

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

---

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE  
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

"COMPARACION INMUNOQUIMICA DEL  
VENENO DE SERPIENTES DE CORAL  
(*Elapidae: Micrurus, Micruroides*) MEXICANAS".

T E S I S  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS  
P R E S E N T A :  
BIOL. ALEJANDRO CARBAJAL SAUCEDO

TUTOR: DR. ALEJANDRO ALAGON CANO

CUERNAVACA, MORELOS. MEXICO.

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR  
Y BIOPROCESOS BAJO LA SUPERVISIÓN DEL Dr. ALEJANDRO ALGÓN CANO  
CON EL APOYO ECONÓMICO DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO, UNAM Y DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA.

## Agradecimientos

A las siguientes personas e instituciones sin cuya ayuda en la obtención de muestras de veneno no hubiera sido posible la realización de este trabajo:

Dr. Jorge Paniagua Solís. Instituto Bioclón. DF, México.  
Sr. Rafael Aguilar. "Reptilmex" Morelos, México  
Dr. Eric N. Smith. Universidad de Texas en Arlington. Arlington, TX. E. U. A.  
Dr. Javier Alvarado. Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo. Morelia, Michoacán. Biól. Roberto Mora Rodríguez. Veracruz, México  
Econ. José Luis Martínez Machuca. Centro Ecológico de Sonora. Sonora, México.  
Ocean. Martín Villa Andrade. Centro Ecológico de Sonora. Sonora, México.  
Biól. Harald Alcaráz Cruz. Morelos, México.  
Biól. Jorge Chávez Juárez. Morelos, México.  
Sr. Armando Sánchez Gómez. Oaxaca, México.  
Sr. Manuel Varela Juliá. Herpetario "La nauyaca". Morelos, México  
Dr. Adrián Nieto Montes de Oca. Facultad de Ciencias, UNAM. DF, México  
M. en C. Luis Canseco Márquez. Facultad de Ciencias, UNAM. DF, México  
Dr. Oscar Flores Villela. Facultad de Ciencias, UNAM. DF, México.  
M. en C. Edmundo Pérez Ramos. Facultad de Ciencias, UNAM. DF, México.  
Dr. Nils Santos. Zoológico "La Aurora". Guatemala, Guatemala.  
Dr. Lester Meléndez. Museo de Historia Natural. Guatemala, Guatemala.  
Dr. Manuel Acevedo. Museo de Historia Natural. Guatemala, Guatemala.

A los doctores Jorge Paniagua Solís y Lourival D. Possani Postay por formar parte de mi comité tutorial y ayudarme a realizar este trabajo.

En especial al Dr. Alejandro Alagón Cano por permitirme formar parte de un excelente grupo de trabajo en uno de los ambientes más alegres que he conocido. Gracias por todo el apoyo y confianza que me ha brindado durante mi formación en la maestría y ayudarme a iniciar con el pie derecho el proyecto de doctorado. Gracias por ser el tutor más humano que he conocido y del que he oído hablar.

A los revisores de mi tesis: Dra. Yvonne Rosenstein, Dr. Baltazar Becerril, Dr. Ricardo Ciria y Dr. Eric N. Smith. Muchas gracias por sus valiosos comentarios.

A todas y cada una de las personas del laboratorio: A Herli por muchísimas cosas, como la paciencia de mostrarme como trabajar en el laboratorio, explicarme el funcionamiento de los aparatos pero sobre todo por esos excelentes momentos en las pláticas del "dog and pony show", esperemos seguir espantando niños ja ja. A Ale Olvera por aclararme un montón de dudas de trabajo y permitirme disfrutar de su buen gusto musical. A Felipe Olvera por esas pláticas tan interesantes que apagan el tedio en el laboratorio y permiten retomar fuerza para seguir trabajando. A Blanquita por regalarme unas horas de su tiempo para platicar, hacer deporte o simplemente compartir una comida. A Roberto por esos inolvidables monólogos (casi diálogos). Al Dr. George Odell por mostrarme lo bello que puede llegar a ser un arácnido. A Rosana, Milena, Mónica, Ricardo, Andrés Judith, Hilda y Laura que han resultado ser parte fundamental de mi formación académica y principalmente de mi formación social. A todos muchas gracias.

A Angélica Linares sin cuya constante y valiosa ayuda seguramente los trámites, pagos y pedidos me habrían vuelto loco (sé que te debo ya dos mundos, pero en algún momento encontraré la forma de pagártelos). A Ricardo Mondragón y Olegaria Benítez por todo el apoyo técnico.

A mi Madre Gloria Saucedo Martínez, por comprenderme a pesar de su poco o nulo gusto por las serpientes; a mis hermanos Fernando y Eduardo por los corajes, las peleas, las risas y los llantos que tanto hemos compartido. Gracias por Brandon y espero pronto contar con "la güerejilla". Siempre les estaré agradecidos por todo, principalmente por ser mi familia.

Por último pero muy especialmente quiero agradecer a mi amada novia Mitzi Villajuana Bonequi, por su constante apoyo e interminable comprensión, por regalarme tanto tiempo para fortalecerme (nos) académica, cultural y espiritualmente. Mil gracias por ayudarme a concluir e iniciar mis (nuestros) proyectos. Gracias señora Maria de la Luz Bonequi y señor. Fred Villajuana por la inmensa confianza y cariño que han depositado en mi. Gracias Sinuhé por esas pláticas de videojuegos, por las películas, por mostrarme que cuando alguien tiene la convicción de hacer las cosas simplemente puede hacerlas y, claro está, por cuidar tanto a tu hermana.

## INDICE

Introducción	
Generalidades	1
Serpientes de coral o coralillos	5
Hábitos	6
Anatomía general	7
Aparato de inoculación de veneno	8
Venenos: química e inmunológica	10
Hipótesis	16
Objetivos	16
Materiales y Métodos	
Venenos	17
Geles	19
Inmunización y obtención de sueros hiperinmunes	19
Western blots	19
ELISAs	20
ELISAs competitivos	20
Determinación de DL50 y neutralizaciones	20
Resultados	21
Discusión	35
Conclusiones	38
Perspectivas	39
Literatura citada	39
Anexos	46

## INTRODUCCIÓN

### Generalidades

Este trabajo se centra en la comparación inmunológica del veneno de un grupo particular de serpientes del Nuevo Mundo conocidas como serpientes de coral o coralillos al que pertenecen cerca de 50 taxa de los cuales dos géneros (*Micruroides* y *Micrurus*) y alrededor de 20 especies se distribuyen dentro del territorio nacional y de los que no se tiene ninguna información a este respecto. A fin de tener una mayor comprensión de las especies de las que se habla se iniciará con una breve revisión del grupo al que pertenecen.

Aunque, en general, un grupo taxonómico se define con base en la presencia de una serie de caracteres, las serpientes se definen por la ausencia de varios de éstos. En comparación con los lagartos, el grupo de reptiles más cercanamente relacionado a ellas, las serpientes no poseen extremidades anteriores ni posteriores<sup>1</sup>, tampoco presentan párpados móviles, oído externo, ni esternón. En cambio, presentan un alargamiento del eje antero-posterior del cuerpo, poseen un elevado número de vértebras y costillas y una de las características más notables que muestran es la enorme movilidad de los huesos que forman el cráneo (para definiciones más especializadas véanse Bellaris y Underwood, 1951; Cope, 1896; Dowling, 1959; McDowell, 1987; Underwood, 1967). Los primeros registros fósiles datan de hace aproximadamente 100 millones de años y aunque todavía existe una fuerte controversia se piensa que el grupo actual de lagartos filogenéticamente más relacionado a ellas son los varanoideos (*Varanus*, *Lanthanotus* y *Heloderma*; Cohn y Tickle, 1999; Lee *et al.*, 1999; Scanlon y Lee, 2000; Schwenk, 1994; Tchernov *et al.*, 2000). Actualmente se reconocen entre 2700 y 3000 especies de serpientes distribuidas alrededor del mundo, excepto en las regiones polares (Pough *et al.*, 1998; Gravlund, 2001), que pueden agruparse, dependiendo del autor, en aproximadamente 20 familias, la mayoría de las cuales son completamente inofensivas para el hombre.

En la Figura 1 se muestra un árbol resumido de las relaciones filogenéticas entre las varias familias de serpientes (para estudios más detallados véanse Cohn y Tickle, 1999; Scanlon y Lee, 2000; Tchernov *et al.*, 2000; Rieppel y Zaher, 2000). A fin de facilitar su estudio se incluyeron a ciertas familias en diferentes subgrupos que pueden ser tomados como infraórdenes. El primero de ellos es llamado Scolecophidia y en él se incluyen a las familias más antiguas conocidas como serpientes gusano. El segundo es conocido como Alethinophidia y en él se agrupan las familias que pueden ser denominadas en forma muy general como boas. Al último grupo, llamado Caenophidia, pertenecen las familias más recientes de serpientes e incluye a todas las especies venenosas conocidas que pueden relacionarse a alguna de cuatro familias: Viperidae, Atractaspidae, Colubridae o Elapidae.

---

<sup>1</sup> Sólo en algunos grupos primitivos como Tiflópifos y Bóidos es posible observar restos de miembros posteriores.

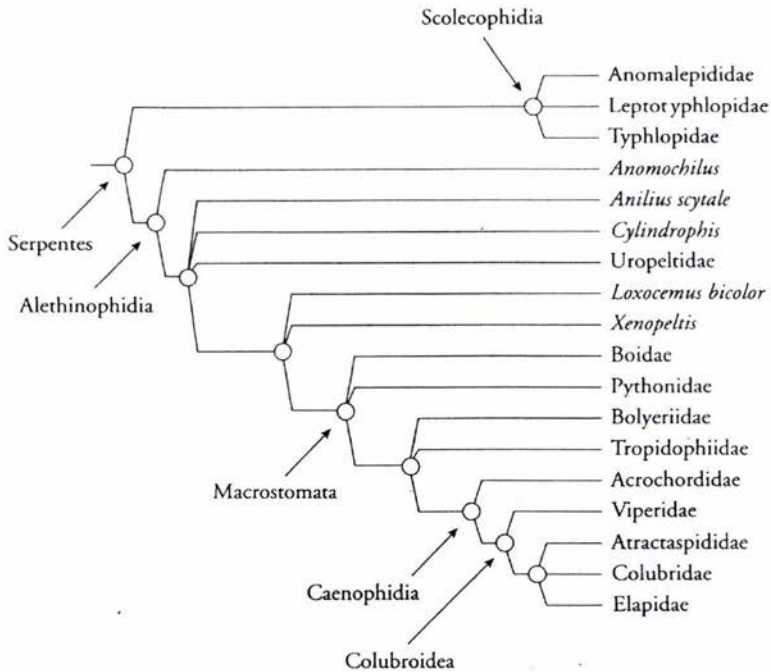


Figura. 1. Las cerca de 3000 especies de serpientes actuales se agrupan en alrededor de 20 familias, la mayoría de las cuales no representan un peligro contra el ser humano. Scolecophida es el grupo más antiguo de serpientes e incluye especies conocidas como "serpientes gusano". En el grupo Alethinophidia se encuentra una variedad de especies conocidas por el nombre genérico de boas; Caenophidia es el grupo más reciente de serpientes e incluye a todas las especies venenosas dentro de cuatro familias: Viperidae, Atractaspidae, Elapidae y Colubridae. Tomado de Greene, 1997.

- Viperidae: A esta familia pertenecen las llamadas víboras verdaderas y se caracterizan por un tipo de dentición muy especializado llamado solenoglifo en el que los colmillos (siempre huecos y móviles) se localizan en la parte anterior del hueso maxilar. Cuando la serpiente mantiene la boca cerrada los colmillos se acomodan para situarse en paralelo al eje antero-posterior de la boca. Al atacar, los colmillos se mueven hasta quedar perpendiculares a dicho eje. Se reconocen de 12 a 22 géneros [de los cuales *Agkistrodon* (cantil), *Bothrops* (nauyacac, mapaná, cuatronarices) y *Crotalus* (cascabeles) son los más conocidos en América, mientras que *Bitis*, *Echis* y *Vipera* son los más reconocidos en África, Asia y Europa] y cerca de 190 especies. Están distribuidas desde el nivel de mar hasta los 4900 m de altitud en casi todo el mundo, excepto en Australia



- **Atractaspididae:** En esta familia el tipo de dentición es muy similar al de los vipéridos, sin embargo poseen una gran cantidad de caracteres que los une con los elápidos y algunos que lo ubican dentro de los colúbridos lo cual lo hace uno de los grupos más enigmáticos dentro de la taxonomía ofidia. El género *Atractaspis* es el único dentro de la familia y cuenta con cerca de 15 especies. Aún cuando se ha demostrado que su veneno es altamente peligroso no representan un problema serio de salud pública (Chippaux, 2002). Se distribuyen principalmente en África central, aunque algunas especies llegan hasta Sudáfrica.
- **Colubridae:** Es el grupo más diverso de serpientes. La forma de definirlos se basa en la presencia y/o ausencia de ciertos huesos, aunque también representa un grupo taxonómicamente muy complejo. Algunas especies de esta familia presentan dentición aglifa (sin colmillos) mientras que en otras especies es opistoglifa (colmillos acanalados situados en la parte posterior de la maxila). Cuenta con más de 1650 especies agrupadas en cerca de 300 géneros lo que representa entre el 55 y 61% del total de especies distribuidas a nivel mundial. La mayor parte de estas serpientes son inofensivas y sólo algunas de ellas se han visto involucradas en casos graves de envenenamiento en humanos (Hill y Mackessy, 2000; Ribeiro et al., 1999)
- **Elapidae:** Se caracterizan por tener un par de colmillos fijos acanalados o huecos situados en la parte anterior de la maxila. A excepción de Europa se les localiza en cualquier continente y aún dentro de los océanos Índico y Pacífico. Esta familia posee cerca de 60 géneros y alrededor de 170 especies que incluyen a las serpientes más mortíferas del mundo como el taipán, las mambas, serpientes marinas, cobras y coralillos.

Las primeras tres familias agrupan cerca del 63% de las especies de serpientes, sin embargo, el resto de este trabajo sólo hablará de la última de ellas debido a que es en ésta en donde se encuentran clasificadas las especies a las que se hará referencia.

Las cerca de 170 especies que conforman a la familia Elapidae representan aproximadamente el 7% de la diversidad de serpientes y varían enormemente en tamaño, hábitos y habitats. Estas especies han logrado colonizar prácticamente todos los tipos de habitat en diversas regiones del mundo. Se les puede encontrar en selvas, bosques, desiertos, matorrales, bosques nubosos, manglares e incluso dentro del mar. Los hábitos alimenticios de la familia son muy variados, las presas incluyen pequeños mamíferos, lagartos, serpientes y peces de diversas especies. Las horas de mayor actividad dependen de la especie y de la región geográfica de la que se trate. La talla promedio de estas especies se encuentra alrededor de los 140-150 cm, aunque la variación es muy grande ya que es posible encontrar especies que no rebasan los 50 cm (*Micruroides euryxanthus*) o bien especies que fácilmente alcanzan una longitud de más de 500 cm (*Ophiphagus hannah*).

Se ha propuesto la división de la familia en dos grandes subfamilias con base en la capacidad que presentan para mover ciertos huesos del cráneo (McDowell, 1969). Los miembros de la primer subfamilia, conocida como Elapinae, son capaces de mover el hueso palatino ligeramente hacia delante cuando el animal se dispone a morder. Debido a este movimiento fueron clasificadas como "erectores del palatino". Todas aquellas especies que no lograban realizar este movimiento fueron clasificadas como "arrastradores del palatino" y se colocaron en una segunda subfamilia conocida como Hydrophiinae. Aunque se han propuestos otras subdivisiones de la familia, esta es una de las más aceptadas y de

más fácil comprensión. Sólo cabe aclarar que a la subfamilia Hydrophiinae pertenecen todas las especies marinas y las australianas (géneros como *Acantophis*, *Aypisurus*, *Laticauda*, *Pelamis*, *Hydrophis* y otros); mientras que a Elapinae pertenecen todas las especies restantes (géneros como *Dendroaspis*, *Naja*, *Bungarus*, *Leptomicrurus*, *Micruroides*, *Micrurus* y otros). Tomado en cuenta estas consideraciones, en resumen la calificación taxonómica de las serpientes de coral americanas resulta como sigue:

Reino Animalia  
Phyllum Vertebrata  
Subphyllum Craniata  
Clase Reptiles  
Orden Squamata  
Suborden Serpentes  
Infraorden Caenophidia  
Familia Elapidae  
Subfamilia Elapinae  
Géneros Leptomicrurus  
Micruroides  
Micrurus

Resulta muy importante aclarar que aunado al hecho de que las relaciones filogénicas entre los diversos géneros de la familia Elapidae ha sido un tema muy controversial, las relaciones filogenéticas entre los géneros, y aún más dentro de las especies de serpientes de coral ha resultado aún más complicado de resolver. Los trabajos más importantes en torno a las relaciones filogenéticas entre las diversas especies de coralillos son los realizados por Roze (1996), Campbell y Lamar (1989), Slowinski (1991) y Slowinsky et al. (2001). Actualmente, uno de los pocos trabajos que intentan esclarecer la filogenia de los coralillos es el que se encuentra realizando el Dr. Eric N. Smith en la Universidad de Texas. Con base en lo propuesto por los autores antes citados y la valiosa aportación del Dr. Smith se pueden hacer ciertas conclusiones acerca del grupo:

1. Se reconocen dos grandes grupos de coralillos: Asiáticos y Americanos
2. Los coralillos Asiáticos se dividen en tres géneros: *Calliophis*, *Sinomicrurus* y *Maticora*
3. Los Americanos se dividen en tres géneros: *Leptomicrurus*, *Micruroides* y *Micrurus*.
4. Los coralillos Asiáticos forman un grupo parafilético con *Sinomicrurus* como grupo hermano de los americanos
5. *Micruroides euryxanthus* y *Micrurus distans* son las especies más antiguas dentro de los coralillos americanos.

Debido a que el trabajo del Dr. Smith aún no se encuentra publicado, la taxonomía utilizada en el presente estudio se basa fuertemente en la propuesta de Roze (1996) pero toma en cuenta las sugerencias propuestas por el Dr. Smith.

### Serpientes de coral o coralillos

Tanto en México como en otros países de América el nombre coralillo o serpiente de coral se asocia a una gran variedad de especies que presentan coloración roja en el cuerpo. Al parecer, el nombre coralillo o serpiente de coral se asocia al coral marino *Corallia rubra*, que por su color rojo brillante es ampliamente utilizado en la fabricación de joyas (Roze, 1996). Por otro lado, una de las características más ampliamente utilizadas para distinguir a un coralillo es la presencia de anillos a lo largo del cuerpo (de color negro, blanco o amarillo y rojo o rosa), aunque los coralillos verdaderos no son las únicas especies en las que se puede apreciar un patrón de anillos.

El mimetismo es uno de los fenómenos de mayor recurrencia en diversas especies de serpientes y el que ocurre entre los falsos corales y los coralillos verdaderos es uno de los que ha llamado mayormente la atención de diversos investigadores (Brodie y Moore, 1995; Savage y Slowinski, 1996; Roze, 1996, Campell y Lamar, 1989). Existen varias especies de serpientes inofensivas, o levemente venenosas, que imitan los patrones de coloración de los coralillos verdaderos con el fin de evitar ser depredados (Campbell y Lamar, 1989). Las creencias populares aseguran que es sencillo distinguir a un coralillo falso de un verdadero prestando atención al arreglo de los anillos. Un viejo dicho anónimo en inglés dice: "black and yellow kills a fellow, red and black it's OK Jack!" (en español el refrán dice: rojo y negro no hay veneno, rojo y amarillo es un coralillo). Este refrán hace referencia a la secuencia de las bandas en el cuerpo del animal: si el color negro y el amarillo están unidos se dice que se trata de un coralillo verdadero, de no ser así se trata de una culebra inofensiva (Figura 2).

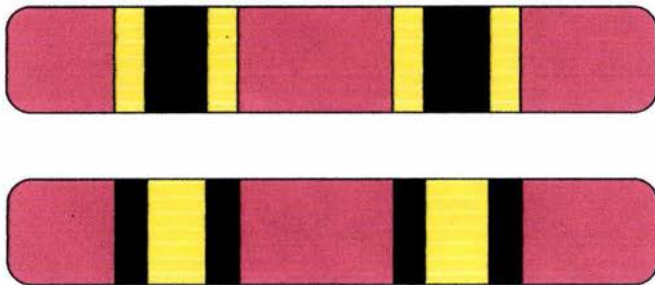


Figura 2. En ciertas regiones de América se puede distinguir un verdadero coralillo (superior: anillos negros delimitados por un par de anillos amarillos) de un falso coral (inferior: anillos amarillos o blancos rodeados por un par de anillos negros). Sin embargo, este fenómeno no es una regla y es sencillo confundir una especie con otra.

Los coralillos del sur de Estados Unidos y los del Norte de México se acoplan muy bien a esta descripción, sin embargo, hacia el centro de México y rumbo a Sudamérica los patrones de diferentes especies, tanto de coralillos verdaderos como falsos, cambian enormemente. Es posible encontrar coralillos que carecen por completo de anillos amarillos en el cuerpo (p. ej. *Micrurus bernadi*, *M. limbatus*, algunas subespecies de *M. diastema*) o bien que tienen el cuerpo completamente negro y sólo es posible ver los anillos en el vientre (*M. elegans*, *M. ephippiper*).

Existen tres géneros y alrededor de 50 especies de coralillos distribuidos desde el sur de Estados Unidos hasta el centro de Argentina. El género *Micruroides* contiene una

sola especie, *M. euryxanthus*. Su distribución está restringida al desierto de Arizona-Sonora a lo largo de la Sierra Madre Occidental hasta el sur de Sinaloa incluyendo Isla Tiburón al oeste del Estado de Sonora. Puede encontrarse desde el nivel del mar hasta los 1800 m de altitud (Roze, 1996).

El segundo género, *Leptomicrurus*, incluye cuatro especies endémicas de Sudamérica. *L. collaris* se encuentra en Venezuela, Surinam, las Guayanas y probablemente alcance la región del Pará en Brasil. *L. narducci* se distribuye desde el este de Ecuador por Perú y hasta el centro de Bolivia. Estas dos especies sólo alcanzan los 700 m en su distribución altitudinal (Roze, 1996). *L. renjifo* se conoce únicamente por un par de especímenes colectados en la región este de Colombia cerca de la frontera con Venezuela (Campbell y Lamar, 2004). *L. scutiventris* se localiza principalmente en la amazonia brasileña aunque también alcanza el este de Ecuador y Perú así como el sur de Colombia. Esta última especie es la que alcanza la mayor distribución altitudinal del género llegando a los 1200 msnm (Roze, 1996).

*Micrurus* es el último género de serpientes de coral y es el más diverso del grupo. Cuenta con cerca de 45 especies que se distribuyen desde el sureste de Estados Unidos hasta el centro de Argentina, habitan desde el nivel del mar hasta los 3000 m de altitud y han ocupado prácticamente todos los tipos de hábitat existentes dentro de su distribución (selvas, bosques, matorrales, desiertos, manglares, vegetación secundaria, etc.). En general, los coralillos son serpientes medianas que no rebasan el metro de longitud, sin embargo este último género incluye a las especies más grandes de las que se tiene registro (*M. spixii princeps*, 1602 mm; *M. a. ancoralis*, 1409 mm; *M. lemniscatus*, 1390 mm; Roze, 1996).

### Hábitos

Los coralillos son serpientes que pasan la mayor parte del tiempo escondidas y únicamente salen para alimentarse o encontrar pareja (Smith E. N., 2003, comunicación personal). Las horas de mayor actividad varían dependiendo de la especie y de la región geográfica en la que se encuentren. Así por ejemplo, en el desierto de Arizona, los coralillos mantienen su mayor actividad durante la noche, en cambio en zonas frías se les suele encontrar durante el día en las horas de mayor insolación. En regiones templadas, donde la temperatura no varía drásticamente, se les puede encontrar prácticamente a cualquier hora (Roze, 1996)

Todas las serpientes de coral son cazadoras activas. Su visión no es del todo buena así que el principal mecanismo de búsqueda se basa en el olfato. Una de las grandes limitantes para mantener coralillos en cautiverio es satisfacer las dietas tan especializadas que presentan. La mayoría de las especies se alimentan de colúbridos (serpientes como *Ninia*, *Geophis*, *Conopsis*, *Tantilla*, *Tantillita*, *Virginia*, *Thamnophis*, *Erythrolamprus*, *Liophis*, *Drymobius*, *Senticolis* y otras) además, de Scíncidos (*Eumeces*, *Scincella* y *Sphenomorphus*) o Anfisbénidos (*Amphisbaena*). Existen especies que, si bien en cautiverio se les ha alimentado con alguno de los grupos anteriores, prefieren dietas mucho más estrictas. Por ejemplo *Micruroides euryxanthus* se alimenta casi exclusivamente de serpientes gusano (*Leptotyphlops*), *Micrurus latifasciatus* tiene una preferencia particular por los dermófididos (un orden de anfibios), *M. surinamensis*, al parecer, sólo se alimenta de peces y las dos subespecies de *Micrurus hemprichii* han preferido un grupo especial de invertebrados: los onicóforos (Greene, 1973; Greene, 1997; Roze 1996; Da Silva y Aird, 2001).

## Anatomía general

La elongación antero-posterior del cuerpo trae como consecuencia ciertos cambios en la morfología de los órganos internos en serpientes al compararla con la sus antepasados lagartos. En coralillos esto no es una excepción y se ajustan al esquema regular de anatomía ofidia. Sólo el pulmón derecho es funcional, mientras que el izquierdo se encuentra tan reducido que resulta prácticamente inútil. En algunas especies es posible identificar un pulmón traqueal que no es otra cosa que una prolongación del tejido traqueal que llega a funcionar como un segundo pulmón cuando el verdadero está siendo estrechado al ingerir algún alimento (Bauchot, 1997; Roze, 1996).

El sistema circulatorio cuenta con un corazón tricavitario situado en el primer tercio del cuerpo. El sistema digestivo funciona igual que en mamíferos e incluye un estómago alargado que se conecta con los intestinos y tiene como destino final la cloaca. El sistema excretor cuenta con un par de riñones situados al lado de los órganos sexuales y al igual que el recto y los órganos genitales también desembocan en la cloaca (Bauchot, 1997; Roze, 1996).

La piel se divide en tres grandes partes: epidermis, dermis e hipodermis. La epidermis es la capa más externa, es rica en queratina y es la que se desecha en cada muda, además posee crestas y espinas que difractan la luz y le dan a la serpiente parte de su coloración; la siguiente, la dermis, es una capa córnea flexible donde se encuentran células no queratinizadas muy innervadas (que probablemente funcionen como órganos sensores); y por último, la hipodermis, se trata de una capa de células basales que posteriormente darán origen a células de las capas superiores (Bauchot, 1997; Roze, 1996).

En la hipodermis, al igual que en otros vertebrados, puede almacenarse grasa como reserva de energía. Los colores de las serpientes se deben a los tipos de cromatóforos presentes en la dermis (melanóforos, guanóforos, lipóforos y alóforos). No existen demasiadas glándulas asociadas a la piel pero las que existen son holócrinas (glándula cuya secreción es la totalidad de la célula) y no están vascularizadas. Existen glándulas asociadas a la cloaca (sacos anales) que, seguramente, juegan un papel importante durante la relación sexual. No existen glándulas sudoríparas por lo que la regulación térmica se lleva a cabo, principalmente, en forma conductual (Bauchot, 1997; Roze, 1996).

El aparato reproductor en hembras consta de un par de ovarios situados por encima de la cloaca que se conectan a ésta por medio de un par de oviductos. En machos existen un par de testículos situados por encima de la cloaca que se conectan, cada uno, a una estructura copulatorias conocida como hemipene que se mantiene guardada hacia la cola hasta el momento de la cópula. Las formas y las ornamentaciones de los hemipenes se han utilizado ampliamente para dividir grupos y reconocer especies (Bauchot, 1997; Keogh, 1998; Roze, 1996; Slowinsky, 1991).

Los órganos de los sentidos poseen las mismas características generales de los diferentes grupos de serpientes. La visión es moderadamente buena aunque no reaccionan a estímulos móviles (Greene, 1973). La audición se lleva a cabo captando vibraciones del suelo y transmitiéndolas al cerebro por medio de los huesecillos del oído interno acoplados a la mandíbula. El olfato está bien desarrollado y los olores son codificados en el órgano de Jacobson que se encuentra situado en la parte superior de la boca. Una de las

características distintivas de estas serpientes es la sensibilidad táctil que tienen a diferentes estímulos, esto probablemente se deba a la innervación de las células de la dermis (Greene, 1973; Bauchot, 1997; Roze, 1996).

#### Aparato de inoculación de veneno

Todas las especies de coralillos son venenosas y potencialmente peligrosas. Aún a finales de la década de 1960 se creía que un sólo rasguño de estos animales era suficiente para asegurar una horrible muerte a la víctima (Flowers, 1966). A partir de entonces se han realizado diversos estudios para medir la letalidad (Cohen et al., 1967), los efectos (Weis y McIsaac, 1971) y las características (Possani et al., 1979; Fix y Greenville, 1980) del veneno así como la potencia de algunos antivenenos para contrarrestar los efectos de la mordedura de estas serpientes (Cohen et al., 1968; Kocholaty et al., 1971; Bolaños et al., 1975, 1978; Gutiérrez et al., 1991; Aird y Da Silva, 1991; Da Silva et al., 1991; Tan y Ponnudurai, 1992).

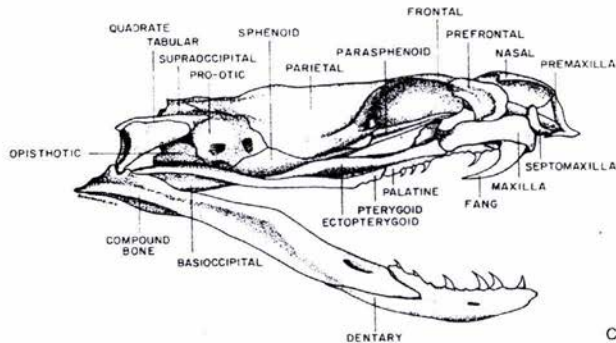
El aparato inoculador de veneno se encuentra en la cabeza del animal y consta de una par de glándulas donde se fabrica el veneno, asociadas a un par de colmillos fijos acanalados (en algunas ocasiones el canal se encuentra parcialmente cerrado) ubicados en la región anterior de la maxila (al frente de la boca).

En la Figura 3A pueden apreciarse los huesos que conforman la cabeza de una serpiente de coral. Se puede notar que existen dientes en cuatro huesos: el dentario, el palatino, el pterigoideo y el maxilar, siendo este último el hueso en el que se sitúan los colmillos. En la sección de generalidades se estableció una división de la familia Elapidae en dos grupos: marinos y terrestres, esta división está basada en la capacidad de ciertas especies de erectar el hueso palatino lo que significa que los músculos asociados hacen que este hueso se mueva ligeramente hacia adelante cuando se disponen a morder. Las especies que pueden lograr este movimiento son llamadas "erectores del palatino" y corresponden a los llamados elápidos terrestres, mientras que las que no lo hacen son conocidas como "arrastradores del palatino" y corresponden a los elápidos marinos ("palatine erectors" y "palatine draggers", respectivamente, véase McDowell, 1969)

La Figura 3B muestra los músculos y las glándulas asociados a la cabeza. Nótese que además de la glándula venenosa existen, al menos, otras cuatro glándulas adicionales: dos glándulas salivares ubicadas en la parte superior e inferior de la boca, las secreciones de estas glándulas sirven para lubricar el alimento y probablemente ayuden a predigerirlo; una glándula nasal que, al igual que en la mayoría de los reptiles, es responsable de secretar una solución salina altamente concentrada con lo cual se evita el gasto excesivo de agua; y la glándula hederiana que tiene la función de lubricar el órgano vomeronasal (o de Jacobson) implicado en la comunicación química y la caza de la presa (Roze, 1996).

Existe una glándula de veneno a cada lado de la cabeza (Figura 4). Estas glándulas poseen una región posterior secretoria donde se fabrica el veneno que se va estrechando hacia la región anterior hasta formar un tubo secretor o ducto de veneno, justo por detrás de los colmillos. Rodeando al ducto de veneno se encuentra una glándula mucosa que por medio de pequeños túbulos secreta su contenido hacia el mismo ducto. Tanto la glándula de veneno como la glándula mucosa e incluso el ducto de veneno están cubiertos por una cápsula de tejido conectivo que los protege de daños (Roze, 1996).

-A



B

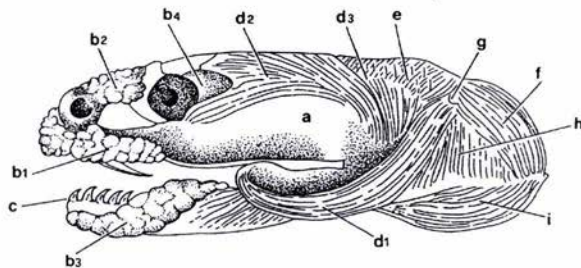


Figura 3A. Vista lateral del cráneo de *Micrurus frontalis*. Nótese que el colmillo se sitúa en el hueso maxilar en la región anterior de la boca. Los músculos asociados hacen que el hueso palatino logre moverse y colocarse en plano perpendicular al eje antero-posterior de la boca. Figura 3B. Glándulas y músculos de la cabeza de *Leptomicrurus narducci melanotus*. Además de la glándula de veneno (a), existen otras cuatro glándulas asociadas a la cabeza de los coralillos, dos glándulas salivares (b1 y b3), una glándula nasal (b2) y la glándula hederiana (b4). El único músculo que se asocia directamente a la glándula de veneno se conoce como *levator anguli oris* (porción ventral d1, porción dorsal anterior d2 y porción dorsal posterior d3). Músculos: aductor externo medial (e), depresor de la mandíbula (f), punto superior del cuadrado (g), aductor externo superficial (h), pterigoideo superficial (i). Tomado de Roze, 1996.

El veneno es expulsado de la glándula gracias a la ayuda de un músculo que se encuentra directamente asociado a ésta conocido como *levator anguli oris* (LAO). El LAO se divide en dos regiones, una dorsal y una ventral. La región dorsal se origina como fibras en la región postorbital, justo detrás del ojo, y encima del hueso parietal. La región ventral del LAO se origina en la superficie lateral de la mandíbula y se inserta en la glándula de veneno por medio de un tendón. Sólo en *Micruroides* las fibras musculares se insertan directamente en la glándula (Roze, 1996). Aún cuando los coralillos tienen una gran capacidad para controlar la cantidad de veneno que inoculan, este mecanismo de inyección es uno de los menos sofisticados en serpientes. De hecho la inoculación es tan lenta que cuando el animal muerde no suelta a la presa en ningún momento mientras busca su cabeza para iniciar la ingestión (Greene, 1973).

Este complejo aparato tiene como finalidad liberar el veneno hacia el tejido donde el animal está mordiendo. La cantidad de veneno que un coralillo pueda depositar varía en forma directa en función del tamaño del animal (Fix y Greenville, 1980) aunque también depende enormemente de la especie de la que se trate. La mayor cantidad de veneno obtenido para una coralillo en una sola ordeña fue de 160 mg de un ejemplar de *M. s. surinamensis* de Colombia. Mientras que la menor cantidad de veneno reportada ha sido de 6 mg para *Micruroides euryxanthus*. (Roze, 1996). En promedio, para la gran mayoría de las especies, se puede obtener entre 8 y 15 mg sin exponer al ejemplar a estrés excesivo.



Figura 4. Corte transversal de la glándula de veneno (mg) y la glándula accesoria (ag) de *Micrurus fulvius*. Tomado de Roze, 1996.

#### Venenos: química e inmuoquímica

La peligrosidad del veneno de estas serpientes era bien conocida por las culturas prehispánicas quienes aludían a sus llamativos colores para distinguirlas de las especies inofensivas. Sin embargo, existía la idea de que estos animales producían la muerte debido a que invocaban malos espíritus que eran los responsables de los síntomas que presentaban los pacientes. No fue sino hasta 1881 que el trabajo de Herman von Iherin demostró la capacidad de este veneno para matar palomas y puso en evidencia el hecho de que éste era el agente causante de la muerte (en Roze, 1996). Para inicios del siglo XX se obtuvo el primer suero antielapídico para América fabricado en Brasil por uno de los pioneros en el tratamiento antiofídico, Oswaldo Vital Brazil, y que tiempo después fundaría lo que hoy se conoce como el Instituto Butantan, el primer centro de investigación en esta área en el continente.

Los efectos fisiopatológicos de estos venenos han sido descritos por varios autores en referencia a diversas especies (Vital Brazil y Fontana, 1983; Russell, 1967; Weis y McIsaac, 1971; Vital Brazil, 1990; Bucarechi, 1990; Goularte *et al.*, 1993). El siguiente párrafo está modificado de Esteso *et al.* (1989) y refiere ampliamente la sintomatología de un paciente mordido por una serpiente de coral:



“Luego de la mordedura casi de inmediato aparece fuerte dolor, en el lugar de la misma, comparable a pinchazos; entre 5 y 10 minutos después de la mordedura aparecen sensaciones parestésicas [de adormecimiento] y de embotamiento a la sensibilidad, que se irradian al resto del miembro afectado, que ceden lentamente, ante las paresisis [alteraciones de la sensibilidad], que cada vez, son más notables. A los 30 minutos ya puede haber trastornos visuales, con visión doble, y/o pérdida de agudeza visual, con somnolencia, mareos y a veces opresión torácica, acompañado de lagrimeo, y salivación profusa, taquicardia y aumento de la frecuencia respiratoria. A los 60 minutos aparece ptosis palpebral [caída involuntaria de los párpados], con franca tendencia a dormirse. A los 120 minutos de evolución, la parálisis tiende a generalizarse, con síntomas de una verdadera curarización, especialmente en músculos intercostales y diafragma, lo que dificulta la respiración y la oxigenación normal. De 2 a 6 horas posteriores a la mordedura se llega a una parálisis completa y muerte del paciente por asfixia cuando no es tratado en forma específica”

Los síntomas relacionados a la parálisis respiratoria son comunes en el envenenamiento por elápidos debido a las toxinas que atacan, de varias maneras, la comunicación neuromuscular (Alape-Girón, 1997; Tsetlin, 1999). También se ha demostrado que estos venenos pueden tener efectos cardiovasculares y miotóxicos (Weiss y Mclsaac, 1971; Gutierrez et al., 1992; Barros et al., 1994),

El suero antielápidico fabricado en el Instituto Butantan se obtuvo (y obtiene) inmunizando caballos con una mezcla de los venenos de *Micrurus frontalis* (varias subespecies) y *M. corallinus*. Los primeros trabajos de reacción y protección cruzada así como de obtención de nuevos sueros mono y polivalentes se iniciaron a finales de la década de 1960. En 1966, Barrio y Miranda demostraron que diferentes subespecies de *M. frontalis*, de varias regiones de Argentina, reaccionaban con el suero del Butantan dando lugar a diferentes líneas de precipitación comprobando la existencia de antígenos comunes con identidad total o parcial y la existencia de antígenos no comunes entre los distintos taxa.

Cohen (1966) fue uno de los primeros investigadores en demostrar neutralización cruzada utilizando el suero del Butantan para tratar el envenenamiento por *M. fulvius*. Por otro lado, Flowers (1966) obtuvo un nuevo antiveneno inmunizando conejos contra el veneno de *M. fulvius* (probablemente *M. f. fulvius*) y no sólo demostró la capacidad neutralizante de este antiveneno sino que corroboró los resultados de neutralización cruzada de Cohen utilizando el suero del Instituto Butantan. Este antiveneno sería mejorado varios años después por Rawat y colaboradores (1994) utilizando cabras para la inmunización y recuperando fragmentos Fab de las inmunoglobulinas.

Para 1967, Cohen *et al.* estudiaron la respuesta inmunológica de los conejos, medida como capacidad neutralizante de los anticuerpos, al inmunizarlos contra el veneno de *M. f. fulvius*. No sólo encontraron que los conejos presentan una buena respuesta contra este veneno (logrando neutralizar hasta 38 DL50) sino que también sugieren que las neurotoxinas de diferentes especies pueden presentar respuestas antigénicas diferentes.

A partir de entonces se han reportado varios sueros experimentales, obtenidos con el veneno de de diferentes especies. En 1971 se obtuvo un suero de cabra contra el veneno de *M. f. fulvius* (Kocholaty *et al.*). Para 1975 el Instituto Clodomiro Picado, en Costa Rica, ya producía un antiveneno en caballos (inmunoglobulinas precipitadas con sulfato de amonio) contra los venenos de *M. nigrocinctus* y *M. alleni* (Bolaños *et al.*, 1973) que no sólo neutralizaba los venenos homólogos sino también el de *M. f. fulvius* y el de *M. dumerilli carinicauda*<sup>2</sup> pero no el de *M. mipartitus*; dos años después, los mismos autores (Bolaños *et al.* 1975) logran obtener un antiveneno de caballo contra el veneno de *M. mipartitus hertwigi*.

En 1978, Bolaños y colaboradores plantean el concepto de que los venenos de diferentes especies de coralillos pueden dividirse en tres grupos dependiendo del grado en el que son reconocidos por un antiveneno. A estos grupos se les llama grupos antigénicos y se propone que la inclusión de una especie representativa de cada uno de ellos en una mezcla antigénica para inmunización produciría los anticuerpos necesarios para neutralizar a los miembros restantes de su grupo. El antiveneno obtenido a partir de una mezcla equivalente de los venenos de *M. nigrocinctus*, *M. frontalis* y *M. mipartitus* es capaz de neutralizar los venenos de *M. f. fulvius*, *M. nigrocintus*, *M. dumerilli carinicauda*, *M. frontalis*, *M. corallinus*, *M. spixii*, *M. lemniscatus*, todos ellos miembros de los grupos 1 y 2 de los cuales *M. nigrocinctus* y *M. fontalis* son los representantes. Sin embargo, los venenos de *M. mipartitus* y *M. alleni* sólo pudieron ser neutralizados a un título muy bajo, mientras que el veneno de *M. surinamensis* no pudo ser neutralizado del todo. Los resultados que arroja este trabajo no sólo ayudaron a la obtención de un antiveneno de mayor espectro neutralizante sino que también aporta evidencias de la existencia de ciertos componentes tóxicos que no son fácilmente neutralizables.

Para 1994, utilizando anticuerpos monoclonales y sueros obtenidos por el Instituto Clodomiro Picado contra el veneno de *M. nigrocinctus*, y con el mejoramiento de la técnica de ELISA, Alape-Girón y colaboradores dividen los venenos de 13 subespecies de corales centro y sudamericanas en tres grandes grupos antigénicos: A) *M. n. nigrocintus*, *M. n. mosquitensis*, *M. dumerilli carinicauda*, *M. f. fulvius*, *M. alleni* y *M. albicinctus*; B) *M. frontalis frontalis*, *M. f. brasiliensis* y *M. s. spixii*; C) *M. s. surinamensis*, *M. ibiboboca*, *M. corallinus*, *M. hemprichii ortonii*, *M. lemniscatus helleri* y *M. mipartitus*. Esta división apoya a la ya sugerida por Bolaños y colaboradores en 1978.

Higashi *et al.* (1995), en Brasil, produjeron tres antivenenos monovalentes en caballo contra los venenos de *M. spixii*, *M. corallinus* y *M. frontalis* y un bivalente contra una mezcla de *M. corallinus-M. frontalis*. Las pruebas de neutralización demuestran que en todos los casos los antivenenos monovalentes presentan un mejor título neutralizante contra los venenos homólogos que el antiveneno bivalente contra los mismos venenos (neutralizan entre 50 y 70% menor cantidad de veneno por mililitro de antiveneno). En el 2001, Da Silva *et al.*, utilizando el mismo esquema de inmunización, muestran que en todos los casos existe reconocimiento de los componentes de diversas especies de coralillos sudamericanos por Western blot además de reconocer los venenos de *Dendroaspis*, *Notechis*, *Bungarus*, la cardiotoxina de *Naja kouthia* (todos pertenecientes a la subfamilia Elapinae) y algunos componentes de los venenos de *Crotalus durissus terrificus* y *Bothrops jararaca* (miembros de la familia Viperidae).

<sup>2</sup> En diferentes artículos se reporta esta especie como *M. carinicauda dumerilii*, sin embargo debido a cambios taxonómicos ahora es conocida como *M. dumerilii carinicauda*

-En México, durante 1997 y 2000 dentro de una colaboración del laboratorio del Dr. Alejandro Alagón del Instituto de Biotecnología de la UNAM y el Instituto Bioclón S. A. de C. V. se desarrolló un antiveneno en caballos contra el veneno crudo de una mezcla de algunas subespecies de *Micrurus nigrocinctus* (probablemente *M. n. nigrocinctus* y *M. n. mosquitensis*) que actualmente es procesado hasta obtener fracciones F(ab')<sub>2</sub> purificadas. En el 2000 éste producto se comercializó en nuestro país bajo el nombre de Coralmyn y desde entonces se ha utilizado para tratar las mordeduras de las diferentes especies de coralillos que están presentes en territorio nacional. Wisniewski et al. (2003) demostraron que este antiveneno es efectivo para neutralizar la letalidad del veneno de *M. f. fulvius*. Este resultado fue comprobado recientemente (de Roodt et al., 2004) y la neutralización del veneno de *M. fulvius* fue equivalente a la que ocurre con el veneno de *M. nigrocinctus*. En este mismo trabajo también se demostró que el Coralmyn no neutraliza la letalidad de los venenos de *M. pyrrhocryptus* y *M. surinamensis*. Interesantemente el antiveneno argentino anti-*Micrurus* (obtenido inmunizando con *M. pyrrhocryptus*) neutraliza no sólo el veneno homólogo sino también el de *M. surinamensis* y los venenos de las dos especies norteamericanas. Fuera de estos trabajos no existen mayores pruebas de reactividad y/o neutralización cruzada entre diferentes especies utilizando Coralmyn. Sin embargo, *in vivo* ha resultado un tratamiento muy eficaz contra la mordedura de varias especies aunque permanece en duda la identidad de éstas.

En comparación con otras especies de elápidos como cobras o mambas, el estudio de la bioquímica e inmunoquímica del veneno de las serpientes de coral ha tenido un desarrollo muy lento a lo largo de los últimos años. Esto se debe principalmente a tres factores:

- a) La dificultad de encontrar vivas a estas serpientes. Como se vió en el apartado de hábitos es muy complicado encontrar a estas serpientes en campo pues pasan la mayor parte de su vida escondidas y sólo se les ve cuando tienen la necesidad de comer o bien se encuentran en temporada reproductiva, lo cual, en paralelo contribuye al bajo número de accidentes que se produce por este grupo de serpientes;
- b) Lo complicado que resulta su mantenimiento en cautiverio. Lo cual no sólo obedece a satisfacer sus especializadas dietas, sino también a que muchas especies no logran adaptarse al cautiverio y suelen morir en menos de un año;
- c) La poca cantidad de veneno que se puede obtener de ellas por ordeña. No más allá de 20 mg por ordeña para la mayoría de las especies evitando al máximo que el animal se lastime o muera.

En cuanto a la cantidad de veneno que se obtiene de estas serpientes, Cohen et al (1968) reportan un promedio de 1.5 mg de veneno por ordeña de *M. dumerilii* y 3 mg por ordeña de *M. fulvius*. Bolaños et al. (1975) reportan la obtención de 200 mg de veneno de ordeñas continuas durante 6 años a varios individuos de *M. mipartitus hertwigii* (suponiendo una ordeña mensual esto implica un promedio de 16.7 mg por ordeña); Possani et al. (1979) reportan un promedio de 20.1 mg de proteína soluble por ordeña de *M. fulvius microgalbinaeus*. En 1980 Fix y Greenville obtuvieron un valor muy parecido para individuos adultos de *M. f. fulvius*. Las cantidades máximas y el promedio de veneno obtenido de diferentes especies se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Comparación de la cantidad de veneno obtenido por ordeña de varias especies de coralillos. Tomado de Roze, 1996.

Especie	Cantidad de veneno por ordeña (mg)	
	Máxima	Promedio
<i>M. e. euryxanthus</i>	6	0.12
<i>M. alleni</i>	-	3
<i>M. corallinus</i>	65	10-12
<i>M. d. dumerilli</i>	-	5-7
<i>M. frontalis (compuesto)</i>	62	10-12
<i>M. f. frontalis</i>	-	10-12
<i>M. f. altirostris</i>	-	8-10
<i>M. f. multicinctus</i>	-	8-10
<i>M. f. fulvius</i>	38	10-12
<i>M. f. tenere</i>	-	10-12
<i>M. isozonus</i>	-	9
<i>M. lemniscatus</i>	27	8-10
<i>M. mertensi</i>	-	2
<i>M. mipartitus decussatus</i>	-	7
<i>M. multifasciatus hertwigi</i>	-	12
<i>M. n. nigrocinctus</i>	20	7
<i>M. p. pyrrhocryptus</i>	80	8
<i>M. spixii obscurus</i>	131	41
<i>M. s. surinamensis</i>	160	56

A pesar de las limitantes anteriormente expuestas se han logrado determinar varias actividades enzimáticas e identificar componentes homólogos a algunas fracciones tóxicas del veneno de otros elápidos en los venenos de varias especies de coralillos. Uno de los primeros estudios a este respecto es el de Possani *et al.* (1979) en el que se logra identificar y recuperar una fracción del veneno de *M. f. microgalbinaeus* con actividad de fosfolipasa A2, además se logra obtener la secuencia amino terminal de esta fracción que es homóloga a la región amino terminal de fosfolipasas tipo A2 descritas para otro tipo de elápidos. Es hasta la década de los 90's que se vuelven a retomar este tipo de estudios y se logra la caracterización de tres fosfolipasas de *M. nigrocinctus* (Mochca-Morales *et al.*, 1990; Alape-Girón *et al.*, 1996b). Recientemente, con el desarrollo de las técnicas de biología molecular se han logrado caracterizar parcialmente alfa-neurotoxinas y fosfolipasas del veneno de *M. corallinus* (Silveira de Oliveira *et al.*, 2000; Castro de Oliveira *et al.*, 2003) y *M. surinamensis* (Aird *et al.*, 1993)

En cuanto a actividades enzimáticas se han detectado acetilcolinesterasas, fosfomonoesterasa alcalina, L-amino ácido oxidasa, 5' nucleotidasa, fosfolipasa, leucina amino peptidasa y, en baja proporción, hialuronidasa, fosfodiesterasa y una actividad marginal de proteasa en varias especies centro y sudamericanas, incluyendo a *M. f. fulvius* como único representante norteamericano, y cabe mencionar que estas actividades varían enormemente dentro de las distintas especies (Aird y Da Silva 1991; Da Silva y Aird, 2001; y véase Possani *et al.*, 1979; Tan y Ponnudurai, 1992). Por otro lado, también se ha detectado cierta actividad miotóxica (Gutierrez *et al.*, 1980, 1983, 1986; Barros *et al.*, 1994),

mionecrótica (Gutierrez *et al.*, 1992), cardiopéutica (Weis y McIsaac, 1971) y hasta hemorrágica (Francis *et al.*, 1997)

Como se mencionó anteriormente, el principal efecto de estos venenos se caracteriza por el debilitamiento muscular y parálisis flácida que pueden llevar a parálisis respiratoria. Al parecer este efecto se debe principalmente al bloqueo de los receptores colinérgicos de acetilcolina en la región postsináptica de la placa neuromuscular, aunque no se descarta la existencia de toxinas que logren inhibir la liberación de acetilcolina en la región presináptica. Da Silva *et al.* (1991) demostraron que existen componentes que corren igual que ciertas toxinas conocidas de otros elápidos (como neurotoxinas cortas y largas, cardiotoxinas y fosfolipasas con actividad de  $\beta$ -neurotoxinas) en RP-HPLC en columnas C4. En 1996 se demuestra la existencia de componentes que compiten, *in vitro*, con neurotoxinas tanto cortas ( $\alpha$ -cobratoxina) como largas ( $\alpha$ -bungarotoxina) del veneno de otros elápidos en el veneno de *M. n. nigrocinctus* (Alape Giron *et al.*, 1996a). En 1993 se reporta la primera secuencia parcial para una  $\alpha$ -neurotoxina de coralillo (Aird *et al.*, 1993) En 1996 y 1997, a partir de los venenos de *M. n. nigrocinctus* y *M. f. frontalis*, se lograron secuenciar los extremos amino terminal de varias proteínas de unión al receptor de acetilcolina cuyas secuencias (25 a 35 amino ácidos) guardan una gran similitud con neurotoxinas tanto cortas como largas de los venenos de cobras (Alape-Girón *et al.*, 1996b; Francis *et al.*, 1997; Silveira de Oliveira *et al.*, 2000; Castro de Oliveira *et al.*, 2003).

En adición, en el veneno de ciertos elápidos se han logrado encontrar proteínas que son capaces de bloquear la comunicación neuromuscular evitando la liberación de acetilcolina de la terminal nerviosa. Estas proteínas han sido identificadas como fosfolipasas y, aunque el mecanismo exacto de como ejercen su acción aún no es conocido a detalle, se sabe que es necesaria la actividad de fosfolipasa para que ésta actúe sobre los fosfolípidos de membrana y ejerzan su acción neurotóxica, además, se maneja la idea de la existencia de receptores específicos para estas toxinas en la membrana nerviosa (Montecucco y Rossetto, 2000; Krizaj y Gubensek, 2000).

Clínicamente, el envenenamiento por algunas especies de coralillos muestran acciones presinápticas (Vital-Brazil y Fontana, 1983; Vital-Brazil, 1990, para *M. corallinus*; Goularte *et al.*, 1993 para *M. nigrocinctus*). Como ya se había mencionado, se han podido detectar actividades (Tan y Ponnudurai, 1992; Aird y da Silva 1991; da Silva y Aird, 2001) e incluso secuencias parciales (Possani *et al.*, 1979; Mochca-Morales *et al.*, 1990; Alape-Girón *et al.*, 1996b; Francis *et al.*, 1997) de fosfolipasa. Sin embargo hasta el momento no se ha obtenido alguna fosfolipasa con actividad neurotóxica demostrada.

En este trabajo se busca comparar los venenos de varias especies de coralillos, principalmente mexicanas, con el objeto de conocer las semejanzas y diferencias que presentan entre ellos. El objetivo principal es proponer las especies cuyos venenos sean importantes para lograr un antiveneno del más amplio espectro posible. Además se aportarán datos de enorme importancia a nivel clínico también y a su vez se pretende ayudar a construir un conocimiento más sólido sobre el veneno de un grupo de serpientes que a lo largo de los años ha resultado muy complicado de estudiar.

## HIPÓTESIS

Los venenos de las serpientes de coral mexicanas responderán de formas distintas a los antivenenos probados y podrán clasificarse en más de un grupo antigénico.

## OBJETIVOS

### Generales

- Determinar el número de grupos antigénicos en los cuales puedan dividirse las serpientes de coral mexicanas.
- Probar la reactividad y efectividad de los diferentes antivenenos contra los venenos bajo estudio.
- Proponer especies cuyos venenos sean importantes como inmunógenos para lograr un antiveneno de amplio espectro

### Particulares

- Constituir un banco de venenos de serpientes de coral que incluya la mayor diversidad de especies de coralillos, principalmente mexicanas.
- Disponer de fuentes vivas de la mayor diversidad posible de coralillos mexicanas para la obtención constante de veneno
- Conocer la variedad de componentes protéicos que poseen estos venenos.
- Obtener suero hiperinmune de conejo contra los venenos crudos de *Micrurus distans* y *M. laticollaris*.
- Probar la reactividad del Coralmyn, el suero de conejo anti-*M. distans* y el suero de conejo anti-*M. laticollaris in vitro* contra los venenos bajo estudio.
- Probar la efectividad del Coralmyn, el suero de conejo anti-*M. distans* y el suero de conejo anti-*M. laticollaris* contra los venenos bajo estudio mediante ensayos de neutralización *in vivo*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Venenos

El cuadro 2 muestra las especies de las cuales se obtuvieron los venenos utilizados en éste trabajo.

Cuadro 2. Especies empleadas a lo largo del presente trabajo. Los números que siguen al nombre de la especie se refieren al ejemplar correspondiente de dicha especie. Las muestras señaladas como "cristalizadas" son ordeñas tomadas por algún colector y que fueron secadas a temperatura ambiente hasta su "cristalización". Las fechas señaladas se refieren a los días en los cuales se hicieron las ordeñas; en el caso de los venenos cristalizados o liofilizados la fecha se refiere al día en que fueron recibidas por el autor.

Especie	TIPO	Día	Mes	Año	Localidad
Micrurus browni 1	Cristalizado	11	Julio	2002	Chilpancingo, Guerrero.
Micrurus browni 2	Cristalizado	11	Julio	2002	Chilpancingo, Guerrero.
Micrurus browni 3	Ordeña	11	Julio	2002	Chilpancingo, Guerrero.
Micrurus browni 4	Ordeña	30	Junio	2003	El Zapotal, Chiapas.
Micrurus browni 5	Ordeña	30	Junio	2003	El Zapotal, Chiapas.
Micrurus browni 6	Ordeña	30	Junio	2003	El Zapotal, Chiapas.
Micrurus browni browni	Ordeña	18	Julio	2002	Ocotepec Mpio. de Chilpancingo, Guerrero.
Micrurus browni taylori	Ordeña	18	Julio	2002	Acahuizotla, Guerrero.
Micrurus diastema 1	Ordeña	11	Julio	2002	Córdoba, Veracruz.
Micrurus diastema 2	Ordeña	26	Agosto	2002	Córdoba, Veracruz.
Micrurus diastema 3	Ordeña	22	Octubre	2002	Córdoba, Veracruz.
Micrurus diastema 3	2a Ordeña	10	Diciembre	2002	Córdoba, Veracruz.
Micrurus diastema 3	3a Ordeña	22	Enero	2003	Córdoba, Veracruz.
Micrurus diastema 3	4a Ordeña	27	Marzo	2003	Córdoba, Veracruz.
Micrurus diastema 3	5a Ordeña	23	Mayo	2003	Córdoba, Veracruz.
Micrurus diastema 3	6a Ordeña	17	Noviembre	2003	Córdoba, Veracruz.
Micrurus diastema 3	7a Ordeña	1	Diciembre	2003	Córdoba, Veracruz.
Micrurus distans 1	Ordeña	20	Septiembre	2002	Estación de Biología Chamela, Jalisco.
Micrurus distans 1	2a Ordeña	22	Octubre	2002	Estación de Biología Chamela, Jalisco.
Micrurus distans 2	Ordeña	21	Noviembre	2002	Mpio de Alamos. Hermosillo, Sonora
Micrurus distans 3	Ordeña	22	Enero	2003	Chamela, Jalisco
Micrurus distans 3	2a Ordeña	3	Mayo	2003	Chamela, Jalisco
Micrurus distans 3	3a Ordeña	17	Noviembre	2003	Chamela, Jalisco
Micrurus distans 3	4a Ordeña	1	Diciembre	2003	Chamela, Jalisco
Micrurus distans 4	Ordeña	22	Enero	2003	Chamela, Jalisco
Micrurus distans 4	2a Ordeña	27	Marzo	2003	Chamela, Jalisco
Micrurus distans 4	3a Ordeña	3	Mayo	2003	Chamela, Jalisco
Micrurus distans 4	4a Ordeña	17	Noviembre	2003	Chamela, Jalisco
Micrurus distans 4	5a Ordeña	1	Diciembre	2003	Chamela, Jalisco
Micrurus elegans elegans	Ordeña	17	Noviembre	2003	Zongolica, Veracruz
Micrurus elegans elegans	2a Ordeña	1	Diciembre	2003	Zongolica, Veracruz

Micrurus ephippipher	Ordeña	11	Diciembre	2003	Mixtequilla. Oaxaca
Micrurus ephippipher	2a Ordeña	19	Enero	2004	Mixtequilla. Oaxaca
Micruroides euryxanthus	Ordeña	21	Noviembre	2002	Centro Ecológico de Sonora
Micrurus fulvius fitzingeri 1	Cristalizado	11	Julio	2002	Tepoztlán, Morelos.
Micrurus fulvius fitzingeri 2	Ordeña	11	Julio	2002	Tepoztlán, Morelos.
Micrurus fulvius fulvius	Liofilizado	28	Agosto	2002	Norte de la Florida, E.U.A.
Micrurus laticollaris 1	Ordeña	4	Julio	2002	Sierra de Huautla. Morelos.
Micrurus laticollaris 1	2a Ordeña	4	Septiembre	2002	Sierra de Huautla. Morelos.
Micrurus laticollaris 2	Ordeña	4	Julio	2002	Sierra de Huautla. Morelos.
Micrurus laticollaris 2	2a Ordeña	4	Septiembre	2002	Sierra de Huautla. Morelos.
Micrurus laticollaris 2	3a Ordeña	10	Diciembre	2002	Sierra de Huautla. Morelos.
Micrurus laticollaris 2	4a Ordeña	29	Octubre	2003	Sierra de Huautla. Morelos.
Micrurus laticollaris 3	Ordeña	4	Julio	2002	Yautepec, Morelos.
Micrurus laticollaris 3	2a Ordeña	4	Septiembre	2002	Yautepec, Morelos.
Micrurus laticollaris 3	3a Ordeña	10	Diciembre	2002	Yautepec, Morelos.
Micrurus laticollaris 4	Cristalizado	4	Julio	2002	
Micrurus l. maculirostris 5	Ordeña	7	Julio	2003	Barra de Navidad-La huerta, Jalisco
Micrurus laticollaris 6	Ordeña	1	Diciembre	2003	Xantiapa. Morelos
Micrurus limbatus 1	Ordeña	26	Agosto	2002	Los Tuxtlas, Veracruz.
Micrurus limbatus 2	Ordeña	26	Agosto	2002	Los Tuxtlas, Veracruz.
Micrurus limbatus 3	Ordeña	22	Octubre	2002	Los Tuxtlas, Veracruz.
Micrurus limbatus 4	Ordeña	22	Octubre	2002	Los Tuxtlas, Veracruz.
Micrurus limbatus 4	2a Ordeña	10	Diciembre	2002	Los Tuxtlas, Veracruz.
Micrurus limbatus 4	3a Ordeña	22	Enero	2003	Los Tuxtlas, Veracruz.
Micrurus nigrocinctus 1	Liofilizado	28	Agosto	2002	Costa Rica
Micrurus nigrocinctus 2	Ordeña	27	Julio	2003	Guatemala
Micrurus nigrocinctus 3	Ordeña	27	Julio	2003	Guatemala
Micrurus nigrocinctus 4	Ordeña	27	Julio	2003	Guatemala
Micrurus nigrocinctus 4	2a Ordeña	27	Julio	2003	Guatemala
Micrurus nigrocinctus 5	Ordeña	27	Julio	2003	Guatemala
Micrurus nigrocinctus 5	2a Ordeña	30	Julio	2003	Guatemala
Micrurus nigrocinctus 6	Ordeña	27	Julio	2003	Guatemala
Micrurus sp.	Congelado	20	Septiembre	2002	
Micrurus surinamensis	Liofilizado	28	Agosto	2002	Colombia
Micrurus tenere 1	Cristalizado	11	Julio	2002	Ciudad Victoria, Tamaulipas.
Micrurus tenere 2	Cristalizado	11	Julio	2002	Ciudad Victoria, Tamaulipas.

Todas las muestras fueron suspendidas en amortiguador acetato de amonio 20 mM pH 4.7 y la concentración de proteína fue determinada por absorbancia asumiendo que una unidad de absorbancia a 280 nm es igual a 1 mg/ml. Todas las muestras se guardaron a -70° C hasta su utilización.



## Geles -

Se utilizó el sistema discontinuo de Laemmli (Laemmli, 1970). Se cargaron 25 µg de proteína total en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE): 4% acrilamida/bisacrilamida (29:1) para el gel concentrador y 17% acrilamida/bisacrilamida (29:1) para el gel separador, en presencia de β-mercaptoetanol (condiciones reductoras). Las muestras se suspendieron en amortiguador de corrida (10% glicerol, 2.5% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% β-mercaptoetanol, 0.002% azul de bromofenol) y se hirvieron durante 5 minutos antes de colocarlos en el gel. La corrida se realizó a 120 V por aproximadamente 2 hrs. Al finalizar, los geles se transfirieron a solución de azul brillante de Coomasie (50% metanol, 10% ácido acético, 0.2% azul de Coomasie G250) y fueron desteñidos con una solución 10% metanol, 10% ácido acético. Para el caso de tinción con plata se siguió el mismo procedimiento de carga y corrida y se utilizó el protocolo de tinción con plata (ver anexos).

## Inmunizaciones y obtención de sueros hiperinmunes

Se utilizaron cuatro conejos hembra cepa Nueva Zelanda entre 1.8 y 2.5 Kg para inyectarlos via subcutánea con concentraciones crecientes de veneno de *Micrurus distans* (dos conejos) y *M. laticollaris* (los dos restantes); los esquemas de inmunización se muestran en los cuadros 3 y 4 en la sección de anexos. Las sangrías se hicieron en las venas de las orejas en las semanas señaladas en cada cuadro. La sangre recuperada en las diferentes sangrías fue incubada a 37° C durante 2 horas para permitir su coagulación e inmediatamente después fue colocada en hielo por 30 min, al termino de lo cual se decantó el suero y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. Se recuperó el suero restante resultado de la contracción del coagulo y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. Los sueros recuperados se alicuotearon y se guardaron a -20° C hasta su utilización.

## Western blots

Se siguieron los mismos lineamientos tomados para correr las muestras en SDS-PAGE excepto que la cantidad total de proteínas fue de 20 µg. Al finalizar la electroforésis los geles se colocaron en contacto con una membrana de nitrocelulosa (Trans Blot 0.45 µm, Bio Rad) y las bandas se electrotransfirieron durante una hora a 420 mA. Al finalizar la transferencia, las membranas se incubaron con leche (Carnation 5%) por una hora para bloquear los sitios libres. Después del bloqueo, se incubaron con los diferentes antivenenos a diluciones 1:500 para el Coralmyn y el suero de conejo anti-*distans* y 1:1000 para el suero de conejo anti-*laticollaris*. Después del lavado, las membranas se incubaron con anticuerpos anti-caballo y anti-conejo (Zymed Lab.) acoplados a fosfatasa alcalina en diluciones 1:1000. Las bandas se revelaron utilizando el paquete de revelado BCIP/NBT (Zymed Lab.) siguiendo las instrucciones del fabricante (ver anexos).

## ELISAs

Se sensibilizaron placas Maxisorb (NUNC™ Brand Products) con 100 µl por pozo de una solución 1 µg/ml (100 ng/pozo) de veneno en amortiguador de carbonatos 100 mM pH 9.6 (ver anexos). Los diferentes antivenenos se diluyeron 1:30 en la primera columna y a partir de ahí se hicieron diluciones 1:3 hasta la columna 10 (ver anexos). Los títulos se definieron como la dilución de antiveneno a la cual se alcanza el 50% de la absorbancia máxima, los valores fueron calculados utilizando el programa Graph Pad Prism (v. 2.0b). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 405 nm en un lector de microplacas (Bio Rad 550).

## ELISAs competitivos

Se utilizaron dos placas por prueba: la placa A, de reacción, y la placa B, de preincubación. La placa A se sensibilizó con 100 µl/pozo de solución de veneno 1 µg/ml en amortiguador de carbonatos 100 mM pH 9.6 y fueron luego bloqueadas con una solución 50 mM Tris-HCl, 0.5% gelatina, 0.2% Tween 20 (solución de bloqueo). La placa B fue bloqueada con 200 µl/pozo de solución de bloqueo y, luego de ser lavada, se incubaron concentraciones variables de veneno competidor (iniciando con 266 µg/ml en el caso de los competitivos contra *M. laticollaris*; 100 µg/ml para los competitivos contra *M. nigrocinctus*; y 200 µg/ml para el caso de *M. distans*) con diluciones constantes de antiveneno que corresponden al 75% de la absorbancia máxima en los ensayos de ELISA (1:64, 000 para el suero anti-distans, 1:100, 000 para el suero anti-laticollaris y 1:4, 000 para el Coralmyn). Luego de una hora de preincubación a 37 °C se pasó el contenido de la placa B a los pozos correspondientes en la placa A y se incubaron a 37° C por una hora. La detección de los anticuerpos se realizó utilizando anticuerpos de conejo anti-caballo o de cabra anti-conejo (Zymed Lab.) acoplados a peroxidasa en diluciones 1:1000 (ver anexos)

## Determinación de DL50 y neutralizaciones

Para ambos ensayos se utilizaron grupos de 4 ratones cepa CD 1 entre 18 y 20 g de peso por dosis. Los ratones fueron inyectados por vía intravenosa. Las lecturas (número de ratones muertos) se realizaron a las 24 y 48 hrs. Las determinaciones de las dosis letales y las dosis efectivas se realizaron utilizando el programa Graph Pad Prism (v. 2.0b). Para el caso de las neutralizaciones, se preincubaron concentraciones constantes de veneno (correspondientes a 3 DL50) con volúmenes variables de antiveneno por 30 min. a 37° C. El Coralmyn (lote B-2D-06), que se presenta en forma liofilizada, fue reconstituido en la solución de inyección suministrada por el fabricante (solución salina isotónica, NaCl 0.85%).

## RESULTADOS

A fin de conocer la diversidad de componentes protéicos que poseen los venenos de las serpientes de coral analizadas, las muestras se sometieron a corrimiento electroforético en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol (véase Materiales y Métodos).. Con el fin de saber si existían proteínas que no se tiñeran con azul de Coomasie uno de los geles se tiñó utilizando plata (Figura 5). Dado que no existen diferencias importantes entre los dos tipos de tinción sólo se emplearon tinciones de Coomasie. Los geles resultantes se muestran en la Figura 6.

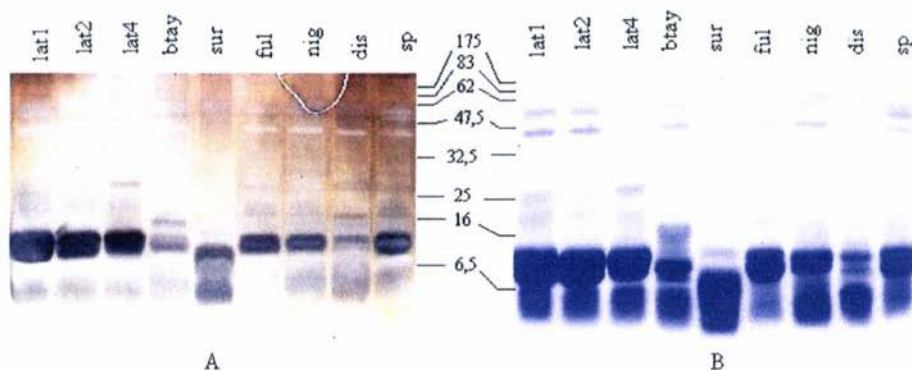


Figura 5. Comparación entre las tinciones de plata (A) y azul brillante de coomasie (B) para los venenos de coralillos. Las muestras (25  $\mu$ g de proteína total) se corrieron bajo condiciones desnaturalizantes (con SDS) en presencia de un agente reductor ( $\beta$ -mercaptoetanol) en geles de acrilamida:bisacrilamida 17%. Las abreviaturas corresponden a las de la Figura 6.

A partir de los resultados obtenidos en los análisis por SDS-PAGE se puede dividir los componentes de los diferentes venenos de coralillos en tres grandes grupos:

a) Bajo peso molecular. Iguales o menores a 16 KDa. Son los más abundantes en las distintas muestras. En promedio existen cinco bandas por veneno aunque en algunos casos pueden llegar a 8 (p. ej. *M browni*). Las bandas más prominentes de este grupos se presentan entre los 6 y 8 Kda y probablemente se traten de  $\alpha$ -neurotoxinas dado que corresponde al peso molecular reportado para estas proteínas (Tsetlin, 1999) También existen bandas de gran tamaño entre los 14 y 16 KDa y probablemente se trate de fosfolipasas A2 que suelen caer en este rango en las especies de elápidos en las que ya se han caracterizado (Six y Dennis, 2000).

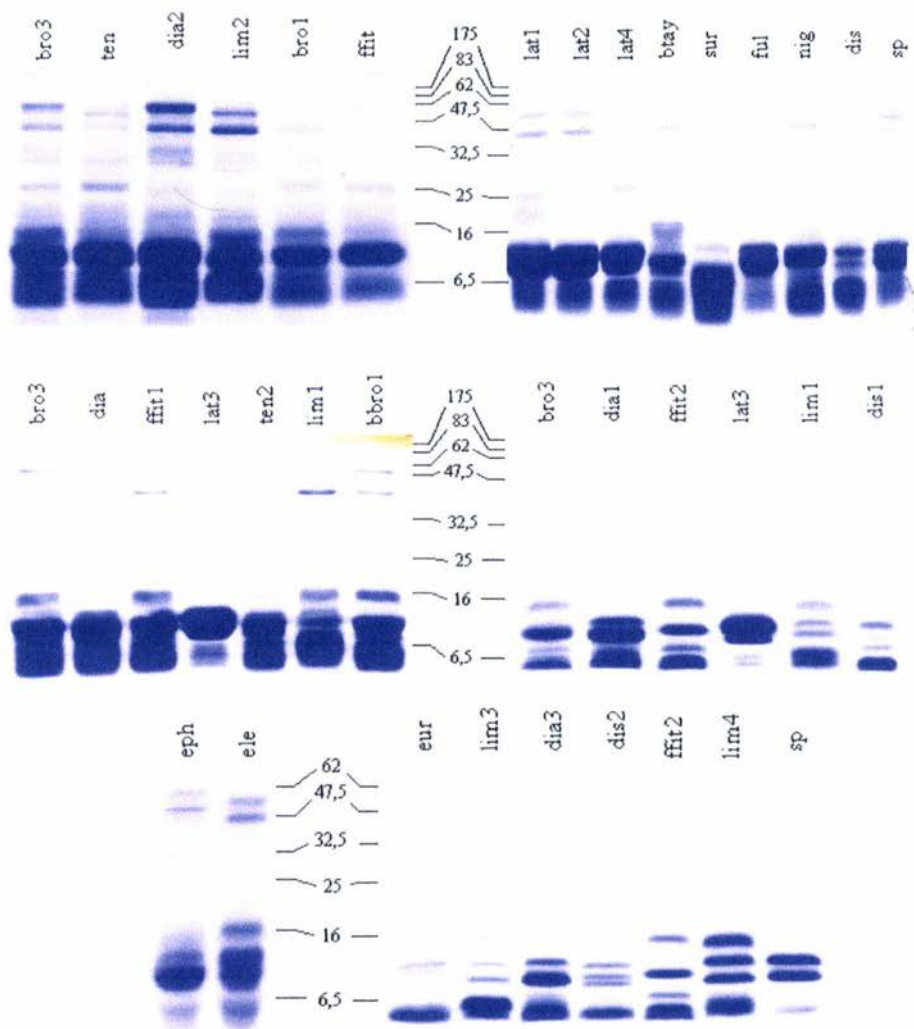


Figura 6. SDS-PAGEs de los venenos de diferentes especies de coralillos. Las muestras (20 µg de proteína total) se corrieron en condiciones reductoras en gels de acrilamida:bisacrilamida 17%. bro = *Micrurus browni*; bbro = *M. browni browni*; btay = *M. browni taylori*; dia = *M. diastema*; dis = *M. distans*; ele = *M. elegans*; eph = *M. ephippiper*; ful = *M. fulvius*; ffit = *M. fulvius fitzingeri*; lat = *M. laticollaris*; lim = *M. limbatus*; nig = *M. nigrocinctus*; sur = *M. surinamensis*; ten = *M. tenere*; eur = *Micruroides euryxanthus*. Los números corresponden al ejemplar de dicha especie (ver Cuadro 2)

b) Peso molecular intermedio. Mayores a 16 y menores a 40 KDa. Estas bandas son muy difíciles de apreciar tanto con azul brillante de Coomassie como con plata a simple vista. Se pueden llegar a observar hasta 4 bandas en el veneno de *M. fulvius* (dos entre los 16 y 25 KDa, una mayor a 25 KDa y una menor a 40 KDa), 2 en *M. laticollaris* (alrededor de los 25 KDa), dos en *M. browni taylori* y *M. distans* (una cerca de los 18 y otra por debajo de los 40 KDa), tres en *M. browni* y *M. tenere* (cerca de los 18, 20 y 25 KDa) y una en *M. fulvius fitzingeri* (cerca de los 25 KDa)

c) Alto peso molecular. Iguales o mayores a 40 KDa. Son los segundos componentes más abundantes en los venenos. En algunas especies pueden apreciarse tres bandas que caen en este rango (*M. browni*, *M. diastema*, *M. nigrocinctus*), aunque en la mayoría de los venenos analizados sólo pueden observarse dos (*M. f. fitzingeri*, *M. laticollaris*, *M. tener*, *M. b. browni*, *M. b. taylori*, *M. fulvius*, *M. distans* y *M. diastema*) o una (*M. limbatus*, *M. surinamensis* y *Micruroides euryxanthus*). La identidad de estas bandas es desconocida aunque una de ellas probablemente se trate de hialuronidasa.

Los análisis por western blot muestran que todos los antivenenos son capaces de reconocer varias bandas en los diferentes venenos de coralillos (Figuras 7 a 9). En promedio, el Coralmyn reconoce un 88% del total de componentes de los diferentes venenos, mientras que el suero anti-*laticollaris* reconoce cerca del 72% y para el suero anti-*distans* esta cantidad se reduce al 54%.

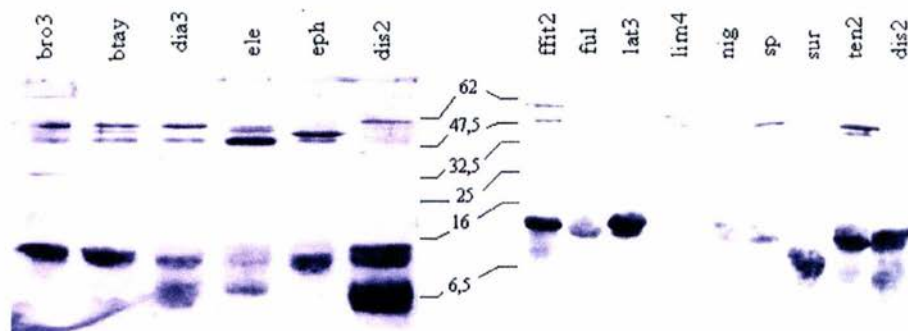


Figura 7. Western blots utilizando suero de conejo anti-*distans* como anticuerpo de reconocimiento en dilución 1:1000; 20 µg totales de veneno. Las condiciones de corrimiento del gel fueron las mismas que se siguieron para los SDS-PAGE. Las abreviaturas corresponden a las de la Figura 6.

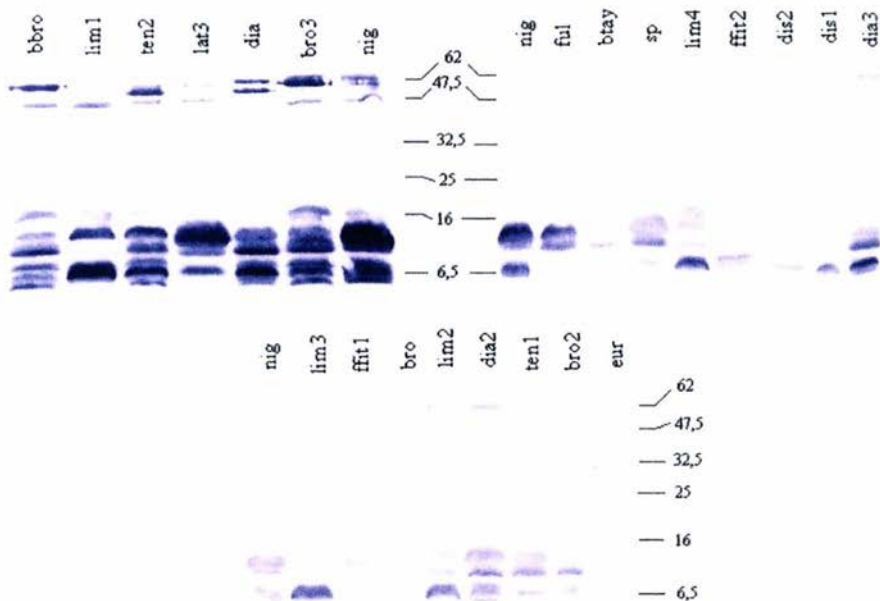


Figura 8. Western blots utilizando el Coralmyx como anticuerpo de reconocimiento en dilución 1:500; 20 µg totales de veneno. Las condiciones de corrimiento del gel fueron las mismas que se siguieron para los SDS-PAGE. Las abreviaturas corresponden a las de la Figura 6.

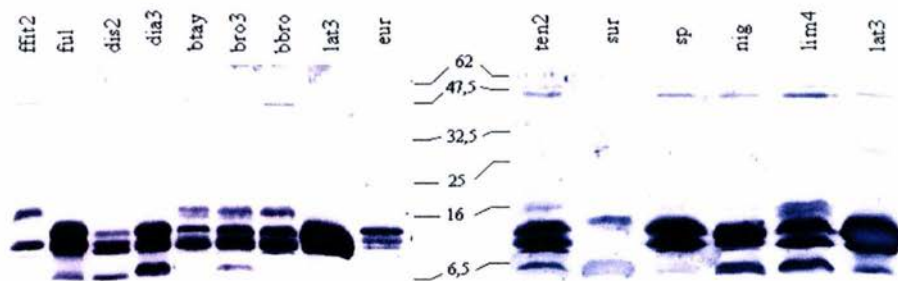


Figura 9. Western blots utilizando el suero de conejo anti-laticollaris como anticuerpo de reconocimiento en dilución 1:500 excepto para *M. euryxanthus* (1:1000); 20 µg totales de veneno. Las abreviaturas corresponden a las de la Figura 6.

Los ensayos de ELISA fueron utilizados para determinar el nivel de reconocimiento que presentan los tres antivenenos contra los diferentes venenos. En el cuadro 5 se muestran los títulos (definidos como la dilución a la cual se obtiene la mitad de la respuesta máxima) de los diferentes antivenenos y además se muestra un cuadro, para fines

comparativos, en donde estos mismos títulos se presentan como porcentajes de la respuesta del veneno homólogo. Todos los antivenenos muestran una buena respuesta contra los distintos venenos siendo el suero de conejo anti-laticollaris el que presenta los títulos más altos (162, 000 en promedio a comparación de 130, 000 para el suero anti-distans y 7, 500 para el Coralmyn). Sin embargo, cuando la comparación se realiza tomando en cuenta el porcentaje que estos títulos representan en comparación con el veneno homólogo la respuesta de los sueros de conejo es mucho menor de la que presenta el Coralmyn (en promedio 92% para el Coralmyn, 78% para el suero anti-distans y 50% para el suero anti-laticollaris). Es decir, a pesar de los enormes títulos que presenta el suero anti-laticollaris en realidad sólo corresponde a la mitad de la reactividad contra los heterólogos si se compara con el veneno homólogo, en cambio el Coralmyn presenta una reactividad muy grande contra los diferentes venenos aún cuando los títulos no son demasiado altos.

Cuadro 5A. Títulos (dilución a la cual se alcanza el 50% de la absorbancia máxima a 405 nm) de los tres antivenenos contra los distintos venenos. Las placas se sensibilizaron con 100 µl por pozo de una solución 1 µg/ml de cada veneno. Los antivenenos fueron prediluidos 1:30 y posteriormente se hicieron diluciones seriadas 1:3. El anticuerpo de revelado (anti-caballo o anti-conejo acoplados a peroxidasa) se utilizó en dilución 1:1000. Cuadro 5B. Porcentaje que representan los títulos mostrados en el cuadro 5A con respecto a los tres venenos homólogos (en negritas).

A			
	Coralmyn	anti-laticollaris	anti-distans
<i>M. browni</i>	4900	164000	176000
<i>M. b. browni</i>	4600	170000	160000
<i>M. b. taylori</i>	4800	130000	94000
<i>M. diastema</i>	10200	165000	255000
<i>M. distans</i>	6700	88500	<b>165000</b>
<i>M. euryxanthus</i>	2600	140600	77500
<i>M. f. fitzingeri</i>	6000	98000	56000
<i>M. fulvius</i>	9900	175000	130000
<i>M. laticollaris</i>	14600	<b>324500</b>	140000
<i>M. limbatus</i>	10900	137000	84000
<i>M. nigrocinctus</i>	<b>8200</b>	165000	180000
<i>M. sp.</i>	8100	150000	140000
<i>M. tener</i>	6300	200000	75000
B			
	Coralmyn	anti-laticollaris	anti-distans
<i>M. browni</i>	56.0	52.3	106.6
<i>M. b. browni</i>	59.8	50.5	96.7
<i>M. b. taylori</i>	59.0	39.7	56.7
<i>M. diastema</i>	124.1	50.8	154.7
<i>M. distans</i>	81.3	27.3	<b>100.0</b>
<i>M. euryxanthus</i>	31.3	43.3	46.9
<i>M. f. fitzingeri</i>	73.3	30.1	34.2
<i>M. fulvius</i>	120.6	53.9	80.8
<i>M. laticollaris</i>	178.2	<b>100.0</b>	85.0
<i>M. limbatus</i>	132.8	42.3	50.7
<i>M. nigrocinctus</i>	<b>100.0</b>	50.8	108.2
<i>M. sp.</i>	99.5	46.3	85.6
<i>M. tener</i>	76.7	61.5	45.6

Con el fin de comprobar y cuantificar la existencia de epítopes compartidos entre los componentes de los distintos venenos de corallillos probados, se montaron pruebas de ELISAs competitivos. La base de estos ensayos se explica en la Figura 10. La idea general se basa en la capacidad que tenga un antígeno B para ser reconocido por un anticuerpo dirigido contra un antígeno A compitiendo su pegado a este último. Para ver este efecto se obtiene una curva dosis respuesta en la que se grafica la absorbancia en función del logaritmo de la concentración de antígeno competidor, antígeno B, (figura 10B). En la figura 10A se establece que el antígeno A se encuentra en fase sólida, es decir, inmobilizado y a concentración constante. Así, cuando el antígeno competidor se encuentre en una concentración muy baja o inexistente se obtendrá la mayor respuesta posible (en este mismo punto se dice que no existe competencia). Sin embargo si el antígeno competidor se encuentra en una alta concentración y posee los sitios de reconocimiento tales que le permitan al anticuerpo anti-A unirse a él y formar un complejo estable, entonces la respuesta observada bajará hasta un límite propio de cada antígeno competidor.

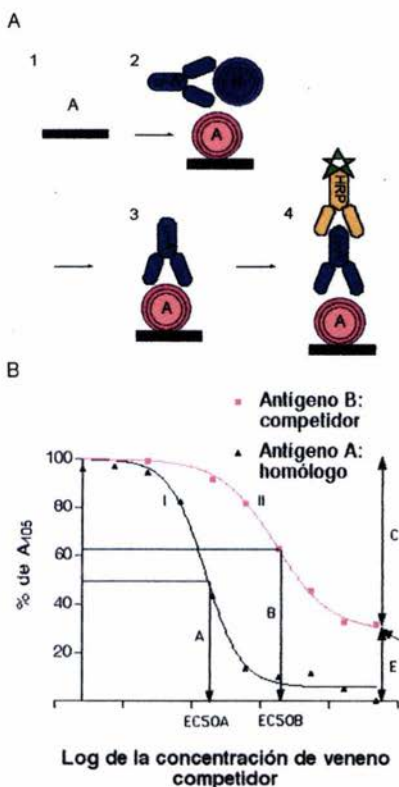


Figura 10 A). Esquema de la prueba de ELISA competitivo. La prueba se realiza en cuatro etapas: en la primera de ellas se fija un antígeno A, utilizado para la obtención de anticuerpos anti-A (homólogo), a una placa. Mientras tanto en otra placa se incuban un segundo antígeno, B (antígeno heterólogo o competidor), con una concentración dada (aquella que da una respuesta del 50-75% del título en ELISA) de los anticuerpos anti-A. La segunda etapa se inicia cuando la mezcla de antígeno B y anticuerpos anti-A se incuban con el antígeno A fijado en la placa. La formación de complejos B-anti-A disminuirá la cantidad de anticuerpos libres disponibles para unirse al antígeno A lo que se ve reflejado en un menor nivel de respuesta (menor intensidad de color). (Figura 10 B.) La curva I muestra la curva esperada al competir el mismo antígeno en fase líquida con el que se encuentra en fase sólida. En este caso la competencia es total y "A" indica la concentración de antígeno en fase líquida necesaria para inhibir el 50% del pegado de los anticuerpos a los antígenos de la fase sólida. La curva II muestra la competencia del pegado de los anticuerpos a antígenos en la fase sólida por antígenos en la fase líquida que son parecidos (pero no iguales) a los de la fase sólida. "D" indica el porcentaje de competencia máxima. "B" es la concentración de antígenos en la fase líquida necesarios para inhibir 50% del pegado de los anticuerpos a antígenos en la fase sólida en la región competitiva "C". "E" es la región no competitiva e indica el porcentaje de epítopes que son diferentes entre los dos tipos de antígenos.



Los análisis por ELISAs competitivos muestran que existen por lo menos dos subpoblaciones antigénicas en los venenos heterólogos: la primera de ellas la forman aquellos antígenos que aún en las concentraciones más altas probadas no muestran inhibición de la unión del anticuerpo anti-A al antígeno homólogo (zona E, Figura 10B); la segunda subpoblación esta formada por todos los antígenos que logran inhibir la unión del anticuerpo anti-A al antígeno homólogo (zona C, Figura 10B). Los antígenos pertenecientes a la segunda subpoblación, antígenos de la zona C, son reconocidos con distinta intensidad por los anticuerpos; la EC50 es una medida de la afinidad promedio de los anticuerpos por estos antígenos (Cuadros 6 a 8)

Los Cuadros 6 a 8 resumen los datos de competencia para cada uno de los venenos y los distintos venenos homólogos probados (ver anexos para cuadros más completos) mientras que las Figuras 11 a 13 muestran las gráficas de competencia.

Cuadro 6. Resumen de los datos de competencia entre los distintos venenos en fase líquida, el veneno de *M. distans* en fase sólida y el suero de conejo anti-distans (véanse las Figuras 10 y 11 para mayor referencia). EC50 se refiere a la concentración ( $\mu\text{g/ml}$ ) necesaria de veneno en fase líquida para competir el 50% de la fracción competitiva del veneno de *M. distans* en fase sólida. H. S. = pendiente de Hill de las diferentes curvas. El porcentaje de competencia máxima indica el porcentaje de inhibición del pegado de los anticuerpos al veneno en fase sólida en la mayor concentración utilizada de veneno competidor. +: competencia  $\leq 60\%$ ; ++ competencia mayor a 60 y menor a 80%; +++ : competencia  $\geq 80\%$ .

	ANTI-DISTANS			
	EC50	H. S.	% Competencia Máx	Competencia
<i>M. sp.</i>	18.056	-0.426	60.1	+
<i>M. fulvius</i>	13.514	-0.350	52.1	+
<i>M. laticollaris</i>	0.429	-0.666	47.7	+
<i>M. nigrocinctus</i>	40.638	-0.399	56.3	+
<i>M. surinamensis</i>	2181.100	-0.361	36.1	+
<i>M. b. taylori</i>	27.033	-0.387	77.4	++
<i>M. browni</i>	25.057	-0.360	62.6	++
<i>M. limbatus</i>	2.205	-0.619	67.3	++
<i>M. b. browni</i>	73.967	-0.437	81.1	+++
<i>M. diastema</i>	51.362	-0.414	91.4	+++
<i>M. distans</i>	<b>22.376</b>	<b>-0.508</b>	<b>100.0</b>	<b>+++</b>
<i>M. f. fitzingeri</i>	269.197	-0.424	85.3	+++
<i>M. tener</i>	29.823	-0.481	80.6	+++

Guadro 7. Resumen de los datos de competencia entre los distintos venenos en fase líquida, el veneno de *M. laticollaris* en fase sólida y el suero de conejo anti-laticollaris (véanse las figuras 10 y 12 para mayor referencia). EC50 se refiere a la concentración ( $\mu\text{g/ml}$ ) necesaria de veneno en fase líquida para competir el 50% de la fracción competitiva del veneno de *M. laticollaris* en fase sólida. H. S. = Pendiente de Hill de las diferentes curvas. El porcentaje de competencia máxima indica el porcentaje de inhibición del pegado de los anticuerpos al veneno en fase sólida en la mayor concentración utilizada de veneno competidor +:competencia  $\leq 60\%$ ; ++ competencia mayor a 60 y menor a 80%; +++ : competencia  $\geq 80\%$ .

ANTI-LATICOLLARIS				
	EC50	H. S.	% Competencia Máx	Competencia
<i>M. b. taylori</i>	0.549	-0.435	59.1	+
<i>M. distans</i>	0.114	-0.368	40.8	+
<i>M. f. fitzingeri</i>	6.530	-0.720	56.8	+
<i>M. fulvius</i>	0.310	-0.462	51.7	+
<i>M. limbatus</i>	0.558	-0.752	41.3	+
<i>M. nigrocinctus</i>	0.435	-0.664	58.5	+
<i>M. surinamensis</i>	62.068	-0.376	56.3	+
<i>M. b. browni</i>	0.341	-0.414	63.8	++
<i>M. browni</i>	0.552	-0.483	61.4	++
<i>M. diastema</i>	ND	ND	70.3	++
<i>M. sp.</i>	5.755	-0.350	63.5	++
<b><i>M. laticollaris</i></b>	<b>0.492</b>	<b>-0.534</b>	<b>100.0</b>	<b>+++</b>
<i>M. tener</i>	24.573	-0.449	91.5	+++

Cuadro 8. Resumen de los datos de competencia entre los distintos venenos en fase líquida, el veneno de *M. nigrocinctus* en fase sólida y el Coralmyn (véanse las figuras 10 y 13 para mayor referencia). EC50 se refiere a la concentración ( $\mu\text{g/ml}$ ) necesaria de veneno en fase líquida para competir el 50% de la fracción competitiva del veneno de *M. nigrocinctus* en fase sólida. H. S. = Pendiente de Hill de las diferentes curvas. El porcentaje de competencia máxima indica el porcentaje de inhibición del pegado de los anticuerpos al veneno en fase sólida en la mayor concentración utilizada de veneno competidor. +:competencia  $\leq 60\%$ ; ++:competencia mayor a 60 y menor a 80%; +++ : competencia  $\geq 80\%$ .

CORALMYN				
	EC50	H. S.	% Competencia Máx	Competencia
<i>M. distans</i>	0.172	-1.092	57.9	+
<i>M. euryxanthus</i>	0.230	-0.868	24.1	+
<i>M. laticollaris</i>			88.0	+
<i>M. surinamensis</i>	11.838	-0.909	37.3	+
<i>M. b. browni</i>	0.106	-1.019	73.1	++
<i>M. b. taylori</i>	0.155	-0.925	71.1	++
<i>M. browni</i>	0.167	-1.124	78.1	++
<i>M. f. fitzingeri</i>	0.269	-0.502	63.1	++
<i>M. sp.</i>	0.279	-0.888	73.5	++
<i>M. fulvius</i>	0.101	-1.027	60.4	++
<i>M. limbatus</i>	0.388	-0.628	66.1	++
<i>M. tener</i>	0.132	-1.154	79.1	++
<i>M. diastema</i>	0.101	-1.114	92.0	+++
<b><i>M. nigrocinctus</i></b>	<b>0.155</b>	<b>-1.554</b>	<b>100.0</b>	<b>+++</b>

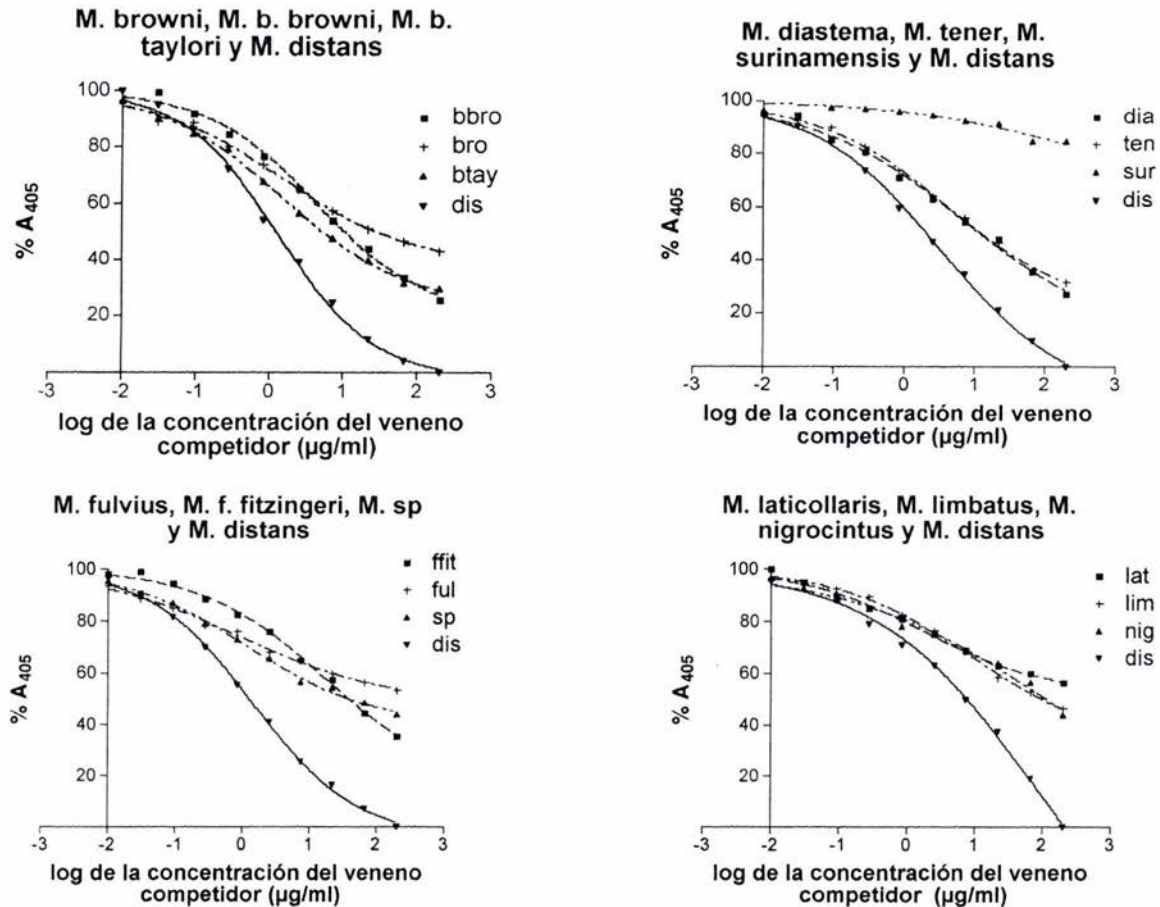


Figura 11. Gráficas de competencia entre los diferentes venenos. El veneno de *M. distans* (1  $\mu\text{g/ml}$ ) se utilizó en fase sólida y el suero de conejo anti-*distans* se utilizó a una dilución 1:64, 000. Véase la figura 10 para mayor referencia. Las abreviaciones corresponden a las de la Figura 6

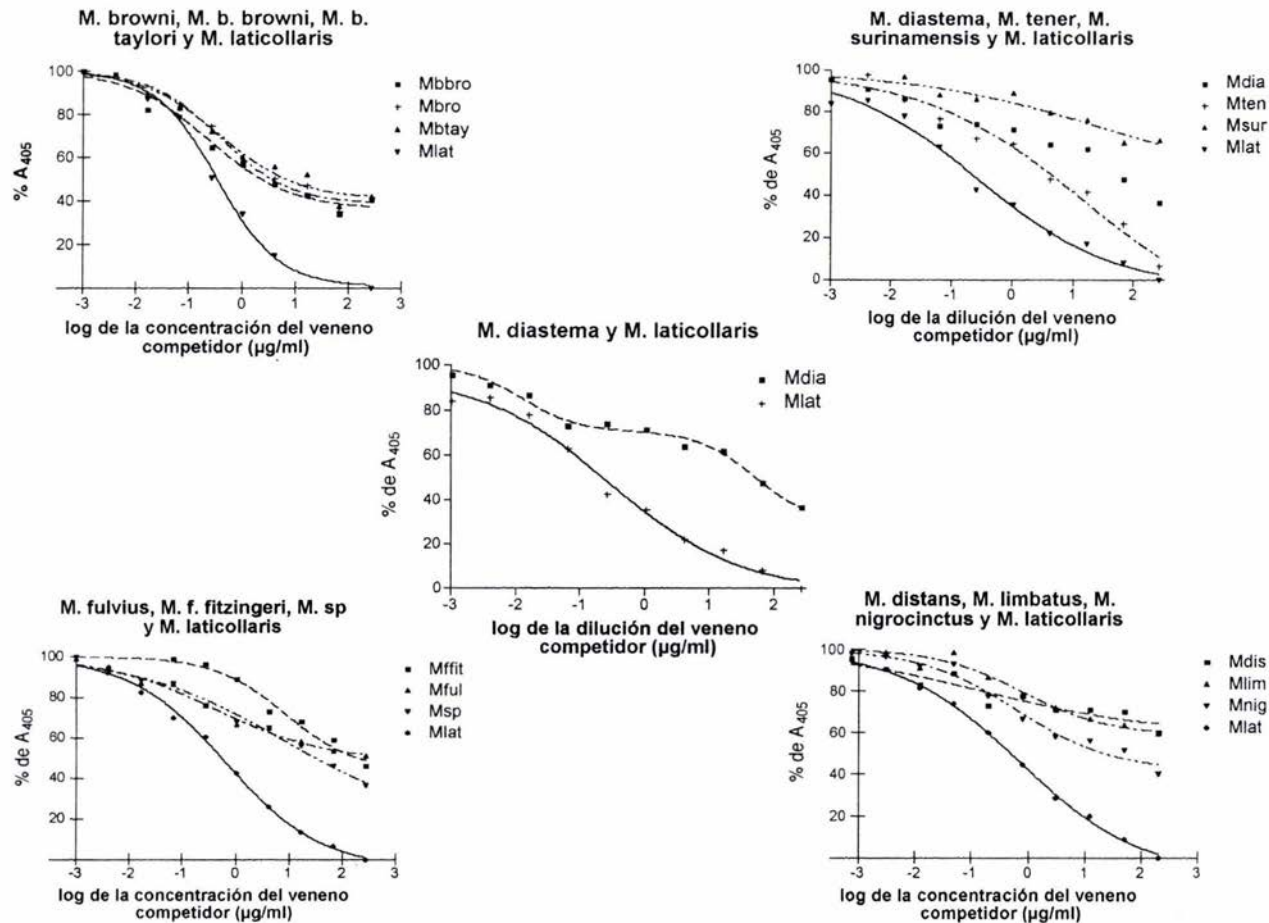


Figura 12. Gráficas de competencia entre los diferentes venenos. El veneno de *M. laticollaris* (1 $\mu$ g/ml) se utilizó en fase sólida y el suero de conejo anti-*M. laticollaris* se usó a una dilución 1:100, 000 Véase la figura 10 para mayor referencia. Las abreviaturas corresponden a las de la Figura 6.

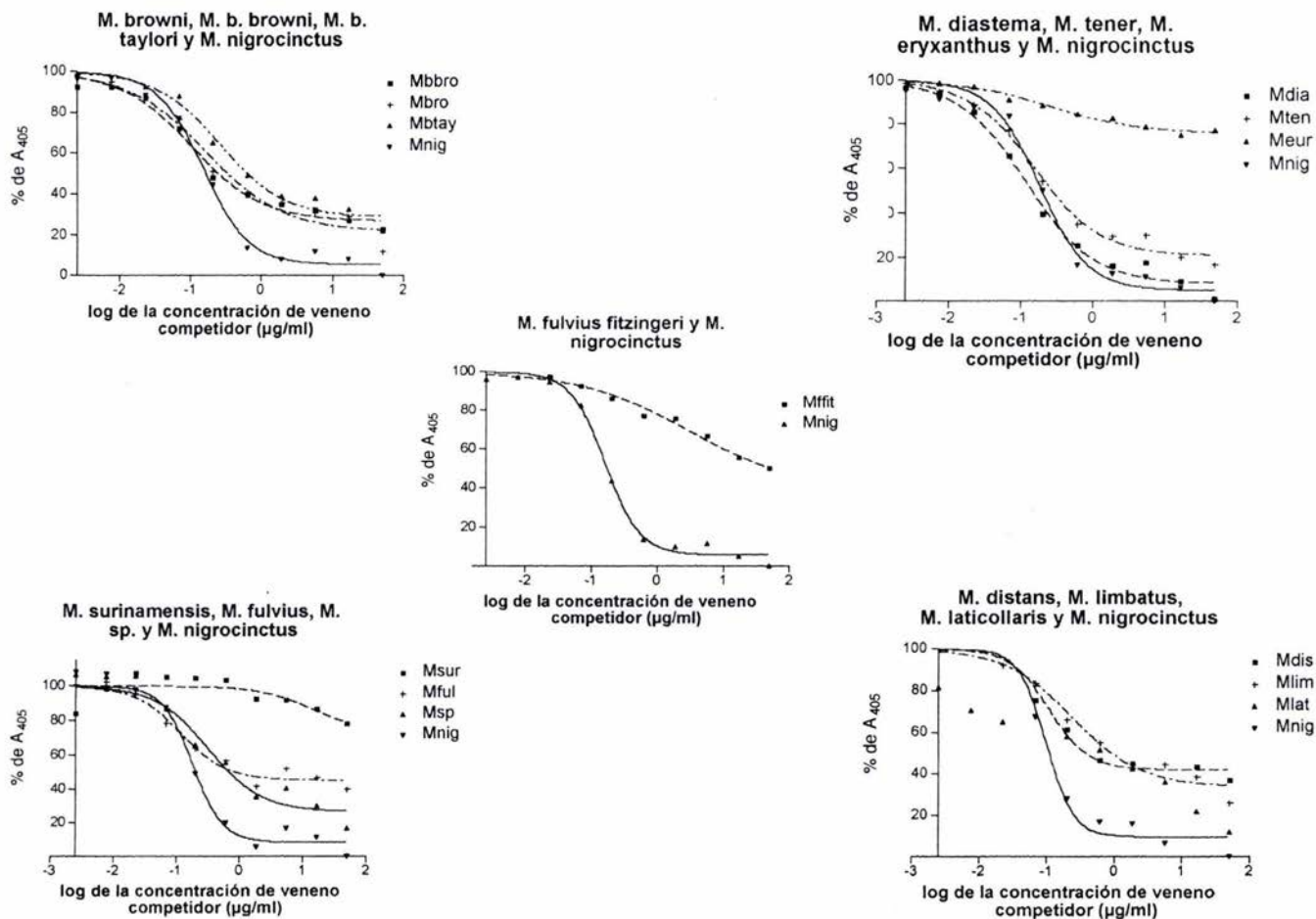


Fig. 13. Gráficas de competencia entre los diferentes venenos. El veneno de *M. nigrocinctus* (1 µg/ml) fue utilizado en fase sólida y el Coralmyn se usó a una dilución 1:4000. Véase la figura 10 para mayor referencia. Las abreviaciones corresponden a las de la Figura 6.

Dos casos interesantes se presentan en estos ensayos de competencia, el primero de ellos lo representa el veneno de *M. diastema* compitiendo en fase líquida con el veneno de *M. laticollaris* fijado en fase sólida (Figura 12). La curva no presenta la forma sigmoide dosis-respuesta común en este tipo de ensayos si no que se adapta a una doble sigmoide indicando que dentro de los componentes competibles del veneno de *M. diastema* existe una parte de ellos que puede inhibir el pegado de los anticuerpos al veneno homólogo con una buena afinidad (menor EC50) mientras que otros compiten con una afinidad menor (ver cuadro 7, *M. diastema*).

El segundo caso se presenta con el veneno de *M. laticollaris* en fase líquida compitiendo con el veneno de *M. nigrocinctus* en fase sólida. La curva que se muestra (Figura 13) no se ajusta a ninguno de los tipos de regresión utilizados para analizar los datos pero los datos mostrados sugieren que pueden existir al menos tres grupos de componentes. Sin embargo, a pesar de ello este ensayo arroja un nivel de competencia alto (88%, ver cuadro 8) cuando el veneno competidor se encuentra a concentraciones muy altas.

Con base en los datos de competencia máxima que se muestran en los cuadros anteriores se proponen los siguientes grupos antigénicos para cada antiveneno siendo los grupos A los de menor porcentaje de competencia y los grupos C los que presentan mayor competencia:

#### **Suero de conejo anti-distans**

Grupo A. *M. fulvius*, *M. laticollaris*, *M. nigrocinctus*, *M. sp* y *M. surinamensis*

Grupo B. *M. browni*, *M. b. taylori*, y *M. limbatus*.

Grupo C. *M. b. browni*, *M. diastema*, *M. f. fitzingeri* *M. tener* y *M. distans*

#### **Suero de conejo anti-laticollaris**

Grupo A. *M. b. taylori*, *M. distans*, *M. fulvius*, *M. f. fitzingeri*, *M. limbatus* y *M. nigrocinctus*

Grupo B. *M. browni*, *M. b. browni*, *M. diastema* y *M. sp*

Grupo C. *M. tener* y *M. laticollaris*

#### **Coralmyn**

Grupo A. *M. distans* *M. laticollaris* y *M. euryxanthus*

Grupo B. *M. browni*, *M. b. browni*, *M. b. taylori*, *M. fulvius*, *M. f. fitzingeri*, *M. limbatus*, *M. sp* y *M. tener*

Grupo C. *M. diastema* y *M. nigrocinctus*

Una vez obtenidos los datos de competencia, se realizaron estudios de neutralización cruzada a fin de conocer la efectividad de cada antiveneno contra algunos venenos (no se incluyeron todos los venenos probados anteriormente debido, principalmente, a la falta de material). El Cuadro 9 resume los datos de letalidad para cada uno de los venenos, mientras que en el Cuadro 10 se muestran los datos de neutralización de los tres antivenenos.

Cuadro 9. Dosis letales medias para diversos venenos. Las pruebas se realizaron en ratones CD-1 entre 18 y 20 g de peso inoculado por vía intravenosa diferentes cantidades de veneno en grupos de cuatro ratones por dosis. La lectura, número de muertes, se realizó a las 72 hrs.

\* Algunas evidencias taxonómicas indican que se trata de una especie aún no descrita que actualmente se encuentra bajo el nombre de *M. browni*.

	DL50 (µg/ratón)
<i>M. browni</i>	11.08
<i>M. browni</i> (Chiapas)*	6.807
<i>M. diastema</i>	5.057
<i>M. distans</i>	14.99
<i>M. fulvius</i>	11.47
<i>M. laticollaris</i>	13.04
<i>M. limbatus</i>	19.92
<i>M. nigrocinctus</i>	11.51

Cuadro 10. Capacidad neutralizante de los tres antivenenos contra varios venenos. Los valores neutralizantes para Coralmyln se expresan tanto en volumen (µl) de antiveneno que neutraliza un microgramo de veneno, como en cantidad (mg) de F(ab')<sub>2</sub> necesarios para neutralizar un miligramo de veneno. Los valores para el suero de conejo anti-*distans* están expresados como volumen (µl) de antiveneno que neutraliza un microgramo de veneno. Para el caso del suero de conejo anti-*laticollaris* se indican los valores máximos de antiveneno (µl) empleados intentando neutralizar 3 DL50.

	Cmyn (µl/µg)	Cmyn (mg/mg)	anti- <i>distans</i> (µl/µg)	anti- <i>laticollaris</i> (µl/3DL50)
<i>M. b. browni</i>	0.30	11.16	1.83	> 80
<i>M. browni</i> (Chiapas)	0.25	9.45	0.57	> 250
<i>M. diastema</i>	1.83	67.95	3.47	> 250
<i>M. distans</i>	0.89	32.98	1.77	> 250
<i>M. fulvius</i>	1.78	65.82	> 490	ND
<i>M. laticollaris</i>	2.10	77.77	> 495	> 250
<i>M. limbatus</i>	1.89	70.18	> 320	> 400
<i>M. nigrocinctus</i>	0.31	11.54	1.16	ND

Haciendo una comparación cruda del volumen necesario de antiveneno para neutralizar un microgramo de los venenos heterólogos parecería que el Coralmyln presenta una mayor capacidad neutralizante que el suero de conejo anti-*M. distans*. Sin embargo, al estandarizar los datos tomando en cuenta el volumen con el cual es neutralizado el veneno homólogo el suero anti-*distans* posee una mayor capacidad neutralizante que el Coralmyln. Por ejemplo, un microgramo del veneno de *M. diastema* es neutralizado con 1.83 µl de Coralmyln lo que corresponde a 6 veces el volumen necesario para neutralizar la misma cantidad del veneno homólogo (*M. nigrocinctus*). Mientras que son necesarios 3.47 µl de suero anti-*distans* para neutralizar un microgramo del veneno de *M. diastema* lo que corresponde a dos veces el volumen necesario de suero anti-*distans* para neutralizar el veneno homólogo.

De esta forma, resulta muy importante la inclusión del veneno de *M. distans* como inmunógeno en la producción de Coralmyln pues es posible obtener mejores títulos neutralizantes comparado con el actual inmunógeno (veneno de *M. nigrocinctus*). Es muy

importante recordar que resulta complicado obtener cantidades importantes de veneno de estas especies por lo que se deben aprovechar al máximo las ventajas que ofrezca obtener mejores títulos neutralizantes con el veneno de otra especie.

Por otro lado se observa que los venenos de *M. fulvius*, *M. limbatus* y *M. laticollaris* no pudieron ser neutralizados por el suero de conejo anti-distans y el Coralmyn los neutralizó a títulos muy bajos (ver Cuadros 6 y 8) lo que habla no sólo de que la naturaleza de los determinantes antigénicos de estas especies son diferentes a los de los venenos homólogos sino también de que los componentes causantes de la acción letal no pueden ser neutralizados fácilmente por ninguno de los antivenenos. También es importante hacer notar que el suero anti-laticollaris no fue capaz de neutralizar los efectos letales de ningún veneno, ni siquiera en contra del veneno homólogo.

El Cuadro 11 resume en forma cualitativa los resultados obtenidos en los ensayos de ELISAs (título), ELISAs competitivos (competencia) y neutralizaciones. No existe, en todos los casos, una correlación entre estos tres ensayos. Tómese por ejemplo los datos de Coralmyn contra el veneno de *M. b. browni*, se podría decir que a pesar de que el antiveneno no presenta un buen título contra este veneno, esto resulta más que suficiente para neutralizar los efectos letales del veneno de *M. b. browni* probablemente porque los componentes que causan la acción letal se encuentran dentro de la fracción competitiva. Ahora tómese el caso del veneno de *M. diastema* con el mismo antiveneno, a pesar de que el antiveneno muestra un muy buen título y que existe una gran cantidad de epítopes compartidos entre los dos venenos, los componentes letales del veneno de *M. diastema* no pueden ser neutralizados, posiblemente porque no se encuentran dentro de la fracción competitiva o bien porque el anticuerpo reconoce al antígeno en una región tal que no neutraliza su acción letal (ver más adelante).

Cuadro 11. Resumen cualitativo de las pruebas de ELISA (título), ELISA competitivo (COMP) y neutralizaciones. Los títulos provienen del cuadro 5, los valores de competencia provienen de los cuadros 6 a 8 y las neutralizaciones del cuadro 10. Títulos y competencias: +  $\geq$  60%, ++ > 60 y  $\leq$  80%, +++ > 80%. Neutralizaciones: +++  $\leq$  2 veces el valor de la neutralización del veneno homólogo; ++ de 2 a 4 veces el valor de la neutralización homóloga; + > 4 veces el valor de la neutralización homóloga; - No hubo neutralización

	Coralmyn			anti-distans			Anti-laticollaris		
	Título	COMP	Neutral	Título	COMP	Neutral	Título	COMP	Neutral
<i>M. b. browni</i>	+	++	+++	+++	++	+++	+	++	-
<i>M. browni</i> (Chiapas)	ND	ND	+++	ND	ND	+++	ND	ND	-
<i>M. diastema</i>	+++	+++	+	+++	+++	+++	+	++	-
<i>M. distans</i>	+++	+	++	+++	+++	+++	+	+	-
<i>M. fulvius</i>	+++	++	+	+++	+	-	+	+	ND
<i>M. laticollaris</i>	+++	+	+	+++	+	-	+++	+++	-
<i>M. limbatus</i>	+++	++	+	+	++	-	+	+	-
<i>M. nigrocinctus</i>	+++	+++	+++	+++	+	+++	+	+	ND



## DISCUSIÓN

Una de las particularidades del veneno de la mayoría de los elápidos es atacar sistema nervioso central por medio de toxinas que inactivan la comunicación neuromuscular en diversas formas. Estas formas de inactivación se relacionan a la presencia de dos grandes grupos de proteínas: las fosfolipasas neurotóxicas y las  $\alpha$ -neurotoxinas (Alape-Girón, 1997). En los venenos de elápidos sólo se han descrito fosfolipasas tipo A2 (PLA2) que hidrolizan los enlaces 2-acilo de los 3 *sn*-fosfoglicéridos (Possani et al., 1979). El mecanismo por el cual estas enzimas ejercen su acción neurotóxica aún no se conoce pero se propone que se introducen a la terminal nerviosa por medio de receptores específicos y al llegar a la vesícula cargada con neurotransmisores inician la degradación de fosfolípidos, lo que provoca que las vesículas se sobrecarguen con neurotransmisores inhibiendo su liberación (Montecucco y Rossetto, 2000; Krisaj y Gubensek, 2000). Estas proteínas son también conocidas como  $\beta$ -neurotoxinas.

Las  $\alpha$ -neurotoxinas son proteínas de aproximadamente 7 KDa que se unen al receptor colinérgico de acetilcolina en el músculo. Hasta el momento se reconocen dos tipos de  $\alpha$ -neurotoxinas en serpientes: las cortas, de 60 a 62 aminoácidos y con cuatro puentes disulfuro; y las largas, de 66 a 75 aminoácidos y cinco disulfuros que estabilizan la estructura (Alape-Girón et al., 1999; Tsetlin, 1999). Existen además otras proteínas que son homólogas a las  $\alpha$ -neurotoxinas pero cuyos blancos de acción no son los receptores colinérgicos de acetilcolina: las fasciculinas, descritas para el veneno de *Dendroaspis* que se unen e inhiben a las colinesterasas endógenas; las  $\kappa$ -neurotoxinas, descritas para *Bungarus*, se unen a ciertos tipos de receptores de acetilcolina neuronales; las calciseptinas, también aisladas del veneno de *Dendroaspis*, bloquean canales tipo L del sistema cardiovascular (Alape-Girón et al., 1997). Otro grupo de toxinas que guardan cierta similitud estructural con las  $\alpha$ -neurotoxinas son las llamadas "toxinas débiles" (llamadas así por la baja toxicidad que presentan) aisladas de los venenos de varios elápidos (Nirthanan et al., 2003)

En los análisis hechos por SDS-PAGE (Figuras 5 y 6) se puede observar que existe una gran diversidad de componentes protéicos en los venenos de las especies de coralillos analizados. Los componentes que migran con una masa molecular aparente entre 5 y 7 KDa, lo más probable es que se trate de este tipo de toxinas. Otros trabajos reportan que esa es la posición de migración de las  $\alpha$ -neurotoxinas de otros elápidos; también, usando anticuerpos específicos se ha probado que las  $\alpha$ -neurotoxinas ocupan dicha posición en geles con SDS (Alape-Girón et al., 1994b; Silveira de Oliveira et al., 2000; Prieto da Silva et al., 2001) experimentos futuros deberán confirmar o descartar que sean verdaderas  $\alpha$ -neurotoxinas tanto desde el punto de vista estructural como de mecanismo de acción.

Por otro lado, las bandas que se sitúan entre los 14 y 16 KDa pueden corresponder a PLA2 (el único tipo de fosfolipasas descritas para serpientes) que ya han sido previamente reportadas para venenos de coralillos (Possani et al., 1979; Gutiérrez et al., 1991; Aird y Da Silva, 1991; Da Silva et al., 1991; Tan y Ponnudurai, 1992; Barros et al., 1994; Alape-Girón et al., 1996b; Francis et al., 1997; Da Silva y Aird, 2001). En ensayos realizados a lo largo de este estudio fue posible encontrar diferentes niveles de actividad de fosfolipasa en los venenos analizados (no se muestran datos), sin embargo aún no se ha comprobado la existencia de  $\beta$ -neurotoxicidad asociada a la actividad de fosfolipasa tipo A2.

Uno de los principales objetivos del veneno, en las diversas especies de serpientes que lo poseen, es facilitar la caza y digestión del alimento (Kochva y Gans, 1960; Bon, 1994; Roze, 1996; Greene, 1997), dejando la parte defensiva como un objetivo secundario. En este sentido la selección natural ha favorecido que una especie particular presente un veneno cuya composición sea tal que le permita asegurar su alimento. Las variaciones en los patrones electroforéticos que se observan en las Figuras 5 y 6 son el reflejo de las preferencias alimenticias de cada especie y cada individuo. Daltry et al. (1996) demostraron que el veneno de *Calloselasma rhodostoma* (Viperidae) puede tener importantes variaciones dependiendo de la región geográfica donde se encuentre. La variación del veneno ya se ha reportado también para otras especies de serpientes (Saravia et al., 2002; Minton y Weinstein, 1986) incluyendo coralillos (Alape-Girón et al., 1994b; Da Silva y Aird, 2001). De hecho, Da Silva y Aird (2001) demostraron que no sólo existe variación importante en las actividades enzimáticas de cada especie y que esta variación está en relación a la presa de la cual se alimentan sino también que los venenos son hasta tres veces más tóxicos contra especies que forman parte de la dieta habitual de cada coralillo que contra especies de las que se alimentan sólo esporádicamente. La variación en la composición de los venenos de dos especies de coralillos puede darse en dos niveles: a) cualitativo que se refiere a la ausencia o presencia de algún componente en especial; b) cuantitativo, es decir, la cantidad relativa que un componente represente en relación a la totalidad de veneno.

¿Cuál sería la importancia de la variación en dos o más venenos desde el punto de vista inmunológico? Suponga que se tiene dos venenos, el veneno 1 cuyos componentes son A (30%), B (10%) y C (60%) y el veneno 2 cuyos componentes son A' (30%), B (60%) y D (10%). Si utiliza el veneno 1 como inmunógeno se pueden obtener anticuerpos contra los tres componentes (suponga también que todos los componentes son buenos inmunógenos). Estos anticuerpos son capaces de reconocer no sólo a los componentes homólogos A, B y C sino también a los heterólogos A' y B (véanse las Figuras 7, 8 y 9). Nótese que los anticuerpos dirigidos contra el veneno 1 no son capaces de reconocer al componente D en el veneno 2 debido a que no existen antígenos en el veneno 1 cuyos determinantes antigénicos sean capaces de generar anticuerpos que reconozcan a D. Es decir, podemos asegurar que el 66% (A' y C) del total de componentes en el veneno 2 poseé epítopes compartidos con el veneno 1 (que corresponden a los componentes de la zona C en la Figura 10B) y existe un 33 % de componentes (D) que son únicos al veneno 2 (que corresponderían a los componentes de la zona E señalados en la Figura 10B).

Si la comparación se hiciera a la inversa, es decir anticuerpos dirigidos contra el veneno 2 reconociendo a los componentes del veneno 1, las proporciones de epítopes compartidos pueden variar en función de la similitud de los determinantes antigénicos. Por ejemplo, utilizando el suero de conejo anti-laticollaris, el veneno de *M. nigrocinctus* comparte el 58.5% de epítopes, pero al utilizar el Coralmyn los análisis muestran que existe un 85% de epítopes compartidos (véanse cuadros 7 y 8). Ahora bien, ¿cómo puede influir la existencia de epítopes compartidos y no compartidos en la capacidad de un anticuerpo para neutralizar los efectos letales de estos venenos?

Nuevamente suponga la existencia de los venenos 1 y 2 mencionados anteriormente y que utiliza los anticuerpos dirigidos contra el veneno 1 para determinar

el grado de neutralización que estos anticuerpos puedan tener. Los anticuerpos anti-veneno 1 pueden ser capaces de neutralizar los efectos del veneno homólogo a un título muy bueno pero pueden a su vez ser incapaces de neutralizar los efectos de los componentes del veneno 2, tal como sucede con el Coralmyn neutralizando el veneno de *M. nigrocinctus* (homólogo) y neutralizando sólo a títulos muy elevados los venenos de *M. fulvius*, *M. limbatus* y *M. laticollaris* (véase Cuadro 10). ¿Cómo se podría explicar este fenómeno? Es importante recordar que en la neutralización influyen tres aspectos importantes:

- a) La afinidad del anticuerpo por el antígeno.
- b) La concentración de antígeno
- c) El sitio de reconocimiento en el antígeno

En el ejemplo anterior A y A' pueden guardar una enorme similitud, sin ser exactamente iguales. Algunos cambios en A' pueden provocar que el anticuerpo se una con menor afinidad al antígeno, principalmente si los cambios se sitúan en la zona de reconocimiento antigénico. Por otro lado, suponga que los antígenos son exactamente iguales, como el caso del componente B. Note que en el veneno 1 (utilizado como inmunógeno) B representa el 10% del total de componentes y es probable que A y C puedan, por cantidad, llamar la atención del sistema inmune en forma preferencial. Este fenómeno se conoce como competencia antigénica o inmunodominancia selectiva (Rao, 2001) y puede dar como resultado una menor proporción de anticuerpos específicos dirigidos contra B. En un envenenamiento causado por la especie 1 la cantidad de anticuerpos anti-B será suficiente para neutralizar sus efectos letales. Sin embargo, en un envenenamiento causado por la especie 2 la cantidad de anticuerpos anti-B será insuficiente para neutralizar la enorme cantidad de antígeno presente (6 veces mayor que en el veneno homólogo). En cualquier caso, ya sea una menor afinidad del anticuerpo debida a cambios en el antígeno o bien por una menor concentración de anticuerpos de la requerida, será necesario aplicar una mayor cantidad de antiveneno a fin de lograr la neutralización completa del antígeno en cuestión.

En el último caso, un antígeno puede tener varios sitios de reconocimiento antigénico, sin embargo sólo unos cuantos serán importantes para ser reconocidos por el sistema inmune por un fenómeno conocido como inmunodominancia (Muller, 2001). Alguno de estos epítopes puede también estar involucrado en la acción tóxica del antígeno en cuyo caso la unión del anticuerpo a esta zona puede asegurar la neutralización de su acción, sin embargo, también puede ser que el epítipo no esté involucrado en la acción tóxica del antígeno y en tal caso éste no podrá ser neutralizado a pesar de haber sido reconocido.

A partir de los grupos antigénicos propuestos (véase Resultados, pagina 29) y los ensayos de neutralización se propone que sean incluidos los venenos de *M. distans* y *M. fulvius*, sin excluir el veneno de *M. nigrocinctus*, como inmunógeno a fin de obtener un antiveneno de mayor espectro de neutralización efectiva. La inclusión de *M. distans* responde a que es posible obtener mejores títulos neutralizantes contra ciertos venenos y aunque no es capaz de neutralizar algunos otros, los anticuerpos dirigidos contra el veneno de *M. nigrocinctus* si son capaces de hacerlo. *M. fulvius* representa un problema grave de salud pública en Estados Unidos y aunque el Coralmyn es capaz

de neutralizarlo es necesario usar altas cantidades de antiveneno, es muy probable que su inclusión en el inmunógeno dé como resultado mejores títulos neutralizantes. Si bien es cierto que el veneno de *M. limbatus* es, desde un punto de vista inmunoquímico, muy interesante esta especie no representa ningún peligro para el ser humano ya que se trata de serpientes muy pequeñas (los adultos probablemente no rebasen los 50 cm de longitud total) restringidas a un área geográfica muy particular (la selva de los Tuxtlas, Veracruz) y que además no suelen ser vistas comúnmente. La inclusión del veneno de *M. laticollaris* debe estudiarse detenidamente pues su incapacidad para inducir la producción de anticuerpos neutralizantes podría provocar competencia antigénica que resultaría en menores títulos neutralizantes contra los demás venenos.

Sin duda los resultados mostrados hasta el momento son el reflejo de la combinación de las varias interacciones arriba descritas. Hay que recordar que estos venenos son mezclas complejas de diversas biomoléculas cuyas acciones si bien pueden ser estudiadas en forma aislada no debe descartarse la idea de que también puedan tener interacciones sinérgicas lo cual dificulta mucho la correcta interpretación de los datos pero a su vez obliga a pensar en el veneno no como en un conjunto de componentes aislados sino como en un todo cuyas partes no actúan necesariamente de solas, al menos en términos de la fisiopatología del envenenamiento en mamíferos.

## CONCLUSIONES

- Los venenos de coralillos muestran cerca de 20 bandas por SDS-PAGE que pueden clasificarse en uno de tres grandes grupos: bajo (menores a 16 KDa), intermedio (de 16 a 40 KDa) y alto peso molecular (mayores a 40 KDa), siendo los más abundantes los de bajo peso molecular
- La mayoría de los componentes son reconocidos por los diferentes antivenenos a buenos títulos
- Los venenos heterólogos muestran dos grandes grupos de componentes con distintas capacidades de competencia en ensayos *in vitro*.
- Tanto el Coralmyn como el suero de conejo anti-distans logran neutralizar los efectos letales de la mayoría de los venenos probados.
- El veneno de *Micrurus laticollaris* es el que presenta mayores diferencias entre los venenos de coralillos mexicanas.
- Se deben incluir los venenos de *M. distans*, *M. fulvius* y *M. nigrocinctus* para lograr un antiveneno de amplio espectro.
- Se debe incluir el veneno de *M. laticollaris* en la producción de un Coralmyn de amplio espectro una vez que se conozcan las razones por las que no produce anticuerpos neutralizantes y pueda inducirse su producción

## PERSPECTIVAS

El presente trabajo ha permitido formar las bases acerca de la inmunoquímica del veneno de diversas especies de coralillos que se distribuyen dentro del territorio nacional. Sin embargo aún falta realizar una gran cantidad de trabajo en diversas áreas. Uno de los objetivos que impulsan a continuar con este trabajo es conocer en forma más detallada la composición bioquímica y la actividad fisiológica del veneno de estas especies, con una atención muy especial al veneno de *M. laticollaris*, a fin de lograr una mayor comprensión y aprovechamiento de estos venenos.

## LITERATURA CITADA

- Aird S. D. y Da Silva J. N. Jr. 1991. Comparative enzymatic composition of brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* 99 (2): 287-294.
- Aird S. D., Da Silva Jr. R. J. y Griffin P. R. 1993. Primary structure of a postsynaptic neurotoxin from the venom of *Micrurus surinamensis surinamensis*. Abstract. 4th Pan American symposium on Animal, plant and Microbial toxins. *Toxicon.* 31 (2): 108.
- Alape-Girón A., Gustafsson B., Lomonte B., Thelestam M y Gutierrez J. M. 1994a. Immunochemical characterization of *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus* venom with monoclonal and polyclonal antibodies. *Toxicon* 32 (6): 695-712.
- Alape-Girón A., Lomonte B., Gustafsson B., Da Silva J. y Thelestam M. 1994b. Electrophoretic and immunochemical studies of *Micrurus* snake venoms. *Toxicon.* 32 (6): 713-723.
- Alape-Girón A., Stiles B. G. y Gutierrez J. M. 1996a. Antibody-mediated neutralization and binding reversal studies on  $\alpha$ -neurotoxins from *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus* (coral snake) venom. *Toxicon* 34 (3): 369-380.
- Alape-Girón A., Stiles B., Schmidt J., Girón-Cortés M., Thelestam M., Jörnvall H. y Bergman T. 1996b. Characterization of multiple nicotinic acetylcholine receptor-binding proteins and phospholipases A2 from the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus*. *FEBS Letters.* 380: 29-32.
- Alape-Girón A. 1997. Immunochemical, biochemical and evolutionary studies on *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus* venom toxins. PhD. Dissertation. Mikrobiologiskt och Tumörbiologiskt Centrum. Karolinska Institutet. Stockholm. 55 p.
- Alape-Girón A., Miranda-Arrieta K., Cortes-Bratti X., Styles G. B., Gutiérrez J. M. 1997. A comparison of in vitro methods for assessing the potency of therapeutic antisera against the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus*. *Toxicon.* 35 (4): 573-581.
- Amuy E., Alape-Girón A., Lomonte B., Thelestam M., Gutiérrez J. M. 1997. Development of immunoassays for determination of circulating venom antigens during envenomations by coral snakes (*Micrurus* species). *Toxicon.* 35 (11): 1605-1616.

- Barrio A. y Miranda M. 1966. Estudio comparativo, morfológico e inmunológico entre las diferentes entidades del género *Micrurus* Wagler (Ophidia: Elapidae) de la Argentina. Mem. Inst. But. Simp. Inter. 33 (3): 869-880.
- Barros S. A., Fernandes D. P., De Lima Ferreira L. C., dos Santos M. C. 1994. Local effects induced by venoms from five species of genus *Micrurus* sp. (Coral snakes). Toxicon. 32 (4): 445-452.
- Bauchot R. 1994. A portrait of snakes. In Bauchot R. (ed). Snakes a Natural History. Sterling publishing. N. Y. p 14-25.
- Bellaris A. D. y Underwood. G. 1951. The origin of snakes. Biological Review Cambridge Phylosophical Society.
- Brodie E. D. y Moore J. A. 1995. Experimental studies of coral snake mimicry: do snakes mimic millipedes? An. Beh. 49 (2): 534-536.
- Bolaños R., Cerdas L y Taylor R. 1973. Estudios inmunológicos de las principales *Micrurus* de Norte América, Centroamérica, Panamá y Colombia. Abstract 3rd latinoamerican Cong. Parasitol. Anioquía Médica. 23, 518.
- Bolaños R., Cerdas L y Taylor R. 1975. The production and characteristics of a coral snake (*Micrurus mipartitus hertwigi*) antivenin. Toxicon. 13: 139-42.
- Bolaños R. Cerdas L. y Abalos J. W. 1978. Venoms of coral snakes (*Micrurus spp.*): report on a multivalent antivenin for the Americas. Bull Pan Amer. Health Organ. 12 (1): 23-27.
- Bon C. 1994. Snake venom and pharmacopeia. In Bauchot R. (ed) Snakes a Natural History. Sterling publishing. N. Y. p 194-209.
- Bucaretschi F. 1990. Elapidic envenomation: clinical features. Mem. Inst But. 52 (supl): 33-34.
- Campbell J. A. y Lamar W. W. The venomous reptiles of Latin America. 1989. Comstock Pub Assoc. E. U. A.
- Campbell J. A. y Lamar W. W. The venomous reptiles of the western hemisphere. 2004. Comstock Pub Assoc. E. U. A. Vol. I.
- Castro de Oliveira U., Assui A., Prieto da Silva A., Silveira de Oliveira J. y Lee H. P. 2003. Cloning and characterization of a basic phospholipasa A2 homologue from *Micrurus corallinus* (coral snake) venom gland. Toxicon 42: 243-255.
- Cohen P. 1966. *In vivo* neutralization of coral snake venom. Mem. Inst. But. Simp. Intern. 33 (3): 881-886.
- Cohen P., Seligman Jr. E. y Berkeley W. H. 1967. Coral snake venom: antibody response in rabbits. Nature. 213: 820-822.

- Cohen-P., Dawson J. H. y Seligman Jr. E. 1968. Cross-neutralization of *Micrurus fulvius fulvius* (coral snake) venom by anti-*Micrurus dumerilii carinicauda* serum. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 17 (2): 308-310.
- Cohn M. J. y Thickle C. 1999. Developmental basis of limblessness and axial patterning in snakes. *Nature.* 399: 474-479.
- Cope D. E. 1896. Boulanger on the difference between Lacertilia and Ophidia; and on the Apoda. *Amer. Natur.* 30: 149-152.
- Da Silva N. J. Jr., Griffin P. R. y Aird S. D. 1991. Comparative chromatography of brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 100 (1): 117-126.
- Da Silva J. N. Jr. y Aird S. D. 2001. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 128: 425-456.
- Da Silva A. R., Yamagushi I. K., Morais J. F., Higashi H. G., Raw I., Ho P. L y Silveira de Oliveira J. 2001. Crossreactivity of different specific *Micrurus* antivenom sera with homologous and heterologous snake venoms. *Toxicon.* 39: 949-953.
- Daltry J. C, Wuster W. y Thorpe R.S.1996. Diet and snake venom evolution. *Nature.* 379 (6565): 537-40.
- De Roodt A. R., Paniagua-Solís J., Dolab J. A., Litwin S., Estévez-Ramírez J. y Alagón A. 2004. Effectiveness of two common antivenoms for North, Central and South American *Micrurus* envenomations. *J. Clin. Toxicol.* In press.
- Dowling H. G. 1959. Classification of the Serpentes: a critical review. *Copeia.* 38-52.
- Esteso S. C., Vázquez T., Olmos A y Palacios R. 1989. Ofidismo por *Micrurus frontalis pyrrocryptus*. *Prensa Med. Argent.* 76: 376-378.
- Fix J. D y Greenville N. C. 1980. Venom yield of the North American coral snake and its clinical significance. *South. Med. J.* 73 (6): 737-738.
- Flowers H. 1966. A comparison of the neutralization ability of a heterologous vs homologous coral snake (*Micrurus fulvius*) venom. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 15 (6): 1003-1006.
- Francis B. R., Da Silva J. N. Jr., Seebart C., Casais E., Silva L. L., Schmidt J. J., Kaiser I. I. 1997. Toxins isolated from the venom of brazilian coral snake (*Micrurus frontalis frontalis*) include hemorrhagic type phospholipase A<sub>2</sub> and post synaptic neurotoxins. *Toxicon.* 35 (8): 1193-1203.
- Goularte F. C., Cruz-Höfling M. A., Cogo J. C., Gutierrez J. M. y Rodrigues-Simioni L. 1993. The ability of specific antivenom and low temperature to inhibit the myotoxicity and neuromuscular block induced by *Micrurus nigrocinctus* venom. *Toxicon.* 33 (5): 679-689.
- Gravlund P. 2001. Radiation within advanced snakes (Caenophidia) with special emphasis on African Opisthophis colubrids based on mitochondrial sequence data. *Biol. J. Linn. Soc.* 79: 99-114.

- Greene H. W. 1973. The food habits and feeding behavior of New World coral snakes. Master of Arts Thesis. UTA. Arlington. Texas. 66 p.
- Greene H. W. Snakes. The evolution of mystery in nature. 1997. U. California Press. Inglaterra. 351 p.
- Gutiérrez J. M., Cháves F., Rojas E. y Bolaños R. 1980. Efectos locales inducidos por la serpiente coral *Micrurus nigrocinctus* en ratón blanco. *Toxicon* 18: 633-639.
- Gutiérrez J. M., Lomonte B., Portilla E. y Cerdas L. 1983. Local effects induced by coral snake venoms: evidence of myonecrosis after experimental inoculations of venoms from five species. *Toxicon*. 21: 777-783.
- Gutiérrez J. M., Arroyo O., Chaves F., Lomonte B y Cerdas L. 1986. Pathogenesis of myonecrosis induced by coral snake (*Micrurus nigrocinctus*) venom in mice. *Br. J. Ex. Pathol.* 67: 1-12.
- Gutiérrez J. M., Rojas G., Pérez A., Arguello I. y Lomonte B. 1991. Neutralization of coral snake *Micrurus nigrocinctus* venom by monovalent antivenom. *Braz. J. Med Biol. Res.* 24 (7); 701-10.
- Gutiérrez J. M., Rojas G., Jorge da Silva N. Jr. y Nuñez J. 1992. Experimental myonecrosis induced by the venoms os south american *Micrurus* (croal snakes). *Toxicon* 30 (10); 1299-1302.
- Gutiérrez J. M. 2002. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigación en América Latina. *Rev. Biol. Trop.* 50 (2): 377-394.
- Higashi H. G., Guidolin R., Caricati C. P., Fernandes I., Marcelino J. R., Morais J. F., Yamagushi I. K., Stephano M. A., Dias da Silva W. y Takehara H. K. 1995. Antigenic cross reactivity among components of brazilian elapidae snake venoms. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28 (7): 767-771.
- Hill R. E. y Mackessy S. P. 2000. Characterization of venom (Duvernoy's secretion) from twelve species of colubrid snakes and partial sequences of four venom proteins. *Toxicon.* 38 (12): 1663-87
- Keogh J. S. 1997. Evolutionary implications of hemipenial morphology in the terrestrial australian elapid snakes. *Zool. J. Linn. Soc.* 125: 239-278.
- King T. P., Joslyn A. y Kochoumian L. 1985. Antigenic cross-reactivity of venom proteins from hornets, wasps and yellow jackets. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 75 (5): 621-628.
- Kocholaty W. F., Bowles-Ledford E., Daly J. G. y Billings T. 1971. Preparation of a coral snake antivenin from goat serum. *Toxicon.* 9: 297-298.
- Kochva E. y Gans C. 1970. Salivary glands of snakes. *Clin. Toxicol.* 3 (3): 363-387.
- Krizaj I. y Gubensek F. 2000. Neuronal receptors for phospholipases A<sub>2</sub> and  $\beta$ -neurotoxicity. *Biochimie.* 82: 807-814.



- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lee M. S., Bell G. R. y Caldwell M. W. 1999. The origin of snake feeding. *Nature*. 400: 655-659.
- McDowell S. B. 1969. Notes on the Australian sea snake *Ephalophis greyi* M. Smith (Serpentes: Elapidae: Hydrophiinae) and the origin and classification of sea snakes. *Zool. J. Linn. Soc.* 48: 333-349.
- McDowell S. B. 1987. Systematics. *In* Snakes, ecology and evolutionary biology. Siegel R. A., Collins J. T. y Nowak S. (eds.) Mc Millan. New York. EUA. p 3-50
- Minton S. A, Weinstein S. A. 1986. Geographic and ontogenic variation in venom of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). *Toxicon*. 24(1): 71-80.
- Mochca-Morales J., Martin B. M., Zamudio F. Z. y Possani L. D. Isolation and characterization of three toxic phospholipases from the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus*. Abstract 3rd Pan American Symposium on Animal, Plant and Microbial toxin. *Toxicon*. 26 (6): 616.
- Montecucco C. y Rossetto O. 2000. How do presynaptic PLA2 neurotoxins block nerve terminals. *Trends Biochem. Sci.* 25 (6): 266-270.
- Moraes F. V., Sousa-e Silva M C., Barbaro K. C., Leitão M. A y Furtado M. F. 2003. Biological and immunological characterization of *Micrurus altirostris* venom and serum neutralization of its toxic activities. *Toxicon* 41: 71-79.
- Muller C.P. Epitopes. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2001. Nature publishing group. www.els.net
- Nirthanan S., Gopalakrishnakone P., Gwee M. C., Khoo H. E. y Kini R. M. 2003. non-conventional toxins from Elapid venoms. *Toxicon*. 41: 397-407.
- Possani L. D., Alagón A. C., Fletcher P. L., Varela M. J. y Juliá J. Z. 1979. Purification and characterization of a phospholipase A2 from the venom of coral snake *Micrurus fulvius microralbivus* (Brown and Smith). *Biochem J.* 179 (3): 603-606.
- Pough H. F., Cadle J., Crump M., Savitzky A. y Wells K. *Herpetology*. 1998. Pretince Hall. Londres. 578 p.
- Prieto da Silva. A. R. Kasuko Y. I., Morais F. J., Higashi G. H., Raw I., Ho P. L., Oliveira J. S. 2001. Cross reactivity of different species of *Micrurus* antivenom sera with homologous and heterologous snake venoms. *Toxicon* 39: 949-953.
- Ramsey G. F. y Klickstein G. 1962. Coral snake bite. Report of a case and suggested therapy. *JAMA*. 182 (9): 949-951.
- Rao K. V. S. Antigens. *Encyclopedia of life sciences*. 2001. Nature publishing group. www.els.net

- Rawat S. Laing G., Smith D. C., Thakston D. y Landon J. 1994. A new antivenom to treat eastern coral snake (*Micrurus fulvius fulvius*) envenoming. *Toxicon*. 32 (2): 185-190.
- Ribeiro L. A., Puerto G. y Jorge M. T. 1999. Bites by the colubrid snake *Philodryas olfersii*: a clinical and epidemiological study of 43 cases. *Toxicon*. 37 (6): 943-948.
- Rieppel O. y Zaher H. 2000. The braincase of mosasaurs and *Varanus*, and the relationships of snakes. *Zool. J. Linn. Soc.* 129: 489-514.
- Rosso J. P., Vargas-Rosso O., Gutiérrez J. M., Rochat H. y Bougis E. 1996. Characterization of an  $\alpha$ -neurotoxin and phospholipase A<sub>2</sub> activities from *Micrurus* venoms. *Eur. J. Biochem.* 238: 231-239.
- Roze J. A. Coral snakes of the Americas. Biology, identifications and venoms. 1996. Krieger. Florida. 323 p.
- Russell F. 1967. Bites by the sonoran coral snake *Micruroides euryxanthus*. *Toxicon*. 5: 39-42
- Russell F. E., Walter F. G., Bey T. A. y Fernández M. C. 1997. Snakes and snakebites in central america. *Toxicon*. 35 (10): 1469-1522.
- Saravia P., Rojas E., Arce V., Guevara C., López J. C., Chaves E., Velásquez R., Rojas G., Gutiérrez J. M. Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: pathophysiological and therapeutic implications. *Rev Biol Trop*. 2002 Mar; 50(1): 337-46.
- Savage J. M. y Slowinski J. B. 1996. Evolution of coloration, urotomy and coral snake mimicry in the snake genus *Scaphiodontophis* (Serpentes: Colubridae). *Biol. J. Linn. Soc.* 57(2):129-194.
- Scanlon J. D. y Lee M. S. 2000. The pleistocene serpent *Wonambi* and the early evolution of snakes. *Nature*. 403: 416-420.
- Schwenk K. 1994. Why snakes have forked tongues. *Science*. 263: 1573-1577.
- Serafim F. G., Reali M., Cruz-Höfling y Fontana M. D. 2002. Action of *Micrurus dumerilii carnicauda* coral snake venom on the mammalian neuromuscular junction. *Toxicon*. 40: 167-174.
- Silveira De Oliveira J., Prieto da Silva A. R. B., Soares M. B., Stephano M. A., De Oliveira Dias W., Raw I. Y Ho P. L. 2000. Cloning and characterization of an  $\alpha$ -neurotoxin-type protein specific for the coral snake *Micrurus corallinus*. *Biochem Biophys. Res Comm.* 267: 887-891.
- Slowinsky J. 1991. The phylogenetic relationships of the New World coral snakes (Elapidae: *Leptomicrurus*, *Micruroides* and *Micrurus*) based on biochemical and morphological data. Ph D. Dissertation. University of Miami. Florida

Slowinsky J. B., Boundy J. y Lawson R. 2001. The phylogenetic relationships of Asian coral snakes (Elapidae: *Calliophis* and *Maticora*) based on morphological and molecular characters. *Herpetologica*. 57 (2): 233-245.

Tan N. H. y Ponnudurai G. 1992. The biological properties of venoms of some American coral snakes (genus *Micrurus*). *Com. Biochem. Physiol. Part B*. 101 (3): 471-474.

Tchernov E., Rieppel O., Zaher H., Polcin M. J y Jacobs L. L. 2000. A fossil snake with limbs. *Science* 287: 2010-2012.

Tsetlin V. 1999. Snake venom  $\alpha$ -neurotoxins and other three-finger proteins. *Eur. J. Biochem.* 264: 281-286.

Underwood. H. G. 1967. A contribution to classification of snakes. Trustees of the British Museum (Natural History). Vol. 653.

Vital-Brazil O. y Fontana M. D. 1983/84. Ações prejunçãois e pós-junçãois da peçonha da cobra coral *Micrurus corallinus* na junção neuromuscular. *Mem. Inst. But.* 47/48: 13-26

Vital-Brazil O. 1987. Coral snake venoms: mode of action and pathophysiology of experimental envenomation. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 29: 119-126.

Vital-Brazil O. 1990. Pharmacology of coral snake venoms. *Mem. Inst But.* 52 (supl): 31-32

Weis R y McIsaac R. J. 1971. Cardiovascular and muscular effects of venom from coral snake *Micrurus fulvius*. *Toxicon*. 9: 219-228.

Wisniewski M. S., Hill R., Havey J. M., Bogdan G. M y Dart R. 2003. Australian tiger snake (*Notechis scutatus*) and Mexican coral snake (*Micrurus* species) antivenoms prevent death from United states coral snake (*Micrurus fulvius fulvius*). *J. Toxicol Clin. Toxicol.* 41 (1): 7-10.

## ANEXOS

### PROTOCOLO PARA TINCIÓN CON PLATA

1. Correr las muestras en un gel según las condiciones deseadas.
2. Colocar 20 min en solución A.
3. Lavar 10 min en solución B. Repetir 3 veces.
4. Colocar 5 min en solución C.
5. Lavar 4 veces en agua desionizada (hasta que se torne transparente).
6. Colocar 30 min en solución D.
7. Lavar 2 veces en agua desionizada

8. Lavar 2 veces y revelar en solución E (el revelado se detiene a consideración del experimentador. El sobreexposición puede provocar mucho ruido de fondo).
9. Parar la reacción en solución F.

Solución A: 50% metanol + 12% ácido acético

Solución B: 10% etanol + 5% ácido acético

Solución C: 3.4 mM  $K_2Cr_2O_7$  + 3.2 mM  $HNO_3$

Solución D: 12 mM  $AgNO_3$

Solución E: 280 mM  $Na_2CO_3$  + 0.05% Formaldehído

Solución F: 1% ácido acético

### WESTERN BLOTT

1. Correr las muestras en un gel según las condiciones deseadas.
2. Remojar 6 trozos de papel filtro y un pedazo de nitrocelulosa cortada al mismo tamaño del gel en amortiguador de transferencia por 15 min.
3. Cuando haya terminado de correr, colocarlo en amortiguador de transferencia  
Poner tres pedazos de papel filtro.  
Colocar el gel.  
Colocar la nitrocelulosa.  
Poner otros tres pedazos de papel filtro.

Que todo quede bien mojado y sin burbujas y que no quede mucho líquido regado en la cámara

4. Tapar la cámara (OWL, transferencia semihúmeda).
5. Poner a corriente constante 400 mA por 1 hr.
6. Incubar con leche Carnation 5% deslipidizada en TBST por 1 hr en agitación (o bien toda la noche a 4° C).
7. Lavar 3 veces, 10 min c/u, con TBST.
8. Incubar con el primer anticuerpo por 1 hr (hacer la dilución en TBST/Carnation 0.1%).
9. Lavar 3 veces, 10 min c/u, con TBST.
10. Incubar con el segundo anticuerpo (conjugado) por 1 hr a temperatura ambiente con agitación (hacer la dilución en TBST/Carnation 0.1%).
11. Lavar 3 veces, 10 min c/u, con TBST.
12. Revelar.

### REVELADO CON FOSFATASA ALCALINA

- 1.- Bloquear la nitrocelulosa en 5% Carnation o Svelty/TBST con agitación y a temperatura ambiente por un mínimo de 1hr.
- 2.- Lavar la membrana con TBST / 10 min / 3X.
- 3.- Incubar con el primer anticuerpo en 0.1% Carnation o Svelty/TBST durante 1hr a temperatura ambiente y con agitación.
- 4.- Lavar igual que en el paso 2.
- 5.- Incubar con el segundo anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina en 0.1% Carnation o Svelty/TBST durante 1hr a temperatura ambiente y con agitación.
- 6.- Lavar igual que en el paso 2.
- 7.- Eliminar el TBST del último lavado y agregar 8 ml de agua + 1 ml de NBT + 1 ml de BCIP. Cubrir el recipiente con papel aluminio y trabajar en un lugar con poca luz (los

reactivos son fotosensibles). La reacción es cromogénica, se desarrolla un color azul-morado.

8.- Parar la reacción con 20 mM EDTA.

Amortiguador TBST. Aforar a 500 ml

	Volumen (ml)	Conc. Final
1 M tris/HCl pH 7.5	5	10 mM
5 M / 4M NaCl	15 / 18.75	150 mM
Tween 20	0.25	0.05%

Amortiguador de transferencia. Aforar a 500 ml

	Peso (g)	Conc. Final
Glicina	1.45	39 mM
Tris base	2.9	48 mM
SDS	0.185	0.037%
Metanol	100 ml	20%

### PROTOCOLO PARA ELISA DIRECTO

1.- Sensibilización. No tocar la placa por debajo. Preparar una solución de antígeno a una concentración de 1 µg/ml en amortiguador Carbonato/bicarbonato. Colocar 100 µl por pozo e incubar 4 hrs a 37° C (o bien toda la noche a 4° C). No añadir en el último pozo (blanco).

2.- Lavado. Aspirar el amortiguador y colocar 200 µl por pozo de amortiguador de lavado y volver a aspirar. Repetir 3 veces.

3.- Bloqueo. Colocar 200 µl por pozo de amortiguador de bloqueo. Incubar 2 hrs a 37° C (o bien a 4° C toda la noche).

4.- Lavado. Igual que en el paso 2.

5.- Incubación con suero o plasma. Hacer las muestras por duplicado o triplicado. Se usan sólo los pozos del 1 al 10.

d) Colocar 100 µl de solución de reacción en los pozos del 2 al 12.

e) En el pozo 1 colocar 150 µl del suero diluido 1:30 en amortiguador de reacción.

f) Tomar 50 µl del pozo 1 y colocarlos en el 2. Pipetear 7 veces. Se va haciendo lo mismo en los siguientes pozos hasta el 10. El contenido que se recoge del pozo 10 se desecha.

6.- Lavado. Igual que el paso 2.

7.- Incubación con el segundo anticuerpo (conjugado). Hacer una dilución 1:1000 del anticuerpo acoplado a peroxidasa en 10 ml de amortiguador de reacción. Añadir 100 µl a cada pozo. Incubar 1 hr a 37° C.

8. Lavado. Igual que el paso 2.

9.- Revelado. Preparar 10 ml de solución de revelado. Añadir 100 µl a cada pozo. CONTAR 10 min. Añadir 100 µl de SDS 10% para detener la reacción. [La solución de revelado también puede prepararse añadiendo 100 µl de solución 40 mM ABTS a 1 ml de buffer para ABTS 10X (Roche) y aforando a 10 ml con agua].

10. Leer a 405 nm.

## ELISA COMPETITIVO

### PLACA A

- 1.- Sensibilización. No tocar la placa por debajo. Preparar una solución de veneno a una concentración de 1 µg/ml en amortiguador Carbonato/bicarbonato. Colocar 100 µl por pozo (100 ng/pozo) e incubar 4 hrs a 37° C (o bien toda la noche a 4° C). No añadir en el último pozo (blanco).
- 2.- Lavado. Aspirar el amortiguador y colocar 200 µl por pozo de amortiguador de lavado y volver a aspirar. Repetir 3 veces.
- 3.- Bloqueo. Colocar 200 µl por pozo de amortiguador de bloqueo. Incubar 2 hrs a 37° C (o bien a 4° C toda la noche).
- 4.- Lavado. Igual que en el paso 2.
- 5.- Incubación con mezcla veneno-antiveneno. Colocar 100 µl de cada pozo de la PLACA B. Incubar 1 hr. a 37° C
- 6.- Lavado. Igual que el paso 2
- 7.- Incubación con el anticuerpo conjugado. Hacer una dilución 1:1000 del anticuerpo conjugado a peroxidasa en 10 ml de amortiguador de reacción. Añadir 100 µl a cada pozo. Incubar 1 hr a 37° C.
- 8.- Lavado. Igual que el paso 2.
- 9.- Revelado. Preparar 10 ml de solución de revelado. Añadir 100 µl a cada pozo. CONTAR 10 min. Añadir 100 µl de SDS 10%) para detener la reacción.
- 10.- Leer a 405 nm.

### PLACA B

- 1.- Bloqueo. Colocar 200 µl por pozo de amortiguador de bloqueo. Incubar 2 hrs a 37° C (o bien a 4° C toda la noche).
- 2.- Lavado. Aspirar el amortiguador y colocar 200 µl por pozo de amortiguador de lavado y volver a aspirar. Repetir 3 veces.
- 3.- Añadir a todos los pozos 100 µl de solución de reacción
- 4.- Dilución. Pipetear 50 µl de stocks de venenos en cada pozo. Mezclar cinco veces, hacer diluciones seriadas 1:3 hasta la columna 10.
- 5.- Reacción. Añadir a cada pozo 100 µl de antiveneno. Incubar 1 hr a 37°C
- 6.- Tomar 100 µl de cada pozo y colocarlos en la PLACA A

### Amortiguadores utilizados en ELISA

#### Solución concentrada de PBS 10X (Solución stock)

- 80 g NaCl
- 2 g KCl
- 14.4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 2.4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- Se disuelve y se ajusta el pH a 7.2 con NaOH 2N
- Aforar a 1 L.
- Se puede esterilizar la solución stock o las de trabajo.

#### 100 mM Carbonato/bicarbonato pH 9.6

0.84 g NaHCO<sub>3</sub> Aforar a 100 ml

1.059 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Aforar a 100 ml.

La solución de NaHCO<sub>3</sub> se coloca en hielo y se ajusta el pH a 9.6 con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Se recomienda congelar una vez ajustado el pH.

#### 1 M Tris-HCl pH 7.2, 7.5, 8 y 8.9

121.14 g de Tris base. Se disuelven en agua, se ajusta el pH al deseado con HCl concentrado y se afora a 1L.

#### Amortiguador de lavado 10X

87.66 g NaCl (1M) se disuelven en 500 mM Tris-HCl pH 8. Se afora a 1 L (con el mismo amortiguador). Se filtra en poro de 2 µm.

Para la solución de trabajo se toman 100 ml de esta solución y se disuelven en 900 ml de agua, se adicionan 500 µL de Tween 20. Se guarda a 4° C.

#### Amortiguador de reacción

Para 100 ml

50 mM Tris HCl pH 8

500 mM NaCl

0.1 g de gelatina

Se calienta para disolver.

Al alcanzar la temperatura ambiente se agregan 50 µL de Tween 20. Si no se va a usar inmediatamente se recomienda congelarla y si su uso es frecuente se puede refrigerar.

#### Amortiguador de Bloqueo

0.5 g gelatina se disuelven en 100 ml de Tris-HCl pH 8, se calienta para disolver. Cuando se alcanza la temperatura ambiente se adicionan 200 µl de Tween 20.

#### Amortiguador de revelado para ABTS

4.8 g de Ácido cítrico se disuelven en 400 ml de agua, se ajusta el pH a 4 con NaOH 10 N, se afora a 500 ml y se guarda en congelación.

#### 40 mM ABTS

0.022 g de ABTS se disuelven en 1 ml de agua se cubre de la luz y se guarda a 4° C. Esta solución es estable por 4 meses. La solución de revelado también puede prepararse añadiendo 100 µl de solución 40 mM ABTS a 1 ml de buffer para ABTS 10X (Roche) y aforando a 10 ml con agua.

#### 500 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

50 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) y se adicionan a 750 µl de agua. Se protege de la luz y se guarda a -20° C. Esta solución es estable por 1 mes.

## Esquemas de inmunización

Cuadro 3. Esquema de inmunización de conejos con el veneno crudo de *M. distans*. La vía de administración fue subcutánea y se utilizó adyuvante completo de Freund únicamente en las primeras dos semanas, posteriormente se utilizó sólo adyuvante incompleto

Semana	Cantidad de proteína ( $\mu\text{g}$ )	Sangría
0	5	Suero preinmune
1	5	
2	5	
3	10	
4	15	Primera
5	20	
6	40	
7	80	
8	120	Segunda
9	250	
10	250	
11	250	Tercera
12	500	
13	500	
14		A blanco

Cuadro 4. Esquema de inmunización de conejos con el veneno crudo de *M. laticollaris*. La vía de administración fue subcutánea y se utilizó adyuvante completo de Freund únicamente en las primeras dos semanas, posteriormente se utilizó sólo adyuvante incompleto

Semana	Cantidad de proteína ( $\mu\text{g}$ )	Sangría
0	5	Suero preinmune
1	5	
2	5	
3	10	
4	15	
5	20	
6	40	Primera
7	80	
8	120	
9	250	Segunda
10	250	
11	250	
12	250	Tercera
13		A blanco



anti-distans	EC50	95% CI	EC50 Mdiss	EC50 p/c sp	Hill Slope	95% CI	H. S. Mdiss
<i>M. b. browni</i>	4.304	2.064 a 8.974	1.302	73.97	-0.5769	-0.724 a -0.43	-0.670
<i>M. b. taylorni</i>	1.573	1.131 a 2.188	1.302	27.03	-0.5102	-0.567 a -0.453	-0.670
<i>M. browni</i>	1.458	0.863 a 2.462	1.302	25.06	-0.4746	-0.551 a -0.398	-0.670
<i>M. distema</i>	7.366	1.877 a 28.85	3.209	51.36	-0.396	-0.493 a -0.299	-0.486
<i>M. distans</i>	1.302	0.971 a 1.746	1.302	22.38	-0.3653	-0.769 a -0.571	-0.365
<i>M. f. fitzingeri</i>	18.01	6.201 a 52.29	1.497	269.20	-0.4653	-0.559 a -0.371	-0.557
<i>M. fulvius</i>	0.9041	0.429 a 1.904	1.497	13.51	-0.3837	-0.456 a -0.311	-0.557
<i>M. laticollaris</i>	1.736		90.52	0.43	-0.4791	-0.622 a -0.336	-0.365
<i>M. limbatus</i>	8.92		90.52	2.20	-0.4456	-0.5 -0.391	-0.365
<i>M. nigrocinctus</i>	164.4		90.52	40.64	-0.2868	-0.697 a -0.176	-0.365
<i>M. sp</i>	1.208	0.745 a 1.956	1.497	18.06	-0.4674	-0.578 a -0.397	-0.557
<i>M. surinamensis</i>	312.8	1.32 E-4 a 7.12 E8	3.209	2181.10	-0.3459	-0.711 a 0.019	-0.486
<i>M. tener</i>	4.277	2.577 a 7.1	3.209	29.82	-0.461	-0.518 a -0.404	-0.486
			22.376				-0.508

	H. S. Mdiss	HS p/c sp	% Comp. Máx	Competencia
<i>M. b. browni</i>	1.32	-0.437	81.14	+++
<i>M. b. taylorni</i>	1.32	-0.387	77.37	++
<i>M. browni</i>	1.32	-0.360	62.61	++
<i>M. distema</i>	0.96	-0.414	91.401	+++
<i>M. distans</i>	0.72	-0.508	100	+++
<i>M. f. fitzingeri</i>	1.10	-0.424	85.3	+++
<i>M. fulvius</i>	1.10	-0.350	52.06	+
<i>M. laticollaris</i>	0.72	-0.666	47.7	+
<i>M. limbatus</i>	0.72	-0.619	67.28	++
<i>M. nigrocinctus</i>	0.72	-0.399	56.3	+
<i>M. sp</i>	1.10	-0.426	60.05	+
<i>M. surinamensis</i>	0.96	-0.361	36.12	+
<i>M. tener</i>	0.96	-0.481	80.59	+++

Datos de competencia entre los diferentes venenos heterólogos en fase líquida, el veneno de *M. distans* en fase sólida (1 µg/ml) y el suero de conejo anti-distans (diluído 1:64000).

**anti-laticollaris**

	<b>EC50</b>	<b>95% CI</b>	<b>EC50 Mlat</b>	<b>EC50 Mlat Norm</b>	<b>EC50 p/c sp Normalizadas</b>	<b>Hill Slope</b>	<b>95% CI</b>	<b>H. S. Mlat</b>
<i>M. b. browni</i>	0.230	0.093 a 0.566	0.331	0.674	0.341	-0.573	-0.81 a -0.335	-0.739
<i>M. b. taylora</i>	0.370	0.116 a 1.178	0.331	0.674	0.549	-0.602	-0.935 a -0.267	-0.739
<i>M. browni</i>	0.372	0.155 a 0.892	0.331	0.674	0.552	-0.668	-0.984 a -0.352	-0.739
<i>M. diastema</i>	0.013	0.006 a 0.028	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>M. diastema</i>	51.860	18.14 a 148.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>M. distans</i>	0.165	8.9 E -4 a 30.2	0.709	1.441	0.114	-0.281	-0.56 a -0.001	-0.407
<i>M. f. fitzingeri</i>	8.459	1.577 a 45.38	0.637	1.295	6.530	-0.652	-1.097 a -0.208	-0.484
<i>M. fulvius</i>	0.401	0.14 a 1.147	0.637	1.295	0.310	-0.419	-0.548 a -0.289	-0.484
<i>M. laticollaris</i>	0.331	0.157 a 0.696	0.331	0.674	0.492	-0.739	-1.046 a -0.432	-0.739
<i>M. limbatus</i>	0.804	0.219 a 2.951	0.709	1.441	0.558	-0.574	-0.884 a -0.2633	-0.407
<i>M. nigrocinctus</i>	0.627	0.181 a 2.166	0.709	1.441	0.435	-0.507	-0.73 a -0.283	-0.407
<i>M. sp</i>	7.455	0.46 a 120.8	0.637	1.295	5.755	-0.317	-0.433 a -0.201	-0.484
<i>M. sunnamensis</i>	34.150	3.99 E-4 a 2.9 E 6	0.2707	0.550	62.068	-0.274	-0.542 a -0.005	-0.389
<i>M. tener</i>	13.520	0.089 a 2034	0.2707	0.550	24.573	-0.33	-0.531 a -0.122	-0.389
			0.492					-0.534

**HS p/c sp**

<b>H. S. Mlat Normalizada</b>	<b>BOTTOM</b>	<b>% Comp. Máx</b>	<b>Competencia</b>
1.384	36.2	63.8	++
1.384	40.9	59.1	+
1.384	38.6	61.4	++
ND	29.73	70.3	++
ND	29.73	70.3	++
0.763	59.2	40.8	+
0.906	43.24	56.8	+
0.906	48.32	51.7	+
1.384	0	100	+++
0.763	58.72	41.3	+
0.763	41.5	58.5	+
0.906	36.49	63.5	++
0.728	43.69	56.3	+
0.728	8.48	91.5	+++

**% Comp. Máx Competencia**

<b>H. S. Mlat Normalizada</b>	<b>HS p/c sp Normalizada</b>	<b>BOTTOM</b>	<b>% Comp. Máx</b>	<b>Competencia</b>
1.384	-0.414	36.2	63.8	++
1.384	-0.435	40.9	59.1	+
1.384	-0.483	38.6	61.4	++
ND	ND	29.73	70.3	++
ND	ND	29.73	70.3	++
0.763	-0.368	59.2	40.8	+
0.906	-0.720	43.24	56.8	+
0.906	-0.462	48.32	51.7	+
1.384	-0.534	0	100	+++
0.763	-0.752	58.72	41.3	+
0.763	-0.664	41.5	58.5	+
0.906	-0.350	36.49	63.5	++
0.728	-0.376	43.69	56.3	+
0.728	-0.449	8.48	91.5	+++

Datos de competencia entre los diferentes venenos heterólogos en fase líquida, el veneno de *M. laticollaris* en fase sólida (1 µg/ml) y el suero de conejo anti-laticollaris diluido (1:100000).

CORALMYN	EC50	95% CI	EC50 Mnig	EC50 p/c sp	Hill Slope	95% CI	H. S. Mnig
			Norm	Normalizadas			
<i>M. b. browni</i>	0.102	0.068 a 0.152	0.149	0.962	-0.876	-1.137 a -0.614	-1.336
<i>M. b. taylori</i>	0.149	0.157 a 0.417	0.149	0.962	-0.795	-1.346 a -0.588	-1.336
<i>M. browni</i>	0.161	0.08 a 0.319	0.149	0.962	-0.967	-1.154 a -0.436	-1.336
<i>M. diastema</i>	0.120	0.083 a 0.174	0.183	1.183	-0.920	-1.162 a -0.272	-1.283
<i>M. distans</i>	0.111	0.055 a 0.225	0.100	0.645	-1.492	-2.797 a -0.186	-2.123
<i>M. euryxanthus</i>	0.273	0.09 a 0.821	0.183	1.183	-0.717	-1.162 a -0.272	-1.283
<i>M. f. fitzingeri</i>	2.794	0.546 a 14.3	0.161	1.040	-0.532	-0.755 a -0.31	-1.649
<i>M. fulvius</i>	0.120	0.07 a 0.207	0.185	1.196	-1.190	-1.848 a -0.532	-1.801
<i>M. laticollaris</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>M. limbatus</i>	0.250	0.103 a 0.61	0.100	0.645	-0.858	-1.393 a -0.323	-2.123
<i>M. nigrocinctus</i>	0.100	0.055 a 0.181	0.100	0.645	-1.043	-4.291 a 0.046	-1.043
<i>M. sp</i>	0.333	0.14 a 0.79	0.185	1.196	-1.029	-1.79 a -0.268	-1.801
<i>M. sunnamensis</i>	14.160	0.01 a 19240	0.185	1.196	-1.053	-5.409 a 2.944	-1.801
<i>M. tener</i>	0.156	0.111 a 0.219	0.183	1.183	-0.953	-1.211 a -0.694	-1.283
			0.155	0.132			-1.554

	H. S. Mnig	HS p/c sp	% Comp. Máx	Competencia
	Normalizada	Normalizada	BOTTOM	
<i>M. b. browni</i>	0.860	-1.019	73.1	++
<i>M. b. taylori</i>	0.860	-0.925	71.1	++
<i>M. browni</i>	0.860	-1.124	78.1	++
<i>M. diastema</i>	0.826	-1.114	92.0	+++
<i>M. distans</i>	1.366	-1.092	57.9	+
<i>M. euryxanthus</i>	0.826	-0.868	24.1	+
<i>M. f. fitzingeri</i>	1.061	-0.502	63.1	++
<i>M. fulvius</i>	1.159	-1.027	60.4	++
<i>M. laticollaris</i>	ND	ND	88.0	+++
<i>M. limbatus</i>	1.366	-0.628	66.1	++
<i>M. nigrocinctus</i>	0.671	-1.554	100	+++
<i>M. sp</i>	1.159	-0.888	73.5	++
<i>M. sunnamensis</i>	1.159	-0.909	37.3	+
<i>M. tener</i>	0.826	-1.154	79.1	++

Datos de competencia entre los diferentes venenos heterólogos en fase líquida, el veneno de *M. nigrocinctus* en fase sólida (1 µg/ml) y el Coralimyn (diluido 1:4000).