



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Toxicidad del veneno de la población intermedia
de *Crotalus aquilus* y *Crotalus lepidus klauberi*
(Squamata: Viperidae) en Aguascalientes, México

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

ROSA ISELA QUINTERO PÉREZ



DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. GUSTAVO ERNESTO QUINTERO DÍAZ

2016

Ciudad Universitaria, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Quintero
Pérez
Rosa Isela
91802082
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308226964

2. Datos del tutor

M. en C.
Gustavo Ernesto
Quintero
Díaz

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Alejandro
Carbajal
Saucedo

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Víctor Hugo
Reynoso
Rosales

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Andrea Rubí
Jiménez
Marín

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
José Alberto
Cruz
Silva

7. Datos del trabajo escrito.

Toxicidad del veneno de la población intermedia de *Crotalus aquilus* y *Crotalus lepidus klauberi* (Squamata: Viperidae) en Aguascalientes, México

65p
2016

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a mi abuela y mi segunda madre Esperanza Hernández Hernández, que en donde quiera que esté siempre tuve su apoyo incondicional y sobre todo su amor. Por todos sus consejos, regaños y enseñanzas que me sirvieron para ser la persona que soy hoy en día. ¡Gracias por todo abuelita!

A mis padres Rosa Imelda Pérez Hernández y Juan Quintero Mejía, que me dieron todo el apoyo desde el inicio de este sueño, que trabajaron más para que mi meta se cumpliera. Sin su ayuda esto jamás pudo haber sido posible. Gracias por encaminarme y quererme como lo hicieron. ¡Los amo!

Este triunfo que conseguí, no solo es para mí, sino para estos grandes seres que tuve y tengo a mi lado. Con todo mi amor y respeto le doy las gracias.

Su nieta e hija Isela

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Principalmente quiero agradecer a la máxima casa de estudios UNAM por darme la oportunidad de formar parte de ella y por todos los buenos momentos y enseñanzas que obtuve durante el periodo de licenciatura en Biología.

Quiero agradecer a mi tutor y amigo M. en C. Gustavo Ernesto Quintero Díaz ya que con su apoyo y confianza se pudo llevar a cabo este proyecto.

A mi segundo tutor que tiene mi admiración y respeto el Dr. Víctor Hugo Reynoso Rosales por el apoyo económico, asesorías y grandes consejos.

En especial a la M. en C. Andrea Jiménez que me enseñó técnicas y métodos moleculares muy importantes para el proyecto, pero sobre todo por la paciencia y la dedicación que tuvo hacia mí.

Al Dr. Alejandro Carbajal Saucedo que estuvo involucrado en el proceso de datos y programas. Por todos sus consejos y enseñanzas acerca de los venenos de Vipéridos y Elápidos.

A mi amiga y sensei desde que entre a la carrera, la bióloga Adriana González que siempre me impulsó a seguir con el proyecto, por todos sus consejos y motivaciones que me sirvieron para concluir este trabajo de tesis.

A mi amigo el Dr. Carlos Balderas que me enseñó muchas cosas sobre los anfibios y reptiles.

A la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), en particular al Director General de Vida Silvestre (DGVS) Jorge Maksabedian de la Roquette, quien autorizó el permiso de recolecta y extracción de veneno de los ejemplares de este estudio.

Mi equipo de campo que siempre estuvo al pie del cañón, Gustavo Quintero, Carolina Chávez F., Rubén Carbajal, Don Robert, Manuel, Lisette Chávez, Aranza Quintana y Misael Garrido Casas.

A Carolina Chávez y Gustavo Quintero por brindarme un lugar para mantener a los animales en mi estancia en Aguascalientes y adoptarme como parte de su familia.

A todas aquellas instituciones que estuvieron involucradas para el tratamiento del veneno y de los ejemplares. Universidad Autónoma de Aguascalientes y al Instituto de Biología de la UNAM.

Al Buró de Investigaciones y Soluciones Biológicas, A.C. por el apoyo y las facilidades para traslado de los ejemplares.

Por la ayuda para mantener en condiciones óptimas a los ejemplares y grandes consejos a mi buen amigo el biólogo Guillermo Gil.

Al M.V.Z. Mario Soriano, al M. en C. Agustín Carmona y a la Bióloga Dora del Bioterio de la Facultad de Ciencias por permitir el alojamiento de los roedores utilizados en los experimentos y adiestrarme en su manutención.

Mis amigos el Biólogo Sergio Bárcenas y al M. en C. Eric Rivas por la ayuda en técnicas y préstamos de ejemplares.

Al M. en C. Canek por su apoyo en técnicas moleculares y muy buenos consejos, gracias amigo.

Por último a mi amigo el Biólogo Hugo Salinas Matus por su gran ayuda y experiencia en programas estadísticos.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A las dos grandes personas que más admiro en la vida y amo, mis padres Rosa Imelda Pérez Hernández y Juan Quintero Mejía por el gran amor y confianza que me brindaron para hacer mis sueños realidad. Siempre tuve su apoyo para vencer todas las barreras que la vida me puso en el camino. Gracias por creer y confiar en mí, este logro es para ustedes.

A mi hermana Valeria Quintero Pérez que siempre me ha brindado su cariño.

Mis tías que siempre me ayudaron y apoyaron en todo momento, Tía Norma, Tía Mapy y mi Tía Millin.

A mi mano derecha en campo y sobre todo compañera de aventuras de vida, que nunca me ha dejado sola, que desde que empezó este gran sueño tuve su apoyo incondicional y que me ha hecho una mejor persona Lisette Chávez García. ¡La aventura continua!

Al profesor del taller de Ecología y Evolución de Anfibios y Reptiles Alberto Cruz Silva “Fauno” y a mis amigos que siempre me estuvieron apoyando y echando porras, Micho “Bebé Vampiro”, Dulce “Abronia”, Corina “Mamá Corina”, Gerardo “Pelón”, Hugo “Dios Hugo” y Paulina “Pau”.

A mis amigos del cubil de herpetología Canek, Ángel “Jarocho”, Carmina, Gaby, Jorge, Miguel y Lulú.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias Benjamín, Lucía “Lucha” y Caro “Sensei”.

Por último a mis amigos de la prepa 8, que son para toda la vida Oscar “Cremas”, Itzel “Sis”, Gabriela “Curi”, Ricardo “Ricky”, Katia “Puchis”, Eduardo “Suazo”, Michelle “Mech”, Jerry, Gaby “Mamá Gaby”, Meli, Gus, Karen “Chuy” y Dinorah “Dino”. Porque con ellos pase los momentos más divertidos y emotivos de mi vida. ¡Gracias Prepa 8!

ÍNDICE

	Págs.
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Serpientes venenosas mexicanas	2
1.2 Familia Viperidae	2
1.3 Serpientes venenosas del estado de Aguascalientes.....	3
1.4 Organismos de estudio.....	3
1.5 Características de los venenos.....	6
1.6 Componentes de los venenos	7
1.7 Cuadro clínico por envenenamiento.....	10
2. ANTECEDENTES.....	13
2.1 Hibridismo en reptiles	13
2.2 Híbridos de serpientes de cascabel	14
2.3 Población intermedia en Aguascalientes	14
2.4 Estudios previos en los venenos de interés	15
3. JUSTIFICACIÓN.....	17
4. OBJETIVOS.....	17
4.1 Objetivo general.....	17
4.2 Objetivos particulares	17
5. HIPÓTESIS.....	17
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
6.1 Recolecta de ejemplares	18
6.2 Alojamiento de los organismos en cautiverio.....	19
6.3 Tratamiento del veneno	20

6.4	Cuantificación de concentración proteica	20
6.5	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	20
6.6	Determinación de la letalidad de los venenos.....	22
6.7	Signología ocasionada por los venenos en roedores	23
6.8	Determinación de la actividad hemorrágica	23
7.	RESULTADOS.....	25
7.1	Organismos recolectados y extracción de veneno.....	25
7.2	Cuantificación de proteína por A 280 nm.....	27
7.3	Comparación del perfil proteico de los venenos por (SDS-PAGE)	28
7.4	Potencia letal de los venenos	32
7.5	Signología ocasionada por los venenos en roedores	35
7.6	Hemorragias producidas por los venenos por vía intradérmica	37
8.	DISCUSIÓN.....	41
9.	CONCLUSIONES	50
10.	LITERATURA CONSULTADA	52
11.	ANEXOS.....	62

RESUMEN

Los venenos de las serpientes están constituidos por un grupo complejo de familias de proteínas que son biológicamente activas y cuya principal función es facilitar la captura y digestión de las presas. Los objetivos de este trabajo fueron la observación del perfil electroforético de proteínas en los venenos de las poblaciones de *Crotalus aquilus* y *Crotalus lepidus klauberi* y de la población intermedia (*Crotalus lepidus x aquilus*), determinar la Dosis Letal Media (DL50), observación de la signología ocasionada por los venenos en roedores y determinar la Dosis Mínima Hemorrágica (DMH). Se realizaron muestreos exhaustivos (junio-julio) del 2014 y se capturaron un total de 15 individuos de ambos sexos, cinco ejemplares de *C. lepidus x aquilus* (Mesa de las Preñadas), cinco de *C. aquilus* (Sierra de Laurel y Tlachichila) y cinco de *C. lepidus klauberi* (Mesa Montoro y Sierra Fría). Posteriormente se realizó la extracción del veneno por ordeña directa. Con el veneno se formó un pool de 15 mg para elaborar las pruebas. El perfil electroforético de las proteínas mostró que todos los venenos cuentan con las bandas proteicas típicas de los venenos de Vipéridos como: Aminoácido oxidasas, Metaloproteasas, Lectinas Tipo-C, Serino Proteasas y Desintegrinas. El veneno con mayor potencial letal fue el de *C. lepidus klauberi* con una DL50 de 1.320 µg/g de ratón. Las poblaciones de cascabeles de montaña presentaron un potencial hemorrágico alto, pero la población con mayor capacidad hemorrágica observada fue la de *C. aquilus*. La población intermedia de *C. lepidus x aquilus* resultó ser el veneno con menor letalidad y menor capacidad hemorrágica. Los venenos de estas poblaciones comparten familias de proteínas, pero cada uno de estos venenos se comporta de manera diferente, ya sea en letalidad, capacidad hemorrágica y sintomatología que puede atribuirse a factores como la alimentación, especie, la estacionalidad y la distribución.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Serpientes venenosas mexicanas

Entre los vertebrados venenosos los reptiles es el grupo con mayor número de especies. Cuentan con adaptaciones tróficas que les facilitan el manejo de la presa. Los venenos de estos organismos no solo dependen de las cantidades inoculadas sino de las moléculas que conforman los venenos (Mackessy, 2010). Nuestro país cuenta con el mayor número de especies de serpientes venenosas que cualquier otra parte en el continente Americano (Campbell y Lamar, 2004). En México las serpientes están representadas por 393 especies clasificadas en nueve familias, de las cuales sólo dos son de importancia médica. La familia Viperidae, que incluye a las serpientes de los géneros *Agkistrodon*, *Atropoides*, *Bothrops*, *Bothriechis*, *Cerrophidion*, *Crotalus*, *Mixcoatlus*, *Ophryacus*, *Porthidium* y *Sistrurus*; y la familia Elapidae, que incluye a las serpientes marinas (*Hydrophis*) y los corales (*Micrurus*), poseen hábitos y características particulares (Flores Villela y García-Vázquez, 2014).

1.2 Familia Viperidae

La familia Viperidae está compuesta de 331 especies. Es característico de ellas la cabeza grande de forma triangular y la presencia de foseta termosensorial profunda en la región loreal que contribuye a la identificación de la presa (Vázquez y Quintero, 2005). Además tienen un aparato venenoso altamente especializado con un hueso maxilar rotatorio que permite que los colmillos sean móviles, presentan glándulas de veneno bilateralmente pareadas situadas detrás de los ojos y rodeadas por un músculo compresor que dirige el veneno a unos colmillos solenoglifos grandes e hipodérmicos, con los que inyecta veneno de manera profunda al morder a su presa o defenderse (Mackessy, 2010; Vázquez y Quintero, 2005).

A nivel mundial las serpientes de la familia Viperidae engloban a tres subfamilias, Azemiopinae, Crotalinae y Viperinae (Pough *et al.*, 1998). En México la subfamilia Crotalinae está presente en casi todo el territorio mexicano, incluyendo algunas islas del Golfo de California. La mayoría de las especies de este grupo habitan principalmente en la parte norte del país, en las zonas áridas y en las principales elevaciones como la

sierra Madre Oriental, la Sierra Madre Occidental y le Eje Neovolcánico Transversal (Campbell y Lamar, 2004).

1.3 Serpientes venenosas del estado de Aguascalientes

En Aguascalientes se han realizado pocos trabajos sobre serpientes. Los antecedentes que se tienen sobre el tema son los estudios regionales de Herpetofauna de Anderson y Lidicker (1963) y de Wilson y McCranie (1979), las recopilaciones de Herpetofauna Mexicana de Smith y Taylor (1966) y de Smith y Smith (1976) y más recientemente los de Sigala-Rodríguez y Vázquez-Díaz (1996) y de Vázquez y Quintero (1997, 2005, en prensa). Sin embargo, de las dos familias de serpientes venenosas que tienen representantes en el estado, existen evidencias de que sólo habita una especie de coralillo (*Micrurus distans zweifeli*, Quintero-Díaz *et al.*, 2000). En Aguascalientes, el género *Crotalus* está representado por siete especies: *Crotalus aquilus*, *Crotalus basiliscus*, *Crotalus lepidus*, *Crotalus polystictus*, *Crotalus scutulatus*, *Crotalus molossus* y *Crotalus pricei*, de las cuales *Crotalus aquilus* y *Crotalus polystictus* son endémicas para el país (Vázquez y Quintero, 2005; en prensa; Carbajal-Márquez *et al.*, 2015 a). Todas estas especies se encuentran enlistadas en la NOM-059-SEMARNAT-2010. Habita también una población intermedia de *Crotalus lepidus* y *Crotalus aquilus* nombrada (*Crotalus lepidus x aquilus*).

1.4 Organismos de estudio

Crotalus aquilus (Klauber, 1952) es una víbora pequeña que llega a tener un tamaño de 62 a 70 cm (Figura 1). Existe dimorfismo sexual donde los machos presentan tonos verdosos y las hembras son de color gris oscuro. Esta especie es endémica de México y su distribución es principalmente el centro del país, se encuentran en suelos rocosos de bosque de encino en las cercanías de cuerpos de agua. La actividad de esta especie es diurna y crepuscular. Se alimentan principalmente de lagartijas (*Sceloporus* y *Gerrhonotus*), ranas, salamandras, ratones y pequeños invertebrados como grillos y arañas (Vázquez y Quintero, 2005). La distribución de *Crotalus aquilus* en el estado de Aguascalientes se ha observado en las partes altas de la Sierra El Laurel, en los límites con el estado de Jalisco (Vázquez y Quintero, 2005), y en los municipios de Huanusco,

Jalpa y Nochistlán de Mejía en Zacatecas (Carbajal-Márquez *et al.*, 2015 b). Esta especie se encuentra sujeta a protección especial por la NOM-059-SEMARNAT-2010.



Figura 1. Ejemplares adultos de *Crotalus aquilus*. A la izquierda hembra (ID C.aqui♀ZAC2) y a la derecha macho (ID C.aqui♂ZAC1), ambos de Tlachichila, Zacatecas.

Crotalus lepidus klauberi (Kennicott 1861) es una serpiente de tamaño mediano que algunas veces alcanza los 80.0 cm de longitud (Figura 2). Existe dimorfismo sexual en el que los machos tienen un color verdoso y las hembras son de color grisáceo a café grisáceo. Habitan en zonas de encino-pino, encino y zacatales en los mismos bosques, generalmente en zonas rocosas y accidentadas, asociadas a cuerpos de agua. Su distribución es amplia en México a lo largo de la porción oeste del Altiplano Mexicano y la Sierra Madre Occidental hasta el norte de Jalisco. La actividad es durante el día y la noche. Su alimentación es variada. Los adultos tienen preferencia por lagartijas del género *Sceloporus* y en menor grado incluyen a pequeños roedores, pequeñas serpientes y ranas. En cambio, los jóvenes se alimentan de grillos, ciempiés y chapulines. En Aguascalientes la distribución de *Crotalus lepidus klauberi* está limitada al conjunto de sierras que conforman la Sierra Fría en los municipios de San José de Gracia, Jesús María y Calvillo (Vázquez y Quintero, 2005). *C. lepidus* se encuentra sujeta a protección especial en la NOM-059-SEMARNAT-2010.



Figura 2. Ejemplares colectados ambas hembras de *Crotalus lepidus klauberi* de la localidad: Mesa Montoro, Aguascalientes. A la izquierda (ID C.lep♀MM1) y a la derecha (ID C.lep♀MM4).

Crotalus lepidus x aquilus (población intermedia)

La información sobre la historia natural de esta población de serpiente de cascabel no está documentada, pero se cree que es una hibridación natural entre ejemplares de *Crotalus aquilus* y *Crotalus lepidus*, ya que la morfología y distribución de los ejemplares observados hasta ahora coincide para estas dos especies. Por lo observado en cautiverio, es de tamaño mediano de aproximadamente 72 cm a 75 cm de talla máxima (Figura 3). Presentan dimorfismo sexual marcado en el que los machos tienen color verdoso claro y las hembras son grisáceas con tonalidades rosadas que las diferencia de *C. aquilus* y *C. lepidus*. Por lo que se observó en laboratorio tienen preferencia por mamíferos de talla pequeña y lagartijas del género *Sceloporus* (obs. pers.).

La distribución de *Crotalus lepidus x aquilus*, aquí llamado población intermedia, aún no está bien definida. En la actualidad existen en al menos una gran zona en el estado de Aguascalientes en donde quedaron aisladas varias poblaciones intermedias que son confundidas con *C. aquilus* o *C. lepidus* (Quintero-Díaz, com. pers.). Principalmente se han encontrado morfotipos intermedios en la zona noreste dentro del municipio del Llano en Mesa de las Preñadas; sin embargo, es posible que existan dentro de las zonas de contacto y solapamiento de las distribuciones de *C. aquilus* y *C. lepidus klauberi*, en la zona noreste y este de Aguascalientes, oeste de San Luis Potosí y sur de Zacatecas.



Figura 3. Ejemplares colectados de *Crotalus lepidus x aquilus* de la localidad de Mesa de las Preñadas, Aguascalientes. A la izquierda la hembra (ID Int♀MP2) y a la derecha el macho (ID Int♂MP2).

1.5 Características de los venenos

El veneno de las serpientes de cascabel es una secreción producida en glándulas especializadas que es liberada a través de una herida provocada por los colmillos. Esta secreción líquida (normalmente amarillenta) contiene moléculas que perjudican algunos de los procesos bioquímicos o fisiológicos normales para ayudar a la alimentación o defensa del animal que lo produce (Fry y Wüster, 2004; Carbajal-Saucedo, com. pers.). Los venenos de las serpientes están constituidos por un grupo complejo de proteínas o familias de proteínas las cuales son activas. La función principal de estas proteínas es facilitar la digestión de las presas (alimentación) y la captura. Se sabe que estos componentes pueden cambiar cualitativamente debido a diversos factores como son la especie, la edad del organismo, la estacionalidad y la dieta, así como cuantitativamente por el tamaño del ejemplar. El grado de actividad del veneno varía en las especies, de tal manera que hay especies con venenos hemolíticos, pero escasamente proteolíticos y neurotóxicos, mientras que otras pueden tener altamente proteolíticas y hemolíticas pero escasamente neurotóxicas (Chippaux *et al.*, 1991; Vázquez y Quintero, 2005).

Gran parte de la actividad tóxica de los venenos de serpiente de cascabel se puede atribuir a las enzimas en el veneno. Los venenos de las serpientes de cascabel no son idénticos y algunos son significativamente más letales que otros principalmente porque poseen neurotoxinas (Glenn y Straight, 1978; Glenn *et al.*, 1983). Estos venenos pueden contener de cincuenta a cien componentes de proteínas y péptidos que representan de 10 a 20 familias de proteínas de veneno (Mackessy, 2010).

1.6 Componentes de los venenos

De manera general, los venenos de vipéridos se encuentran compuestos por una gran cantidad de moléculas. Entre ellas destacan los péptidos y las proteínas (enzimas) (Neri *et al.*, 2014) que representan alrededor del 90% del peso seco del veneno (Mebs, 2002). Los péptidos no enzimáticos son toxinas que tienen actividad específica en estructuras nerviosas y membranas celulares. Además tienen propiedades inhibitorias en enzimas como proteasas y acetilcolinesterasas, repercusión en canales iónicos y efectos sinérgicos con otros componentes no tóxicos. Las proteínas (enzimas) como las metaloproteasas, serino proteasas, nucleasas y fosfolipasas A₂, en su mayoría son hidrolasas y aminoácido-oxidasas las cuales cuentan con una función digestiva. Algunas de las enzimas pueden convertirse en toxinas funcionales, como la fosfolipasas A₂ que desempeñan efectos específicos sobre estructuras nerviosas. Las demás enzimas afectan la coagulación sanguínea o pueden causar daño a los tejidos (miotoxinas) (Mebs, 2002).

El 10% del veneno en peso seco restante también contribuyen a la potencia biológica de los venenos. Estos componentes adicionales no son ni enzimas ni toxinas e incluyen componentes no peptídicos orgánicos (tales como nucleósidos), pequeños componentes peptídicos, aminoácidos, carbohidratos y componentes de iones inorgánicos y metálicos (Mebs, 2002).

Existe una gran cantidad de proteínas diferentes que se encuentran agrupadas en familias de proteínas. Algunas de ellas son:

1. Las Metaloproteasas son proteínas que degradan a otras proteínas (Fox y Serrano, 2005). Son dependientes de zinc o cobalto, en venenos de serpientes son dependientes de zinc. Hidrolizan algunas proteínas que componen la lámina basal que rodea las células endoteliales de los vasos capilares y de las vénulas. Como consecuencia de esta hidrólisis, las células endoteliales se ven afectadas, desarrollando una serie de vesículas y reduciendo su grosor, hasta el punto en que su integridad se interrumpe y se producen rupturas a través de las que se crea la salida de fluido del vaso que lo contiene, llamado “extravasación” (Moreira *et al.*, 1994; Gutiérrez y Rucavado, 2000).

Desde el punto de vista estructural, las metaloproteasas hemorrágicas se clasifican en cuatro clases con base en los dominios que poseen (Bjarnason y Fox 1994). La clase P-I presenta únicamente el dominio metaloproteasa caracterizado por una secuencia consenso responsable de la unión al zinc. Las otras clases presentan, además un dominio catalítico. La clase P-II tiene dominio “tipo desintegrina”, la clase P-III dominio “tipo desintegrina” y es rico en cisteína, y por último, la clase P-IV tiene dominio “lectina tipo C” (Gutiérrez, 2002). Adicional a la actividad hemorrágica, varias metaloproteasas también modulan al sistema hemostático promoviendo o inhibiendo la coagulación (Fox y Serrano, 2005).

2. Las Serino Proteasas son enzimas que hidrolizan otras proteínas a través de la actividad de un residuo serina localizado en el sitio activo. Algunos miembros pueden tener actividad tipo trombina ya que actúan sobre el fibrinógeno para convertirlo en fibrina que coagula la sangre. La fibrina que producen las Serino Proteasas no es idéntica a la fibrina normal producida por la trombina endógena y es removida rápidamente, por lo que los niveles plasmáticos de fibrinógeno bajan de manera muy importante. A nivel clínico se produce una coagulopatía por consumo de fibrinógeno que se manifiesta por sangrados importantes, incluso a nivel cerebral. Su actividad biológica consiste en afectar las cascadas de coagulación (Kini, 2005).

3. Las fosfolipasas tipo A₂ (PLA₂) constituyen una gran familia y son enzimas esterolíticas que digieren glicerofosfolípidos (Ohno *et al.*, 2003) que se encuentran abundantemente en la naturaleza. Se clasifican en diferentes grupos de acuerdo a su estructura tridimensional, la secuencia de aminoácidos, la especificidad catalítica y el lugar de expresión. Los venenos de serpiente son una buena fuente de enzimas de los grupos I y II PLA₂. El grupo I de enzimas PLA₂ está en el páncreas de mamíferos y en venenos de serpientes como elápidos y colúbridos, y el grupo II en los venenos de los vipéridos (Mackessy, 2010).

Muchas de las enzimas PLA₂ del veneno de serpiente existen como monómeros, aunque algunos de ellos forman agregados o complejos. Los componentes de estos complejos se mantienen unidos por interacciones covalentes y no covalentes. Estos factores proteicos adicionales ayudan a expresar sus efectos farmacológicos en la mayor potencia (Bon, 1997). Sus efectos incluyen destrucción de eritrocitos,

interferencia en la coagulación sanguínea, inflamación y citotoxicidad inespecífica. Tienen blancos biológicos como sinapsis nerviosa, fibra muscular lisa y fibra cardiaca (Ohno *et al.*, 2003).

Un ejemplo de complejo de PLA₂ es la crotoxina, un componente principalmente neurotóxico descrito en el veneno de la cascabel sudamericana *Crotalus durissus terrificus* (Slotta y Fraenkel-Conrat, 1938). Es una neurotoxina heterodimérica con masa molecular de 24 kDa de acción presináptica. Está compuesta de una subunidad ácida no tóxica, y una básica tóxica. La subunidad ácida tiene como función la orientación de la neurotoxina a los sitios de actividad y mejora la toxicidad de la subunidad básica (Aird *et al.*, 1990; Bieber *et al.*, 1990). Esta toxina se ha encontrado en los venenos de varias especies de América del Norte, por ejemplo en *Crotalus oreganus helleri*, *Crotalus oreganus concolor* y *Crotalus tigris* (Calvete *et al.*, 2012), *C. simus* (Neri *et al.*, 2013) y en una población de *Crotalus lepidus klauberi* en Aguascalientes, México (Rivas-Mercado, 2014).

4. Las L-Aminoácido oxidasas (LAAO's) se produce ampliamente en los venenos de serpiente. Son flavoproteínas y constituidas por dos subunidades con secuencias de aminoácidos idénticas, cada una con un peso molecular de 57-68 kDa. Estudios recientes mostraron que LAAO's son enzimas multifuncionales que inducen edema, pueden inducir o inhibir la agregación de plaquetas, inducen apoptosis, y tienen poder antibacteriano, anticoagulante y con efectos anti-VIH. El efecto hemorrágico de LAAO's es resultado de efectos complejos y puede implicar la apoptosis de las células endoteliales vasculares y otros (Mackessy, 2010).

5. Las nucleasas son enzimas que actúan sobre los ácidos nucleicos (DNA y ARN) y sus derivados. Las nucleasas de los venenos de serpientes se clasifican como endonucleasas y exonucleasas y ambas tienen fosfodiesterasas PDE. La diferenciación entre la actividad específica de las endonucleasas de veneno y la actividad PDE es difícil de diferenciar ya que la actividad endonucleasa es una propiedad inherente de las PDE del veneno (Mori *et al.*, 1987; Stoynov *et al.*, 1997), y no hay informes que describen la actividad exclusiva de las exonucleasas en venenos de serpiente. Así, la actividad de las exonucleasas del veneno se atribuye más bien a las PDE (Mackessy, 2010).

6. Las proteínas secretoras ricas en cisteína (CRiSP's) derivan su nombre por la abundancia de cisteína que se encuentran en los miembros de familia. Estas proteínas se expresan en los mamíferos, reptiles, insectos, plantas y hongos. Las proteínas CRiSP's se expresan principalmente en los tractos reproductivos de los mamíferos y de los venenos de varias serpientes y lagartos. Las CRiSP's que se encuentran en los venenos de serpientes han sido determinadas por análisis de la estructura cristalina (Kenneth *et al.*, 2007). Los efectos de estas proteínas en los venenos de la familia Viperidae son bloquear los canales iónicos, la hipotermia inducida, la inmovilización de la presa y son desconocidas otras funciones (Yamazaki y Morita, 2004).

7. Lectinas Tipo C: abarcan un grupo de toxinas que son capaces de interferir con la hemostasia. Las lectinas tipo C más estudiada de los venenos de serpiente es la toxina heterodimérica convulxina (CVX), que se obtuvo a partir de los venenos de las serpientes de cascabel americanas *Crotalus durissus terrificus* y *C. d. cascavella*. Consisten en dos subunidades, alfa (CVX α , 13.9 kDa) y beta (CVX β , 12.6 kDa), unidas por enlaces disulfuro (Rádis-Baptista *et al.*, 2005). Algunas de sus funciones y actividades biológicas son unirse a los receptores de las plaquetas y el colágeno siendo los moduladores de las plaquetas y coagulantes (Leduc y Bon, 1998).

8. Las Desintegrinas representan una familia de proteínas que tienen cisteína, presentes en los venenos de las familias de serpientes Atractaspididae, Elapidae, Colubridae y Viperidae. Esta familia de proteínas es de bajo peso molecular de 15 a 5.2 kDa. La función de las desintegrinas es bloquear selectivamente la función de los receptores de integrina y promueven la inhibición de plaquetas. Es importante la comprensión de la biología de estas toxinas que están presentes en los venenos de serpientes porque pueden proporcionar información sobre investigación básica y clínica en tratamiento de ataques cardíacos, diabetes, osteoporosis y cáncer (Calvete *et al.*, 2005).

1.7 Cuadro clínico por envenenamiento

El veneno actúa sobre las células y el sistema hemostático debido a la acción biológica de todas las familias de proteínas que contiene. Causa efectos locales inmediatos como hinchazón progresiva partiendo del sitio de la inoculación, dolor intenso, decoloración

de los tejidos, edema, náuseas, vómito, diarrea y trauma. También se pueden presentar múltiples hemorragias induciendo una variedad de alteraciones sobre la coagulación sanguínea por contener componentes procoagulantes y anticoagulantes. Los efectos de los envenenamientos pueden resultar en secuelas permanentes que se desarrollan muy rápidamente después del envenenamiento (Gutiérrez *et al.*, 2000; Maruñak *et al.*, 2005; Vázquez y Quintero, 2005). La necrosis del tejido muscular o mionecrosis es uno de los efectos más conspicuos de los envenenamientos por serpientes de la familia Viperidae (Gutiérrez y Lomonte, 1989).

En México y en el resto de Latinoamérica, existen envenenamientos por accidente ofídico y no se les presta la importancia en salud pública que deberían. En los últimos años la complejidad biológica, bioquímica y farmacológica de los venenos ha impulsado interés en científicos latinoamericanos por su investigación (Gutiérrez, 2002). Tanto el manejo prehospitalario como el hospitalario juegan un papel importante en la evolución favorable del accidente ofídico, ya que entre más tiempo tarde la aplicación del antídoto, el veneno causará mayores daños. De igual manera, una mala aplicación del antídoto y/o un manejo médico inadecuado del envenenamiento resultan perjudiciales para el paciente (Gil Alarcón *et al.*, 2011; Fernández Badillo *et al.*, 2011). Los casos de accidente ofídico que se tienen reportados para los estados de la República Mexicana en los últimos años, indican que los estados con mayor incidencia son San Luis Potosí, Oaxaca y Veracruz (Figura 4).

Una parte de los accidentes ofídicos no se encuentran reportados en la Secretaría de Salud para algunos estados de la República Mexicana y a veces son confundidos con otros animales venenosos. Para Aguascalientes la incidencia de mordeduras de serpiente de cascabel es baja, en 2012 en Sierra Fría se presentó un accidente ofídico por mal manejo del ejemplar, una cría de *Crotalus lepidus klauberi*. En el cual la persona afectada no aceptó el tratamiento para la mordedura.

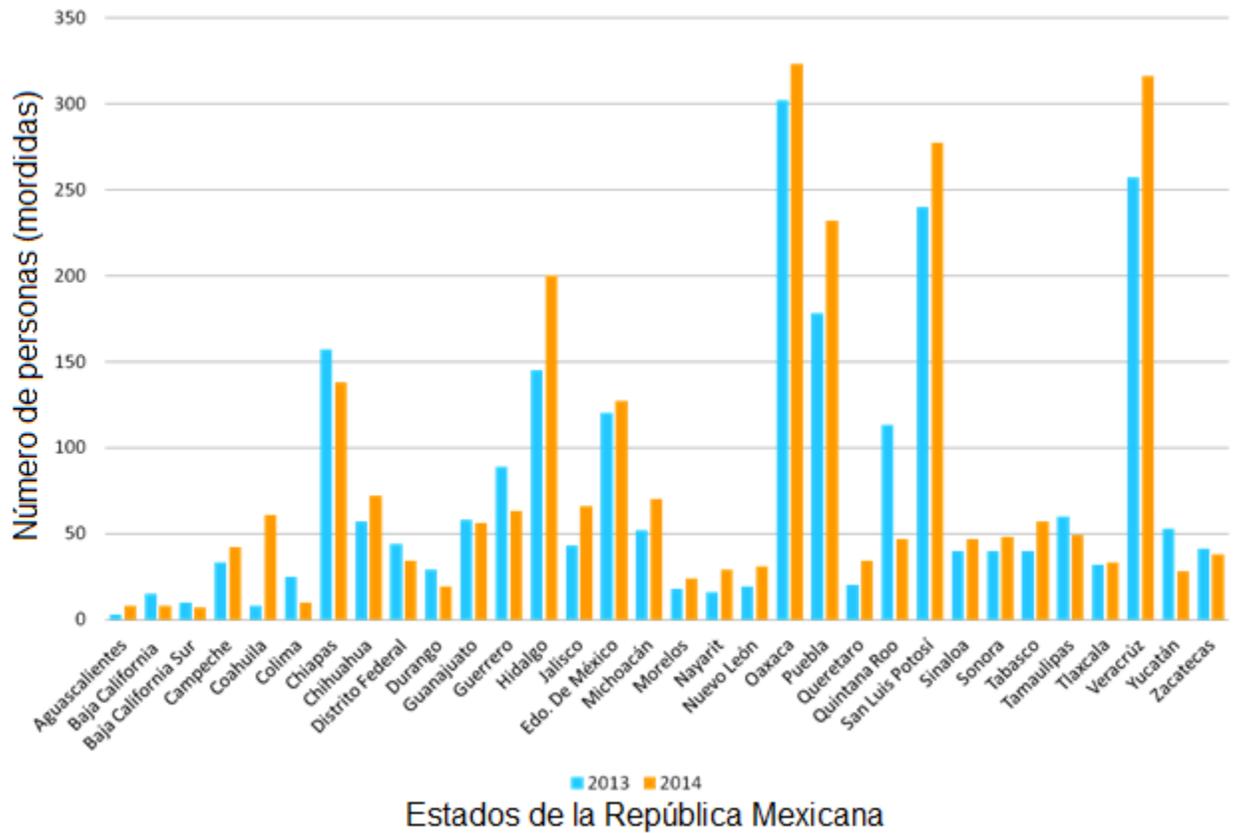


Figura 4. Incidencia de mordeduras de serpiente por estado de la República Mexicana. Compilación de Guillermo Gil (2015) de la Secretaría de Salud, de los Estados Unidos Mexicanos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Hibridismo en reptiles

Los hábitats modificados por la actividad humana es muy común en nuestros días que lleva a efectos sinérgicos que podrían tener graves implicaciones para la conservación (Mendelson y Jennings, 1992). La fragmentación de hábitat es provocada por el uso humano de la tierra y puede dar lugar a una dinámica inestable en el que dos especies que históricamente no se reproducen en el mismo hábitat, se ponen en contacto, pudiendo dar lugar a aumento de los eventos naturales de hibridación, exogamia y asimilación genética de especies (Arnold, 1997). Se cree que la hibridación entre especies podrían ser más comunes a medida que aumente la modificación del hábitat (Meik *et al.*, 2008). Es importante documentar casos naturales de la hibridación debido a que pueden tener consecuencias de gran alcance respecto a los mecanismos de especiación y evolución de las barreras reproductivas (Coyne y Orr, 2004).

Existen pocos estudios sobre poblaciones o especies híbridas de reptiles. Zarza *et al.* (2008) describió con evidencia genética el hibridismo entre *Ctenosaura pectinata* y *C. hemilopha* en la zona de contacto de ambas especies. En el mismo trabajo describió rastro de hibridismo en el contacto de *C. pectinata* con *C. acanthura* en la zona de contacto de ambas especies. Pacheco-Hoyos (en preparación) indica que la población de *Ctenosaura nolasensis* es en realidad una población híbrida entre *C. hemilopha* y *C. conspicuosa*.

En serpientes del género *Thamnophis* donde coexisten las especies *Thamnophis sirtalis* y *Thamnophis butler* en Wisconsin, USA Kapfer *et al.* (2013) mediante análisis genéticos encontró que hay híbridos donde coexisten las dos especies similares a la descendencia híbridos criados en cautiverio. Es interesante lo obtenido ya que estas dos especies a pesar de ser del mismo género no están cercanamente emparentadas pero son capaces de la hibridar.

2.2 Híbridos de serpientes de cascabel

Murphy y Crabtree (1988) indicaron que los híbridos naturales de serpientes de cascabel son raros. Sin embargo, Jacob, (1977) analizó datos morfológicos y bioquímicos de las poblaciones simpátricas de *Crotalus atrox* y *Crotalus scutulatus* para examinar la variación dentro de las especies y poblaciones y para determinar si las especies hibridan. Los datos morfológicos indicaron que existen híbridos en condiciones naturales y que hay producción de híbridos descendientes. Esto indica que es factible romper los mecanismos de aislamiento entre especies en cascabeles, ya que el cruce entre diferentes especies se produce aparentemente con facilidad en cautiverio.

Campbell et al. (1989) documentaron una hibridación natural entre *Crotalus lepidus* y *Crotalus willardi*. Sin embargo, la descripción se realizó con el único ejemplar híbrido que se encontró (una hembra juvenil de aproximadamente 22 cm de longitud total). Caracteres como la forma de las escamas rostrales, las supraoculares y el patrón de coloración los llevó a la conclusión de que el híbrido está conformado por la unión de las dos especies.

Meik et al. (2008) encontraron un ejemplar híbrido natural entre *Crotalus atrox* y *Crotalus horridus* en Wise, Texas, que exhibió un fenotipo intermedio entre las especies parentales, siendo el primer híbrido natural conocido entre ellas. El hibridismo se basó en un patrón de coloración intermedio y su escamación determinada por microscopía electrónica de barrido. Dicho híbrido resultó ser una hembra sub-adulta de 66.7 cm de longitud total.

2.3 Población intermedia en Aguascalientes

Existen poblaciones de especies diferentes del género *Crotalus* que comparten el mismo espacio y los mismos recursos. Este es el caso de *Crotalus aquilus* que tiene una distribución en el centro de México, y *Crotalus lepidus klauberi* que se distribuye en el norte-centro. La distribución de *Crotalus aquilus* está bien estudiada y se han incorporado nuevos registros para algunos estados de la república como Zacatecas (Carbajal-Márquez *et al.*, 2015 b). También ha sido estudiada su taxonomía (Campbell y Lamar, 2004; Valencia-Hernández, 2006), alimentación (Campbell y Lamar, 2004; Vázquez y Quintero, 2005) y la bioquímica de su veneno (Roldán-Padrón *et al.*, 2010;

Rivas-Mercado, 2014; Pérez-Guzmán *et al.*, 2015). *Crotalus lepidus* ha sido objeto de estudios taxonómicos (Campbell y Lamar, 2004), alimenticios (Vázquez y Quintero, 2005; Carbajal-Márquez y Quintero-Díaz, 2015), toxicológicos (Martínez-Romero *et al.*, 2013; Rivas-Mercado, 2014) y de distribución (Campbell y Lamar, 2004; Vázquez y Quintero, 2005).

Las especies *Crotalus aquilus* y *Crotalus lepidus* comparten poblaciones que se traslapan en los estados de Aguascalientes, Jalisco, San Luis Potosí y Zacatecas. En Aguascalientes se encontró una población intermedia (posiblemente híbrida) que comparte algunos de los caracteres de ambas especies. Similar a *C. aquilus*, tienen la escama preocular no dividida, pero el número de manchas dorsales es similar a *C. lepidus*. Esta población fue nombrada como *Crotalus lepidus x aquilus* por Rivas-Mercado (2014). No se han realizado estudios ecológicos sobre esta población intermedia, y su biología aún no se conoce del todo. Estos eventos fortuitos que surgen en la naturaleza han sido muy poco estudiados ya sea en el ámbito taxonómico, biológico y, aún con menor interés, la estructura y función del veneno.

2.4 Estudios previos en los venenos de interés

Martínez-Romero *et al.* (2013) compararon los venenos de tres subespecies *Crotalus lepidus lepidus*, *Crotalus lepidus klauberi*, *Crotalus lepidus morulus* que tienen una distribución al norte y centro de México. Los venenos de las serpientes de cascabel de las rocas muestran un notable grado de variabilidad, incluyendo diferencias intraespecíficas en los componentes principales relacionados a la geografía, la ontogenia y al sexo, entre otros. Los venenos de las subespecies *Crotalus lepidus* mostraron gran similitud en los perfiles de proteínas. También mostraron similitud fuerte en las actividades biológicas de los venenos, aunque se muestran algunas diferencias notables en los efectos letales y hemorrágicos. Martínez-Romero *et al.* (2013) concluyen que una comprensión más completa de las consecuencias adaptativas de los venenos dentro de esta especie requiere información más detallada sobre la historia natural de las subespecies.

Las propiedades bioquímicas y biológicas del veneno de *Crotalus aquilus* ha sido muy poco estudiado. Pérez-Guzmán *et al.* (2015) realizaron un trabajo sobre la

actividad de la fosfolipasa A₂ y las proteínas de esta especie, encontrando que el veneno de *Crotalus aquilus* presenta proteínas con un peso molecular desde los 10 hasta los 66 kDa y es muy similar al veneno de *Crotalus lepidus klauberi*. Esto podrían deberse a la cercanía filogenética que tienen las dos especies y su distribución en hábitats similares (Pérez-Guzmán *et al.*, 2015).

En cuanto a estudios realizados con venenos de híbridos para México, (Roldán-Padrón *et al.* (2010) analizaron las actividades proteolíticas del veneno de *Crotalus aquilus* y *Crotalus polystictus* en Querétaro. Encontraron que existe una variación en el bandeo de proteínas así como en actividad proteolítica, tanto entre organismos parentales *C. aquilus* y *C. polystictus*, como entre ejemplares híbridos. Los valores de actividad proteolítica que poseen los híbridos son mayores en relación a las especies parentales.

Para el estado de Aguascalientes, Rivas-Mercado (2014) realizó un estudio donde se tomaron ejemplares de poblaciones de *Crotalus aquilus*, *Crotalus lepidus klauberi* y *Crotalus lepidus x aquilus*. El veneno de *C. lepidus klauberi* tiene un valor mayor de potencia letal (expresado como dosis letal media) que el de *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus*. El autor sugiere que este grado de letalidad se debe a la presencia de crotoxina, estimada en un valor de 10.8% del total de veneno.

Con base en lo reportado por Rivas-Mercado (2014), el presente proyecto pretende comparar la composición bioquímica y las actividades biológicas de los venenos de poblaciones de *Crotalus aquilus* y *Crotalus lepidus klauberi*, comparándolas con la población intermedia *Crotalus lepidus x aquilus*, estudiando ejemplares capturados en vida libre.

3. JUSTIFICACIÓN

Aunque existen referencias sobre la capacidad de hibridación entre diferentes especies de serpientes de cascabel, es relativamente poco el conocimiento que se ha desarrollado sobre el efecto que tiene este fenómeno en la composición biológica y bioquímica de los venenos. Los resultados de este proyecto pueden tener implicaciones en áreas ecológicas, evolutivas, bioquímicas y médicas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Comparar la composición bioquímica y las actividades biológicas de los venenos de las poblaciones de *Crotalus aquilus*, *Crotalus lepidus klauberi* con aquellas de la población intermedia de *Crotalus lepidus x aquilus* en Aguascalientes.

4.2 Objetivos particulares

- Obtener muestras de veneno de ejemplares de las poblaciones de *Crotalus aquilus*, *Crotalus lepidus klauberi* así como de la población intermedia *Crotalus lepidus x aquilus*.
- Obtener la cuantificación proteica y describir el perfil electroforético de los venenos de las poblaciones bajo estudio, así como de la población intermedia.
- Determinar y comprar la potencia letal en roedores de los venenos bajo estudio.
- Observar, describir y comprar la signología ocasionada por los venenos bajo estudio en roedores.
- Determinar y comprar la actividad hemorrágica de los venenos en roedores.

5. HIPÓTESIS

Dado que Rivas Mercado (2014) encontró diferencias entre la bioquímica de los venenos de *Crotalus aquilus*, *Crotalus lepidus klauberi* y de la población intermedia de *Crotalus lepidus x aquilus*, esperamos que:

Los venenos de las poblaciones de *C. aquilus*, *C. lepidus klauberi* y *C. lepidus x aquilus* mostrarán diferencias cualitativas y cuantitativas en perfil electroforético y en las actividades biológicas.

6. MATERIALES Y MÉTODO

6.1 Recolecta de ejemplares

Para la recolección científica de los ejemplares se solicitó el permiso a la Dirección General de Vida Silvestre (DGVS), Dependencia descentralizada de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), mediante los Oficios Núm. SGPA/DGVS/05143/14 y SGPA/DGVS/03079/16. Se realizaron recorridos semanales de aproximadamente cinco horas al día con el fin de encontrar cinco individuos de la población intermedia *Crotalus lepidus x aquilus* en el municipio del Llano en Mesa de las Preñadas, Aguascalientes (Figura 6). Se buscaron los organismos de manera directa levantando rocas, en los caminos, sobre las rocas o bardas, por aproximadamente un mes (junio y julio de 2014). Adicionalmente se capturaron cinco ejemplares de *Crotalus aquilus* en la Sierra de Laurel-Aguascalientes y Tlachihila-Zacatecas y cinco ejemplares de *Crotalus lepidus klauberi* de Mesa Montoro-Aguascalientes y Sierra Fría-Aguascalientes (Figura 5 y 6). Cada ejemplar fue medido en su longitud total (LT) y sexado después de su captura.

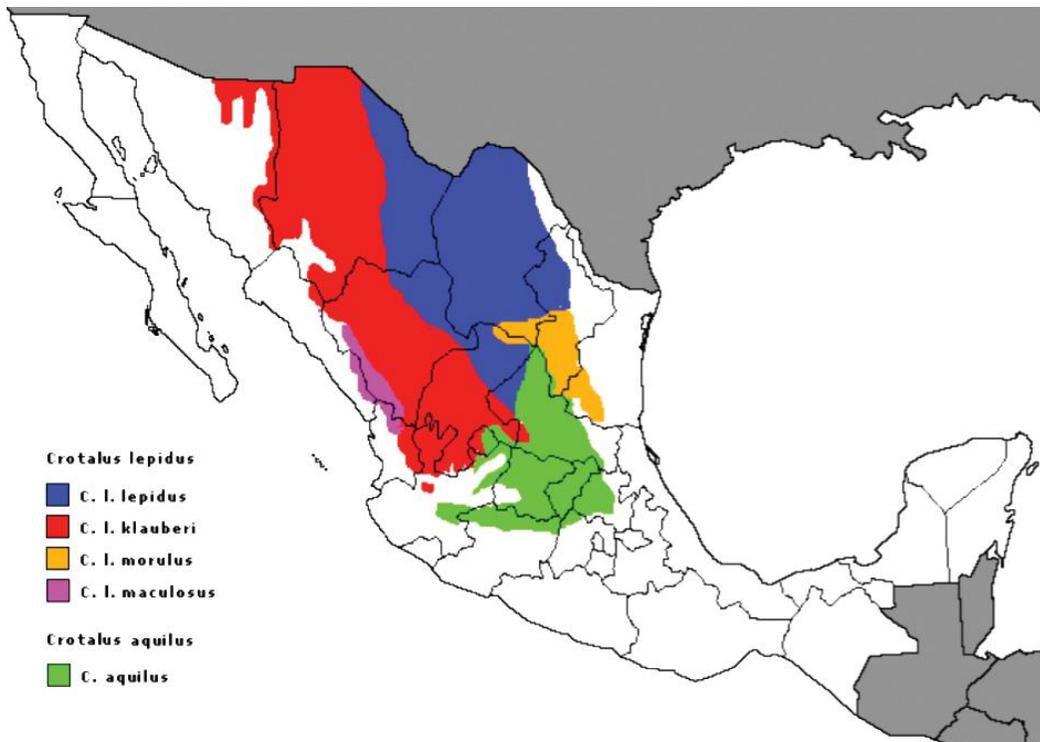


Figura 5. Distribución en México de *Crotalus aquilus* y *Crotalus lepidus* con las diferentes subespecies. Incluyendo *Crotalus lepidus klauberi*.



Figura 6. Zonas de colecta de las poblaciones de *Crotalus aquilus* (Sierra de Laurel y Tlachichila), *Crotalus lepidus klauberi* (Sierra Fria y Mesa Montoro) y de la población intermedia *Crotalus lepidus x aquilus* (Mesa de las Preñadas). Google, INEGI 2016.

6.2 Alojamiento de los organismos en cautiverio

Los 15 organismos fueron trasladados al Bioterio del Instituto de Biología y mantenidos en terrarios individuales con ventilación a una temperatura entre los 26 °C a 30 °C y una humedad relativa no controlada, provista por un recipiente de agua que se cambiaba una vez a la semana. La alimentación consistió de ratones *Mus musculus* de la cepa CD1 de aproximadamente 20-25 g. La higiene de los terrarios se realizó con solución de Hipoclorito de Sodio al 10% y con Virkon S® (DuPont, México) capaz de eliminar bacterias, hongos y virus.

Los roedores que se utilizaron para los experimentos fue la especie *Mus musculus* cepa CD1, un peso de 18 a 20 g de sexo indistinto. Estuvieron alojados en el Bioterio de la Facultad de Ciencias en cajas de acrílico con una cama de viruta de madera, facilitándoseles el acceso a agua (bebedero) y alimento (nutrí cubo) *ad libitum*.

Se mantuvieron a una temperatura entre 20 °C a 25 °C con una humedad relativa de 40% a 70%.

6.3 Tratamiento del veneno

La extracción del veneno se realizó por ordeña directa. El animal se sujetó e inmovilizó, obligándolo a morder un recipiente previamente limpio y estéril. El veneno se recuperó en acetato de amonio 20 mM, pH de 4.7 y se centrifugó a 13,000 rpm por dos minutos. El sobrenadante fue recuperado y almacenado a -70 °C y liofilizado (Carbajal-Saucedo, 2014).

Para realizar cada una de las pruebas se tomaron 3 mg de peso seco de los venenos de cada uno de los individuos, teniendo en cuenta de se contaban con cinco individuos para las poblaciones y se formó un pool (conjunto de veneno de varios individuos) de 15 mg para *Crotalus aquilus*, *Crotalus lepidus klauberi* y de la población intermedia *Crotalus lepidus x aquilus* para realizar los experimentos.

6.4 Cuantificación de concentración proteica

La cuantificación proteica se realizó por medio de un fotómetro utilizando el quipo Thermo Scientific Nanodrop 2000. La concentración final fue calculada por medio del programa NANODROP 2000/2000c, tomando en cuenta que la cuantificación de proteína es mg/mL y la fórmula que realiza el programa es 1 Abs = 1 mg/ mL. Este proceso se realizó con los tres pooles de los venenos bajo estudio (*Crotalus aquilus*, *Crotalus lepidus klauberi* y *Crotalus lepidus x aquilus*), utilizando solución salina isotónica (0.9% NaCl) como blanco (Anexo 1). La espectrofotométrica es una técnica utilizada para conocer la interacción de luz con la materia y se caracteriza por su precisión, las pequeñas cantidades que necesita la prueba y la lectura inmediata de las muestras.

6.5 Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se separaron las proteínas que componen cada uno de los venenos utilizando el método de electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Se hicieron geles al 12.5% de poliacrilamida en los cuales se cargaron con 30 µg de pool

de veneno por carril en condiciones reductoras añadiendo β - mercaptoetanol. La separación se realizó en cámaras modelo mini PROTEAN III (BIO-RAD). La separación de las proteínas de los venenos se realizó a 70 volts durante cuatro horas aproximadamente. Cuando las proteínas fueron separadas, el gel se fijó con metanol 20 mL y ácido acético 5 mL durante 15 minutos. Después se lavó con agua desionizada y se agregó azul de Coomassie para teñir (toda la noche). Ya teñido, el gel fue lavado con agua desionizada para eliminar el exceso de Coomassie. El gel se preservó realizando una técnica de secado con papel celofán dulce (Anexo 2).

La electroforesis en SDS-PAGE es un método en el cual se separan biomoléculas bidimensionalmente en función al peso molecular y dependiendo de su carga bajo la acción de un campo eléctrico. Este proceso es importante en este estudio ya que con base al patrón electroforético de los venenos es posible conocer el peso molecular aproximado de cada una de las bandas en el gel y determinar qué tipo de grupos de proteínas y concentraciones están presentes. Para conocer el peso molecular aproximado de cada una de las bandas proteicas de los pools de veneno de *Crotalus aquilus*, *Crotalus lepidus klauberi* y de la población intermedia *Crotalus lepidus x aquilus* se utilizó el programa ImageJ V. 1.6.0 (Fiji Is Just ImageJ, USA) midiendo la distancia entre cada banda y la banda de 10 KD (banda baja 17) tomando como referente la distancia del cambio del peso molecular medido directamente en el gel. Para calcular el peso molecular de cada banda se usó el peso molecular patrón (MP) con el cual se estimó el peso proteico de cada banda en función de la distancia medida en el gel. Para distinguir la concentración de proteína del gel en cada una de las bandas generadas, se usó el software Adobe® PhotoShop® CS V. 8.0 (Adobe® PhotoShop®, USA), en el cual se midió la cantidad de Rojo en la paleta RGB de cada banda, por ser considerada la más variable sobre G y B. Las diferencias entre el patrón de bandeo proteico y la concentración de proteína por banda por pool se analizaron con la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis en el ambiente R Studio ® V. 3.0.3. (R Studio®, USA).

6.6 Determinación de la letalidad de los venenos

Se determinó por vía intraperitoneal siguiendo la metodología descrita por Theakston y Reid (1983). La dosis letal media (DL50) se define como la cantidad de veneno (μg) necesaria para matar al 50% de una población de animales experimentales. Los animales utilizados fueron roedores de especie *Mus musculus* la cepa CD1 con un peso entre 18 a 20 gramos, sin importar el sexo. Se realizaron alícuotas con veneno activado con Cloruro de Sodio al 0.9% preparadas con un volumen final de 0.2 mL por ratón, administrando distintas cantidades de veneno (μg) en grupos de tres ratones por dosis ($n = 9$). Para este experimento se tuvo un grupo control negativo en el que se inocularon a tres ratones con Cloruro de Sodio al 0.9%, con un volumen final de 0.2 mL (Anexo 3). Los valores de cantidad de veneno de inicio fueron estimados a partir de estudios previos (Rivas Mercado, 2014; Martínez-Romero *et al.*, 2013).

Se administraron las siguientes cantidades de veneno:

Crotalus aquilus: 1.3, 1.6, 2.1, 2.6, 3.6, 4.1, 5, 6 $\mu\text{g/g}$

Crotalus lepidus klauberi: 0.50, 0.84, 1.3, 1.6, 2.6, 3.6 $\mu\text{g/g}$

Crotalus lepidus x aquilus: 1.3, 1.6, 2.6, 3.1, 3.6, 4.1, 4.6 $\mu\text{g/g}$

El porcentaje de mortalidad por dosis en cada grupo fue graficado con una curva dosis-respuesta y los resultados se analizaron con el programa estadístico GraphPad Prism V4.0b (GraphPad, USA) con la cual se obtuvo la dosis media letal. Los patrones de mortalidad por dosis por pool de *Crotalus aquilus*, *Crotalus lepidus klauberi* y de la población intermedia *Crotalus lepidus x aquilus* se analizaron mediante regresión logística para modelar el porcentaje de mortalidad esperado en función del efecto de cada una de las dosis de veneno en (μg) por pool. Una prueba de regresión lineal múltiple se realizó para conocer si existen diferencias entre los patrones dosis/mortalidad entre los pools de venenos, con el programa R Studio® V. 3.0.3. (R Studio®, USA).

6.7 Signología ocasionada por los venenos en roedores

La signología presentada en roedores de la cepa CD1 por acción de los venenos de las poblaciones de *Crotalus aquilus*, *Crotalus lepidus klauberi* y de la población intermedia de *Crotalus lepidus x aquilus*, se observaron durante las pruebas de dosis letal media (DL50). Posteriormente se inocularon dosis elegidas para *C. aquilus*, *C. lepidus klauberi* y *C. lepidus x aquilus* con el fin de conocer los signología ocasionada por el veneno a un sistema biológico. Los datos reportados se tomaron cada hora y se analizaron con una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en el programa estadístico Statistica.

6.8 Determinación de la actividad hemorrágica

Se usó el método descrito por Kondo (1960) modificado por Theakston y Reid (1983), definiendo la dosis mínima hemorrágica (DMH) como la cantidad de veneno (μg) necesaria para producir un halo hemorrágico de 10 mm de diámetro en animales experimentales inyectados en el dorso vía intradérmica, previamente rasurados. Los roedores utilizados fueron de la cepa CD1 con un peso entre 35 a 40 g de sexo indistinto. Se inocularon 3 ratones por dosis de veneno en μg (volumen final de 0.05 mL). Para este experimento se tuvo un grupo control negativo en el que se inocularon a tres ratones con Cloruro de Sodio al 0.9% con un volumen final de 0.05 mL (Anexo 4).

Se administraron las siguientes cantidades de veneno:

Crotalus aquilus: 100, 80, 60, 20, 10, 5, 2 μg

Crotalus lepidus klauberi: 100, 80, 60, 20, 10, 5, 2 μg

Crotalus lepidus x aquilus: 100, 80, 60, 20, 10, 5, 2 μg

Después de tres horas de ser inyectados con diferentes dosis de venenos (μg) se sacrificaron por dislocación cervical, se retiraron las pieles midiéndose con un vernier el largo (diámetro 1) y el ancho (diámetro 2) del halo hemorrágico y se determinó el diámetro hemorrágico siguiendo la fórmula:

$$\text{Diámetro hemorrágico} = (\text{Diámetro 1} + \text{Diámetro 2}) / 2$$

Los resultados obtenidos se analizaron en el programa estadístico GraphPad Prism V4.0b (GraphPad, USA). Para conocer si existen diferencias significativas entre la capacidad hemorrágica del veneno de las poblaciones *Crotalus aquilus*, *Crotalus lepidus klauberi* y la población intermedia *Crotalus lepidus x aquilus* se realizó una prueba de regresión lineal múltiple en el ambiente R Studio ® V. 3.0.3 (R Studio ®, USA). Debido a que no existen estudios previos de capacidad hemorrágica *Crotalus aquilus* y *Crotalus lepidus x aquilus*, se probaron homogéneamente dosis altas a muy bajas en las poblaciones estudiadas.

7. RESULTADOS

7.1 Organismos recolectados y extracción de veneno

En el trabajo en campo se recolectaron un total de 15 ejemplares de serpientes de cascabel de cinco localidades diferentes en época de lluvias con un total de 10 hembras y cinco machos (*Crotalus aquilus* tres ♀ y dos ♂, *Crotalus lepidus klauberi* cuatro ♀ y un ♂ y *Crotalus lepidus x aquilus* tres ♀ y dos ♂). La extracción de los venenos se realizó en dos ocasiones para cada individuo, con el fin de que se obtuviera el suficiente veneno para realizar todas las pruebas correspondientes (Cuadro 1 y Figura 7).

Los ejemplares recolectados proporcionaron distintas cantidades de veneno. Aquellos de talla de 30 cm a 40 cm proporcionaron poco veneno en promedio 1.9 mg, seguido de organismos de 40 cm a 60 cm con una extracción promedio de 9.98 mg y por último ejemplares de 60 cm a 70 cm en los que se obtuvo 27.6 mg en promedio de peso seco. El ejemplar que proporcionó menor cantidad de veneno fue C.aqui♀ZAC1 de 38 cm proveyendo 0.9 mg de veneno de peso seco. Hubo ejemplares de *Crotalus aquilus* (C.aqui♀SLR) y *Crotalus lepidus x aquilus* (Int♀MP1) que no proporcionaron veneno en alguna de las extracciones.

Las cantidades de veneno en peso seco, obtenidas en ejemplares de distintas tallas se muestran en la Figura 7. Se observa que la cantidad de veneno varía de manera positiva, exponencialmente de acuerdo al tamaño del organismo ($R^2 = 0.63614$; $p = 0.0003680$).

Cuadro 1. Datos de los ejemplares colectados en los meses de junio y julio de 2014. Abreviaturas: LT, longitud total; PSV, Peso seco del veneno.

Población	ID del ejemplar	Localidad	LT (cm)	Peso (g)	PSV primera extracción (mg)	PSV segunda extracción (mg)
C. aquilus	C.aqui♀SLR	Sierra de Laurel	58	114.7	0	4
	C.aqui♀ZAC1	Tlachichila	38.0	40.7	2.9	0.9
	C.aqui♀ZAC2	Tlachichila	43.0	56.7	4.6	5.5
	C.aqui♂SLE	Sierra de Laurel	54.5	58.7	15.4	26.1
	C.aqui♂ZAC1	Tlachichila	54.5	103.7	25	11.7

<i>C. lepidus klauberi</i>	C.lep♀MM1	Mesa Montoro	52.0	88.7	9.1	9.7
	C.lep♀SF2	Sierra Fría	42.0	37.2	5.4	4
	C.lep♀SF3	Sierra Fría	40.5	30.2	11.6	17
	C.lep♀MM4	Mesa Montoro	44.0	78.7	14.4	9.1
	C.lep♂MM1	Mesa Montoro	45.0	47.7	5.1	1.6
<i>C. lepidus x aquilus</i>	Int♀MP1	Mesa de las Preñadas	45.0	32.7	0	3
	Int♀MP2	Mesa de las Preñadas	49.5	62.2	8.9	9
	Int♀MP3	Mesa de las Preñadas	49.0	52.2	11.2	14
	Int♂MP1	Mesa de las Preñadas	62.0	132.7	33.1	15.4
	Int♂MP2	Mesa de las Preñadas	72.0	196.4	20.1	41.8

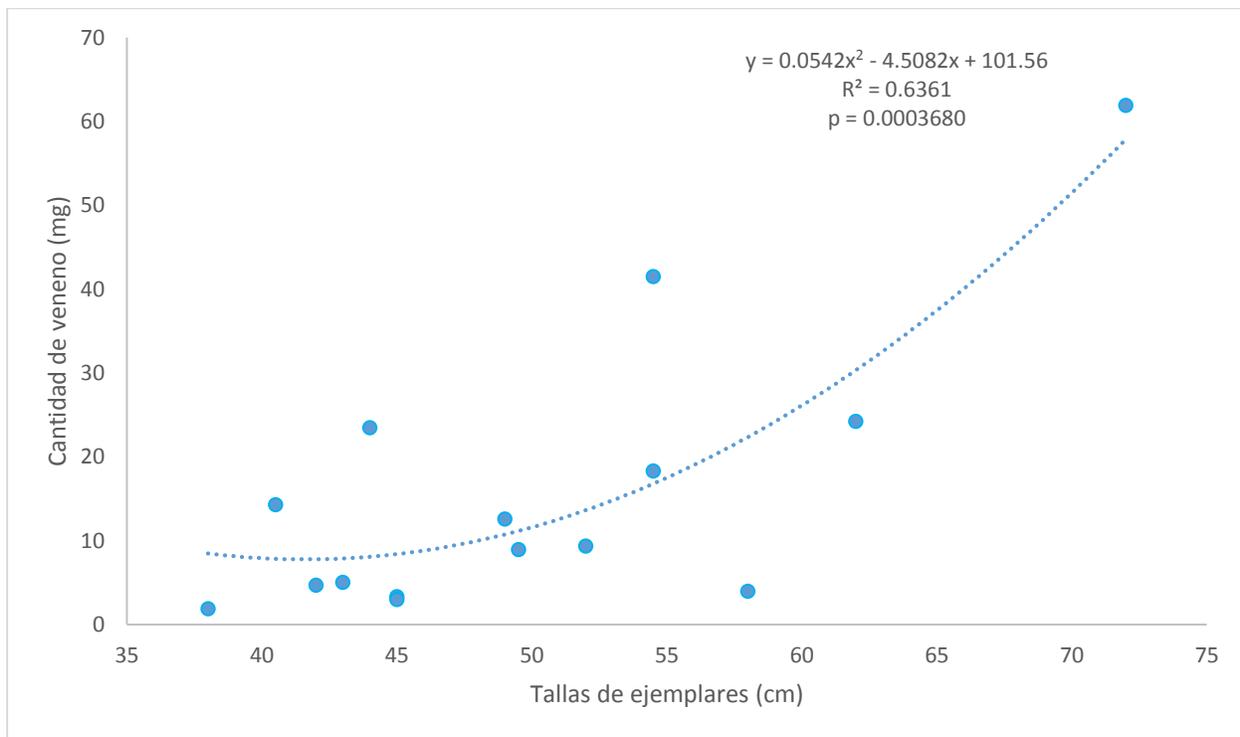


Figura 7. Cantidad de veneno en mg obtenida en las extracciones de los ejemplares del género *Crotalus* en relación con la talla en cm ($R^2 = 0.6361$; $p = 0.0003680$).

7.2 Cuantificación de proteína por A 280 nm

En la Figura 8 se observan la absorbancia A 280 del peso seco de cada uno de los pools de veneno de la poblaciones de *C. aquilus*, *C. lepidus klauberi* y *C. lepidus x aquilus* que ayudó a estandarizar la concentración proteica de cada pool de veneno para obtener el perfil proteico de los venenos por SDS-PAGE (Cuadro 2).

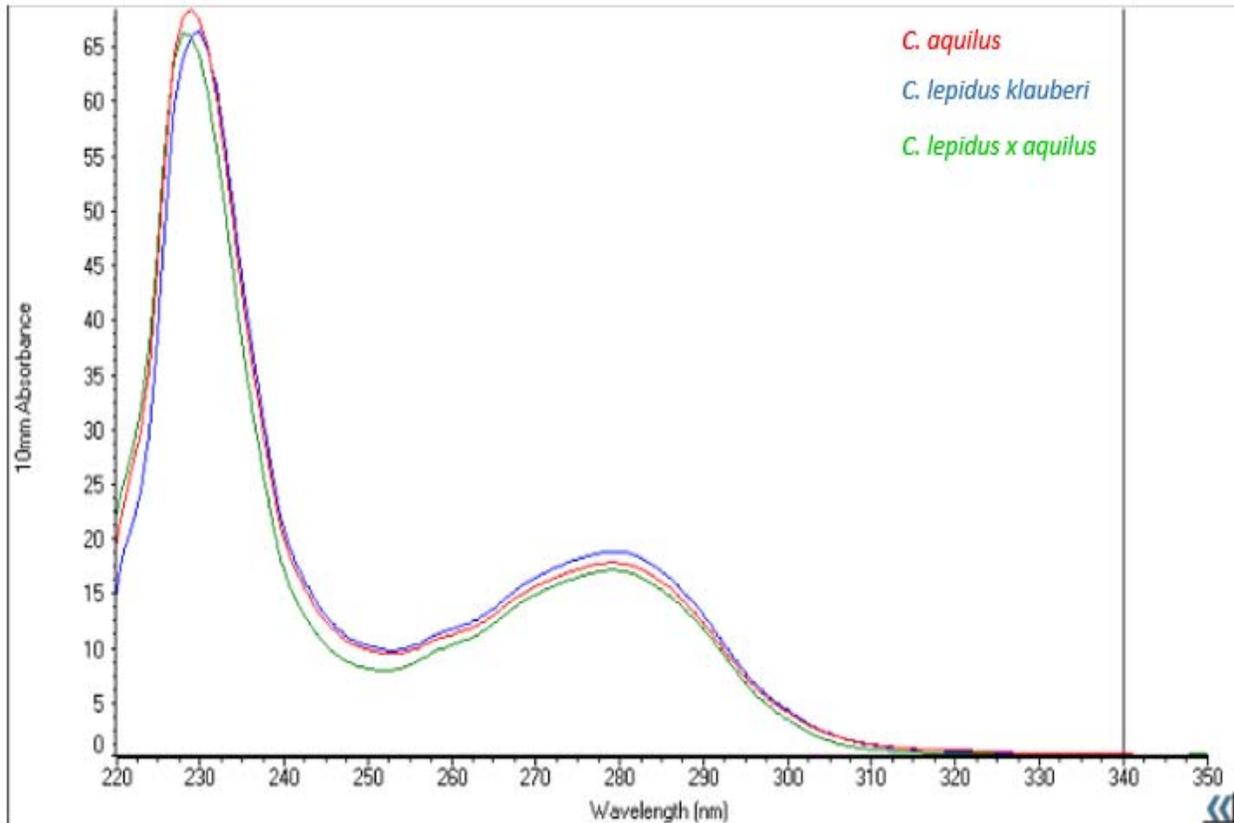


Figura 8. Cuantificación de proteína de los tres pool de venenos de *Crotalus* A 280 nm en el equipo Thermo SCIENTIFIC NANODROP 2000 con el programa NANODROP 2000/2000c, cargando 2 μ l de veneno previamente liofilizado y reconstituido con 100 μ l de solución salina.

Cuadro 2. Cuantificación de los pool de veneno de cascabeles A 280 nm por mg/mL. De los cuales se tomaron 30 μ g para hacer el perfil electroforético.

#	ID	Concentración de proteína	Unidad
1	<i>C. aquilus</i>	18.576	mg/mL
2	<i>C. lepidus klauberi</i>	16.868	mg/mL
3	<i>C. lepidus x aquilus</i>	17.557	mg/mL

7.3 Comparación del perfil proteico de los venenos por SDS-PAGE

Los perfiles en gel de poliacrilamida pueden observarse en la Figura 9. El veneno de *C. aquilus* presenta bandas muy intensas entre los 25 y 20 kDa y bandas de menor intensidad en 75, 50 y 15 kDa. Bandas muy tenues pueden observarse en los 37 y 30 kDa. Por otro lado, el veneno de *C. lepidus klauberi* muestra bandas de fuerte intensidad en los 25 a 20 y 15 kDa, bandas de menor intensidad en los 75 a 37 kDa y bandas muy tenues en los 37 a 26 kDa. Por último, el veneno de la población intermedia *C. lepidus x aquilus* muestra bandas de gran intensidad en 25 y 20 kDa, bandas de menor intensidad en los 75 a 50 y 15 kDa y bandas muy tenues en 37 a 26 kDa.

El perfil electroforético muestra que en los 25 y 20 kDa son muy similares (bandas muy intensas) Figura 9, *C. aquilus* presenta una banda (22.42 kDa), *C. lepidus klauberi* se observa una banda (22.54 kDa) y por último *C. lepidus x aquilus* dos bandas (21.47 y 22.82 kDa). La diferencia del bandeo se encuentra entre los 15 kDa, para *C. lepidus klauberi* son dos bandas muy intensas (14.03 y 13.45 kDa), *C. lepidus x aquilus* presenta bandas de menor intensidad (14.80, 13.54 y 12.63 kDa) y *C. aquilus* con bandas muy tenues (14.48, 14.35, 13.52 y 12.78 kDa). Es interesante notar que las diferencias más evidentes del bandeo se observan en la sección de los pesos moleculares bajos (15 kDa) y para los pesos de 90 a 20 kDa el bandeo es similar con algunas diferencias de intensidad (*C. lepidus klauberi*).

En la Figura 10 se observan las bandas proteicas con el peso molecular en (kDa) para cada una de las proteínas de *C. aquilus*, *C. lepidus klauberi* y *C. lepidus x aquilus*. Para *C. aquilus* presenta bandas proteicas que van de 75.5 a los 12.78 kDa, en *C. lepidus klauberi* se pueden observar proteínas que van de los 90.35 a 10.68 kDa y por último *C. lepidus x aquilus* con bandas proteicas de 69.01 a 10.54 kDa (Cuadro 3).

Para la prueba de concentración proteica en R de RGB, las bandas proteicas que se muestran con mayor concentración son entre los pesos 25 a 20 kDa (*C. aquilus* R = 15.66, *C. lepidus klauberi* R = 16.66 y *C. lepidus x aquilus* R = 12.33) y las bandas de proteínas con menor concentración están entre los pesos de 70 a 90 kDa (*C. aquilus* R = 194.66, *C. lepidus klauberi* R = 109.33 y *C. lepidus x aquilus* R = 99) (Figura 11 y Cuadro 4).

Las pruebas estadísticas no muestran diferencias en la estructura de los pesos moleculares entre los pools ($p = 0.6552$), ni en la concentración proteica estimada a partir del análisis de R de RGB ($p = 0.2225$), Figura 10 y 11.

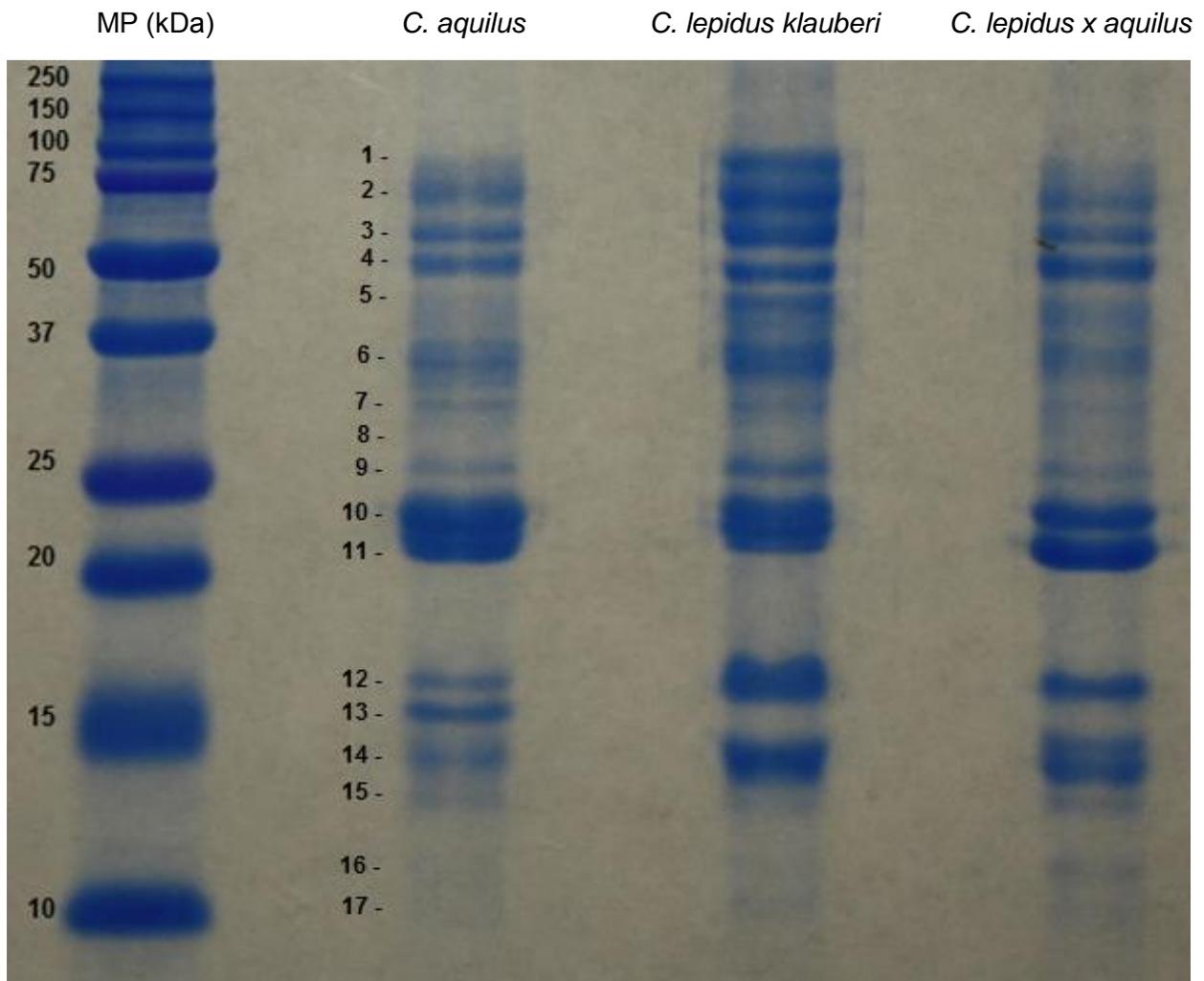


Figura 9. Perfil electroforético de *C. aquilus*, *C. lepidus klauberi* y *C. lepidus x aquilus*). SDS-PAGE al 12.5% de poliacrilamida, en condiciones reductoras, 30 μ g de veneno por carril. MP (peso molecular en kDa). Los números de la segunda columna indican la banda proteica para los tres pools de veneno. Precision Plus Protein™ Standards; BIO-RAD.

Cuadro 3. Peso molecular (kDa) para cada una de las bandas proteicas encontradas de los pools de veneno de *C. aquilus*, *C. lepidus klauberi* y *C. lepidus x aquilus* estimados a partir de la Figura 9 en el programa ImageJ.

Número de banda proteica	<i>C. aquilus</i> Peso en kDa	<i>C. lepidus klauberi</i> Peso en kDa	<i>C. lepidus x aquilus</i> Peso en kDa
1	0	90.35	0
2	75.5	71.33	69.01
3	52.78	52.78	52.31
4	45.74	44.47	45.74
5	0	38.90	37.47
6	33.39	33.14	33.72
7	29.40	29.23	29.07
8	0	0	26.99
9	24.49	24.40	24.33
10	22.42	22.54	22.82
11	0	0	21.47
12	14.48	14.03	14.80
13	14.35	0	0
14	13.52	13.45	13.54
15	12.78	0	12.63
16	0	11.35	11.28
17	0	10.68	10.54

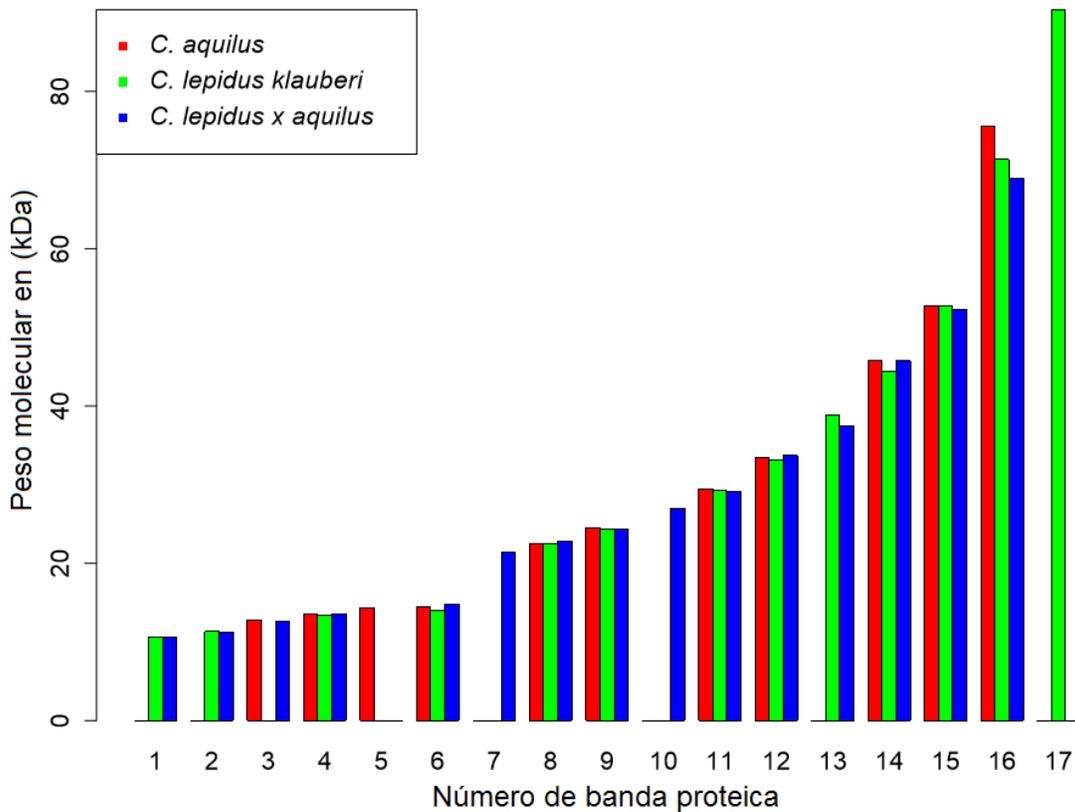


Figura 10. Prueba de Kruskal-Wallis ($p = 0.6552$) para el peso molecular en (kDa) para el patrón de bandeado proteico encontrado de los pools de veneno de *C. aquilus*, *C. lepidus klauberi* y *C. lepidus x aquilus* obtenidas en el programa estadístico R Studio ®.

Cuadro 4. Bandas proteicas y concentraciones de proteína estimada por el promedio de R de RGB obtenidas en Adobe® PhotoShop® CS a partir de la Figura 9.

Número de banda	<i>C.aquilus</i>	<i>C. lepidus klauberi</i>	<i>C. lepidus x aquilus</i>
1	0	25.33	0
2	68.66	22.33	50
3	53.33	23.66	64.33
4	51.66	23	29.66
5	0	37	64.33
6	64	27.66	55.66
7	68	66	86.66
8	0	0	95
9	90	53	76.33
10	15.66	16.66	21.33
11	0	0	12.33
12	63	22.66	29.66
13	46	0	0
14	63.33	16.66	28
15	94.66	0	78.33
16	0	109.33	93.33
17	0	103.33	99

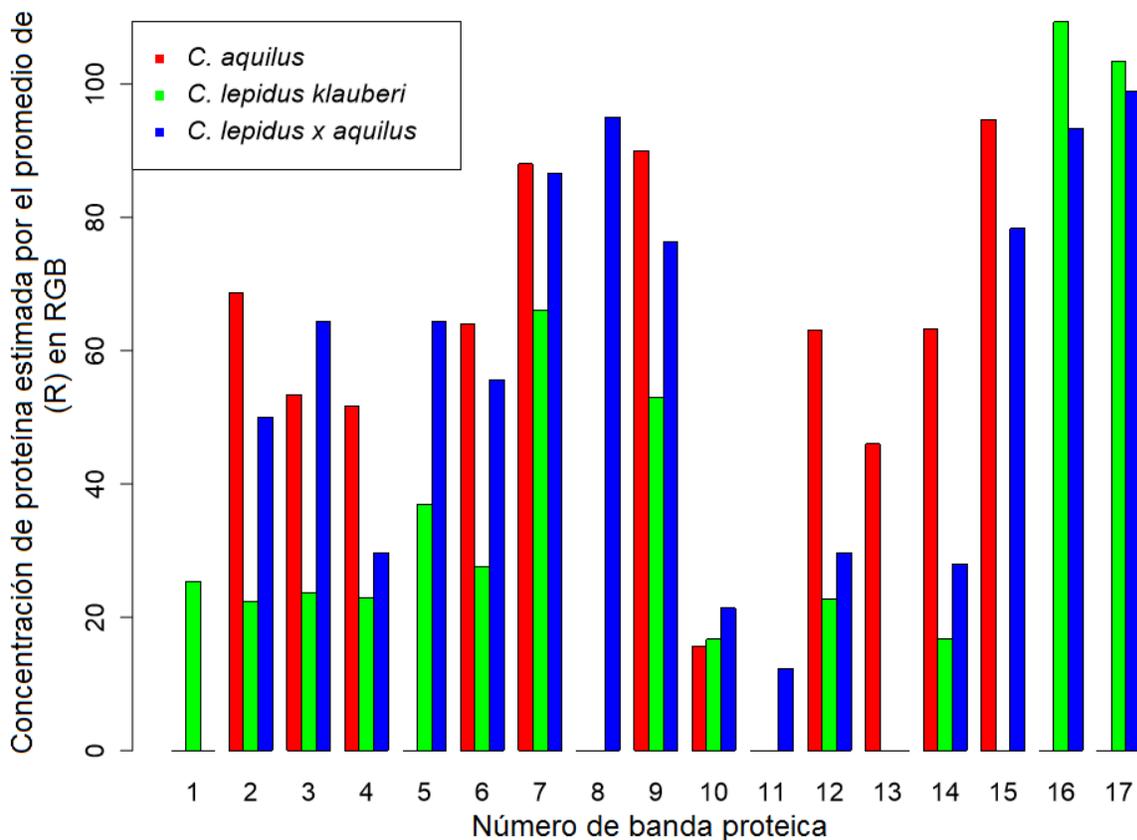


Figura 11. Prueba de Kruskal-Wallis ($p = 0.2225$) para las banda con concentraciones de proteína estimada por el promedio de R en RGB de Adobe® PhotoShop® CS para los tres pools de *C. aquilus*, *C. lepidus klauberi* y *C. lepidus x aquilus* obtenidas en el programa estadístico R Studio®.

7.4 Potencia letal de los venenos

El potencial letal se define como la cantidad de veneno (μg) necesaria para matar al 50% de una población de animales experimentales, en este experimento se utilizaron roedores de la cepa CD1, como se plantea en la sección 6.6. El veneno de *Crotalus lepidus klauberi* resultó ser el más letal, con una DL50 de 1.320 μg de ratón, siendo este veneno tres veces más potente que los venenos de *C. aquilus* y *Crotalus lepidus x aquilus*. El veneno con menor potencial letal fue el de la población intermedia *Crotalus lepidus x aquilus* con una letalidad de 3.585 μg de ratón, resultando ser el menos letal y por último *C. aquilus* presenta una letalidad de 3.181 μg de ratón, es similar a la de *Crotalus lepidus x aquilus* (Figura 12; Cuadro 5).

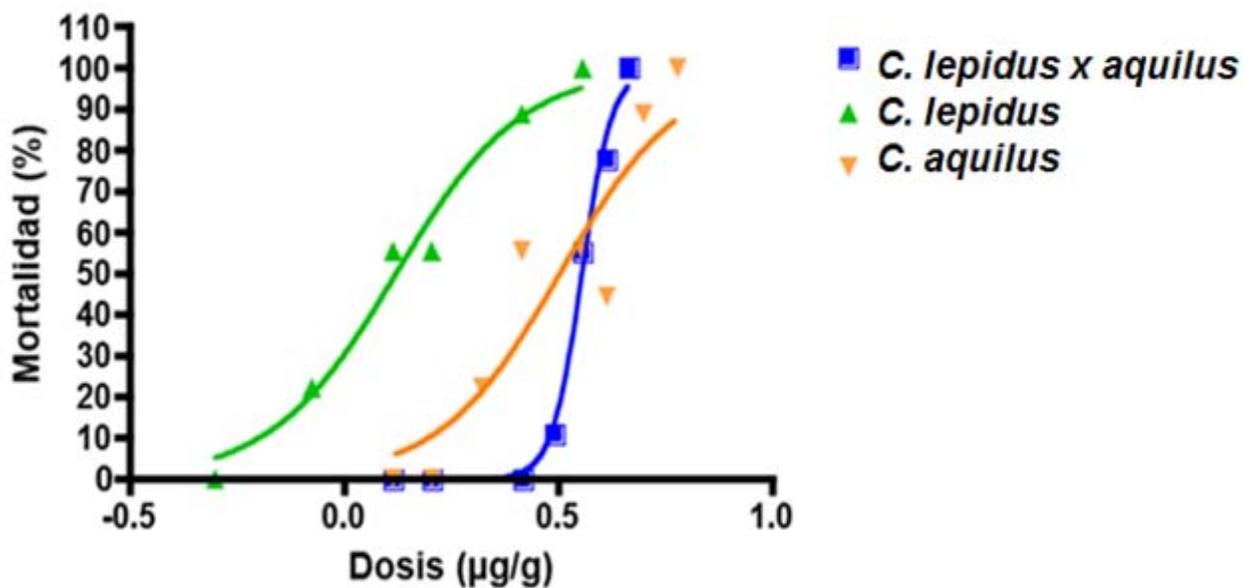


Figura 12. Dosis media letal por pool de veneno, con una $n = 9$. Las muertes fueron registradas a las 24 horas para los tres pooles de veneno. En el programa estadístico GraphPad Prism.

Cuadro 5. Determinación de DL50 del venenos de *C. aquilus*, *C. lepidus klauberi* y *C. lepidus x aquilus* administrado vía intraperitoneal según las estimaciones en GraphPad Prism. Los valores de DL50 μ /ratón se reportan para hacer comparable nuestro estudio con otros. Los valores menores son lo que presentan una mayor letalidad.

Espece	DL50 μ /g de ratón	DL50 μ /ratón	Intervalo de confianza 95%	R ²
<i>Crotalus aquilus</i>	3.181	60.43	2.477 a 4.087	0.8557
<i>Crotalus lepidus klauberi</i>	1.320	25.08	1.133 a 1.538	0.9768
<i>Crotalus lepidus x aquilus</i>	3.585	68.11	3.485 a 3.688	0.9917

El comportamiento de la curva del veneno de *C. lepidus klauberi* no se traslapa con las curvas de *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus* pero tiene una pendiente similar a la de *C. aquilus* (Figura 12), lo que indica que se diferencia entre la dosis mínima de acción letal y la dosis en la que muere el 100% de los ratones es similar en ambos casos, pero la dosis mínima letal es mayor en *C. lepidus klauberi*. La curva del veneno de la población intermedia de *C. lepidus x aquilus* tiene una pendiente mucho mayor, lo que indica que a la dosis mínima letal y la dosis a la que muere el 100% de los ratones es muy similar para esta población. Sin embargo, la dosis media letal de *C. lepidus x aquilus* es menor que en *C. aquilus* y *C. lepidus klauberi*.

En las Figuras 13, 14 y 15 se observan los modelos de mortalidad dosis-porcentaje de mortalidad de *C. aquilus*, *C. lepidus klauberi* y *C. lepidus x aquilus* estimados a partir de n = 9 repeticiones por dosis. Existen diferencias significativas entre la letalidad de los venenos de las poblaciones *C. aquilus*, *C. lepidus klauberi* y de la población *C. lepidus x aquilus* (p = 0.001996).

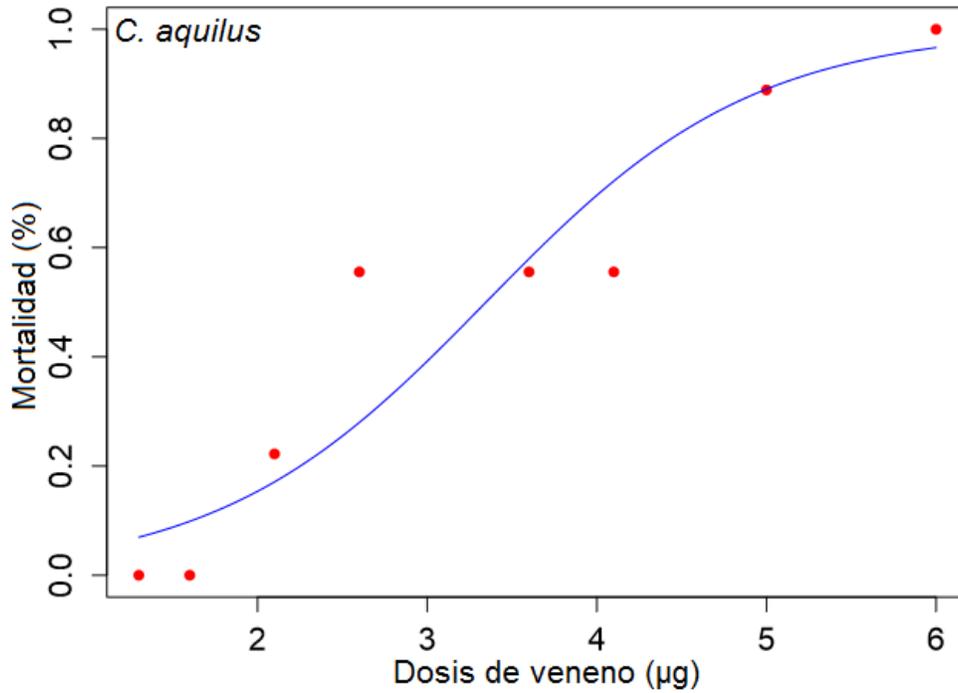


Figura 13. Modelo de regresión logística para el pool de veneno de *C. aquilus*. Obtenido en el programa estadístico R Studio®.

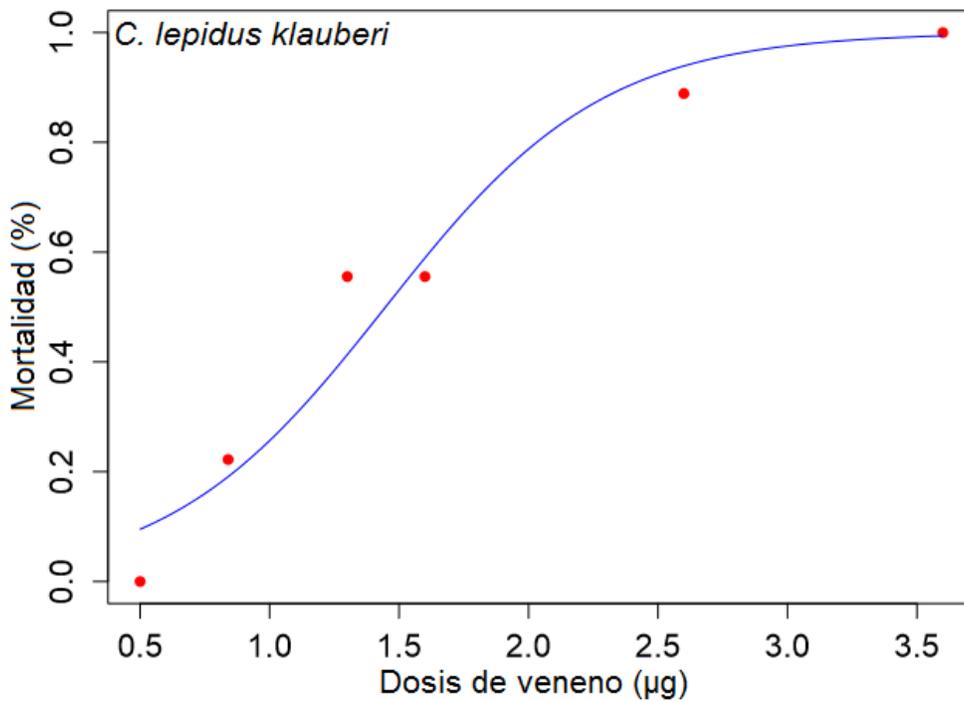


Figura 14. Modelo de regresión logística para el pool de veneno de *C. lepidus klauberi*. Obtenido en el programa estadístico R Studio®.

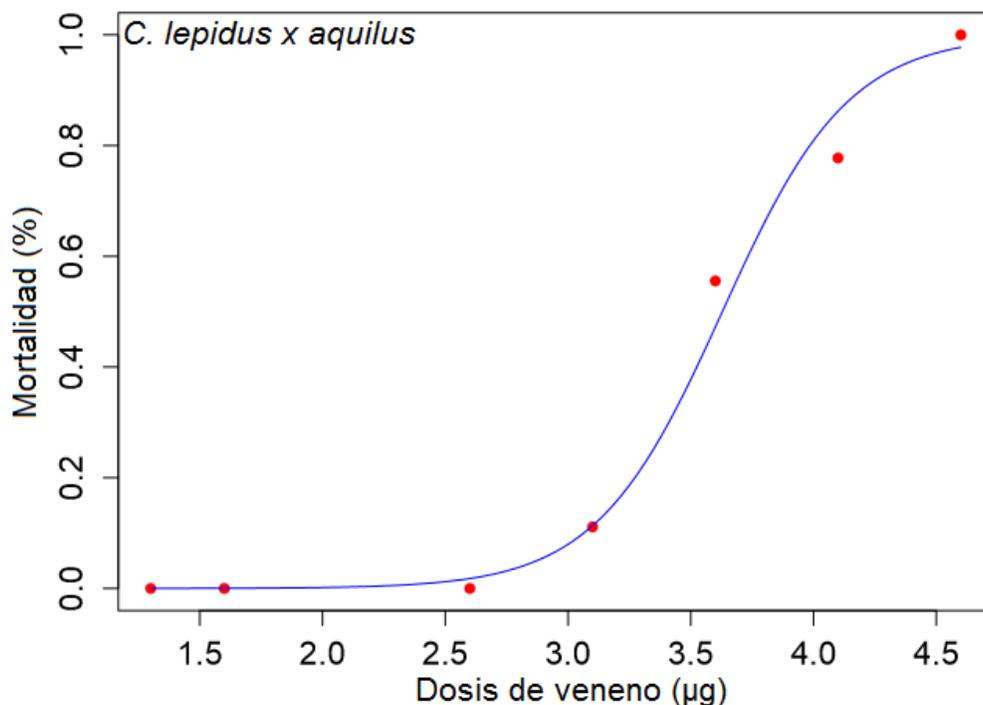


Figura 15. Modelo de regresión logística para el pool de veneno de *C. lepidus x aquilus* obtenido en el programa estadístico R Studio®.

7.5 Signología ocasionada por los venenos en roedores

a) *Crotalus aquilus* dosis 5 µg/g

En las primeras dos horas la actividad fue baja para los organismos. Se encontraron quietos y no presentaron síntomas de envenenamiento. Alrededor de las cuatro horas de la inoculación se observó cambio en la coloración en el lugar de la inyección en el vientre de tonos rosados a un tono negruzco. Después de las cinco a seis horas los ratones se notaron agitados y mostraron evidencia de pérdida de fuerza en el cuerpo, lentitud y torpeza en el movimiento y sin coordinación. El color negruzco en el vientre empezó a ser más evidente y a extenderse hacia órganos reproductores. En las últimas horas 12 a 14 la movilidad del cuerpo fue casi nula, se mantuvieron quietos en un rincón sin desplazamiento en el área y mueren. En algunos de los ratones inoculados se presentó sangrado nasal a partir de las ocho horas.

b) *Crotalus lepidus klauberi* dosis 2.6 µg/g

En las primeras dos horas de la inoculación los organismos no presentan síntomas inmediatos de envenenamiento y se encontraron interactuando con los demás individuos y desplazándose en gran parte del encierro. Tres horas después de la inyección empezaron con problemas respiratorios evidentes, afectación en la coordinación y leve pérdida de fuerza en las patas traseras. A las seis a ocho horas estos problemas se agravaron mostrándose menor coordinación, flacidez en las patas traseras con pérdida de fuerza y desplazamiento arrastrándose solo con las patas delanteras. Se observó un cambio de colocación de rosa a negruzco en la zona de la inyección. De las 10 a 12 horas la parálisis de patas traseras fue total. Tomaron bocanadas de aire bruscamente antes de fallecer.

c) *Crotalus lepidus x aquilus* dosis 4.1 µg/g

En las primeras tres horas no se presentaron síntomas de envenenamiento pero los ratones empezaron con estiramientos. Después de cuatro horas mostraron un poco de agitación respirando rápido y desplazándose de un lado a otro. De las ocho a las 10 horas presentaron movimientos lentos y descoordinados, con a una etapa sin actividad evitando caminar, brincar e interactuar. Se notó un cambio de coloración de rosa a negruzca en la zona de la inyección en el vientre. De las 12 a 14 horas la actividad motora fue muy baja, no presentan movimientos en las patas traseras ni en las patas delanteras, se aíslan de los demás ratones y la respiración fue lenta hasta el fallecimiento.

La signología provocada por los venenos de *C. aquilus*, *C. lepidus klauberi* y *C. lepidus x aquilus* se tipifica y se resume en Cuadro 6. La prueba estadística Kruskal-Wallis indica que no se encontraron diferencias significativas en el la signología de los roedores causado por el venenos de *C. aquilus*, *C. lepidus klauberi* y de la población intermedia *C. lepidus x aquilus* ($p = 0.4677$; Cuadro 7).

Cuadro 6. Daños en los roedores. 0 (sin daño), 1 (daño menor), 2 (daño), 3 (daño intenso). Se hicieron disecciones de los ratones de las pruebas de DL50 y se comparó con ratones sanos (no fueron inoculado con veneno).

Sintomatología	<i>C. aquilus</i>	<i>C. lepidus klauberi</i>	<i>C. lepidus x aquilus</i>
Ataxia	2	2	2
Contracciones musculares	2	2	2
Movimiento lentos	2	2	2
Hemorragias difusas (en sistema digestivo)	2	1	1
Color negruzco en la zona de la inyección	3	1	2
Color negruzco en aparato reproductor (testículos)	2	0	1
Órganos agrandados	2	2	2
Parálisis flácida parcial (patas traseras)	0	3	0

Cuadro 7. Prueba de Kruskal-Wallis. p= 0.4677 en el programa estadístico Statistica.

Daños	<i>C. aquilus</i>	<i>C. lepidus klauberi</i>	<i>C. lepidus x aquilus</i>
<i>C. aquilus</i>			
<i>C. lepidus klauberi</i>	1.000000		
<i>C. lepidus x aquilus</i>	0.866533	1.000000	

7.6 Hemorragias producidas por los venenos por vía intradérmica

La dosis Mínima Hemorrágica (DMH) se define como la cantidad de veneno en (μg) necesaria para producir un halo hemorrágico de 10 mm en animales experimentales de la cepa CD1 inyectados en el dorso vía intradérmica. Después de tres horas de ser inyectados con diferentes dosis de venenos (μg) se sacrificaron con el fin de medir con un vernier el halo hemorrágico generado por las dosis de veneno, como se describe en la sección 6.8.

Las serpientes de cascabel (*Crotalus aquilus*, *Crotalus lepidus klauberi* y *Crotalus lepidus x aquilus*) presentan actividad hemorrágica, el veneno que resultó tener mayor capacidad hemorrágica fue el de *Crotalus aquilus* con 8.35 μg ; seguido de *Crotalus*

lepidus klauberi 9.18 μg y por último *Crotalus lepidus x aquilus* la menor capacidad hemorrágica con 12.5 μg (Figura 16; Cuadros 8 y 9).

La capacidad hemorrágica provocada por el veneno (μg) de *Crotalus aquilus* y *Crotalus lepidus x aquilus* muestran que a mayor cantidad de veneno inoculado la hemorragia es mucho mayor, a diferencia de *Crotalus lepidus klauberi* que a mayor cantidad de veneno la hemorragia se mantiene (Figura 16). En *Crotalus aquilus* se observó que la hemorragia adquirió un color rojizo con mayor intensidad en los 100 μg , 80 μg y 60 μg a diferencia de los otros dos venenos (Cuadro 9).

En el análisis estadístico de regresión lineal múltiple mostró que existen diferencias de la capacidad hemorrágica para cada uno de los venenos de las serpientes de cascabel de montaña ($p = 0.00707$).

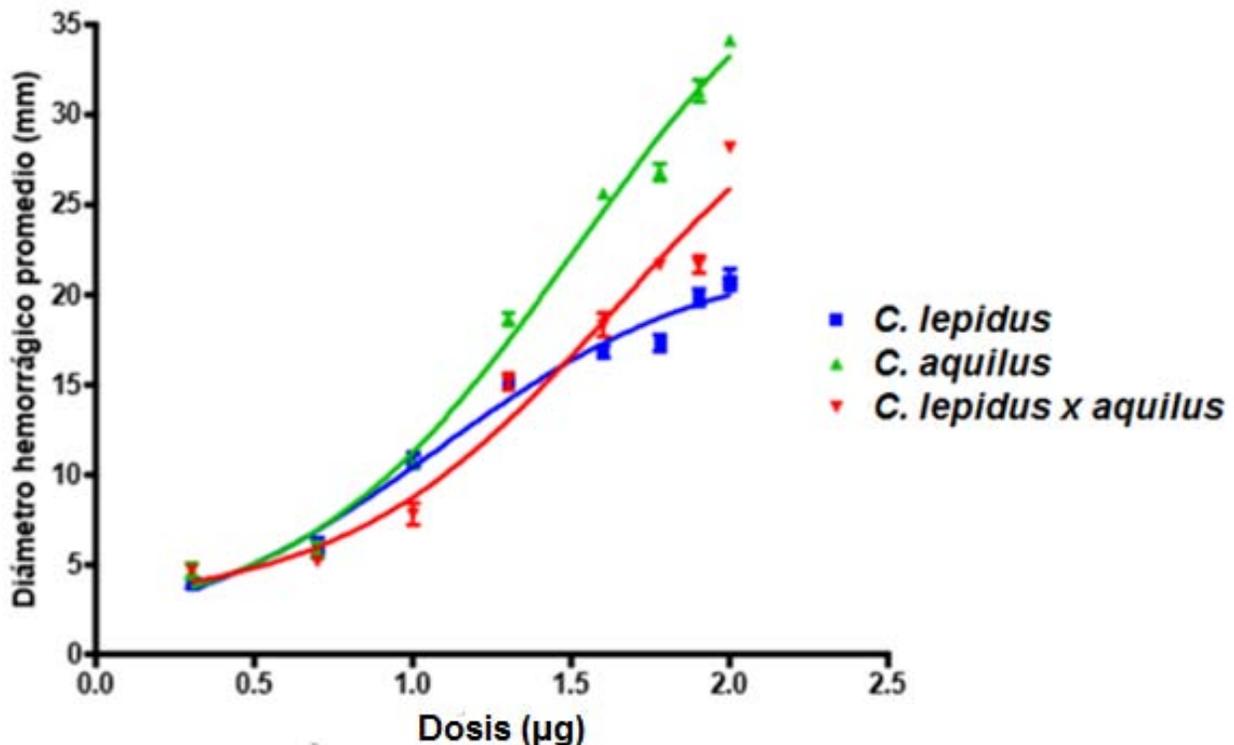
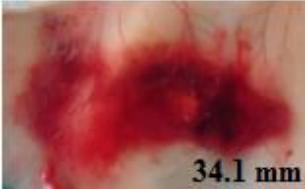
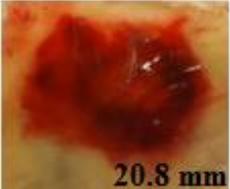
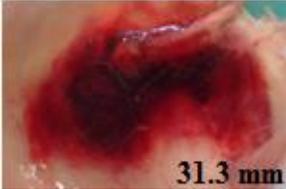
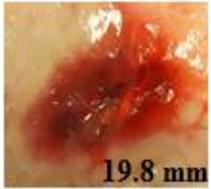
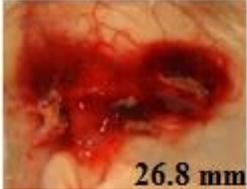
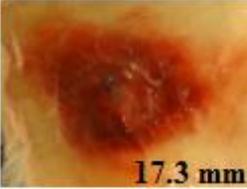


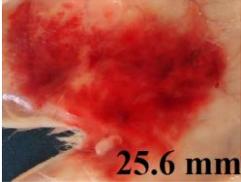
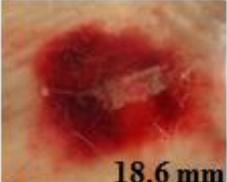
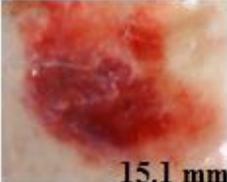
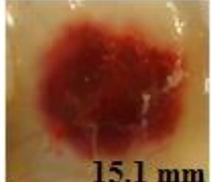
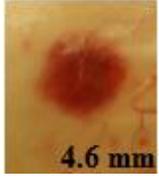
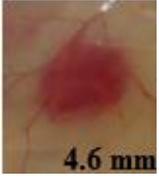
Figura 16. Capacidad hemorrágica por pool de veneno de cascabel a tres horas de la inoculación a diferentes dosis obtenidas en el programa estadístico GraphPad Prism.

Cuadro 8. Determinación de la Dosis Mínima Hemorrágica de *C. aquilus*, *C. lepidus klauberi* y *C. lepidus x aquilus* obtenida en GraphPad Prism a partir de halos hemorrágicos de 10 mm de diámetro por inyección de veneno vía intradérmica a diferentes dosis. Los valores menores son lo que presentan una mayor capacidad hemorrágica.

Especie	DMH μg	Desv. Est.
<i>Crotalus aquilus</i>	8.35	0.021
<i>Crotalus lepidus klauberi</i>	9.18	0.016
<i>Crotalus lepidus x aquilus</i>	12.5	0.041

Cuadro 9. Halos hemorrágicos de *C. aquilus*, *C. lepidus klauberi* y *C. lepidus x aquilus* provocados por inyección de veneno a diferentes dosis en μg .

Dosis μg	<i>C. aquilus</i>	<i>C. lepidus klauberi</i>	<i>C. lepidus x aquilus</i>
100	 34.1 mm	 20.8 mm	 28.1 mm
80	 31.3 mm	 19.8 mm	 21.6 mm
60	 26.8 mm	 17.3 mm	 21.6 mm

40	 25.6 mm	 16.8 mm	 18.3 mm
20	 18.6 mm	 15.1 mm	 15.1 mm
10	 10.6 mm	 10.8 mm	 7.8 mm
5	 5.8 mm	 6 mm	 5.1 mm
2	 4.6 mm	 4 mm	 4.6 mm

DISCUSIÓN

Trabajo en campo y extracciones de venenos

Las recolectas realizadas en los meses de junio-julio fueron exitosas al encontrarse individuos de las poblaciones de *Crotalus aquilus* y *Crotalus lepidus klauberi* y la población intermedia *Crotalus lepidus x aquilus*. Con alrededor de 35 horas de búsqueda promedio capturamos los 15 ejemplares requeridos para el estudio. Los encuentros coincidieron con el mapa de distribución de *Crotalus aquilus* y *Crotalus lepidus klauberi* (Campbell y Lamar, 2004; Vázquez y Quintero, 2005). Para la población intermedia de *Crotalus lepidus x aquilus* aún no se conoce con exactitud el área de distribución en el estado de Aguascalientes (Quintero-Díaz com. pers.; Figura 6), pero podría extenderse a otros estados de la República como el norte de Guanajuato, sur de Zacatecas, oeste de San Luis Potosí y este de Jalisco.

Las serpientes de cascabel que dieron menor cantidad de veneno en este estudio fueron *Crotalus aquilus* (C.aqui♀ZAC1, 38.0 cm LT, con 0.9 mg peso seco) y la que proporcionó mayor cantidad fue *Crotalus lepidus x aquilus* (Int♂MP2, 72.0 cm LT, con 41.8 mg). A pesar de que en la literatura se refiere a que hay una relación del tamaño de la serpiente con la cantidad de veneno proporcionada (Klauber, 1956; Mackessy, 1988; Mirtschin *et al.*, 2002; Mackessy *et al.*, 2006). El estudio demuestra que la relación tamaño/cantidad de veneno es exponencial en serpientes de cascabel y no lineal (Figura 7). Se espera que el tamaño de la serpiente esté relacionado al incremento del tamaño de la cabeza que alberga las glándulas venenosas, que de igual manera se espera crezcan proporcionales al tamaño.

En algunas ordeñas de cascabeles de talla pequeña (Bárcenas-Arriaga, 2012) como lo son *Crotalus ravus* se obtuvieron 21.2 mg a 27.7 mg de veneno en peso seco y para *Crotalus polystictus*, que es una de las serpientes que se encuentra distribuida en algunas zonas de muestreo, se puede obtener de 6 mg a 82.9 mg de veneno. Los datos de Bárcenas-Arriaga (2012) difieren con los obtenidos en este estudio, como en el caso de la población intermedia *Crotalus lepidus x aquilus* que proporciono de 3 mg a 41.8 mg una baja cantidad.

Se han observado grandes cantidades de veneno en peso seco por extracción en serpientes de cascabel de montaña, Rivas-Mercado (2014) reporta para *Crotalus aquilus* (52 mg con 36 cm LT), *Crotalus lepidus klauberi* (58 mg con 64 cm LT) y *Crotalus lepidus x aquilus* (126 mg con 54 cm LT). Estas grandes cantidades de veneno en peso seco sobrepasan las obtenidas aquí (Figura 7).

Comparación del perfil proteico de los venenos por SDS-PAGE

Los resultados obtenidos con el gel de poliacrilamida son muy similares entre sí y no existen diferencias significativas en peso molecular (kDa) y concentración proteica (Figura 9, 10 y 11). Estos resultados coinciden con la aseveración de Rivas-Mercado (2014) para las mismas serpientes, en donde indica que su composición proteica tiene los componentes característicos de la familia Viperidae. Al igual que Rivas-Mercado (2014), aquí encontramos que el bandeo proteico corresponde a pesos moleculares de las familias de proteínas como: LAAO's, Metaloproteasas PI, PII y PIII, Serino Proteasas, Lectinas Tipo-C, CRiSP's, Fosfolipasas A₂ Grupo II, Nucleasas y Desintegrinas (Figura 9 y Cuadro 3). Mackessy, (2010) por su parte, también mencionó que los venenos comparten muchas similitudes en relación a su composición a nivel de familia Viperidae, como son las toxinas enzimáticas de mayor peso molecular. Todas estas familias de proteínas tienen una función dentro de la mezcla compleja de veneno y pueden variar, o ser más o menos activas dependiendo de distintos factores naturales.

Las Metaloproteasas PI que van de los 20 - 24 kDa (Mackessy, 2010) son las responsables de causar hemorragias, mionecrosis y ayudan a la predigestión de la presa (Fox y Serrano, 2005). En el gel de poliacrilamida aquí reportado (Figura 9), estas bandas son grandes y además tienen elevadas concentraciones proteicas (Cuadro 4) y se comparten entre las distintas poblaciones estudiadas.

Martínez-Romero et al. (2013) estudió los venenos de las subespecies de *C. lepidus*. El bandeo proteico de *Crotalus lepidus klauberi* que encontró, es muy similar al aquí reportado y está conformado por algunas familias de proteínas como las Metaloproteasas PI y las Serino Proteasas. En las poblaciones de *Crotalus aquilus* se observaron bandas de varios pesos moleculares entre los 75.5 a los 12.78 kDa coincidiendo con los pesos encontrados por Pérez-Guzmán et al. (2015), que van de los

10 hasta los 66 kDa. Desafortunadamente en ninguno de estos trabajos se reporta el peso molecular estimado de cada banda para definir precisamente que familias de proteínas están involucradas.

Las pruebas estadísticas mostraron que no existen diferencias entre los pesos moleculares (kDa) y las concentraciones proteicas de los pooles entre cada uno de los venenos de las poblaciones de *Crotalus lepidus klauberi*, *Crotalus aquilus* y de la población intermedia *Crotalus lepidus x aquilus*. Para la concentración proteica estimada a partir del análisis de R de RGB, en la sección donde se encontró mayor concentración de proteína fue en los 24 a 20 kDa donde se localizan las Metaloproteasas PI (Mackessy, 2010), una de la funciones de esta familia de proteínas consiste en promover la actividad hemorrágica e involucra alteraciones en la hemostasia.

A pesar de que no existen diferencias estadísticas en el gel, se observan pequeñas variaciones de bandeo en las proteínas de bajo peso molecular de 15 a 10 kDa en los tres pooles. *Crotalus lepidus klauberi* tiene dos bandas grandes visibles que van de los 14.03 a 13.45 kDa, *Crotalus aquilus* y *Crotalus lepidus x aquilus* tienen más bandas más tenues. En esta sección las bandas de *Crotalus aquilus* están a los 14.48, 14.35, 13.52 y 12.78 kDa y las de *Crotalus lepidus x aquilus* a 14.80, 13.54 y 12.63 kDa (Figura 9 y Cuadro 3). En esta sección se encuentran familias de proteínas como lo son las Desintegrinas cuya función es la inhibición de plaquetas y promueven la hemorragia (Calvete *et al.*, 2005).

Potencia letal de los venenos

La letalidad estimada en DL50 para las poblaciones de *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus* es similar (*C. aquilus* = 3.181 µg/g = 60.43 µg/ratón; *C. lepidus x aquilus* = 3.585 µg/g = 68.11 µg/ratón; Cuadro 5) al igual que la signología (Cuadro 6). En la Figura 12, se puede observar que a pesar de que los venenos comparten una DL50 similar, las pendientes de la curva difieren, siendo la dosis letal mínima de *C. lepidus x aquilus* es mayor que la de *C. aquilus*, pero adquiere su potencia máxima con un menor cambio en la dosis. Las letalidades DL50 reportadas por Rivas-Mercado (2014) difieren con los resultados aquí presentados. Mientras *C. aquilus* fue más baja (DL50 = 44.86 µg/ratón),

la población intermedia *C. lepidus x aquilus* fue considerablemente más alta (DL₅₀ = 117.6 µg/ratón). Debido a que es de interés en este estudio conocer el efecto de una mordida natural, se difirió en la vía de administración del veneno que fue intraperitoneal, mientras que Rivas Mercado la aplicó vía intravenosa; y aquí se controló la dosis por µg por gramo de peso de ratón y Rivas-Mercado (2014) por µg/ratón, teniendo un menor control de las dosis aplicadas. La vía de administración es muy importante en el efecto del envenenamiento. La vía intravenosa se incorpora de prisa a torrente sanguíneo y la actividad biológica es rápida, a diferencia de la vía intraperitoneal que tarda en llegar a torrente sanguíneo debido a que pasa distintas barreras biológicas. En las mediciones dos casos parecieran mostrar el patrón esperado de mortalidad. Para *C. aquilus* por vía intraperitoneal muestra una letalidad de 60.43 µg/ratón, mientras que vía intravenosa de 44.86 µg/ratón (Rivas-Mercado, 2014) y para *C. lepidus klauberi*, vía intraperitoneal muestra una letalidad de 25.08 µg/ratón mientras que por vía intravenosa de 12.3 µg/ratón (Rivas-Mercado, 2014) indicando que por vía intraperitoneal se requiere alrededor del doble de la dosis para *C. lepidus* y *C. aquilus*. Sin embargo, *C. lepidus x aquilus* por vía intraperitoneal muestra una letalidad de 68.11 µg/ratón, mientras que vía intravenosa de 117.6 µg/ratón (Rivas-Mercado, 2014). Esto significa que la letalidad es menor por vía intravenosa, lo que es imposible.

Martínez-Romero et al. (2013) estudió el veneno de las subespecies de *C. lepidus* y reportan que *C. lepidus klauberi* presenta una letalidad de 1.5 µg /g a 1.66 µg/g con administración vía intravenosa para ejemplares recolectados en los estados de Aguascalientes, Chihuahua y Zacatecas. Aquí se presentó que *C. lepidus klauberi* recolectado en Mesa Montoro y Sierra Fría, Aguascalientes, fueron las poblaciones con mayor potencial letal con una DL₅₀ de 1.320 µg/g con administración vía peritoneal (Cuadro 5). Las letalidades presentadas en ambos estudios son muy similares, sin embargo, teniendo en cuenta que la vía de administración del veneno las poblaciones de Mesa Montoro y Sierra Fría fue intraperitoneal, se espera que podrían tener un potencial letal mayor que las poblaciones de Chihuahua y Zacatecas. Esta mayor letalidad podría deberse a la presencia de crotoxina en las poblaciones de Aguascalientes de *C. lepidus klauberi*, en la que se reportó un 10.8% de crotoxina para Mesa Montoro (Rivas-Mercado, 2014). En el perfil proteico presentado por Martínez-

Romero et al. (2013) no se menciona la presencia de esta toxina. Es muy probable que podría estar presente en Sierra Fría al igual que Mesa Montoro debido a que el envenenamiento mostró parálisis flácida en patas traseras que indica la presencia de crotoxina. Graham et al. (2007) menciona que existen vipéridos con venenos compuestos por neurotoxinas, como es la crotoxina.

Las regresiones logísticas realizadas (Figuras 13, 14 y 15) muestran que los venenos de *C. aquilus*, *C. lepidus klauberi* y *C. lepidus x aquilus* predicen diferentes tendencias en los patrones de mortalidad (%) por dosis y son diferentes estadísticamente entre ellos ($p = 0.001996$). Esto resulta interesante ya que el perfil electroforético mostró que no existían diferencias importantes entre el bandeo proteico (Figura 9) lo que podría indicar que esas mínimas diferencias en la composición y la concentración proteica es importante. Los modelos de regresión logística podrían ser de utilidad para establecer algunas predicciones de letalidad con otras poblaciones de *C. aquilus*, *C. lepidus klauberi* y *C. lepidus x aquilus*.

Las variaciones que se encontraron en los venenos de las poblaciones de cascabeles estudiadas podría deberse a la alimentación, la distribución y la estacionalidad (Chippaux *et al.*, 1991). También es importante considerar el tipo de inyección aplicada en el experimento. Se sabe que los venenos pueden variar individualmente, incluso en ejemplares de la misma especie o de las mismas poblaciones (Jiménez-Porras, 1970; Chippaux, 1991; Francischetti *et al.*, 2000). También es muy importante las diferentes interacciones tróficas de depredador-presa (Mackessy, 2010) que hacen que el veneno cumpla con su función principal que es la alimentación.

La dieta de *C. lepidus klauberi* está compuesta principalmente de lagartijas del género *Sceloporus* (obs. pers.). Esta preferencia es consistente con la reportada en la literatura (Werler y Dixon, 2002; Ernst y Ernst, 2003; Carbajal-Márquez y Quintero-Díaz, 2015). *C. aquilus* también se alimentan de *Sceloporus* pero incluyen *Gerrhonotus* y ratones pequeños en su dieta (Vázquez y Quintero, 2005). Para la población intermedia *C. lepidus x aquilus* no hay registros de su alimentación en la naturaleza, pero por observaciones en cautiverio, *C. lepidus x aquilus* tienen preferencia por roedores de talla pequeña. Las diferencias entre las dietas podría dirigir la evolución de los venenos

de manera que su función sea óptima de acuerdo a la presa. Benárt-Valle (2011) en experimentos con venenos de coralillos demostró que el veneno inoculado a reptiles presenta un efecto principalmente paralizante y la muertes de los reptiles envenenados es una consecuencia de la parálisis, los reptiles tardan en fallecer a diferencia de los roedores que mueren antes. La preferencia de *C. lepidus klauberi* por las lagartijas explicaría su mayor potencia letal comparado a las otras dos serpientes estudiadas (*C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus*).

Signología ocasionada por los venenos en roedores

Los venenos provocaron efectos tales como decoloración de los tejidos, hemorragias, necrosis de tejido muscular o mionecrosis (Cuadro 6) que son algunas de las manifestaciones clínicas típicas provocadas por envenenamientos por serpientes de la familia Viperidae (Gutiérrez y Lomonte 1989; Gutiérrez *et al.*, 2000; Vázquez y Quintero, 2005; Maruñak *et al.*, 2005). La prueba estadística mostró que no existen diferencias significativas ($p = 0.4677$) en la signología entre las poblaciones de cascabeles estudiadas (Cuadro 7).

A pesar de que no hay diferencias estadísticas en la signología global, hay diferencias en algunos signos importantes. En el caso de *C. aquilus* se observó que los órganos reproductores de los roedores se pusieron de color negruzco, quizá debido a la acción de proteínas como Fosfolipasa A₂, donde esta actividad fue encontrada anteriormente en *C. aquilus* por Pérez-Guzmán *et al.* (2015). Esta Fosfolipasa A₂ provoca mionecrosis, destrucción de eritrocitos e interferencia en la coagulación sanguínea (Ohno *et al.*, 2003). El efecto en *C. lepidus klauberi* y en *C. lepidus x aquilus* también se puede observar este tipo de coloración en la zona de la inyección y conforme pasaron las horas se extendió el color hacia el abdomen. Estos signos también fueron reportados para *C. lepidus klauberi* por Martínez-Romero *et al.* (2013), donde los animales experimentales presentaron mionecrosis.

Los daños ocasionados a los roedores por el veneno de las serpientes se deben a las proteínas o conjunto de proteínas que interactúan en los sistemas del animal para cumplir su función. Las proteínas tienen diferentes efectos dependiendo de la familia. Las LAAO's se producen ampliamente en los venenos de serpiente (Mackessy, 2010) y

tienen como función la inducción de la apoptosis y daño de las células, y quizá sea por estas proteínas que los ratones presentaron movimientos lentos o incluso ya no se movieron. Esta sintomatología también es causada por los compuestos de la familia de las CRiSP's que inducen hipotermia e inmovilización de la presa (Yamazaki y Morita, 2004).

Los envenenamientos por serpientes de la familia Viperidae se caracterizan por el sangrado local y sistémico. Esto se reflejó en las hemorragias difusas al realizar la disección de los animales experimentales. Para *C. aquilus* algunos de los ratones inoculados presentaron hemorragia nasal y extensas hemorragias. Las familias de proteínas que tienen que ver con este tipo de sintomatologías son las Serino Proteasas que interrumpen la hemostasia y las cascadas de coagulación al ser enzimas anti-coagulantes (Kini, 2005), la Fosfolipasa A₂ que destruyen a los eritrocitos e interfieren en la coagulación sanguínea (Ohno *et al.*, 2003), las Desintegrinas que promueven la hemorragia (Calvete *et al.*, 2005), pero sobre todo las Metaloproteasas que producen hemorragias severas en piel por su acción sobre las proteínas de la matriz extracelular y modulan al sistema hemostático por su función pro-coagulante y anti-coagulante (Fox y Serrano, 2005). Todas estas familias de proteínas en conjunto hacen que los venenos tengan graves consecuencias en el sistema hemostático lo cual se vio reflejado en las hemorragias que presentaron los ratones a causa de los venenos de *C. aquilus*, *C. lepidus klauberi* y *C. lepidus x aquilus* (Cuadro 9). Todas estas familias de proteínas fueron observadas en el gel de poliacrilamida (Figura 9).

Los venenos de los vipéridos pueden presentar un complejo de PLA₂ conocido como crotoxina o mojave toxina que es un componente principalmente neurotóxico (Slotta y Fraenkel-Conrat, 1938). Esta toxina fue reportada para *C. lepidus klauberi* de Mesa Montoro por Rivas-Mercado (2014). La diferencia más evidente en la signología observada fue para *C. lepidus klauberi* en la que todos los roedores inoculados con el veneno presentaron un tipo de parálisis flácida parcial en las patas traseras (Cuadro 6). Este efecto fue posiblemente causado por la presencia de crotoxina que no solo es un compuesto altamente neurotóxico sino también facilita la inmovilización de la presa.

Hemorragias producidas por los venenos por vía intradérmica

Una de las consecuencias más comunes de los envenenamientos por serpientes de la familia Viperidae lo constituye el sangrado local y sistémico causado por las Metaloproteasas, que causa lesión tisular permanente en el tejido muscular (Fan y Cardoso, 1995; Gutiérrez, 1995). Las pruebas estadísticas mostraron que los venenos de *C. aquilus*, *C. lepidus klauberi* y *C. lepidus x aquilus* tienen capacidades hemorrágicas distintas ($p = 0.00707$). Sin embargo, la hemorragia producida en un halo de 10 mm fue similar para *C. aquilus* y *C. lepidus klauberi* (Cuadro 8).

Los valores de potencial hemorrágico (DMH) menores son los que tienen una mayor capacidad hemorrágica. El veneno de *C. aquilus* resultó ser el que presenta mayor potencial hemorrágico de los tres venenos, con un potencial mínimo hemorrágico de 8.35 μg . Incluso se observó que a cantidades de 100 μg , 80 μg y 60 μg el halo hemorrágico adquirió un color rojizo con mayor intensidad, a diferencia de los otros dos venenos (Cuadro 9). Esto podría deberse a que el veneno de estas poblaciones tengan blancos específicos como los son la alteración de las cascadas de coagulación. Para otras especies de cascabeles de talla pequeña como los son *C. polystictus* y *C. ravus* se han encontrado altos niveles de potencial hemorrágico, *C. ravus* con 4.7 μg a 8.1 μg y *C. polystictus* 6.4 μg a 20.1 μg (Bárcenas-Arriaga, 2012).

Al comparar las pruebas de capacidad hemorrágica de las serpientes aquí estudiadas con los resultados de Bárcenas-Arriaga (2012) se encontró que tienen potenciales hemorrágicos parecidos, menores que los de *C. ravus*, pero similares a los más altos de *C. polystictus*, teniendo en cuenta que los valores menores son los que poseen un mayor potencial hemorrágico (Cuadro 8). Hay que considerar que aquí se trabajó con los pools enmascarando la variabilidad individual de los venenos, debido a esto *C. aquilus* podría tener una mayor capacidad hemorrágica.

C. lepidus klauberi resultó tener el veneno con mayor letalidad de las tres serpientes estudiadas y también tiene un potencial hemorrágico importante. Coincidiendo con Martínez-Romero et al. (2013) *C. lepidus klauberi* tiene un veneno con alto grado de potencial hemorrágico, lo que hace que el veneno de *C. lepidus klauberi* resulta ser neurotóxico y hemorrágico, según la clasificación de Glenn y Straight (1989). Es interesante resaltar que el veneno de *C. lepidus klauberi* a dosis pequeñas (μg), se

comporta de manera similar al de *C. aquilus* pero cuando las dosis aumentan para ambos venenos *C. aquilus* eleva su capacidad hemorrágica, cuando para *C. lepidus klauberi* esta capacidad hemorrágica parece mantenerse (Figura 16). En estudios futuros sería conveniente realizar pruebas con cantidades grandes de venenos de *C. aquilus* y *C. lepidus klauberi* para complementar la información de capacidad hemorrágica en estas poblaciones.

C. lepidus x aquilus resultó tener el veneno con menor potencial hemorrágico (DMH = 12.5 µg), pero a dosis altas, este veneno puede ser parecido a *C. aquilus* y tener una capacidad hemorrágica mayor a la de *C. lepidus klauberi* (Figura 16). Especies de cascabeles de mayor talla como *Crotalus molossus*, que también se encuentra distribuida en el estado de Aguascalientes, puede llegar a tener un potencial hemorrágico de 10.6 µg, 10.9 µg, 11.9 µg, 12.3 µg y 24.3 µg (Bárceñas-Arriaga, 2012). Los potenciales hemorrágicos de esta especie son algo cercanos a los de *C. lepidus x aquilus*, pero menores a los encontrados en *C. aquilus* y *C. lepidus klauberi*.

Integrando la información de letalidad de veneno inyectado, DL50 y DMH es claro que el halo hemorrágico mínimo es proporcional a la cantidad de veneno inyectada y que mayor letalidad causa un halo hemorrágico menor. Así, las poblaciones de *C. aquilus* a 60 µg de veneno inyectado presenta un halo de 26.8 mm promedio y su dosis media letal (DL50 = 60.43 µg ratón), en *C. lepidus klauberi* en los 20 µg hay un halo de 15.1 mm y su dosis media letal (DL50 = 25.08 µg ratón), y por último *C. lepidus x aquilus* que es muy similar a *C. aquilus* presentando a los 60 µg un halo de 21.6 mm y su dosis media letal (DL50 = 68.11 µg ratón).

9. CONCLUSIONES

Las poblaciones de serpiente de cascabel, *C. aquilus*, *C. lepidus klauberi* y *C. lepidus x aquilus* comparten las mismas proteínas características de la familia Viperidae, y se observan pequeñas variaciones en el bandeo y la concentración proteica, que quizá se deban a la alimentación, la estacionalidad, la distribución y otros factores naturales que provocan que el veneno varíe.

El veneno con mayor potencial letal fue el de *C. lepidus klauberi*, es posible que sea así porque contienen crotoxina, indicando que el veneno de *C. lepidus klauberi* en Aguascalientes es una combinación hemorrágica y neurotóxica.

Para los tres venenos se observaron síntomas de envenenamiento y la signología mostrada para *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus* fue similar a diferencia de *C. lepidus klauberi* donde se observó además parálisis flácida parcial en patas traseras, también indicando la presencia de crotoxina.

Las poblaciones de cascabeles *C. aquilus*, *C. lepidus klauberi* y la población intermedia *C. lepidus x aquilus* presentaron un potencial hemorrágico alto, pero quien reflejó mayor capacidad hemorrágica fue *C. aquilus*.

La población intermedia de *C. lepidus x aquilus* resultó ser el veneno con menor letalidad y menor capacidad hemorrágica.

A pesar de que no existen grandes diferencias en las proteínas contenidas y en la sintomatología de los venenos de las serpientes *C. aquilus*, *C. lepidus klauberi* *C. lepidus x aquilus* las actividades biológicas como la dosis letales y las capacidades hemorrágicas son diferentes.

Los datos obtenidos en este estudio complementan la información sobre los venenos de *C. aquilus* *C. lepidus klauberi* y *C. lepidus x aquilus* y se concluye que existen variaciones entre ellos.

Los venenos varían en composición y actividad biológica, esta variación puede darnos una idea general de cómo están compuestos y cómo actúan los venenos de los vipéridos mexicanos.

Aunque no sean frecuentes o no estén reportadas las mordeduras de estos organismos tenemos que estar conscientes que existen y sería de gran ayuda conocer mejor los síntomas para cuando se presente un accidente ofídico.

Las diferencias en las actividades biológicas y la composición de los venenos de este estudio nos llevarán a la realización de nuevos antivenenos (específicos) capaces de neutralizar de mejor forma el veneno de mordeduras de serpientes en humanos.

Se propone la realización de un mayor número de estudios sobre venenos de serpientes mexicanas, no solo de crótalos sino también de todos aquellos que pertenecen a la familia Viperidae, para tener idea más completa de cómo sus venenos están compuestos, los efectos en un sistema biológico, las proteínas por las cuales se componen cada uno de estos venenos y también para conocer la signología causada por los venenos con los que cuenta el país, pues se conoce muy poco de ellos.

10. LITERATURA CONSULTADA

- Aird, S. D., Kruggel, W. G. y I. I. Kaiser. 1990. Amino acid sequence of the basic subunit of Mojave toxin from the venom of the Mojave rattlesnake (*Crotalus s. scutulatus*). *Toxicon*, 28: 669-673.
- Arnold, M. L. 1997. Natural hybridization and evolution. Oxford University Press, New York, 123 págs.
- Barcenás-Arriaga, S. 2012. Venenos de las serpientes de cascabel de la Ciudad de México: actividades biológicas y neutralización por Antivipmyn®. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Biólogo, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 62 págs.
- Benárt-Valle, M. 2011. Caracterización Bioquímica del Veneno de la Serpiente de Coral *Micrurus tener*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología, UNAM, México D.F. 43 págs.
- Bieber, A. L., Becker, R. R., McParland, R., Hunt, D. F., Shabanowitz, J., Yates 3rd, J., Martino, P. A. y G. R. Johnson. 1990. The complete sequence of the acidic subunit from Mojave toxin determined by Edman degradation and mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta* 10(37): 413-421.
- Bjarnason, J. B. y J. W. Fox. 1994. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol. Ther*, 62(3):325-72.
- Bolaños, R. 1984. Serpientes, venenos y ofidismo en Centroamérica. Universidad de Costa Rica, San José.

- Bon, C. 1997. Multicomponent neurotoxic phospholipases A₂. In Phospholipase A₂ enzymes: Structure, function and mechanism, ed. R. M. Kini. Chichester, England: John Wiley & Sons. 269-85.
- Calvete, J. J., Marcinkiewicz, C., Monleon, D., Esteve, V., Celda, B., Juarez, P. y L. Sanz. 2005. Snake venom disintegrins: Evolution of structure and function. *Toxicon*, 45: 1063-74.
- Calvete, J. J., Pérez, A., Lomonte, B., Sánchez, E. E. y L. Sanz. 2012. Snake venomomics of *Crotalus tigris*: the minimalist toxin arsenal of the deadliest Nearctic rattlesnake venom. Evolutionary clues for generating a pan-specific antivenom against crotalid type II venoms. *J. Proteome Res.* 11(2):1382-1390.
- Campbell, A. J., Brodie, E. D., Barker, D. G. y A. H. Price. 1989 An Apparent Natural Hybrid Rattlesnake and *Crotalus willardi* (Viperidae) From the Peloncillo Mountains of Southwestern New Mexico. *Herpetologica*, 45(3): 344-349.
- Campbell, J. A. y W. L. Lamar 2004. The Venemous Reptiles of the Western Hemisphere. Vol 1. Cornell University Press, 425 págs.
- Carbajal-Márquez, R. A. y G. E. Quintero-Díaz. 2015. Diet of *Crotalus lepidus* (Serpentes: Viperidae) in Mesa Montoro, Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Herpetología*. 1: 18-21.
- Carbajal-Márquez, R. A., Quintero-Díaz G. E. y E. A. Rivas-Mercado. 2015 (a). Geographic distribution. *Crotalus basiliscus* (Mexican West Coast Rattlesnake). *Herpetological Review*. 46(2): 219.
- Carbajal-Márquez, R. A., González-Saucedo, Z. Y. y J. C. Arenas-Monroy. 2015 (b). *Crotalus aquilus* Klauber, 1952 (Squamata: Viperidae), un nuevo registro estatal para Zacatecas, México. *Acta Zoológica Mexicana*. 31(1): 131-133.

- Carbajal-Saucedo, A. 2014. Caracterización biológica, bioquímica e inmunoquímica del veneno de *Micrurus laticollaris*: bases para el desarrollo de un antiveneno de amplio espectro contra coralillos. Tesis de Doctoral para obtener el grado de Doctor en Ciencias, Instituto de Biotecnología, UNAM, México D.F, 90 págs.
- Coyney, J. A. y H. A. Orr. 2004. Speciation. Sinauer Associates, Inc., Boston, Massachusetts, 45 págs.
- Chippaux, J. P., Williams, V. y J. White. 1991. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, 29(11): 1279-1303.
- Fan, H. W. y J. L. Cardoso. 1995. Clinical toxicology of snake bites in South America. In J. Meier & J. White (eds.). *Handbook of toxicology of animal venoms and poisons*. CRC, Florida. 667-688.
- Fernández-Badillo, L., Morales-Capellán, N. y I. Goyenechea-Mayer. 2011. Serpientes Venenosas del Estado de Hidalgo. Lito Impresos Bernal, S.A., México, Hidalgo, 55- 65 págs.
- Flores-Villela, O. A. y U. O. García-Vázquez. 2014. Biodiversidad de reptiles en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85: 467-475.
- Fox, J. W. y S. M. T. Serrano. 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*, 45(8): 969-985.
- Franceschi, A., Rucavado, A., Mora, N. y J. M. Gutiérrez. 2000. Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* 38: 63-77.

- Fry, B. G. y W. Wüster. 2004. Assembling an arsenal: Origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 21:870-83.
- Gil-Alarcón, G., Sánchez-Villegas, M. del C. y V. H. Reynoso. 2011. Tratamiento prehospitalario del accidente ofídico: revisión, actualización y problemática actual. *Gaceta Médica de México*. 17(3): 195-208.
- Glenn, J. L. y R. C. Sraight. 1989. Intergradation of two different venom populations of the Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) in Arizona. *Toxicon*. 27(4): 411-8.
- Glenn, J. L., Straight, R. C., Wolfe, M. C. y D. L Hardy. 1983. Geographical variation in *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) venom properties. *Toxicon*, 21(1): 119-130.
- Glenn, J. L. y R. C. Straight. 1978. Mojave rattlesnake *Crotalus scutulatus scutulatus* venom: variation in toxicity with geographical origin. *Toxicon*, 16: 81-84.
- Graham, R. L. J., Graham, C., Theakston, D., McMullan, G. y C. Shaw. 2007. Elucidation of trends within venom components from the snake families Elapidae and Viperidae using gel filtration chromatography. *Toxicon*, 51: 121-129.
- Gutiérrez, J. M. y B. Lomonte. 1989. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. *Mem. Inst. Butantan*, 51: 211-223.
- Gutiérrez, J. M. y A. Rucavado. 2002. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Rev. Biol. Trop*, 50(2): 377-394.
- Gutiérrez, J. M. y A. Rucavado. 2000. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*, 82: 841-850.

Gutiérrez, J. M. 1995. Clinical toxicology of snakebite in Central America. In J. Meier & J. White (eds.). Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons. CRC, Florida, 645-665 págs.

Henderson, J. T. y A. L. Bieber. 1986. Antigenic relationship between mojave toxin subunits, mojave toxin and some crotalids venoms. *Toxicon*, 24(5): 473-479.

INEGI., 2016, Google maps, <https://www.google.com.mx/maps/place/Aguascalientes/> (consultado el 12 de enero de 2016).

Jacob, J. S. 1977. An evaluation of the possibility of hybridization between the rattlesnakes *Crotalus atrox* and *C. scutulatus* in the southwestern United States. *Southwestern Naturalist*, 22: 469-485.

Jiménez-Porras, J. M. 1970. Biochemistry of snake venoms (a review). *Clin Toxicol*, 3: 389-431.

Kapfer, J. M., Sloss, B. L., Schuurman, G. W., Paloski, R. A. y J. M. Lorch. 2013. Evidence of Hybridization between Common Gartersnakes (*Thamnophis sirtalis*) and Butler's Gartersnakes (*Thamnophis butleri*) in Wisconsin, USA. *Journal of Herpetology*, 47(3):400-405.

Kenneth, P. R., Johnston, D. S., Nolan, M. A., Wooters, J. L., Waxmonsky, N. C., Piehl, L. B., Ensrud-Bowlin, K. M. y D. W. Hamilton. 2007. Structure and function of epididymal protein cysteine-rich secretory protein-1. *Asian Journal of Andrology*, 9(4): 508-514.

Kini, R. M. 2003. Excitement ahead: Structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon*, 42:827-40.

- Kini, R. M. 2005. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 34(4-5), 200-204.
- Klauber, L. M. 1956. *Rattlesnakes, their habits, life histories, and influence on mankind*. 2 vols. Berkeley University of California Press.
- Leduc, M. y C. Bon. 1998. Cloning of subunits of convulxin, a collagen-like platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Biochem. J.*, 333: 389-93.
- Mackessy, S. P. 1988. Venom ontogeny in the Pacific rattlesnakes *Crotalus viridis helleri* and *C. v. oreganus*. *Copeia*, 1988: 92-101.
- Mackessy S. P. 2010. *The handbook of venoms and toxins of reptiles*. CRC Press. U.S.A, 521 págs.
- Mackessy, S. P., Sixberry, N. M., Heyborne, W. H. y T. Fritts. 2006. Venom of the brown treesnake, *Boiga irregularis*: Ontogenetic shifts and taxa-specific toxicity. *Toxicon*, 47:537-48.
- Martínez-Romero, G., Rucavado, A., Lazcano, D., Gutiérrez, J. M., Borja, M., Lomonte, B., Garza-García, Y. y A. Zugasti-Cruz. 2013. Comparison of venom composition and biological activities of the subspecies *Crotalus lepidus lepidus*, *Crotalus lepidus klauberi* and *Crotalus lepidus morulus* from Mexico. *Toxicon*, 71: 84-95.
- Maruñak, S. L., Ruíz De Torrent, R. M., Teibler, G. P., Gay, C. C., Leiva, L. y O. Acosta De Pérez. 2005. Acción del veneno de *Bothrops jararacussu* de Argentina sobre la coagulación sanguínea. *InVet*, 8(1): 119-128.

- Mebs, D. 2002. *Venomous and Poisonous Animals*. CRCpress. Boca Raton, Florida: CRC Press, 339 págs.
- Meik, J., Fontenot, B., Franklin, C. y C. King. 2008. Apparent Natural Hybridization Between the Rattlesnakes *Crotalus atrox* and *C. horridus*. *The Southwestern Naturalist*, 53(2): 196-200.
- Mendelson, J. R. y B. J. Jennings. 1992. Shifts in the relative abundance of snakes in a desert grassland. *Journal of Herpetology*, 26: 38-45.
- Mirtschin, P. J., Shine, R., Nias, T. J., Dunstan, N. L., Hough, B. J. y M. Mirtschin. 2002. Influences on venom yield in Australian tigersnakes (*Notechis scutatus*) and brownsnakes (*Pseudonaja textilis*: Elapidae, Serpentes). *Toxicon*, 40: 1581-92.
- Moreira, L. G., Borkow, M. O. y J. M. Gutiérrez. 1994. Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. *Toxicon*, 32: 977-987.
- Mori, N., Nikai, T., y H. Sugihara. 1987. Phosphodiesterase from the venom of *Crotalus ruber ruber*. *Int. J. Biochem.* 19:115-19.
- Murphy, W. y B. Crabtree. 1988. Genetic Identification of a Natural Hybrid Rattlesnake: *Crotalus scutulatus scutulatus* × *C. viridis viridis*. *Herpetologica*, 4(1): 173-176.
- Neri-Castro, E. E., Bénard-Valle, M. y A. Alagón-Cano. 2014. Reptiles venenosos en México. *Revista digital universitaria*, 15(11): 1607-6079.
- Neri-Castro, E. E., Lomonte, B., Gutiérrez, M. C., Alagón-Cano, A. y J. M. Gutiérrez J. M. 2013. Intraspecies variation in the venom of the rattlesnake *Crotalus simus* from Mexico: Different expression of crotoxin results in highly variable toxicity in the venoms of three subspecies. *Journal of Proteomics*, 87: 103-121.

Ohno, M., Chijiwa, T., Oda-Ueda, N., Ogawa, T. y S. Hattori. 2003. Molecular evolution of myotoxic phospholipases A2 from snake venom. *Toxicon*, 42(8): 841-854.

Pacheco-Hoyos, N. G. 2015. Flujo genético entre las poblaciones de iguanas insulares y continentales en el Golfo de California. Tesis de Maestría para obtener el título de Maestra en Ciencias Biológicas (Orientación Evolución). Universidad Nacional Autónoma de México, 134 págs.

Pérez-Guzmán, A. K., Godoy-Godoy, J. B., Lazcano, D., Banda-Leal, J., Morlett, J., Cepada-Nieto, A. C., Garza-García, Y. y A. Zugasti-Cruz. 2015. Actividad proteolítica del veneno de *Crotalus aquilus*. Memorias del Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Guadalajara. Jalisco. Universidad Autónoma de Guadalajara, 1 pág.

Pough, F. H., Andrews, R. M., Cadle, J. E., Crump, M. L., Savitzky, A. H. y K. D. Wells. 1998. *Herpetology*. Londres: Pretince Hall.

Quintero-Díaz., G. E., Vázquez-Díaz., J. y H. M. Smith. 2000. *Micrurus distans zweifeli* (Zweifel's Coral Snake). New Geographic Distribution. México: Aguascalientes. *Herpetological Review* 31(2): 114.

Rábis-Baptista, G., Moreno, F. B. M. B., Nogueira, L. L., Martins, A. M. C., Toyama, D. O., Toyama, M. H., Azevedo Jr, W. F., Cavada, B. S. y T. Yamane. 2005. Crotacetin, a novel snake venom C-Type Lectine, is homolog of convulxin. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis*, 11(4): 557-578.

Rael, E. D., Salo, R. J. y H. Zepeda. 1986. Monoclonal antibodies to Mojave toxin and use for isolation of cross-reacting proteins in *Crotalus* venoms. *Toxicon*, 24: 661-668.

- Rivas-Mercado, E. A. 2014. Caracterización bioquímica del veneno de tres serpientes de cascabel de montaña (*Crotalus aquilus*, *C. lepidus klauberi* y *C. lepidus x aquilus*). Tesis de Maestría para obtener el grado de Maestro en Ciencias; Área de Toxicología, Universidad Autónoma de Aguascalientes, México, Aguascalientes Aguascalientes, 97 págs.
- Roldán-Padrón, O., Blanco-Labra, A., García-Gasca, T. y U. Padilla-García. 2010. Caracterización de Serin Proteasas del venenos de híbridos de *Crotalus aquilus* y *Crotalus polystictus* en Cautiverio. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad autónoma de Querétaro, CINVESTAV IPN Irapuato, México, Querétaro, 4 págs.
- Sigala-Rodríguez, J. J. y J. Vázquez Díaz. 1996. Serpientes Venenosas de Aguascalientes. Cuaderno de Trabajo No. 56. Cuadernos de Trabajo, Serie de Agricultura y Recursos Naturales. Gob. del Edo. de Aguascalientes.
- Slotta, K. H. y H. L. Fraenkel-Conrat. 1938. Estudos quimicos sobre os venenos ofidicos. 4. Purificação e cristalização do veneno de cobra cascavel. Mem. Inst. Butantan, 12: 505-513.
- Stoynov, S. S., Bakalova, A. T., Dimov, S. I., Mitkova, A. V. y L. B. Dolapchiev. 1997. Single-strand-specific DNase activity is an inherent property of the 140-kDa protein of the snake venom exonuclease. FEBS Lett, 409: 151-54.
- Valencia-Hernández, A. A. 2006. Taxonomía y distribución del género *Crotalus* (Linneo, 1758) en el estado de Hidalgo. Tesis de Licenciatura para obtener el Título de Biólogo, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 104 págs.
- Vázquez-Díaz, J., y G. E. Quintero-Díaz. 2005. Anfibios y Reptiles de Aguascalientes. Editorial CIEMA, México Aguascalientes, 318 págs.

Yamazaki, Y. y T. Morita. 2004. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Toxicon*, 44: 227–31.

Zarza, E., Reynoso, V. H. y B. C. Emerson. 2008. Diversification in the northern neotropics: mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of the iguana *Ctenosaura pectinata* and related species. *Molecular Ecology*, 17: 3259–3275.

11. ANEXOS

1- Cuantificación de concentración proteica

- Se pesó 1 mg de la muestra problema previamente liofilizado (veneno) y se reconstituyó en 100 µl de solución salina 0.9%.
- El blanco para esta prueba fue la solución salina, de la cual se obtuvo su absorbancia.
- Para después obtener la absorbancia de la muestra problema (se cargaron 2 µl de ambas muestras veneno de los tres pools y blanco).
- El programa NANODROP 2000 dio la concentración de proteína dada por: mg/mL.
- Con esa concentración de proteína dada se cargaron los geles de SDS-PAGE teniendo un total proteico de 30 µg.

2- Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Solución de acrilamida 30% de acrilamida + 0.8% de bis-acrilamida. Disolver 30 g de acrilamida y 0.8 g de bis-acrilamida en un volumen final de 100 mL de agua desionizada.

Amortiguador inferior (buffer tris 1.5 M, SDS 0.4%). Disolver 18.1 g de Tris en 50 mL de agua desionizada y adicionar 0.4 g de SDS. Ajustar el pH a 8.8 con HCL concentrado y aforar a 100 mL.

Amortiguador superior (buffer tris 0.5 M, SDS 0.4%). Disolver 6.05 g de Tris en 50 mL de agua desionizada y adicionar 0.4 g de SDS. Ajustar el pH a 6.8 con HCL concentrado y aforar a 100 mL.

Amortiguador de corrida (buffer tris 0.25 M, glicina 0.19 M, SDS 0.1%). Para una solución 10X, se disolvieron 15 g de tris y 72.1 g de glicina en 300 mL de agua desionizada, se adicionaron 50 mL de SDS al 10% y se ajustó pH a 8.6 con NaOH, y se aforó a 500 mL.

Amortiguador de corrida desnaturizante 5X (10% glicerol + 2.5% SDS + 50 mM tris – HCl pH 6.8 + 5% 2 – mercaptoetanol + 0.002% azul de bromofenol). En un tubo marca Falcon de 15 mL, se mezclaron los siguientes volúmenes: 300 µg de glicerol, 750 µg de SDS al 10%, 150 µg Tris-HCl 1 M pH 6.8, 150 µg de β – mercaptoetanol, 0.06 g azul de bromofenol, se aforó a 3 mL con agua desionizada.

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

Solución de tinción (25% isopropanol + 10% ácido acético + 0.2% de azul de Coomasie). Se agregaron 20 mL de isopropanol y 5 mL de ácido acético. Dejando reposar por 5 minutos y posteriormente se agregó azul de Coomasie para teñir toda la noche.

Para desteñir se usó lavados de aguas desionizada por unos 10 minutos.

Para realizar el gel se mezclaron los siguientes volúmenes:

Gel separador al 15%

- Amortiguado inferior 1.5 mL
- Acrilamida 3.0 mL
- Agua desionizada 1.5 mL
- TEMED 10 µl
- 10% PSA 45 µl

Gel concentrador al 4%

- Amortiguador superior 0.63 mL
- Agua desionizada 1.54 mL
- Acrilamida 0.33 mL
- TEMED 10 µl
- 10% PSA 40 µl

Para la preservación del gel se usó papel celofán dulce, envolviendo el gel en el papel y dejándolo secar por 2 días aproximadamente. Los resultados fueron analizados en los programas ImageJ, Adobe® PhotoShop® CS y en el ambiente R Studio®.

3- Determinación de la letalidad de los venenos

Material para DL50.

- Cajas de acrílico especiales para roedores
- Tapas para la caja
- Bebederos

- Alimento (Nutri Cubo)
- Ratones de la cepa CD1 entre 18 y 20 g aproximadamente
- Jeringas de insulina 3 mL.
- Solución salina 0.9%
- Muestra problema (veneno)
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL
- Algodón
- Guantes
- Mesa de trabajo (inoculación de los ratones)

Método:

- Tomar cantidades diferentes de la muestra problema veneno en (μg).
- Administrar la cantidad elegida de veneno a los roedores de la cepa CD1 por vía intraperitoneal (se ajustara dependiendo la cantidad de veneno a 0.2 mL de volumen final con solución salina).
- Tomar datos de la signología ocasionada a los roedores.
- La toma del registro de muertes es a las 24 horas después de la inoculación.
- Los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism y en el ambiente R Studio [®].

Nota: Es importante que en las dosis se represente el 100% de mortalidad y 100% de la supervivencia.

4- Determinación de la actividad hemorrágica

Material de DMH

- Cajas de acrílico especiales para roedores
- Tapas para la caja
- Bebederos
- Alimento (Nutri Cubo)
- Ratones de la cepa CD1 entre 35 y 40 g aproximadamente
- Jeringas de insulina 3 mL.
- Solución salina 0.9%
- Muestra problema (veneno)

- Tubos Eppendorf de 1.5 mL
- Algodón
- Guantes
- Mesa de trabajo (inoculación de los ratones)
- Rasuradora
- Estuche de disección
- Vernier

Método:

- Tomar cantidades diferentes de la muestra problema veneno en (μg).
- Administrar la cantidad elegida de veneno a los roedores de la cepa CD1 por vía intradérmica (se ajustara dependiendo la cantidad de veneno a 0.05 mL de volumen final con solución salina).
- Los roedores se van a rasurar en la parte dorsal, para después inocularlos por vía intradérmica.
- Transcurridas 3 horas de la inoculación, los ratones serán sacrificados para pasar a la disección (solo se ocupa la piel).
- La piel se medirá con el vernier, para obtener el d1 y el d2.
- Se promediaron dichos diámetros dados para meterlos en el programa GraphPad Prism y en el ambiente R Studio®.

Nota: En el momento de la inyección intradérmica es importante que se forme una pápula. Se deben obtener halos hemorrágicos menores a 10 mm.