histológicos de músculo de ratón inoculados con la fracción hemoaglutinante	48
Figuras 14 a 15.- Microscopía electrónica del efecto destructivo de la fracción crotálida sobre el VPIB-3	50
Figura 16.- Electroforesis del veneno de <i>A piscivorus</i> y de la fracción hemoaglutinante aislada	50
Figura 17.- "Western blot" marcando la identidad entre la fracción hemoaglutinante y una proteína estructural del VPIB-3	51

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1.- Patrón cromatográfico del veneno de <i>A piscivorus</i>	46
Gráfica 2.- Viabilidad de cultivos MDBK posterior a la inoculación con la fracción hemoaglutinante de <i>A piscivorus</i>	48
Gráfica 3.- Viabilidad de cultivos MDBK posterior a la infección con el VPIB-3	49
Gráfica 4.- Prueba de bloqueo de la replicación del VPIB-3	49

K

TITULO

**INTERFERENCIA DE UNA FRACCIÓN
HEMOAGLUTINANTE DEL VENENO CROTÁLIDO EN LA
ADSORCIÓN DEL VIRUS DE PARAINFLUENZA-3 (VPIB-3)**

INTRODUCCIÓN

El veneno de serpiente consiste en una mezcla compleja de polipéptidos y proteínas farmacológicamente activos. Varios de sus componentes tóxicos interfieren en diversas funciones del organismo, con actividades cardiotoxicas, hemotóxicas, miotóxicas, neurotóxicas y vasoactivas (Manjunatha y Evans, 1990). Las serpientes y sus venenos han fascinado al hombre y han sido objeto de estudio, purificándose cientos de toxinas proteicas que han servido como herramienta para el entendimiento de eventos moleculares en la fisiología normal. Gracias a las acciones bioquímicas y metabólicas de sus componentes, se han elucidado mecanismos básicos del sistema nervioso, de procesos en membrana celular, de degranulación de células productoras de autacoides, de procesos de coagulación e identificación de receptores nerviosos (Manjunatha y Evans, 1990; Apellanis, 1980).

De los venenos de serpiente, los pertenecientes a las subfamilias Crotalinae y Viperinae, de la familia Viperidae, son de importancia, ya que actúan como inductores de la aglutinación de plaquetas, a través de una glicoproteína denominada hemoaglutinina ó lectina, caracterizada por poseer sitios de unión a receptores de azúcar de la membrana celular y, mediante este mecanismo traspasan dicha membrana. Estas lectinas han sido aisladas del veneno de serpiente de los géneros *Agkistrodon* y *Crotalus* (Ogilvie y Gartner, 1984; Gartner y Ogilvie, 1984). La finalidad del presente estudio es el aprovechar esta capacidad de unión de la lectina hacia los receptores de ácido síalico de la membrana celular, con la intención de bloquear la adherencia celular del virus de Parainfluenza-3 bovino (VPIB-3), o en su defecto, aprovechar la capacidad de unión de la lectina hacia las glicoproteínas que emergen de la cubierta lipídica viral, creando un efecto de inhibición viral.

Para el control de la enfermedad producida por el VPIB-3 sólo existe la vacunación. Sin embargo, por las similitudes en las estructuras y los mecanismos de acción entre los virus de VPIB-3 e Influenza A, es factible que pueda controlarse al VPIB-3 mediante drogas antivirales. Para la quimioprofilaxis del virus de la Influenza A en humanos, existen varios fármacos como la amantadina,

rimantadina y zanamivir, que actúan interfiriendo el ciclo de replicación viral. Las dos primeras bloquean los cambios en el pH que requiere el virión para verter su contenido en el citosol; mientras que la tercera actúa bloqueando a la neuraminidasa (Graeme *et al.*, 1999). El VPIB-3, al igual que el virus de Influenza A, posee en su cubierta las glicoproteínas (en este caso unidas) hemoaglutinina/neuraminidasa; la primera de ellas interviene en el mecanismo de adherencia viral a la membrana celular, mientras que la función de la segunda es favorecer la excreción de las partículas virales de la célula infectada (Scheid y Choppin, 1974; Portner, 1981; Murphy *et al.*, 1999). Basándose en la biología viral y en la similitud de las propiedades biológicas de las glicoproteínas presentes en los *Orthomyxovirus* (Influenza A), los *Paramyxovirus* (VPIB-3) (Lamb y Kolakofsky, 1996), así como en la afinidad de las lectinas por los carbohidratos presentes en los receptores celulares y hemoaglutininas virales, se consideró factible la evaluación de la lectina como un agente bloqueador de los receptores que permiten la adherencia viral y/o como un agente con actividad antiviral.

ANTECEDENTES

Venenos crotálicos

De las 2,500 a 2,700 especies de serpientes, sólo alrededor de 350 son venenosas. Estas últimas están confinadas en 4 familias: Colubridae, Elapidae, Atractaspididae y Viperidae. Existe una quinta familia, denominada Hydrophidae, la cual, para algunos taxonomistas, se incluye dentro de la familia Elapidae (Greene, 1997; Apellanis, 1980; Serpientes Venenosas de Costa Rica, 2001). En México se conocen unas 579 especies y subespecies, de las cuales sólo el 21% poseen venenos capaces de causar daños serios al hombre. Las serpientes venenosas de nuestro país pertenecen a dos familias: la Elapidae y la Viperidae (Sigala y Vázquez, 1996).

Dentro de la familia Viperidae se encuentran las subfamilias Viperinae y Crotalinae, cubriendo 30 géneros y 230 especies de víboras y víboras de foseta, entre las que se encuentran los géneros: *Agkistrodon*, *Atropoides*, *Bothrops*, *Bothriechis*, *Crotalus*, *Lachesis*, *Porthidium* y *Cerrophidion* (Greene, 1997; Serpientes Venenosas de Costa Rica, 2001). Las serpientes de estas familias tienen importancia desde dos diferentes puntos de vista: el primero, por ser las que ocasionan la mayoría de los envenenamientos ofídicos, y en segundo término, por poseer polipéptidos y proteínas farmacológicamente activas (Manjunatha y Evans, 1990).

En el envenenamiento ofídico, los efectos clínicos varían de acuerdo a las propiedades de los venenos de cada especie. Tenemos por ejemplo, las toxinas de *Vipera russellii* que causan la muerte por insuficiencia circulatoria aguda, con hipotensión e incremento de la permeabilidad vascular, producida por la liberación de autacoides y parálisis de los capilares. Posteriormente, los autacoides favorecen las acciones tóxicas de otros componentes del veneno (Apellanis, 1980). Los *Crotalus scutulatus*, poseen entre otros componentes, hemotoxinas y potentes neurotoxinas, siendo estas últimas las que causan la muerte por insuficiencia respiratoria (Sigala y Vázquez, 1996). Mientras que, las hemotoxinas de *Agkistrodon contortrix* y *Agkistrodon piscivorus* son dramáticas pero no fatales, al causar edema masivo, dolor y extravasación sanguínea; solo que *Agkistrodon*

piscivorus causa daño en los tejidos y alteraciones en la sangre, de forma un poco similar al efecto de *Crotalus* (Moccasins, 2001).

Los efectos farmacológicos más estudiados de las proteínas y polipéptidos contenidos en los venenos, están enfocados en: a) Las cardiotoxinas /citotoxinas, que se unen a receptores de la membrana de los glóbulos rojos y células del corazón; b) Las hemotoxinas, mismas que pueden ser inhibidores de proteasas, activadores del factor X y activadores de proteína C, que causan efectos anticoagulantes e hipotensión; c) Las desintegrinas, que tienen un efecto anticoagulante al unirse a receptores GPIIb/IIIa de las plaquetas; d) Las proteasas, con una gran variedad de acciones, entre ellas la conversión del fibrinógeno en fibrina; e) La fosfolipasa A, de actividad hemorrágica (Manjunatha y Evans, 1990; Untitled Document, 2001) y; f) La crotamina (de los crotálicos) ó el factor lítico directo (de los elápidos), que es un polipéptido con un residuo N-terminal polar, con una alta densidad de carga, que le permite unirse a los grupos catiónicos de los extremos polares de la membrana, tendiendo a estabilizar las cargas, y por lo tanto, disminuyendo las fuerzas iónicas que unen dichos extremos. Lo anterior permite que los extremos no polares (lipofílicos) de los polipéptidos penetren en la membrana, formada por cadenas hidrocarbonadas (lipídicas), unidas por débiles fuerzas hidrofóbicas. De tal forma que separan laxamente las moléculas del estrato externo, facilitando así la unión de la fosfolipasa A (factor lítico indirecto) a su principal sustrato, la lecitina, hidrolizándola a liolecitina, la cual funciona como un detergente, aumentando de esta manera la actividad citolítica, al producir una reacción en cadena (Apellanis, 1980).

Las toxinas contenidas en los venenos de serpiente, también han sido usadas terapéuticamente, el ejemplo mas conocido es el inhibidor de la enzima transformadora de la angiotensina (ACE), aislado del veneno de *Bothrops jaracusa*. Esta enzima es la responsable de transformar el precursor inactivo, en la hormona angiotensina localmente activa, la cual causa la constricción de los vasos sanguíneos y de este forma promueve la presión sanguínea. Mediante el bloqueo farmacológico de la actividad de estas enzimas, la presión sanguínea se reduce y los agentes que poseen esta actividad son usados comúnmente para el

tratamiento de la presión sanguínea (captopril). También, se ha demostrado que estos inhibidores tienen la habilidad de prolongar la acción de la hormona bradikinina, la cual dilata los vasos sanguíneos, al bloquear a la enzima que inactiva a la bradikinina (Cushman *et al.*, 1980). Además, se han aislado de muchos venenos de serpiente, varias proteínas de bajo peso molecular, entre los 5 000 y 9 000 Da, con actividad inhibitoria de la agregación de plaquetas y la coagulación sanguínea. Estas proteínas actúan como potentes antagonistas de los receptores de la glicoproteína IIb/IIIa, de la superficie celular de las plaquetas. Mediante su unión a estos receptores, evitan la interacción entre las plaquetas y el fibrinógeno; y son usados terapéuticamente para el control de la coagulación anormal (Dennis, 1989; Gould, 1990).

Las toxinas de los venenos de serpientes, también han sido empleadas para elucidar mecanismos fisiológicos básicos, como el de las dendrotoxinas; la cuales son homólogas a ciertos inhibidores de proteasas y tienen habilidad para aumentar la señalización química entre las células nerviosas y musculares, elevando la liberación de neurotransmisores, al bloquear ciertos canales iónicos neuronales de potasio (Harvey y Anderson, 1991). Se especula, que el bloqueo selectivo de los canales de potasio, podría elevar la actividad de las células nerviosas dañadas y aliviaría algunos desordenes degenerativos, tales como la enfermedad de Alzheimer's, o reducir la actividad eléctrica anormal del cerebro, y ser usada como una droga anticonvulsionante para la epilepsia (Cook, 1990).

Otro de los aspectos más estudiados, en torno a los componentes de los venenos de serpientes, es el de las proteínas inductoras de la aglutinación de plaquetas. Algunas de ellas, requieren de la presencia de receptores plasmáticos como el fibrinógeno y el factor de von Willebrand (vWF) para inducir la aglutinación, mientras otras (lectinas) actúan independientemente (Manjunatha y Evans, 1990).

El botrocetin o coaglutinina de veneno, es un potente inductor de la aglutinación, y está presente en varios venenos de serpientes, particularmente en los del género *Bothrops*. Su acción depende de la presencia de la proteína plasmática receptora vWF. Primeramente, el botrocetin interactúa con el receptor

vWF para formar un complejo, el cual es un agente aglutinante activo. Este complejo después se une a los receptores GP Ib, los cuales actúan como puentes para formar la aglutinación. El botrocetin, vWF y GP Ib, deben de estar presentes para que la aglutinación sea estable, lo cual indica la formación de un complejo ternario; sin embargo, los detalles de esta interacción aún no son claros (Read *et al.*, 1989).

Las lectinas, también son potentes inductores de la aglutinación y ninguna de ellas requiere de factores plasmáticos para actuar. Estas han sido identificadas en varios venenos de crotálicos (lectinas dependientes de calcio y sensibles a agentes reductores), elápidos (lectinas independientes de calcio e insensibles a agentes reductores) y viperinos (con actividad hemoaglutinante débil) (Ogilvie y Gartner, 1984); y han sido aisladas de los géneros y especies: *Bothrops atrox*, *Agkistrodon contortix contortix*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma*, *Crotalus atrox*, *Lachesia muta*, *Dendroaspis jamesonii* y *Agkistrodon rhodostoma* (Gartner y Ogilvie, 1984).

Básicamente, las lectinas han sido descubiertas en una gran cantidad de plantas (Sharon y Lis, 1972), virus, microorganismos y vertebrados como la anguila eléctrica, gallinas, monos y el hombre; siendo la trombolectina, la primera lectina aislada de veneno de serpientes, del género *Bothrops atrox* (Gartner y Stocker, 1980).

La mayoría de los estudios con lectinas de plantas se realizaron inicialmente con extractos crudos, siendo la concanavalina A la primera lectina aislada en forma cristalina. Debido a las propiedades biológicas y bioquímicas de las lectinas de plantas, su uso se ha enfocado principalmente a su actividad aglutinante, misma que ha sido ampliamente aprovechada para la determinación de grupos sanguíneos humanos (Watkins, 1966); Se ha reportado que ciertas lectinas poseen actividad mitogénica, estimulando la transformación de los linfocitos desde pequeñas células en reposo en grandes células en división mitótica; Estudios recientes hacen referencia a la actividad de ciertas lectinas para aglutinar preferentemente a células cancerígenas que han sido transformadas por virus o productos químicos oncogénicos, así como por células transformadas

espontáneamente (Sharon y Lis, 1972); Mientras que otras publicaciones hacen referencia a su toxicidad hacia los animales, lo que las ubica entre las plantas con un pobre valor nutritivo (Jaffé, 1969).

Las lectinas animales, son consideradas proteínas no enzimáticas que selectivamente se unen a estructuras específicas de carbohidratos, cuya función normal podría ser el decodificar la información encontrada en las estructuras de carbohidratos. Los estudios estructurales clasifican a las lectinas animales en dos grandes grupos; las Tipo C (calcio-dependientes), que se localizan a nivel extracelular y se relacionan estructuralmente con receptores de la clase de las sialoglicoproteínas, y las tipo S (thiol-dependientes), que se localizan a nivel extracelular e intracelular y se unen a las porciones de carbohidratos de los componentes de membrana más fuertemente unidos, como las glicoproteínas, glicolípidos y proteoglicanos. Las estructuras más estudiadas corresponden a las lectinas hepáticas de pollo, ratón y humanas, de las que se ha determinado su completa secuencia de aminoácidos, consistente en polipéptidos que contienen secuencias hidrofóbicas de aproximadamente 25 aminoácidos precedidos por un dominio citoplásmico NH₂-terminal, mientras que los polipéptidos restantes permanecen expuestos en la región no citoplásmica de la membrana. Son oligoméricos y no se ha establecido el número de subunidades que forman la molécula receptora. Sin embargo, mediante procesos de proteólisis parcial, se ha definido que cada una de estas proteínas posee un dominio de reconocimiento de carbohidratos COOH-terminal (Drickamer, 1988).

Las lectinas en general, son moléculas que tienen la capacidad de aglutinar células y glóbulos rojos. Estas requieren de dos o más sitios de unión a azúcares para pasar a través de la membrana celular. La divalencia o polivalencia de las lectinas permite que estas interactúen con las mitades de azúcar en la superficie de células adyacentes, dando origen a la aglutinación celular ó de glóbulos rojos (Sharon y Lis, 1972). Se sabe muy poco sobre el sitio activo de la mayoría de las lectinas, pero es posible que las lectinas interactúen con los carbohidratos que poseen similitudes estructurales con su sitio activo. Debido a que las lectinas de los crotálicos requieren de calcio para su actividad, los sitios de unión para el

calcio pueden constituir el punto de unión; lo anterior se ha indicado porque las lectinas de los crotaídos pueden tener sitios de unión similares, mas no idénticos (Ogilvie y Gartner, 1984).

VIRUS DE LA PARAINFLUENZA-3

El VPIB-3 afecta a los bovinos y ovinos. El virus se ha aislado del ganado bovino, búfalo, caballo, mono y hombre. Experimentalmente, se ha logrado infectar a hámsters y cerdos. A las cepas humanas, bovinas y ovinas se les relaciona muy estrechamente (Howard y Francis, 1981). Sin embargo, es sabido que las cepas del VPIB-3 humanas y bovinas son serológicamente distintas (Mohanty y Dutta, 1981).

La enfermedad en los bovinos y ovinos es marcada por fiebre, lagrimeo, descarga nasal serosa, depresión, dificultad para respirar y tos. Las complicaciones pueden desembocar en neumonía intersticial. Las infecciones no severas cursan en 3-4 días con una recuperación completa. Sin embargo, en situaciones de estrés, los animales llegan a desarrollar neumonía intersticial. En estos casos, la infección sola o junto con otros agentes virales (adenovirus, rinotraqueitis infecciosa bovina, virus sincitial respiratorio bovino) o bacterianos, predispone a infecciones secundarias, principalmente con *Mannheimia haemolytica* (Fiebre de embarque) (Murphy *et al.*, 1999).

El VPIB-3 pertenece al orden de los *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae* y género *Respirovirus*. Los viriones son pleomórficos (tendientes a lo esférico o filamentoso) de 150 a 300 nm de diámetro. Son envueltos, cubiertos con peplómeros grandes (8 a 20 nm de longitud), con una nucleocápside de simetría helicoidal en forma de hueso de arenque, de 600 a 800 nm de longitud y 18 nm de diámetro. El genoma consiste de una cadena sencilla de RNA en sentido negativo, con 15 a 16 Kb. El genoma del VPIB-3 tiene de 7 a 8 marcos de lectura abiertos que codifican de 10 a 12 proteínas, incluyendo la NP, P, M, F, L y la HN (Murphy *et al.*, 1999).

Los peplómeros se componen de 2 glicoproteínas: la proteína de fusión (F) y hemoaglutinina/neuraminidasa (HN). La proteína H/N es la que interviene en el

primero y en el último paso de la infección, la hemoaglutinina se une a los receptores de superficie celular, los cuales pueden ser glicoproteínas que contienen ácido siálico o gangliósidos; mientras que la neuraminidasa, participa en la segmentación enzimática de los residuos de ácido siálico, para prevenir la autoagregación de las partículas virales durante la liberación de las células infectadas. La proteína F está presente en el virión como un precursor inactivo, que es activado por su segmentación proteolítica mediante una proteasa celular adecuada, lo que resulta esencial para la infectividad viral. Los paramixovirus se replican en el citoplasma. Los viriones se adhieren a través de la proteína H/N a la sialoglicoproteína celular o glicolípidos receptores. Posteriormente, la proteína F media la fusión de la cubierta viral con la membrana plasmática, dentro de un pH fisiológico. La nucleocápside liberada se mantiene intacta con sus tres proteínas asociadas (N, P y L), las cuales son requeridas para la transcripción mediante la RNA polimerasa RNA-dependiente (transcriptasa). El genoma se transcribe progresivamente en 6 a 10 mRNA mediante la síntesis secuencial a partir de un promotor. También se sintetiza la copia del genoma completo que sirve como template para la replicación del RNA genómico de sentido negativo (Lamb y Kolakofsky 1996; Murphy *et al.* 1999).

El término Parainfluenza se acuñó porque algunos signos son similares a los de la enfermedad producida por el virus de la Influenza, y porque la partícula viral tiene actividades de hemoaglutinina y neuraminidasa, similares a las del virus de Influenza (Collins y Chanok, 1996). Las glicoproteínas de superficie le confieren al virión actividades biológicas; tenemos como ejemplo, que la proteína H/N media la adsorción de eritrocitos (hemoadsorción), la aglutinación de eritrocitos en suspensión (hemoaglutinación), y la partición del ácido siálico (a través de la neuraminidasa); mientras que la proteína F, media la lisis de los eritrocitos adsorbidos (Choppin y Scheid, 1980).

Para el control del VPIB-3 se cuenta con vacunas elaboradas con virus atenuados de aplicación intranasal o parenteral, que inducen la producción de anticuerpos IgA. Para maximizar su efectividad, las vacunas deben de inducir la

producción de anticuerpos contra las proteínas de cubierta H/N, así como contra la proteína F (Lamb y Kolakofsky, 1996).

ANTIVIRALES

No existen drogas antivirales contra el VPIB-3. Sin embargo, es bien sabido que para el control del virus de la Influenza A humana (virus con actividad muy similar), se recurre frecuentemente a la quimioprofilaxis, reduciendo la severidad y duración de los signos, con la administración de la droga dentro de las primeras 48 horas de la enfermedad (Centers for Disease Control and Prevention, 1997). Los agentes antivirales más empleados son la amantadina (symadine) y la rimantadina (flumadine), los cuales interfieren en el ciclo de la replicación viral, bloqueando los cambios en el pH que requiere el virión para verter su contenido en el citosol (Graeme *et al.*, 1999). Ambas, en algunos casos pueden crear reacciones adversas en el sistema nervioso central, como nerviosismo, dificultad en la concentración, ansiedad y dolor de cabeza (Graeme *et al.*, 1999; Oates y Wood, 1996), u otros efectos adversos más comunes como náuseas, anorexia, constipación, boca seca, edema y retención de orina (Dolin, 1992). En casos aislados pueden ocurrir efectos adversos serios como alucinaciones y delirio, debido a la toma de dosis altas en pacientes de mayor edad y los que padecen de insuficiencia renal o psicosis (Oates y Wood, 1996). Otro antiviral es el zanamivir, quien actúa bloqueando la actividad de algunas moléculas involucradas en el ciclo reproductivo del virus. El mecanismo de acción de esta droga se basa en inhibir la actividad de la neuraminidasa, la cual normalmente interviene en el recorte del ácido siálico de los viriones recién formados. La droga al bloquear el sitio activo de la neuraminidasa, interrumpe el recorte del ácido siálico y consecuentemente inhibe la liberación y difusión de los viriones (Graeme *et al.*, 1999).

JUSTIFICACIÓN

Los virus de Influenza A y VPIB-3 manifiestan varias similitudes y diferencias. Por un lado está la semejanza en los signos de la enfermedad, y ambos poseen espículas de hemoaglutinina y neuraminidasa que ejercen la misma actividad. Debido a ello, frecuentemente se ha extrapolado la información relacionada con las actividades y procesos de las glicoproteínas, inmunidad y patogénesis viral de los virus de Influenza con los del virus de Parainfluenza. Por otro lado, difieren en que el genoma del virus de Influenza se transcribe y replica en el núcleo y es segmentado, mientras que el genoma de Parainfluenza, es una cadena sencilla que se replica en el citoplasma (Collins y Chanok, 1996).

El control del VPIB-3 hasta la fecha está básicamente concentrado en la inmunoprofilaxis. Sin embargo, éste podría ser ampliado a la quimioprofilaxis. De las drogas antivirales probadas para el control de Influenza A, el zanamivir parece ser el que ejecuta su acción, sin causar trastornos severos (o al menos, no se han publicado), al interrumpir el ciclo de replicación viral inhibiendo la liberación de los viriones recién formados (mecanismo de excreción viral).

Retomando la analogía de evadir la infección por interrupción del ciclo de replicación, en el presente trabajo se pretende evitar la infección bloqueando los mecanismos de entrada viral, ya sea por bloqueo o taponamiento de los receptores ácido siálico de las células huésped, o por bloqueo o taponamiento de las hemoaglutininas presentes en la bicapa lipídica del VPIB-3.

Dadas las similitudes funcionales de las moléculas de hemoaglutinina de los virus de Influenza A y VPIB-3, es un hecho que éstas son reconocidas por los receptores ácido siálico de las células huésped. Así mismo, consideramos que podría darse como un hecho, que las hemoaglutininas (lectinas) presentes en los venenos de los crotálicos, podrían ser reconocidas por los receptores ácido siálico y, si es que éstas son administradas con anticipación o al inicio de la entrada viral, podrían bloquear o competir por los receptores celulares y de esta forma disminuir o evitar la infección.

Por otra parte, también podría ser factible el evitar la infección viral, al bloquear o inhibir a las hemoaglutininas virales a través de las hemoaglutininas

(lectinas) presentes en los venenos de los crotálicos, dada su afinidad por los residuos de carbohidratos (azúcares) presentes en el sitio de unión de la espícula de la hemoaglutinina viral. Existen antecedentes de que las lectinas se han empleado para la identificación de residuos de carbohidratos (azúcares) que están involucrados en el proceso de interacción de algunos virus (Concavalina A) (Sharon y Lis, 1972; Reyes-Leyva *et al.*, 1997).

HIPÓTESIS

La inhibición viral o el bloqueo de la infección del VPIB-3 en sus células hospedadoras, podría lograrse mediante la utilización de la fracción hemoaglutinante (lectina) del veneno de los crotálicos, debido a que éstas moléculas presentan una gran afinidad por los carbohidratos, con lo cual, podrían cubrir al virus o tapan los sitios celulares a los que el virus requiere unirse, para tener éxito en la infección.

OBJETIVOS

General

Demostrar que las fracciones del veneno crotálico, con propiedades de lectina hemoaglutinante, pueden impedir la adherencia del VPIB-3 a la célula huésped y/o bloquear a la hemoaglutinina viral, mediante su previa unión a los grupos carboxilo presentes en ella.

Particulares

- Seleccionar de entre los venenos crotálicos, los de mayor actividad hemoaglutinante
- Determinar el grado de daño celular "*in vivo*" e "*in vitro*" de los venenos seleccionados.
- Aislar la proteína con actividad de lectina hemoaglutinante de los mismos.
- Determinar el grado de daño celular "*in vivo*" e "*in vitro*" de la lectina aislada.
- Determinar "*in vitro*", la capacidad de la lectina para bloquear la adherencia del VPIB-3 hacia los receptores celulares.

MATERIAL Y METODOS

1.- Selección de Venenos.

De acuerdo con la literatura consultada, de entre los venenos de crotálicos con mayor capacidad hemoaglutinante se seleccionó a los producidos por las serpientes *Crotalus scutulatus*, *Agkistrodon piscivorus* y *Agkistrodon contortix* (Ogilvie y Gartner, 1984). Como control, se empleó el veneno de un saurio del género *Heloderma* (Monstruo de Gila), de escasa o nula actividad hemoaglutinante (todos los venenos fueron adquiridos en el Herpetario de Tepoztlán, Edo. de Morelos).

Se implementó la técnica de hemoaglutinación de acuerdo a la metodología descrita por Ogilvie y Gartner, (1984); Gartner *et al.*, (1980). Los venenos se reconstituyeron en la proporción de 6.25 mg/ml, con solución reguladora de Tyrodes (Anexo 1). Utilizando microplacas de poliestireno de fondo en "V" marca Nunc, con 12 líneas de 8 pozos, se depositaron 50 μ l de solución salina como medio de dilución (Anexo 1). En el primer pozo de cada línea se adicionaron 50 μ l del veneno reconstituido, realizando diluciones dobles desde 1:2 hasta 1:256. Finalmente, se agregaron en todos los pozos 50 μ l de glóbulos rojos de conejo al 2.5%, previamente colectados en tubos "vacutainer" con EDTA o heparina como anticoagulante y lavados por 3 ocasiones por centrifugación a 1,000 rpm, con solución salina. Se incubaron las placas por 20 minutos a temperatura ambiental y la lectura fue por apreciación de la aglutinación. El control negativo consistió en un pozo con 50 μ l de medio de dilución y 50 μ l de glóbulos rojos al 2.5%. Las unidades de aglutinación en la prueba, se definieron como el recíproco a la dilución final en que se manifestó la hemoaglutinación. Por ejemplo, si la muestra aglutina hasta el pozo en que la dilución fue de 1:16, entonces la muestra contendrá 16 unidades hemoaglutinantes.

2.- Determinación del daño celular “in vivo” de los venenos crotálicos.

2.1.- Determinación de la dosis máxima no letal 50%.

Primeramente se determinó la dosis máxima no letal 50% de los venenos de serpiente *Crotalus scutulatus*, *Agkistrodon piscivorus*, *Agkistrodon contortix* y del saurio *Heloderma*, por inoculación de grupos de 2 conejos y/o 10 ratones (con 5 repeticiones), a las concentraciones de 0.5, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 3.0 y 4.0 mg por cada 30 g de peso corporal; diluidos en solución salina estéril (Anexo 1). Los animales fueron observados a intervalos de 24 horas a fin de constatar las muertes ocasionadas (La Granje y Rusell, 1973).

2.2.- Inoculación en ratones con dosis no letal.

Se inocularon ratones con la dosis umbral no letal de 1.75 mg/30 g de peso corporal dada para el veneno de *Crotalus scutulatus*, en grupos de 2 individuos con los venenos de *Crotalus scutulatus*, *Agkistrodon piscivorus* y *Agkistrodon contortix* a nivel del músculo tibial. Como control se emplearon 2 ratones a los que se administró solamente solución salina estéril (con 5 repeticiones). Los animales se sacrificaron a los tiempos de 30 minutos, 1, 3, 6 y 24 horas posteriores a la inoculación (Helater, 2000). Se observó si existía daño a nivel macroscópico y se extrajo el músculo tibial para realizar el estudio histopatológico.

2.3.- Estudio histopatológico.

El estudio histopatológico se hizo a partir de cortes de 3 mm del músculo tibial, teñidos bajo la técnica de Hematoxilina-Eosina (Anexo 1), de acuerdo a la metodología de inclusión en parafina de 20 horas, descrita por Valero y Morales (1988). Las inclusiones en las células de las fibras musculares se observaron posteriormente, con la ayuda de un microscopio óptico, con ocular 10 X y objetivo 20 X.

3.- Determinación del daño celular “in vitro” de los venenos crotálicos.

El daño celular se determinó de acuerdo con la metodología de reducción de placas, empleada para la titulación viral (Jenney *et al.*, 1978). Se desarrollaron cultivos celulares de la línea MDBK “Madin Darby Bovine Kidney” hasta obtener el 100% de confluencia, en microplacas de poliestireno, estériles y fondo plano de 96

pozos, marca Nunc. De los venenos de *Crotalus scutulatus*, *Agkistrodon piscivorus*, *Agkistrodon contortix* y *Heloderma* a una concentración inicial de 6.25 mg/ml de solución salina (Anexo 1), se realizaron diluciones para lograr concentraciones de 3.125, 1.562, 0.781, 0.390, 0.195, 0.097, 0.048, 0.024, 0.012, 0.006, 0.003 y 0.0015 mg/ml, empleando como diluyente medio de cultivo MEM estéril (Anexo 1). Se utilizó una placa para cada uno de los venenos, inoculando 50 μ l por pozo, los 8 pozos de cada línea, con las diferentes concentraciones del veneno. Como control positivo, en otra placa se inoculó una línea, con 50 μ l por pozo de cada uno de los venenos a la concentración inicial. Como control negativo, se depositó medio de cultivo MEM estéril. La incubación fue por 24 horas a 37° y la lectura se realizó en un microscopio invertido marca Zeiss, con objetivo 10X y ocular 8X, por apreciación de la dilución a la cual los monoestratos celulares permanecieran 100% confluentes.

4.- Aislamiento de la fracción con actividad hemoaglutinante del veneno crotálico.

4.1.- Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

De acuerdo a la previa observación de la capacidad tóxica o lítica en condiciones "*in vivo*" e "*in vitro*", así como de las propiedades hemoaglutinantes de los venenos crotálicos, se seleccionó el producido por *Agkistrodon piscivorus* para el aislamiento de la fracción proteica con actividad hemoaglutinante. Para ello, se empleó el proceso de cromatografía líquida de alto rendimiento, en fase reversa (HPLC-RP) (VYDAC, 1995; Mancin *et al.*, 1998). En el equipo de cromatografía marca Beckman, se montó una columna de gel de sílice C₁₈ (5 μ , 4.6 X 2.50 mm) y un inyector de 50 μ l. El veneno se diluyó a una proporción de 10 mg/ml de agua grado HPLC y se pasó por filtración en una membrana Millipore de nylon de 0.22 μ m de porosidad. Para la solubilización y separación de los polipéptidos, se empleó ácido trifluoroacético al 0.1% (Sigma) (solvente A) (Anexo1). Y como modificador orgánico para el desprendimiento de los polipéptidos de la superficie hidrofílica y su solubilización, se empleó acetonitrilo (Sigma) (solvente B) (Anexo

1), ambos fueron previamente desgasificados por una fuente de vacío y agitación, con filtro Millipore tipo Durapore GV de 0.22 μm . El gradiente de elusión fue a una proporción inicial de 30% del solvente B sobre el solvente A, hasta alcanzar un 100% del solvente B, a un tiempo de 10 minutos, con un rango de flujo de 1ml/minuto. El veneno se inyectó en la columna en dosis de 50 μl y la absorbancia fue medida a una longitud de onda de 280 nm.

4.2.- Evaluación de la actividad biológica de la fracción aislada.

Se colectaron las proteínas y polipéptidos correspondientes a cada uno de los picos manifestados en el análisis cromatográfico. Se concentraron por liofilización (Manual de congelación en seco HETOSICC). Posteriormente, se resuspendieron en un volumen de 50 μl de solución salina (Anexo 1). Para la identificación de la fracción, cada proteína o polipéptido aislado fue evaluado en su actividad biológica mediante la prueba de hemoaglutinación descrita por Ogilvie y Gartner, (1984); Gartner *et al.*, (1980).

5.- Determinación del daño celular “*in vivo*” producido por la fracción aislada.

La fracción aislada se diluyó a una concentración de 4.25 μg por cada 0.2 ml de solución salina (Anexo 1). Se inocularon 2 ratones en dosis de 0.2 ml a nivel del músculo tibial. Como control negativo, se inyectó a un ratón con solución salina en la misma dosis. Como control positivo, se inoculó un ratón en dosis de 1.75 mg por cada 30 g de peso corporal, con veneno completo de *A. piscivorus* (Helater, 2000). Se sacrificaron una hora después y se observó la presencia de lesiones macroscópicas (con 5 repeticiones). Posteriormente, se extrajo el músculo tibial para el estudio histopatológico, de acuerdo a la metodología de inclusión en parafina de 20 horas, descrita por Valero y Morales (1988).

6.- Determinación del daño celular “*in vitro*” producido por la fracción aislada.

Se determinó la sensibilidad celular hacia la fracción hemoaglutinante de *A piscivorus* mediante un proceso colorimétrico, basado en la reducción del tetrazolium (MTT) (3-[4, 5-Dimethyl-thiazol-2-Yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide), en un producto azul formazán por la dehidrogenasa mitocondrial de las células viables, de acuerdo a la metodología descrita por Hayes *et al.*, (1994); Martikainen *et al.*, (1993).

Se realizaron diluciones de la fracción para obtener concentraciones de 8.5, 4.25, 2.125, 1.062, 0.531, 0.265, 0.132 y 0.066 µg/ml en solución salina estéril (Anexo 1). Se desarrollaron cultivos celulares MDBK hasta el 100% de confluencia en 24 horas, en una microplaca marca Nunc de 96 pozos de fondo plano. Se depositaron 50 µl de cada una de las diferentes concentraciones de la fracción en los 8 pozos de cada línea, dejando una como control, con sólo medio de cultivo MEM (Anexo 1), incubándose a 37° por 24 horas. A cada uno de los pozos se les adicionaron 20 µl de MTT diluido en PBS (Anexo 1) y se incubó a 37° por 4 horas. Posteriormente, la placa se solubilizó empleando 50 µl por pozo de SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) al 15% (Anexo 1), con incubación por toda la noche a temperatura ambiental en la oscuridad. La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 492 nm en un lector de ELISA (BDSL, Immunoskan Plus) y los resultados se interpretaron estadísticamente mediante análisis de variancia (Wayne, 1989).

7.- Determinación del efecto “*in vitro*” del Virus de la Parainfluenza-3.

7.1.- Viabilidad celular.

Siguiendo la metodología de tinción con MTT descrita precedentemente, se determinó la viabilidad celular después de la inoculación con el VPIB-3, donado amablemente por el Dr. Alvaro Aguilar, UIM del IMSS. Para ello se realizaron diluciones decimales del VPIB-3 de 10^{-1} a 10^{-8} en medio de cultivo MEM (Anexo 1). Monoestratos celulares MDBK 100% confluentes, desarrollados en 24 horas en

placas planas Nunc de 96 pozos, se inocularon con 50 μ l por pozo/por línea, con cada una de las diluciones virales. Como control negativo, en una línea se depositó solo medio de cultivo MEM estéril. La incubación fue por 48 horas a 37°. La interpretación fue por análisis de variancia (Wayne, 1989).

7.2.- Titulación.

De acuerdo a la metodología de titulación por reducción de placas (Jenney *et al.*, 1978), en microplacas Nunc de 96 pozos con cultivos MDBK 100% confluentes, se depositaron 50 μ l/pozo/línea, con cada una de las diluciones decimales del virus de VPIB-3 de 10^{-1} a 10^{-8} , la incubación fue por 48 horas a 37°, la lectura fue por apreciación del efecto citopático en un microscopio invertido marca Zeiss con objetivo 10X y ocular 8X, y la determinación del título viral por la técnica de Reed and Muench (OMS, 1975) (con 5 repeticiones).

8.- Determinación “*in vitro*” de la capacidad de la fracción hemoaglutinante para bloquear la adherencia del virus de la Parainfluenza-3.

Una vez estandarizado el daño celular causado tanto por la fracción aislada como por el VPIB-3, se realizaron las pruebas de bloqueo de la adherencia viral. Nuevamente se determinó la viabilidad celular por tinción con MTT de acuerdo a la metodología descrita precedentemente. Para ello, los monoestratos celulares MDBK desarrollados en 8 líneas de una microplaca Nunc de 96 pozos, se inocularon con 50 μ l de la fracción hemoaglutinante en concentración de 1.062 μ g/ml. Una hora después, se inocularon 2 líneas con 50 μ l/pozo, con cada una de las diluciones desde 10^{-3} a 10^{-6} del VPIB-3. Se emplearon 2 líneas como control negativo, en las que se depositó sólo medio de cultivo MEM (Anexo1); 1 línea como control positivo del VPIB-3 a la dilución 10^{-2} ; y 1 línea como control positivo de la fracción hemoaglutinante en concentración de 4.25 μ g/ml. Se incubaron por 48 horas a 37°. La interpretación fue por análisis de variancia (Wayne, 1989).

9.- Determinación “*in vitro*” de la capacidad de la fracción hemoaglutinante del veneno crotálico para unirse a las proteínas del virus de la Parainfluenza-3 y evitar la infección viral.

9.1.- Microscopía electrónica.

Se procedió de acuerdo a la metodología de preparación de muestras para microscopía electrónica descrita por Dawes (1973). Dos mililitros de suspensión del VPIB-3 con un título viral de $10^{5.6}$ DICC_{50%} (dosis infectantes en cultivos celulares _{50%}) fueron clarificados por centrifugación a 1000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se pasó por filtración con membrana de nitrocelulosa Millipore de $0.45 \mu\text{m}$ de porosidad. La suspensión viral se dividió en dos partes iguales, la primera se preparó para microscopía electrónica y se empleó para la diferenciación óptica de la estructura del VPIB-3 y la segunda se mezcló en proporción 1:1 con la fracción hemoaglutinante previamente diluida a una concentración de $1.062 \mu\text{g/ml}$. La mezcla se incubó durante 1 hora a 37° . El VPIB-3 y la mezcla VPIB-3/fracción hemoaglutinante se centrifugaron a 13,000 rpm, por 30 minutos, en centrifuga refrigerada. Los botones obtenidos se prepararon para la apreciación de las partículas virales por microscopía electrónica. Para ello, fueron fijados con glutaraldehído al 10% (Anexo 1) y para la tinción negativa se empleó el ácido fosfotúngstico al 2% (Anexo 1). La observación al microscopio electrónico de transmisión marca Jeol, fue a 25 000 aumentos (25 000 X).

9.2.- Determinación de la actividad viral posterior a la incubación con la fracción hemoaglutinante.

Por otra parte, el fluido cosechado tras la última centrifugación de la mezcla VPIB-3/fracción hemoaglutinante, fue evaluado en cuanto a su capacidad de conservar la actividad viral. Para ello, se realizó la titulación mediante la técnica de reducción de placas descrita por Jenney *et al.*, (1978). Se realizaron diluciones decimales del fluido VPIB-3/fracción hemoaglutinante desde 10^{-1} a 10^{-8} . Se desarrollaron cultivos celulares MDBK en microplaca Nunc de 96 pozos hasta el 100% de confluencia. Ocho pozos fueron inoculados con $50 \mu\text{l}$ de cada dilución de

la mezcla VPIB-3/fracción hemoaglutinante. Como control negativo, se dejaron dos líneas de pozos con medio de cultivo MEM (Anexo 1). Como control positivo, una línea de pozos se inoculó con el VPIB-3 en dilución 10^{-2} y una línea con la fracción hemoaglutinante en concentración de 2.125 $\mu\text{g/ml}$. La placa se incubó a 37° por 48 horas. La lectura fue por apreciación del efecto citopático en un microscopio invertido marca Zeiss con objetivo 10X y ocular 8X, y la determinación del título viral por la técnica de Reed and Muench (OMS, 1975).

10.- Comprobación del reconocimiento de las proteínas virales y la fracción hemoaglutinante crotálica por sueros anticrotálicos.

Con la finalidad de determinar si las fracciones crotálicas y las proteínas del VPIB-3, poseían cierta afinidad o identidad, se planteó una forma de reconocimiento de ambas, a través de anticuerpos específicos dirigidos contra el veneno crotálico, para lo cual se obtuvo un suero policlonal hiperinmune. Posteriormente, se recurrió al proceso de separación electroforética y electrotransferencia de las proteínas estructurales del VPIB-3, de las proteínas y polipéptidos del veneno, así como de la fracción hemoaglutinante aislada, para ser sometidas a pruebas de "western blot" e identificar la fracción viral y/o crotálica en la que ocurrió la unión o reconocimiento de los anticuerpos anticrotálicos. Bajo este mismo procedimiento, se determinó la pureza de la cepa del VPIB-3, para lo cual previamente se realizó la extracción de membrana celular de la línea MDBK en que fue replicado el virus, con objeto de descartar a través del "western blot", la posible unión de los anticuerpos anticrotálicos hacia receptores ácido siálico celulares.

10.1.- Obtención del suero hiperinmune.

Con la dosis de 1.75 mg por cada 30 g de peso corporal de los venenos de *A. piscivorus* y *A. contortix*, diluidos en 0.5 ml de solución salina estéril y adicionados en una proporción 1:1 con adyuvante completo de Freud, se inocularon grupos de 2 conejos para la obtención del suero hiperinmune. Se inició con la aplicación de 2 estímulos a intervalos de 7 días, seguido de un tercero con

incremento de la dosis a 2.0 mg a intervalo de 7 días y dos últimos en dosis de 4.0 mg por cada 30 g de peso corporal, a intervalos de 14 días. Se colectaron sueros a partir del segundo estímulo y hasta los 28 días después de la última aplicación, mezclando los sueros homólogos.

10.2.- Determinación del nivel de anticuerpos mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación.

Se determinaron los niveles de anticuerpos alcanzados, por la técnica de inhibición de la hemoaglutinación en placa, de acuerdo con la metodología descrita por Barret e Inglis (1991). Los venenos de *A piscivorus* y *A contortix* se reconstituyeron en la proporción de 6.25 mg/ml con solución reguladora de Tyrodes (Anexo 1). En microplacas Nunc de fondo en "V" (12 líneas de 8 pozos) se depositaron 50 μ l de solución salina como medio de dilución (Anexo 1). En el primer pozo de cada línea se adicionaron 50 μ l de suero anti-*A piscivorus* y/o anti-*A contortix*, realizando diluciones dobles desde 1:2 hasta 1:256. En los pozos correspondientes, se adicionaron 50 μ l de los venenos homólogos reconstituidos. Finalmente, en todos los pozos se depositaron 50 μ l de glóbulos rojos de conejo al 2.5%.

Para determinar la identidad entre las fracciones hemoaglutinantes de ambos venenos, se realizó el mismo procedimiento, permitiendo que reaccionaran los sueros en pruebas cruzadas con los venenos, en forma homóloga y heteróloga. Se incubaron las placas por 20 minutos a la temperatura del medio ambiente y la lectura fue hecha por apreciación de la inhibición de la hemoaglutinación. El control negativo consistió en un pozo con 50 μ l del medio de dilución y 50 μ l de glóbulos rojos al 2.5%. El control positivo consistió en 50 μ l del medio de dilución, 50 μ l de veneno *A piscivorus* y/o *A contortix*, reconstituidos a la proporción de 6.25 mg/ml con solución reguladora de Tyrodes y 50 μ l de glóbulos rojos de conejo al 2.5%.

10.3.- Extracción de la membrana celular.

De acuerdo a la metodología descrita por Schwimmbeck *et al*, (1990), se desarrollaron monoestratos celulares MDBK hasta el 100% de confluencia en 24

horas. Los cultivos se lavaron con PBS (Anexo 1), se desprendieron por raspado, se disgregaron pasándolos a través de una jeringa y se resuspendieron en PBS estéril a una concentración celular de 1×10^8 /ml. El paquete celular se clarificó por 3 ocasiones mediante el cambio del PBS y centrifugación a 1,000 rpm por 10 minutos. El rompimiento celular fue por 9 ciclos de 15 segundos de sonicación con 15 segundos de descanso, en un sonicador marca Ultrasonic Processor, a una frecuencia de 15 micrones de amplitud. Para la colección de la membrana celular la suspensión se sometió a ultracentrifugación a 10 000 X g, por 1 hora, en centrífuga refrigerada, desechando el sobrenadante con los detritos celulares, mientras que el botón (membrana celular) se resuspendió en PBS y almacenó en congelación a -70° hasta su uso.

10.4.- Concentración de virus de la Parainfluenza-3.

En monoestratos celulares MDBK 100% confluentes, se replicó el VPIB-3 con título viral de $10^{5.7}$ DICC_{50%}. Se incubó a 37° por 48 horas, tiempo en el que se presentó el efecto citopático. La liberación viral fue por congelación a -70° y descongelación por 3 ocasiones y se clarificó de detritos celulares por centrifugación a 1,000 rpm. La suspensión viral se concentró por ultracentrifugación a 10 000 X g, por 1 hora, en centrífuga refrigerada. El botón se resuspendió en solución salina estéril y se congeló a -70° hasta su uso.

10.5.- Electroforesis y electrotransferencia.

Se empleó el proceso de electroforesis de proteínas estructurales en gel de poliacrilamida, para la tinción y determinación de los pesos moleculares de los componentes protéicos del veneno *A piscivorus* e identificación de la fracción hemoaglutinante aislada, y otro para la electrotransferencia y las pruebas de "western blot". Para ello, el veneno fue diluido a una concentración de 1.56 mg contenidos en 10 μ l de "solución de muestra"; la fracción hemoaglutinante a una concentración de 4.25 y 2.125 μ g/ml; los extractos de membrana celular en diluciones de 1:8 y 1:16; y la suspensión del VPIB-3 en diluciones de 1:4, 1:8 y 1:16, contenidos en 10 μ l de "solución de muestra" (Anexo 1) y desnaturalizadas por ebullición durante 5 minutos. El gel separador se elaboró al 12% y el

introducción al 3% (Anexo 1). Se empleó como control un marcador de pesos moleculares BIO-RAD de amplio rango, que va desde los 201 a los 6.600 kDa. El corrimiento se realizó a 15 mA por 10 minutos y a 50 mA por 45 minutos con la "solución de corrimiento" (Anexo 1). La tinción de uno de los geles fue con azul de Coomassie al 1% por 1 hora y la decoloración con ácido acético al 5% por 24 horas (Manual de Prácticas de Laboratorio de Virología, 1989; BIO-RAD, "Instruction manual"; Schwimmbeck *et al.*, 1990). Los pesos moleculares se determinaron por regresión lineal, mediante un analizador de imágenes, con el programa Quantity One (BIO-RAD).

Para la electrotransferencia se empleó una membrana BIO-RAD de nitrocelulosa de 0.2 μm de porosidad. El sándwich elaborado con el papel de nitrocelulosa, el gel de acrilamida, papel filtro, esponja y rejillas negra (polo negativo) y blanca (polo positivo), se corrió con la "solución de transferencia" (Anexo 1) y un refrigerante a 100 V por 1 hora (Schwimmbeck *et al.*, 1990; BIO-RAD, "Instruction manual")

10.6.- Pruebas de "Western blot".

Para evitar la unión inespecífica, la membrana de nitrocelulosa se incubó con solución bloqueadora (Anexo 1) por toda la noche. El lavado de la membrana fue por 6 ocasiones, en tiempos de 10 minutos, con la solución de lavado (Anexo 1) en agitación. El suero hiperinmune de *A piscivorus* se diluyó en proporción 1:40 con solución de lavado y se incubó en agitación con la membrana, a 37°, por 2 horas. Después de lo cual, se realizó un nuevo lavado en las mismas condiciones. Se diluyeron las inmunoglobulinas anti-conejo binotiladas (anti-IgG) (marca Dako) en una proporción de 1:2,000 con solución de lavado, y se incubó por 1 hora, en agitación a 37°, seguido de un tercer lavado en las mismas condiciones. El conjugado de avidin-peroxidasa (marca Dako) se diluyó a una proporción de 1:6,000 con solución de lavado, y se incubó en agitación con la membrana a 37°, por 2 horas, seguido de un cuarto lavado. Se adicionó el cromógeno de diaminobenzidina (BIO-RAD) (Anexo 1) y se incubó por 10 minutos a 37° en

agitación. La reacción se paró por lavado con agua destilada y se dejó secar la membrana a temperatura ambiente (Schwimmbeck *et al.*, 1990).

RESULTADOS

1.- Selección de venenos.

En la selección de venenos de acuerdo a su capacidad hemoaglutinante, se obtuvo una respuesta para el veneno de *Crotalus scutulatus* con 2 unidades hemoaglutinantes. Con respecto a *Agkistrodon piscivorus*, hubo respuesta hasta las 64 unidades hemoaglutinantes. Mientras que con *Agkistrodon contortix* se observó esta capacidad entre las 16 y 32 unidades hemoaglutinantes. Por otro lado, el veneno del saurio *Heloderma* no mostró ningún efecto aglutinante (Figura 1 y Cuadro 1).

2.- Daño “in vivo” de los venenos crotálicos.

2.1.- Dosis máxima no letal 50%.

En la determinación del daño “in vivo” causado por los venenos seleccionados, se observó que los venenos de los crotálicos *A piscivorus* y *A contortix*, así como el del no crotálico *Heloderma*, no causaron la muerte de ratones ni conejos, aún a la dosis de 4.0 mg por cada 30 g de peso corporal. Sólo se apreció ligera cojera y tumefacción en el área de aplicación del inóculo. Sin embargo, con el veneno de baja actividad hemoaglutinante *C scutulatus* se encontró que la dosis máxima no letal, tanto para conejo como para ratón, fue de 1.75 mg por cada 30 g de peso corporal; y que a dosis superiores, causaba la muerte, en un máximo de 24 horas (Cuadro 1).

2.2.- Daño de tejidos.

El factor tiempo no influyó para la apreciación del daño a nivel macroscópico en los tejidos del músculo tibial, pues en los casos en que si hubo daño, las lesiones fueron muy similares a los diferentes tiempos de observación de 30 minutos, 1, 3, 6 y 24 horas posteriores al sacrificio. En los ratones control y en los inoculados con dosis de 1.75 mg/30 g de peso corporal con el veneno de *C scutulatus*, no se apreció daño a nivel del músculo tibial; mientras que los inoculados con la misma dosis de los venenos de *A piscivorus* y *A contortix*, mostraron un daño local y extensivo, con edema masivo e infiltración en los tejidos con la sangre extravasada de los vasos sanguíneos (Figura 2 y Cuadro 1).

2.3.- Estudio histopatológico.

En el corte del músculo tibial de los ratones controles negativos, inoculados con solución salina estéril, el tejido del área inoculada mostró una estructura intacta. En el corte correspondiente a la inoculación con *A contortix*, se diagnosticó una miositis aguda multifocal severa, en la que se apreció abundante infiltrado basófilo, así como la presencia de eritrocitos fuera de los vasos sanguíneos, sobre las fibras musculares y entre los fascículos. En algunas zonas se apreció degeneración de Zenker, en donde el sarcoplasma, adquirió aspecto de "vidrio esmerilado" por la precipitación de proteínas citoplasmáticas, con pérdida de la estriación, núcleos en picnosis, cariorexis y cariólisis, así como pérdida del detalle celular y del contenido plasmático.

En el corte correspondiente a la inoculación con *A piscivorus*, se diagnosticó una miositis aguda difusa severa, en la que el tejido presentó abundante infiltrado basófilo, así como marcados cambios vasculares, tales como congestión y hemorragia. Se observaron zonas multifocales con fascículos musculares que presentaron pérdida total del detalle celular y ausencia de núcleos, así como abundante precipitación proteica del sarcoplasma, dando el aspecto de "vidrio esmerilado".

En el corte correspondiente a *C scutulatus*, se diagnosticó una miositis multifocal aguda leve, en la que se apreció un infiltrado discreto en la periferia del corte, correspondiente a macrófagos y unos pocos neutrófilos, además de algunos vasos sanguíneos con congestión. En zonas multifocales en las que las células pierden el detalle celular, hubo ausencia de núcleos y pérdida de la estriación (Figuras 3 a 6 y Cuadro 1).

3.- Daño producido "in vitro" por los venenos de crotálicos.

En la determinación del daño "in vitro" causado por los venenos seleccionados, se observó que el veneno de *A piscivorus*, desde la concentración de 3.125 hasta 0.097 mg/ml, causaba el desprendimiento total de la monocapa celular con una franca aglutinación (Figura 7). Y que el efecto decrecía paulatinamente hasta la aplicación de la concentración de 0.006 mg/ml, en donde

aún se observó una aglutinación menor y agrupamiento celular (Figura 8). Mientras que a partir de la concentración de 0.003 mg/ml los monoestratos fueron 100% confluentes.

Con el veneno de *A contortix*, se apreció el mismo efecto de aglutinación severa hasta la concentración de 0.195 mg/ml, ligera aglutinación y agrupamiento celular hasta los 0.012 mg/ml y 100% de confluencia celular a partir de la aplicación de 0.006 mg/ml.

Con el veneno *C scutulatus*, se detectó el efecto de aglutinación y agrupamiento celular hasta la concentración de 0.390 mg/ml, y confluencia celular a partir de la concentración de 0.195 mg/ml.

Los cultivos inoculados aún con la más alta concentración de 3.125 mg/ml de *Heloderma*, así como los cultivos control negativos, permanecieron 100% confluentes (Figura 9 y Cuadro 1).

4.- Aislamiento de la fracción con actividad hemoaglutinante a partir del veneno crotálico.

4.1.- Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

En el proceso cromatográfico para el aislamiento de la fracción con actividad hemoaglutinante, *A piscivorus* manifestó poseer 15 diferentes fracciones, las cuales migraron a tiempos de elusión de 1.1, 1.39, 1.83, 2.11, 2.48, 2.72, 2.99, 3.62, 4.23, 4.92, 5.44, 6.04, 6.79, 7.32 y 8.28 minutos. Correspondientes a los picos 1 a 15 respectivamente, siendo el doceavo pico, con tiempo de elusión de 6.04 minutos, el de la actividad biológica. Del área total de picos (510.15652), al pico 12 le correspondió un área de 98.75763 (19.358%). Mientras que de la altitud total de picos (1.42530), el 12 tuvo una elevación de 0.15457 (10.845%) (Gráfica 1). Se colectó la lectina a la proporción de 17 µg/ml, por cada 10 mg de veneno completo sometido al proceso cromatográfico.

4.2.- Actividad biológica de la fracción aislada.

En las pruebas de actividad biológica, de los 15 polipéptidos y proteínas colectados, sólo una, la correspondiente al pico 12 y tiempo de elusión de 6.04

minutos, manifestó la actividad al aglutinar claramente a los glóbulos rojos de conejo hasta una dilución de 1:64, correspondiente a 64 unidades hemoaglutinantes. Las proteínas y polipéptidos restantes mostraron una clara precipitación; al igual que el control negativo, consistente sólo de solución salina y glóbulos rojos. El control positivo, conformado por veneno de *A piscivorus* completo (con todos sus componentes protéicos y polipeptídicos), mostró una marcada aglutinación (Figura 10).

5.- Daño “*in vivo*” producido por la fracción aislada.

Durante la evaluación del daño “*in vivo*” que pudiera causar la fracción aislada, los músculos tibiales del ratón control negativo, al que se administró 0.2 ml de solución salina estéril, así como los inoculados con la fracción de *A piscivorus*, en dosis de 4.25 µg/30 g de peso corporal, se apreciaron sin daño en los tejidos a nivel macroscópico (Figura 11). Lo cual quedó confirmado en la histopatología, en donde los cortes no mostraron cambios patológicos aparentes (Figuras 12 y 13). Contrastando con ellos, en el músculo del ratón control positivo, inoculado con veneno de *A piscivorus* completo (con todos sus componentes protéicos y polipeptídicos), a nivel macroscópico se apreció daño local y extensivo, con edema e infiltración sanguínea (Figuras 2 y 11) y al corte histopatológico nuevamente se diagnosticó miositis aguda difusa severa (Figura 4)

6.- Daño “*in vitro*” producido por la fracción aislada.

En la determinación del daño “*in vitro*”, de acuerdo a la reducción o mantenimiento del metabolismo celular, posterior a la infección con la fracción hemoaglutinante de *A piscivorus*, y considerando un metabolismo al 100% dado por las células control (sembradas con sólo medio de cultivo MEM), se encontraron porcentajes de viabilidad de 36.64, 67.03, 95.81, 99.03, 100.64, 105.27, 106.68 y 108.49%, para las monocapas celulares que recibieron las concentraciones de la fracción hemoaglutinante que fueron de 8.5, 4.25, 2.125, 1.062, 0.531, 0.265, 0.132 y 0.066 µg/ml, respectivamente. Se apreció que a partir

de las concentraciones de 1.062 y 0.531 $\mu\text{g/ml}$, el metabolismo se regularizó. Al hacer la evaluación estadística de las concentraciones de la fracción que afectan la viabilidad, se encontró que la variancia para las concentraciones de 8.5 y 4.25 $\mu\text{g/ml}$ fue de 0.0389 y 0.0095 respectivamente, mientras que para las concentraciones restantes no hubo variancia estadísticamente significativa (Gráfica 2).

7.- Daño “*in vitro*” producido por el virus de Parainfluenza-3.

La viabilidad celular determinada por la disminución del metabolismo posterior a la inoculación de monocapas celulares con las diluciones del VPIB-3, desde 10^{-1} hasta 10^{-6} , mostró porcentajes de viabilidad de 58.37, 64.21, 74.07, 79.10, 93.59, 104.26, 104.46 y 106.88%, respectivamente. Se detectó que el nivel de metabolismo a la dilución 10^{-5} está muy cercano al 100%, mientras que en las diluciones mayores, básicamente el virus no afecta la viabilidad celular. Al análisis estadístico, la variancia para las diluciones 10^{-1} a 10^{-5} fueron de 0.0146, 0.0115, 0.0063, 0.0048 y 0.006 respectivamente. A las diluciones restantes no hubo variancia significativa (Gráfica 3). Lo anterior fue confirmado mediante la titulación viral por reducción de placas e interpretado por la técnica de Reed and Muench, la cual se mantuvo al nivel inicial que fue de $10^{5.6}$ DICC_{50%}.

8.- Capacidad de la fracción hemoaglutinante para bloquear la adherencia del VPIB-3.

En las pruebas empleadas para evaluar la capacidad de bloquear o inhibir la unión del VPIB-3 a los receptores celulares, la medición del metabolismo celular en el control positivo de VPIB-3 en concentración 10^{-2} , fue de un porcentaje de viabilidad de 68.78%, mientras que para el control positivo de fracción hemoaglutinante en concentración de 4.25 $\mu\text{g/ml}$ fue de 58.69%. Los porcentajes de viabilidad en el bloqueo viral, con la fracción en una concentración constante de 1.062 $\mu\text{g/ml}$ y el virus a las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , fueron de 69.34, 72.71, 80.93 y 84.86%, respectivamente. Al análisis estadístico, la variancia dio valores

de 0.0126, 0.0123, 0.0072 y 0.0055 para las diluciones 10^{-3} a 10^{-6} , respectivamente (Gráfica 4).

9.- Capacidad de unión de la fracción hemoaglutinante crotálica hacia las proteínas del VPIB-3 y evasión de la infección viral.

9.1.- Microscopía electrónica.

En las pruebas de microscopía electrónica, realizadas para determinar si la fracción hemoaglutinante pudiese reconocer los carbohidratos presentes en las hemoaglutininas virales, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 14. En ella se observan dos restos "fantasmas" de partículas virales, con su interior vacío (de color claro) y delimitadas por restos de la estructura viral original. En todo el campo visual se aprecian restos de diversos tamaños de la estructura viral y la presencia de residuos, detectados mediante la microscopía electrónica a 25,000 aumentos.

En la Figura 15 se muestra la tinción negativa del VPIB-3 sin tratamiento a 30,000 aumentos. Se observa una partícula viral completa, con un campo visual limpio y libre de restos virales o celulares. En ella se aprecia la membrana de cubierta íntegra en color gris tenue, rodeando a su nucleocápside en forma de hueso de arenque. Al centro de la nucleocápside, aparentemente se observa su ácido nucleico íntegro.

9.2.- Actividad viral posterior a la exposición con la fracción hemoaglutinante.

La viabilidad viral de la cepa del VPIB-3 posterior a su incubación con la fracción hemoaglutinante aislada de *A piscivorus* se vio seriamente afectada, con una reducción del título de $10^{5.6}$ DICC_{50%} a $10^{2.0}$ DICC_{50%}.

10.- Reconocimiento de las proteínas virales y la fracción hemoaglutinante crotálica por sueros anticrotálicos.

10.1.- Obtención de suero hiperinmune.

Se colectaron de 10 a 20 ml de suero hiperinmune, contra los venenos crotálicos de *A piscivorus* y *A contortix*, respectivamente. Ambos mostraron una

capacidad para inhibir la hemoaglutinación hasta la dilución de 1:64, correspondiente a 64 unidades inhibitorias de la hemoaglutinación, al reaccionar con los venenos homólogos. Por otra parte, se mostró la existencia de una reacción cruzada, al mismo nivel de unidades inhibitorias de la hemoaglutinación, al reaccionar los sueros y venenos en forma heteróloga.

10.2.- Determinación de pesos moleculares.

Al analizar el veneno de *A piscivorus* completo (con todos sus componentes protéicos y polipeptídicos), en la electroforesis de proteínas estructurales, se detectaron con mayor y/o menor nitidez la presencia de 8 bandas de proteína, de aproximadamente 92.57, 59.19, 46.10, 42.30, 35.57, 32.68, 26.38 y 20.99 kDa (Figura 16).

10.3.- “Western blot”.

En las pruebas de identidad, entre la fracción hemoaglutinante aislada del veneno de *A piscivorus* y las proteínas estructurales del VPIB-3, se detectó mediante la utilización del suero hiperinmune de conejo anti-*A piscivorus*, una fuerte tinción en las bandas protéicas correspondientes a los 20.99 kDa, en la fracción hemoaglutinante aislada a las concentraciones de 4.25 y 2.125 µg/ml. Así como bandas protéicas del mismo peso molecular, en el VPIB-3, a las diluciones de 1:4 y 1:8. Dicha proteína no se detectó a la dilución 1:16 de la cepa viral, y no estuvo presente en los extractos de la membrana celular. Por otro lado, se detectó, el reconocimiento de ciertas bandas de identidad de proteína entre el VPIB-3 y los extractos de membrana de las células MDBK, en la que fue replicado el virus. Así como una posible identidad entre los anticuerpos anti-*A piscivorus* hacia varios componentes proteicos de la membrana celular (Figura 17).

DISCUSIÓN

Se realizó el presente trabajo, con la finalidad de emplear la fracción hemoaglutinante del veneno crotálico (lectina) como un agente antiviral, la cual podría actuar como un inhibidor de la adherencia, al bloquear a los receptores ácido siálico celulares y/o unirse a los carbohidratos de la hemoaglutinina del VPIB-3. Evaluando e identificando al mismo tiempo, los posibles beneficios y/o daños que pudiera llegar a causar "*in vivo*" como "*in vitro*", el empleo del veneno crotálico completo (con todos sus componentes polipeptídicos y protéicos) y/o la fracción hemoaglutinante purificada.

La capacidad hemoaglutinante de los venenos crotálicos seleccionados, no fue similar a lo reportado por otros autores. Mientras que Ogilvie y Gartner (1984), empleando glóbulos rojos de conejo, informan de capacidades hemoaglutinantes de 16, >1024 y +/- 2 unidades para los venenos de *A piscivorus*, *A contortix* y *C scutulatus*, respectivamente, en el presente trabajo se obtuvieron 64, 32 y 2 unidades para cada uno de los venenos, respectivamente. Sin embargo, la disparidad encontrada no es de extrañarse, ya que la actividad biológica de los venenos, aún colectados de un mismo individuo puede variar (Jhonson *et al.*, 1987), de acuerdo a factores como la coloración del veneno, dada por el tipo de glándula secretoria (Dos Santos *et al.*, 1993); la edad, ya que en algunos casos, como sucede con la víbora de cascabel, el veneno de las crías es más potente que el de las adultas (Brown, 1997); la frecuencia de colección y la preparación del veneno, lo cual incluye la forma en que es colectado, procesado, almacenado y diluido (Clinical Toxicology Web Site, 2001). En el presente trabajo, debido a que los venenos fueron comprados en forma ya procesada por el herpetario de Tepoztlán, se desconoce el proceso de colección y procesamiento de los mismos.

Las observaciones anteriores también justifican los resultados obtenidos en la determinación de la dosis máxima no letal ^{50%}. Mientras que algunos autores, reportan dosis letales ^{50%} para los venenos de las serpientes *A piscivorus*, *A contortix* y *C scutulatus* de 25.8, 25.6 y 18.5 mg/Kg (Grieg, 2001), en el desarrollo del presente trabajo se encontró que los dos primeros venenos, aún a la dosis de

4 mg/30g de peso corporal (133 mg/Kg), no resultaban mortales para conejos ni ratones, y para que *C scutulatus* fuera mortal, se necesitaron dosis superiores a los 1.75 mg/30g (58.3 mg/Kg), causando la muerte en un máximo de 24 horas. La variabilidad entre lo reportado y los resultados obtenidos, también puede ser adjudicado a factores como la vía de inoculación, ya que de acuerdo con Dos Santos *et al.*, (1993), la vía intraperitoneal aparentemente es más efectiva que la intramuscular. Debido a que la mayoría de los trabajos publicados apoyan sus determinaciones de dosis letal $_{50\%}$ en ratón por vía intramuscular, en el presente trabajo se seleccionó esta última vía.

Los daños "*in vivo*" con el veneno completo a nivel macroscópico, concuerdan con lo publicado por Grieg (2001), al encontrar que tanto *A contortix* como *A piscivorus* no representan una amenaza, debido a que sus componentes protéicos con acciones coagulantes "bilineobin", hemorrágicas "bilitoxin" y "HT-1" y mionecróticas "Fosfolipasa A₂", no obstante que causaron daños dramáticos locales, tales como edema masivo y extravasación sanguínea, no fueron fatales. Estos efectos fueron confirmados en el estudio histopatológico, al observar la presencia de eritrocitos fuera de los vasos sanguíneos, congestión, infiltración de basófilos, fascículos musculares con pérdida del detalle celular y ausencia de núcleos, finalizando con necrosis. Mientras que con *C scutulatus*, sólo se encontró a nivel local, la presencia de un infiltrado de macrófagos y unos pocos neutrófilos. En este último caso, tomando en cuenta las observaciones hechas por Grieg (2001), se esperaba que no existiera daño local, ya que de acuerdo con el autor, *Crotalus scutulatus* al igual que *Crotalus durrisus* no causan signos o síntomas localizados, siendo su principal peligro el ejecutado por sus proteínas neurotóxicas, las cuales causan ceguera, parálisis y finalmente la muerte por insuficiencia respiratoria. Igualmente, Rosenfeld (1971) y Amaral *et al.*, (1991), aseguran que en el envenenamiento por *Crotalus durrisus*, el efecto local es mínimo o ausente. Sin embargo, este tema resulta ser controversial, ya que autores como Dos Santos *et al.*, (1993), al evaluar la diferencia en daño al tejido muscular en ratón, con veneno amarillo y blanco de *Crotalus durrisus*, menciona similitudes con los daños obtenidos en el presente trabajo con los venenos de A

piscivorus y *A contortix*, describiendo músculos en congestión, edema, exudado de granulocitos y neutrófilos y miocitólisis, además de una mayor actividad caseinolítica y hemorrágica con el veneno amarillo al compararlo con el blanco.

En un estudio de evaluación del daño "*in vitro*" por componentes protéicos de veneno de cobra, Martikainen *et al*, (1993), al inocular células MCF-7 (células de tumor mamario humano) con fosfolipasa A₂ de veneno de *Naja mosambique*, encontró un efecto tóxico aún a concentraciones de 4.5 U/ml, en donde apreció cambios morfológicos consistentes en redondeo celular, seguido de desprendimiento y agrupamiento de 10 a 20 células, hasta que el número total decreció de 9.8 a 6.7 X 10⁵ células y la viabilidad decreció hasta un 33%. Un efecto similar se encontró en el presente trabajo, al inocular células MDBK con veneno completo de *A piscivorus*, *A contortix* y *C scutulatus* a las concentraciones de 0.006, 0.012 y 0.390 mg/ml respectivamente, en donde los daños fueron desde el desprendimiento total de la monocapa celular, hasta efectos de redondeo, aglutinación y agrupamiento celular. Según Cotter *et al.*, (1990), el efecto de redondeo celular, debido a la fosfolipasa A₂, se podría adjudicar a que la mayoría de las células infectadas, desarrollan un citoplasma vigoroso antes de morir, lo cual sería una característica típica del proceso de apoptosis.

El efecto tóxico dado por los componentes del veneno de *A piscivorus* con actividad hemorrágica y mionecrótica, pudo haber sido eliminado con el aislamiento y purificación de la fracción con actividad hemoaglutinante, mediante el proceso de cromatografía líquida de alto rendimiento-fase reversa (HPLC), sin alterar sus propiedades biológicas. Esto último fue confirmado, al conservar esta proteína su actividad y especificidad biológica, manteniendo la capacidad hemoaglutinante al nivel de 64 unidades. De acuerdo con Sim (1998), en la purificación de los polipéptidos y proteínas de los venenos de víbora, frecuentemente estos contienen un gran número de isoenzimas, con una gran homología en las secuencias de sus aminoácidos, masas moleculares o puntos isoeléctricos, por lo que pueden llegar a coeluir junto con algunos otros componentes de interés. De ahí que aparentemente, el método más adecuado

para la purificación fue por HPLC, el cual tiene la capacidad de separar polipéptidos de secuencias cercanamente idénticas (VYDAC, 1995).

Mediante la evaluación "*in vivo*" de la fracción hemoaglutinante de *A piscivorus*, se pudo observar que ésta, a la concentración de 4.25 µg/ml no causa daño alguno al tejido (figuras 11 y 12). Pues en comparación con lo observado en la inoculación "*in vivo*" con el veneno completo (figuras 2, 4, 5 y 6), parece ser que las toxinas con actividad hemolítica y necrótica fueron eliminadas, y al inocular intramuscularmente la fracción, a nivel macro y microscópico, no hubo daño ni cambios patológicos aparentes.

Debido a que a la observación microscópica de los cultivos inoculados con la fracción hemoaglutinante sólo se aprecia un leve efecto de redondeo celular, para la evaluación "*in vitro*" del daño causado por la fracción, se empleó la prueba colorimétrica de reducción del tetrazolium (MTT). Esta ha sido recientemente usada en la determinación de la sensibilidad a drogas en diversas líneas celulares (Carmichael *et al.*, 1987). Se basa en la medición de la habilidad de las células tumorales vivas, pero no muertas, de reducir al MTT en un producto azul formazán. Martikainen *et al.*, (1993), empleó la prueba de MTT para evaluar el efecto causado por la fosfolipasa A₂ de *Naja mosambique*, encontrando que el metabolismo se reducía al 50% o menos de las células control. En el presente trabajo, al evaluar el daño que pudiera causar la fracción aislada en células MDBK, se apreció que a las concentraciones de 8.5 y 4.25 µg/ml, la viabilidad celular también se redujo a niveles superiores e inferiores al 50% (36.64 y 67.03%, respectivamente) en relación a las células control (100% de viabilidad). Mientras que la dosis de 2.125 µg/ml estuvo muy cercana a la regularización del metabolismo. A partir de la concentración de 1.062 µg/ml, aunque el efecto de redondeo continuaba manifestándose, la viabilidad fue mantenida al mismo nivel que las células control. Indicando así la factibilidad de su empleo en las pruebas de bloqueo de la adherencia del VPIB-3 en sus células huésped (Gráfica 2). Se considera que el efecto de redondeo celular obtenido en el presente trabajo, no pudo haberse debido a la acción de la fosfolipasa A₂ descrita por Cotter *et al.*,

(1990), ya que aparentemente ésta última fue eliminada durante la purificación de la fracción hemoaglutinante por HPLC. De acuerdo con Manjunatha y Evans (1990), los sitios de unión de las lectinas son reconocidos por los receptores celulares y a través de ellos logran penetrar a la célula. Por lo tanto, es factible que el efecto de redondeo celular observado sea debido a la penetración de la fracción hemoaglutinante al interior de la célula.

Para lograr evaluar la capacidad antiviral de la fracción aislada del veneno crotálico, se requería contar con un virus de cierta similitud al de Influenza, hacia el cual están dirigidos la mayoría de los productos antivirales. El virus más cercano y factible de reproducir fue el VPIB-3, ya que de la membrana lipídica de éste, al igual que del virus de Influenza, emergen las espículas de hemoaglutinina y neuraminidasa necesarias para los mecanismos de entrada y salida viral, además de que el VPIB-3 en su salida causa una lisis celular, que a la observación microscópica de los cultivos celulares inoculados, muestra un claro efecto citopático (Collins *et al.*, 1996). Aunque en el presente trabajo, la evaluación de la actividad antiviral antes y después de la conjugación del VPIB-3 con la fracción crotálica, pudo ser medida por la técnica de titulación por reducción de placas, resultaba necesario aplicar la prueba de MTT, para poder establecer un patrón comparativo con el efecto individual de la fracción hemoaglutinante, el VPIB-3 y la combinación de ambos.

Cuando las monocapas celulares se inocularon sólo con el VPIB-3, en las pruebas de MTT, se detectó disminución del metabolismo hasta la dilución 10^5 , lo cual concuerda con la titulación por reducción de placas, siendo este de $10^{5.6}$ DICC _{50%}. Por otro lado, durante la evaluación del bloqueo viral, a través de la adherencia de la fracción crotálica hacia los receptores ácido siálico celulares, el metabolismo detectado con la inoculación de la mezcla VPIB-3/fracción hemoaglutinante, fue superior a los controles de cada uno de ellos en forma individual, y aunque no alcanzó el nivel de las células control, la diferencia estadística a las diluciones 10^5 y 10^6 (0.0072 y 0.0055, respectivamente) no fue significativa. Básicamente, no existe un trabajo previo con lectinas sobre el cual se pudiese establecer un patrón comparativo con los resultados obtenidos. Se

esperaba que por el efecto del bloqueo, el metabolismo se mantuviera dentro de la normalidad, al emplear ambos agentes a las concentraciones previamente establecidas como no dañinas. Sin embargo, el metabolismo se redujo, probablemente debido a el efecto de ambos reactantes, aunque sin llegar a causar lisis celular (por efecto del virus), al mantenerse las monocapas 100% confluentes.

Aparentemente, las secuencias N-terminales de la fracción hemoaglutinante crotálica (Francischetti *et al.*, 1997), mostraron una mayor afinidad hacia los carbohidratos de las hemoaglutininas del VPIB-3, que por los receptores ácido siálico de las células MDBK. Lo anterior se observó al comparar los resultados obtenidos en las pruebas de bloqueo de receptores celulares, con las pruebas de evasión de la infección viral, mediante la unión de la fracción crotálica a la proteína viral. La Figura 14 muestra que la fracción crotálica no solo se unió a las proteínas virales, sino que traspasó y desintegró la membrana lipídica, con apreciación en todo el campo visual de residuos virales y restos "fantasma" de partículas del VPIB-3. Otro factor que mostró la mayor afinidad de la fracción crotálica hacia la hemoaglutinina viral fue la titulación de la cepa del VPIB-3, la cual tras su previa incubación con la fracción aislada de *A piscivorus*, redujo su actividad drásticamente de $10^{5.6}$ DICC_{50%} a $10^{2.0}$ DICC_{50%}.

Las aparentes similitudes entre las proteínas estructurales virales y las fracciones hemoaglutinantes crotálicas se determinaron por la comparación de sus pesos moleculares a través de la electroforesis y por su reconocimiento a través de anticuerpos específicos anti-*A piscivorus* y *A contortix*, obtenidos tras la inmunización de conejos, mediante las pruebas de "western blot". Francischetti *et al.*, (1997), al aislar a una proteína denominada "convulxina" con actividad de lectina, de *Crotalus durissus*, informó que ésta consistía de una proteína única de 72.0 kDa, que al ser sometida a condiciones reductoras manifestaba estar constituida por dos polipéptidos de peso molecular de 13.5 y 12.5 kDa. Hirabayashi *et al.*, (1991), al aislar a la lectina de *Crotalus atrox*, informó de la presencia de una sola hemoaglutinina con peso molecular de 14.4 kDa en condiciones reductoras y de 31.0 kDa en condiciones no reductoras. Ogilvie *et al.*, (1986), al aislar las lectinas de *Lachesis muta* y *Dendroaspis jamesonii* reportó que

ambas poseían pesos moleculares de 14.0 kDa en condiciones reductoras y 28.0 kDa en condiciones no reductoras. Si bien los pesos moleculares informados por estos autores no son idénticos a los encontrados en el presente trabajo, si se aproximan con lo encontrado en los diversos corrimientos electroforéticos de la fracción hemoaglutinante de *A piscivorus* en condiciones reductoras, en los que el peso molecular fue de 20.99 kDa. Por otro lado, en las pruebas de identidad de las fracciones hemoaglutinantes crotálicas y proteínas estructurales virales, se observó en ambos reactantes, bandas de aproximadamente 20.99 kDa que reaccionaron con los anticuerpos anti-*A piscivorus*, con una mayor afinidad hacia las correspondientes a la fracción crotálica. Sin embargo, el reconocimiento hacia la proteína viral también fue bastante claro cuando el antígeno se encontró a una alta concentración.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, nos llevan a concluir que si bien la actividad antiviral, a través del bloqueo de los receptores celulares, no es lo suficientemente adecuada, por el hecho de reducir el metabolismo, dicho efecto es mínimo, ya que no da cabida al efecto lítico viral.

Por otra parte, se observó que, independientemente del bloqueo de los receptores celulares, también existe una alta actividad antiviral dada por la gran afinidad de la fracción hemoaglutinante hacia los carbohidratos presentes en la proteína viral, ya que la fracción no solo fue reconocida y adherida a la superficie viral, sino que también tuvo la capacidad de traspasar la membrana lipídica, creando su desintegración, con la subsiguiente extravasación de sus componentes vistos a través de la microscopía electrónica, así como por la reducción del título viral.

Normalmente, para que los antivirales comerciales sean efectivos, deben emplearse en una forma preventiva, administrándose antes y/o al inicio de la infección. En el caso de la fracción crotálica contemplada como agente antiviral, aparentemente su uso no se limitaría a determinadas etapas, ya que por su alta afinidad hacia las proteínas virales, probablemente podría actuar en cualquier etapa de la infección.

CUADROS Y FIGURAS

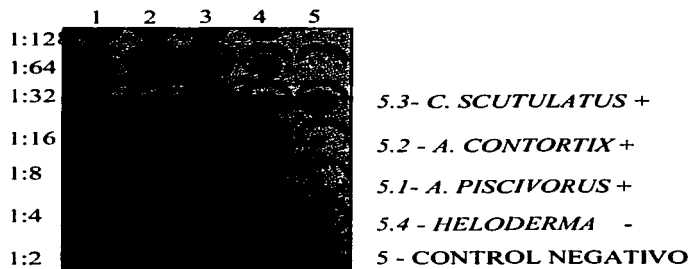
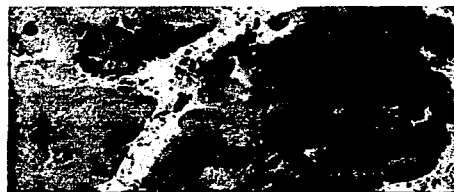
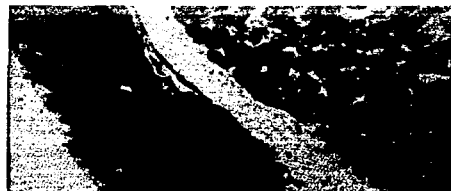


FIGURA 1.- Capacidad hemoaglutinante de los venenos crotálicos y no crotálico. La **Línea 1** con diluciones de 1:2 a 1:128 del veneno *A. piscivorus*, con clara aglutinación hasta 64 unidades. La **Línea 2** en las mismas diluciones del veneno *A. contortix*, con aglutinación entre las 16 y 32 unidades. **Línea 3** con mismas diluciones de *C. scutulatus*, con débil aglutinación a 2 unidades. **Línea 4** con veneno *Heloderma*, sin efecto aglutinante. **Línea 5** con control negativo con sólo solución salina y glóbulos rojos, así como los controles positivos (pozos 5.1 a 5.4) con los mismos venenos en concentración de 6.25 mg/ml (sin diluir).



FIGURA 2.- Daño "in vivo" causado por los venenos de crotálicos. **Ratón 1**, control negativo al que se administraron 0.2 ml de solución salina estéril en músculo tibial. **Ratón 2**, inoculado con 1.75 mg de *C. scutulatus*, sin apreciación macroscópica de daño en el tejido del músculo tibial. **Ratones 3 y 4**, inoculados en mismas dosis con *A. piscivorus* y *A. contortix* respectivamente, con apreciación de edema masivo y equimosis, con extensión aún más allá del área de inoculación.



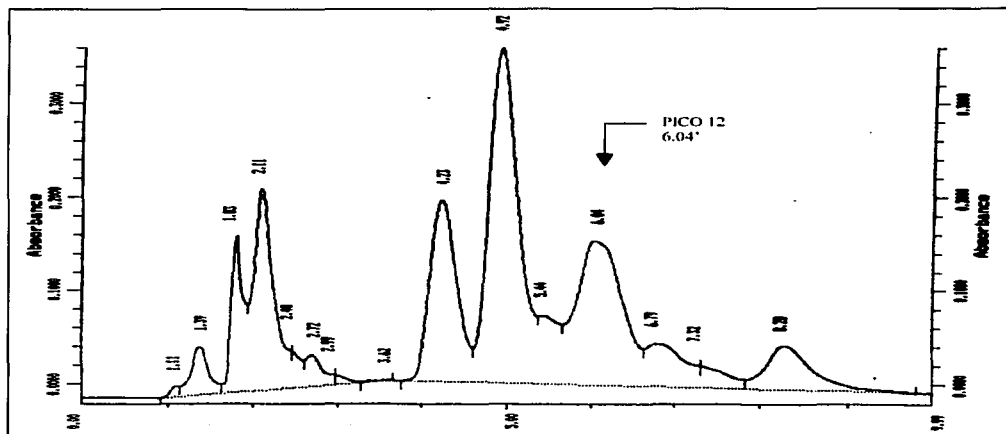
FIGURAS 3 a 6.- Cortes histológicos de músculo tibial de ratones inoculados con los diferentes venenos. En la **Figura 3** se aprecia el corte del músculo del ratón control negativo, al que se administró solo solución salina estéril, con una estructura intacta. La **Figura 4** corresponde al corte del músculo inoculado con 1.75 mg/30 g de peso corporal de veneno *A piscivorus* en donde se aprecia una necrosis total, infiltración de macrófagos y neutrófilos, congestión y hemorragia. La **Figura 5** corresponde al músculo inoculado en misma dosis con *C scutulatus*, con infiltrado discreto de macrófagos y algunos neutrófilos. La **Figura 6** corresponde al músculo inoculado en misma dosis con *A contortix*, con infiltrado de macrófagos y neutrófilos, eritrocitos fuera de los vasos sanguíneos y sobre las fibras musculares y necrosis.

"In Vivo"	<i>Crotalus scutulatus</i>	<i>Agkistrodon piscivorus</i>	<i>Agkistrodon contortix</i>	<i>Heloderma</i>
Capacidad Hemoaglutinante	2 unidades	64 unidades	16 a 32 unidades	Negativa
Dosis Máxima No letal	1.75 mg/30g peso corporal	≥4.0 mg/30g peso corporal	≥4.0 mg/30g peso corporal	≥4.0mg/30g peso corp.
Daño a Tejidos Macroscópico	Sin daño aparente	Local y extensivo	Local y extensivo	No se evaluó
Daño a Tejidos Microscópico	Miositis Multifocal Leve	Miositis Aguda Difusa Severa	Miositis Aguda Multifocal Severa	No se evaluó
"In Vitro"				
Dosis Máxima Causante de Daño	0.390mg/ml	0,006mg/ml	0.012mg/ml	Negativo
Daño Observado	Aglutinación y Agrupamiento Celular (+)	Aglutinación y Agrupamiento Celular (+)	Aglutinación Agrupamiento Celular (+)	Monocapas 100% Confluentes (-)

Cuadro 1.- Resumen de las características principales de los venenos de serpientes crotálicas y del saurio *Heloderma*, sobre su actividad hemoaglutinante, dosis y grado de daño "in vivo" tras su inoculación en músculo tibial de ratón, así como el grado de daño "in vitro" por inoculación de monocapas 100% confluentes de células MDBK.



FIGURAS 7, 8 y 9.- Daño celular "in vitro" causado por los venenos crotálicos. La **Figura 7** corresponde a células MDBK inoculadas con *A. piscivorus* a una concentración de 0.970 mg/ml, en donde se aprecia una aglutinación y total desprendimiento del monoestrato celular. La **Figura 8** corresponde al mismo tipo de cultivo celular, inoculado con *A. piscivorus* a una concentración de 0.006 mg/ml, en la que se aprecia agrupamiento y desprendimiento del monoestrato. La **Figura 9** corresponde a células control negativo, 100% confluentes.



GRÁFICA 1.- Patrón cromatográfico del veneno de *A. piscivorus*, a una longitud de onda de 280 nm, con apreciación de 15 picos correspondientes a los diferentes componentes polipeptídicos y proteicos; siendo el pico 12, con un tiempo de elusión de 6.04 minutos, el poseedor de la actividad hemoaglutinante.

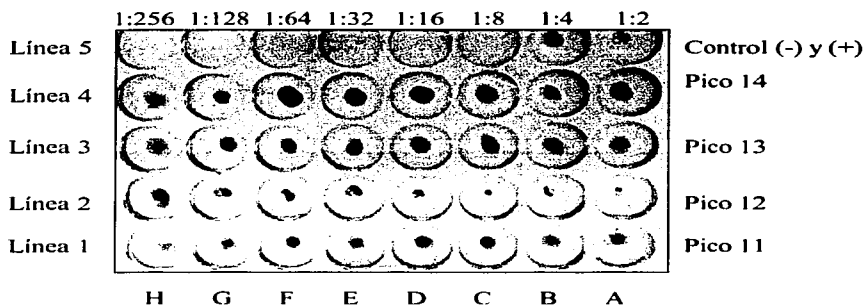
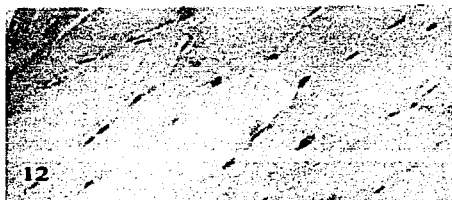


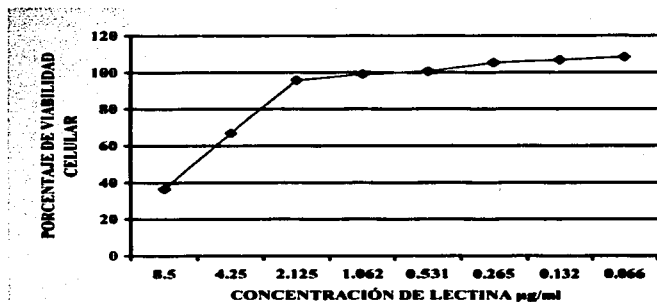
FIGURA 10.- Pruebas de aglutinación con glóbulos rojos de conejo al 2.5 % en solución salina, de algunas de las proteínas o polipéptidos aislados de *A piscivorus* por HPLC. De derecha a izquierda (pozos A → H) se encuentran las diluciones de 1:2 a 1:256. En la Línea 2, correspondiente a la proteína (pico) doce, se aprecia hemoaglutinación hasta la dilución de 1:64, correspondiente a 64 unidades hemoaglutinantes de la fracción crotálica. Las Líneas 1, 3 y 4 corresponden a las proteínas (picos) 11, 13 y 14, en las que se aprecia una clara precipitación. En la Línea 5, pozo 5A, se encuentra el control positivo con veneno *A piscivorus* completo a una concentración de 6.25 mg/ml y en el pozo 5B, el control negativo con solución salina.



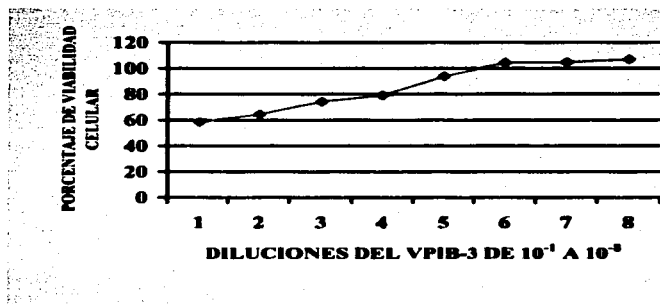
FIGURA 11.- Daño "in vivo" causado por la fracción hemoaglutinante aislada de *A piscivorus*. **Ratón 1**, control negativo al que se administró solución salina estéril. **Ratones 2 y 3**, inoculados con 4.25 µg de la fracción crotálica (pico 12 en HPLC), sin daño aparente a nivel macroscópico. **Ratón 4**, control positivo al que se inoculó veneno completo de *A piscivorus* en dosis de 1.75 mg/30 g de peso corporal, con edema masivo y extravasación sanguínea.



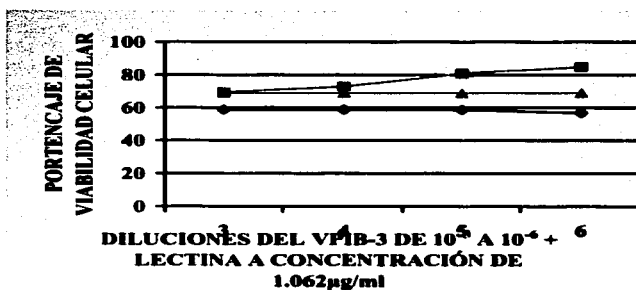
FIGURAS 12 y 13.- Cortes histopatológicos de músculo tibial de ratón inoculados con la fracción hemoaglutinante, teñidos bajo la técnica de Hematoxilina-Eosina y apreciados con objetivo 20X. La **Figura 12** muestra el corte del músculo de ratón inoculado con 4.25 μg de la fracción aislada de *A piscivorus*, sin cambios patológicos aparentes, mismos que se aprecian en el corte del ratón control negativo de la **Figura 13**, al que se administraron 0.2 ml de solución salina estéril.



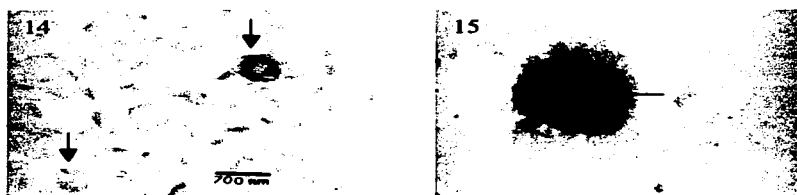
GRÁFICA 2.- Determinación de la viabilidad de cultivos MDBK posterior a la inoculación con la fracción hemoaglutinante de *A piscivorus*, mediante la medición del metabolismo celular con MTT e interpretación a una longitud de onda de 492 nm, considerando como un 100% al metabolismo dado por los cultivos control. La **Línea Roja** marca los porcentajes de viabilidad, dados para las concentraciones de 8.5 a 0.066 $\mu\text{g/ml}$ de la fracción hemoaglutinante. El daño celular se detectó con una variancia estadísticamente significativa para las concentraciones de 8.5 y 4.25 $\mu\text{g/ml}$ de la fracción aislada con valores de 0.0389 y 0.0095, respectivamente. Mientras que a partir de las restantes concentraciones no existe variancia alguna.



GRÁFICA 3.- Viabilidad de células MDBK posterior a la infección con el VPIB-3, medida por la alteración del metabolismo celular con MTT y absorbancia a 492 nm. La numeración en el eje de las X indica las diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-8} . La Línea Roja marca los porcentajes de viabilidad celular para las diluciones virales 10^{-1} a 10^{-8} . El daño celular se detectó con una variancia estadísticamente significativa de las diluciones 10^{-1} a 10^{-4} con valores de 0.0146, 0.0115, 0.0063 y 0.0048, mientras que a la dilución 10^{-5} no fue significativa.



GRÁFICA 4.- Prueba de bloqueo de la replicación del VPIB-3 en células MDBK, mediante la inoculación con la fracción aislada de *A. piscivorus*, detectada por tinción con MTT e interpretada por absorbancia, a una longitud de onda de 492 nm. La numeración en el eje de las X indica las diluciones del VPIB-3 desde 10^{-3} hasta 10^{-6} . La Línea Azul corresponde a la fracción hemoaglutinante control positivo en concentración de 4.25 $\mu\text{g/ml}$, con un porcentaje de viabilidad del 58.69%. La Línea Rosa corresponde al control positivo del VPIB-3 en concentración 10^{-2} , con un porcentaje de viabilidad del 68.78%. La Línea Roja corresponde a los porcentajes de viabilidad celular posterior al bloqueo viral, con la fracción crotálica a una concentración constante de 1.062 $\mu\text{g/ml}$ y diluciones del VPIB-3 desde 10^{-3} hasta 10^{-6} , con reducción del metabolismo celular al análisis de variancia, con valores de 0.0126, 0.0123, 0.0072 y 0.0055, respectivamente.



FIGURAS 14 y 15 .- Microscopía electrónica mostrando el efecto destructivo de la fracción crotálica sobre el VPB-3. La **Figura 14** muestra la tinción negativa con ácido fosfotúngstico de partículas del virus, bajo el efecto destructivo de la fracción aislada de *A piscivorus* en concentración de 1.062 $\mu\text{g/ml}$, en la que se aprecian 2 restos fantasmas de partículas virales y en todo el campo visual, restos de estructuras virales. La **Figura 15** muestra la tinción negativa del virus sin tratamiento, en la que se puede apreciar una partícula del VPB-3 completa, con su nucleocápside en forma de hueso de arenque y ausencia de restos virales (25 000X).

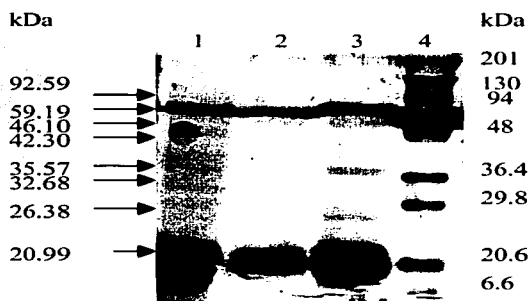


FIGURA 16.- Electroforesis del veneno de *A piscivorus* y de la fracción aislada. La **Línea 1** manifiesta los pesos moleculares del veneno de *A piscivorus* con todos sus componentes proteicos y polipeptídicos, con la presencia de 8 diferentes bandas proteicas, con pesos moleculares que fueron desde los 92.59, hasta los 20.99 kDa. La **Línea 2** contiene a la fracción aislada de *A piscivorus* a una concentración de 2.125 $\mu\text{g/ml}$, y la **Línea 3** muestra la misma fracción en concentración de 4.25 $\mu\text{g/ml}$. En ambas se aprecia una banda de la proteína purificada, con un peso molecular de 20.99 kDa. La **Línea 4** muestra el control de pesos moleculares que fue desde los 201 hasta los 6.6 kDa.



FIGURA 17.- “Western blot” marcando la identidad entre la fracción crotálica aislada y una proteína estructural del VPIB-3. Las **Líneas 1, 2 y 3** corresponden al VPIB-3 en diluciones 1:16, 1:8 y 1:4 respectivamente, en las que se aprecia el reconocimiento de la proteína de 20.99 kDa en las diluciones 1:4 y 1:8. Las **Líneas 4 y 5** corresponden a células MDBK, en las que no se detecta a la proteína de 20.99 kDa., pero sí se manifiestan otras bandas también presentes en el VPIB-3, al compararles con las líneas 2 y 3. La **Línea 6** corresponde al marcador de pesos moleculares y que fue desde los 201 hasta los 6.6 kDa. Las **Líneas 7 y 8** corresponden a las concentraciones de 4.25 y 2.125 $\mu\text{g/ml}$ de la fracción aislada de *A piscivorus*, con el reconocimiento de la proteína de 20.99 kDa, al igual que la **Línea 9**, correspondiente a el veneno de *A piscivorus*, con todos sus componentes proteicos y polipeptídicos.

TESIS CON
FALLA EN
EN

ANEXO 1

Soluciones para dilución de venenos

1.- Solución de Tyrodes

- 1 g de Glucosa
- 8 g de NaCl
- 0.05 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 1 g de NaHCO_3
- 0.2 g de CaCl_2
- 0.1 g de MgCl_2
- 0.1 g de KCl
- 1 lt. De agua destilada estéril
- a un pH de 7.4

2.- Solución salina

- 0.85 g de NaCl
- 100 ml. De agua destilada estéril
- a un pH de 7.2

Soluciones para la histopatología

3.- Formalina al 10%

- 4 g de fosfato ácido de sodio monohidratado
- 6.5 g de fosfato disódico anhidro
- 10 ml de formalina
- 1 lt. de agua destilada

4.- Formalina

- Formaldehído al 40%

5.- Hematoxilina de Harris

- 5 g de Hematoxilina en cristales
- 50 ml de Etanol absoluto
- 100 g de Alumbre de amonio o potasio

- 2.5 g de Oxido rojo de mercurio
- 1 lt. de agua destilada

6.- Eosina Alcoholica

Solución concentrada

- 1 g de Eosina γ soluble en agua
- 20 ml de agua destilada
- 80 ml de Etanol al 96%

Solución de trabajo

- 1 parte de solución concentrada de eosina
- 3 partes de etanol al 80%
- 0.5% de ácido acético glacial

7.- Alcohol ácido

- 10 ml de Acido clorhídrico
- 1 lt de etanol al 70%

8.- Agua amoniacal

- 3 ml de Hidróxido de amonio al 28% (amoniaco)
- 1 lt de agua destilada

Soluciones para cultivos celulares

9.- Medio de cultivo MEM

- 1 lt. De Medio MEM "in Vitro"
- 10 % Suero Fetal Bovino
- 5 % de Caldo de Tripticaseína y Fosfato
- 0.8 g de NaHCO_3 estéril
- 1 ml de mezcla penicilina/estreptomina de 10 000 UI/ $\mu\text{g}/\text{ml}$

Soluciones para la HPLC

10.- Solvente A

- Acido trifluoroacético (TFA) al 0.1% en agua grado HPLC

11.- Solvente B

- Acetonitrilo (ACN) con TFA al 0.1%

Soluciones para determinación de viabilidad celular

12.- MTT

- 5 mg MTT 3-[4, 5-Dimethyl-thiazol-2-Yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide
- 1 ml PBS

13.- PBS

- 8 g NaCl
- 0.2 g KCl
- 2.9 g NaHPO₄·2H₂O
- 0.2 g KH₂PO₄
- 1 lt de agua
- pH 7.4
- Esterilización a 15 libras por 15 minutos

14- SDS

- 15% w/v Dodecil Sulfato de Sodio
- 0.02 M HCl

Soluciones para microscopia electrónica

15.- Glutaraldehido

- 1 ml de glutaraldehido
- 9 ml de PBS

16.- Ácido Fosfotúgnstico

- 2 g de ácido fosfotúgnstico
- 100 ml de agua destilada

Soluciones para electroforesis

17.- Solución A.- Buffer Tris-HCl 3.0M, pH 8.8

- 18.3 g de Tris base
- 0.76 g de EDTA tetrasódico Disolver en 35 ml. de agua destilada
- 115 µl de TEMED

- Ajustar a pH 9.4 con HCl
 - Aforar a 50 ml con agua destilada
- 18.- Solución B.- Buffer Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8
- 3.029 g de Tris base Disolver en 35 ml de agua destilada
 - Ajustar a pH 6.8 con HCl
 - Aforar a 50 ml con Agua destilada
- 19.- Solución C.- Acrilamida-Bis 30:0.8 (30%)
- 15 g de Acrilamida
 - 0.4 g de Bisacrilamida
 - 50 ml de Agua destilada c.b.p.
- 20.- Solución SDS 10%
- 5 g de SDS
 - 50 ml de agua destilada c.b.p.
- 21.- Solución de Persulfato de Amonio al 2%
- 0.1 g de Persulfato de amonio
 - 50 ml de agua destilada c.b.p.
- 22.- Solución de bromofenol al 0.05%
- 0.025 g de Azul de Bromofenol
 - 50 ml de agua destilada c.b.p.
- 23.- Solución de corrimiento, pH 3.0
- 3.029 g de Tris 0.025 M
 - 14.413 g de Glicina 0.192 M
 - 10 ml de SDS (10%) ó 1 g de SDS
 - Disolver en +/- 800 ml de agua destilada
 - Ajustar a pH de 3.0 con HCl
 - Aforar a 1 lt con agua destilada
- 24.- Solución de muestra
- 0.0095 g de EDTA (2.5mM ó 1 ml EDTA 24 mM en 4 ml de agua
 - 5 ml de Agua destilada c.b.p.
 - 1.25 ml de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8
 - 1 ml de Glicerol

- 2 ml de SDS al 10%
- 0.5 ml de 2-b-mercaptoetanol
- 0.25 ml de Azul de bromofenol 0.05% (w/v)
- 10 ml total

25.- Elaboración de geles

Reactivo	gel separador	gel introductor
	12%	3%
- Agua destilada	3.5 ml	6.1 ml
- Tris-HCl, 1.5M, pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml
- SDS 10%	100 μ l	100 μ l
- Acrilamida/bisacrilamida 30%	4.0 ml	1.3 ml
- Persulfato de Amonio 10%	50 μ l	50 μ l
- TEMED	5 μ l	10 μ l
Volúmen total	10 ml	10 ml

Solución para electrotransferencia

26.- Solución de electrotransferencia

- 3.03 g de Trisma base 25 mM
- 14.4 g de Glicina 102 mM
- 200 ml de Metanol
- Aforar a 1 lt con agua destilada
- PH de 8.3

Soluciones para "Western blot"

27.- Solución bloqueadora al 3%

- 0.75 g de Albúmina bovina Fracción V
- 25 ml de Agua destilada

28.- Solución de lavado al 1%

- 10 g de Albúmina bovina fracción V
- 1 lt de Agua destilada

29.- Cromógeno

- 25 mg de diaminobenzidina
- 50 ml de PBS
- 50 μ l de peróxido de hidrógeno al 30%

CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Amaral CFS, Dourado, HV. *et al.* Manual de diagnóstico e tratamento de accidentes ofídicos. Ministerio de Saúde do Brasil. 1991.
- 2.- Apellanis, de la PH. El uso de antihistamínicos y sustancias antianafilácticas en el envenenamiento por mordedura de serpiente. Tesis de Licenciatura UNAM. FMVZ. 1980.
- 3.- Barret T, Inglis SC. in: Virology, a practical approach. Mahy BWJ. Practical approach series. IRL press. Oxford Washington D.C. 119-150. 1991
- 4.- BIO-RAD. Mini-Protean II. Electrophoresis Cell. Instruction Manual. Sin fecha de publicación.
- 5.- BIO-RAD. Mini-Protean II. Electrotransfer Cell. Instruction Manual. Sin fecha de publicación.
- 6.- Brown. A field guide to snake of California. 1997.
- 7.- Carmichael J, De Graff W, *et al.* Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assesment of Chemosensitivity Testing. Cancer Research **47**, 936-942. 1987
- 8.- Centers for Disease Control and Prevention: Prevention and control of Influenza: Recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP) **MMWR 46:RR-9**, 1.25. 1997
- 9.- Clinical Toxicology Web Site. Delivery of Venom and Poisons. http://wch.sa.gov.au/paedm/clintox/venoms_toxicity.html. 2001
- 10.-Collins PL, Chanok RM. McIntosh: Parainfluenza viruses in: Fields Virology, 3^o Edition. B.N. Edited by Fields DM. Knipe PM. Howley *et al.* Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1177-1204 (chapter 40). 1996.
- 11.- Cook NS. Potassium channels structure, classification, function and therapeutic potential. Ed NS Cook. Chichester: Ellis Horwood Ltd. 1990
- 12.- Cotter TG, Lennon SV, *et al.* Cell death via apoptosis and its relationship to grow, development and differentiation of four enzymes in blood. Scan J. Clin. Lab. Invest. **22**, 391-306. 1990

- 13.- Cushman DW. In "Enzyme inhibitors and drugs", Ed. M Sandler, London: Macmillan, 231-247. 1980.
- 14.- Choppin PW, Scheid A. The role of viral glycoproteins in adsorption, penetration, and pathogenicity of viruses. *Rev Infect Dis.* 40-61. 1980
- 15.- Dawes CJ. Biological techniques in electron microscopy. Barnes and Noble International Textbook Series. **17-46**, 131-150. 1973.
- 16.- Dennis MS. In "Snake toxins", Ed AL Harvey, New York: Pergamon Press, 323-383. 1989.
- 17.- Dolin R. Viral Pneumonia in: Wyngaarden JB, Smith L, Bennett JC. Eds. *Textbook of Medicine.* 5th ed. Philadelphia. W.B. Saunders Co. 485-487. 1992
- 18.- Dos Santos MC, Ferreira LCL, *et al.* Caracterización de las actividades biológicas de los venenos amarillo y blanco de *Crotalus durissus ruruima* comparados con el veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Poder neutralizante de los antivenenos frente a los venenos de *Crotalus durissus ruruima*. *Toxicon* **31:11**, 1459-1469. 1993.
- 19.- Drickamer, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *The Journal of Biological Chemistry*, **263:20**, 9557-9560. 1968
- 20.- Francischetti IMB, Saliou B, *et al.* Convulxin, a potent platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom, specifically binds to platelets. *Toxicon* **35:8**, 1217-1228. 1997.
- 21.- Gartner TK, Stocker K, *et al.* Thrombolectin: a lectin isolated from *Bothrops atrox* venom. *FEBS lett.* **117**, 13-16. 1980.
- 22.- Gartner TK, Ogilvie ML. Isolation and characterization of three Ca⁺⁺ dependent β -galactoside-specific lectins from snake venoms. *Biochem. J.* **224**, 301-307. 1984.
- 23.- Gould RJ. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* **195**, 168-171. 1990
- 24.- Graeme LW, Bischofberger N, *et al.* Disarming flu viruses. *Scientific American.* **January**, 56-65. 1999.
- 25.- Greene HW. *Snakes, The evolution of mystery in nature.* 1° Ed., University of California Press, 11-33, 1997.

- 26.- Grieg FB, Australian venom & Toxin database.
<http://www.kingsnake.com/toxinology/menu.html>. 2001
- 27.- Harvey AL & Anderson AJ. In "Snake Toxins". Ed. A.L. Harvey, New York: Pergamon Press, 131-164. 1991
- 28.- Hayes PJ, Scoot R, *et al.* In vivo production of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in Balb/c mice inoculated intranasally with a high dose of respiratory syncytial virus. *Journal of medical virology* **42**, 323-329. 1994
- 29.- Helater LD. Intramuscular and intradermal injection of DNA Vaccines in mice and primates, in: *DNA vaccines, Methods in molecular medicine*. Lowrie DB, Whalen RG. Human Press, Totowa, New, Jersey, 71-77, 2000
- 30.- Hirabayashi J, Kusunoki T, *et al.* Complete Primary Structure of a Galactose-specific Lectin from the Venom of the Rattlesnake *Crotalus atrox*. *The Journal of Biological Chemistry* **286**:4, 2320-2326. 1991
- 31.- Howard JG, Francis JT. The Paramyxoviridae. In Hagan and Bruner's *Infectious Diseases of Domestic Animals. With reference to Etiology, Pathogenicity, Immunity, Epidemiology, Diagnosis and Biologic Therapy*. 7^o Ed. Comstock Publishing Associates. Division of Cornell University Press. Ithaca and London. 747-751. 1981
- 31.- Jaffé, WG. In *Toxic Constituents of Plant Food-stuffs*, I.E. Liener, Ed. Academic Press, New York, 69-101. 1969.
- 32.- Jenney EW, Wessman SJ, *et al.* Microtitration serology methods for bovine virology. U.S. department of Agriculture. Animal and Plant Health Inspection Service. Ames Iowa. 1978.
- 33.- Johnson EK, Kardong KV, *et al.* Observation on white and yellow venoms from an individual southern pacific rattlesnake (*Crotalus viridis helleri*). *Toxicon* **25**;1169-1180. 1987.
- 34.- La Grange RG, Rusell FE. Platelet studies in rabbits following *Crotalus* poisoning, in: *Toxins of Animal and Plant Origin*. A de Vries and E. Kochva. Ed Gordon and Breach Science Publishers **3**, 1033-1038. 1973.

- 35.- Lamb RA, Kolakofsky D. Paramyxoviridae: The virus and their replication. In: Fields Virology, 3rd Edition. B.N. Edited by Fields, DM Knipe, PM Howley, *et al.* Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1996.
- 36.- Mancin AC, Soares AM, *et al.* The analgesin activity of crotamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (south American rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. *Toxicon* **36:12**, 1927-1937. 1998
- 37.-Manjunatha RK, Evans HJ. Effects of Snake Venom Proteins on Blood Platelets. *Toxicon* **28:12**, 1387-1422, 1990.
- 38.- Manual de congelación en seco HETOSICC CD2,5. Sin fecha de publicación
- 39.- Manual de Prácticas de Laboratorio de Virología. Departamento de Microbiología. Instituto Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional ISBN 968-28-2449-9, 62-77. 1989.
- 40.- Martikainen P, Nyman K, *et al.* Toxic effects of human pancreatic and snake and bee venom phospholipases A₂ on MCF-7 cells in culture. *Toxicon* **31:7**, 835-843. 1993
- 41.-Moccasins, Agkistrodon (moccasins & cantils)
<http://www.Kingsnake.com/toxinology/snakes/American/moccasin.html>. 2001
- 42.- Mohanty SB, Dutta SK. *Veterinary Virology*. 3^a edition, Lea & Febiger 140-147. 1981
- 43.- Murphy FA, Gibbs EPJ, *et al.* *Veterinary Virology*, 3rd edition, Academic Press, 411-428 (chapter 26), 459-468 (chapter 30). 1999.
- 44.- Oates JA, Wood AJ, Prophylaxis and treatment of Influenza. *N England J. Med.* **322:7**, 443-450. 1996
- 45.- Ogilvie ML, Gartner TK. Identification of lectins in snake venoms. *J. Herpetol* **18**, 285-290.1984.
- 46.- Ogilvie ML, Dockter ME, *et al.* Isolation and Characterization of Lactose-Binding Lectins from the venoms of the Snake *Lachesis muta* and *Dendroaspis jamesonni*. *J. Biochem.* **100**. 1425-1431. 1986.
- 47.- OMS. La Rabia. Técnicas de laboratorio. 3^o edición. Ed. Organización mundial de la salud. Ginebra Suiza, 348, 1975.

- 48.- Portner A. The HN glycoprotein of Sendai virus: analysis of site(s) involved in hemagglutinating and neuraminidase activities. *Virology* **115**, 375-384. 1981.
- 49.- Read MS, Smith SV, *et al.* Role of botrocetin in platelet agglutination: formation of an activated complex of botrocetin and von Willebrand factor. *Blood* **74**, 1031-1035. 1989.
- 50.- Reyes-Leyva J, Espinoza B, *et al.* NeuA α 2,3 Gal-Glycoconjugate Expresión Determines Cell Susceptibility to the Porcine Rubulavirus LPMV. *comp.. Biochem. Physiol.* **118B**, 1-6. 1997
- 51.- Rosenfeld G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South América. In: *Venomous Animals and their Venoms, Venomous Vertebrates.* Bucherl W, Buckley EE, Eds. New York Academic Press 2, 345-384. 1971.
- 52.- Scheid A, Choppin PW. The hemagglutinating and neuraminidase protein of a paramyxovirus. Interaction with neuraminic acid in affinity chromatography. *Virology* **62**, 125-133. 1974.
- 53.- Schwimmbeck PL, Lohr M, *et al.* Viral-receptor binding assay in: *Animal virus Pathogenesis. A practical Approach.* Ed. By Oldstone MBA. The Practical Approach Series Editors: D. Rickwood and B. Hames 137-148. 1990.
- 54.- Serpientes Venenosas de Costa Rica
<http://cariari.urc.ac.cr/icpucl/serpient.htm>. 2001
- 55.- Sharon N, Lis H. Lectins: cell-agglutinating and sugar specific proteins. *Science* **177**, 949-959. 1972
- 56.- Sigala RJJ, Vázquez DJ. Serpientes venenosas de Aguascalientes. Cuaderno de trabajo No. **56**. Cuadernos de Trabajo, Serie de Agricultura y Recursos Naturales. Gob. Del Edo. De Aguascalientes. 1996.
- 57.- Sim KL. Purification and preliminary characterization of praelongin phospholipases, antiplatelet agents from the snake venom of *Acanthophis praelongus*. *Biochimica et biophysica Acta* **1379**, 198-206. 1998.
- 58.- Valero EG, Morales AJF. Técnicas de histopatología 1: Técnica usual. Centro de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. SARH. 1988.

- 59.- **Untitled Document.** <http://www.Kingsnake.com/toxinology/venomtypes.html>. 2001
- 60.-**VYDAC. The handbook of analysis and purification on peptides and proteins by reversed phase HPLC. 2° edition. VYDAC (the separations group) 17434 Mojave Street. 1995.**
- 61.- **Watkins WM. In Glycoproteins, A. Gottschalk. Ed. BBA Library, Elsevier, Amsterdam 5:475-483. 1966**
- 62.- **Wayne WD. Bioestadística. Ed. Limusa. 3° edición. 2° reimpresión. 283-349. 1989.**