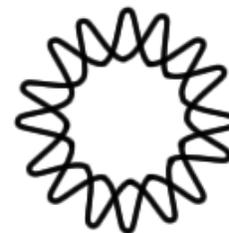




INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

---

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO



## **CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL VENENO DE LA SERPIENTE DE CORAL *Micrurus tener***

Presenta: Melisa Bénard Valle

Maestría en Ciencias Bioquímicas

Tutor: Dr. Alejandro Alagón Cano

Octubre, 2011



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.

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	3
Los coralillos.....	3
Epidemiología y síntomas.....	5
Los venenos.....	7
ANTECEDENTES.....	9
OBJETIVOS.....	13
General.....	13
Particulares.....	13
HIPÓTESIS.....	13
METODOLOGÍA.....	14
Procedencia y cuantificación de los venenos.....	14
Estrategia experimental.....	14
SDS-PAGE.....	15
Fraccionamiento por RP – HPLC .....	16
Determinación de masa molecular.....	16
Toxicidad.....	16
Ensayo de actividad de fosfolipasa A2.....	17
Pruebas de afinidad por el receptor de acetilcolina.....	17
RESULTADOS.....	19
Etapa 1. Caracterización del veneno completo de <i>M. tener</i> .....	19
SDS-PAGE y Actividad PLA <sub>2</sub> .....	19
Letalidad y signología.....	19
Fraccionamiento por HPLC de fase reversa.....	21
Resumen de la Etapa 1 .....	23
Etapa 2. Caracterización de fracciones.....	24
SDS-PAGE.....	24
Análisis de masas por espectrometría (ESI-MS).....	25
Letalidad.....	27
Actividad PLA <sub>2</sub> .....	28

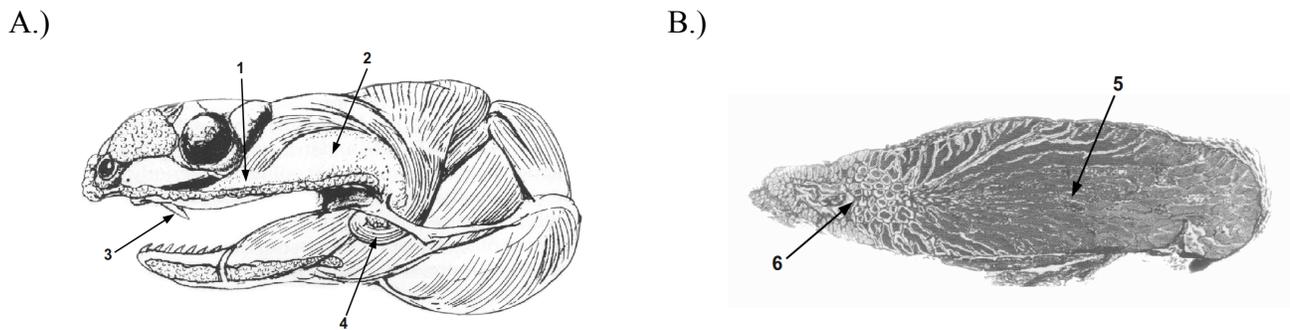
Resumen de la Etapa 2.....	29
Etapa 3: Unión a receptores de acetilcolina.....	30
DISCUSIÓN.....	32
Etapa 1. Caracterización del veneno completo de M. tener.....	32
Etapas 2 y 3: Caracterización de fracciones.....	34
a.) Compuestos de bases nitrogenadas.....	34
b.) Componentes con actividad $\alpha$ -neurotóxica.....	35
c.) Componentes con actividad de fosfolipasa A <sub>2</sub> .....	37
CONCLUSIONES.....	39
LITERATURA CITADA.....	40

# INTRODUCCIÓN

## Los coralillos

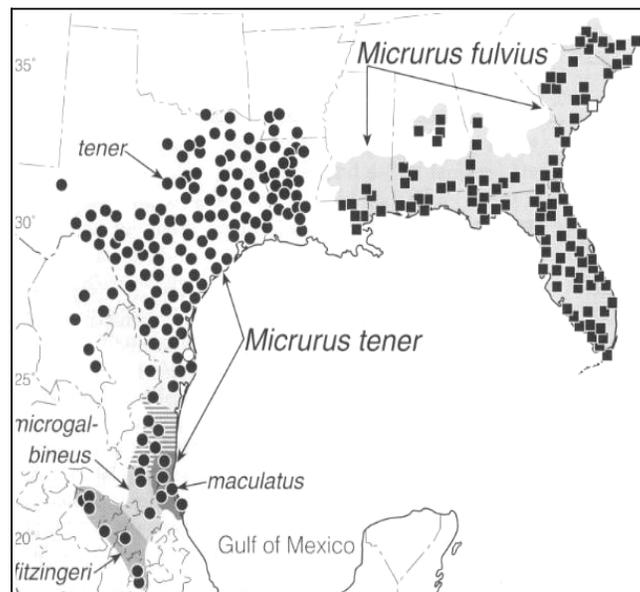
Las serpientes de coral o coralillos pertenecen a la familia Elapidae, un grupo de serpientes venenosas cuya principal característica es una dentición de tipo proteroglifa, es decir, poseen colmillos huecos inoculadores de veneno fijos en la parte frontal superior del hocico, sobre el hueso maxilar (Figura 1.1). Los representantes americanos más diversificados de este grupo se conocen como coralillos del nuevo mundo y están agrupados en tres géneros: *Leptomicrurus* (4 especies), *Micruroides* (1 especie) y *Micrurus* (más de 66 especies). Estas serpientes se caracterizan por su brillante coloración, generalmente en patrones de anillos rojos, negros y amarillos o blancos. Pueden ser encontradas en prácticamente todos los hábitats desde el sur de E.U.A. hasta Argentina (Campbell y Lamar, 2004). Son serpientes huidizas y relativamente pequeñas pues rara vez superan un metro de longitud. En la mayoría de los casos, son de hábitos semifosoriales y crepusculares, pasando la mayor parte del tiempo bajo troncos u hojarasca cazando serpientes pequeñas y lagartos los cuales componen gran parte de su dieta (Roze, 1996). Debido en parte a lo anterior y a su naturaleza poco agresiva, los accidentes ocasionados por estos reptiles son poco frecuentes.

El aparato inoculador de veneno consta de una glándula venenosa principal localizada a cada lado del hueso maxilar, por debajo y atrás del ojo. Ésta tiene forma alargada y consiste en una porción posterior de tejido productor de veneno y una gran cantidad de túbulos. Justo por debajo del ojo, la glándula principal cambia su aspecto histológico y se convierte en una glándula denominada accesoria formada por muchos túbulos pequeños que desembocan en el conducto secretor (Figura 1.1B). La función de esta glándula no está del todo clara, sin embargo, es posible que esté relacionada con la protección de la glándula principal ante agentes patógenos. Finalmente, el conducto secretor desemboca en el colmillo inoculador. Un solo músculo (*M. adductor externus superficialis*) es el encargado de la expulsión de veneno, éste rodea a la glándula principal por la parte posterior y dorsal (Figura 1.1A).



**Figura 1.1.** Aparato inoculador de veneno de las serpientes de coral. **A.)** Glándulas y músculos de *Micrurus fulvius fulvius*. Se señala la glándula venenosa principal (1) y accesoria (2), así como el colmillo inoculador (3) y el músculo adductor externus superficialis (4). **B.)** Sección transversal de las glándulas venenosa principal (5) y accesoria (6) de *M. fulvius* (Adaptado de Roze, 1996).

*Micrurus tener*, la serpiente de coral que concierne a este estudio, se distribuye desde el oeste del río Mississippi hasta el río Grande en Texas y hacia el Sur por el Golfo de México (Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas y Veracruz) y el centro del país (Morelos, Hidalgo, Querétaro, Guanajuato y San Luis Potosí) (Figura 1.2). Como la mayoría de los coralillos, es una serpiente poco agresiva que se alimenta de pequeños reptiles; Roze (1997) reporta que sus presas preferidas incluyen síncidos como *Plestiodon fasciatus* y *P. tetragammus* así como pequeñas culebras como *Virginia striatula*.



**Figura 1.2.** Distribución geográfica de *M. tener* y sus subespecies (Campbell y Lamar, 1997).

### Epidemiología y síntomas

Se estima que cada año ocurren en el mundo alrededor de 2.6 millones de envenenamientos por mordedura de serpiente de los cuales unos 125 000 son fatales (Chippaux, 1998). En América, la mayor parte (aproximadamente 95%) de estos accidentes son ocasionados por serpientes de la familia Viperidae, subfamilia Crotalinae, la cual comprende a varios géneros de importancia médica como *Bothrops*, *Crotalus* y *Agkistrodon* (Pough *et al.*, 2008). Por otro lado, la familia Elapidae, representada en América por tres géneros de serpientes de coral o coralillos (*Micrurus*, *Micruroides* y *Leptomicrurus*) y una especie de serpiente marina (*Pelamis platurus*), ocasiona menos del 5% de los envenenamientos (Juckett y Hancox, 2002; Sánchez *et al.*, 2008). Aún así, la alta toxicidad de los venenos de las serpientes de coral (Aird y DaSilva, 1991; Carbajal-Saucedo, 2004; deRoodt *et al.*, 2004; Bénard-Valle, 2009) hace de estos accidentes un problema de salud pública relevante que requiere de tratamientos efectivos.

En humanos, los envenenamientos por mordedura de coralillo ocasionan cuadros clínicos marcadamente neurotóxicos cuya severidad varía de leves a muy graves e incluso fatales. Los casos leves se caracterizan por síntomas locales como enrojecimiento, inflamación de leve a moderada y en algunos casos dolor (Morgan *et al.*, 2007). En casos moderados los síntomas incluyen ptosis palpebral (flacidez y caída de los párpados superiores), parálisis flácida de los músculos de la laringe, faringe y mandíbula, oftalmoplejía (inmovilidad de los globos oculares), nistagmus (movimiento involuntario de los ojos y sialorrea (salivación excesiva). En casos severos puede presentarse parálisis flácida del cuello y extremidades seguida de una parálisis del diafragma dando lugar a muerte por insuficiencia respiratoria (Roze, 1996).

El desarrollo de los síntomas y la severidad de los cuadros clínicos durante un envenenamiento por coralillo están determinados por una amplia variedad de factores relacionados tanto a la serpiente como al paciente. Se ha observado que el estado de salud general del individuo mordido, su edad, peso corporal y el consumo de sustancias embriagantes, entre otros, pueden afectar el desarrollo de los

## Introducción

envenenamientos (Kitchens y Van Mierop, 1987). Otro factor determinante es la cantidad de veneno inoculada por la serpiente la cual depende principalmente de la especie y el tamaño de ésta. En promedio, una serpiente de coral inocula entre 10 y 20 mg de veneno en una mordedura, sin embargo se han reportado hasta 28 mg en especies norteamericanas como *M. fulvius* (Fix, 1980) y 160 mg en especies sudamericanas de mayor tamaño como *M. spixii* y *M. surinamensis* (Roze, 1996). En 1980, Fix reportó una correlación directa entre el tamaño de la serpiente y la cantidad de veneno inoculada. Finalmente, es relevante mencionar que no en todos los casos de mordeduras se inocula veneno; Kitchens y Van Mierop (1987) reportaron que de 39 casos analizados, sólo el 75% presentó síntomas de envenenamiento.

Existen muy pocos estudios respecto a la incidencia y sintomatología de los envenenamientos provocados por *M. tener* en Estados Unidos y aún menos en México debido en parte a la dificultad de identificación de estas serpientes y a que los datos epidemiológicos rara vez son correctamente colectados y almacenados. En un estudio retrospectivo en el estado de Texas, Morgan y colaboradores (2007) reportan un total de 82 pacientes envenenados por *M. tener* entre 2000 y 2004, aproximadamente la mitad de ellos fueron tratados con el antiveneno NACSA. De manera interesante, observaron que sólo el 7.3% de estos pacientes desarrolló síntomas sistémicos (mareos, vómitos, debilidad, fasciculaciones) sin llegar nunca a presentar parálisis y el resto presentó solamente síntomas locales como eritema, inflamación y dolor leve o moderado. Aparentemente, los envenenamientos ocasionados por esta especie son poco severos a diferencia de los ocasionados por *M. fulvius*, en los que se han observado síntomas como parálisis flácida generalizada e incluso insuficiencia respiratoria y muerte (Norris *et al.*, 2009; Parrish y Khan, 1967).

Actualmente, el único tratamiento efectivo para los envenenamientos por serpiente de coral es la aplicación de un antiveneno específico (Kitchens y Van Mierop, 1987; Davidson y Eisner, 1996; Gold y Wingert, 1994). Debido a que los síntomas sistémicos pueden presentarse de manera tardía, entre 1 y 32 horas después del accidente, o no presentarse del todo, es aconsejable mantener al paciente en observación durante aproximadamente 48 horas (Roze, 1996; Morgan *et al.*, 2007).

### Los venenos

El veneno de las serpientes de coral, al igual que el del resto de las serpientes, es una mezcla compleja de componentes. La mayoría de éstos (alrededor del 90% del peso seco de cada veneno) son de naturaleza proteica, ya sea enzimas o proteínas sin actividad enzimática. Prácticamente todos los componentes tóxicos se encuentran en este grupo, sin embargo, no todas las proteínas de venenos tienen un efecto tóxico conocido; el papel de enzimas como fosfodiesterasas y L-aminoácido oxidasas aisladas de distintos venenos de coralillos, es aún motivo de debate (Aird, 2002). Aunque mucho menos abundantes, componentes no proteicos como algunos lípidos, carbohidratos, sales, metales y nucleósidos han sido observados en todos los venenos de serpientes. Su papel durante el envenenamiento, suponiendo que lo tengan, ha sido poco estudiado. Aird, por ejemplo, propuso en el 2002 una variedad de mecanismos de toxicidad de las purinas presentes en venenos de serpientes. Por otro lado, es un hecho que gran cantidad de enzimas requieren de cofactores como por ejemplo iones metálicos para ser activas (Berg *et al.*, 2002).

En estudios previos, se ha observado que los componentes tóxicos más relevantes en los venenos de coralillos son  $\alpha$ -neurotoxinas pertenecientes a la familia de las “toxinas de tres dedos” y fosfolipasas A<sub>2</sub> (Aird y DaSilva, 1991; Alape-Girón, 1997; Rosso et al., 2002). Ambos tipos de toxinas, al actuar sobre la sinapsis neuromuscular, son capaces de ocasionar una parálisis flácida de los músculos debida a un bloqueo del impulso nervioso.

Las  $\alpha$ -neurotoxinas ( $\alpha$ -NTX) de la familia de las “toxinas de tres dedos” (3FTX) son proteínas básicas de bajo peso molecular (alrededor de 7 000 Da). Están formadas por entre 60 y 74 aminoácidos y poseen afinidad por distintos receptores de acetilcolina (Tsetlin y Hucho, 2004). Estas toxinas actúan como antagonistas del neurotransmisor, evitando la apertura del canal iónico y por lo tanto la transmisión del impulso nervioso (Nirthanan y Gwee, 2004). Este grupo se subdivide a su vez en dos:  $\alpha$ -neurotoxinas cortas y largas. Las neurotoxinas cortas se unen al receptor nicotínico de acetilcolina muscular con una afinidad de orden nanomolar, poseen entre 60 y 62 aminoácidos y cuatro puentes disulfuro. Las neurotoxinas largas están conformadas por 66 a 74 aminoácidos y 5 puentes disulfuro.

Estas últimas, a diferencia de las cortas, son capaces de unirse al receptor nicotínico de acetilcolina neuronal  $\alpha 7$  además del receptor muscular (Kini y Doley, 2010).

El segundo grupo de toxinas relevantes, las fosfolipasas  $A_2$ , son enzimas de alrededor de 14 000 Da que catalizan la hidrólisis del enlace éster en la posición *sn*-2 de los glicerofosfolípidos. Son capaces de ejercer una amplia gama de efectos farmacológicos como neurotoxicidad, cardiotoxicidad y miotoxicidad, entre otros. (Kini, 2003). Existen  $PLA_2$  capaces de comportarse como neurotoxinas presinápticas o  $\beta$ -neurotoxinas, es decir, evitando la liberación de acetilcolina en la sinapsis neuromuscular (Pungercar y Krizaj, 2007). Las  $PLA_2$  con actividad  $\beta$ -neurotóxica son el grupo de toxinas de serpiente con mayor potencia letal conocida ( $DL_{50}$  entre 1 y 1250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; Alape-Girón, 1997). Producen un característico efecto trifásico sobre la transmisión del impulso nervioso: durante la primera fase se observa una inhibición de la liberación del neurotransmisor, posteriormente se presenta un breve aumento en esta liberación y finalmente, durante la tercera fase, se observa una disminución progresiva de la respuesta nerviosa que finaliza en la total ausencia de ésta (Caccin *et al.*, 2006).

La investigación de la composición de estos venenos y la caracterización de sus componentes tóxicos es de vital importancia en la comprensión de la fisiopatología de los envenenamientos y por lo tanto el desarrollo de tratamientos adecuados. Con el fin de comprender el mecanismo de funcionamiento de un veneno, es necesario estudiarlo desde un punto de vista evolutivo, observando su efecto sobre distintos modelos animales, en particular las presas naturales.

## ANTECEDENTES

En México, los envenenamientos por serpiente de coral son tratados con el antiveneno comercial Coralmyn<sup>®</sup> producido por el Instituto Bioclon y generado mediante la inmunización de caballos con el veneno de *Micrurus nigrocinctus*, una especie de coralillo centroamericana. Este antiveneno ha probado ser eficaz en casos clínicos, sin embargo, rara vez en estos casos es conocida la especie que ocasionó el envenenamiento y se ha reportado la baja capacidad neutralizante de este antiveneno contra algunas especies mexicanas como *M. laticollaris* (Carbajal-Saucedo, 2005).

En EUA, el antiveneno utilizado para tratar estos envenenamientos hasta el 2008 era NACSA (North American Coral Snake Antivenom), producido por la empresa Wyeth mediante la inmunización de caballos con el veneno de *M. fulvius*. Su eficacia clínica ha sido evidente ya que desde su aparición en el mercado en 1967 la mortalidad debida a envenenamientos por mordedura de coralillo en EUA, anteriormente alrededor de un 10%, se ha reducido casi a cero (Sánchez *et al.*, 2008). En 2006, sin embargo, la compañía Wyeth anunció que el antiveneno NACSA sería discontinuado y que las reservas alcanzarían aproximadamente hasta Octubre de 2008. Debido a lo anterior, es de vital importancia probar la eficacia de otros antivenenos como Coralmyn<sup>®</sup> contra las especies de coralillos estadounidenses y realizar investigación sobre la bioquímica e inmunoquímica de estos venenos con el fin de contribuir al entendimiento de los cuadros clínicos y mejorar las terapias existentes.

A la fecha existen pocas especies de coralillos cuyo veneno haya sido estudiado con cierto detalle, entre ellas se encuentran la especie norteamericana *M. laticollaris* (Carbajal-Saucedo, tesis de doctorado en desarrollo), así como las centro-sudamericanas *M. surinamensis* (Olamendi-Portugal, 2008), *M. corallinus* (Leao *et al.*, 2009) y *M. nigrocinctus* (Alape-Girón, 1997; Fernández *et al.*, 2010). Sin embargo, se han llevado a cabo estudios comparativos enfocados en actividades bioquímicas, biológicas y enzimáticas (Da Silva Jr. *et al.*, 1991; Tan y Ponnudurai, 1992; Higashi *et al.*, 1995; Da Silva Jr. y Aird, 2001; Cecchini *et al.*, 2005; Corrêa-Netto *et al.*, 2011) así como en el desarrollo y mejoramiento de antivenenos (Arce *et al.*, 2003; Wisniewski *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2008). De esta manera se ha determinado la presencia de actividades enzimáticas como fosfolipasa A<sub>2</sub>,

acetilcolinesterasa, L-aminoácido deshidrogenasa y leucina aminopeptidasa (Da Silva Jr. *et al.*, 1991) y se ha reportado que las principales toxinas de los venenos son neurotoxinas postsinápticas ( $\alpha$ -neurotoxinas) y presinápticas (fosfolipasas A<sub>2</sub> con actividad  $\beta$ -neurotóxica) (Alape-Girón, 1997; Rosso *et al.*, 2002).

Además de estos reportes de actividad *in vitro*, existen estudios *in vivo* (Vital-Brazil, 1987; Weis y McIsaac, 1971) que apuntan a una gran relevancia de las neurotoxinas presinápticas y postsinápticas en los envenenamientos, además de reportar otros efectos como cardiotoxicidad y depolarización del músculo esquelético (Weis y McIsaac, 1971). A partir de estudios electrofisiológicos y observaciones *in vivo* de los efectos del veneno de 4 especies de coralillos centro y sudamericanos, Vital-Brazil (1987) propuso una clasificación que comprende tres grupos:

- i.) Venenos que presentan solamente neurotoxicidad postsináptica. (*M. frontalis* y *M. lemniscatus*)
- ii.) Venenos que presentan neurotoxicidad postsináptica y presináptica. (*M. corallinus*)
- iii.) Venenos que presentan neurotoxicidad postsináptica e inducen despolarización de la membrana muscular. (*M. fulvius*)

En trabajos previos, se ha descrito neurotoxicidad presináptica en los venenos de *Micrurus corallinus* (Vital-Brazil, 1983/84) y *M. dumerilli carnicauda* (Serafím *et al.*, 2002). Además, a partir del veneno de *M. nigrocinctus* han sido caracterizadas dos PLA<sub>2</sub> (Nigroxinas A y B) que presentan alta similitud inmunoquímica con la taipoxina y la textilotoxina, dos neurotoxinas presinápticas de venenos elapídicos (Alape-Girón *et al.*, 1996) aunque no se ha reportado a la fecha actividad presináptica en el veneno de esta última especie.

En cuanto a los reportes de neurotoxicidad postsináptica, se han reportado al menos 17 toxinas con capacidad bloqueadora del receptor de acetilcolina en venenos de varias especies de serpientes de coral (Alape-Girón *et al.*, 1996; Rosso *et al.* 1996; Olamendi-Portugal *et al.*, 2009; Carbajal-Saucedo, tesis de doctorado en desarrollo).

Es interesante notar que en distintos venenos estudiados a la fecha se han encontrado

componentes que no tienen efectos tóxicos en los modelos animales utilizados, generalmente ratones (Posanni *et al.*, 1979; Olamendi-Portugal *et al.*, 2008). Es posible, por lo tanto, poner en duda la utilidad de este modelo para la caracterización bioquímica de muchos venenos, en particular los de aquellos animales cuya dieta consiste en animales no mamíferos. DaSilva y Aird (2001) observaron que la mayoría de los venenos de coralillos tienen una potencia letal mayor al ser probados en sus presas naturales que al ser probados en ratones. Por ejemplo, *M. surinamensis*, un coralillo sudamericano cuya dieta consta casi exclusivamente de peces tiene un veneno 20 veces más letal al ser probado en el pez *Gymnotus carapo* que al ser probado en ratones. Por otro lado, el veneno de *M. altirostris*, una especie principalmente ofiófaga, es 4 veces más letal sobre la culebra *Liophis typhlus* que en ratones (DaSilva y Aird, 2001). Es posible que algunas de las toxinas que no parecen ser relevantes para el envenenamiento en mamíferos, sí lo sean para reptiles. Esta información proporcionaría un enfoque muy interesante para estudios evolutivos referentes a la función de toxinas particulares además de contribuir a comprender el mecanismo de acción de los venenos dentro de un organismo.

El veneno de *M. tener* es un modelo de estudio interesante ya que posee una letalidad entre dos y tres veces menor que la mayoría de las especies de coralillo estudiadas en el laboratorio (22.7 ug/ratón vs. aproximadamente 10 µg/ratón) a pesar de contar con componentes posiblemente neurotóxicos cercanos a los 7kDa y a los 14 kDa (Bénard-Valle, 2009). Es posible que la baja toxicidad relativa de este veneno se deba en parte a la especificidad de algunos componentes por las culebras y lagartijas que componen la dieta de *M. tener*.

Aunado a lo anterior, la baja capacidad neutralizante de varios sueros hiperinmunes y antivenenos contra este veneno (Sánchez *et al.*, 2008; Carbajal-Saucedo, 2005) lo hacen relevante a estudiar desde un punto de vista inmunológico. Estudios realizados previamente en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón demostraron que un suero hiperinmune generado en caballos contra *M. tener* es incapaz de neutralizar el veneno de la especie homóloga, sin embargo, es eficaz para neutralizar los venenos de *M. nigrocinctus* y *M. fulvius*. Incluso un suero hiperinmune equino generado contra *M. nigrocinctus*, *M. fulvius* y *M. tener* resulta ineficaz para neutralizar el veneno de *M. tener* (Calderón, 2011).

## Antecedentes

Con respecto a estudios previos, existen pocos análisis bioquímicos del veneno de *M. tener*. En 1979 el veneno de la serpiente *M. fulvius microgalbineus* (actualmente *M. tener microgalbineus*) fue analizado por Possani y colaboradores. En este estudio fue fraccionado mediante exclusión en gel y posterior intercambio catiónico obteniendo de esta manera 4 fracciones letales, tres de ellas con actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>. Además, se purificó y caracterizó una fosfolipasa A<sub>2</sub> no tóxica (Possani *et al.*, 1979).

Un ensayo de SDS-PAGE, realizado en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón, reveló que el veneno consta principalmente de componentes de bajo peso molecular (entre 6 y 20 kDa) aunque también mostró componentes minoritarios de alto peso molecular (50 – 70 kDa). Adicionalmente, muestra actividad PLA<sub>2</sub> (116.6 U/mg) en ensayo titulométrico sobre yema de huevo 10% (Bénard-Valle, 2009).

El presente trabajo contribuirá a ampliar el conocimiento actual respecto a la bioquímica de los venenos de coralillo. Además propocionará información muy importante para el estudio de las toxinas que componen estos venenos desde un punto de vista evolutivo y funcional.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Identificar y caracterizar los componentes más relevantes del veneno de *Micrurus tener* durante el envenenamiento en ratones así como en sus presas naturales (culebras y lagartijas).

### **Particulares**

- Caracterización biológica y bioquímica del veneno crudo de *Micrurus tener*.
- Fraccionamiento del veneno por cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC).
- Caracterización biológica y bioquímica de las fracciones del veneno de *Micrurus tener*.
- Observación de signología ocasionada por el veneno y las fracciones en ratones y reptiles.
- Identificación de las fracciones más relevantes en cuanto a letalidad y abundancia.
- Determinación de la afinidad de las fracciones relevantes por distintos receptores de acetilcolina.

## **HIPÓTESIS**

Los componentes más relevantes durante el envenenamiento por *Micrurus tener* son neurotoxinas presinápticas y postsinápticas cuya letalidad es mayor al actuar en reptiles que al actuar en ratones.

## **METODOLOGÍA**

### **Procedencia y cuantificación de los venenos**

Para la realización de todos los experimentos reportados en este trabajo se utilizó un pool de veneno de dos ejemplares de *M. tener* colectados en el estado de Tamaulipas, México y mantenidos vivos como parte de la colección científica Kiinam (HK014 y HK017). Los venenos previamente liofilizados de manera independiente fueron resuspendidos en un volumen total de 2 ml. de buffer acetato de amonio 20 mM, pH 4.7. Posteriormente, el pool de veneno fue nuevamente liofilizado y almacenado a -80 °C.

Previo a su utilización, cantidades variables de veneno fueron resuspendidas nuevamente y la cantidad de proteína soluble cuantificada por absorbancia a 280 nm (asumiendo que una unidad de absorbancia -UA- corresponde a una concentración de un miligramo por mililitro) y por el método del ácido bicinonínico (BCA) (Pierce, USA).

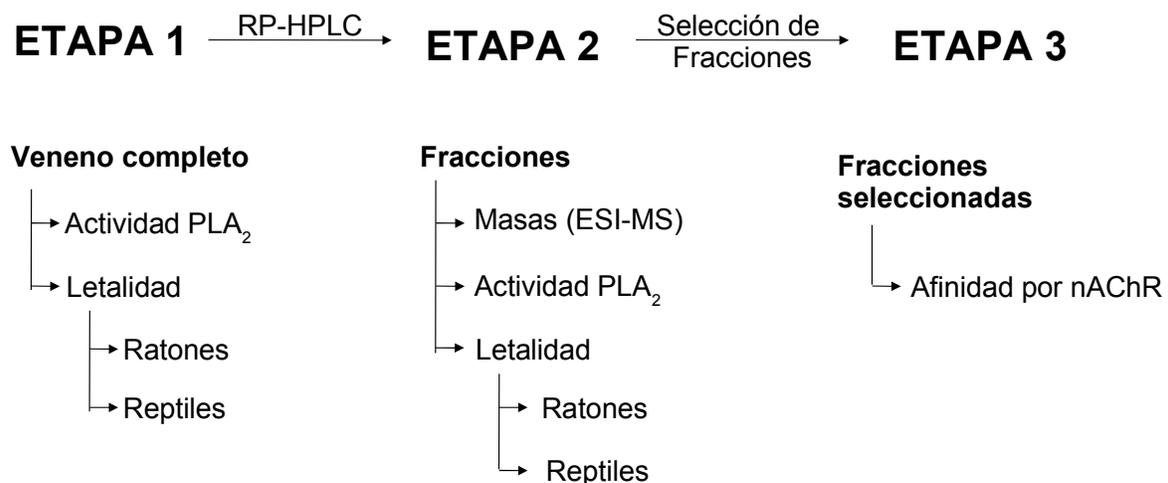
### **Estrategia experimental**

La estrategia experimental consta de 3 etapas (Figura 3). En la primera se llevó a cabo la caracterización del veneno completo de *M. tener* mediante ensayos de actividad PLA<sub>2</sub> y electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Posteriormente, se determinó la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) y se realizaron observaciones de signología en ratones y reptiles al inyectar el veneno por vía intravenosa y subcutánea.

Para iniciar la segunda etapa, el veneno fue separado por RP-HPLC y cada una de las fracciones obtenidas fue sometida a los mismos ensayos que el veneno completo además de una determinación de masas moleculares mediante espectrometría de masas (ESI-MS).

A partir de la información obtenida en las primeras dos etapas del proyecto, fueron seleccionadas las fracciones de mayor relevancia en el veneno de *M. tener* para realizar la tercera etapa. Ésta consistió en la determinación de la afinidad de cada fracción por receptores nicotínicos de

acetilcolina (nAChR) mediante ensayos electrofisiológicos sobre ovocitos de *Xenopus laevis*. Los criterios utilizados para la selección de fracciones fueron los siguientes: a.) Presencia de componentes con peso molecular entre 6 y 8 kDa y b.) ausencia de actividad de PLA<sub>2</sub>, debido a que ésta daña la capacidad de los ovocitos para mantener su potencial de membrana, impidiendo la correcta realización de las mediciones electrofisiológicas.



**Figura 4.1.** Estrategia experimental

## **SDS-PAGE**

Se utilizó el sistema de separación descrito por Laemmli (1970) utilizando una matriz de acrilamida-bisacrilamida al 17% como gel separador y al 4% como concentrador. Se cargaron 2 µg de veneno completo o fracción por carril tanto en condiciones reductoras (beta mercaptoetanol) como no reductoras. La estimación de peso molecular se realizó incluyendo en cada gel 10 µl de marcadores de peso molecular preteñidos de amplio rango para proteínas (6.5 a 175 kDa) (BioLabs, EUA). Los gels se corrieron a un voltaje constante de 70 V durante 15 min. y posteriormente a 120 V durante aproximadamente 90 min. Finalmente, fueron teñidos con azul brillante de Coomassie G-250 (Protocolo en Anexos).

### Fraccionamiento por RP – HPLC

El veneno se fraccionó por RP-HPLC utilizando una columna C18 semipreparativa (GraceVydac 250 x 10 mm. Tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ ) estabilizada con  $\text{H}_2\text{O}$  + 0.1% ácido trifluoroacético (TFA). La elusión se realizó utilizando un gradiente lineal de 0 a 60% de acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) + 0.1% TFA en 60 minutos. Se realizaron 9 corridas en la que se cargaron entre 4 y 7 mg de veneno crudo resuspendido en buffer acetato de amonio ( $\text{CH}_3\text{COO}^- \text{NH}_4^+$ ) 20 mM pH 4.7.

### Determinación de masa molecular

Las fracciones obtenidas por separación en columna C18 fueron cargadas en un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap XL (Thermo-Fischer) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). Posteriormente, fueron inyectadas por infusión directa utilizando como fase móvil acetonitrilo 50% con 0.1% de ácido acético, con un flujo de 500 nL/min. El voltaje del spray fue de 1.9kV y la detección iónica realizada en modo positivo. Los datos espectrométricos fueron adquiridos manualmente mediante el programa Tune Plus y la deconvolución se realizó utilizando el programa Xtract. Las masas moleculares se determinaron como masas medianas contemplando la contribución de los isótopos pesados y no como masas monoisotópicas.

### Toxicidad

La determinación de dosis letales medias ( $\text{DL}_{50}$ ) se llevó a cabo utilizando grupos de 5 ratones de la cepa CD1 entre 18 y 20 gramos de peso por vía intravenosa y subcutánea. Las lecturas de mortalidad se realizaron a las 48 hrs. El porcentaje de mortalidad fue graficado como función del logaritmo de la cantidad de veneno o toxina y analizado por métodos no paramétricos utilizando el programa GraphPad Prism V4.00b. La  $\text{DL}_{50}$  fue definida como la cantidad de veneno o fracción capaz

de matar al 50% de la población de ratones (Theackston y Reid, 1983).

La determinación de  $DL_{50}$  del veneno completo en reptiles se llevó a cabo por vía subcutánea utilizando grupos de tres culebras de la especie *Conopsis biserialis* entre cinco y siete gramos de peso. Las lecturas de mortalidad se realizaron a las 72 horas. Adicionalmente se registró el tiempo de aparición de parálisis flácida en alguna parte del cuerpo así como el tiempo de aparición de parálisis generalizada.

Con el fin de observar el efecto de fracciones independientes en reptiles, éstas se inocularon por vía subcutánea en serpientes adultas de la especie *Conopsis lineata*. En el caso de las fracciones letales para ratones se inyectó el equivalente a 10  $DL_{50}$ s (determinadas en ratones por vía intravenosa) por serpiente. En el caso de las fracciones no letales para ratones se inyectaron 10  $\mu\text{g/g}$  de fracción a cada serpiente. Se registró el tiempo de aparición de parálisis flácida, el tiempo de aparición de parálisis flácida generalizada y el tiempo de muerte, en caso de presentarse. Las serpientes fueron observadas durante 72 hrs.

### **Ensayo de actividad de fosfolipasa $A_2$**

Se determinó la actividad de fosfolipasa  $A_2$  por medio de ensayo titulométrico utilizando como sustrato solución de yema de huevo al 10% (NaCl 0.1 M,  $\text{CaCl}_2$  0.01 M, 0.1% Tritón X-100) y NaOH 50 mM para titular. La actividad se reporta en unidades específicas definidas como  $\mu\text{mol}$  de NaOH consumidas por minuto por miligramo de veneno. Las  $\mu\text{mol}$  de NaOH consumidas en el ensayo son directamente proporcionales a la cantidad de ácidos grasos liberados por acción de las  $\text{PLA}_2$  del veneno (Shiloah *et al.*, 1973).

### **Pruebas de afinidad por receptores nicotínicos de acetilcolina**

Todos los ensayos de afinidad por receptores de acetilcolina fueron realizados en el laboratorio del Dr. Estuardo López Vera del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. Se utilizaron tres

## Metodología

subtipos de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) expresados en ovocitos maduros de *Xenopus laevis*: Receptor nicotínico neuronal  $\alpha 7$  receptor muscular nicotínico adulto ( $\alpha\beta\epsilon\delta$ ) y receptor muscular nicotínico fetal ( $\alpha\beta\gamma\delta$ ). Éstos fueron expresados mediante microinyección de cDNA/RNA donado por el Dr. Estuardo López Vera. Para el caso del receptor neuronal  $\alpha 7$ , se inyectaron en el citoplasma de cada ovocito 36.8 nl conteniendo 36.8 ng de RNA de subunidad  $\alpha$ . Para los receptores musculares ( $\alpha\beta\gamma/\epsilon\delta$ ) se inyectaron en el núcleo de cada ovocito 4.6 nl de solución conteniendo 0.5 ng de cDNA de cada una de las subunidades. Posteriormente, los ovocitos inyectados se almacenaron en cajas petri con solución ND96 (NaCl 80 mM, KCl 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, HEPES 5 mM) y gentamicina 0.1% durante uno o dos días antes de realizar los experimentos.

Para realizar las lecturas de electrofisiología, se utilizó la técnica de *voltage clamp* de dos microelectrodos como se describe a detalle por Cartier y colaboradores (1996). El ovocito fue colocado en una cámara cilíndrica de aproximadamente 30  $\mu$ l con flujo constante de solución ND96 y las corrientes fueron generadas mediante pulsos de acetilcolina (100  $\mu$ M para el receptor  $\alpha 7$  y 5  $\mu$ M para ambos receptores musculares) con duración de un segundo separados entre sí por 1 min. Las fracciones fueron aplicadas directamente a la cámara mediante una micropipeta y posteriormente se dejó un período de incubación de 5 min antes de iniciar el lavado y los pulsos de acetilcolina.

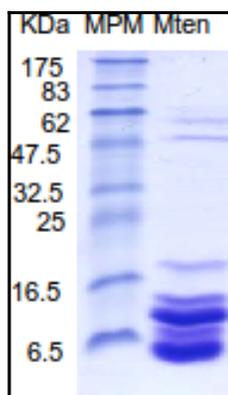
## RESULTADOS

### Etapa 1. Caracterización del veneno completo de *M. tener*.

#### SDS-PAGE y Actividad PLA<sub>2</sub>

El veneno mostró actividad específica de PLA<sub>2</sub> de 118.7 U/mg (I. de C. 95%= 108.9 – 128.5). Este resultado se encuentra dentro del rango de actividades observadas en ensayos realizados previamente en el laboratorio con otros venenos de coralillos norteamericanos (Bénard-Valle, 2009).

En el gel de poliacrilamida (Figura 5.1) se observan 4 bandas mayoritarias entre 5 y 15 kDa así como una alrededor de 17 kDa. Adicionalmente, se observan dos bandas tenues, una de aproximadamente 48 kDa y otra de alrededor de 60 kDa.



**Figura 5.1.** Perfil electroforético de veneno completo de *M. tener*. SDS-PAGE 17%. 10 µg de veneno (cuantificado por A280 nm). Condiciones reductoras (2ME).

#### Letalidad y signología

##### a.) Ratones

El valor de DL<sub>50</sub> endovenosa fue de 23.65 µg/ratón (1.2 µg/g; R<sup>2</sup>= 0.9660; Figura 5.2). A continuación se describen los signos observados durante el envenenamiento experimental con aproximadamente 1 DL<sub>50</sub> de veneno de *M. tener* por vía intravenosa:

Inmediatamente después de la inyección, se presenta debilidad en todo el cuerpo y respiración agitada. Posteriormente, se observa una parálisis flácida de las patas traseras que puede iniciar entre 5 y

## Resultados

50 min. después de la inyección y se mantiene durante el resto del envenenamiento. Entre 1 y 3 horas después de la inyección se hace aparente la dificultad para respirar y se observa orina color rojo intenso. Finalmente, la muerte se alcanza entre 1 y 5 minutos después de que inician las complicaciones respiratorias. Es interesante notar que las patas delanteras no se ven afectadas por la parálisis flácida sino solo en algunos casos aislados. También en casos aislados, se presentan otros signos como hinchazón de los ojos, hiperdilatación de las venas de la cola y espasmos.

Por otro lado, el valor de  $DL_{50}$  subcutánea fue de 89.73  $\mu\text{g}/\text{ratón}$  (4.49  $\mu\text{g}/\text{g}$ ;  $R^2=0.937$ ; Figura 5.2). A continuación se describen los signos observados durante el envenenamiento experimental con aproximadamente 1  $DL_{50}$  de veneno de *M. tener*:

En todos los casos se observa a los ratones erizados, posiblemente debido a dolor, inmediatamente después de la inyección. Entre 20 y 70 minutos después inicia una parálisis flácida que se extiende a todo el cuerpo y se mantiene hasta la muerte de los ratones. Alrededor de dos horas después de la inyección se observan los ojos saltones e inicia la dificultad respiratoria. La muerte ocurre entre 1 y 5 min. después del inicio de las complicaciones respiratorias. Es interesante notar que en ningún momento se observó orina color rojo intenso como en los ratones inyectados por vía intravenosa.

### b.) Reptiles

Al inyectar el veneno por vía subcutánea en culebras de la especie *Conopsis lineata*, se obtuvo una  $DL_{50}$  de 72.57  $\mu\text{g}/\text{reptil}$  (12.1  $\mu\text{g}/\text{g}$ ;  $R^2=0.857$ ; Figura 5.2). Cerca de 25 minutos después de la inyección, se genera una parálisis flácida generalizada que puede mantenerse durante más de 120 horas sin ocasionar la muerte. En los casos en donde ocurre la muerte, ésta sucede aproximadamente 48 horas después de la inyección.

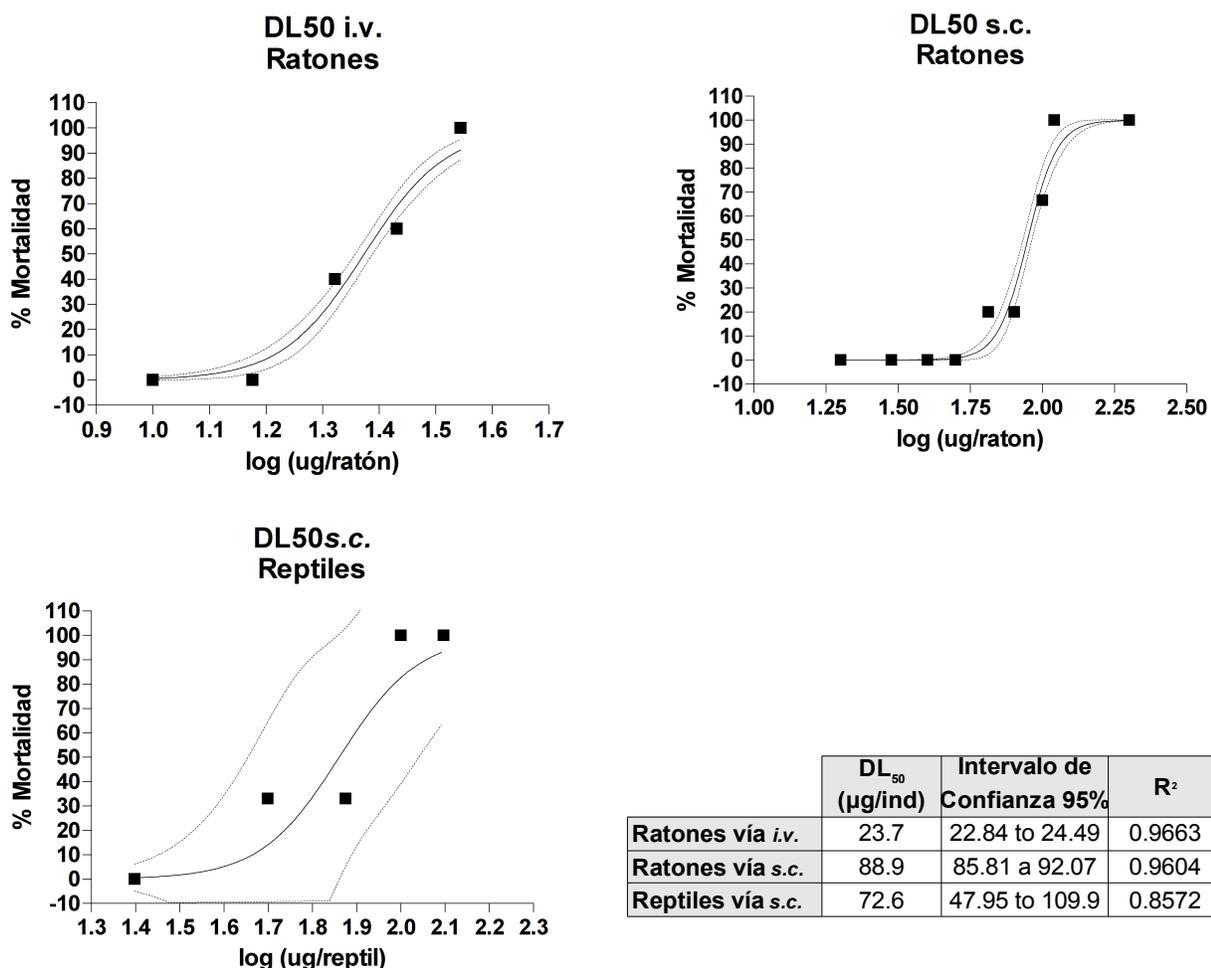
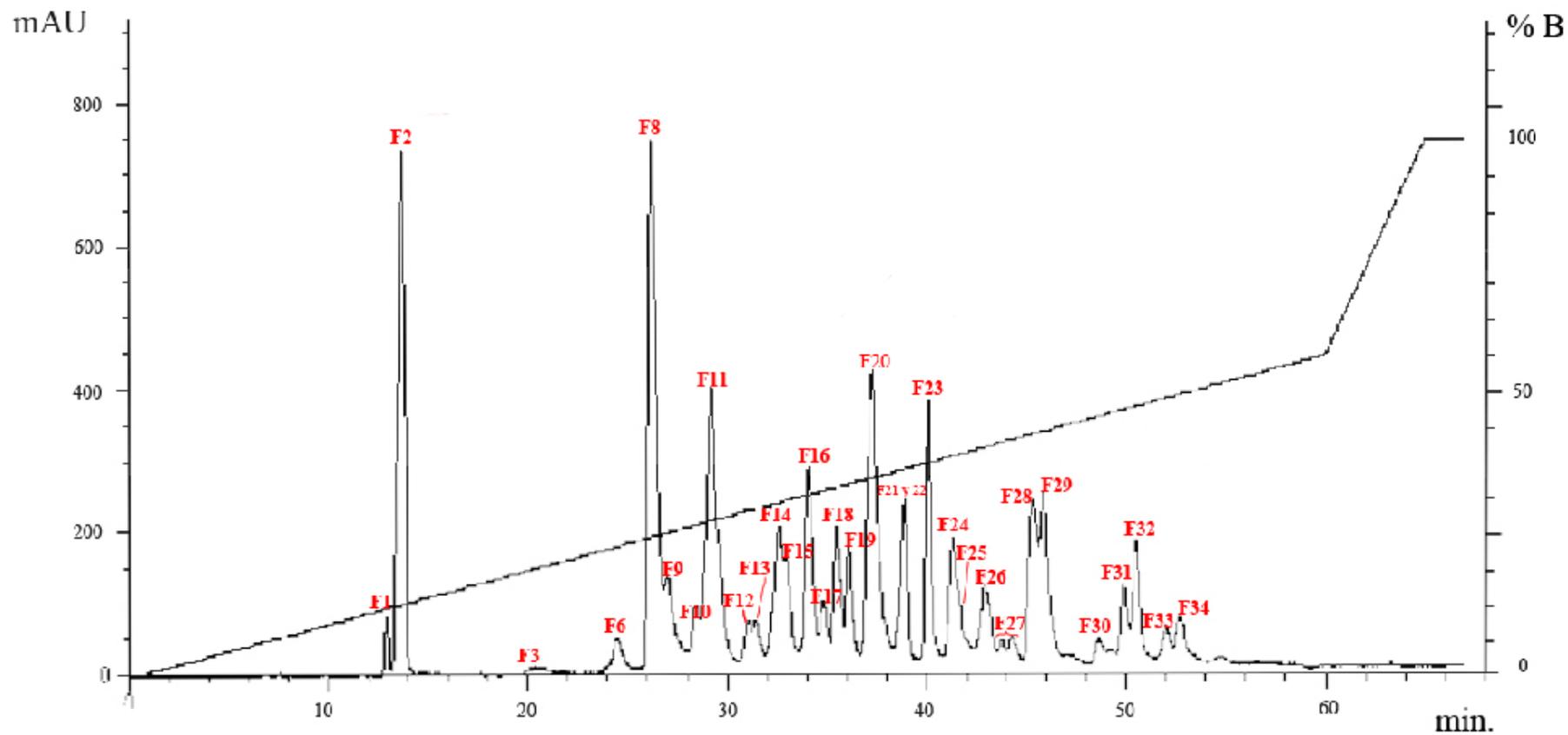


Figura 5.2. Determinación de DL<sub>50</sub> del veneno crudo de *M. tener* de Tamaulipas. **DL<sub>50</sub> (µg/ind)**: Dosis letal media expresada en microgramos inyectados por individuo (ratón o reptil).

**Fraccionamiento por HPLC de fase reversa**

Se realizaron 10 corridas cargando entre 4 y 8 mg de veneno completo de *M. tener* en cada una. Se obtuvieron 32 fracciones con tiempos de retención entre 10 y 55 min (Figura 5.3). Posteriormente, las fracciones 20, 21/22 y 27 fueron recromatografiadas mediante RP-HPLC con una columna C18 analítica estabilizada con H<sub>2</sub>O + 0.1 TFA, utilizando un gradiente de 0 a 120 min. de CH<sub>3</sub>CN + TFA y una velocidad de flujo de 1 ml/min. De esta manera se obtuvieron las fracciones 20a, 20b, 21, 22, 27a y 27b (Anexos).



**Figura 5.3.** RP-HPLC. Separación cromatográfica de veneno de *M. tener* (7 mg). Columna C18 semipreparativa estabilizada con H<sub>2</sub>O + 0.1% TFA. Elución con 0 a 60% CH<sub>3</sub>CN + 0.1% TFA. Flujo: 2 ml/min. Cuantificación por absorbancia a 280 nm.

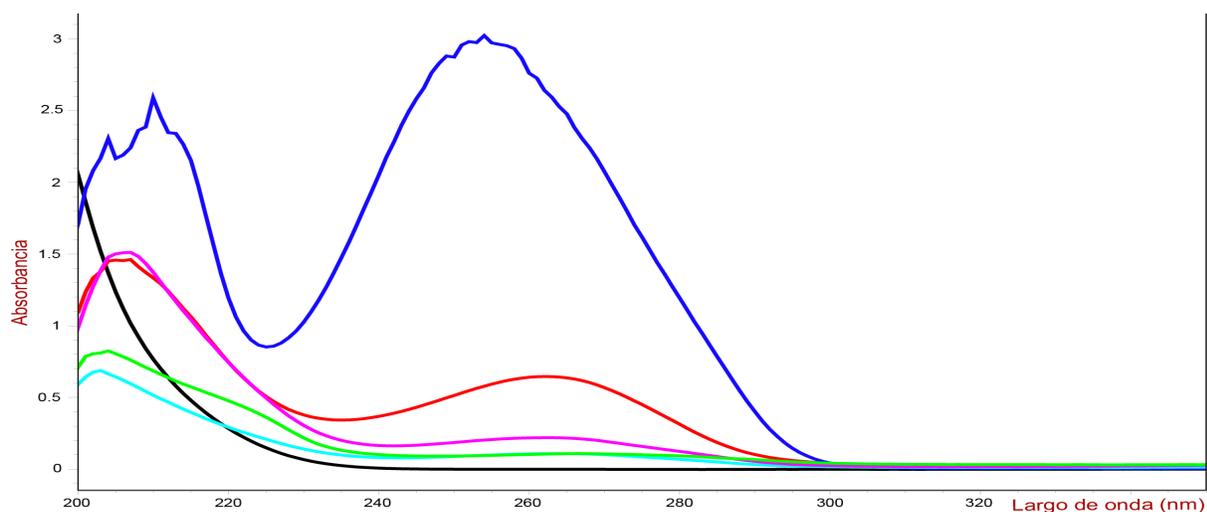
### **Resumen de la Etapa 1**

En esta etapa, se realizaron las siguientes observaciones:

- 1.) El veneno está compuesto principalmente por componentes de bajo peso molecular (Figura 5.1)
- 2.) El veneno presenta actividad de PLA2 de 118.7 U/mg
- 3.) Las DL50s obtenidas fueron: 23.7 ug/individuo por vía intravenosa en ratones, 88.9 ug/individuo por vía subcutánea en ratones y 72.6 ug/individuo or vía subcutánea en reptiles (Figura 5.2).
- 4.) El principal signo causado por el veneno tanto en ratones como en reptiles es parálisis flácida.
- 5.) Al separar el veneno por HPLC de fase reversa en una columna C18 se obtienen 32 fracciones (Figura 5.3).

## Etapa 2. Caracterización de fracciones.

A través de su perfil electroforético y de absorbancia, las fracciones de la F1 a la F5 fueron identificadas de manera preliminar como compuestos de bases nitrogenadas (Figura 5.4), veinticuatro fracciones fueron identificadas como proteínas o péptidos y las restantes cuatro (F27a, F31, F33 y F34) son de naturaleza aún desconocida.



**Figura 5.4.** Perfil de absorbancia de fracciones presumiblemente nucleosídicas (200 a 400 nm).

Fracción	Tiempo de retención (min $\pm$ D.E.)	% del total (% $\pm$ D.E.)	Concentración (UA280 = mg/ml)	Masas moleculares (Da)	Picos de absorbancia (nm)
<b>F1</b>	12.73 $\pm$ 0.4	5.4 $\pm$ 3.1	0.62	652.28, 674.26, 697.25	255, 209
<b>F2</b>	13.27 $\pm$ 0.4	5.9 $\pm$ 3.8	0.73	652.28, 674.26, 723.33	254, 207
<b>F3</b>	19.61 $\pm$ 0.6	0.2 $\pm$ 0.1	0.05	ND	204, 262
<b>F4</b>	20.67 $\pm$ 0.6	0.2 $\pm$ 0.1	0.02	ND	209, 261, 355
<b>F5</b>	23.145 $\pm$ 0.9	0.2 $\pm$ 0.1	0.04	ND	205, 263

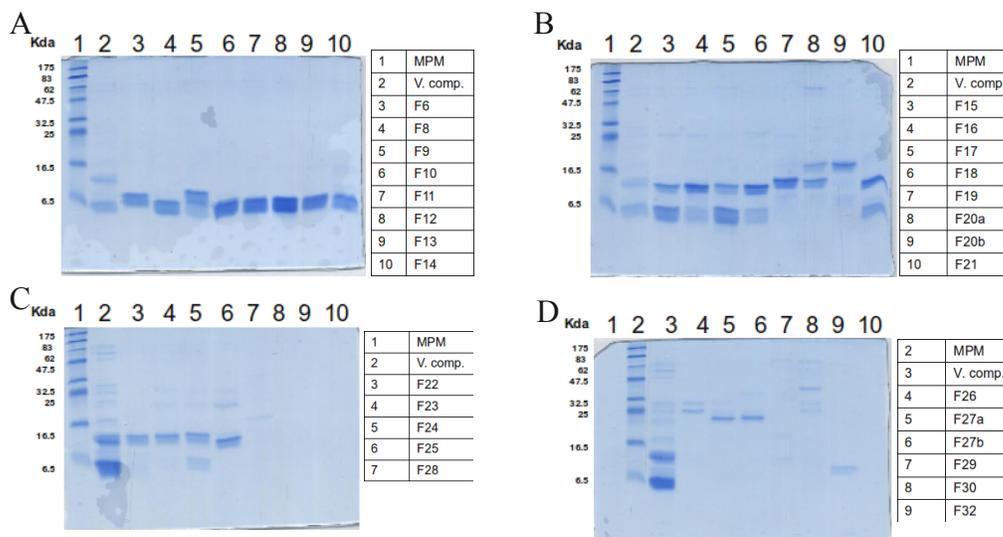
**Tabla 5.1.** Caracterización de fracciones presumiblemente nucleosídicas. NOTA: El código de color corresponde a los perfiles de absorbancia en la Figura 5.4.

## SDS-PAGE

Todas las fracciones obtenidas por RP-HPLC que presentaron un perfil cromatográfico acorde con péptidos o proteínas fueron cargados en geles de poliacrilamida-SDS al 17% (Figura 5.5). En éstos se realizaron las siguientes observaciones:

- 1.) Las fracciones F6 a F14 y F32 presentan entre una y dos bandas de peso molecular cercano a 6.5 KDa.

- 2.) Las fracciones F15 a F18, F21 y F24 presentan de una a dos bandas cerca de los 6.5 KDa y dos bandas de peso molecular aproximado de 16 KDa.
- 3.) Las fracciones F19 a F20b, F22, F23 y 25 presentan entre una y cuatro bandas con peso molecular aproximado entre 14 y 17 KDa.
- 4.) Las fracciones F26 a F30 presentan entre 1 y 4 bandas de peso molecular entre 20 y 40 KDa.



**Figura 5.5.** Perfil electroforético de fracciones de veneno de *Micrurus tener* obtenidas mediante HPLC de fase reversa. Electroforesis en gel de acrilamida/bisacrilamida al 17% en presencia de SDS. Se cargaron 2 µg/carril (geles A, B y C) y 1 µg/carril (gel D) en presencia de 2-mercaptetanol como agente reductor. Los geles fueron corridos a un voltaje constante de 60 V durante 15 min. y posteriormente a 120 V. durante 90 min.

### **Análisis de masas por espectrometría (ESI-MS)**

Aún cuando el SDS-PAGE y los cromatogramas resultantes del RP-HPLC mostraban fracciones discretas, la espectrometría de masas demostró que cada una de las fracciones colectadas representa una mezcla de entre 2 y 8 componentes de distintos pesos moleculares. En la tabla 5.2 se presentan las masas moleculares obtenidas con una abundancia relativa mayor al 5% en el espectro de masas. Basados en estos resultados, es posible agrupar los diferentes componentes en cinco familias:

- a.) Compuestos con masas menores a 1000 Da (fracciones 1 a 5). Presumiblemente nucleosídicos, en total representan alrededor del 11.9% del veneno.
- b.) Péptidos cuyas masas moleculares oscilan entre 1000 y 5000 Da (Fracciones 26, 28 y 29). Representan alrededor de 6.4% del total del veneno.

## Resultados

c.) Péptidos y proteínas de peso molecular entre 6000 y 8000 Da (Fracciones 6 a 15). Representan alrededor del 39.9% del veneno y es posible que algunos de ellos pertenezcan a la familia de las “toxinas de tres dedos”.

d.) Proteínas de peso molecular entre 13000 y 14000 Da (Fracciones 16 a 25, 30 y 32), representan cerca del 39.1% del total del veneno. La masa molecular se encuentra en el rango reportado para PLA2 de elápidos.

e.) Proteínas de masas moleculares entre 17000 y 22000 Da (Fraccion 27b). Representan aproximadamente el 2.4% del veneno y aunque su identidad permanece desconocida, es posible que contenga algunos miembros de la familia de las metaloproteasas u otras enzimas.

Fracción	Tiempo de retención (min $\pm$ D.E.)	% del total (% $\pm$ D.E.)	Masas moleculares (Da)
F1	12.73 $\pm$ 0.4	5.4 $\pm$ 3.1	652.28, 674.26, 697.25
F2	13.27 $\pm$ 0.4	5.9 $\pm$ 3.8	652.28, 674.26, 723.33
F3	19.61 $\pm$ 0.6	0.2 $\pm$ 0.1	ND
F4	20.67 $\pm$ 0.6	0.2 $\pm$ 0.1	ND
F5	23.14 $\pm$ 0.9	0.2 $\pm$ 0.1	ND
F6	25.22 $\pm$ 0.7	1.6 $\pm$ 0.8	6587.95, 6617.95
F8	26.54 $\pm$ 0.8	13.2 $\pm$ 2.1	6676.91
F9	27.85 $\pm$ 0.5	2.2 $\pm$ 1.0	6822.37, 6807.41, 6676.91, 6454.01, 6399.93
F10	28.89 $\pm$ 0.3	4.7 $\pm$ 4.3	6786.91, 6539.81, 7131.42, 6399.91
F11	29.45 $\pm$ 0.2	7.0 $\pm$ 2.5	6539.83, 7131.44, 6786.92, 6437.82
F12	30.78 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 1.2	6806.00, 2664.28, 2607.26
F13	31.64 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.4	7232.58, 7076.48, 6805.93, 3695.72
F14	32.83 $\pm$ 0.1	3.3 $\pm$ 1.5	6480.80, 7436.56, 6494.86, 7117.29, 7589.66
F15	33.91 $\pm$ 0.8	4.5 $\pm$ 2.3	6676.92, 6437.79
F16	34.48 $\pm$ 0.3	3.7 $\pm$ 1.5	13434.81
F17	35.00 $\pm$ 0.1	3.3 $\pm$ 1.9	6489.85, 6511.84
F18	35.85 $\pm$ 0.2	3.7 $\pm$ 0.7	6676.90, 13429.16
F19	36.50 $\pm$ 0.3	3.4 $\pm$ 0.8	6676.92, 7645.68, 13403.77
F20a	37.6 $\pm$ 0.2	5.3 $\pm$ 3.4	13525.83, 13283.58
F20b	37.8 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.8	13284.62, 13279.62
F21	38.93 $\pm$ 0.2	3.9 $\pm$ 2.0	6939.32, 13013.78, 7103.08
F22	39.32 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 1.0	13418.73, 7646.43, 7103.07, 7182.06
F23	40.36 $\pm$ 0.2	5.1 $\pm$ 1.5	7454.93, 13370.84
F24	41.49 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 1.2	13136.63, 13168.62
F25	41.84 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.6	13736.16
F26	43.07 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 1.1	2890.69, 2627.55
F27a	43.67 $\pm$ 0.7	1.8 $\pm$ 1.0	Indeterminado
F27b			22250.05, 17324.53
F28	45.29 $\pm$ 0.6	5.2 $\pm$ 4.5	4202.03, 4260.04, 4616.24, 6676.91, 8405.06
F29			4202.02, 5638.86, 4260.03
F30	48.38 $\pm$ 0.8	0.8 $\pm$ 0.5	12091.58 9638.17, 12189.54, 12419.76
F31	49.61 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 0.5	Indeterminado
F32	50.66 $\pm$ 0.1	2.7 $\pm$ 1.2	10375.97
F33	52.75 $\pm$ 0.7	0.8 $\pm$ 0.8	Indeterminado

**Tabla 5.2.** Pesos moleculares obtenidos mediante espectrometría de masas (ESI-MS). Ordenados en cada fracción de mayor a menor abundancia relativa. **D.E.:** Desviación estándar de 10 corridas

**Letalidad**

## a.) Ratonos

Se inyectaron 20 µg de cada fracción por vía endovenosa a grupos de 3 ratones, identificando de esta manera 5 fracciones letales (F6, F12, F20a, F22 y F23). Posteriormente se obtuvieron los valores de DL<sub>50</sub> (definida como la cantidad de veneno capaz de matar al 50% de una población de ratones) para cada una de estas fracciones. Los resultados obtenidos se ilustran en la Tabla 5.3.

Fracción	Tiempo de retención (min ± D.E.)	% del total (% ± D.E.)	DL <sub>50</sub> i.v. ratones	
			µg/ratón (I de C 95%)	µg/g
F6	25.22 ± 0.7	1.6 ± 0.8	1.71 (1.71 a 1.73)	0.09
F12	30.78 ± 0.4	1.9 ± 1.2	19.46 (9.00 a 42.08)	0.973
F20a	37.6 ± 0.2	5.3 ± 3.4	24.49 (24.46 a 24.53)	1.22
F22	39.32 ± 0.1	4.1 ± 1.0	14.85 (14.83 a 14.86)	0.74
F23	40.36 ± 0.2	5.1 ± 1.5	22.08 (22.06 a 22.11)	1.10

**Tabla 5.3.** Potencia letal de fracciones del veneno de *M. tener*.

**DL<sub>50</sub>** = Cantidad (µg) de fracción necesaria para matar al 50% de la población. Se expresa tanto en cantidad por ratón (µg/ratón) como en cantidad por unidad de masa de ratón (µg/g).

**D.E.** = desviación estándar de 10 corridas.

**I de C 95%** = Intervalo de confianza ( $\alpha = 0.05$ ).

## b.) Reptiles

Los resultados del apartado anterior mostraron valores de DL<sub>50</sub> iv que oscilan entre 0.09 y 1.22 µg/g de ratón para cinco fracciones. Estos valores fueron tomados como base para comparar la potencia letal de estas mismas fracciones al ser administradas en reptiles. Debido a la dificultad técnica de acceder a la vía endovenosa en culebras, se decidió utilizar la vía subcutánea administrando cantidades equivalentes a 10 veces los valores de DL<sub>50</sub> iv previamente señalados. Adicionalmente, se administraron, también por vía subcutánea, 10 µg/g de las fracciones que no resultaron letales para ratones. En las Tablas 5.4 y 5.5 se detallan los resultados obtenidos.

Fracción	Dosis (µg/g)	Inicio de parálisis* (hrs.)	Parálisis generalizada** (hrs.)	Muerte (hrs.)	Recuperación Total (72 hrs.)
6	0.9	NP	NP	NP	-
12	9.7	1.90	2.00	1/2	1/2
20a	12.3	30.89	46.00	NP	No
22	0.7	8.88	34.92	1/2	No
23	11.0	28.67	NP	NP	-

**Tabla 5.4** Efecto de las fracciones letales para ratones en serpientes de la especie *C. lineata*.

\* Tiempo de aparición de parálisis flácida evidente en alguna parte del cuerpo.

\*\* Tiempo de aparición de parálisis flácida en todo el cuerpo.

**NP:** No se presentó. **1/2:** Sólo una serpiente de las dos inyectadas murió o se recuperó.

Fracción	Dosis (µg/g)	Inicio de parálisis* (hrs.)	Parálisis generalizada** (hrs.)	Muerte (hrs.)	Recuperación Total (72 hrs.)
8	10	NP	NP	NP	-
9	7	NP	NP	NP	-
10	1	NP	NP	NP	-
10	10	0.43	1.71	NP	Si
11	1	0.57	1.70	NP	Si
11	10	NP	0.67	24.00	-
13	7	NP	NP	NP	-
14	10	3.54	NP	NP	Si
15	10	14.42	NP	NP	Si
16	10	14.32	NP	NP	No
18	10	NP	NP	NP	-
21	10	28.79	NP	NP	No
28	10	NP	NP	NP	-

**Tabla 5.5** Efecto de las fracciones NO letales para ratones en serpientes de la especie *C. lineata*.

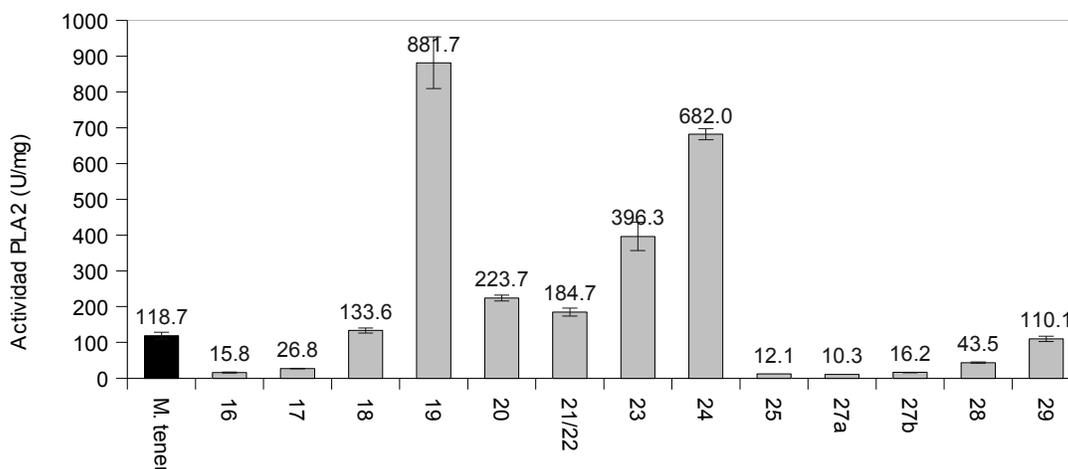
\* Tiempo de aparición de parálisis flácida evidente en alguna parte del cuerpo.

\*\* Tiempo de aparición de parálisis flácida en todo el cuerpo.

NP: No se presentó.

### Actividad PLA<sub>2</sub>

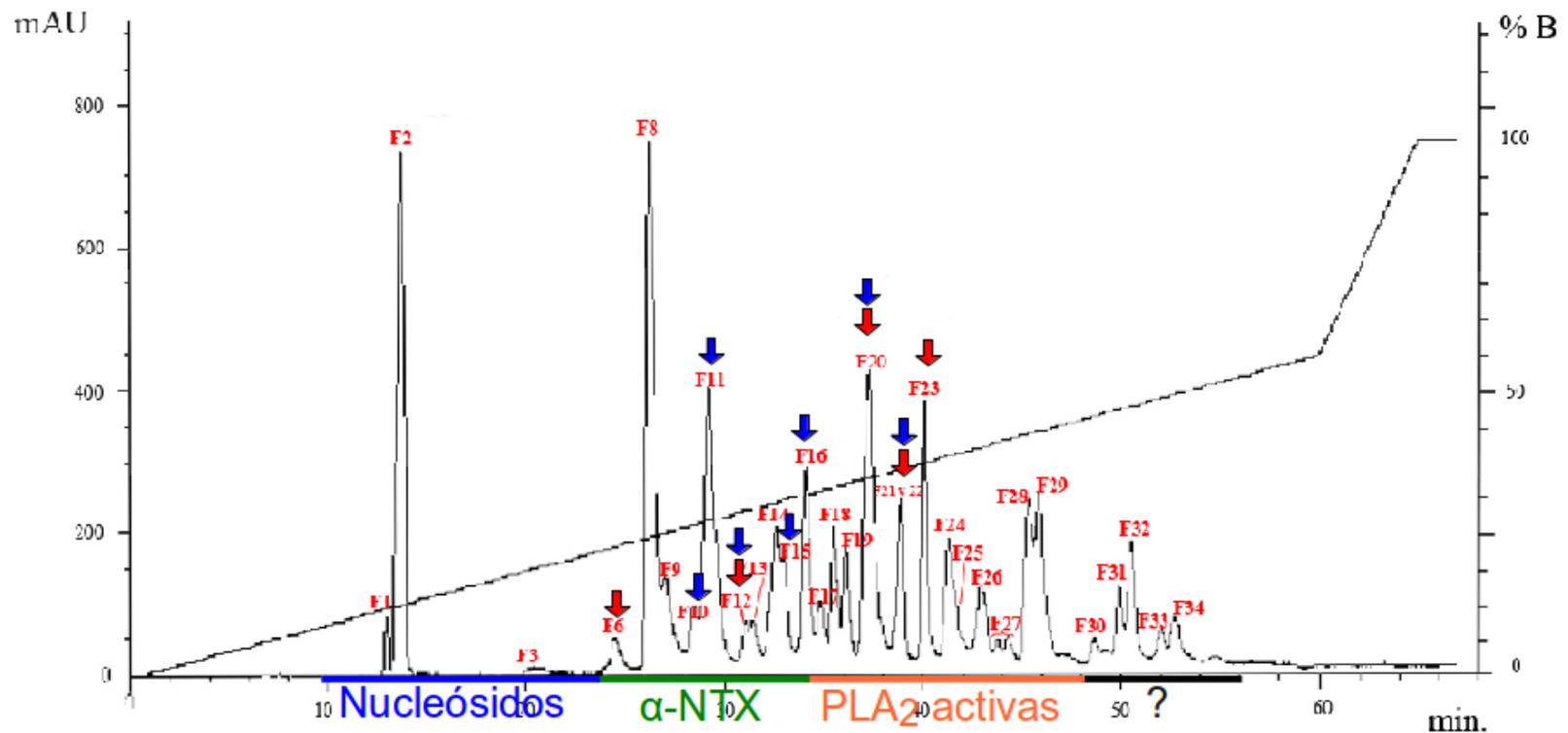
Quince de las fracciones obtenidas mostraron actividad fosfolipasa tipo A<sub>2</sub> en un ensayo titulométrico utilizando como sustrato yema de huevo al 10% (Figura 5.6).



**Figura 5.6.** Ensayo titulométrico de actividad PLA<sub>2</sub>. U/mg = µmoles de NaOH consumidos por minuto por miligramo de veneno. D.E. = Desviación estándar. Las barras de error representan desviación estándar de tres experimentos.

### Resumen de la etapa 2

En esta etapa se determinó que existen tres grupos mayoritarios de toxinas en el veneno de *M. tener*: Componentes de tipo nucleosídico, posibles  $\alpha$ -neurotoxinas y fosfolipasas de tipo  $A_2$  activas. Posteriormente, se identificaron 5 fracciones letales para ratones y 7 más que ocasionan algún grado de parálisis flácida en *Conopsis biserialis*. En la Figura 5.7 se presenta una recopilación de los resultados de esta etapa.

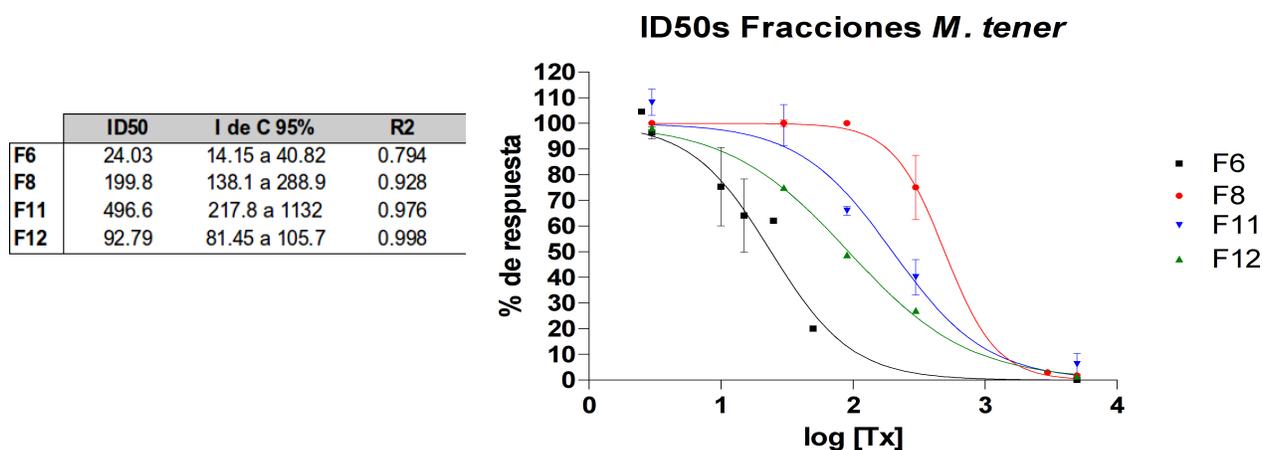


**Figura 5.7.** Resumen gráfico de la etapa 2. Se señalan con una flecha azul (↓) las fracciones que ocasionan parálisis flácida en *Conopsis lineata* y con una flecha roja (↓) las fracciones letales para ratones.

### Etapa 3: Unión a receptores de acetilcolina.

Con el fin de identificar las fracciones con capacidad de bloquear el receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR, por sus siglas en inglés) se realizó un ensayo inicial utilizando una concentración final de 5  $\mu$ M de cada fracción. Debido a que la presencia de fosfolipasas activas afecta la capacidad de los ovocitos para mantener una diferencia de potencial estable, se ensayaron sólo aquellas fracciones que no mostraron actividad PLA<sub>2</sub> (F6 a F15). Tres de las ocho fracciones probadas (F6, F8 y F10) lograron inhibir de manera irreversible la respuesta del ovocito a la administración exógena de acetilcolina. Tres más (F11, F12 y F13) ocasionaron un bloqueo de más del 80% de la respuesta que se recupera en el 2º pulso de acetilcolina. Las últimas dos fracciones probadas (F14 y F15) ocasionan un bloqueo de alrededor de 30% que también se recupera para el 2º pulso de acetilcolina (Figura 5.9).

Finalmente, se determinó la dosis inhibitoria media (ID<sub>50</sub> = definida como la concentración de toxina que inhibe en 50% la respuesta del ovocito al estímulo de acetilcolina) sobre nAChR muscular adulto para las fracciones F6 y F12 debido a que son letales en ratones y para las fracciones F8 y F11 debido a su gran abundancia relativa en el veneno. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.8.

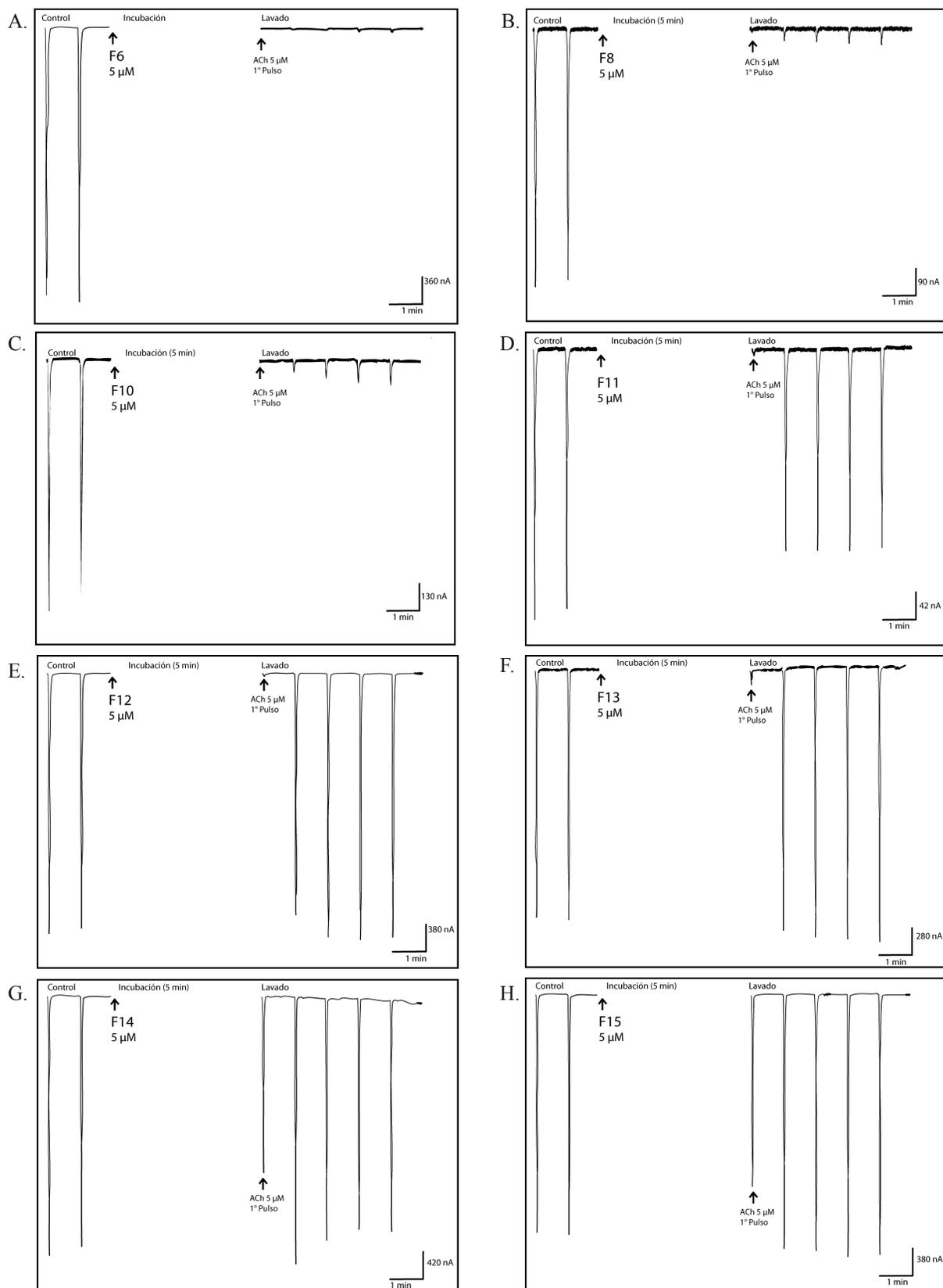


**Figura 5.8.** Determinación de dosis inhibitoria media de fracciones de *M. tener* sobre el receptor nicotínico de acetilcolina muscular adulto (nAChR  $\alpha\beta\epsilon\delta$ ).

[Tx] = Concentración final de fracción. Las barras de error representan desviación estándar de 3 experimentos.

ID<sub>50</sub> = Dosis inhibitoria media.

I de C 95% = Intervalo de confianza ( $\alpha=0.05$ )



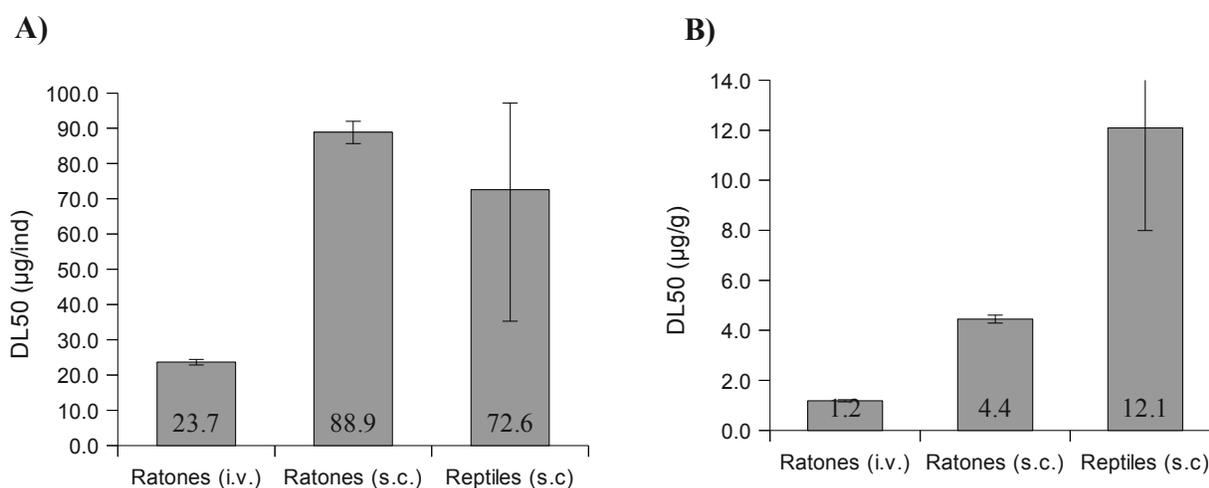
**Figura 5.9.** Capacidad de las fracciones del veneno de *M. tener* para bloquear el receptor nicotínico de acetilcolina muscular adulto (nAChR  $\alpha\beta\epsilon\delta$ ). Voltage clamp de dos electrodos.

## Discusión

### Etapa 1: Caracterización del veneno completo de *M. tener*

La  $DL_{50}$  del veneno crudo determinada en ratones por vía subcutánea es cerca de 4 veces mayor que la  $DL_{50}$  determinada por vía intravenosa (Figura 6.1). Lo anterior ha sido observado también en otros venenos de serpientes (Vergara, 2010) y puede deberse a la diferencia en la absorción de las toxinas del veneno al ser inoculadas por vía subcutánea.

Debido a la dificultad para inyectar por vía intravenosa en serpientes pequeñas como *Conopsis lineata*, se utilizó la vía subcutánea para realizar todos los experimentos sobre estas serpientes. Con fines comparativos, todos los valores fueron posteriormente corregidos por gramo de peso de individuo inyectado. En estos experimentos, se observó que la  $DL_{50}$  *sc* para reptiles es aproximadamente tres veces mayor que la  $DL_{50}$  *sc* para ratones (Figura 6.1). Por lo tanto, contrario a lo esperado, no parece existir especificidad del veneno crudo de *M. tener* por las serpientes de la especie *C. lineata*.



**Figura 6.1.** Comparación de potencia letal del veneno de *M. tener*. **A)**  $DL_{50}$  expresada como cantidad de veneno por individuo. **B)** Valores de  $DL_{50}$  corregidos por gramo. Las barras de error representan intervalos de confianza ( $\alpha = 0.05$ ).

Durante la determinación de la  $DL_{50}$  del veneno se observó que incluso al inyectar dosis menores a 5 µg/g éste ocasionaba una parálisis flácida parcial o generalizada que podía mantenerse sin ocasionar la muerte durante más de 120 hrs. (tiempo máximo de observación previo al sacrificio de las

serpientes). Debido a lo anterior se decidió obtener una dosis paralizante media ( $DP_{50}$ ) con el fin de evaluar el efecto paralizante del veneno y compararlo con su letalidad. La  $DP_{50}$  fue definida como la dosis capaz de ocasionar una parálisis flácida generalizada al 50% de una población en menos de 72 hrs. en el caso de las serpientes y en menos de 48 hrs. en el caso de los ratones (Figura 6.2).

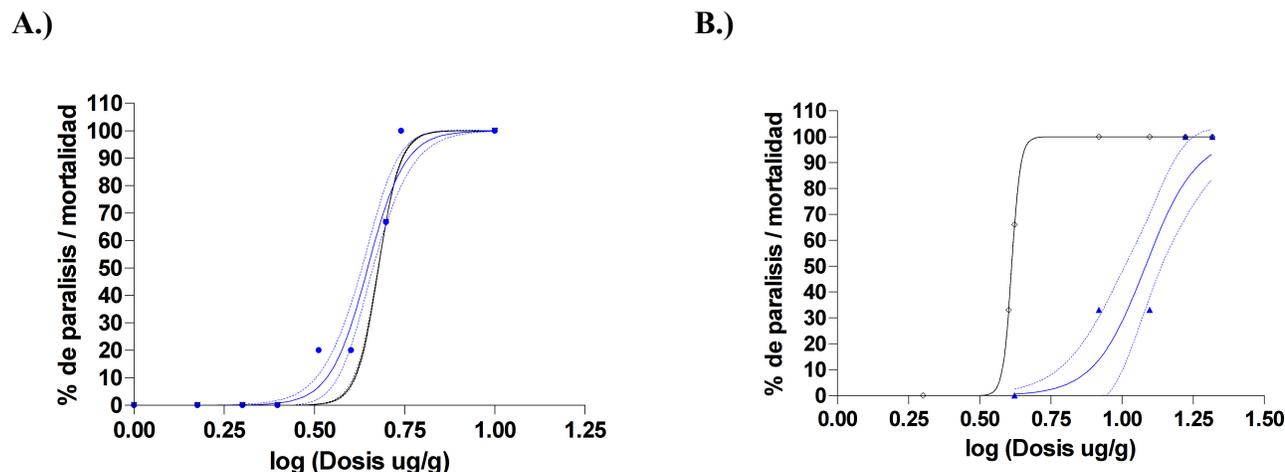


Figura 6.2. Determinación de Dosis Letal Media (—) y Dosis Paralizante Media (—) en A.) Ratones y B.) *Conopsis lineata*. Las líneas punteadas representan intervalos de confianza ( $\alpha = 0.05$ ).

	Ratones (s.c.)	Reptiles (s.c.)
<b><math>DP_{50}</math></b>	<b>4.7 <math>\mu\text{g/g}</math></b>	<b>4.1 <math>\mu\text{g/g}</math></b>
l. de C. 95%	4.7 a 4.7	4.1 a 4.1
R2	1.000	1.000
<b><math>DL_{50}</math></b>	<b>4.4 <math>\mu\text{g/g}</math></b>	<b>12.1 <math>\mu\text{g/g}^*</math></b>
l. de C. 95%	4.3 a 4.6	8.0 a 18.3
R2	0.960	0.857

Tabla 6.1. Valores de dosis letal media ( $DL_{50}$ ) y dosis paralizante media ( $DP_{50}$ ) del veneno de *M. tener* en ratones y reptiles (*Conopsis lineata*). \*Significativamente diferente ( $P < 0.001$ , ANOVA de un solo sentido y prueba de comparación múltiple de Tukey)

A partir del análisis de datos mostrado en la figura 6.2 y la Tabla 6.1 se observó que, en serpientes, la  $DP_{50}$  es mucho menor que la  $DL_{50}$  mientras que en ratones no hay diferencias significativas entre los dos parámetros. Esto puede deberse a diferencias en la fisiología de los modelos de estudio. Es decir, el elevado gasto energético de un mamífero pequeño como el ratón, aunado a la presencia de un sólo músculo destinado a la respiración, hacen que la parálisis flácida generalizada sea letal en muy pocos minutos. Los reptiles, siendo animales ectotérmicos, tienen gastos energéticos

mucho menores (Pough *et al.*, 2008) lo cual les permite sobrevivir con tasas de respiración muy bajas. Lo anterior, además de que la respiración en su caso está generada por la expansión de toda la cavidad torácica y no sólo por la contracción de un músculo (Pough *et al.*, 2008), les permite a las serpientes mantenerse vivas por varios días aún cuando el veneno ha ocasionado una parálisis flácida generalizada.

Las observaciones anteriores permiten concluir que los componentes del veneno de *Micrurus tener* tienen un efecto principalmente paralizante y la muerte de los ejemplares envenenados es una consecuencia de esta parálisis. Por otro lado, al comparar la dosis paralizante en ratones y serpientes, no hay diferencia significativa entre los valores de  $DP_{50}$  por lo que no es posible suponer una especificidad del veneno completo de *M. tener* para causar parálisis en sus presas naturales.

### **Etapas 2 y 3: Caracterización de fracciones.**

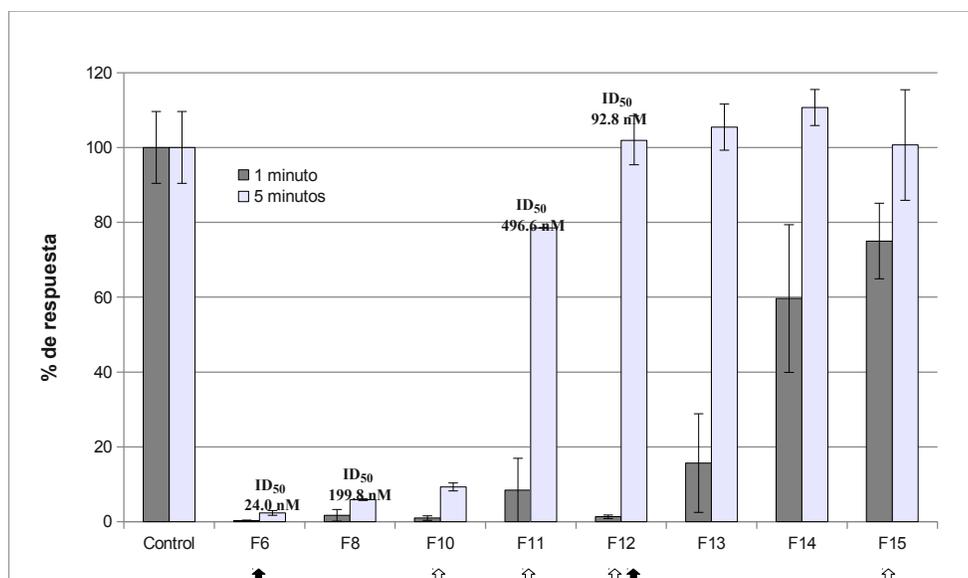
#### **a.) Compuestos de bases nitrogenadas**

Estas fracciones tienen un tiempo de elución entre 12 y 24 min. (Figura 5.3; F1 a F5) y representan alrededor de 11.9% del veneno total. Fueron identificadas mediante el análisis de su espectro de absorbancia y peso molecular como posibles compuestos de bases nitrogenadas como FAD, NAD, AMP, adenosina, uridina y citosina (Figura 5.4, Tabla 5.1). Aird (2005) reportó la presencia de compuestos de este tipo, principalmente guanosina, adenosina e inosina, en los venenos de *Micrurus altirostris*, *M. corallinus* y *M. nigrocinctus*.

El papel de estos componentes durante los envenenamientos por mordedura de serpiente ha sido poco estudiado, sin embargo, su presencia ha sido reportada en los venenos de prácticamente todas las familias de serpientes venenosas (Aird, 2005). Aird (2002) propuso que purinas presentes en los venenos, así como purinas liberadas por acción de enzimas presentes en éstos podrían actuar como toxinas multifuncionales jugando un papel central en la inmovilización de la presa mediante hipotensión y parálisis. Además, propuso que podrían participar en la digestión de la presa a través de la generación de apoptosis y muerte celular necrótica (Aird, 2002).

**b.) Componentes con actividad  $\alpha$ -neurotóxica.**

Entre los 25 y 34 minutos eluyen componentes cuyos pesos moleculares oscilan entre 6000 y 8000 Da y representan cerca del 39.9% del veneno total (Figura 5.3; F6 a F15). Éstas fracciones presentan actividad bloqueadora del nAChR muscular adulto murino expresado en ovocitos maduros de *Xenopus laevis*. En particular, las fracciones F6, F8 y F10 ocasionan un bloqueo de alrededor del 90% de la respuesta del ovocito que no se recupera tras 20 minutos de lavado por lo que fue denominado bloqueo irreversible (Figura 5.9 A, B y C). Las fracciones F11, F12 y F13 también ocasionan un bloqueo de cerca del 90% de la respuesta del ovocito, sin embargo ésta se recupera a más del 80% para el 5° minuto de lavado, por lo que fue denominado bloqueo reversible (Figura 5.9 D, E y F). Finalmente, las fracciones 14 y 15 ocasionaron solamente un bloqueo de cerca de 20% de la respuesta del ovocito que se recupera completamente para el 5° minuto de lavado por lo que esta actividad no fue tomada en cuenta como bloqueo (Figura 5.9 G y H). Dados estos resultados, puede concluirse que existe por lo menos un componente que se comporta como neurotoxina postsináptica ( $\alpha$ -neurotoxina) dentro de cada una de las fracciones F6 a F13. En la Figura 6.3 se resumen los resultados anteriores.



**Figura 6.3.** Capacidad de las fracciones del veneno de *M. tener* para bloquear el receptor nicotínico de acetilcolina muscular adulto (nAChR  $\alpha\beta\epsilon\delta$ ). Concentración final por fracción: 5  $\mu$ M. Las barras de error representan desviación estándar de tres experimentos. Los resultados están normalizados tomando como 100% la respuesta ejercida por un pulso de acetilcolina 5  $\mu$ M con duración de 1 s. sin agregar ninguna fracción (Control). Se señalan con una flecha negra (♣) las fracciones letales para ratones y con una flecha blanca (♠) las fracciones que ocasionan parálisis en serpientes de la especie *Conopsis lineata*. ID<sub>50</sub> = Dosis inhibitoria media determinada para cada fracción.

Tomando en cuenta todos los experimentos llevados a cabo con cada una de las fracciones se realizaron las siguientes observaciones:

- 1.) Aquellas fracciones que son letales para ratones (F6 y F12) poseen ID<sub>50</sub>s menores que aquellas que no lo son. Por lo tanto, es posible que sea esta alta afinidad de las toxinas por los receptores lo que las hace letales (Figura 6.3).
- 2.) No existe una correlación clara entre la capacidad de las fracciones para bloquear el nAChR muscular adulto murino y la generación de parálisis flácida en reptiles. Por lo tanto, es posible suponer que existe una diferencia a nivel de secuencia y/o estructura entre los receptores murinos y de reptiles que es, al menos en parte, responsable de las diferencias en los efectos ocasionados por las fracciones en ambos modelos de estudio (Figura 6.3).
- 3.) La fracción F11 ocasiona una severa parálisis flácida al ser inyectada en serpientes de la especie *Conopsis lineata* (1 µg/g s.c.), sin embargo, no tiene ningún efecto al ser inyectada en ratones (1 µg/g i.v.). Aunque sí tiene capacidad bloqueadora del nAChR murino su afinidad es muy baja, lo cual apoya la teoría de que existe una diferencia entre este receptor y el de reptiles y es además, evidencia de que existe una especificidad de al menos algunas de las toxinas presentes en esta fracción por el nAChR de reptiles (Figura 6.3).

Existen algunos trabajos en los que se ha reportado neurotoxicidad postsináptica en venenos de serpientes de coral. Entre ellos se encuentra el estudio realizado por Olamendi-Portugal y colaboradores (2008) en el que se identificaron 6 toxinas con capacidad bloqueadora del nAChR en el veneno del coralillo sudamericano *Micrurus surinamensis* (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008). Posteriormente, se reportaron en el veneno de *Micrurus pyrrhocryptus* 5 fracciones capaces de competir con la  $\alpha$ -bungarotoxina marcada radioactivamente (<sup>125</sup>I $\alpha$ -BgTx) por el sitio de unión del receptor nicotínico de acetilcolina, lo cual sugiere la presencia de neurotoxicidad postsináptica (Dokmetjian *et al.*, 2009). El presente estudio demuestra que el veneno de *M. tener* no es una excepción en este aspecto ya que fue posible identificar al menos 6 fracciones con actividad  $\alpha$ -neurotóxica clara.

Además de las fracciones mencionadas anteriormente, se observaron componentes de masas moleculares entre 6000 y 8000 Da con tiempos de elución entre 34 y 45 min. Sin embargo, debido a que éstas se encontraban combinadas con fosfolipasas A<sub>2</sub> activas no fue posible probar su capacidad bloqueadora del nAChR.

### **c.) Componentes con actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>.**

Las fracciones con actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> presentes en el veneno tienen tiempos de elución entre 34 y 45 minutos (Figura 5.3, F16 a F29) y representan alrededor del 33.4% del veneno total. Todas ellas presentan componentes cuya masa molecular oscila entre los 13000 y 14000 Da y su actividad específica de PLA<sub>2</sub> oscila entre 10.3 U/mg (Figura 5.6, F27a) y 881.7 U/mg (Figura 5.6, F19), en donde una unidad (U) es definida como las umolas de NaOH consumidas en un minuto utilizando un ensayo titulométrico sobre yema de huevo.

En el presente estudio se observó que no existe una correlación entre la actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> y la letalidad de las fracciones. Las tres fracciones pertenecientes a este grupo que son letales para ratones tienen actividades de fosfolipasa A<sub>2</sub> cercanas al promedio (Figura 5.6, F20a, F22 y F23).

De manera interesante, no existen diferencias marcadas en los efectos ocasionados por este grupo de fracciones en los dos modelos animales. Es decir, ninguna de las fracciones que no tienen efecto en ratones lo tienen al ser probadas en reptiles. Asimismo, dos de las fracciones letales para ratones (F20a y F22) ocasionan parálisis flácida generalizada en *Conopsis lineata*. La otra fracción letal para ratones no alcanzó a generar una parálisis flácida generalizada en las serpientes, sin embargo ocasionó una marcada debilidad de la 2<sup>a</sup> mitad del cuerpo que posteriormente dió lugar a parálisis flácida en esa misma zona.

Este tipo de actividad enzimática ha sido reportada en prácticamente todos los venenos de coralillos estudiados a la fecha. Ejemplo de esto es el trabajo realizado por Aird y Da Silva (1990) en el cual reportaron la presencia de actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> en los venenos de 10 especies de coralillos

sudamericanos y una especie de coralillo norteamericana. Posteriormente, en un estudio realizado recientemente en el laboratorio se observó actividad de fosfolipasa A2 en 10 especies de coralillos norteamericanos y una sudamericana (Bénard-Valle, 2009).

Dada la signología ocasionada por estas fracciones en los modelos de estudio utilizados en el presente trabajo es posible suponer que al menos algunas de las fosfolipasas A2 que conforman las fracciones se comporten como neurotoxinas presinápticas. Sin embargo, debido a que la mayoría de ellas presentan también componentes con pesos moleculares similares a los reportados para neurotoxinas postsinápticas, las cuales ocasionarían una signología muy similar, no es posible asegurar la presencia de fosfolipasas A2 con actividad de neurotoxinas presinápticas. Por otro lado, la descripción de neurotoxicidad presináptica en otros venenos de coralillos como *Micrurus corallinus* (Vital-Brazil, 1983/84) y *M. dumerilli* carnicauda (Serafim *et al.*, 2002) apoya la teoría de la presencia de esta actividad también en el veneno de *M. tener*.

## CONCLUSIONES

- El veneno de *Micrurus tener* está compuesto por una mezcla compleja de componentes entre los que se encuentran:
  - Compuestos de bases nitrogenadas
  - Péptidos de bajo peso molecular
  - Fosfolipasas A<sub>2</sub>
  - Componentes  $\alpha$ -neurotóxicos y tipo  $\alpha$ -neurotóxicos.
- Los componentes más relevantes durante el envenenamiento en ratones por *M. tener* son  $\alpha$ -neurotoxinas y fosfolipasas A<sub>2</sub>.
- No se observó una mayor letalidad del veneno completo al ser inyectado en serpientes que al ser inyectado en ratones.
- Solamente cinco fracciones mostraron ser letales para ratones al ser inyectadas de manera individual.
- Se identificaron 6 fracciones con capacidad bloqueadora del nAChR muscular adulto murino.
- El principal efecto ejercido por el veneno de *M. tener* tanto en ratones como en serpientes es la parálisis flácida.
- Se observaron 4 fracciones que ocasionan parálisis flácida en *Conopsis lineata* y sin embargo no tienen ningún efecto observable en ratones. Esto puede ser una evidencia de especificidad de las  $\alpha$ -neurotoxinas de *M. tener* por los nAChR de reptiles.

## LITERATURA CITADA

- Aird S. D.** (2002). Ophidian envenomation strategies and the role of purines. *Toxicon*, 40, 335-393.
- Aird S. D.** (2005). Taxonomic distribution and quantitative analysis of free purine and pyrimidine nucleosides in snake venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 140: 109–126
- Aird S. D., DaSilva Jr, J. N.** (1991). Comparative enzymatic composition of brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 99: 287-294.
- Alape-Girón, A.** (1997). Immunochemical, biochemical and evolutionary studies on *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus* venom toxins.
- Arce, V., Rojas, E., Ownby, C. L., Rojas, G., Gutiérrez, J. M.** (2003). Preclinical assessment of the ability of polyvalent (Crotalinae) and anticoral (Elapidae) antivenoms produced in Costa Rica to neutralize the venoms of North American snakes. *Toxicon*. 41: 851–860.
- Bénard-Valle, M.** (2009). *Similitud bioquímica e inmunoquímica entre venenos de coralillos norteamericanos*. Tesis de licenciatura. Cuernavaca, Morelos, México: Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L.** (2002). Biochemistry. 5<sup>th</sup> edition. *W. H. Freeman and Company*. New York.
- Caccin P., Rigoni M., Biseglie A., Rossetto O., Montecucco C.** (2006). Reversible skeletal neuromuscular paralysis induced by different lysophospholipids. *FEBS Letters*. 580: 6317-6321.
- Cecchini, A. L., Marcussi, S., Silveira, L. B., Borja-Oliveira, C. R., Rodrigues-Simioni, L., Amara, S., Stabeli, R. G., Giglio, J. R., Arantes, E. C., Soares, A. M.** (2005). Biological and enzymatic activities of *Micrurus* sp. (Coral) snake venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 140: 125– 134.
- Campbell, J. A., & Lamar, W. L.** (2004). The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere (Vol. 1). *Cornel University Press*. New York.
- Carbajal-Saucedo, A.** (2004). Comparación inmunoquímica del veneno de serpientes de coral (Elapidae: *Micrurus*, *Micruroides*) mexicanas. *Tesis de Maestría*. Instituto de Biotecnología, UNAM. México.
- Cartier, G. E., Yoshikami, D., Gray, W. R., Luo, S., Olivera, B. M., & McIntosh, J. M.** (1996). A New alpha-Conotoxin Which Targets  $\alpha 3\beta 2$  Nicotinic Acetylcholine Receptors. *The Journal Of Biological Chemistry*, 271 (13), 7522-7528.
- Chippaux, J. P.** (1998). Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bulletin of the World Health Organization*. 76 (5): 515-524.
- Corrêa-Netto, C., Junqueira-de-Azevedo, I. L. M., Silva, D. A., Ho, P.L., Leitão-de-Araújo, M., Alves, M. L. M., Sanz, L., Foguel, D., Zingali, R. B., Calvete J. J.** (2011). Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*, *J Prot.*
- Da Silva Jr. N. J., Aird S. D.** (2001). Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 128: 425-456.
- Da Silva Jr. N. J., Griffin, P. R., Aird, S. D.** (1991). Comparative chromatography of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comp. Biochem. Physiol.* 100B (1): 117-126.
- Davidson, T. M., Eisner, J.** (1996). United States coral snakes. *Wilderness and Environmental Medicine*. 1: 38-45.
- Dal Belo, C. A., Leitea, G. B., Toyamab, M. H., Marangonib, S., Corradoc, A. P., Fontana, M. D.** (2005). Pharmacological and structural characterization of a novel phospholipase  $A_2$  from *Micrurus dumerilii carinicauda* venom. 46, 736-750.

- Dokmetjian, J. A., del Canto, S., Vinzón, S., Biscoglio de Jiménez Bonino, M. (2009).** Biochemical characterization of the *Micrurus pyrrochryptus* venom. *Toxicon*. Vol. 53: 375 – 382.
- Fix J. D. (1980).** Venom Yield of the North American Coral Snake and its Clinical Significance. *Southern Medical Journal*. Vol. 73(6):737-8.
- Gold, B. S., Wingert, W. A. (1994).** Snake venom poisoning in the United States: A review of therapeutic practice. *Southern Medical Journal*. 87 (6): 579 – 589.
- Kini, M. R. (2003).** Excitement ahead: Structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon*. 42: 827-840.
- Kitchens, C. S., Van Mierop, L. H. S. (1987).** Envenomation by the Eastern Coral Snake (*Micrurus fulvius fulvius*): A Study of 39 Victims. *JAMA* 258 (12): 1615 – 1618.
- Fernandez, J., Alape-Giron, A., Angulo, Y., Sanz, L., Gutierrez, J. M., Calvete, J. J., Lomonte, B. (2010).** Venomic and Antivenomic Analyses of the Central American Coral Snake, *Micrurus nigrocinctus* (Elapidae). *Journal of Proteome Research*.
- Luciana I Leão, L., Ho, P. L., Junqueira-de-Azevedo, I. L. M. (2009).** Transcriptomic basis for an antiserum against *Micrurus corallinus* (coral snake) venom. *BMC Genomics*. 10: 112
- López-Vera, E., Jacobsen, R.B., Ellison, M., Olivera, B. M., Teichert, R.W. (2007).** A novel alpha conotoxin ( $\alpha$ -PIB) isolated from *C. purpurascens* is selective for skeletal muscle nicotinic acetylcholine receptors. *Toxicon*. 49: 1193–1199.
- Morgan D. L., Borys D. J., Stanford R., Kjar D., Tobleman W. (2007).** Texas coral snake (*Micrurus tener*) bites. *Southern Medical Journal*. 100 (2): 152-156.
- Nirthanan, S., Gwee, M. (2004).** Three finger  $\alpha$ -neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. *J. Pharmacol. Sci.* 94: 1-17.
- Norris R. L., Pfalzgraf R. R., Laig G. (2009)** Death following coral snake bite in the United States-First documented case (with ELISA confirmation of envenomation) in over 40 years. *Toxicon*. 53: 693-697.
- Olamendi-Portugal T., Batista C., Restano-Cassulini R., Pando V., Villa-Hernández O., Zaveleta-Martínez-Vargas A., Salas-Arruz M., Rodríguez de la Vega R., Becerril B., Possani L. (2008).** Proteomic analysis of the venom of the fish-eating coral snake *Micrurus surinamensis*: novel toxins, their function and phylogeny. *Proteomics*. 8: 1919–1932.
- Parrish, H.M., Khan, M.S. (1967).** Bites by coral snakes: report of 11 representative cases. *Am. J. Med. Sci.* 253, 561–568.
- Possani L. D., Alagón A. C., Fletcher P. L., Varela M., Juliá J. Z. (1979).** Purification and characterization of a phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of the coral snake *Micrurus fulvius microgalbineus*. *Biochem. J.* 179: 603-66.
- Pough, F. H., Andrews, R. M., Cadle, J. E., Crump, M. L., Savitsky, A. H. Wells, K. D. (2008).** *Herpetology. Ed. Prentice Hall.* Upper Saddle River. NY.
- Pungercar, J., Krizaj, I. (2007).** Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipase A2. *Toxicon*. 50: 871-892.
- Rosso J., Vargas-Rosso O., Gutiérrez J. M., Rochat H., Bougis P. E. (1996).** Characterization of alfa-neurotoxin and phospholipase A2 activities from *Micrurus* venoms. *Biochemistry*. 238: 231-239.
- Roze, J. A. (1996).** Coral Snakes of the Americas: Biology, Identification and Venoms. *Krieger Publishing Company*. Florida.
- Sánchez E. E., López-Johnson J. C., Rodríguez-Acosta A., Pérez J. C. (2008).** Neutralization of two North American coral snake venoms with United States and Mexican antivenoms. *Toxicon*. 51: 297-303.
- Shiloah, J., Klibansky, C., deVries, A., & Berger, A. (1973).** Phospholipase B activity of a purified phospholipase A from *Vipera pahstinae* venom. *Journal of Lipid Research*. 14: 268-278.

- Tan, N., Ponnudurai, G.** (1992). The biological properties of venoms of some American coral snakes (genus *Micrurus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 101B (3): 471-474.
- Theakston R. D. G. & Reid H. A. (1983).** Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of the World Health Organization* Vol. 61 (6): 949 – 956.
- Tsetlin V. I., Hucho F.** (2004). Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. *FEBS Letters.* 557: 9-13.
- Vergara I.** (2010). Influencia de la vía de administración en la capacidad neutralizante in vivo de dos antivenenos. *Tesis de Maestría.* Instituto de Biotecnología, UNAM. México.
- Vital-Brazil, O.** (1987). Coral snake venoms: mode of action and patofisiology of experimental envenomation. *Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 29: 119-126.
- Vital-Brazil, O. & Fontana D.** (1983/84). Ações prejuncionais e pos-juncionais da peçonha da cobra coral *Micrurus corallinus* na Junção neuromuscular. *Mem. Inst. But.* 47/48: 13-26.
- Weis, R., McIsaac, R.** (1971). Cardiovascular and muscular effects of venom from coral snake *Micrurus fulvius*. *Toxicon.* 9, 219-228.
- Wisniewski, M. S., Hill, R. E., Havey J. M., Bogdan, G. M., Dart, R. C.** (2003). Australian Tiger Snake (*Notechis scutatus*) and Mexican Coral Snake (*Micrurus* species) antivenoms prevent death from United States Coral Snake (*Micrurus fulvius fulvius*) venom in a mouse model. *Journal of Toxicology Clinical Toxicology.* 41 (1): 7–10.