

Instituto de Biotecnología  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Comparación del nivel de reconocimiento y neutralización  
de tres antivenenos mexicanos hacia el veneno de nueve  
especies de vipéridos.

TESIS

Que para obtener el título de:

Biólogo

P R E S E N T A:

Alid Guadarrama Martínez

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Edgar Enrique Neri Castro

Ciudad de México 2023





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano, perteneciente al Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría del Dr. Edgar Neri Castro.

Agradecemos el apoyo económico otorgado para llevar a cabo el presente proyecto y la escritura de la tesis mediante los programas:

- DAGAPA-PAPIIT IN211621. Caracterización del veneno de tres serpientes de importancia médica en México: investigación básica y mejoramiento de antivenenos.
- CONACYT 303045. Venenos y Antivenenos.

***Dedico este trabajo***

***A mis padres, Abel Guadarrama Sánchez y Zaida Martínez Espinosa por su incansable amor, apoyo y sacrificio. Por impulsarme (y soportarme) en todo aquello que he emprendido.***

***A Maura, por permitirme construir una vida juntos, por siempre saber qué decir para animarme, por compartir tantas alegrías, aventuras, pláticas, llantos y carcajadas, por salir juntos de los tiempos grises.***

***Gracias por estos años Maurita.***

***Esto no hubiera sido posible sin ustedes.***

## AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, el Dr. Edgar Neri por la paciencia, por todas las enseñanzas y la confianza que depositó en mí.

Al Dr. Alejandro Alagón, por abrir las puertas de su laboratorio y brindarme todo el apoyo para realizar este trabajo

A la Dra. Melisa Bénard por toda la ayuda y guía tanto académica como personal.

Al M. en C. Alejandro Olvera por sus consejos, regaños y pláticas.

A mis buenos amigos Víctor Carpanta, Gibran Rodríguez, Andreí Montero y Fernando Lozoya por su apoyo, las interesantes discusiones y por tantas tardes de café que refrescaban los ánimos.

A la Dra. Hilda Vazquez por sus palabras de aliento y sus consejos tanto técnicos como personales.

A Felipe Olvera, Angélica Linares, Manuela Ávila y Ricardo Mondragón por su apoyo técnico en el laboratorio.

A todos los integrantes del laboratorio 13, tanto *alagones* como *corzos* por la amistad, consejos y buenos momentos.

Por su apoyo técnico y administrativo, agradezco a la Unidad de Docencia del IBt, especialmente a Antonio Bolaños y a la Unidad de Cómputo del IBt, en especial a David Santiago Castañeda Carreón.

<b>I. ABREVIATURAS USADAS EN EL PRESENTE TRABAJO</b>	<b>1</b>
<b>II. RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1.1. ACCIDENTE OFÍDICO EN EL MUNDO	3
1.2. ACCIDENTE OFÍDICO EN MÉXICO	3
1.3. TRATAMIENTOS	5
1.4. ANTIVENENOS EN EL MUNDO	5
1.5. ANTIVENENOS EN MÉXICO	7
1.5.1. <i>FABOTERÁPICO POLIVALENTE ANTIVIPERINO</i>	7
1.5.2. <i>ANTIVIPMYN</i>	8
1.5.3. <i>INOSERP</i>	8
1.6. EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE LOS ANTIVENENOS	8
1.7. DIVERSIDAD DE SERPIENTES VENENOSAS EN MÉXICO	9
1.8. APARATO VENENOSO	10
1.9. VENENO	11
1.10. VENENOS DE VIPÉRIDOS MEXICANOS	11
1.10.1. <i>FOSFOLIPASAS</i>	11
1.10.2. <i>METALOPROTEASAS</i>	13
1.10.3. <i>SERÍNPROTEASAS</i>	14
1.10.4. <i>OTRAS FAMILIAS PROTEICAS PRESENTES EN EL VENENO DE VIPÉRIDOS</i>	14
1.11. VARIACIÓN INTRAESPECÍFICA EN EL VENENO	15
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>16</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>16</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
4.1. OBJETIVO GENERAL	16
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES	16
<b>5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	<b>17</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>17</b>
6.1. USO DE ANIMALES DE LABORATORIO	17
6.2. FABOTERÁPICOS	18
6.3. VENENOS	18
6.4. CUANTIFICACIÓN PROTEICA DE LOS ANTIVENENOS	20
6.5. CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LOS ANTIVENENOS	20
6.6. CUANTIFICACIÓN DE $F(Ab')_2$ ESPECÍFICOS	20
6.7. CUANTIFICACIÓN PROTEICA DE LOS VENENOS	21

6.8.	CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LOS VENENOS	22
6.9.	EVALUACIÓN DEL NIVEL DE RECONOCIMIENTO	22
6.9.1.	<i>ENSAYO DE INMUNOADSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)</i>	22
6.9.2.	<i>RECONOCIMIENTO MEDIANTE UN ENFOQUE DE ANTIVENÓMICA</i>	23
6.9.3.	<i>WESTERN BLOT DE LA RESINA USADA EN ANTIVENÓMICA</i>	24
6.10.	DETERMINACIÓN DE LAS PRINCIPALES ACTIVIDADES BIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS	25
6.10.1.	<i>ACTIVIDAD LETAL</i>	25
6.10.2.	<i>ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA IN VITRO</i>	25
6.10.3.	<i>ACTIVIDAD FIBRINOGENOLÍTICA IN VITRO</i>	26
6.11.	DETERMINACIÓN DE LA POTENCIA NEUTRALIZANTE DE LOS FABOTERÁPICOS CONTRA LAS PRINCIPALES ACTIVIDADES BIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS	27
6.11.1.	<i>NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD LETAL</i>	27
6.11.2.	<i>NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA IN VITRO</i>	28
6.11.3.	<i>NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD FIBRINOGENOLÍTICA IN VITRO</i>	28
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>29</b>
7.1.	CUANTIFICACIÓN PROTEICA DE LOS ANTIVENENOS	29
7.2.	CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LOS ANTIVENENOS	30
7.3.	CUANTIFICACIÓN DE F(AB') <sub>2</sub> ESPECÍFICOS	30
7.4.	CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LOS VENENOS	32
7.5.	EVALUACIÓN DEL RECONOCIMIENTO	33
7.5.1.	<i>ENSAYO DE INMUNOADSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)</i>	33
7.5.2.	<i>RECONOCIMIENTO MEDIANTE UN ENFOQUE DE ANTIVENÓMICA</i>	34
7.5.3.	<i>WESTERN BLOT DE LA RESINA USADA EN ANTIVENÓMICA</i>	38
7.6.	DETERMINACIÓN DE LAS PRINCIPALES ACTIVIDADES BIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS	39
7.6.1.	<i>ACTIVIDAD LETAL</i>	39
7.6.2.	<i>ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA IN VITRO</i>	40
7.6.3.	<i>ACTIVIDAD FIBRINOGENOLÍTICA IN VITRO</i>	40
7.1.	DETERMINACIÓN DE LA POTENCIA NEUTRALIZANTE DE LOS ANTIVENENOS CONTRA LAS PRINCIPALES ACTIVIDADES BIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS	41
7.1.1.	<i>NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD LETAL</i>	41
7.1.2.	<i>NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA IN VITRO</i>	48
7.1.3.	<i>NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD FIBRINOGENOLÍTICA IN VITRO</i>	49
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>52</b>
<b>9.</b>	<b>PROSPECTIVAS</b>	<b>53</b>
<b>10.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>54</b>
<b>11.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>70</b>

## I. ABREVIATURAS USADAS EN EL PRESENTE TRABAJO

A <sub>280</sub>	Absorbancia a 280 nm
Birmex	Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México S.A. de C.V.
CNBrS	Sefarosa activada por bromuro de cianógeno
CRiSPs	Proteínas secretoras ricas en cisteína
CTLs	Lectinas tipo C
DE <sub>50</sub>	Dosis efectiva media
DIS	Desintegrinas
DL <sub>50</sub>	Dosis letal media
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Inmunoensayo de adsorción ligado a enzimas
Fab	Dominio de unión a antígeno
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FHR	Fracción hiper-retenida
FNR	Fracción no retenida
FR	Fracción retenida
i.p.	Vía intraperitoneal
i.v.	Vía intravenosa
ICP	Instituto Clodomiro Picado
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
kDa	Kilodalton
LAAOs	L-aminoácido oxidasas
NOM	Norma Oficial Mexicana
NP	Péptidos natriuréticos
NTDs	Enfermedades Tropicales Desatendidas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer de fosfatos salino
PLA <sub>2</sub> s	Fosfolipasas A <sub>2</sub>
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SubA	Subunidad ácida de la crotoxina
SubB	Subunidad básica de la crotoxina
SVMPs	Metaloproteasas de veneno de serpiente
SVSPs	Serín proteasas de veneno de serpiente
TL-SVSP	Serín proteasas tipo trombina

## II. RESUMEN

El accidente ofídico en México es un problema de salud pública causado por el contacto traumático con serpientes principalmente de la familia Viperidae. Las cifras oficiales reportan en promedio 3800 envenenamientos anuales que conducen a 35 defunciones. Para tratar el envenenamiento por mordedura de vipérido en México, existen dos antivenenos comerciales y un tercero en proceso experimental que pretende salir al mercado pronto. Los tres son de origen equino y funcionan a partir de fragmentos  $F(ab')_2$ , pero utilizan el veneno de diferentes especies como inmunógenos. A pesar de la larga tradición en la manufactura de antivenenos en México, no existen estudios enfocados en evaluar su capacidad neutralizante hacia especies de vipéridos no pertenecientes al género *Crotalus* o que comparen el desempeño de distintos lotes de cada producto. Por tal motivo, se caracterizó bioquímica e inmunológicamente distintos lotes de los tres antivenenos. Para ello, se cuantificó la proporción de fragmentos  $F(ab')_2$  capaces de reconocer tres diferentes venenos usados en la elaboración de los antivenenos, además, el perfil electroforético de los antivenenos fue evaluado en busca de contaminantes. Posteriormente, se evaluó la capacidad neutralizante de los antivenenos hacia las principales actividades tóxicas del veneno de nueve especies de vipéridos mexicanos y su nivel de inmunoreconocimiento. Nuestros datos muestran diferencias significativas en el contenido proteico y en la capacidad neutralizante entre diferentes antivenenos e incluso entre distintos lotes de un mismo producto. Entre los resultados más sobresalientes destaca el hecho de que el veneno de *Crotalus atrox* es pobremente neutralizado por todos los lotes evaluados a pesar de ser la especie responsable de la mayoría de los envenenamientos en el norte del país. Adicionalmente, con la mayor cantidad probada ningún antiveneno fue capaz de neutralizar la actividad letal de los venenos de *Metlapilcoatlus nummifer* y *Porthidium yucatanicum*. Nuestros datos reflejan importantes áreas de oportunidad tanto para el mejoramiento de los antivenenos disponibles como para la creación de nuevos productos.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. ACCIDENTE OFÍDICO EN EL MUNDO**

El envenenamiento por mordedura de serpiente también llamado ofidismo o accidente ofídico, es una condición en la cual se ven afectados diversos procesos fisiológicos producto de la inyección de secreciones tóxicas a humanos. El veneno inoculado puede llevar a un amplio espectro de efectos tóxicos que van desde el daño tisular local a la falla multiorgánica, que de no ser tratados adecuadamente, pueden causar la muerte. El ofidismo representa un problema de salud pública desatendido que afecta principalmente a las comunidades rurales de países tropicales y subtropicales, donde es causa importante de mortalidad y morbilidad asociadas a un deficiente acceso a servicios de salud, y en algunos casos, a escasez de antivenenos (Gutiérrez et al., 2017; Kasturiratne et al., 2008; Kim et al., 2019).

A nivel mundial ocurren entre 1.8 y 2.7 millones de envenenamientos al año, los cuales producen de 81,000 a 138,000 muertes y más de 400,000 sobrevivientes con secuelas incapacitantes (Chippaux, 1998; Kasturiratne et al., 2008). Tan sólo en el continente americano la incidencia alcanza los 57,500 casos al año, que resultan en cerca de 370 muertes (Chippaux, 2017a).

El envenenamiento por mordedura de serpiente fue reconocido en 2009 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como parte de las Enfermedades Tropicales Desatendidas (NTDs) (World Health Organization, 2010), no obstante, para 2013 fue retirado de esta lista (Chippaux, 2017b) y dos años más tarde no se contaba con ningún programa asociado a la OMS para su control y prevención (Hui Wen et al., 2015). Aunque el 9 de junio de 2017 se reincorporó a la categoría de NTDs (Chippaux, 2017b), el accidente ofídico ha recibido históricamente poca atención de organismos de financiamiento, autoridades sanitarias y la industria farmacéutica. Este abandono ha retrasado el desarrollo de soluciones efectivas para reducir su impacto social (Calvete et al., 2018; Gutiérrez et al., 2017).

### **1.2. ACCIDENTE OFÍDICO EN MÉXICO**

La información epidemiológica disponible acerca del accidente ofídico en México es deficiente. Recién en 2003 comenzó a ser registrada de manera independiente la incidencia de mordeduras por serpiente en los reportes epidemiológicos semanales del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) que pertenece a la Secretaría de Salud. De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) y el SINAVE de 2003 a 2019 se contabilizaron en promedio 3,893 mordeduras, las cuales causaron 35.5



### **1.3. TRATAMIENTOS**

Después de un envenenamiento la búsqueda de tratamiento está influenciada por distintas razones, especialmente en zonas que carecen de servicios sanitarios, lo cual empuja a los pobladores a recurrir a curanderos tradicionales, herbolarios o chamanes. Los tratamientos tradicionales son variables y pueden incluir vendajes, torniquetes, incisiones, amputaciones, ingesta de infusiones vegetales y aplicación tópica de hielo, hierbas, fuego, succión o choques eléctricos en el sitio de la mordedura, entre otros (Bénard-Valle et al., 2015; Chippaux, 2017a; Gutiérrez et al., 2017; Schioldann et al., 2018). Aunque el principal motivo para su uso es la disponibilidad, dichas prácticas están alimentadas por mitos y creencias infundadas y diversos estudios han comprobado que carecen de efectividad, retrasando significativamente la atención médica y distorsionando los cuadros clínicos, generando así serias complicaciones médicas como dolor, isquemia, infecciones o necrosis incluso en la ausencia de envenenamiento (Alberts et al., 2004; Bush et al., 2000; Gutiérrez et al., 2017; Warrell, 2010). Hasta la fecha, la administración parenteral de antiveneno representa el único tratamiento específico y científicamente validado del envenenamiento por mordedura de serpiente (Gutiérrez et al., 2017; Warrell, 2010; Zolfagharian & Dounighi, 2013).

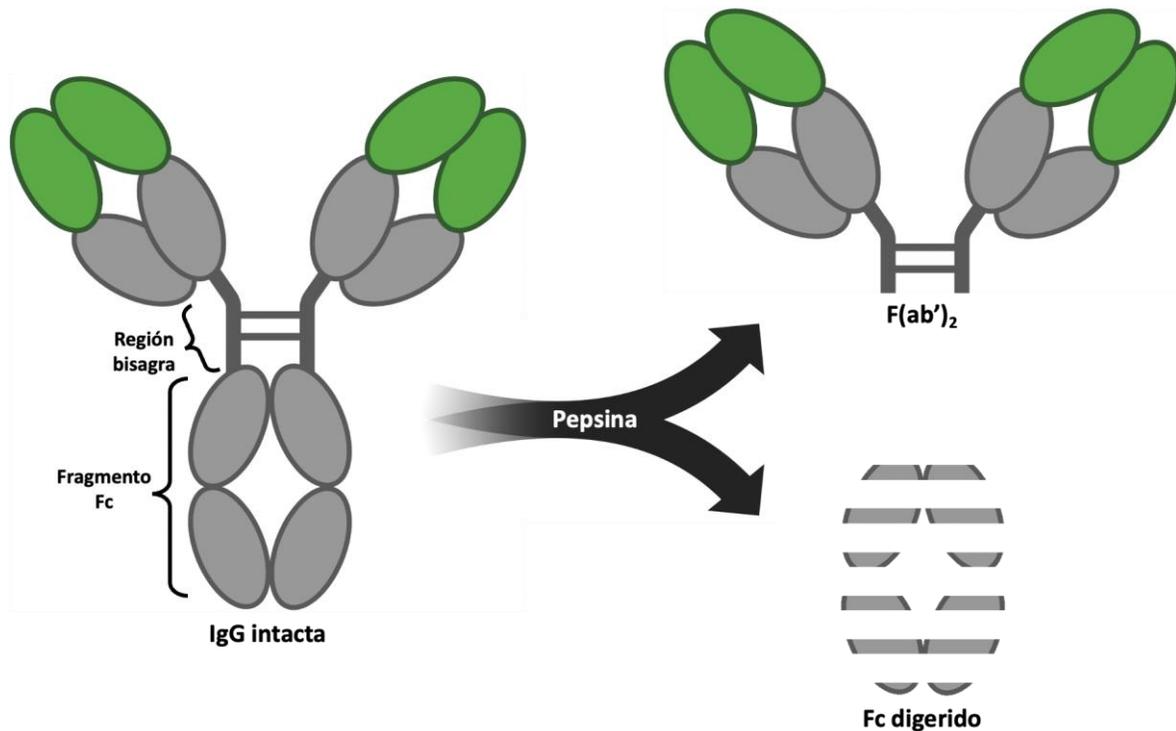
### **1.4. ANTIVENENOS EN EL MUNDO**

Los orígenes de la inmunoterapia para los envenenamientos se remontan a hace más de 125 años con los trabajos independientes de Phisalix y Calmete (Bochner, 2016), y aunque los antivenenos han permanecido sin cambios fisicoquímicos sustanciales (Calvete et al., 2018), siguen siendo la única terapia específica para el tratamiento del accidente ofídico.

La producción de antivenenos inicia con la inoculación de dosis crecientes de veneno en mamíferos grandes, usualmente caballos u ovejas. Esto provoca en los animales el desarrollo de una respuesta inmune contra los componentes del veneno, y con ello, un aumento progresivo de anticuerpos neutralizantes. Posteriormente, se obtiene una muestra de sangre seguida de la purificación de los anticuerpos contenidos en el plasma (Lalloo & Theakston, 2003; World Health Organization, 2018). La purificación se realiza típicamente ácido caprílico (Rojas et al., 1994). Algunos fabricantes incluyen un paso de digestión enzimática de las inmunoglobulinas con pepsina, obteniendo fragmentos  $F(ab')_2$  (Pope, 1939).

Los fragmentos  $F(ab')_2$  están compuestos por dos dominios de unión a antígeno (Fab) unidos por un puente disulfuro, lo que les otorga el carácter de bivalentes, es decir, tienen la capacidad teórica de unir dos moléculas del mismo antígeno (Fig. 2). Los  $F(ab')_2$  de origen equino tienen una masa molecular de aproximadamente 110 kDa, y aquellos

antivenenos que se basan en estas moléculas reciben el nombre de *faboterápicos*. El producto obtenido es una mezcla de anticuerpos neutralizantes contra el veneno y anticuerpos contra todos los demás antígenos con los que el animal inmunizado ha estado en contacto, por lo que los anticuerpos médicamente relevantes se encuentran en menor proporción (Segura et al., 2013).



**Figura 2. Digestión enzimática de las inmunoglobulinas.** La digestión con pepsina divide a la IgG por debajo de la región bisagra produciendo un fragmento bivalente llamado  $F(ab')_2$ . Además, la pepsina digiere el fragmento Fc en pequeños fragmentos que generalmente no son recuperados (Feldkamp & Carey, 1996).

La capacidad neutralizante de un antiveneno está en función, principalmente, de los venenos incluidos en la mezcla de inmunización. Por ello, la gran diversidad inmunoquímica del veneno de serpientes restringe la efectividad clínica de un antiveneno a un espectro geográfico y biológico limitado (Gutiérrez et al., 2006; World Health Organization, 2018). No obstante, los antivenenos son capaces de neutralizar (generalmente con menor eficacia) algunos venenos que no son utilizados como inmunógenos en su elaboración. Esta neutralización cruzada se debe a la similitud entre las toxinas presentes en el veneno de serpientes relacionadas filogenéticamente (Segura et al., 2012).

En consecuencia, la selección de los venenos incluidos en la mezcla de inmunización es crítica en la producción de antivenenos (Gutiérrez et al., 2011). Se requiere de un análisis

cuidadoso y basado en el conocimiento científico, que integre información bioquímica, inmunológica, clínica y epidemiológica para el diseño de las mezclas inmunizantes (Gutiérrez et al., 2011). Preferentemente el veneno debe ser colectado de organismos con diferentes edades, provenientes de diversas poblaciones geográficamente representativas y mezclado antes de usarlo como inmunógeno (World Health Organization, 2018).

## **1.5. ANTIVENENOS EN MÉXICO**

En México, los faboterápicos antiviperinos se encuentran regulados por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) y la Norma Oficial Mexicana NOM-036-SSA2-2012, la cual establece “una capacidad neutralizante de no menos de 790  $DL_{50}$  de veneno de *Crotalus sp.* y no menos de 780  $DL_{50}$  de veneno de *Bothrops sp.*” (Norma Oficial Mexicana NOM-036-SSA2-2012, Prevención y control de enfermedades. Aplicación de vacunas, toxoides, faboterápicos (sueros) e inmunoglobulinas en el humano, 2012; Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2014).

Para tratar el envenenamiento por mordedura de vipérido en México, existen dos antivenenos comerciales y un tercero en proceso experimental que pretende salir al mercado pronto. Los tres son de origen equino y funcionan a partir de fragmentos  $F(ab')_2$ , pero utilizan el veneno de diferentes especies como inmunógenos.

### **1.5.1. FABOTERÁPICO POLIVALENTE ANTIVIPERINO**

Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México S.A. de C.V. (Birmex) es una empresa de participación estatal mayoritaria que produce antivenenos desde hace cerca de 90 años (Fan et al., 2019; Temprano et al., 2017). Birmex utiliza una mezcla de veneno de *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper* como inmunógeno para producir cerca de 24,000 viales al año de un antiveneno poliespecífico llamado Faboterápico Polivalente Antiviperino®. Dicha mezcla está compuesta por el veneno de ejemplares juveniles y adultos en una proporción aproximada de 60-80% y de 20-40%, respectivamente. Además, se aseguran de incluir ejemplares de *C. basiliscus* cuyo veneno contenga neurotoxinas (García Bañuelos, comunicación personal, junio de 2020).

El Faboterápico Polivalente Antiviperino® referido en adelante simplemente como “Birmex”, es capaz de neutralizar la actividad letal de los venenos usados como inmunógenos (Segura et al., 2012, 2017), además del veneno de *Crotalus atrox*, *C. culminatus*, *C. simus*, *C. tzabcan*, *C. scutulatus scutulatus*, *C. s. salvini* (M. Sánchez et al., 2020), *C. molossus* (Borja, Neri-Castro, Pérez-Morales, et al., 2018) y *C. ravus* (Gallegos, 2008). Sin embargo, actualmente no existen trabajos que evalúen la potencia

neutralizante de este faboterápico hacia las actividades tóxicas del veneno producido por especies mexicanas no pertenecientes a los géneros *Bothrops* o *Crotalus*.

### **1.5.2. ANTIVIPMYN**

Antivipmyn® es producido por laboratorios Silanés usando como inmunógenos el veneno de *B. asper* y de *C. simus* aunque es probable que sea empleado también el veneno de *C. culminatus*, *C. tzabcan* y *C. mictlantecuhtli* ya que hasta hace poco estas especies eran consideradas subespecies de *C. simus* (Carbajal-Márquez et al., 2020; Wüster et al., 2005). Este faboterápico es capaz de neutralizar la actividad letal de los venenos usados en su elaboración (De Roodt et al., 2014; Neri-Castro, 2010), así como aquellos de *Crotalus atrox*, *C. scutulatus* (Neri-Castro, 2010; E. E. Sánchez et al., 2003), *C. molossus* (Borja, Neri-Castro, Pérez-Morales, et al., 2018; Neri-Castro, 2010; E. E. Sánchez et al., 2003) y de especies pertenecientes a géneros distintos a las serpientes de cascabel, *i.e.*, *Agkistrodon bilineatus* y *Metlapilcoatlus nummifer* (De Roodt et al., 2014).

### **1.5.3. INOSERP**

Inosan Biopharma utiliza una mezcla de venenos de *B. asper*, *C. basiliscus*, *C. simus*, *C. culminatus*, *C. tzabcan*, *C. atrox*, *C. molossus*, *C. s. scutulatus*, *C. s. salvini*, *A. bilineatus* y *Sistrurus catenatus* como inmunógeno para producir Inoserp®, un faboterápico en etapa experimental.

## **1.6. EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE LOS ANTIVENENOS**

A pesar de que los antivenenos son el tratamiento más efectivo y con la mejor relación costo/beneficio para el ofidismo (Brown & Landon, 2010), frecuentemente son inaccesibles para las personas de bajos recursos económicos en ambientes rurales quienes están en mayor riesgo. Adicionalmente, los mercados frágiles y la falta tanto de incentivos financieros como de liderazgo por parte de las organizaciones internacionales de salud pública han hecho de este un campo con pocas mejoras e innovación (Barlow et al., 2009; Williams et al., 2011). Como muestra, la gran mayoría de mezclas de veneno usadas actualmente como inmunógenos fueron establecidas hace varias décadas a pesar de que desde entonces se conoce cada vez más sobre la composición de los venenos, su variabilidad y toxicidad. El conocimiento recién adquirido podría aplicarse al diseño de esquemas de inmunización para producir nuevos antivenenos de amplio espectro o para optimizar los existentes. Para lograr esta mejora, la evaluación preclínica de los antivenenos es un aspecto clave (Calvete et al., 2018; Gutiérrez et al., 2011; Williams et al., 2011).

La neutralización cruzada de venenos similares a los usados en el esquema de inmunización puede expandir el rango de aplicación clínica de algunos antivenenos, pero requiere de ensayos preclínicos para identificar su potencial. Por ende, se debe evaluar la potencia neutralizante de las actividades tóxicas más relevantes tanto de los venenos incluidos en la mezcla de inmunización como del veneno de aquellas especies de importancia médica relacionadas filogenéticamente (Gutiérrez, 2018; Williams et al., 2011).

Aunque útiles, los ensayos de reconocimiento *in vitro* son, por sí mismos, insuficientes para evaluar la eficacia de un antiveneno. Son requeridos, además, ensayos de neutralización *in vivo* (World Health Organization, 2018). No obstante, dichos análisis preclínicos *in vitro* e *in vivo* tienen limitaciones fisiológicas debido a que los protocolos de inyección del veneno y del antiveneno no corresponden a un escenario real de envenenamiento. Incluso existe la posibilidad de que la respuesta orgánica al envenenamiento/tratamiento de parte de los modelos murinos pueda diferir de aquella desarrollada por pacientes humanos. Y aunque el uso de modelos animales sea actualmente la mejor herramienta para el análisis de la sintomatología asociada a un envenenamiento, es imperativo evitar las extrapolaciones simplistas de estos ensayos a la situación clínica. A pesar de todo, estas evaluaciones sobre los antivenenos son esenciales para comprobar su seguridad y determinar su capacidad neutralizante antes de que estos productos sean recomendados para su uso en humanos (Williams et al., 2018; World Health Organization, 2018).

### **1.7. DIVERSIDAD DE SERPIENTES VENENOSAS EN MÉXICO**

México se encuentra entre los países con el relieve más accidentado del planeta. Más de la mitad del territorio se encuentra a más de 1 000 msnm y cerca de la tercera parte de la superficie del país tiene una altitud inferior a 500 m (Rzedowski, 2006). Esta disposición del relieve ha formado 15 provincias fisiográficas principales, cuya heterogeneidad se refleja en una gran variedad de tipos de vegetación y ecosistemas. Lo anterior hace de México uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo.

Las serpientes se distribuyen en todas las masas continentales a excepción de la Antártida, Groenlandia e Islandia (Flores-Villela & García-Vázquez, 2014). En México se registran 442 especies de serpientes, de las cuales sólo el 20% es considerado de relevancia médica (Neri-Castro et al., 2021). Las serpientes de importancia médica en México pertenecen a dos familias: Viperidae y Elapidae. Esta última agrupa a 18 especies y está formada casi exclusivamente por serpientes de coral. Por su parte la familia Viperidae, cuyos integrantes se conocen como vipéridos o simplemente víboras, cuenta con 74 especies

(Uetz et al., 2021) y como se mencionó anteriormente, es la principal responsable de los envenenamientos en el país.

La OMS reconoce dos categorías de serpientes de relevancia médica, la categoría 1 incluye especies sumamente venenosas, con amplia distribución y que causan un elevado número de envenenamientos; la categoría 2 a su vez comprende a especies que no están involucradas en un gran número de accidentes. Para el caso específico de México la categoría 1 incorpora especies como *Agkistrodon bilineatus*, *Bothrops asper*, *Crotalus atrox* y *C. simus*. Por otro lado, *Metlapilcoatlus nummifer*, *Cerrophidion tzotzilorum*, *Crotalus basiliscus* y *Porthidium yucatanicum* forman parte de la categoría 2 (World Health Organization, 2018).

### 1.8. APARATO VENENOSO

El veneno de las serpientes es producido, almacenado e inculado por un aparato venenoso altamente especializado que se encuentra a lo largo del maxilar e incluye la adaptación de glándulas, músculos y dientes. En vipéridos, consta de una glándula principal que desemboca a través de un conducto primario en una glándula accesoria que, a su vez, conecta a un diente hueco por medio de un conducto secundario (Fig. 3). La producción y almacenamiento del veneno ocurren en la glándula principal. Esta glándula contiene cisternas tubulares revestidas de células secretoras donde el veneno es producido. Por otra parte, el almacenamiento del veneno es posible gracias a un gran lumen y dúctulos epiteliales. Durante la mordedura, la glándula principal es comprimida por un músculo especializado que aumenta la presión con la que el veneno es inyectado (Kochva & Gans, 1966; Mackessy, 1991, 2010; Mackessy & Baxter, 2006).

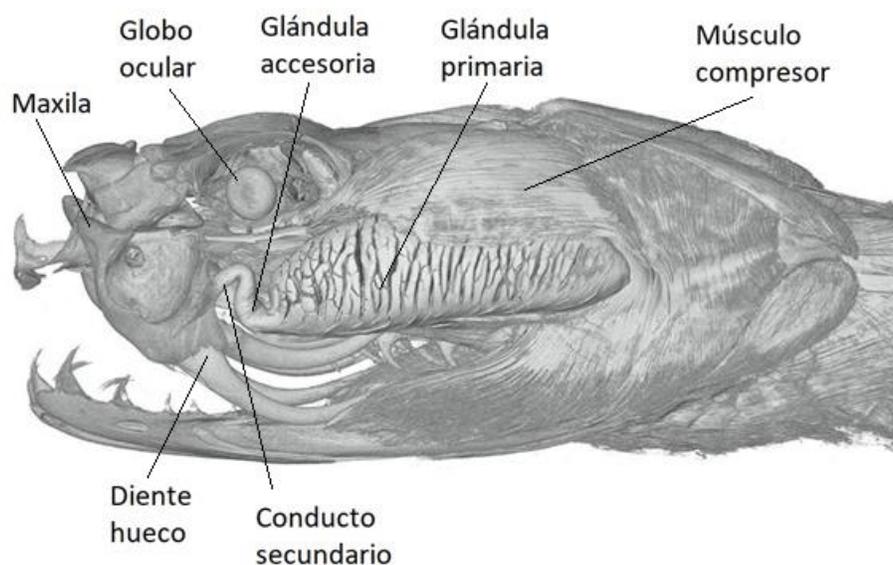


Figura 3. Aparato venenoso en vipéridos. (Imagen cortesía de Dan Rabosky y Erin Westeen).

## **1.9. VENENO**

El veneno es una secreción tóxica que perturba procesos fisiológicos o bioquímicos, facilitando la alimentación y defensa del animal que lo produce (Calvete, Sanz, et al., 2009). El veneno de las serpientes está constituido por elementos orgánicos e inorgánicos. Entre los componentes inorgánicos se encuentran metales como Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Co y Zn (Bjarnason & Fox, 1994). Los elementos orgánicos pueden, a su vez, subdividirse en proteicos y no proteicos, estos últimos agrupan a carbohidratos, lípidos, nucleótidos y aminoácidos. Cerca del 95% del peso seco del veneno corresponde a proteínas y péptidos (Russell, 1980), los cuales alteran la actividad de enzimas, receptores y canales iónicos, desordenando así algunos sistemas como el neuromuscular, cardiovascular, nervioso central y periférico, la coagulación sanguínea y la homeostasis (Fry, 2015; Mackessy, 2010; Moura-da-Silva et al., 2007; E. E. Sánchez et al., 2003).

## **1.10. VENENOS DE VIPÉRIDOS MEXICANOS**

En general, el veneno de los vipéridos está constituido por tres familias proteicas dominantes: fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2s</sub>), metaloproteasas de veneno de serpiente (SVMPs) y serín proteasas de veneno de serpiente (SVSPs). Conjuntamente estas familias representan en promedio el 77% del proteoma del veneno. El 22% restante está formado por otras familias proteicas que se encuentran en menor proporción: L-aminoácido oxidasas (LAAO), proteínas secretoras ricas en cisteína (CRiSP), lectinas tipo C (CTL), desintegrinas (DIS) y péptidos natriuréticos (NP) (Lomonte et al., 2014; Tasoulis & Isbister, 2017).

### **1.10.1. FOSFOLIPASAS**

La superfamilia de las PLA<sub>2s</sub> es un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace éster *sn*-2 de los glicerofosfolípidos, liberando ácidos grasos y lisofosfolípidos. Las PLA<sub>2s</sub> presentes en el veneno de serpientes tienen una masa molecular de entre 12 y 15 kDa (Lomonte & Gutiérrez, 2011), consisten entre 120 y 125 residuos aminoácidos (Ghazaryan et al., 2015), 7 puentes disulfuro y un sitio activo altamente conservado formado por los residuos His48 y Asp93 (Lomonte & Gutiérrez, 2011; Ward et al., 2002). Para llevar a cabo su función catalítica, las SVPLA<sub>2s</sub> requieren de Ca<sup>+</sup> como cofactor (Dennis et al., 2011). Este ión se une a la enzima gracias a un residuo aspártico en la posición 49 (Asp49), el cual está conservado en la estructura de las fosfolipasas enzimáticamente activas (Angulo et al., 2005), que se conocen como D49-PLA<sub>2s</sub>. Sin embargo, en algunas PLA<sub>2s</sub> el Asp49 está sustituido por lisina, serina, asparagina o arginina, produciendo homólogos conocidos como K49-, S49-, N49- y R49- PLA<sub>2s</sub>, respectivamente (Lomonte et al., 2009). A pesar de que estos homólogos son carentes de

actividad enzimática, cuentan con efectos miotóxicos y citotóxicos que son de gran relevancia clínica en los envenenamientos por mordedura de serpiente (Angulo et al., 2005; Ghazaryan et al., 2015; Lomonte & Gutiérrez, 2011).

Las PLA<sub>2</sub>s contenidas en el veneno de vipéridos afectan principalmente al sistema neuromuscular en modelos *in vivo*, ya sea por miotoxicidad o por una combinación de actividades neurotóxicas presináptica y miotóxica. Se han propuesto tres mecanismos para la actividad miotóxica de las PLA<sub>2</sub>s: la hidrólisis de los fosfolípidos membranales por las D49-PLA<sub>2</sub>s; la interacción entre el sarcolema y una región rica en residuos catiónicos e hidrofóbicos cerca del extremo C-terminal de los homólogos K49-PLA<sub>2</sub>s y un tercer mecanismo en el cual además de miotoxicidad sistémica se produce neurotoxicidad, causadas por PLA<sub>2</sub>s heterodiméricas como la crotoxina (Angulo et al., 2005; Lomonte & Gutiérrez, 2011).

La crotoxina fue la primera neurotoxina de origen animal y la primera proteína de veneno de serpiente en ser purificada y cristalizada (Slotta & Fraenkel-Conrat, 1938). Esta molécula y sus homólogos están compuestas por una subunidad básica (subunidad B - SubB-) unida no covalentemente a una subunidad ácida (subunidad A -SubA-). SubB es una D49 PLA<sub>2</sub> y SubA está formada por tres cadenas polipeptídicas unidas por 7 puentes disulfuro (Faure & Bon, 1988; Hawgood & Smith, 1977). Las dos subunidades tienen un comportamiento sinérgico: SubB es tóxica (DL<sub>50</sub>: 10 µg/g, datos no publicados) y al igual que la toxina completa, actúa en las terminales presinápticas (Faure & Bon, 1988); mientras que SubA carece de toxicidad y actividad enzimática (Hawgood & Smith, 1977), pero juega un papel muy importante al permitir que SubB alcance los posibles receptores específicos en la unión neuromuscular, aumentando así su letalidad (Faure et al., 2003; Faure & Bon, 1988).

Esta neurotoxina se une al receptor específico R48 localizado en la membrana presináptica, formando el complejo transitorio SubA-SubB-R48. Posteriormente se disocia liberando a SubA, lo que bloquea la transmisión neuromuscular (Faure et al., 2011), produce parálisis flácida y fallo respiratorio (Hawgood & Smith, 1977; Vital-Brazil & Excell, 1971). Aunado a las actividades neurotóxicas y miotóxicas, la crotoxina puede producir nefrotoxicidad y cardiotoxicidad (Sampaio et al., 2010).

La crotoxina y sus homólogos cobran gran relevancia clínica al estar presentes en el veneno de vipéridos que se distribuyen en México, principalmente serpientes de cascabel, *i. e.*, *Crotalus scutulatus* (Glenn & Straight, 1989), *C. basiliscus*, *C. mitchelli* (Chen et al., 2004), *C. tigris* (Weinstein & Smith, 1990), *C. lepidus* (Rivas et al., 2017), *C. simus*, *C. tzabcan*, *C. mictlantecuhtli* (Carbajal-Márquez et al., 2020; Castro et al., 2013) y otros

vipéridos como *Ophryacus sphenophrys* (Neri-Castro et al., 2019) y *Mixcoatlus melanurus* (Neri-Castro, Sanz, et al., 2020).

### **1.10.2. METALOPROTEASAS**

Las SVMPs (snake venom metalloproteinases) conforman una subfamilia de enzimas endoproteolíticas dependientes de zinc que contienen una secuencia de unión a este ión, típicamente HEXXHXXGXXH (Bjarnason & Fox, 1994; Bode et al., 1996; Kini & Koh, 2016; Moura-da-Silva et al., 2007; Teixeira et al., 2005). Se pueden organizar de acuerdo con los dominios que las conforman en cuatro grupos, cada uno más complejo que el anterior: el P-I (25-30 kDa) sólo contiene el dominio metaloproteasa; el P-II (30-45 kDa) incluye además un dominio tipo desintegrina; el P-III (50-100 kDa) suma un dominio rico en cisteína y el P-IV incorpora también un par de dominios tipo lectina unidos por puentes disulfuro (Hite et al., 1994). La especificidad de los sustratos reconocidos por las SVMPs es muy amplia, incluyendo proteínas del plasma y la membrana basal vascular como laminina, nidógeno, colágeno tipo IV y fibronectina (Gutiérrez et al., 2016; Moura-da-Silva et al., 2007).

Estas enzimas representan la familia proteica más abundante en el veneno de muchos vipéridos (Calvete, Sanz, et al., 2009; Tasoulis & Isbister, 2017) y son las principales responsables de la actividad fibrinogenolítica así como de la hemorragia local y sistémica observada en los envenenamientos causados por este grupo de serpientes (Bjarnason & Fox, 1994; Moura-da-Silva et al., 2007). La hemorragia local puede causar isquemia y contribuir a la regeneración deficiente del tejido (Gutiérrez et al., 1995), por su parte, la hemorragia sistémica afecta diversos órganos produciendo serias complicaciones como shock cardiovascular, sangrado pulmonar y hemorragia del sistema nervioso central (Cardoso et al., 1993; Otero, Gutiérrez, et al., 2002). Asimismo, las SVMPs son fuertemente proinflamatorias y han sido asociadas con otros síntomas como mionecrosis, edema y diversas coagulopatías (Gutiérrez et al., 1995, 2016; Mackessy, 2010; Teixeira et al., 2005).

Se han propuesto dos mecanismos mediante los cuales las SVMPs producen hemorragia: *per rhexis* (Ownby et al., 1974) y *per diapedesis* (Ohsaka, 1979), los cuales ocurren principalmente en los capilares sanguíneos y en las vénulas, respectivamente (Gutiérrez et al., 2005; Gutiérrez & Rucavado, 2000). En la hemorragia *per rhexis* la extravasación de eritrocitos ocurre a través de células endoteliales dañadas por la acción de las SVMPs (Ownby et al., 1974, 1978; Ownby & Geren, 1987). En contraste, en la hemorragia *per diapedesis* la ruptura de las proteínas de la membrana basal provoca que los eritrocitos escapen por las uniones intercelulares (Gonçalves & Mariano, 2000; Ohsaka, 1979).

### **1.10.3. SERÍNPROTEASAS**

Las SVSPs (snake venom serin proteases) son enzimas generalmente glicosiladas con actividad proteolítica que incorporan 12 residuos de cisteína formando seis puentes disulfuro, uno de los cuales es característico y se encuentra conservado (Itoh et al., 1987; Parry et al., 1998). A pesar de que los integrantes de este grupo muestran una alta identidad de secuencia entre sí (60-70%), reconocen sustratos diferentes con una alta especificidad (Murayama et al., 2003). Estas enzimas hidrolizan enlaces peptídicos después de una arginina o lisina en posición P1 (Serrano, 2013), aunque su actividad es influenciada en gran medida por el motivo peptídico adyacente al enlace escindible (Murayama et al., 2003). Su mecanismo involucra una triada catalítica conservada en las serino proteasas conformada por residuos de serina, histidina y aspartato (Parry et al., 1998). El residuo de serina es altamente reactivo y tiene un papel esencial en la formación de un complejo transitorio acil-enzima, el cual es estabilizado por la histidina y el aspartato (Barrett & Rawlings, 1995). Aunque no son letales por sí mismas, las SVSPs contribuyen a los efectos tóxicos de los demás componentes del veneno (Braud et al., 2000). Afectan principalmente al sistema hemostático, ya sea de forma inespecífica por degradación proteolítica o de manera selectiva al activar/inhibir diversos factores involucrados en la agregación plaquetaria, la coagulación y la fibrinólisis (Braud et al., 2000; Matsui et al., 2000; Serrano, 2013).

Muchas SVSPs tienen actividad procoagulante al hidrolizar preferencialmente la cadena  $\alpha$  seguida de la cadena  $\beta$  del fibrinógeno (J. O. Costa et al., 2010; Matsui et al., 2000; Zaqueo et al., 2014), lo que puede liberar los fibrinopéptidos A y B, respectivamente. Estos péptidos se ensamblan espontáneamente formando protofibrillas (Mosesson, 2005). Sin embargo, debido a que las SVSPs no hidrolizan exactamente el mismo sitio que la trombina endógena y no activan al factor de coagulación XIII que promueve el entrecruzamiento de los fibrinopéptidos, el coágulo que producen presenta una limitada polimerización (J. O. Costa et al., 2010; Vivas-Ruiz et al., 2020). Dado que esta actividad se asemeja a la de la trombina, estas enzimas se denominan serínproteasas “tipo trombina” o “*thrombin-like*” (TL-SVSP) (Stocker et al., 1982).

### **1.10.4. OTRAS FAMILIAS PROTEICAS PRESENTES EN EL VENENO DE VIPÉRIDOS**

Las LAAOs son flavoenzimas generalmente diméricas con masas moleculares de entre 120 y 150 kDa, responsables del característico color amarillo presente en la mayoría de venenos (Guo et al., 2012). Catalizan la desaminación oxidativa estereoespecífica de un amplio rango de L-aminoácidos, mostrando cierta especificidad hacia los aromáticos o hidrofóbicos. La desaminación da lugar a  $\alpha$ -cetoácidos, produciendo amonio y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), lo cual contribuye a la toxicidad del veneno gracias al estrés oxidativo

generado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Costa et al., 2014; Guo et al., 2012). Además, se ha mostrado que las LAAOs pueden inducir (Ali et al., 2000) o inhibir (Samel et al., 2006) la agregación plaquetaria, inducen apoptosis en distintas líneas celulares tumorales (Suhr & Kim, 1996) y exhiben actividad antimicrobiana (Skarnes, 1970) y antiviral (Zhang et al., 2003).

Las CRiSP son polipéptidos de cadena sencilla con pesos moleculares que van de 20 a 30 kDa (Suntravat et al., 2019). Tienen 16 residuos de cisteína estrictamente conservados (Tadokoro et al., 2020), de los cuales 10 se encuentran en el extremo C-terminal (Yamazaki & Morita, 2004). Generalmente son asociadas con la inhibición no enzimática de canales en la membrana celular, aunque algunas presentan otras actividades como miotoxicidad, inhibición de la angiogénesis o regulación de la permeabilidad capilar (Lecht et al., 2015; Suntravat et al., 2019; Yamazaki & Morita, 2004).

Las desintegrinas son una familia de polipéptidos presentes en el veneno de vipéridos que bloquean selectivamente la función de los receptores de integrina  $\beta_1$  y  $\beta_3$ . Se originan por el procesamiento proteolítico de las P-II SVMPS, separando los dominios metaloproteasa y desintegrina, los cuales pueden actuar de forma independiente (Mackessy, 2010). La mayoría de estas moléculas tienen una secuencia de reconocimiento de integrinas, conformada por la triada arginina-glicina-ácido aspártico (llamada RGD) (Huang et al., 1987). Gracias a su interacción con las integrinas, son capaces de inhibir diversos procesos biológicos como la agregación plaquetaria, metástasis, angiogénesis y crecimiento tumoral (Rivas et al., 2020).

### **1.11. VARIACIÓN INTRAESPECÍFICA EN EL VENENO**

Los efectos producidos por el veneno en los diferentes organismos no son siempre homogéneos y dependen no sólo de la cantidad inoculada, si no de las moléculas que contiene, las cuales pueden variar considerablemente. Además de la inherente diversidad intergenérica e interespecífica en la composición del veneno, distintos reportes han correlacionado la variación en el veneno de vipéridos con distintos factores como la dieta (Barlow et al., 2009; Creer et al., 2003; Daltry et al., 1996; Mackessy, 1988), la edad del organismo (Andrade & Abe, 1999; Borja, Neri-Castro, Pérez-Morales, et al., 2018; Lomonte et al., 1983; Mackessy, 1988; Neri-Castro & Ponce-López, 2018), el sexo (Menezes et al., 2006) o la distribución geográfica (Alape-Girón et al., 2008; Borja, Neri-Castro, Castañeda-Gaytán, et al., 2018; Glenn & Straight, 1978; Rivas et al., 2017).

Esta disparidad en la composición y, por ende, en las actividades biológicas del veneno se ve reflejada en las distintas (y en ocasiones impredecibles) manifestaciones clínicas del accidente ofídico y puede causar inconsistencias en la capacidad neutralizante de los antivenenos. Por ello, desde un punto de vista terapéutico, el conocimiento de la

variación intraespecífica del veneno permitiría un tratamiento más efectivo de los pacientes envenenados (Borja, Neri-Castro, Pérez-Morales, et al., 2018; Chippaux et al., 1991).

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

A pesar de que la producción de antivenenos en México tiene una larga historia y estos están considerados entre los mejores del mundo, no existen hasta la fecha estudios enfocados en evaluar su capacidad neutralizante hacia especies de vipéridos no pertenecientes al género *Crotalus*.

## **3. HIPÓTESIS**

Debido a que los antivenenos son producidos a partir de una mezcla que incluye un número limitado de venenos, el reconocimiento y la neutralización cruzada hacia venenos no incluidos en la mezcla de inmunización será variable.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

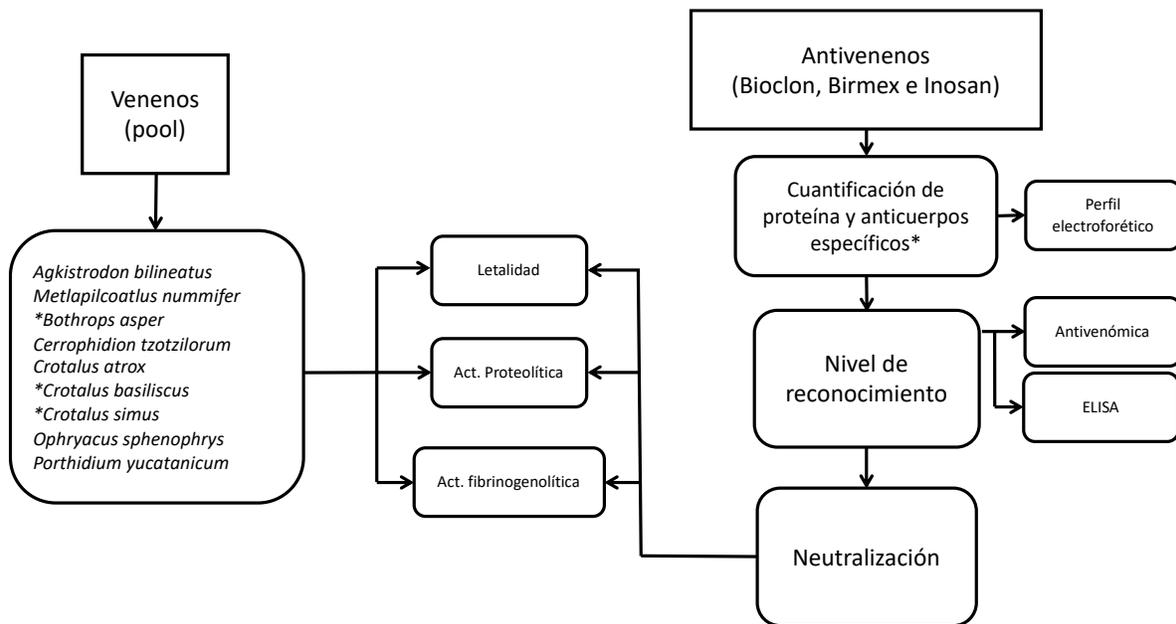
Evaluar el nivel de reconocimiento y la capacidad neutralizante de los dos antivenenos comerciales y el antiveneno experimental hacia el veneno de nueve especies de vipéridos pertenecientes a siete géneros distintos.

### **4.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Caracterizar las actividades bioquímicas y biológicas más relevantes (proteolítica, fibrinogenolítica y letal) del veneno de nueve especies de vipéridos mexicanos.
- Determinar el nivel de inmunoreconocimiento de los faboterápicos hacia los componentes del veneno mediante métodos cuantitativos (ELISA).
- Evaluar la potencia neutralizante de tres lotes de cada antiveneno hacia las actividades antes mencionadas.

## 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El proyecto fué dividido en dos etapas: La parte de los venenos consistió en la caracterización de sus principales actividades biológicas y bioquímicas; por otro lado, durante la etapa de los antivenenos, estos fueron caracterizados, se evaluó su nivel de reconocimiento hacia los venenos así como la potencia neutralizante de las actividades ya mencionadas.



**Figura 4.** Diagrama de flujo mostrando la estrategia metodológica seguida en el presente trabajo. \*, la cuantificación de anticuerpos específicos se llevó a cabo únicamente para tres venenos utilizados como inmunógenos: *B. asper*, *C. basiliscus* y *C. simus*.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. USO DE ANIMALES DE LABORATORIO

En el presente trabajo se utilizaron ratones CD-1, de sexo indistinto, de 18 a 21 g de peso para la determinación de las diferentes dosis letales medias (DL<sub>50</sub>) y dosis efectivas medias (DE<sub>50</sub>). Todos los ratones provinieron de la Unidad de Bioterio del Instituto Biotecnología (IBt) de la UNAM y fueron mantenidos en un fotoperiodo de 12/12 h de luz/obscuridad, con alimento y agua *ad libitum*.

## 6.2. FABOTERÁPICOS

Todos los antivenenos usados en el presente trabajo fueron obtenidos del Banco de Antivenenos del Laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano, en el IBt. Se incluyeron tres lotes de Antivipmyn, tres lotes de Birmex y dos lotes de Inoserp. Todos los ensayos fueron realizados antes de vencida la caducidad de cada lote. En el cuadro 1 se muestran los faboterápicos empleados.

**Cuadro 1.** Lotes de los faboterápicos incluidos en el presente estudio.

Faboterápico	Lote	Caducidad
Antivipmyn	B-6J-31	Ago-20
	B-8K-31	Sep-22
	B-8H-34	Jun-22
Birmex	FV045A	Feb-21
	FV043A	Sep-20
	FV044A	Oct-20
Inoserp	8805181002	Oct-20
	8805181003	Nov-20

## 6.3. VENENOS

Todos los venenos usados en los ensayos pertenecen al banco de venenos del laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano, en el IBt. A fin de incluir la mayor diversidad posible, se analizó el veneno de 9 especies de vipéridos pertenecientes a 7 géneros distintos. Todas las especies se distribuyen en México, 5 de forma endémica. Para cada mezcla se utilizó el veneno de 2 a 11 ejemplares, cubriendo la mayor extensión de su distribución posible (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Venenos usados en el presente estudio. *Se muestran las localidades reportadas en la base de datos del banco de venenos, para algunas muestras sólo se conoce la entidad federativa de origen. ND, no se determinó el peso seco de las muestras; NI, no se cuenta con información sobre la localidad de colecta; \*, mezclas ya existentes en el banco de veneno, entre paréntesis se indica el número de ejemplares diferentes de los cuales provienen los venenos que componen dicha mezcla.*

Especie	Clave de identificación de los individuos o de las mezclas	Sitio de colecta	Peso seco (mg)
<i>A. bilineatus</i>	HK103	Ejido San Vicente, Tuxpan, Nayarit	20.8
	Lote DeVal Animal* (2)	Nayarit; Colima	10.3
	HK170	El Limón, Tepalcingo, Morelos	10.4

	Lote Luis Román* (5)	Nayarit; Chiapas	10.1
	HK087	Tuxtla Gutiérrez, Chiapas	10.2
	M. Varela Chiapas	Chiapas	9.6
	HK036	Carretera a Ixtlahuacán, Colima	10.4
<i>B. asper</i>	<i>B. asper</i> Master Mix*	Diversas localidades a través de su rango de distribución.	ND
	HK096	Tierra Colorada, Zinacantán, Chiapas	15.1
<i>C. tzotzilorum</i>	HK097	Tierra Colorada, Zinacantán, Chiapas	15.3
	HK250	Peñón Blanco, Durango	39.8
<i>C. atrox</i>	Atrox colección IBt A170117-Pool* (2)	NI	40.0
	B1313-IBT-014	NI	40.1
	CLPT1047	NI	39.9
	CLPT ZO	Huaxtla, Zapopan, Jalisco	4.3
	CB-CoP	Ixtlahuacán, Colima	5.8
<i>C. basiliscus</i>	Ext. 0087 G0515	Colima	9.25
	CbaA276	Coahuayana, Michoacán	11.2
	CB-NayA	Coahuayana, Michoacán	8.9
	Cba-IBt	San Blas, Nayarit	4.0
		Jalisco	9.1
<i>C. simus</i>	<i>C. simus</i> * (11)	Playas del Conchal, Veracruz; Actopan, Veracruz; La Tinaja, Veracruz; Punta Nacional, Veracruz; Tinajas, Veracruz; Chiapa de Corzo, Chiapas; Copainalá, Chiapas; Santo Domingo, Oaxaca	ND
<i>M. nummifer</i>	Lote Belem García * (11)	Córdoba, Veracruz; Ixtaczoquitlán, Veracruz; San Rafael, Veracruz; Actopan, Veracruz; Zongolica, Veracruz	ND
<i>O. sphenophrys</i>	<i>O. sphenophrys</i> * (2)	Cerro Perico, Oaxaca	ND

<i>P. yucatanicum</i>	HK209	Solidaridad, Quintana Roo	7.1
	HK210	Solidaridad, Quintana Roo	10.4

#### 6.4. CUANTIFICACIÓN PROTEICA DE LOS ANTIVENENOS

Se determinó el contenido proteico de tres viales por cada lote de antiveneno, para ello, el contenido liofilizado de cada vial fue resuspendido en 10 mL de agua bidestilada y posteriormente se midió absorbancia a 280 nm ( $A_{280}$ ) de diluciones duplicadas 1:50 en un espectrofotómetro UV BioMate 3S marca Thermo Scientific. La concentración de proteína se determinó con la siguiente fórmula:

$$[\text{Proteína}](\text{mg/mL}) = \frac{A_{280} \times \text{Factor de dilución}}{\epsilon_{280}}$$

Donde:

- $\epsilon_{280}$  es el coeficiente de extinción molar para los fragmentos  $F(ab')_2 = 1.4$  (Schlamowitz et al., 1975).

#### 6.5. CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LOS ANTIVENENOS

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de acuerdo con el método de Laemmli (1970). Esta técnica consiste en utilizar dos geles: un gel concentrador y uno separador. Todos los ensayos electroforéticos en este trabajo se realizaron utilizando geles separadores a una concentración del 12.5 % y geles concentradores al 5%. Se realizaron migraciones tanto en condiciones reductoras como no reductoras; para el tratamiento reductor, las muestras fueron llevadas a punto de ebullición a baño maría durante 5 minutos en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol. De acuerdo con el ensayo a realizar, cantidades variables de proteína fueron cargadas en cada carril. Se utilizó una cámara de electroforesis marca BIO-RAD modelo Mini-PROTEAN Tetra Cell a un voltaje constante de 120 V. Finalizada la migración, los geles fueron teñidos con Azul Brillante Coomasie G-250.

#### 6.6. CUANTIFICACIÓN DE $F(ab')_2$ ESPECÍFICOS

Se realizaron cromatografías de afinidad en columnas con CNBr-Activated Sepharose 4B (CNBrS) de Sigma-Aldrich. Esta matriz se empleó como soporte para inmovilizar 9 mg de veneno de *Bothrops asper*, *Crotalus simus* y *C. basiliscus* en tres columnas diferentes con un volumen de 2 mL cada una. El procedimiento para la preparación de las columnas se

detalla en el [Anexo I](#). Una vez que las moléculas del veneno se acoplaron a la resina, cada columna se incubó durante una hora a temperatura ambiente con 20 mg de antiveneno cuantificados mediante  $A_{280}$  como se detalla en la sección **6.4**. El volumen final de reacción fue llevado a 2 mL con buffer de fosfatos salino (PBS). Después del tiempo de incubación, la columna se sometió a múltiples lavados con distintos buffers, todos ellos de 1 mL. Inicialmente, se realizaron 15 lavados con PBS para eluir los fragmentos  $F(ab')_2$  que no reconocieron al veneno acoplado a la resina, esta fracción se denominó Fracción no retenida (FNR) y se cuantificó mediante  $A_{280}$ . Posteriormente, se realizaron 5 lavados con Buffer de Elución ( $CH_3COOH$  0.1 M) seguidos de 10 lavados con PBS. Cada uno de estos 15 lavados se colectó individualmente de forma manual y se le midió  $A_{280}$ ; aquellos con valor  $\geq 0.020$  se agregaron en una fracción denominada Retenida (FR), la cual se cuantificó mediante  $A_{280}$ . Después, se realizó un lavado con NaOH 50 mM e inmediatamente siete lavados con PBS. Cada uno de estos ocho lavados se colectó individualmente de forma manual y se le midió  $A_{280}$ ; aquellos con valor  $\geq 0.020$  se juntaron en una fracción denominada Hiper-Retenida (FHR). Finalmente, para calcular las proporciones de las distintas fracciones, se usaron las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ de } F(ab')_2 \text{ específicos} = \frac{\{[FR] \times V_{FR}\} + \{[FHR] \times V_{FHR}\}}{20} \times 100$$

$$\% \text{ de } F(ab')_2 \text{ no específicos} = \frac{[FNR] \times V_{FNR} \times 100}{20}$$

Donde:

- [FR] = concentración de FR
- $V_{FR}$  = volumen de FR
- [FHR] = concentración de FHR
- $V_{FHR}$  = volumen de FHR
- [FNR] = concentración de FNR
- $V_{FNR}$  = volumen de FNR
- El 20 en el divisor hace referencia a los 20 mg de antiveneno con los que se incubó cada columna

## **6.7. CUANTIFICACIÓN PROTEICA DE LOS VENENOS**

En el banco de venenos, éstos se mantienen liofilizados y bajo refrigeración. Para los ensayos es necesario resuspender los venenos en PBS y cuantificar la solución. La cuantificación se realiza a través del método del ácido bicinconínico (BCA) usando el kit Pierce BCA Protein Assay, de la marca Thermo Scientific. Diluciones 1:20 o 1:50 de los stocks de veneno se cuantificaron por absorbancia a 280 nm para asegurarse de que se

encontraban dentro del rango de la curva; estas diluciones se usaron como muestras a analizar. Para obtener la curva de calibración se utilizaron cinco estándares de albúmina sérica bovina, de 20, 40, 80, 160 y 320  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Posteriormente en una microplaca de 96 pozos se colocaron 196  $\mu\text{L}$  de Solución A, 4  $\mu\text{L}$  de Solución B y 25  $\mu\text{L}$  de muestra o estándar en cada pozo. Se analizaron los estándares por duplicado, las muestras por triplicado y se utilizó un blanco como control. La placa fue incubada durante dos horas a 37 °C después de colocar las muestras. Después del tiempo de incubación, se leyó absorbancia a 570 nm con un lector de microplacas marca TECAN modelo SUNRISE y los datos se analizaron con el software Magellan versión 4.3 (Tecan, Männedorf, Suiza).

## **6.8. CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LOS VENENOS**

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de acuerdo con la metodología descrita en la sección 6.5. Para la caracterización del perfil electroforético de los venenos se cargaron 25  $\mu\text{g}$  de muestra.

## **6.9. EVALUACIÓN DEL NIVEL DE RECONOCIMIENTO**

### **6.9.1. ENSAYO DE INMUNOADSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)**

El nivel de reconocimiento de un lote de cada faboterápico hacia los distintos venenos fue evaluado mediante ELISAs indirectos. Estos ensayos requieren que el antígeno sea reconocido por un anticuerpo primario, que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario. Este último se encuentra conjugado con un enzima que producirá una reacción cromógena al añadir el sustrato. En el presente trabajo, la definición de título fue establecida como la concentración de antiveneno en  $\text{mg}/\text{mL}$  necesaria para alcanzar la mitad de la señal máxima. Lo anterior implica que cuanto menor sea el valor de un título, mejor será el reconocimiento del antiveneno hacia un veneno dado.

Para sensibilizar la microplaca con los componentes antigénicos presentes en los venenos, se preparó una solución de cada veneno a concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en buffer de sensibilizado ( $\text{NaHCO}_3$  100 mM, pH 9.5), añadiendo 100  $\mu\text{L}$  de solución de sensibilizado a cada pozo con excepción de la columna 12 que se utilizó como control negativo. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante una hora (Fig. 5A) y después se lavaron tres veces con 200  $\mu\text{L}/\text{pozo}$  de buffer de lavado (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.05%, pH 8.0). Para bloquear los sitios libres de antígenos, las placas fueron incubadas a 37 °C por dos horas con 200  $\mu\text{L}/\text{pozo}$  de buffer de bloqueo (Tris-HCl 50 mM, gelatina 5  $\text{mg}/\text{mL}$ , Tween 20 0.02%, pH 8.0) y a continuación fueron lavadas tres veces con 200  $\mu\text{L}/\text{pozo}$  de buffer de lavado. Después, se agregaron a la placa 100  $\mu\text{L}/\text{pozo}$  de buffer vehículo (Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.5 M, gelatina 1  $\text{mg}/\text{mL}$ , Tween 20 0.05%, pH 8.0). Los lotes número 1

de los distintos faboterápicos fueron empleados como anticuerpo primario (Fig. 5B), para lo cual se prepararon soluciones a 700 µg/mL en buffer vehículo, agregando 50 µL en la primera columna y llevando a cabo diluciones seriadas 1:3 hasta la última columna. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante una hora y posteriormente se lavaron tres veces con 200 µL/pozo de buffer de lavado. Como anticuerpo secundario se utilizó una dilución 1:3000 del anticuerpo comercial *Affinity Purified Antibody Peroxidase Labeled Goat anti-horse IgG* marca KPL, lote 120607, agregando 100 µL/pozo (Fig. 5C). Las placas fueron incubadas por una hora a 37 °C y después fueron lavadas tres veces con 200 µL/pozo de buffer de lavado. Para el revelado de las placas (Fig. 5D), se prepararon por placa 10 mL de buffer de revelado (ABTS 0.5 mg/mL, buffer citrato-fosfato 70 mM, pH 4.2), al que le fueron añadidos 5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%. Se agregaron 100 µL/pozo de buffer de revelado y se incubaron las placas durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se midió la absorbancia a 405 nm con un lector de microplacas marca TECAN modelo SUNRISE y los datos se analizaron con el software Magellan versión 4.3 (Tecan, Männedorf, Suiza).

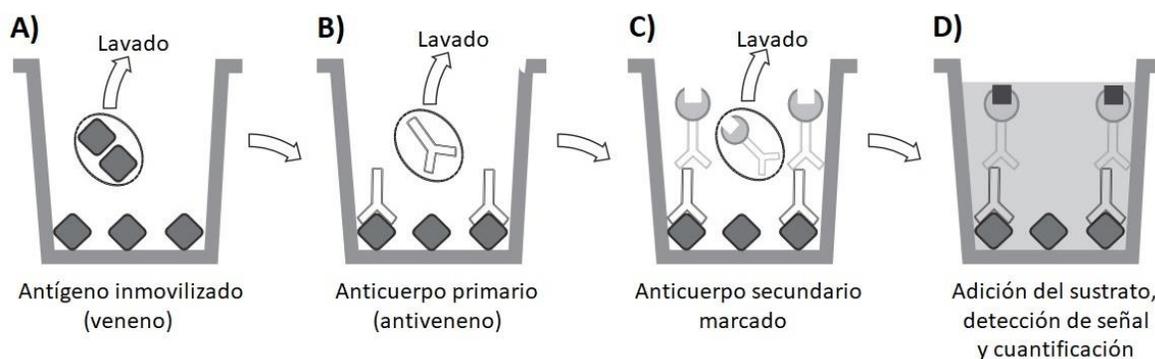


Figura 5. ELISA indirecto esquematizado. Modificado de Kohl & Ascoli (2017).

### 6.9.2. RECONOCIMIENTO MEDIANTE UN ENFOQUE DE ANTIVENÓMICA

Con la finalidad de evaluar cuantitativamente el reconocimiento de los faboterápicos hacia el veneno de especies médicamente relevantes, se llevaron a cabo ensayos de antivenómica de segunda generación utilizando el método descrito por Pla et al. (2012).

Para ello, los ensayos fueron realizados en columnas Pierce Centrifuge Columns de la marca Thermo Scientific, usando como resina CNBrS de Sigma-Aldrich. Esta matriz se empleó como soporte para inmovilizar 4 mg de antiveneno en 500 µL de resina. El procedimiento para la preparación de las columnas se detalla en el Anexo I. Una vez que las moléculas del antiveneno fueron acopladas a la resina, las columnas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con 300 µg de veneno de *B. asper*, *C. atrox* o *C. simus*. El volumen final de cada muestra fue llevado a 400 µL con PBS. Después del tiempo de incubación, se colocó cada columna en un microtubo de 1.5 mL y fue sometida a pulsos

de centrifugación de tres segundos hasta secar la resina. Se recuperó el filtrado y se realizaron dos lavados adicionales con 400  $\mu$ L de PBS que fueron centrifugados y adicionados al primer volumen eluido. Esta fracción se denominó *No reconocida*. Posteriormente, la columna se cambió a un microtubo nuevo al cual le fueron añadidos 120  $\mu$ L de Buffer de neutralización (TRIS 1M pH 9). La matriz fue lavada tres veces con 360  $\mu$ L de Buffer de elución ( $\text{CH}_3\text{COOH}$  0.1 M pH 2.3) y el filtrado se denominó fracción *Reconocida*. Finalmente, cada fracción fue sometida a una cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa y los perfiles cromatográficos fueron comparados con aquellos resultantes del análisis de 300  $\mu$ g de veneno sin tratar, calculando el área bajo la curva de los picos principales.

### **6.9.3. WESTERN BLOT DE LA RESINA USADA EN ANTIVENÓMICA**

De acuerdo con los resultados de los ensayos de antivenómica, se decidió llevar a cabo ensayos de reconocimiento por western blot para evaluar la posible retención de veneno por parte de los  $\text{F(ab')}_2$  inmovilizados en la resina. Para ello, se realizaron SDS-PAGE en condiciones reductoras de acuerdo a lo descrito en la sección 6.5. En el caso de las muestras que involucran CNBrS, estas se prepararon tomando 40  $\mu$ L de matriz y se les agregó 10  $\mu$ L de buffer de carga 5X, se hirvieron a baño maría durante 5 minutos y fueron centrifugadas a 13,000 rpm durante 5 minutos. Se tomaron 15  $\mu$ L del sobrenadante los cuales fueron cargados en un carril. Terminada la migración, las proteínas contenidas en el gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa en una cámara semi-húmeda con Buffer de transferencia (glicina 39 mM, Tris 48 mM, SDS 0.037 %, metanol 20 %) durante una hora a corriente constante de 400 mA. A continuación, la membrana se incubó con Buffer TBST (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.05 %, pH 7.5) + 5 % de leche descremada por dos horas en agitación constante para bloquear los sitios que no contienen ligando. Posteriormente, la membrana fue sometida a tres lavados consecutivos con Buffer TBST y se incubó durante una hora con 10 mL de solución del lote 1 de Antivipmyn 100  $\mu$ g/mL en Buffer TBST como anticuerpo primario. Pasado el tiempo de incubación, la membrana se lavó nuevamente tres veces con Buffer TBST y fue incubada durante una hora con 10 mL de una dilución 1:1000 de Affinity Purified Antibody Peroxidase Labeled Goat anti-horse IgG marca KPL, lote 120607 como anticuerpo secundario en Buffer TBST. Finalmente, se lavó la membrana 3 veces más con Buffer TBST y fue revelada con 1 mL de TMB Ready-to-use for Immunoblot de la marca Zymed, deteniendo la reacción con agua destilada.

## 6.10. DETERMINACIÓN DE LAS PRINCIPALES ACTIVIDADES BIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS

### 6.10.1. ACTIVIDAD LETAL

La Dosis Letal media (DL<sub>50</sub>) se define como la cantidad de veneno necesaria para producir la muerte en la mitad de una población dada y es una medida usada con la finalidad de evaluar y comparar la actividad letal de distintos venenos. Es conveniente precisar que trabajos anteriores han reportado bajo la misma metodología la DL<sub>50</sub> de algunos venenos usados en el presente proyecto, específicamente: *M. nummifer*, *B. asper*, *C. simus* y *O. sphenophrys* (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Valores de DL<sub>50</sub> reportadas con anterioridad.** *DL<sub>50</sub> hace referencia a la cantidad de veneno necesaria para producir la muerte en la mitad de una población dada. En todos los casos, se inyectaron cantidades variables de veneno vía intravenosa a ratones CD-1.*

Especie	DL <sub>50</sub> (µg/ratón)	Cita
<i>A. bilineatus</i>	36.5	Román-Domínguez et al., 2019
<i>B. asper</i>	11.0	Datos no publicados
<i>C. simus</i>	3.0	Castro et al., 2013
<i>M. nummifer</i>	132.6	García-Osorio et al., 2020
<i>O. sphenophrys</i>	16.7	Neri-Castro et al., 2019

Para determinar la DL<sub>50</sub> del resto de venenos, grupos de tres ratones de 18 a 20 g fueron inyectados vía intravenosa (i.v.) en la vena caudal lateral con distintas cantidades de veneno diluidas en 500 µL de PBS. Como grupo control, se inyectaron tres ratones con 500 µL de PBS. El porcentaje de mortalidad de cada grupo experimental fue registrado 24 horas después de la inoculación. Los datos obtenidos se graficaron y analizaron en función del logaritmo de la cantidad de veneno, empleando un modelo de regresión no lineal tipo sigmoidal de dosis-respuesta. El software GraphPad Prism versión 8.2.1 (GraphPad Software, California, EE. UU.) fue empleado para calcular el valor de las DL<sub>50</sub>.

### 6.10.2. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA *IN VITRO*

Para evaluar la actividad proteolítica *in vitro* sobre azocaseína, se modificó la metodología propuesta por Wang y colaboradores (2004). Se preparó una solución de azocaseína 10

mg/mL en buffer Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.15 M y CaCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 8.0. Se incubaron por triplicado 100 µL de la solución de azocaseína con 20 µg de veneno a 37 °C durante 30 minutos, utilizando como control negativo 100 µL de azocaseína con 3 µL de PBS. La reacción fue detenida al agregar a cada tubo 200 µL de ácido tricloroacético al 5 % y homogenizar la mezcla. Después, los tubos fueron centrifugados a 13,400 rpm durante 10 minutos y 150 µL del sobrenadante fueron mezclados con 150 µL de NaOH 0.5 M en una microplaca de 96 pozos. Posteriormente, se midió absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas marca TECAN modelo SUNRISE y los datos se analizaron con el software Magellan versión 4.3 (Tecan, Männedorf, Suiza). Finalmente, la determinación cuantitativa de la actividad proteolítica fue expresada como actividad específica (U/mg) a partir de la siguiente fórmula:

$$U/mg = \frac{1000}{((\mu\text{g de veneno} \times 0.2)/(\Delta A_{450 \text{ nm}}/30))}$$

Donde:

- U = unidad de actividad proteolítica, definida como la cantidad de veneno necesaria para producir un cambio en la absorbancia de 0.2 unidades por minuto a 450 nm.
- $\Delta A_{450 \text{ nm}}$  = cambio en la absorbancia a 450 nm con respecto del control negativo

### **6.10.3. ACTIVIDAD FIBRINOGENOLÍTICA *IN VITRO***

Se evaluó la actividad fibrinogenolítica *in vitro* de los distintos venenos con la finalidad de caracterizar su actividad proteolítica hacia esta proteína hemostática. Adicionalmente, se incluyó un pretratamiento a las muestras de veneno con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como agente quelante para inhibir la acción de las SVMPS. En los ensayos se modificó el método descrito por Menezes y colaboradores (2006). Se realizaron diluciones conteniendo 50 µg de fibrinógeno humano marca Sigma-Aldrich y 10 µg de cada veneno, se incubó cada muestra a 37 °C durante 40 minutos. Para los ensayos de inhibición de las SVMPS las muestras de veneno fueron incubadas con EDTA 5 mM a 37 °C durante 30 minutos previo a la incubación con fibrinógeno. En ambos casos el volumen de reacción fue llevado a 50 µL con PBS pH 7.2. Después de la incubación con fibrinógeno, se golpeó suavemente la punta del microtubo a fin de disgregar el gel formado y se tomó una alícuota de 5 µL para su análisis por SDS-PAGE en condiciones reductoras (ver sección 6.5).

## 6.11. DETERMINACIÓN DE LA POTENCIA NEUTRALIZANTE DE LOS FABOTERÁPICOS CONTRA LAS PRINCIPALES ACTIVIDADES BIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS

### 6.11.1. NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD LETAL

Con el propósito de valorar y contrastar la capacidad de los distintos faboterápicos para neutralizar la actividad letal de los venenos incluidos en el proyecto, se buscó establecer su Dosis Efectiva media ( $DE_{50}$ ), que definimos como la cantidad de antiveneno necesaria para neutralizar la actividad letal de  $3DL_{50}$  en la mitad de una población dada. Para determinar la  $DE_{50}$ , los viales de faboterápico fueron reconstituidos en 10 mL de agua destilada y posteriormente se incubaron durante 30 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  distintos volúmenes de antiveneno con la cantidad equivalente a  $3 DL_{50}$  de cada veneno. Dichas mezclas fueron llevadas a un volumen final de  $500\text{ }\mu\text{L}$  con PBS. Después de cumplido el tiempo de incubación, las mezclas de veneno-antiveneno fueron inyectadas i.v. en la vena caudal lateral a grupos de 3 ratones de 18 a 21 g. Es preciso señalar que por cuestiones de cantidad de veneno disponible de *O. sphenophrys* y *P. yucatanicum*, sólo un lote de cada faboterápico fue retado con estos venenos. El porcentaje de sobrevivencia de cada grupo experimental fue registrado 24 horas después de la inoculación. Los datos obtenidos se graficaron y analizaron en función del logaritmo de la cantidad de antiveneno, empleando un modelo de regresión no lineal tipo sigmoideal de dosis-respuesta. El software GraphPad Prism versión 8.2.1 (GraphPad Software, California, EE. UU.) fue empleado para calcular el valor de las  $DE_{50}$ s.

Una vez obtenidos los valores de  $DE_{50}$ , se calculó la neutralización específica y el número de  $DL_{50}$  neutralizadas por vial con las siguientes fórmulas:

$$\text{Neutralización específica (mg AV/mg V)} = \frac{(DE_{50} \times [AV])}{(DL_{50} \times 3)}$$

Donde:

- [AV] = concentración del antiveneno (mg/mL)
- V = veneno

Para el cálculo del número de  $DL_{50}$  neutralizadas por vial, se tiene que una  $DE_{50}$  neutraliza  $3DL_{50}$ , por lo tanto, en teoría  $1DL_{50}$  es neutralizada por:

$$1DL_{50} = \frac{DE_{50}}{3}$$

Dado que un vial está resuspendido en 10 mL, tenemos que:

$$\text{Número de DL}_{50}/\text{vial} = \frac{10,000 \mu\text{L}}{\text{DL}_{50}}$$

Sustituyendo en la ecuación anterior, obtenemos:

$$\text{Número de DL}_{50}/\text{vial} = \frac{\frac{10,000}{1}}{\frac{\text{DE}_{50}}{3}}$$

Y finalmente:

$$\text{Número de DL}_{50}/\text{vial} = \frac{30,000}{\text{DE}_{50}}$$

### **6.11.2. NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA *IN VITRO***

Se evaluó la capacidad neutralizante de los faboterápicos hacia la actividad proteolítica de los diferentes venenos a través de la modificación de la metodología descrita en la sección 6.10.2. Para este ensayo, se define la  $\text{DE}_{50}$  como la cantidad de antiveneno necesaria para neutralizar el 50 % de la actividad proteolítica producida por 20  $\mu\text{g}$  de veneno. Previo a la incubación con azocaseína, se prepararon soluciones conteniendo 20  $\mu\text{g}$  de veneno y cantidades variables de faboterápico. Como control positivo se utilizó veneno más PBS. El volumen de cada solución fue ajustado a 200  $\mu\text{L}$  con PBS y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Después del tiempo de incubación, se tomaron por triplicado 50  $\mu\text{L}$  de cada muestra y fueron añadidos a 100  $\mu\text{L}$  de solución de azocaseína 15 mg/mL en buffer Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.15 M y  $\text{CaCl}_2$  5 mM, pH 8.0. La solución de azocaseína, veneno y antiveneno fue incubada a 37 °C durante 30 minutos y a partir de este punto se continuó con la metodología descrita en la sección 6.10.2.

La actividad proteolítica obtenida por el control de veneno fue tomada como referencia para calcular el porcentaje de neutralización obtenida con cada cantidad de faboterápico. Los datos obtenidos se graficaron y analizaron en función del logaritmo de la cantidad de antiveneno, empleando un modelo de regresión no lineal tipo sigmoideal de dosis-respuesta. El software GraphPad Prism versión 8.2.1 (GraphPad Software, California, EE. UU.) fue empleado para calcular el valor de las  $\text{DE}_{50}$ s.

### **6.11.3. NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD FIBRINOGENOLÍTICA *IN VITRO***

Con la finalidad de determinar cualitativamente la potencia neutralizante de los faboterápicos hacia la actividad fibrinogenolítica de los venenos, se modificó la

metodología descrita en la sección 6.10.3. Antes de la digestión del fibrinógeno, 10 µg de veneno fueron incubados con 400 µg de cada faboterápico a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente, a esta mezcla le fueron agregados 50 µg de fibrinógeno humano y fue incubada a 37 °C durante 40 minutos. La concentración del veneno, del fibrinógeno y del antiveneno fue ajustada para que el volumen de reacción fuera de 50 µL. Después de la incubación, se tomó una alícuota de 5 µL para su análisis por SDS-PAGE en condiciones reductoras (ver sección 6.5).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. CUANTIFICACIÓN PROTEICA DE LOS ANTIVENENOS

En términos generales, el contenido proteico en cada vial de Birmex es, en promedio, entre 3 y 4.5 veces mayor que Inoserp y Antivipmyn, respectivamente. Adicionalmente, Birmex es el faboterápico que mostró menos homogeneidad en su contenido proteico, contando con diferencias estadísticamente significativas entre los lotes evaluados. Por otra parte, el ANOVA formó un grupo estadísticamente igual para Inoserp y dos grupos para Antivipmyn (Cuadro 4).

Nuestros resultados en la cuantificación proteica de Antivipmyn contrastan con lo reportado hace dos décadas, donde cada vial tiene una concentración de 60 mg/mL (Otero, Núñez, et al., 2002). Esta diferencia pudiera deberse a un proceso de mejoramiento de los antivenenos, donde cada vez se requiera una menor cantidad de proteína para cumplir con las normativas establecidas (ver sección 1.5). Es importante mencionar que los ocho lotes evaluados cumplen con los requerimientos de la FEUM en torno a la concentración proteica, cuyo límite máximo fue establecido como 100 mg/mL (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2014).

**Cuadro 4. Resultados de la cuantificación proteica de los antivenenos.** *Valores obtenidos de concentración proteica reconstituyendo los viales en 10 mL de agua destilada. Entre paréntesis se indican los intervalos de confianza al 95 %, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P < 0.05; n = 3; prueba post-hoc de Tukey).*

Antiveneno	Lote		Concentración proteica (mg/mL)
Antivipmyn	L1	B-6J-31	4.6 (4.5 - 4.8) <sup>a</sup>
	L2	B-8K-31	6.0 (5.3 - 6.6) <sup>b</sup>
	L3	B-8H-34	6.7 (6.4 - 6.9) <sup>b</sup>
Birmex	L1	FV045A	26.4 (26.0 - 26.8) <sup>c</sup>
	L2	FV043A	21.8 (20.5 - 23.2) <sup>d</sup>
	L3	FV044A	28.6 (27.5 - 29.7) <sup>e</sup>
Inoserp	L1	8805181002	8.0 (7.6 - 8.3) <sup>f</sup>
	L2	8805181003	7.4 (7.1 - 7.8) <sup>f</sup>

## 7.2. CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LOS ANTIVENENOS

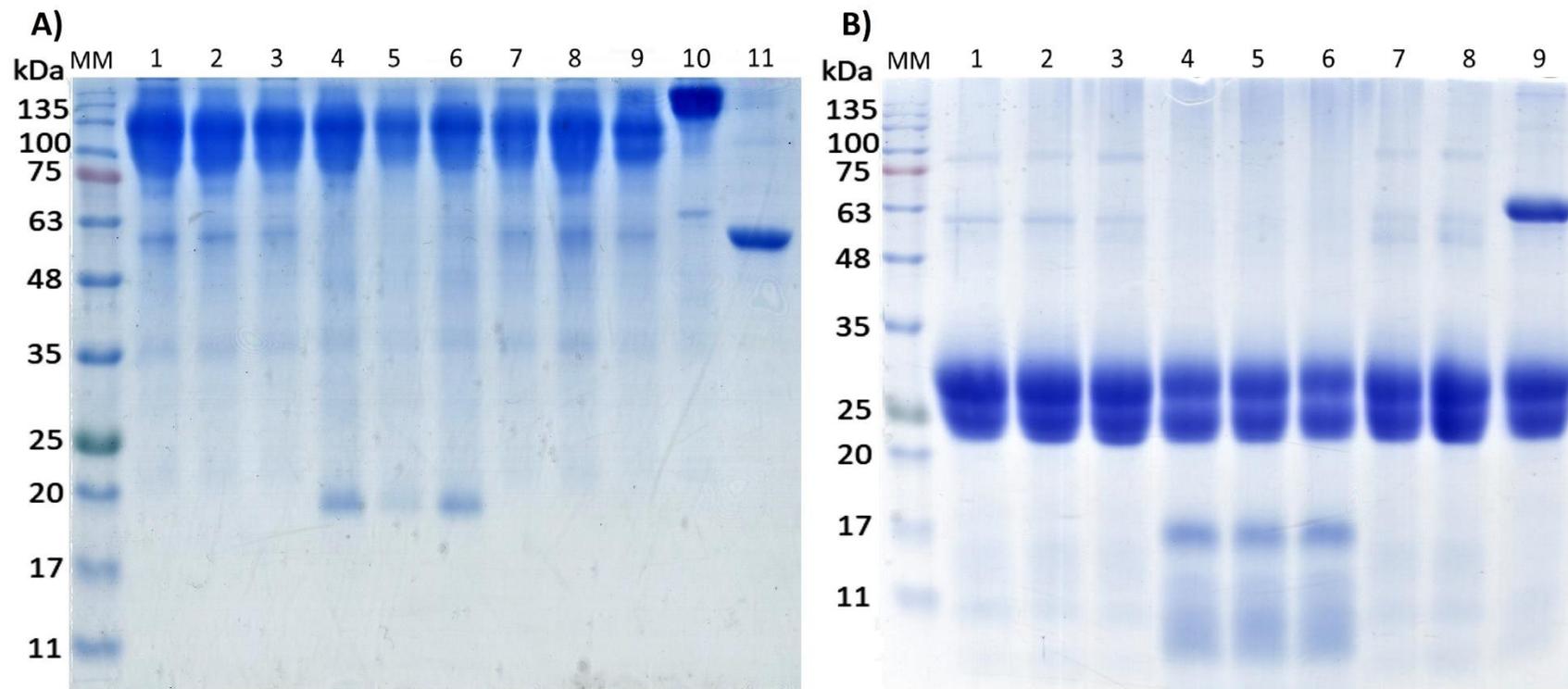
En condiciones no reductoras se observa una banda principal que migra por debajo de los 135 kDa y que corresponde a los  $F(ab')_2$ . En contraste, la electroforesis reductora muestra dos bandas predominantes de  $\approx 27$  y 23 kDa, que coinciden con el peso esperado para las cadenas pesadas y ligeras de las IgGs digeridas con pepsina, respectivamente (Fig. 6).

La inexistencia de bandas conspicuas de  $\approx 50$  y 150 kDa tanto en condiciones reductoras como no reductoras, respectivamente, sugiere que la totalidad de las IgGs han sido completamente digeridas. Sin embargo, para corroborar esta hipótesis sería útil el empleo de un western blot debido a que existen reportes de detección de cadenas pesadas sin digerir en faboterápicos a pesar de no ser evidentes en los ensayos SDS-PAGE (Squaiella-Baptistaõ et al., 2014).

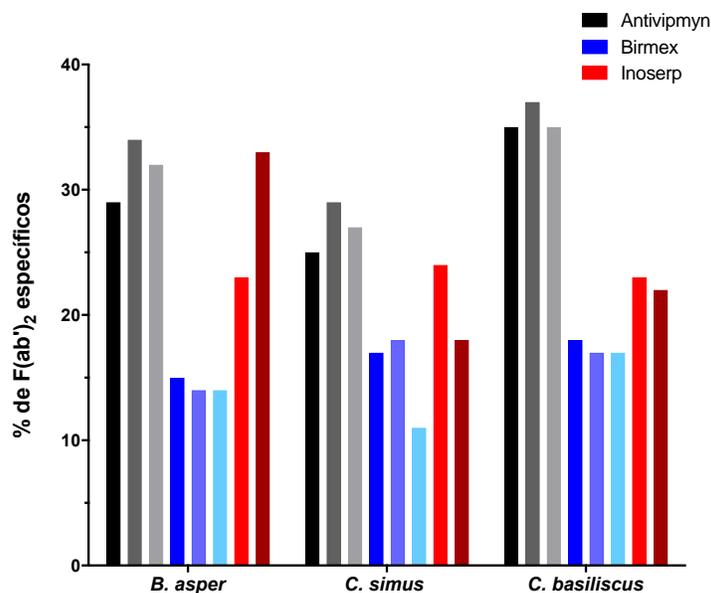
Es preciso destacar que en ambas condiciones experimentales se presentan bandas menores a 20 kDa en los lotes de Birmex. La identidad de dichas bandas es incierta en términos del presente trabajo aunque existen reportes contrastantes en la literatura. Por un lado, Squaiella-Baptistaõ y colaboradores (2014), al analizar distintos lotes de faboterápicos producidos por los Institutos Butantan y Vital Brazil, concluyen que bandas con pesos similares representan contaminantes proteicos diferentes a cualquier producto de la degradación de las IgGs. No obstante, Kurtović y colaboradores (2020) identifican, en un faboterápico experimental, bandas menores a 20 kDa como residuos digestivos tanto de la cadena pesada de las IgGs como de inhibidores de inter-alfa-tripsina. Estos reportes subrayan la necesidad de ensayos adicionales para la identificación plena de las bandas que migran por debajo de 20 kDa presentes en los faboterápicos producidos por Birmex.

## 7.3. CUANTIFICACIÓN DE $F(ab')_2$ ESPECÍFICOS

La cuantificación de fragmentos  $F(ab')_2$  específicos mostró que, aunque Antivimpyn tiene un menor contenido proteico, proporcionalmente es el faboterápico más enriquecido en términos de moléculas médicamente relevantes, en promedio cerca del doble de los contenidos por Birmex (31 % y 16 %, respectivamente) (Fig. 7). Por otro lado, aunque era de esperarse que los antivenenos contuvieran más  $F(ab')_2$  específicos contra los venenos usados como inmunógenos, esto no fue el caso para Antivimpyn, que presentó más moléculas que reconocen el veneno de *C. basiliscus* (36 %), el cual no es usado en su elaboración (ver sección 1.5.2). Lo anterior puede explicarse debido a la similitud inmunológica entre el veneno de *C. basiliscus* y *C. simus*, lo que produce una fuerte neutralización cruzada (Segura et al., 2017).



**Figura 6. SDS-PAGE de los faboterápicos. A)** Condiciones no reductoras. Carriles 1 a 3, Antivipmyn lotes L1, L2 y L3, respectivamente; carriles 4 a 6, Birmex lotes L1, L2 y L3; carriles 7 y 8, Inoserp lotes L1 y L2, respectivamente; carriles 9 a 11, estándares de fragmentos  $F(ab')_2$ , IgGs completas y albúmina equina, respectivamente. **B)** Condiciones reductoras. Los carriles 1 a 8 corresponden a los de A); carril 9, estándar de fragmentos  $F(ab')_2$  + estándar de albúmina equina.



**Figura 7.** Porcentaje de fragmentos  $F(ab')_2$  médicamente relevantes contenidos en los antivenenos. *Las barras del mismo color en diferentes tonos corresponden a lotes distintos del mismo antiveneno, numerados de izquierda a derecha.*

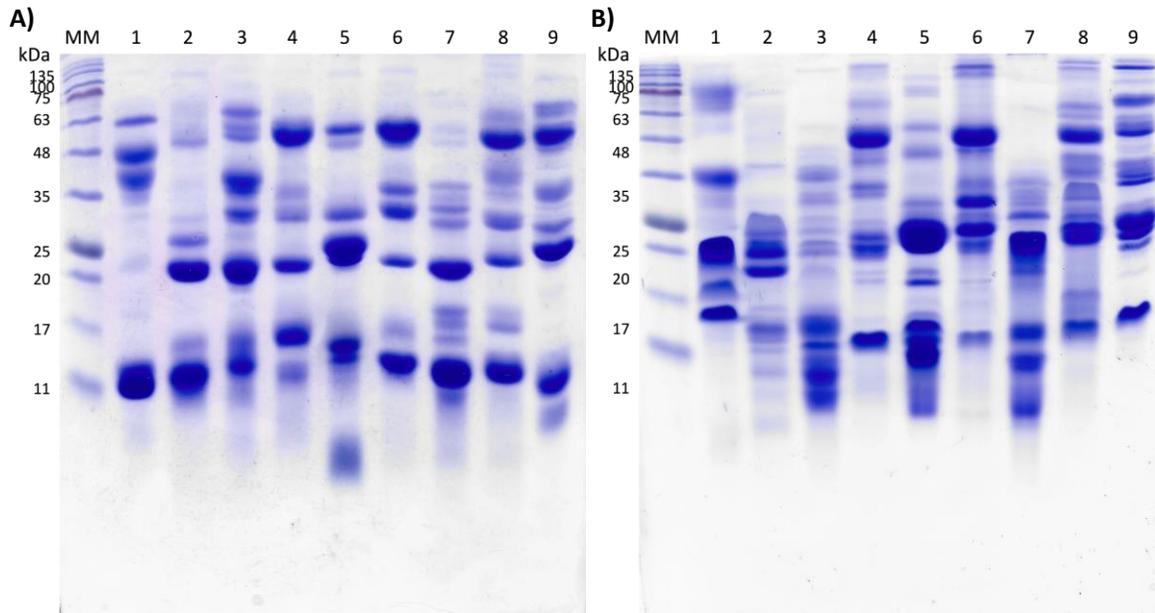
Nuestros resultados concuerdan con lo ya reportado para otros antivenenos, donde sólo entre el 5.8 y el 36.4 % del contenido proteico total está formado por anticuerpos (o sus fragmentos) específicos contra el veneno (Herrera et al., 2014; Neri-Castro, 2010; Rawat et al., 1994; Segura et al., 2013). Inclusive, los fragmentos  $F(ab')_2$  no específicos podrían considerarse como contaminantes ya que no participan en el efecto terapéutico y además pueden influenciar el comienzo de reacciones adversas (Segura et al., 2013).

#### **7.4. CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LOS VENENOS**

Los perfiles electroforéticos de los venenos son muy heterogéneos entre sí dado que existe una gran diversidad en función del número e intensidad de las bandas, las cuales se encuentran en un amplio rango de pesos moleculares. Sin embargo, se observa que las bandas de  $\approx 14$ , 20 y 55 kDa que corresponderían con SVPLA<sub>2</sub>, SVSPs y SVMPS, respectivamente, están enriquecidas en la mayoría de venenos. Vale la pena aclarar que el número de bandas es una subestimación de las proteínas contenidas en un veneno, porque es probable que todas las moléculas de masa similar formen una sola banda.

De forma interesante, a pesar de que los perfiles electroforéticos de los venenos pertenecientes al género *Crotalus* son muy similares bajo condiciones no reductoras (Fig. 8A, carriles 5 al 7), se observó que esto no se mantiene al analizar dichas muestras en condiciones reductoras (Fig. 8B, carriles 5 al 7). Lo anterior aporta evidencia acerca de la complejidad de los venenos de vipéridos mexicanos: a pesar de que son especies del mismo género y que pudieran parecer iguales en primera instancia, se encontró que están

formados por familias proteicas diferentes. En conjunto, nuestros resultados son evidencia de que los faboterápicos antiviperinos mexicanos tienen el gran reto de neutralizar muchos venenos con características diferentes.



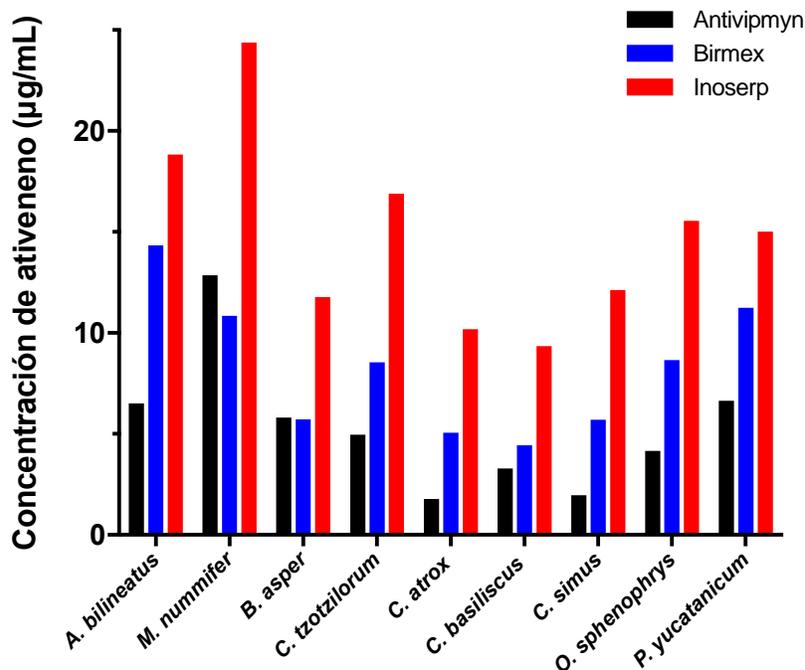
**Figura 8. SDS-PAGE de los venenos. A)** Condiciones reductoras; **B)** condiciones no reductoras. Carril 1, *Agkistrodon bilineatus*; carril 2, *Bothrops asper*; carril 3, *Cerrophidion tzotzilorum*; carril 4, *Crotalus atrox*; carril 5, *Crotalus basiliscus*; carril 6, *Crotalus simus*; carril 7, *Metlapilcoatlus nummifer*; carril 8, *Ophryacus sphenophrys*; carril 9, *Porthidium yucatanicum*.

## 7.5. EVALUACIÓN DEL RECONOCIMIENTO

### 7.5.1. ENSAYO DE INMUNOADSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

Nuestros datos muestran que el faboterápicos con un mejor reconocimiento de los venenos es Antivipmyn, seguido de Birmex y finalmente Inoserp. Además, se evidenció que los venenos de las serpientes de cascabel son mejor reconocidos en comparación con aquellos de géneros distintos a *Crotalus* o *Bothrops*, tal es el caso de *Metlapilcoatlus nummifer* o *Agkistrodon bilineatus*. En el caso de Birmex, parece existir una relación entre la cantidad de anticuerpos específicos y el nivel de reconocimiento dado que los porcentajes de anticuerpos que reconocen los venenos de *B. asper*, *C. simus* y *C. basiliscus* son similares entre sí y el nivel de reconocimiento hacia estos tres venenos también se asemeja. Sin embargo, y contrario a lo que se podría esperar, nuestros resultados no revelan una relación generalizada entre la cantidad de anticuerpos específicos y el nivel de reconocimiento por ELISA. Esto podría deberse a la propia definición de título, donde sólo se compara la concentración de antiveneno necesario para alcanzar la mitad de la

respuesta máxima, sin tomar en cuenta que no todos los antivenenos alcanzaron la misma respuesta para un veneno dado.

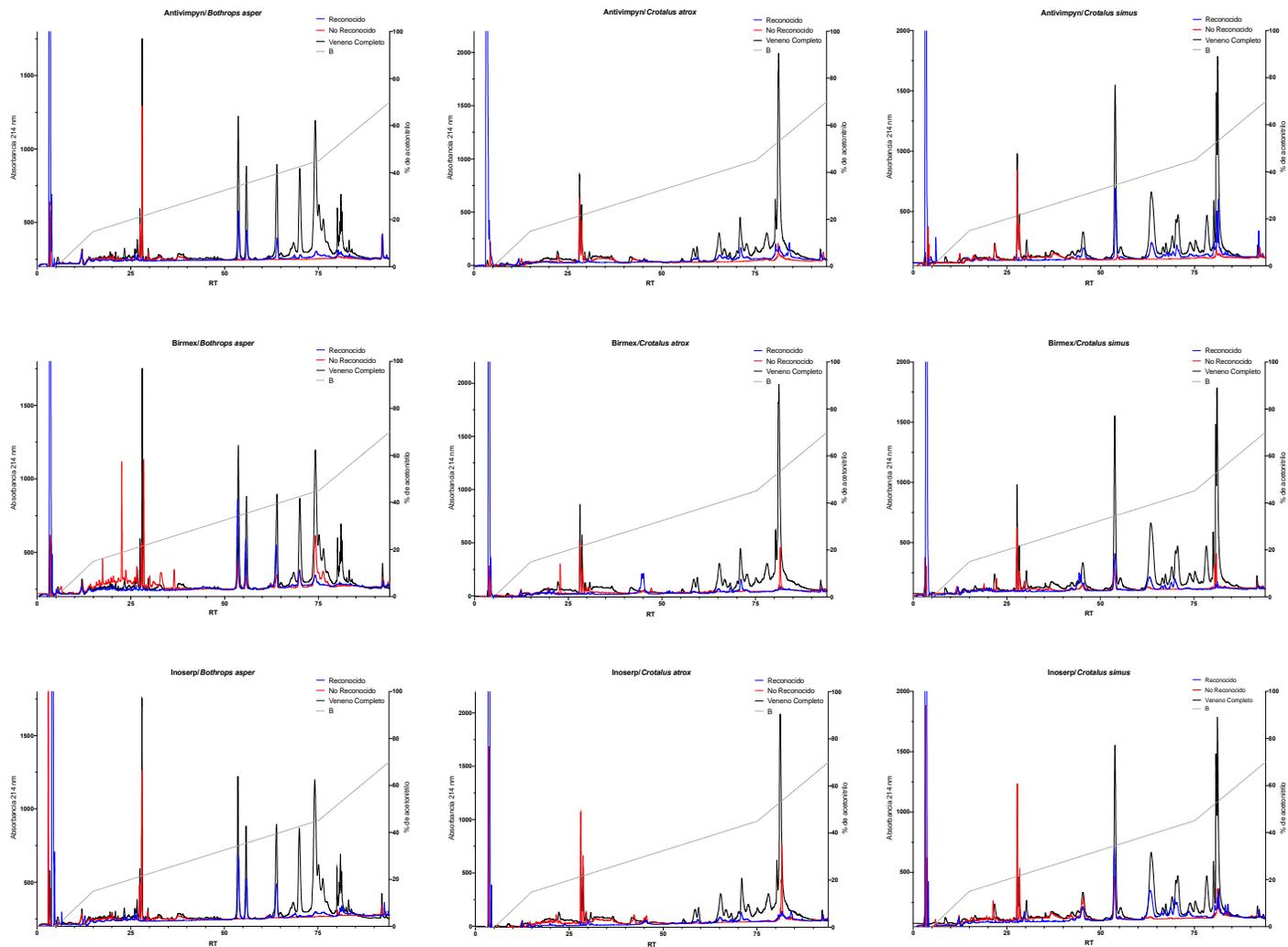


**Figura 9. Títulos obtenidos mediante ELISA.** Se utilizó antiveneno como anticuerpo primario y Affinity Purified Antibody Peroxidase Labeled Goat anti-horse IgG marca KPL, lote 120607 como anticuerpo secundario. El nivel de reconocimiento mediante ELISA fue evaluado para el lote B-6J-31 de Antivipmyn, el FV045A de Birmex y el 8805181002 de Inoserp.

Aunque los ensayos de tipo ELISA se realizaron con el fin de determinar cuantitativamente el reconocimiento de los faboterápicos hacia los distintos venenos, estos ensayos sólo otorgan una medida del reconocimiento del veneno en general, sin discriminar qué componentes son reconocidos y cuáles no.

### 7.5.2. RECONOCIMIENTO MEDIANTE UN ENFOQUE DE ANTIVENÓMICA

Los ensayos de antivenómica ofrecen una descripción tanto cualitativa como cuantitativa de los componentes del veneno que son reconocidos por los  $F(ab')_2$  del antiveneno. Uno de los aspectos más evidentes es que los venenos no fueron recuperados en su totalidad, lo que se demuestra con la diferencia en el cálculo del área bajo la curva entre el veneno completo y las fracciones *Reconocida* y *No reconocida* (Fig. 10; Anexo II). Si las condiciones de elución fueran las adecuadas, se esperaría que la suma del área bajo la curva de las fracciones reconocida y no reconocida fuera similar a aquella del veneno completo. En el cuadro 5 se muestran los porcentajes de las distintas familias proteicas presentes en los venenos y el porcentaje de estas que es reconocido por los distintos faboterápicos.



**Figura 10. Cromatogramas** obtenidos en los ensayos de antivenómica. En cada gráfica se muestran 3 cromatogramas superpuestos: veneno completo, fracción reconocida y fracción no reconocida en negro, azul y rojo, respectivamente. Además, se muestra el porcentaje de acetonitrilo (B) con una línea punteada. El nivel de reconocimiento hacia los venenos de *B. asper*, *C. atrox* y *C. simus* fue evaluado mediante antivenómica para el lote B-6J-31 de Antivipmy, el FV045A de Birmex y el 8805181002 de Inoserp.

**Cuadro 5. Porcentaje de reconocimiento de los venenos determinado mediante antivenómica. K49-PLA<sub>2</sub>, homólogo enzimáticamente inactivo de las PLA<sub>2</sub>; PLA<sub>2</sub>, fosfolipasas A<sub>2</sub>; SVSP, serín proteasas de veneno de serpiente; SVMP, metaloproteasas de veneno de serpiente; CNP, péptido natriurético tipo C; SubA, subunidad ácida de la crotoxina; SubB, subunidad básica de la crotoxina. La identidad proteica de los picos recuperados de los venenos de *B. asper*, *C. atrox* y *C. simus* fue asignada de acuerdo a lo reportado por Alape-Girón et al., (2008), Calvete et al., (2009) y Castro et al., (2013), respectivamente.**

*Bothrops asper*

	Familias proteicas	Desintegrinas	K49-PLA <sub>2</sub>	PLA <sub>2</sub>	SVSP	SVMP	Veneno completo
Antivipmyn	% Reconocido	12	33	21	5	3	11
	% No Reconocido	62	0	1	0	1	8
	% No Recuperado	26	67	78	95	96	81
Birmex	% Reconocido	10	67	47	13	3	21
	% No Reconocido	83	18	18	15	24	27
	% No Recuperado	7	15	35	72	73	51
Inoserp	% Reconocido	11	47	41	3	4	16
	% No Reconocido	61	0	2	0	1	8
	% No Recuperado	28	53	57	97	95	76

*Crotalus atrox*

	Familias proteicas	Desintegrinas	CNP	K49-PLA <sub>2</sub>	PLA <sub>2</sub>	SVSP	SVMP	Veneno completo
Antivipmyn	% Reconocido	4	0	53	28	24	17	17
	% No Reconocido	72	92	0	0	0	4	12
	% No Recuperado	24	8	47	72	76	79	71
Birmex	% Reconocido	0	100	0	15	17	7	12
	% No Reconocido	63	0	8	0	2	6	12
	% No Recuperado	37	0	92	85	81	87	76
Inoserp	% Reconocido	7	0	0	9	15	10	10
	% No Reconocido	84	100	0	0	0	13	20
	% No Recuperado	9	0	100	91	85	77	70

*Crotalus simus*

	Familias proteicas	Tripéptidos	Desintegrinas	SubA	SubB	PLA <sub>2</sub>	SVSP	SVMP	Veneno completo
Antivipmyn	% Reconocido	8	24	42	29	19	16	19	21
	% No Reconocido	74	33	0	1	0	1	6	8
	% No Recuperado	18	43	58	70	81	83	75	71
Birmex	% Reconocido	3	15	80	19	0	34	1	16
	% No Reconocido	60	57	20	12	0	2	10	12
	% No Recuperado	37	28	0	69	100	64	89	72
Inoserp	% Reconocido	15	0	30	40	53	38	22	34
	% No Reconocido	85	0	70	22	0	5	14	19
	% No Recuperado	0	100	0	38	47	57	64	47

La retención de gran parte del veneno por parte de la matriz puede ser causada por una suma de factores. Primero, la interacción de anticuerpos con tan alta afinidad que el cambio de pH producido por el Buffer de elución no es suficiente para romper la interacción del complejo antígeno-anticuerpo, posiblemente estos anticuerpos son obtenidos de los caballos que tienen más tiempo siendo hiperinmunizados con los respectivos venenos, lo que permitiría el aumento progresivo de la afinidad. Adicionalmente, en las columnas tenemos una alta cantidad de toxinas que son reconocidas por un gran conjunto de F(ab')<sub>2</sub> con especificidades distintas, lo que aumenta drásticamente la complejidad de la elución.

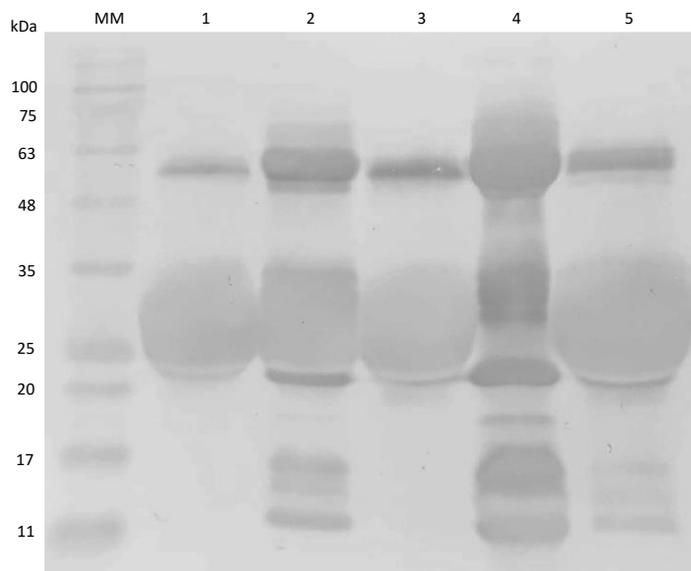
Las condiciones de elución para cada interacción antígeno-anticuerpo son diferentes y sólo pueden ser determinadas empíricamente (Harlow & Lane, 1988). Inclusive, se han reportado porcentajes bajos de recuperación empleando soluciones de elución ácidas (Agraz et al., 1994). Por otro lado, se descartó el uso de eluyentes de carácter básico dado que existe evidencia de que la liberación del ligando por parte de la CNBrS comienza en condiciones ligeramente alcalinas, incrementando su ritmo a medida que el pH aumenta (Tesser et al., 1974). Lo anterior ocurre porque el ligando se une a la CNBrS a través de un enlace isourea, el cual es inherentemente inestable (Yarmush et al., 1992). Se ha sugerido que la mejor estrategia es probar tantas condiciones de elución como sea posible (Harlow & Lane, 1988), sin embargo, la cantidad de faboterápico necesaria para ello es un

impedimento técnico. Aunque existen reportes en la literatura de la disociación del complejo antígeno-anticuerpo mediante el uso de técnicas como electroforesis (Dean et al., 1977) y aumento de presión (Olson et al., 1989), el perfil electroforético del veneno podría modificarse con la desnaturalización de las proteínas y por ello las técnicas que la implican fueron descartadas.

Por otro lado, si consideramos el veneno no recuperado como moléculas reconocidas por el antiveneno, encontramos que, en promedio, las SVSP forman el grupo mejor reconocido con el 97 %, seguido de las PLA<sub>2</sub> y las SVMP con el 92 y 91 %, respectivamente. Lo anterior contrasta con lo reportado por Sousa et al. (2013), quienes señalan a las P-III SVMP como la familia más inmunogénica, seguida de las SVSP, las P-I SVMP y finalmente las PLA<sub>2</sub>. Dicha discrepancia puede originarse porque en este trabajo el porcentaje de reconocimiento de las SVMP incluye tanto a las P-I como a las P-III.

### 7.5.3. WESTERN BLOT DE LA RESINA USADA EN ANTIVENÓMICA

La resina acoplada a los F(ab')<sub>2</sub> del antiveneno presenta un patrón de bandeo distinto antes y después de estar en contacto con el veneno (Fig. 11, carriles 1 y 5). Las bandas adicionales se encuentran en el rango aproximado de 10 a 17 kDa y coinciden con bandas presentes en el veneno (Fig. 11, carril 4). Lo anterior supone evidencia de que una parte del veneno es retenida por los F(ab')<sub>2</sub> aún después de eluir las columnas.



**Figura 11. Western blot de la resina tratada mediante un enfoque de antivenómica.** Carril 1, CNBrS-Antivipmyn lote B-6J-31; 2, mezcla de veneno y Antivipmyn lote B-6J-31; 3, Antivipmyn lote B-6J-31; 4, veneno; 5, CNBrS- Antivipmyn lote B-6J-31 después de ser incubada con veneno. En el caso de las muestras que involucran CNBrS (carriles 1 y 5), a 40 µL de matriz se les agregó 10 µL de Sample Loading Buffer 5X, se hirvieron a baño maría durante 5 minutos y fueron centrifugadas a 13,000 rpm durante 5 minutos, finalmente, se tomaron 15 µL del sobrenadante los cuales fueron cargados cada carril. Para las muestras compuestas por proteínas solubles (carriles 2, 3 y 4) se cargaron 20 µg. Como anticuerpo primario se utilizó una solución 0.1 mg/mL de Antivipmyn lote B-6J-31y como anticuerpo secundario una dilución 1:1000 de Affinity Purified Antibody Peroxidase Labeled Goat anti-horse IgG marca KPL, lote 120607.

## 7.6. DETERMINACIÓN DE LAS PRINCIPALES ACTIVIDADES BIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS

### 7.6.1. ACTIVIDAD LETAL

El veneno de *C. basiliscus* produjo en los individuos experimentales sintomatología concordante con la presencia de neurotoxinas homólogas a crotoxina, lo cual ya ha sido reportado (Chen et al., 2004; Colis-Torres et al., 2022) y que se ve reforzado por la DL<sub>50</sub> baja en comparación con otras especies incluidas en este trabajo (Cuadro 6).

En el caso de *C. atrox*, nuestros datos contrastan con lo reportado para el veneno de organismos de Veracruz, México cuya DL<sub>50</sub> es casi el doble (M. Sánchez et al., 2020) de la obtenida en el presente trabajo. Lo anterior puede explicarse por uno o más factores como la variación geográfica del veneno, la vía de inoculación o la edad del animal. Sin embargo, la letalidad de nuestro pool concuerda con los valores de DL<sub>50</sub> del veneno de *C. atrox* provenientes del sur de EE. UU., los cuales se encuentran en el rango de 17.9 a 82.1 µg/ratón de acuerdo a su origen geográfico (Minton & Weinstein, 1986).

Con respecto al veneno de especies mexicanas de los géneros *Cerrophidion* y *Porthidium* no existen datos publicados. Para el primero, el taxon más cercano es *C. sasai* de Costa Rica (Gutiérrez et al., 2013). En el caso de *Porthidium*, únicamente se ha evaluado la actividad letal del veneno de organismos provenientes de Colombia, Venezuela y Costa Rica, donde un caso interesante es el veneno de *P. lansbergii rozei* de Venezuela, el cual no es letal aún inoculando 241.3 µg/ratón (Girón et al., 2018; Gutiérrez et al., 2013; Otero, Núñez, et al., 2002). Además, en todos los trabajos referidos en este párrafo el veneno fue administrado por vía intraperitoneal (i.p.), lo que aunado a la diferencia en las especies, hace muy difícil la comparación de los datos.

**Cuadro 6. Valores de DL<sub>50</sub> obtenidos.** DL<sub>50</sub> hace referencia a la cantidad de veneno necesaria para producir la muerte en la mitad de una población dada. Entre paréntesis se muestran los intervalos de confianza al 95 %.

Espece	DL <sub>50</sub> (µg/ratón)	R <sup>2</sup>
<i>Cerrophidion tzotzilorum</i>	49.3 (46.3 - 53.0)	0.99
<i>Crotalus atrox</i>	38.8 (38.2 - 39.4)	0.99
<i>Crotalus basiliscus</i>	14.6 (14.5 - 14.7)	0.99
<i>Porthidium yucatanicum</i>	106.5 (102.5 - 110.6)	0.98

### 7.6.2. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA *IN VITRO*

Nuestros resultados muestran diferencias estadísticamente significativas en la actividad proteolítica de diferentes venenos. Sin embargo, no se observa la formación de un patrón con respecto al género al que pertenecen las especies. Cabe mencionar que a excepción de *C. basiliscus*, los venenos con mayor actividad proteolítica *in vitro* corresponden a aquellos con valores de DL<sub>50</sub> más altos (Figura 12), lo que se ha denominado venenos tipo 1 o tipo B (Borja, Neri-Castro, Castañeda-Gaytán, et al., 2018; Mackessy, 2008).

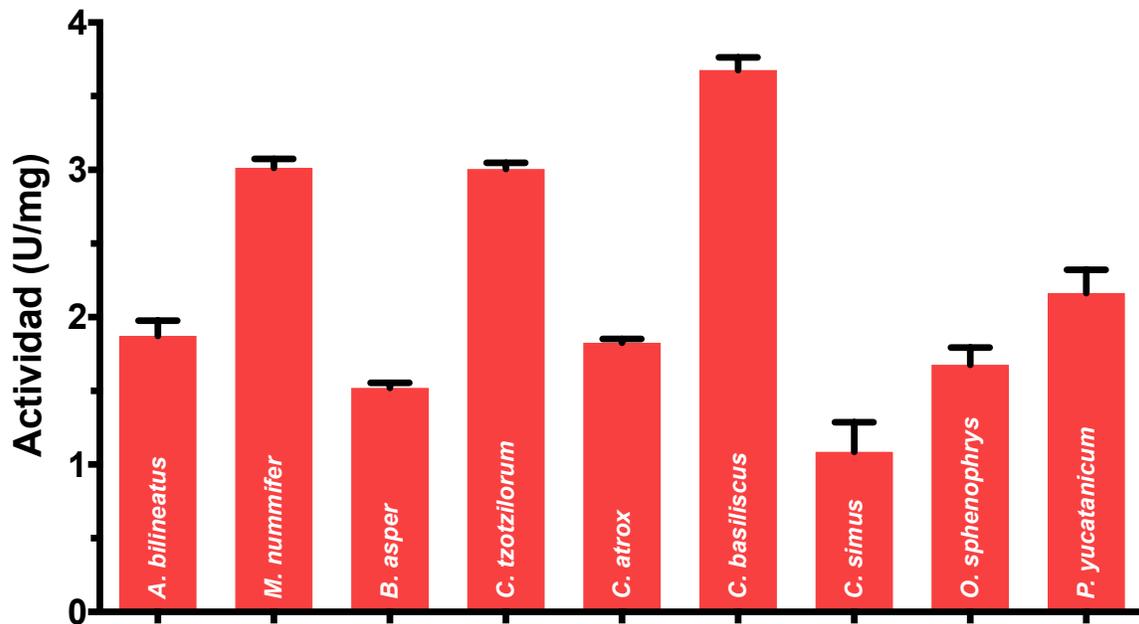


Figura 12. Gráfica de actividades proteolíticas *in vitro*. U, unidad de actividad proteolítica definida como la cantidad de veneno necesaria para producir un cambio en la absorbancia de 0.2 unidades por minuto a 450 nm. Las barras de error representan la desviación estándar.

### 7.6.3. ACTIVIDAD FIBRINOGENOLÍTICA *IN VITRO*

Todos los venenos analizados tienen actividad proteolítica sobre la cadena  $\alpha$  del fibrinógeno mientras que la cadena  $\beta$  es degradada de forma parcial por los venenos de *A. bilineatus* y *C. simus*, y de manera total por el resto. La cadena  $\gamma$ , por su parte, es proteolizada únicamente por el veneno de *M. nummifer* (Fig. 13). Existen pocos registros de la degradación de la cadena  $\gamma$  del fibrinógeno y todos ellos fueron obtenidos con una mayor relación veneno:fibrinógeno o con tiempos de reacción más prolongados que las condiciones empleadas en este trabajo (Liang et al., 2005; Mackessy, 1993; Menezes et al., 2006; Wang et al., 2004). Es preciso destacar que este es el primer reporte de degradación de la cadena  $\gamma$  por el veneno de una serpiente endémica de México.

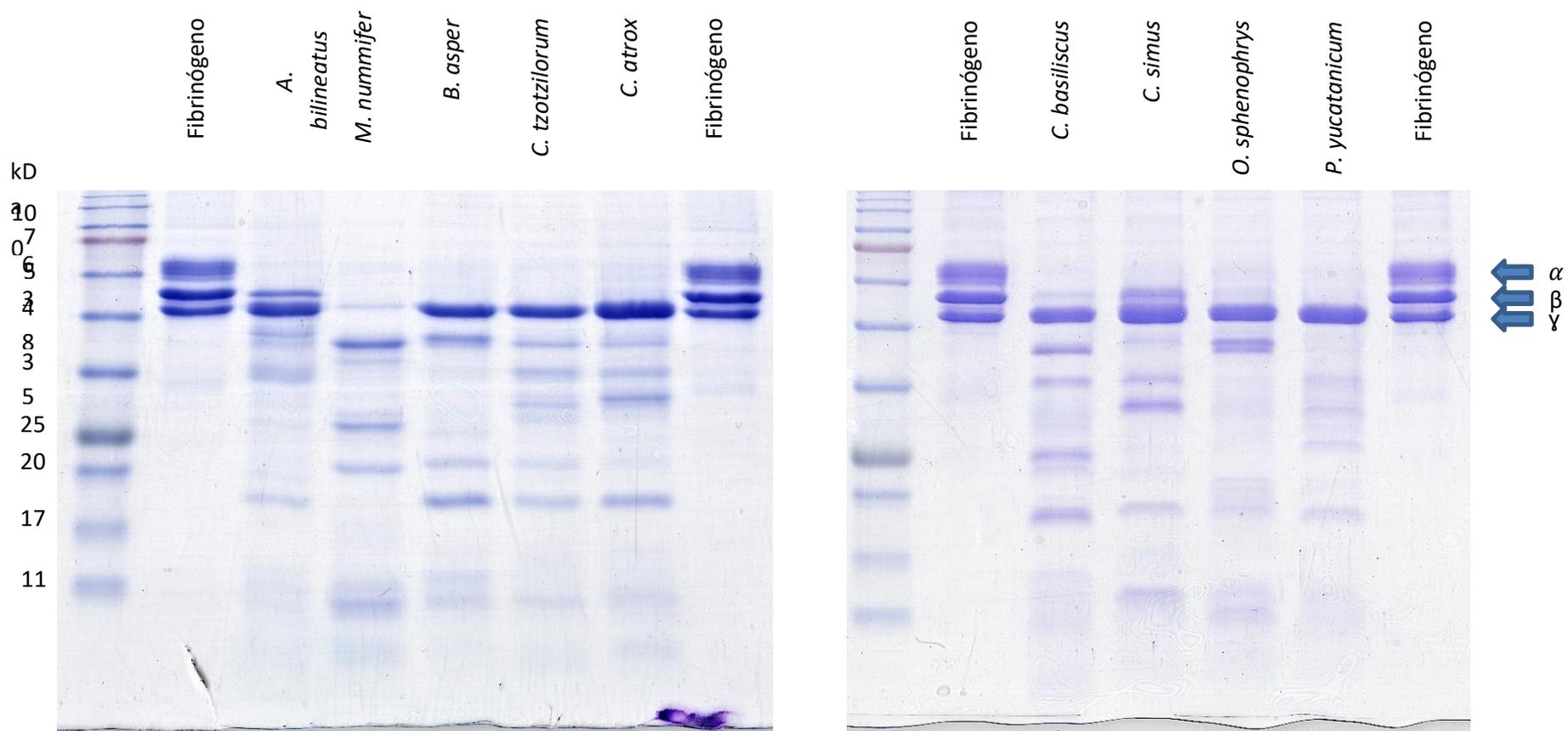
En los ensayos tratados con EDTA se observa que la mayoría de los patrones de degradación de las cadenas de fibrinógeno fueron modificados. En los casos particulares de *A. bilineatus* y *C. basiliscus* donde el tratamiento con EDTA no modifica la proteólisis del fibrinógeno, se puede concluir que en la degradación de esta proteína no participan SVMPs y se sugiere que las responsables sean SVSPs. Un escenario contrastante ocurre con los venenos de *O. sphenophrys* y *P. yucatanicum*, donde la digestión de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  es catalizada principalmente por SVMPs, lo que concuerda con lo reportado para el veneno de *P. lansbergii rozei* (Girón et al., 2018) (Fig. 14). Adicionalmente, el caso de *C. tzotzilorum* es atípico debido a que en el ensayo inhibido con EDTA las bandas correspondientes a las cadenas del fibrinógeno son más tenues. Durante el ensayo se observó que la gelificación de esta reacción fue mayor que las demás, y al golpear suavemente el microtubo no fue disgregada totalmente, lo que dificultó su carga en el SDS-PAGE. Lo anterior podría ser producido por TL-SVSPs (ver sección 1.10.3) contenidas en el veneno de esta especie (Jones et al., 2022). Cabe señalar que este ensayo fue replicado dos veces más (datos no mostrados) con resultados similares.

## **7.1. DETERMINACIÓN DE LA POTENCIA NEUTRALIZANTE DE LOS ANTIVENENOS CONTRA LAS PRINCIPALES ACTIVIDADES BIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS**

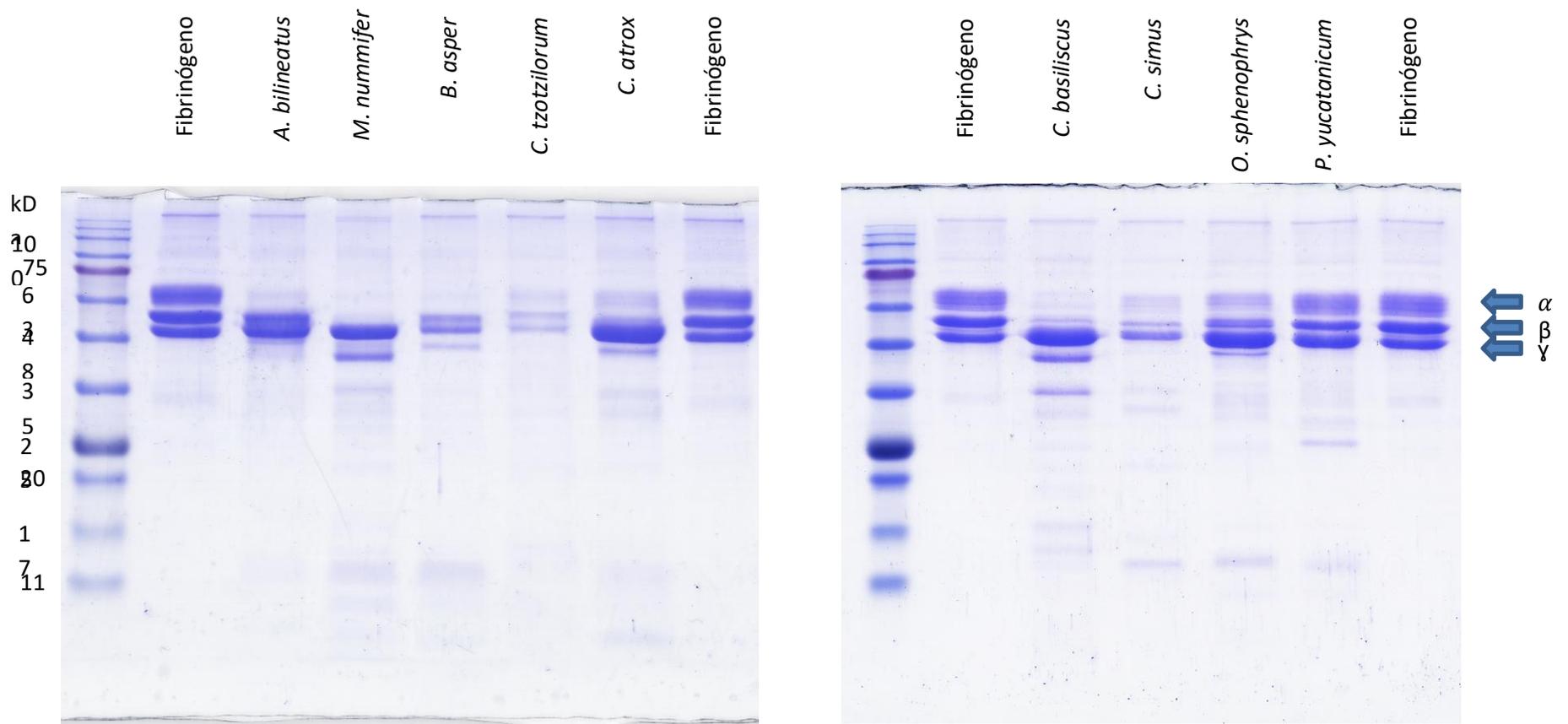
### **7.1.1. NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD LETAL**

La potencia neutralizante de los distintos faboterápicos es diferente entre los distintos productos. Incluso, existe una importante variación de las capacidades neutralizantes entre los distintos lotes de un mismo faboterápico, lo que se hace evidente al revisar los resultados de Birmex contra los venenos de *B. asper* y *C. simus*, Antivipmyn contra aquellos de *B. asper* y *C. basiliscus* e Inoserp contra el de *C. simus*; así como en la falta de constancia general en neutralizar el veneno de *C. tzotzilorum* (Cuadro 7).

Se reportan además los valores de neutralización específica, que corresponde a los mg de antiveneno necesarios para neutralizar la actividad letal de 1 mg de veneno. Esto permite comparar la calidad de los diferentes faboterápicos independientemente del contenido proteico de los viales (Cuadro 4). Aunque era de esperarse que todos los faboterápicos presentaran una mejor neutralización específica de los venenos incluidos en las respectivas mezclas de inmunización (ver sección 1.4), este fue solo el caso de Birmex (Cuadro 8). Antivipmyn tiene una mejor neutralización específica del veneno de *C. basiliscus* que de aquél de *C. simus*, dicha reactividad cruzada podría explicarse por la similitud antigénica de estos venenos (Segura et al., 2017). Inoserp, por su parte, aunque incluye en su mezcla de inmunización el veneno de *C. atrox*, su neutralización específica no es muy distinta a la de los venenos no utilizados en su elaboración. Anteriormente se



**Figura 13.** SDS-PAGE mostrando la actividad fibrinogenolítica *in vitro* de los distintos venenos. En cada gel se incluyeron dos carriles con fibrinógeno sin digerir como control negativo.  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  corresponden a las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del fibrinógeno, respectivamente.



**Figura 14.** SDS-PAGE mostrando la actividad fibrinogenolítica *in vitro* de los distintos venenos al ser incubados con EDTA. En cada gel se incluyeron dos carriles con fibrinógeno sin digerir como control negativo.  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  corresponden a las cadenas A $\alpha$ , B $\beta$  y  $\gamma$  del fibrinógeno, respectivamente.

había reportado el carácter inmunogénico subóptimo del veneno de *C. atrox*, al encontrar que los anticuerpos producidos a partir de este inmunógeno tienen menor reconocimiento por el veneno homólogo comparado con aquellos generados a partir del veneno de otras especies del género (Minton, 1987). Adicionalmente, una muestra de variación entre lotes de un mismo faboterápico radica en que se han obtenido valores de neutralización específica de Birmex contra el veneno de *C. atrox* de 12.8 mgAV/mgV (M. Sánchez et al., 2020), lo que representa el doble de potencia neutralizante con respecto al lote 3 de Birmex analizado en el presente trabajo.

Con la finalidad de que los resultados representen una potencial herramienta de comparación para el personal médico que se enfrente a un caso de envenenamiento, las potencias neutralizantes se encuentran expresadas en DL<sub>50</sub> neutralizadas por cada vial (Cuadro 9). Además, esta información hace posible contrastar nuestros resultados con las especificaciones requeridas por la NOM-036-SSA2-2012. En este respecto, los lotes analizados de Antivipmyn y Birmex cumplen con la norma al retarlos contra los venenos usados en su elaboración, en contraste, los dos lotes evaluados de Inoserp no alcanzaron el umbral mínimo de neutralización para el veneno de *C. atrox*. Cabe destacar que ningún lote analizado fue capaz de neutralizar más de 350 DL<sub>50</sub> del veneno de *C. atrox*, cifra que está muy por debajo de las 790 señaladas en la NOM-036-SSA2-2012. Sin embargo, dicha norma no define las especies del género *Crotalus* de las cuales se debe neutralizar el veneno.

Es importante destacar que la actividad letal de algunos venenos no fue neutralizada aún con la mayor cantidad administrada de faboterápico. Tal es el caso de los venenos de *M. nummifer* y *P. yucatanicum*, para los cuales se retaron 8 y 3 lotes, respectivamente. De manera similar, dos de los ocho lotes fallaron en neutralizar la letalidad del veneno de *C. tzotzilorum*. Aunque no existen reportes de ensayos de neutralización de los venenos de *P. yucatanicum* ni de *C. tzotzilorum*, para el caso de *M. nummifer*, los resultados son contrastantes. De Root (2014) reporta la neutralización del veneno de *M. nummifer* por Antivipmyn inyectando 5 DL<sub>50</sub> i.p., sin embargo, García-Osorio (2020) señala que la letalidad no fue neutralizada al retar 2 y 3 DL<sub>50</sub> vía i.v. por los faboterápicos Antivipmyn y Birmex. Esta diferencia podría explicarse por la variación intraespecífica del veneno (ver sección 1.11), o como se expone en este trabajo, por la variabilidad en la potencia neutralizante de los faboterápicos al comparar distintos lotes. En el caso de *Porthidium*, se ha reportado la neutralización del veneno de *P. nasutum* provenientes de Colombia por parte de Antivipmyn, cuya neutralización específica es de 8.3 mgAV/mgV (Otero, Núñez, et al., 2002). Dadas las diferencias en la concentración de los lotes de antivipmyn, esta disparidad puede estar explicada por la cantidad de antiveneno suministrada (Ver sección 7.1).

**Cuadro 7. Valores obtenidos de DE<sub>50</sub>.** \* = para estos venenos la actividad letal no fue neutralizada aún con la mayor cantidad de faboterápico administrada. **ND** = No determinado debido a la cantidad de veneno disponible en el banco de venenos. Los valores corresponden a  $\mu\text{L}$  de faboterápico reconstituido en 10 mL de agua destilada, en paréntesis se indican los intervalos de confianza.

Especie	Antivipmyn ( $\mu\text{L}/3\text{DL}_{50}$ )			Birmex ( $\mu\text{L}/3\text{DL}_{50}$ )			Inoserp ( $\mu\text{L}/3\text{DL}_{50}$ )	
	B-6J-31	B-8K-31	B-8H-34	FV045A	FV043A	FV044A	8805181002	8805181003
<i>B. asper</i>	17.0 (16.8 - 17.2)	17.1 (14.3 - 20.4)	8.7 (8.2 - 9.2)	3.8 (3.1 - 4.8)	7.7 (7.5 - 7.9)	7.5 (7.2 - 7.8)	18.8 (18.1 - 19.5)	15.7 (11.0 - 22.57)
<i>C. simus</i>	14.5 (12.1 - 17.4)	19.9 (19.9 - 19.9)	25.0 (23.2 - 26.8)	8.8 (8.7 - 8.8)	8.5 (6.9 - 10.6)	16.5 (16.3 - 16.7)	16.2 (15.6 - 16.7)	35.6 (35.1 - 36.2)
<i>C. basiliscus</i>	41.1 (40.2 - 42.0)	18.8 (17.7 - 19.9)	18.8 (17.7 - 19.9)	11.3 (11.2 - 11.4)	9.8 (8.5 - 11.3)	13.7 (13.0 - 14.4)	23.7 (22.6 - 26.9)	34.0 (31.7 - 36.5)
<i>C. atrox</i>	292.4 (271.3 - 315.2)	171.3 (143.0 - 205.2)	174.1 (152.7 - 198.5)	85.6 (76.1 - 96.3)	91.0 (87.4 - 91.7)	103.5 (101.2 - 105.8)	218.5 (216.7 - 220.3)	168.1 (167.9 - 168.3)
<i>A. bilineatus</i>	232.0 (227.8 - 236.3)	143.1 (137.4 - 149.1)	104.9 (98.2 - 112.9)	218.0 (216.7 - 219.4)	235.1 (232.6 - 237.7)	280.8 (270.2 - 291.8)	230.3 (227.7 - 232.9)	279.0 (278.6 - 279.4)
<i>M. nummifer</i>	>460*	>460*	>460*	>460*	>460*	>460*	>460*	>460*
<i>C. tzotzilorum</i>	224.0 (210.9 - 238.1)	>445*	179.6 (158.8 - 203.2)	60.0 (53.9 - 66.3)	87.0 (78.5 - 97.5)	68.6 (66.1 - 71.2)	322.6 (317.7 - 327.7)	>445*
<i>O. sphenophrys</i>	170.0 (168.7 - 171.4)	ND	ND	39.2 (39.1 - 39.3)	ND	ND	129.7 (128.4 - 131.1)	ND
<i>P. yucatanicum</i>	>385*	ND	ND	>385*	ND	ND	>385*	ND

**Cuadro 8. Valores obtenidos de neutralización específica.** \* = dado que la actividad letal no fue neutralizada aún con la mayor cantidad de antiveneno administrada, la neutralización específica tiene un valor mayor que el mostrado. **ND** = No determinado debido a la cantidad de veneno disponible en el banco de venenos. Los valores corresponden a los mg de antiveneno necesarios para neutralizar la actividad letal de 1 mg de veneno, en paréntesis se indican los intervalos de confianza.

Especie	Antivipmyn (mgAV/mgV)			Birmex (mgAV/mgV)			Inoserp (mgAV/mgV)	
	B-6J-31	B-8K-31	B-8H-34	FV045A	FV043A	FV044A	8805181002	8805181003
<i>B. asper</i>	2.4 (2.4-2.4)	3.3 (2.7-3.9)	1.7 (1.6-1.8)	3.1 (2.5-3.9)	5.2 (5.0-5.3)	6.6 (6.4-6.9)	4.6 (4.4-4.8)	3.6 (2.5-5.1)
<i>C. simus</i>	7.5 (6.3-9.1)	13.9 (13.9-13.9)	18.4 (17.1-19.8)	25.9 (25.7-26.0)	21.0 (16.9-26.2)	53.4 (52.7-54.2)	14.5 (14.0-15.1)	29.7 (29.2-30.2)
<i>C. basiliscus</i>	4.4 (4.3-4.5)	2.7 (2.5-2.9)	2.8 (2.7-3.0)	6.9 (6.8-6.9)	5.0 (4.3-5.7)	9.1 (8.6-9.6)	4.4 (4.2-5.0)	5.8 (5.4-6.2)
<i>C. atrox</i>	11.7 (10.9-12.6)	9.2 (7.7-11.1)	9.9 (8.7-11.3)	19.5 (17.3-21.9)	17.3 (16.6-18.0)	25.9 (25.3-26.4)	15.2 (15.0-15.3)	10.8 (10.8-10.8)
<i>A. bilineatus</i>	9.9 (9.7-10.1)	8.2 (7.9-8.6)	6.4 (5.9-6.8)	52.9 (52.6-53.3)	47.7 (47.2-48.2)	74.8 (72.0-77.7)	17.0 (16.8-17.2)	19.1 (19.1-19.1)
<i>M. nummifer</i>	>5.4*	>7.3*	>7.7*	>30.9*	>25.8*	>33.9*	>9.4*	>8.7*
<i>C. tzotzilorum</i>	7.1 (6.7-7.5)	>19.0*	8.1 (7.1-9.1)	10.8 (9.7-11.9)	13.1 (11.8-14.6)	13.5 (13.0-14.0)	17.7 (17.4-18.0)	>22.6*
<i>O. sphenophrys</i>	15.9 (15.7-16.0)	ND	ND	20.8 (20.8-20.9)	ND	ND	21.0 (20.8-21.2)	ND
<i>P. yucatanicum</i>	>5.6*	ND	ND	>32.0*	ND	ND	>9.8*	ND

**Cuadro 9. Valores de DL<sub>50</sub> neutralizadas por vial.** \* = dado que la actividad letal no fue neutralizada aún con la mayor cantidad de antiveneno administrada, cada vial es capaz de neutralizar menos DL<sub>50</sub> que el valor mostrado. **ND** = No determinado debido a la cantidad de veneno disponible en el banco de venenos. Los valores corresponden al número de DL<sub>50</sub> neutralizadas por un vial de faboterápico resuspendido en 10 ml de agua destilada, en paréntesis se indican los intervalos de confianza.

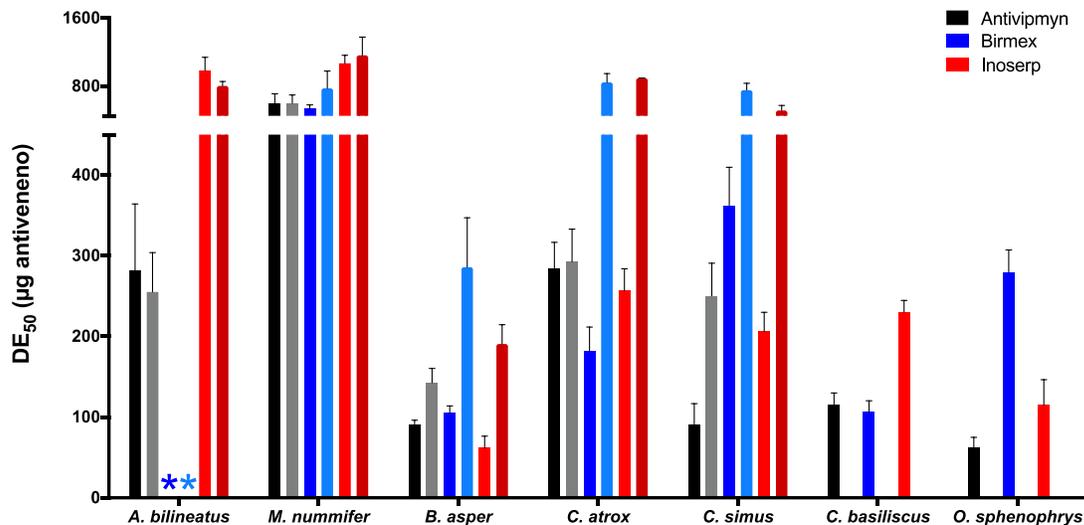
Especie	Antivipmyn (DL <sub>50</sub> /vial)			Birmex (DL <sub>50</sub> /vial)			Inoserp (DL <sub>50</sub> /vial)	
	B-6J-31	B-8K-31	B-8H-34	FV045A	FV043A	FV044A	8805181002	8805181003
<i>B. asper</i>	1765 (1746 - 1784)	1756 (1471 - 2098)	3465 (3275 - 3667)	7813 (6211 - 9804)	3898 (3793 - 4005)	4013 (3866 - 4161)	1600 (1541 - 1661)	1907 (1329 - 2735)
<i>C. simus</i>	2066 (1720 - 2481)	1510 (1508 - 1511)	1202 (1118 - 1293)	3429 (3409 - 3452)	3517 (2830 - 4373)	1819 (1794 - 1845)	1858 (1792 - 1924)	842 (828 - 855)
<i>C. basiliscus</i>	729 (715 - 746)	1598 (1506 - 1696)	1598 (1506 - 1696)	2650 (2636 - 2667)	3061 (2653 - 3529)	2195 (2079 - 2317)	1268 (1115 - 1325)	883 (823 - 948)
<i>C. atrox</i>	103 (95 - 111)	175 (146 - 210)	172 (151 - 196)	350 (312 - 394)	330 (317 - 343)	290 (284 - 296)	137 (136 - 138)	178 (178 - 179)
<i>A. bilineatus</i>	129 (127 - 132)	210 (201 - 218)	286 (266 - 306)	138 (137 - 138)	128 (126 - 129)	107 (103 - 111)	130 (129 - 132)	108 (107 - 108)
<i>M. nummifer</i>	<65*	<65*	<65*	<65*	<65*	<65*	<65*	<65*
<i>C. tzotzilorum</i>	134 (126 - 142)	<67*	167 (148 - 189)	500 (453 - 557)	345 (308 - 382)	437 (421 - 454)	93 (92 - 94)	<67*
<i>O. sphenophrys</i>	176 (175 - 178)	ND	ND	765 (763 - 766)	ND	ND	231 (229 - 234)	ND
<i>P. yucatanicum</i>	<78*	ND	ND	<78*	ND	ND	<78*	ND

### 7.1.2. NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA *IN VITRO*

Con el propósito de comparar la potencia neutralizante de los antivenenos hacia la actividad proteolítica de los diferentes antivenenos se realizaron ensayos de neutralización. Se evaluaron los primeros dos lotes de cada faboterápico contra los venenos de *A. bilineatus*, *M. nummifer*, *B. asper*, *C. atrox* y *C. simus*; para los venenos de *C. basiliscus* y *O. sphenophrys* solo el primer lote de cada producto fue retado. Por otro lado, no nos fue posible realizar estos ensayos con los venenos de *C. tzotzilorum* ni *P. yucatanicum* debido a la disponibilidad de veneno.

De manera similar a la neutralización de la letalidad, también existe variación en la capacidad neutralizante de la actividad proteolítica *in vitro* tanto entre los diferentes productos como entre lotes del mismo faboterápico, lo que es especialmente evidente con los venenos de *B. asper*, *C. atrox* y *C. simus*. Además, ninguno de los dos lotes probados de Birmex fue capaz de neutralizar la actividad proteolítica del veneno de *A. bilineatus*, que junto con el de *M. nummifer* fueron los peor neutralizados (Fig. 15).

Aunque no hay datos publicados sobre la neutralización de la actividad proteolítica sobre azocaseína para el veneno de *M. nummifer*, la actividad de otras especies del género es relativamente bien neutralizada. Lo anterior se demuestra al compararla con la neutralización de venenos usados como inmunógenos, como es el caso de *B. asper* con el antiveneno ICP (Antúnez et al., 2010). Lo anterior contrasta con nuestros datos dado que existe una gran diferencia en la potencia neutralizante de los faboterápicos hacia las diferentes actividades *in vitro* e *in vivo* del veneno de *B. asper* y el de *M. nummifer*.

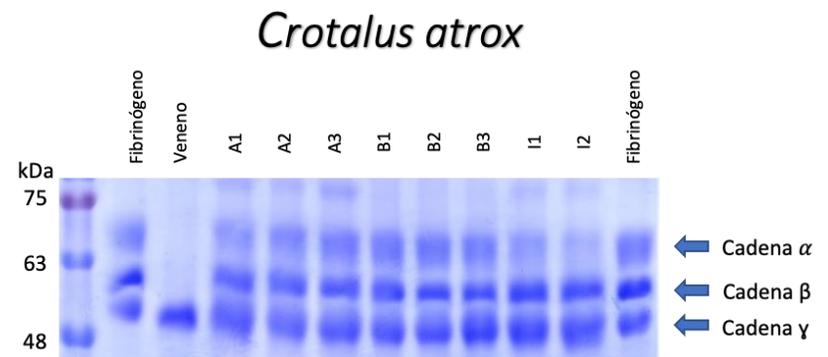
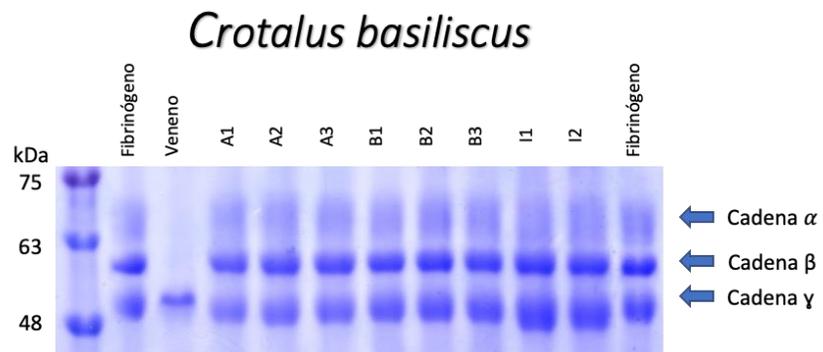
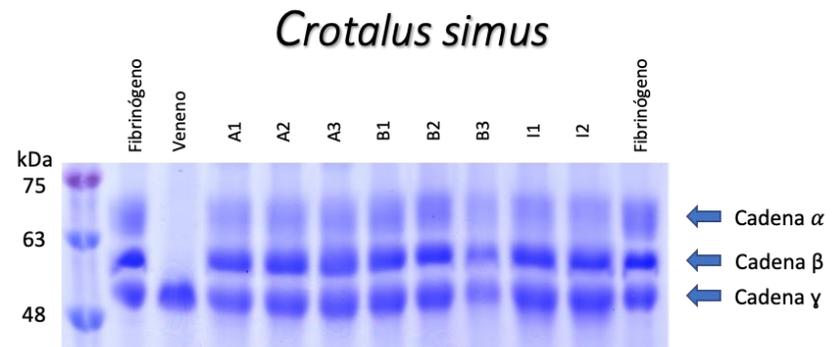
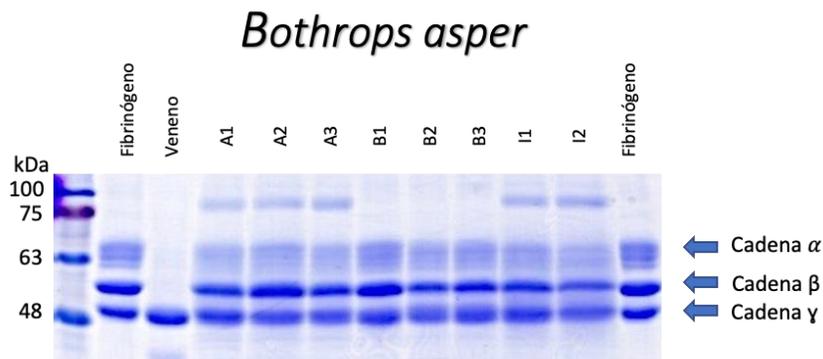


**Figura 15.** Valores de  $DE_{50}$  obtenidos para la neutralización de la actividad proteolítica *in vitro*.  $DE_{50}$  hace referencia a la cantidad de antiveneno necesaria para neutralizar el 50 % de la actividad proteolítica producida por 20 µg de veneno. Las barras del mismo color en diferentes tonos corresponden a lotes distintos del mismo antiveneno, numerados de izquierda a derecha. \*, no existió neutralización. Las barras de error corresponden a los intervalos de confianza al 95 %.

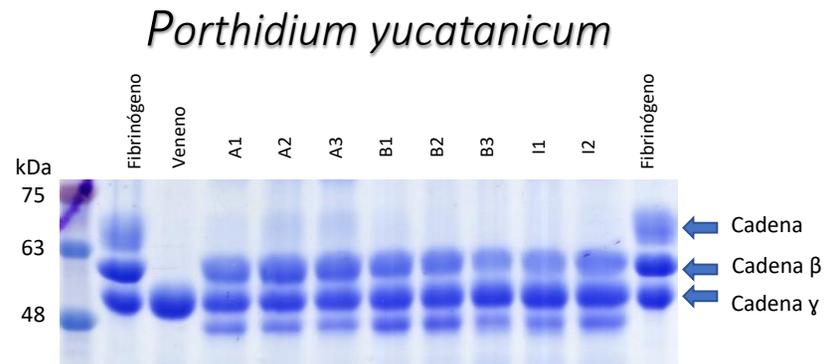
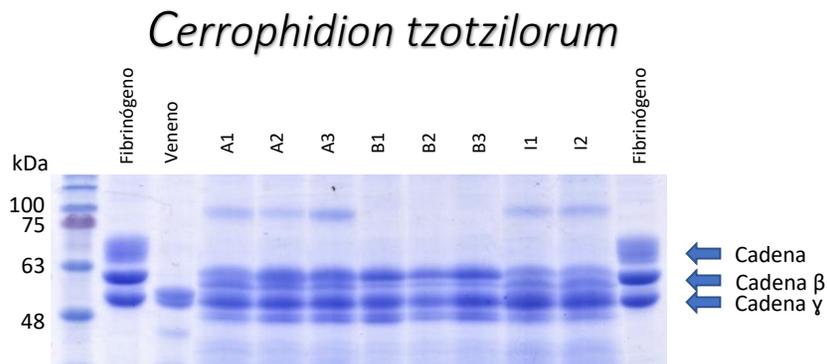
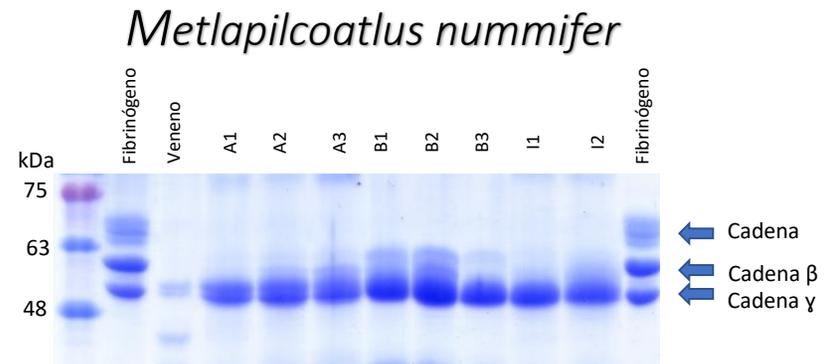
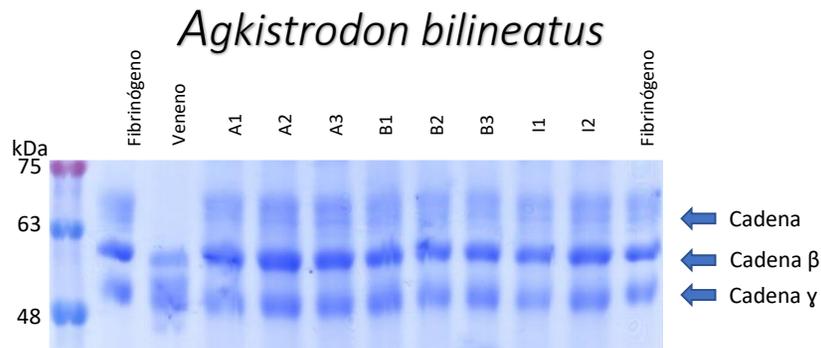
### 7.1.3. NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD FIBRINOGENOLÍTICA *IN VITRO*

Todos los lotes de faboterápico neutralizaron efectivamente la fibrinogenólisis *in vitro* producida por el veneno de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* (Fig. 16). Sin embargo, esto no ocurrió con el veneno de *M. nummifer*, *C. tzotzilorum* y de *P. yucatanicum*, los cuales aún después de ser incubados con los diferentes faboterápicos mantuvieron su actividad proteolítica, en especial contra la cadena  $\alpha$  del fibrinógeno (Fig. 17). El caso de *A. bilineatus* es interesante debido a que la fibrinogenólisis es neutralizada por todos los antivenenos a pesar de que los primeros dos lotes de Birmex no fueron capaces de neutralizar su actividad proteolítica sobre azocaseína (ver sección 7.7.2). Esto sugiere que diferentes proteínas están involucradas en la proteólisis de estos dos sustratos, las cuales son neutralizadas diferencialmente por los faboterápicos producidos por Birmex.

Es importante señalar que, aunque los ensayos de fibrinogenólisis no necesariamente reflejen la dinámica en un envenenamiento real, son buenas herramientas para evaluar la capacidad neutralizante de la actividad proteolítica de SVMs y SVSPs



**Figura 16.** Neutralización de la actividad fibrinogenolítica de los venenos usados como inmunógenos en la producción de los faboterápicos. **A1, A2 y A3**, *Antivipmyn* lotes 1, 2 y 3, respectivamente; **B1, B2 y B3**, *Birmex* lotes 1, 2 y 3, respectivamente; **I1 e I2**, *Inoserp* lotes 1 y 2, respectivamente. En cada gel se incluyeron dos carriles con fibrinógeno sin digerir como control negativo.



**Figura 17.** Neutralización de la actividad fibrinogenolítica de los venenos de géneros distintos a *Bothrops* o *Crotalus*. **A1, A2 y A3**, *Antivipmyn* lotes 1, 2 y 3, respectivamente; **B1, B2 y B3**, *Birmex* lotes 1, 2 y 3, respectivamente; **I1 e I2**, *Inoserp* lotes 1 y 2, respectivamente. En cada gel se incluyeron dos carriles con fibrinógeno sin digerir como control negativo.

## 8. CONCLUSIONES

La evaluación de los faboterápicos antiviperinos mexicanos permitió la identificación de variaciones importantes en diversos aspectos de sus propiedades bioquímicas y terapéuticas, así como la identificación de importantes áreas de oportunidad para su mejora.

El contenido proteico en cada vial es contrastante entre los diversos productos y va desde los 46 mg en Antivipmyn hasta los 286 mg en Birmex. Sin embargo, no toda la proteína contenida en los viales representa moléculas de relevancia terapéutica. La cuantificación de los  $F(ab')_2$  específicos reveló que estos representan entre el 15 y el 30 % del total de proteína en los viales. Por otra parte, en el presente trabajo no se encontró evidencia de algún contaminante que pudiera generar reacciones secundarias en ninguno de los lotes evaluados.

Aunque el reconocimiento de un antígeno por parte de un anticuerpo es necesario para su neutralización, no parece existir una relación clara entre el nivel de reconocimiento y la potencia neutralizante de los faboterápicos evaluados en este trabajo, la cual es diferente entre los distintos productos. Incluso, existe una importante variación de las capacidades neutralizantes entre los distintos lotes de un mismo faboterápico, lo que sugiere la necesidad de homogenizar los venenos usados como inmunógenos.

Aunque los faboterápicos antiviperinos mexicanos cumplen con la NOM-036-SSA2-2012, en este trabajo se encontraron importantes áreas de mejora representadas por la poca y nula neutralización del veneno de *C. atrox* y *M. nummifer*, respectivamente. Esto se enfatiza debido a la amplia distribución de dichas especies, su tamaño y temperamento.

En términos generales, y los venenos usados en la mezcla de inmunización son mejor neutralizados que aquellos no incluidos.

## 9. PROSPECTIVAS

- ⌘ Estudiar a profundidad las características inmonogénicas de las toxinas presentes en el veneno de *Crotalus atrox*, dado que, a pesar de formar parte de la mezcla de inmunización no es bien neutralizado por Inoserp.
- ⌘ Evaluar las características tóxicas del veneno de *Porthidium yucatanicum* que impiden que este sea neutralizado por los faboterápicos probados.
- ⌘ Continuar la evaluación de la potencia neutralizante de los faboterápicos mexicanos para las especies restantes de vipéridos mexicanos incluidos en las categorías 1 y 2 de la OMS (*Agkistrodon contortix*, *A. russeolus*, *A. taylori*, *Bothriechis schlegelii*, *Cerrophidion godmani*, *Crotalus molossus*, *C. oreganus*, *C. ruber*, *C. scutulatus*, *C. totonacus*, *C. tzabcan*, *C. viridis*, *Porthidium nasutum* y *Sistrurus catenatus*).

## 10. REFERENCIAS

- Agraz, A., Duarte, C. A., Costa, L., Pérez, L., Páez, R., Pujol, V., & Fontirrochi, G. (1994). Immunoaffinity purification of recombinant hepatitis B surface antigen from yeast using a monoclonal antibody. *Journal of Chromatography A*, 672(1–2), 25–33. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)80591-1](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)80591-1)
- Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M., & Calvete, J. J. (2008). Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations. *Journal of Proteome Research*, 7(8), 3556–3571. <https://doi.org/10.1021/pr800332p>
- Alberts, M. B., Shalit, M., & LoGalbo, F. (2004). Suction for venomous snakebite. *Annals of Emergency Medicine*, 43(2), 181–186. [https://doi.org/10.1016/S0196-0644\(03\)00813-8](https://doi.org/10.1016/S0196-0644(03)00813-8)
- Ali, S. A., Stoeva, S., Abbasi, A., Alam, J. M., Kayed, R., Faigle, M., Neumeister, B., & Voelter, W. (2000). Isolation, Structural, and Functional Characterization of an Apoptosis-Inducing - Amino Acid Oxidase from Leaf-Nosed Viper (*Eristocophis macmahoni*) Snake Venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 384(2), 216–226. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2130>
- Andrade, D. v., & Abe, A. S. (1999). Relationship of venom ontogeny and diet in *Bothrops*. *Herpetologica*, 55(2), 200–204.
- Angulo, Y., Gutiérrez, J. M., Soares, A. M., Cho, W., & Lomonte, B. (2005). Myotoxic and cytolytic activities of dimeric Lys49 phospholipase A 2 homologues are reduced, but not abolished, by a pH-induced dissociation. *Toxicon*, 46(3), 291–296. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.03.025>
- Antúnez, J., Fernández, J., Lomonte, B., Angulo, Y., Sanz, L., Pérez, A., Calvete, J. J., & María Gutiérrez, J. (2010). Antivenomics of *Atropoides mexicanus* and *Atropoides picadoi* snake venoms: Relationship to the neutralization of toxic and enzymatic activities. In *Authors / Journal of Venom Research* (Vol. 1).
- Barlow, A., Pook, C. E., Harrison, R. A., & Wüster, W. (2009). Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1666), 2443–2449. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0048>
- Barrett, A. J., & Rawlings, N. D. (1995). Families and Clans of Serine Peptidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 318(2), 247–250. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1227>

- Bénard-Valle, M., Neri, E., Boyer, L., Jackson, T., Sunagar, K., & Clarkson, M. (2015). Ineffective traditional and modern techniques for the treatment of snakebite. *Venomous Reptiles and Their Toxins*, 73–88.
- Bjarnason, J. B., & Fox, J. W. (1994). Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacology and Therapeutics*, 62(3), 325–372. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(94\)90049-3](https://doi.org/10.1016/0163-7258(94)90049-3)
- Bochner, R. (2016). Paths to the discovery of antivenom serotherapy in France. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 22(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40409-016-0074-7>
- Bode, W., Grams, F., Reinemer, P., Gomis-Rüth, F. X., Baumann, U., McKay, D. B., & Stöcker, W. (1996). The metzincin-superfamily of zinc-peptidases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 389, 1–11. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0335-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0335-0_1)
- Borja, M., Neri-Castro, E., Castañeda-Gaytán, G., Strickland, J. L., Parkinson, C. L., Castañeda-Gaytán, J., Ponce-López, R., Lomonte, B., Olvera-Rodríguez, A., Alagón, A., & Pérez-Morales, R. (2018). Biological and Proteolytic Variation in the Venom of *Crotalus scutulatus scutulatus* from Mexico. *Toxins*, 10(1), 35. <https://doi.org/10.3390/toxins10010035>
- Borja, M., Neri-Castro, E., Pérez-Morales, R., Strickland, J. L., Ponce-López, R., Parkinson, C. L., Espinosa-Fematt, J., Sáenz-Mata, J., Flores-Martínez, E., Alagón, A., & Castañeda-Gaytán, G. (2018). Ontogenetic change in the venom of mexican blacktailed rattlesnakes (*Crotalus molossus nigrescens*). *Toxins*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/toxins10120501>
- Braud, S., Bon, C., & Wisner, A. (2000). Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie*, 82(9–10), 851–859. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)01178-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01178-0)
- Brown, N., & Landon, J. (2010). Antivenom: The most cost-effective treatment in the world? *Toxicon*, 55(7), 1405–1407. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.02.012>
- Bush, S., Hegewald, K., Green, S., Cardwell, M., & Hayes, W. (2000). Effects of negative pressure venom extraction device (Extractor) on local tissue injury after artificial rattlesnake envenomation in a porcine mode. *Wilderness & Environmental Medicine*, 11, 180–188. [https://doi.org/10.1580/1080-6032\(2000\)011\[0180:EOANPV\]2.3.CO;2](https://doi.org/10.1580/1080-6032(2000)011[0180:EOANPV]2.3.CO;2)
- Calvete, J. J., Fasoli, E., Sanz, L., Boschetti, E., & Righetti, P. G. (2009). Exploring the venom proteome of the western diamondback rattlesnake, *Crotalus atrox*, via snake venomomics and combinatorial peptide ligand library approaches. *Journal of Proteome Research*, 8(6), 3055–3067. <https://doi.org/10.1021/pr900249q>
- Calvete, J. J., Rodríguez, Y., Quesada-Bernat, S., & Pla, D. (2018). Toxin-resolved antivenomics-guided assessment of the immunorecognition landscape of antivenoms. *Toxicon*, 148, 107–122. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.04.015>

- Calvete, J. J., Sanz, L., Angulo, Y., Lomonte, B., & Gutiérrez, J. M. (2009). Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Letters*, *583*(11), 1736–1743. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.029>
- Carbajal-Márquez, R. A., Cedeño-Vázquez, J. R., Martínez-Arce, A., Neri-Castro, E., & Machkour-M'Rabet, S. C. (2020). Accessing cryptic diversity in Neotropical rattlesnakes (Serpentes: Viperidae: Crotalus) with the description of two new species. *Zootaxa*, *4729*(4), 451–481. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4729.4.1>
- Cardoso, J. L. C., Fan, H. W., Franca, F. O. S., Jorge, M. T., Leite, R. P., Nishioka, S. A., Avila, A., Tomy, S. C., & Santoro, M. L. (1993). Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. *QJM: An International Journal of Medicine*, 315–325. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.qjmed.a068818>
- Castro, E. N., Lomonte, B., del Carmen Gutiérrez, M., Alagón, A., & Gutiérrez, J. M. (2013). Intraspecies variation in the venom of the rattlesnake *Crotalus simus* from Mexico: Different expression of crotoxin results in highly variable toxicity in the venoms of three subspecies. *Journal of Proteomics*, *87*(c), 103–121. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.024>
- Chen, Y. H., Wang, Y. M., Hseu, M. J., & Tsai, I. H. (2004). Molecular evolution and structure-function relationships of crotoxin-like and asparagine-6-containing phospholipases A2 in pit viper venoms. *Biochemical Journal*, *381*(1), 25–34. <https://doi.org/10.1042/BJ20040125>
- Chippaux, J. P. (1998). Snake-bites: Appraisal of the global situation. *Bulletin of the World Health Organization*, *76*(5), 515–524.
- Chippaux, J. P. (2017a). Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. In *PLoS Neglected Tropical Diseases* (Vol. 11, Issue 6). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005662>
- Chippaux, J. P. (2017b). Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, *23*(1), 1–2. <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0127-6>
- Chippaux, J. P., Williams, V., & White, J. (1991). Snake Venom Variability : Methods of Study . *Toxicon*, *29*(11), 1279–1303.
- Colis-Torres, A., Neri-Castro, E., Strickland, J. L., Olvera-Rodríguez, A., Borja, M., Calvete, J., Jones, J., Parkinson, C. L., Bañuelos, J., López de León, J., & Alagón, A. (2022). Intraspecific venom variation of Mexican West Coast Rattlesnakes (*Crotalus basiliscus*) and its implications for antivenom production. *Biochimie*, *192*, 111–124. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.10.006>
- Costa, J. O., Fonseca, K. C., Neves Mamede, C. C., Beletti, M. E., Santos-Filho, N. A., Soares, A. M., Arantes, E. C., Hirayama, S. N. S., Selistre-de-Araújo, H. S., Fonseca, F., Henrique-Silva, F.,

- Penha-Silva, N., & Oliveira, F. de. (2010). Bhalternin: Functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. *Toxicon*, *55*(7), 1365–1377. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.02.014>
- Costa, T. R., Burin, S. M., Menaldo, D. L., de Castro, F. A., & Sampaio, S. V. (2014). Snake venom L-amino acid oxidases: An overview on their antitumor effects. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, *20*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1678-9199-20-23>
- Creer, S., Malhotra, A., Thorpe, R. S., Stöcklin, R. S., Favreau, P. S., & Hao Chou, W. S. (2003). Genetic and Ecological Correlates of Intraspecific Variation in Pitviper Venom Composition Detected Using Matrix-Assisted Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) and Isoelectric Focusing. *Journal of Molecular Evolution*, *56*(3), 317–329. <https://doi.org/10.1007/s00239-002-2403-4>
- Daltry, J. C., Wüster, W., & Thorpe, R. S. (1996). Diet and snake venom evolution. *Nature*, *379*(6565), 537–540. <https://doi.org/10.1038/379537a0>
- De Roodt, A. R., Clement, H., Dolab, J. A., Litwin, S., Hajos, S. E., Boyer, L., & Alagón, A. (2014). Protein content of antivenoms and relationship with their immunochemical reactivity and neutralization assays. *Clinical Toxicology*, *52*(6), 594–603. <https://doi.org/10.3109/15563650.2014.925561>
- Dean, P. D. G., Brown, P., Leyland, M. J., Watson, D. H., Angal, S., & Harvey, M. J. (1977). Electrophoretic Desorption of Affinity Adsorbents. *Biochemical Society Transactions*, *5*(4), 1111–1113. <https://doi.org/10.1042/bst0051111a>
- Dennis, E. A., Cao, J., Hsu, Y., Magrioti, V., & Kokotos, G. (2011). Phospholipase A enzymes Physical Structure, Biological Function,.pdf. *Chemical Reviews*, *111*, 6130–6185.
- Fan, H. W., Natal Vigilato, M. A., Augusto Pompei, J. C., & Gutiérrez, J. M. (2019). Situación de los laboratorios públicos productores de antivenenos en América Latina. *Revista Panamericana de Salud Pública*, *43*, 1. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2019.92>
- Faure, G., & Bon, C. (1988). Crotoxin, a Phospholipase A2 Neurotoxin from the South American Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: Purification of Several Isoforms and Comparison of Their Molecular Structure and of Their Biological Activities. *Biochemistry*, *27*(2), 730–738. <https://doi.org/10.1021/bi00402a036>
- Faure, G., Čopič, A., le Porrier, S., Gubenšek, F., Bon, C., & Križaj, I. (2003). Crotoxin acceptor protein isolated from *Torpedo electric* organ: Binding properties to crotoxin by surface plasmon resonance. *Toxicon*, *41*(4), 509–517. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00394-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00394-X)

- Faure, G., Xu, H., & Saul, F. A. (2011). Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric  $\beta$ -neurotoxin. *Journal of Molecular Biology*, *412*(2), 176–191. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.07.027>
- Feldkamp, C. S., & Carey, J. L. (1996). Immune function and antibody structure. In E. P. Diamandis & T. K. Christopoulos (Eds.), *Immunoassay* (pp. 5–24). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012214730-2/50003-0>
- Flores-Villela, O., & García-Vázquez, U. O. (2014). Biodiversity of reptiles in Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *85*(SUPPL.). <https://doi.org/10.7550/rmb.43236>
- Fry, B. G. (2015). *Venomous Reptiles and their Toxins*. *53*(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Gallegos, M. G. (2008). *Caracterización de la reactividad cruzada del faboterápico polivalente antivipireno contra el veneno de serpientes mexicana del género Crotalus, especies C. basiliscus, C. atrox, C. ravus, y C. Molossus* (I. N. de S. P. (México)., Ed.). El autor.
- García-Osorio, B., Lomonte, B., Bénard-Valle, M., López de León, J., Román-Domínguez, L., Mejía-Domínguez, N. R., Lara-Hernández, F., Alagón, A., & Neri-Castro, E. (2020). Ontogenetic changes in the venom of Metlapilcoatlus nummifer, the mexican jumping viper. *Toxicon*, *184*, 204–214. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.06.023>
- Ghazaryan, N. A., Ghulikyan, L., Kishmiryan, A., Andreeva, T. V., Utkin, Y. N., Tsetlin, V. I., Lomonte, B., & Ayvazyan, N. M. (2015). Phospholipases a2 from Viperidae snakes: Differences in membranotropic activity between enzymatically active toxin and its inactive isoforms. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1848*(2), 463–468. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.037>
- Girón, M. E., Ramos, M. I., Cedeño, L., Carrasquel, A., Sánchez, E. E., Navarrete, L. F., & Rodríguez-Acosta, A. (2018). Exploring the biochemical, haemostatic and toxinological aspects of mapanare dry-tail (Porthidium lansbergii rozei) snake's venom causing human accidents in Eastern Venezuela. *Investigación Clínica*, *59*(3), 260–277. <https://doi.org/10.22209/IC.v59n3a06>
- Glenn, J. L., & Straight, R. C. (1978). Mojave rattlesnake Crotalus scutulatus scutulatus venom: variation in toxicity with geographical origin. *Toxicon*, *16*(1), 81–84. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(78\)90065-X](https://doi.org/10.1016/0041-0101(78)90065-X)
- Glenn, J. L., & Straight, R. C. (1989). Intergradation of two different venom populations of the Mojave rattlesnake (Crotalus scutulatus scutulatus) in Arizona. *Toxicon*, *27*(4), 411–418. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(89\)90203-1](https://doi.org/10.1016/0041-0101(89)90203-1)

- Gonçalves, L. R., & Mariano, M. (2000). Local haemorrhage induced by Bothrops jararaca venom: relationship to neurogenic inflammation. *Mediators of Inflammation*, *9*(2), 101–107. <https://doi.org/10.1080/096293500411569>
- Guo, C., Liu, S., Yao, Y., Zhang, Q., & Sun, M. Z. (2012). Past decade study of snake venom l-amino acid oxidase. *Toxicon*, *60*(3), 302–311. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.05.001>
- Gutiérrez, J. M. (2018). Preclinical assessment of the neutralizing efficacy of snake antivenoms in Latin America and the Caribbean: A review. *Toxicon*, *146*, 138–150. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.02.053>
- Gutiérrez, J. M., Calvete, J. J., Habib, A. G., Harrison, R. A., Williams, D. J., & Warrell, D. A. (2017). Snakebite envenoming. *Nature Reviews. Disease Primers*, *3*, 17063. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.63>
- Gutiérrez, J. M., Escalante, T., Rucavado, A., Herrera, C., & Fox, J. W. (2016). A comprehensive view of the structural and functional alterations of extracellular matrix by snake venom metalloproteinases (SVMPs): Novel perspectives on the pathophysiology of envenoming. *Toxins*, *8*(10). <https://doi.org/10.3390/toxins8100304>
- Gutiérrez, J. M., León, G., & Burnouf, T. (2011). Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: The road ahead. *Biologicals*, *39*(3), 129–142. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.02.005>
- Gutiérrez, J. M., Romero, M., Núñez, J., Chaves, F., Borkow, G., & Ovadia, M. (1995). Skeletal Muscle Necrosis and Regeneration after Injection of BaH1, A Hemorrhagic Metalloproteinase Isolated from the Venom of the Snake Bothrops asper (Terciopelo). *Experimental and Molecular Pathology*, *62*(1), 28–41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/exmp.1995.1004>
- Gutiérrez, J. M., & Rucavado, A. (2000). Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*, *82*(9–10), 841–850. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)01163-9](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01163-9)
- Gutiérrez, J. M., Rucavado, A., Escalante, T., & Díaz, C. (2005). Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: Biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*, *45*(8), 997–1011. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.029>
- Gutiérrez, J. M., Sanz, L., Flores-Díaz, M., Figueroa, L., Madrigal, M., Herrera, M., Villalta, M., León, G., Estrada, R., Borges, A., Alape-Girón, A., & Calvete, J. J. (2010). Impact of regional variation in Bothrops asper snake venom on the design of antivenoms: Integrating antivenomics and neutralization approaches. *Journal of Proteome Research*, *9*(1), 564–577. <https://doi.org/10.1021/pr9009518>

- Gutiérrez, J. M., Theakston, R. D. G., & Warrell, D. A. (2006). Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: The need for a global partnership. *PLoS Medicine*, *3*(6), 0727–0731. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030150>
- Gutiérrez, J. M., Tsai, W. C., Pla, D., Solano, G., Lomonte, B., Sanz, L., Angulo, Y., & Calvete, J. J. (2013). Preclinical assessment of a polyspecific antivenom against the venoms of *Cerrophidion sasai*, *Porthidium nasutum* and *Porthidium ophryomegas*: Insights from combined antivenomics and neutralization assays. *Toxicon*, *64*, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.12.024>
- Harlow, Edward., & Lane, D. (1988). *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Hawgood, B. J., & Smith, J. W. (1977). The mode of action at the mouse neuromuscular junction of the Phospholipase A-crotapotin complex isolated from venom of the south american rattlesnake. *British Journal of Pharmacology*, *61*(4), 597–606. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1977.tb07553.x>
- Herrera, M., Paiva, O. K., Pagotto, A. H., Segura, Á., Serrano, S. M. T., Vargas, M., Villalta, M., Jensen, S. D., León, G., Williams, D. J., & Gutiérrez, J. M. (2014). Antivenomic characterization of two antivenoms against the venom of the taipan, *Oxyuranus scutellatus*, from Papua New Guinea and Australia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *91*(5), 887–894. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0333>
- Hite, L. A., Jia, L. G., Bjarnason, J. B., & Fox, J. W. (1994). cDNA Sequences for Four Snake Venom Metalloproteinases: Structure, Classification, and Their Relationship to Mammalian Reproductive Proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *308*(1), 182–191. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1026>
- Huang, T. F., Holt, J. C., Lukasiewicz, H., & Niewiarowski, S. (1987). Trigramin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex. *Journal of Biological Chemistry*, *262*(33), 16157–16163.
- Hui Wen, F., Monteiro, W. M., Moura da Silva, A. M., Tambourgi, D. v., Mendonça da Silva, I., Sampaio, V. S., dos Santos, M. C., Sachett, J., Ferreira, L. C. L., Kalil, J., & Lacerda, M. (2015). Snakebites and Scorpion Stings in the Brazilian Amazon: Identifying Research Priorities for a Largely Neglected Problem. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *9*(5), e0003701. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003701>
- Itoh, N., Tanaka, N., Mihashi, S., & Yamashina, I. (1987). Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, *262*(7), 3132–3135. <http://www.jbc.org/content/262/7/3132.abstract>
- Jones, L., Youngman, N. J., Neri-Castro, E., Guadarrama-Martínez, A., Lewin, M. R., Carter, R., Frank, N., & Fry, B. G. (2022). Differential Antivenom and Small-Molecule Inhibition of Novel

- Coagulotoxic Variations in Atropoides, Cerrophiidion, Metlapilcoatlus, and Porthidium American Viperid Snake Venoms. *Toxins*, 14(8). <https://doi.org/10.3390/toxins14080511>
- Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A. R., De Silva, N., Gunawardena, N. K., Pathmeswaran, A., Premaratna, R., Savioli, L., Lalloo, D. G., & De Silva, H. J. (2008). The global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Medicine*, 5(11), 1591–1604. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050218>
- Kim, Y. H., Choi, J. H., Kim, J., & Chung, Y. K. (2019). Fasciotomy in compartment syndrome from snakebite. *Archives of Plastic Surgery*, 46(1), 69–74. <https://doi.org/10.5999/aps.2018.00577>
- Kini, R. M., & Koh, C. Y. (2016). Metalloproteases Affecting Blood Coagulation, Fibrinolysis and Platelet Aggregation from Snake Venoms: Definition and Nomenclature of Interaction Sites. *Toxins*, 8(10), 284. <https://doi.org/10.3390/toxins8100284>
- Kochva, E., & Gans, C. (1966). Histology and Histochemistry of Venom Glands of Some Crotaline Snakes. *Copeia*, 1966(3), 506. <https://doi.org/10.2307/1441074>
- Kohl, T. O., & Ascoli, C. A. (2017). Indirect immunometric ELISA. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017(5), 396–401. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot093708>
- Kurtović, T., Brgles, M., Balija, M. L., Steinberger, S., Sviben, D., Marchetti-Deschmann, M., & Halassy, B. (2020). Streamlined downstream process for efficient and sustainable (Fab')<sub>2</sub> antivenom preparation. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 26(July), 1–11. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0025>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lalloo, D. G., & Theakston, R. D. G. (2003). Snake antivenoms. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology*, 41(3), 277–290. <https://doi.org/10.1081/CLT-120021113>
- Lecht, S., Chiaverelli, R. A., Gerstenhaber, J., Calvete, J. J., Lazarovici, P., Casewell, N. R., Harrison, R., Lelkes, P. I., & Marcinkiewicz, C. (2015). Anti-angiogenic activities of snake venom CRISP isolated from *Echis carinatus* sochureki. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850(6), 1169–1179. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.02.002>
- Liang, X. X., Zhou, Y. N., Chen, J. S., Qiu, P. X., Chen, H. Z., Sun, H. H., Wu, Y. P., & Yan, G. M. (2005). Enzymological characterization of FIIa, a fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon acutus* venom. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26(12), 1474–1478. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00204.x>
- Lomonte, B., Angulo, Y., & Gutierrez, M. S. and J. M. (2009). The Phospholipase A2 Homologues of Snake Venoms: Biological Activities and Their Possible Adaptive Roles. In *Protein & Peptide*

Letters (Vol. 16, Issue 8, pp. 860–876).  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/092986609788923356>

- Lomonte, B., Fernández, J., Sanz, L., Angulo, Y., Sasa, M., Gutiérrez, J. M., & Calvete, J. J. (2014). Venomous snakes of Costa Rica: Biological and medical implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of snake venomomics. *Journal of Proteomics*, *105*, 323–339. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.020>
- Lomonte, B., Gené, JoséA., Gutiérrez, J., & Cerdas, L. (1983). Estudio comparativo de los venenos de serpiente Cascabel (*Crotalus durissus durissus*) de ejemplares adultos y recién nacidos. *Toxicon*, *21*(3), 379–384. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(83\)90094-6](https://doi.org/10.1016/0041-0101(83)90094-6)
- Lomonte, B., & Gutiérrez, J. M. (2011). Phospholipases A2 from viperidae snake venoms: How do they induce skeletal muscle damage? *Acta Chimica Slovenica*, *58*(4), 647–659.
- Mackessy, S. P. (1988). Venom Ontogeny in the Pacific Rattlesnakes *Crotalus viridis helleri* and *C. v. oreganus*. *Copeia*, *1988*(1), 92. <https://doi.org/10.2307/1445927>
- Mackessy, S. P. (1991). Morphology and ultrastructure of the venom glands of the northern pacific rattlesnake *Crotalus viridis oreganus*. *Journal of Morphology*, *208*(1), 109–128. <https://doi.org/10.1002/jmor.1052080106>
- Mackessy, S. P. (1993). Fibrinogenolytic proteases from the venoms of juvenile and adult northern pacific rattlesnakes (*Crotalus viridis oreganus*). *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry And*, *106*(1), 181–189. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(93\)90025-Z](https://doi.org/10.1016/0305-0491(93)90025-Z)
- Mackessy, S. P. (2008). Venom Composition in Rattlesnakes: Trends and Biological Significance. *The Biology of Rattlesnakes*, 495–510.
- Mackessy, S. P. (2010). *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*.
- Mackessy, S. P., & Baxter, L. M. (2006). Bioweapons synthesis and storage: The venom gland of front-fanged snakes. *Zoologischer Anzeiger*, *245*(3–4), 147–159. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2006.01.003>
- Matsui, T., Fujimura, Y., & Titani, K. (2000). Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1477*(1–2), 146–156. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00268-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00268-X)
- Menezes, M. C., Furtado, M. F., Travaglia-Cardoso, S. R., Camargo, A. C. M., & Serrano, S. M. T. (2006). Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen Bothrops jararaca siblings. *Toxicon*, *47*(3), 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.11.007>
- Minton, S. A. (1987). Present tests for detection of snake venom: Clinical applications. *Annals of Emergency Medicine*, *16*(9), 932–937. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0196-0644\(87\)80736-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0196-0644(87)80736-9)

- Minton, S. A., & Weinstein, S. A. (1986). Geographic and ontogenic variation in venom of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). *Toxicon*, 24(1), 71–80. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(86\)90167-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(86)90167-4)
- Mosesson, M. W. (2005). Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(8), 1894–1904. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01365.x>
- Moura-da-Silva, A., Butera, D., & Tanjoni, I. (2007). Importance of Snake Venom Metalloproteinases in Cell Biology: Effects on Platelets, Inflammatory and Endothelial Cells. *Current Pharmaceutical Design*, 13(28), 2893–2905. <https://doi.org/10.2174/138161207782023711>
- Murayama, N., Saguchi, K., Mentele, R., Assakura, M. T., Ohi, H., Fujita, Y., Camargo, A. C. M., Higuchi, S., & Serrano, S. M. T. (2003). The unusual high molecular mass of Bothrops protease A, a trypsin-like serine peptidase from the venom of *Bothrops jararaca*, is due to its high carbohydrate content. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1652(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.08.001>
- Neri-Castro, E. (2010). *Reconocimiento inmunoquímico de venenos de vipéridos Norteamericanos por antivipmyn y crofab*.
- Neri-Castro, E., Bénard-Valle, M., Gil, G., Borja, M., León, J. L. De, & Alagón, A. (2020). Serpientes venenosas en México: Una revisión al estudio de los venenos, los antivenenos y la epidemiología. *Revista Latinoamericana de Herpetología*, 03(02), 5–22.
- Neri-Castro, E., Bénard-Valle, M., López de León, J., Boyer, L., & Alagón, A. (2021). Envenomations by Reptiles in Mexico. In S. P. Mackessy (Ed.), *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles* (2nd ed., pp. 525–538). CRC Press.
- Neri-Castro, E., Lomonte, B., Valdés, M., Ponce-López, R., Bénard-Valle, M., Borja, M., Strickland, J. L., Jones, J. M., Grünwald, C., Zamudio, F., & Alagón, A. (2019). Venom characterization of the three species of *Ophryacus* and proteomic profiling of *O. sphenophrys* unveils Sphenotoxin, a novel Crotoxin-like heterodimeric  $\beta$ -neurotoxin. *Journal of Proteomics*, 192(July 2018), 196–207. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.09.002>
- Neri-Castro, E., & Ponce-López, R. (2018). Variación ontogénica en el veneno de *Crotalus simus* en México. *Árido-Ciencia*, 3(1), 42–47.
- Neri-Castro, E., Sanz, L., Olvera-Rodríguez, A., Bénard-Valle, M., Alagón, A., & Calvete, J. J. (2020). Venomics and biochemical analysis of the black-tailed horned pitviper, *Mixcoatlus melanurus*, and characterization of Melanurutoxin, a novel crotoxin homolog. *Journal of Proteomics*, 225, 103865. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103865>

- Ohsaka, A. (1979). Hemorrhagic, Necrotizing and Edema-Forming Effects of Snake Venoms. In C.-Y. Lee (Ed.), *Snake Venoms* (pp. 480–546). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-66913-2\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-642-66913-2_14)
- Olson, W. C., Leung, S. K., & Yarmush, M. L. (1989). Recovery of Antigens From Immunoabsorbents Using High Pressure. *Nature Biotechnology*, *7*(4), 369–373. <https://doi.org/10.1038/nbt0489-369>
- Otero, R., Gutiérrez, J., Mesa, M. B., Duque, E., Rodríguez, O., Arango, J. L., Gómez, F., Toro, A., Cano, F., Rodríguez, L. M., Caro, E., Martínez, J., Cornejo, W., Gómez, L. M., Uribe, F. L., Cárdenas, S., Núñez, V., & Díaz, A. (2002). Complications of Bothrops, Porthidium, and Bothriechis snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon*, *40*(8), 1107–1114. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00104-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00104-6)
- Otero, R., Núñez, V., Barona, J., Díaz, A., & Saldarriaga, M. (2002). Características bioquímicas y capacidad neutralizante de cuatro antivenenos polivalentes frente a los efectos farmacológicos y enzimáticos del veneno de Bothrops asper y Porthidium nasutum de Antioquia y Chocó. *Iatreia*, *15*, 05–15.
- Ownby, C. L., Bjarnason, J., & Tu, A. T. (1978). Hemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. Pathogenesis of hemorrhage induced by three purified toxins. *The American Journal of Pathology*, *93*(1), 201–218.
- Ownby, C. L., & Geren, C. R. (1987). Pathogenesis of hemorrhage induced by hemorrhagic proteinase IV from timber rattlesnake (*Crotalus horridus horridus*) venom. *Toxicon*, *25*(5), 517–526. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101\(87\)90287-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101(87)90287-X)
- Ownby, C. L., Kainer, R. A., & Tu, A. T. (1974). Pathogenesis of hemorrhage induced by rattlesnake venom. An electron microscopic study. *The American Journal of Pathology*, *76*(2), 401–414.
- Parry, M. A. A., Jacob, U., Huber, R., Wisner, A., Bon, C., & Bode, W. (1998). The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. *Structure*, *6*(9), 1195–1206. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(98\)00119-1](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00119-1)
- Pla, D., Gutiérrez, J. M., & Calvete, J. J. (2012). Second generation snake antivenomics: Comparing immunoaffinity and immunodepletion protocols. *Toxicon*, *60*(4), 688–699. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.04.342>
- Pope, C. G. (1939). The Action of Proteolytic Enzymes on the Antitoxins and Proteins in Immune Sera: I. True Digestion of the Proteins. *British Journal of Experimental Pathology*, *20*(2), 132.

- Rawat, S., Laing, G., Smith, D. C., Theakston, D., & Landon, J. (1994). A new antivenom to treat eastern coral snake (*Micrurus fulvius fulvius*) envenoming. *Toxicon*, 32(2), 185–190. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90107-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90107-4)
- Rivas, E., Neri, E., Bénard, M., Rucavado-Romero, A., Olvera, A., Zamudio, F., Alagón, A., & Garza, L. (2020). Disintegrins extracted from totonacan rattlesnake (*Crotalus totonacus*) venom and their anti-adhesive and anti-migration effects on MDA-MB-231 and HMEC-1 cells. *Toxicology in Vitro*, 65(February), 104809. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104809>
- Rivas, E., Neri-Castro, E., Bénard-Valle, M., Hernández-Dávila, A. I., Zamudio, F., & Alagón, A. (2017). General characterization of the venoms from two species of rattlesnakes and an intergrade population (*C. lepidus* x *aquilus*) from Aguascalientes and Zacatecas, Mexico. *Toxicon*, 138, 191–195. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.09.002>
- Rojas, G., Jiménez, J., & Gutiérrez, J. (1994). Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: Description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon*, 32(3), 351–363. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90087-6](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90087-6)
- Román-Domínguez, L., Neri-Castro, E., Vázquez López, H., García-Osorio, B., Archundia, I. G., Ortiz-Medina, J. A., Petricevich, V. L., Alagón, A., & Bénard-Valle, M. (2019). Biochemical and immunochemical characterization of venoms from snakes of the genus *Agkistrodon*. *Toxicon*: X, 4(August), 100013. <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2019.100013>
- Russell, F. E. (1980). *Snake Venom Poisoning*. Lippincott.
- Russell, F. E., Walter, F. G., Bey, T. A., & Fernandez, M. C. (1997). Snakes and snakebite in Central America. *Toxicon*, 35(10), 1469–1522. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(96\)00209-7](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(96)00209-7)
- Rzedowski, J. (2006). Bases fisiográficas. In J. Rzedowski (Ed.), *Vegetación de México* (1ra. Edición digital, pp. 20–32). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Norma Oficial Mexicana NOM-036-SSA2-2012, Prevención y control de enfermedades. Aplicación de vacunas, toxoides, faboterápicos (sueros) e inmunoglobulinas en el humano, (2012).
- Salud, S. de. (2014). *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* (11th ed.).
- Samel, M., Vija, H., Rönholm, G., Siigur, J., Kalkkinen, N., & Siigur, E. (2006). Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting l-amino acid oxidase from *Vipera berus berus* (common viper) venom. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1764(4), 707–714. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.01.021>
- Sampaio, S. C., Hyslop, S., Fontes, M. R. M., Prado-Franceschi, J., Zambelli, V. O., Magro, A. J., Brigatte, P., Gutierrez, V. P., & Cury, Y. (2010). Crotoxin: Novel activities for a classic  $\beta$ -neurotoxin. *Toxicon*, 55(6), 1045–1060. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.01.011>

- Sánchez, E. E., Galán, J. A., Perez, J. C., Rodríguez-Acosta, A., Chase, P. B., & Pérez, J. C. (2003). The efficacy of two antivenoms against the venom of North American snakes. *Toxicon*, 41(3), 357–365. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00330-6](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00330-6)
- Sánchez, M., Solano, G., Vargas, M., Reta-Mares, F., Neri-Castro, É., Alagón, A., Sánchez, A., Villalta, M., León, G., & Segura, Á. (2020). Toxicological profile of medically relevant *Crotalus* species from Mexico and their neutralization by a *Crotalus basiliscus/Bothrops asper* antivenom. *Toxicon*, 179(January), 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.03.006>
- Schioldann, E., Mahmood, M. A., Kyaw, M. M., Halliday, D., Thwin, K. T., Chit, N. N., Cumming, R., Bacon, D., Alfred, S., White, J., Warrell, D., & Peh, C. A. (2018). Why snakebite patients in Myanmar seek traditional healers despite availability of biomedical care at hospitals? Community perspectives on reasons VO - 12 RT - Journal Article. *PLoS Neglected Tropical Diseases OP - Article: E0006299, 2 WP-*, 1–14.
- Schlamowitz, M., Kaplan, M., Shaw, A. R., & Tsay, D. (1975). Preparation and Characterization of Rabbit IgG Fractions. *The Journal of Immunology*, 114(5), 1590–1598.
- Segura, Á., Herrera, M., Reta Mares, F., Jaime, C., Sánchez, A., Vargas, M., Villalta, M., Gómez, A., Gutiérrez, J. M., & León, G. (2017). Proteomic, toxicological and immunogenic characterization of Mexican west-coast rattlesnake (*Crotalus basiliscus*) venom and its immunological relatedness with the venom of Central American rattlesnake (*Crotalus simus*). *Journal of Proteomics*, 158, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.02.015>
- Segura, Á., Herrera, M., Villalta, M., Vargas, M., Gutiérrez, J. M., & León, G. (2013). Assessment of snake antivenom purity by comparing physicochemical and immunochemical methods. *Biologicals*, 41(2), 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.11.001>
- Segura, Á., Herrera, M., Villalta, M., Vargas, M., Uscanga-Reynell, A., de León-Rosales, S. P., Jiménez-Corona, M. E., Reta-Mares, J. F., Gutiérrez, J. M., & León, G. (2012). Venom of *Bothrops asper* from Mexico and Costa Rica: Intraspecific variation and cross-neutralization by antivenoms. *Toxicon*, 59(1), 158–162. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.11.005>
- Serrano, S. M. T. (2013). The long road of research on snake venom serine proteinases. *Toxicon*, 62, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.003>
- Skarnes, R. C. (1970). L-Amino-acid Oxidase, a Bactericidal System. *Nature*, 225(5237), 1072–1073. <https://doi.org/10.1038/2251072a0>
- Slotta, K. H., & Fraenkel-Conrat, H. L. (1938). Schlangengifte, III. Mitteil.: Reinigung und Krystallisation des Klapperschlangen-Giftes. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 71(5), 1076–1081. <https://doi.org/10.1002/cber.19380710527>
- Sousa, L. F., Nicolau, C. A., Peixoto, P. S., Bernardoni, J. L., Oliveira, S. S., Portes-Junior, J. A., Mourão, R. H. v., Lima-dos-Santos, I., Sano-Martins, I. S., Chalkidis, H. M., Valente, R. H., &

- Moura-da-Silva, A. M. (2013). Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of Bothrops Complex. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002442>
- Squaiella-Baptista, C. C., Marcelino, J. R., Ribeiro Da Cunha, L. E., Gutiérrez, J. M., & Tambourgi, D. V. (2014). Anticomplementary activity of horse IgG and F(ab')<sub>2</sub> antivenoms. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(3), 574–584. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0591>
- Stocker, K., Fischer, H., & Meier, J. (1982). Thrombin-like snake venom proteinases. *Toxicon*, 20(1), 265–273. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(82\)90225-2](https://doi.org/10.1016/0041-0101(82)90225-2)
- Suhr, S.-M., & Kim, D.-S. (1996). Identification of the Snake Venom Substance That Induces Apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 224(1), 134–139. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0996>
- Suntravat, M., Cromer, W. E., Marquez, J., Galan, J. A., Zawieja, D. C., Davies, P., Salazar, E., & Sánchez, E. E. (2019). The isolation and characterization of a new snake venom cysteine-rich secretory protein (svCRISP) from the venom of the Southern Pacific rattlesnake and its effect on vascular permeability. *Toxicon*, 165, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.04.006>
- Tadokoro, T., M. Modahl, C., Maenaka, K., & Aoki-Shioi, N. (2020). Cysteine-Rich Secretory Proteins (CRISPs) from Venomous Snakes: An Overview of the Functional Diversity in a Large and Underappreciated Superfamily. *Toxins*, 12(3), 175. <https://doi.org/10.3390/toxins12030175>
- Tasoulis, T., & Isbister, G. K. (2017). A review and database of snake venom proteomes. *Toxins*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/toxins9090290>
- Teixeira, C. de F. P., Fernandes, C. M., Zuliani, J. P., & Zamuner, S. F. (2005). Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(suppl 1), 181–184. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000900031>
- Temprano, G., Aprea, P., & Christian Dokmetjian, J. (2017). La producción pública de antivenenos en la Región de las Américas como factor clave en su accesibilidad. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 41, 1. <https://doi.org/10.26633/rpsp.2017.109>
- Tesser, G. I., Fisch, H.-U., & Schwyzer, R. (1974). Limitations of Affinity Chromatography: Solvolytic Detachment of Ligands from Polymeric Supports. *Helvetica Chimica Acta*, 57(6), 1718–1730. <https://doi.org/10.1002/hlca.19740570624>
- Uetz, P., Freed, P., Aguilar, R., & Hošek, J. (2021). *The Reptile Database*. <http://www.reptile-database.org>
- Vital-Brazil, O., & Excell, B. J. (1971). Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. *The Journal of Physiology*, 212(2), 34P–35P. <http://europepmc.org/abstract/MED/5548012>

- Vivas-Ruiz, D. E., Sandoval, G. A., Gonzalez-Kozlova, E., Zarria-Romero, J., Lazo, F., Rodríguez, E., Magalhães, H. P. B., Chávez-Olortegui, C., Oliveira, L. S., Alvarenga, V. G., Urra, F. A., Toledo, J., Yarlequé, A., Eble, J. A., & Sanchez, E. F. (2020). Fibrinogen-clotting enzyme, pictobin, from *Bothrops pictus* snake venom. Structural and functional characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, *153*, 779–795. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.055>
- Wang, W. J., Shih, C. H., & Huang, T. F. (2004). A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkislysin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *324*(1), 224–230. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.031>
- Ward, R. J., Chioato, L., De Oliveira, A. H. C., Ruller, R., & Sá, J. M. (2002). Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A2: Biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. *Biochemical Journal*, *362*(1), 89–96. <https://doi.org/10.1042/bj3620089>
- Warrell, D. A. (2004). Snakebites in Central and South America: Epidemiology, Clinical features, and Clinical Management. In J. A. Campbell & W. W. Lamar (Eds.), *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Cornell University Press.
- Warrell, D. A. (2010). Snake bite. *The Lancet*, *375*(9708), 77–88. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61754-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61754-2)
- Weinstein, S. A., & Smith, L. A. (1990). Preliminary fractionation of tiger rattlesnake (*Crotalus tigris*) venom. *Toxicon*, *28*(12), 1447–1455. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(90\)90158-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(90)90158-4)
- Williams, D. J., Gutiérrez, J. M., Calvete, J. J., Wüster, W., Ratanabanangkoon, K., Paiva, O., Brown, N. I., Casewell, N. R., Harrison, R. A., Rowley, P. D., O’Shea, M., Jensen, S. D., Winkel, K. D., & Warrell, D. A. (2011). Ending the drought: New strategies for improving the flow of affordable, effective antivenoms in Asia and Africa. *Journal of Proteomics*, *74*(9), 1735–1767. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.027>
- Williams, D. J., Habib, A. G., & Warrell, D. A. (2018). Clinical studies of the effectiveness and safety of antivenoms. *Toxicon*, *150*(March), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.05.001>
- World Health Organization. (2010). *Guidelines for the management of snake-bites*.
- World Health Organization. (2018). WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. *World Health Organization Technical Report Series*, *964*.
- Wüster, W., Ferguson, J. E., Quijada-Mascareñas, J. A., Pook, C. E., Salomão, M. D. G., & Thorpe, R. S. (2005). Tracing an invasion: Landbridges, refugia, and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). *Molecular Ecology*, *14*(4), 1095–1108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02471.x>

- Yamazaki, Y., & Morita, T. (2004). Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Toxicon*, 44(3), 227–231. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.05.023>
- Yarmush, M. L., Weiss, A. M., Antonsen, K. P., Odde, D. J., & Yarmush, D. M. (1992). Immunoaffinity purification: Basic principles and operational considerations. *Biotechnology Advances*, 10(3), 413–446. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(92\)90303-Q](https://doi.org/10.1016/0734-9750(92)90303-Q)
- Zaqueo, K. D., Kayano, A. M., Simões-Silva, R., Moreira-Dill, L. S., Fernandes, C. F. C., Fuly, A. L., Maltarollo, V. G., Honório, K. M., Da Silva, S. L., Acosta, G., Caballol, M. A. O., De Oliveira, E., Albericio, F., Calderon, L. A., Soares, A. M., & Stábeli, R. G. (2014). Isolation and biochemical characterization of a new thrombin-like serine protease from *Bothrops pirajai* snake venom. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/595186>
- Zhang, Y.-J., Wang, J.-H., Lee, W.-H., Wang, Q., Liu, H., Zheng, Y.-T., & Zhang, Y. (2003). Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom l-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309(3), 598–604. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.08.044>
- Zolfagharian, H., & Dounighi, N. (2013). Progress and improvement of the manufacturing process of snake antivenom. *Archives of Razi Institute*, 68(1), 1–10. <https://doi.org/10.7508/ari.2013.01.001>

## 11. ANEXOS

### I. Protocolo para la preparación de las columnas de CNB

Buffers:

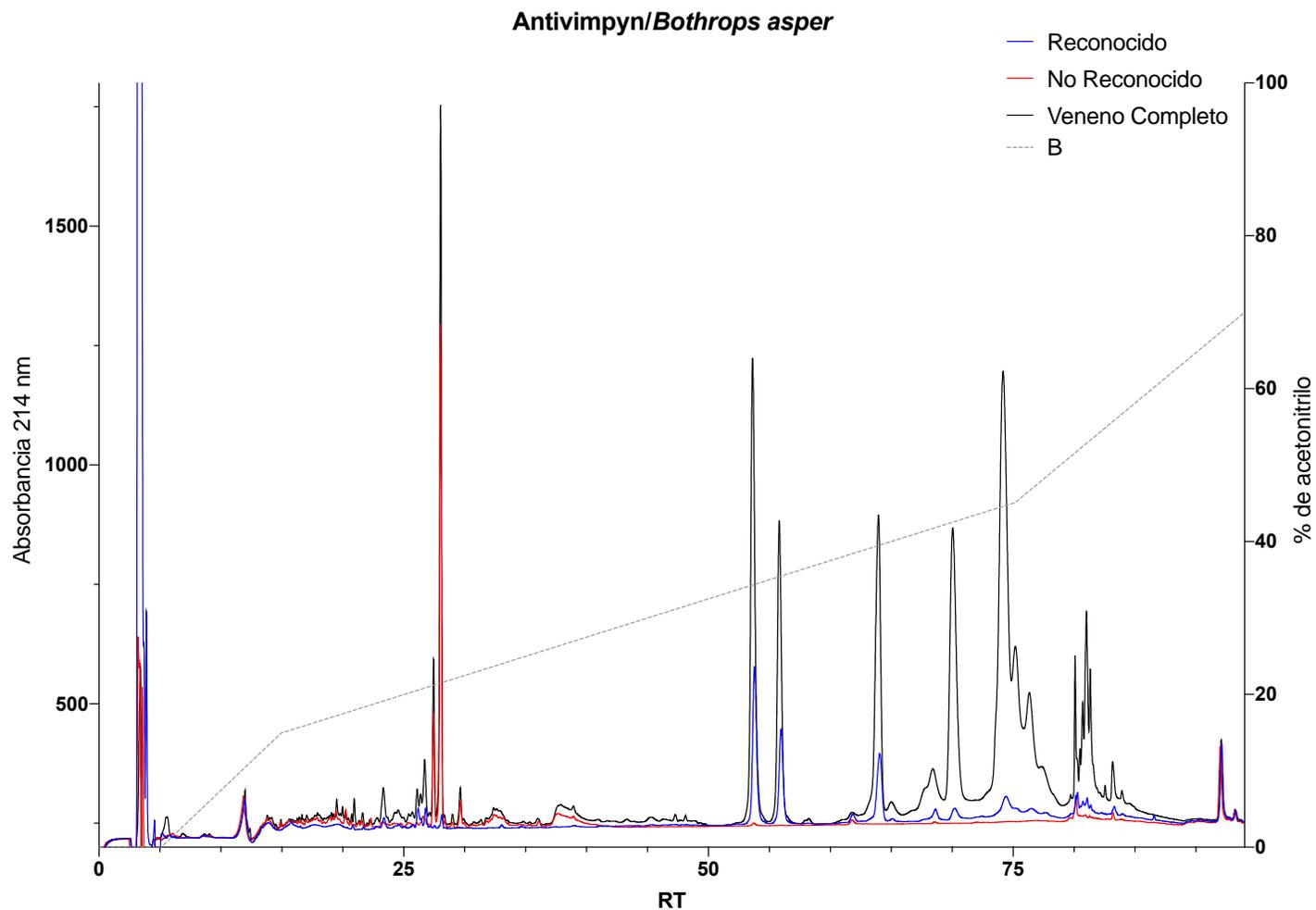
**Buffer de acoplamiento:** NaHCO<sub>3</sub> 0.2 M + NaCl 0.5 M pH 8.3 – 8.5.

**Buffer de Bloqueo:** Tris-HCl 0.1 M pH 8.0

Procedimiento:

1. La matriz se encuentra liofilizada, por lo que es necesario regenerarla usando HCl 1mM realizando lavados con 10 a 15 volúmenes de matriz. Por ejemplo, 500 mg de matriz se regeneran en 5 mL de HCl 1mM, lo que es suficiente para 5 columnas con 300  $\mu$ L de resina cada una. La relación aproximada de la resina en seco/regenerada es 1:3.
2. En una spin column se colocaron 300  $\mu$ L de agua Mili-Q, se marcó el nivel y se llenó hasta ahí de CNBr-Activated Sepharose ya regenerada. Se dieron pequeños pulsos en una microcentrífuga para filtrar el líquido cuidando de no sobrepasar las 2500 rpm.
3. Una vez que la resina alcanzó el nivel marcado, se lavó la columna con tres volúmenes de Buffer de acoplamiento o hasta que el filtrado tenga un pH de 8.5. Esta medición se realizó con tiras de papel reactivas de pH. Se colocó parafilm en la base de la columna para evitar cualquier fuga.
4. De manera paralela, se cuantificó la muestra por A<sub>280</sub> y se ajustó la relación volumétrica muestra:resina a 2:1 usando Buffer de acoplamiento como diluyente.
5. Se añadió la muestra a la columna y se incubó toda la noche a 4 °C en noria.
6. Tras la incubación, se recuperó la fracción no acoplada y se lavó la columna con 5 volúmenes de Buffer de acoplamiento. Tanto la fracción no acoplada como los 5 lavados se colectaron y se cuantificó por A<sub>280</sub>.
7. Para bloquear los grupos activos no acoplados a la muestra, se incubó la columna con Buffer de Bloqueo por 4 horas a temperatura ambiente.
8. Posteriormente, se lavó la columna con 5 volúmenes de PBS 1X pH 7.2.
9. En este punto las columnas se encuentran listas para su uso.

## II. Cromatogramas de los ensayos de antivenómica



**Figura II.1.** Reconocimiento del lote B-6J-31 de Antivimpyn hacia el veneno de *Bothrops asper* evaluado mediante un enfoque de antivenómica. Se muestran 3 cromatogramas sobrepuestos: veneno completo, fracción reconocida y fracción no reconocida en negro, azul y rojo, respectivamente. Además, se muestra el porcentaje de acetonitrilo (B) con una línea punteada.

### Antivimpyn/*Crotalus atrox*

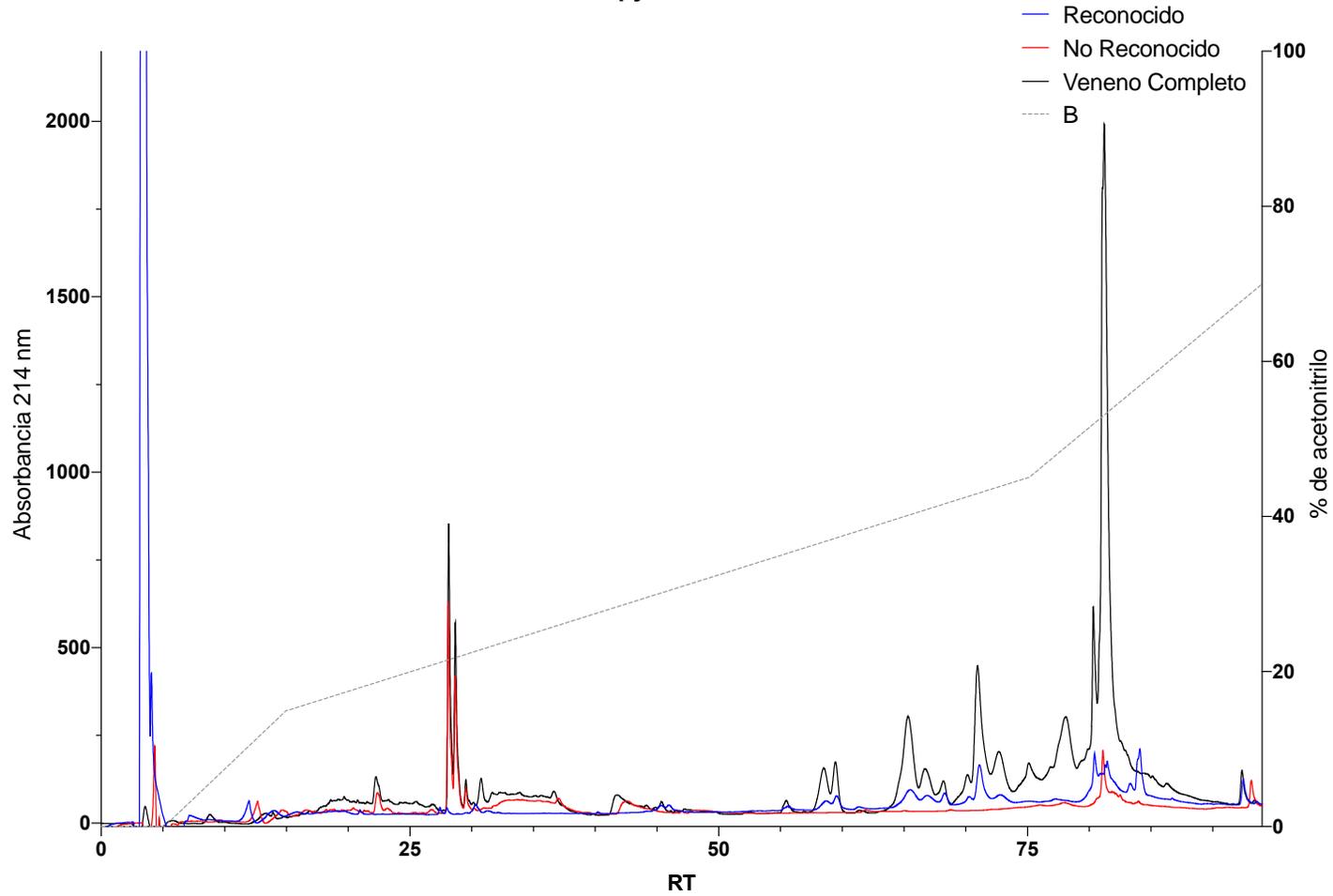
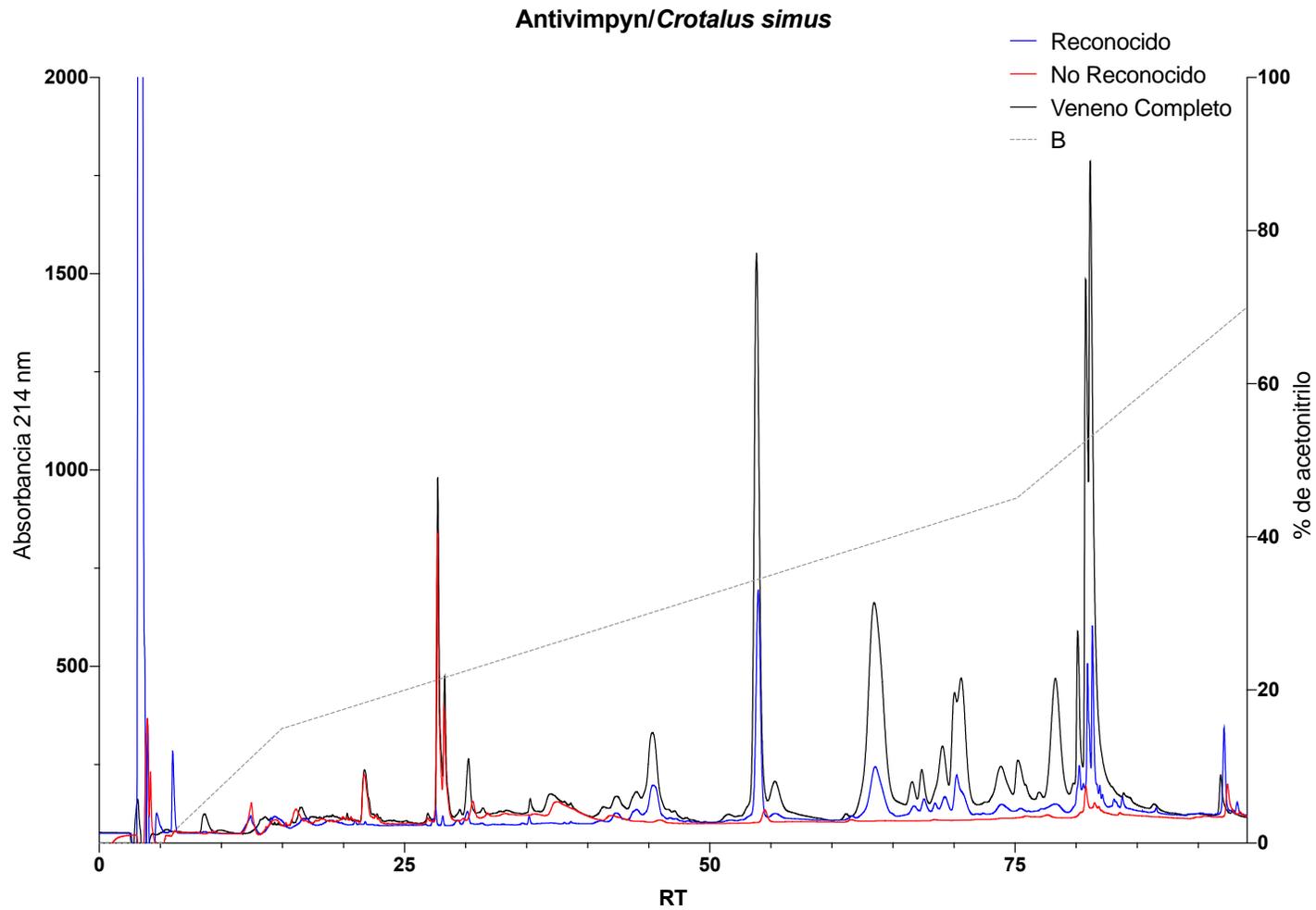
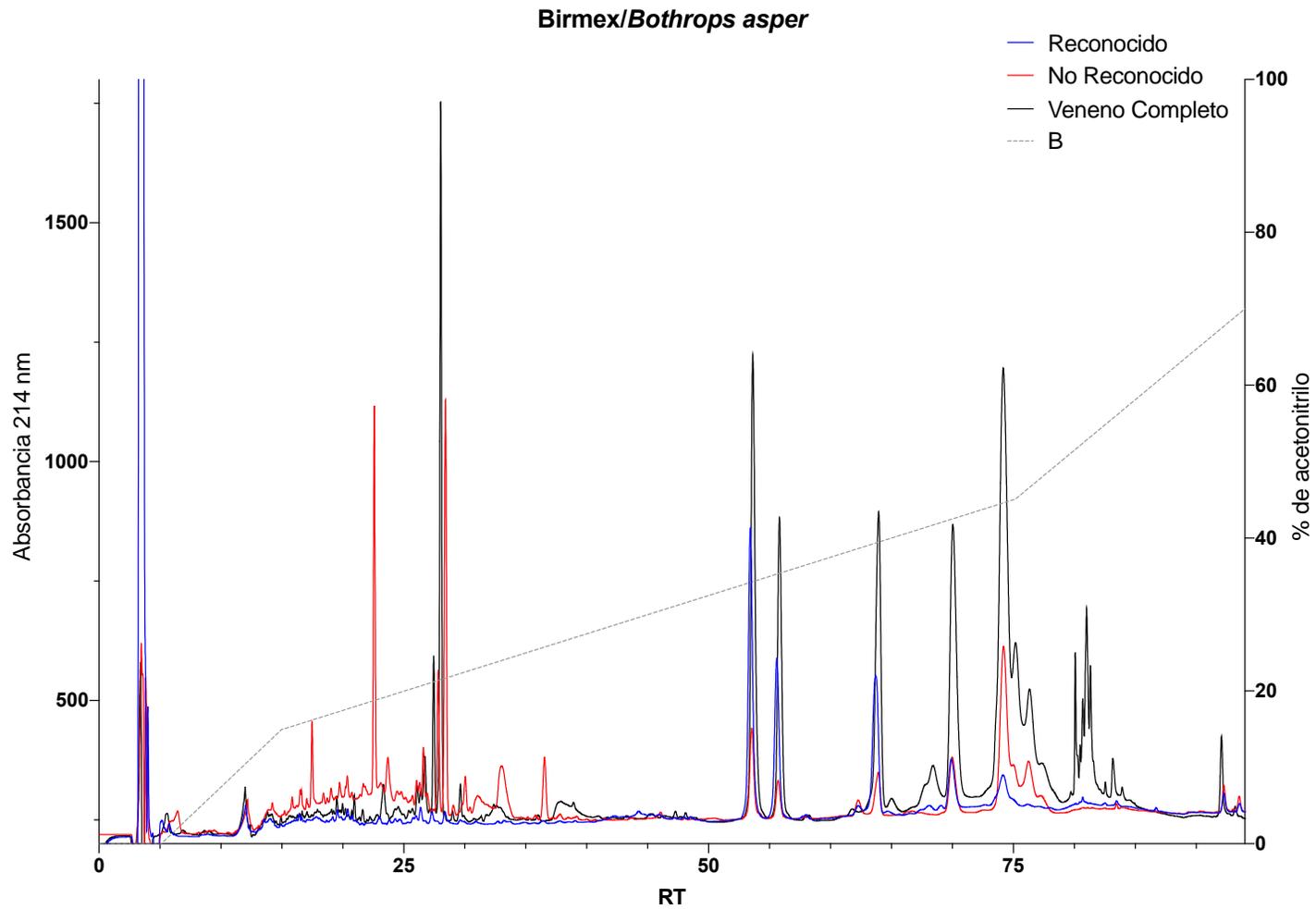


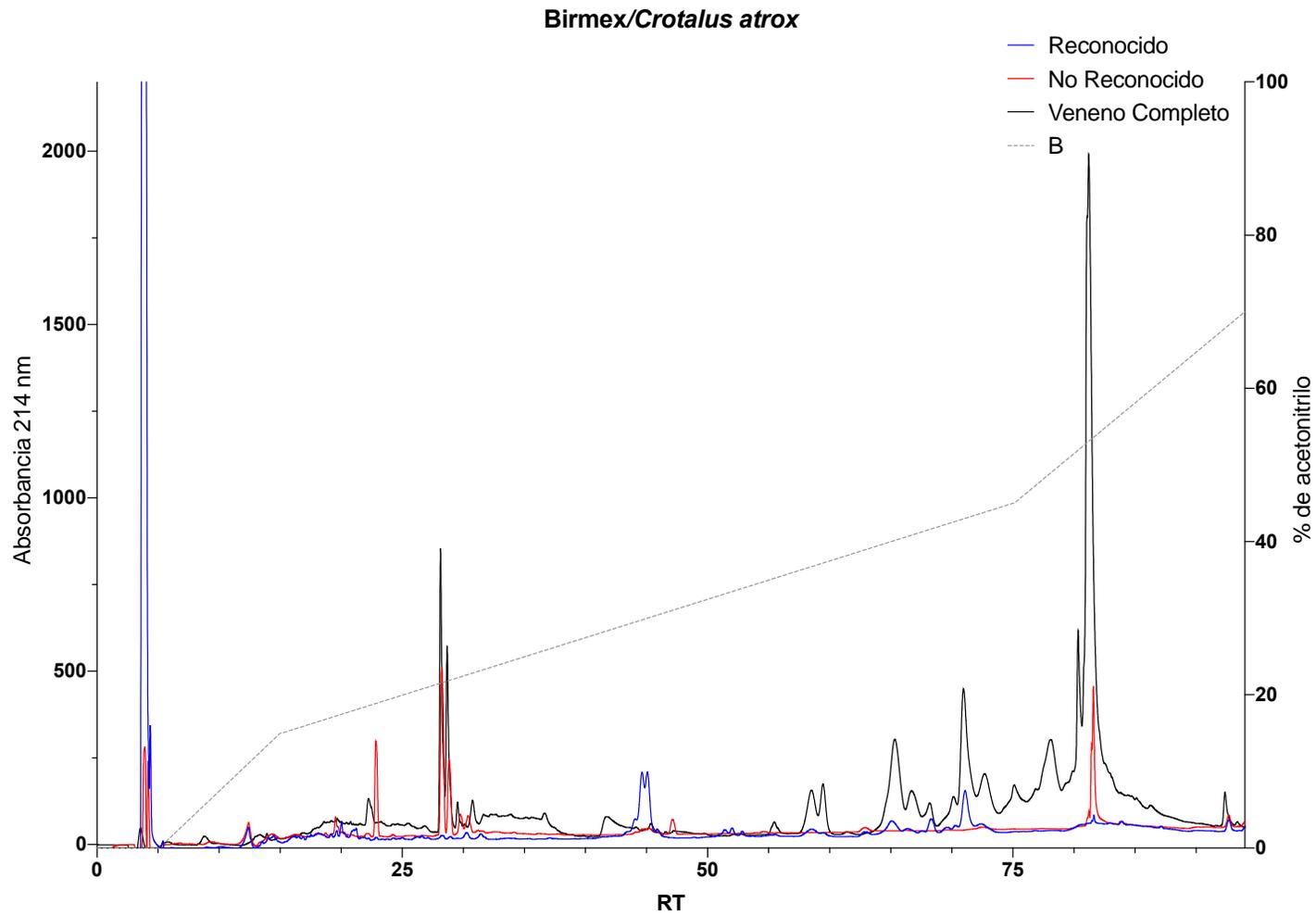
Figura II.2. Reconocimiento del lote B-6J-31 de Antivimpyn hacia el veneno de *Crotalus atrox* evaluado mediante un enfoque de antivenómica. Se muestran 3 cromatogramas sobrepuestos: veneno completo, fracción reconocida y fracción no reconocida en negro, azul y rojo, respectivamente. Además, se muestra el porcentaje de acetonitrilo (B) con una línea punteada.



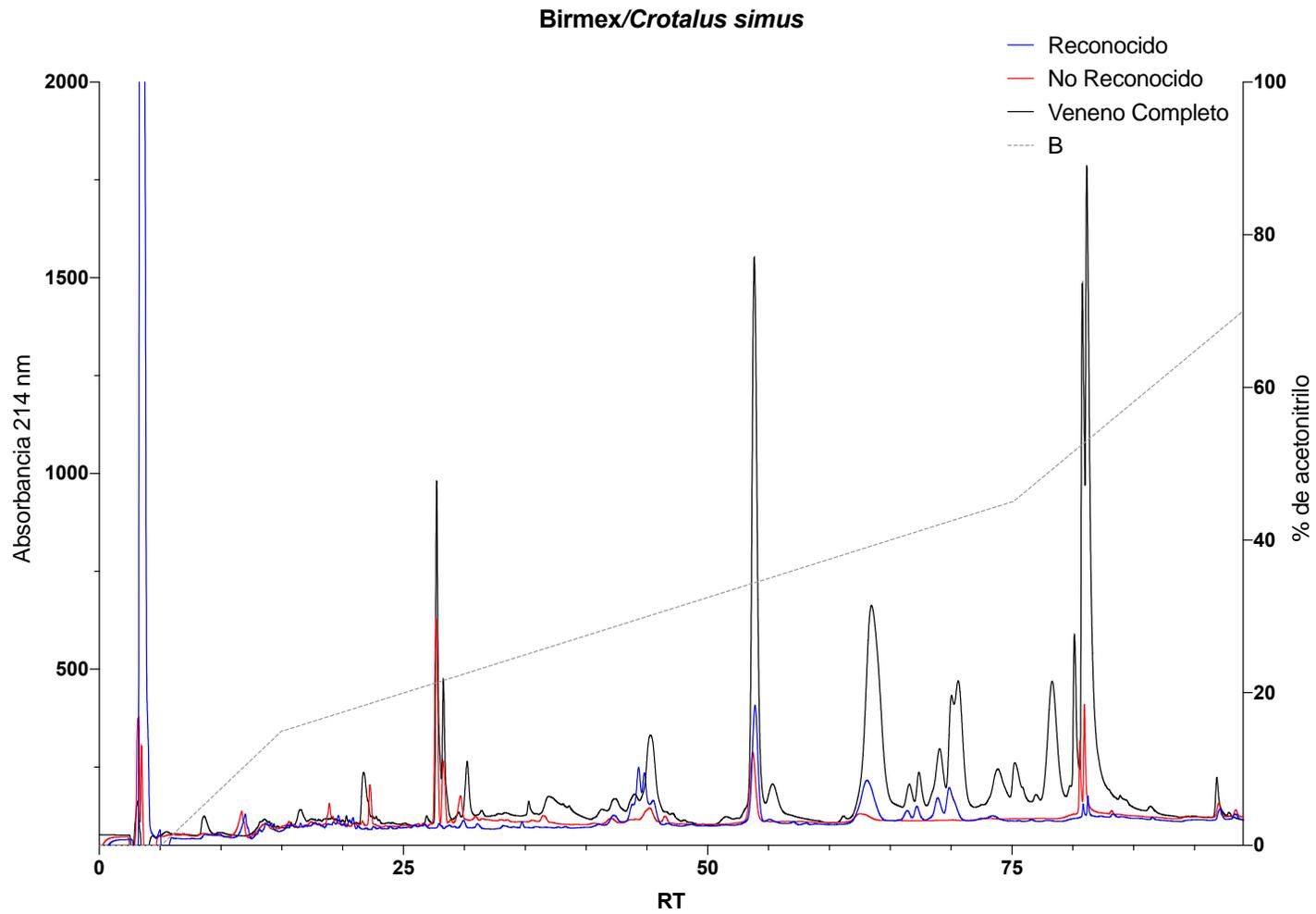
**Figura II.3.** Reconocimiento del lote B-6J-31 de Antivimpyn hacia el veneno de *Crotalus simus* evaluado mediante un enfoque de antivenómica. Se muestran 3 cromatogramas sobrepuestos: veneno completo, fracción reconocida y fracción no reconocida en negro, azul y rojo, respectivamente. Además, se muestra el porcentaje de acetonitrilo (B) con una línea punteada.



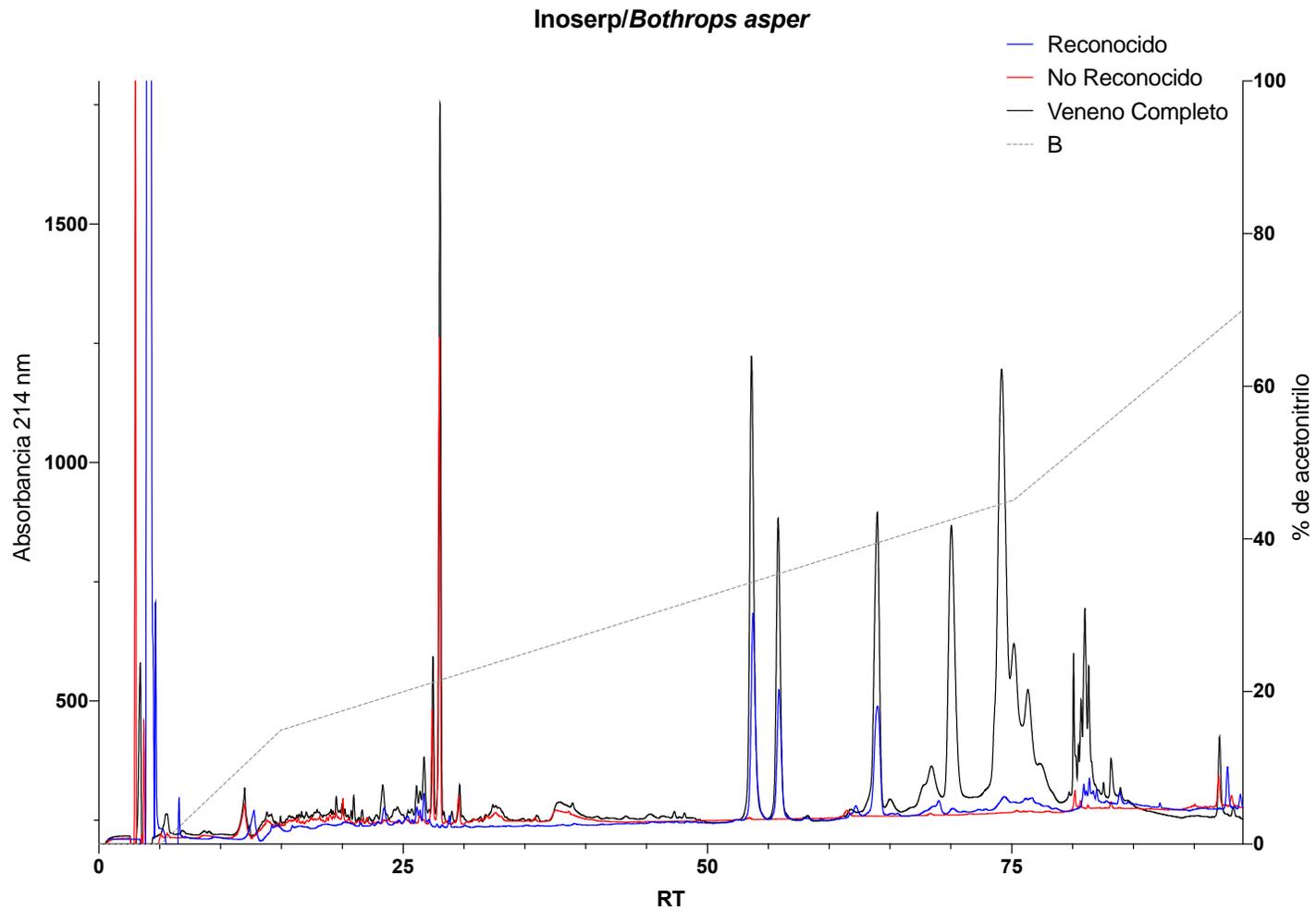
**Figura II.4.** Reconocimiento del lote FV045A de Birmex hacia el veneno de *Bothrops asper* evaluado mediante un enfoque de antivenómica. Se muestran 3 cromatogramas sobrepuestos: veneno completo, fracción reconocida y fracción no reconocida en negro, azul y rojo, respectivamente. Además, se muestra el porcentaje de acetonitrilo (B) con una línea punteada.



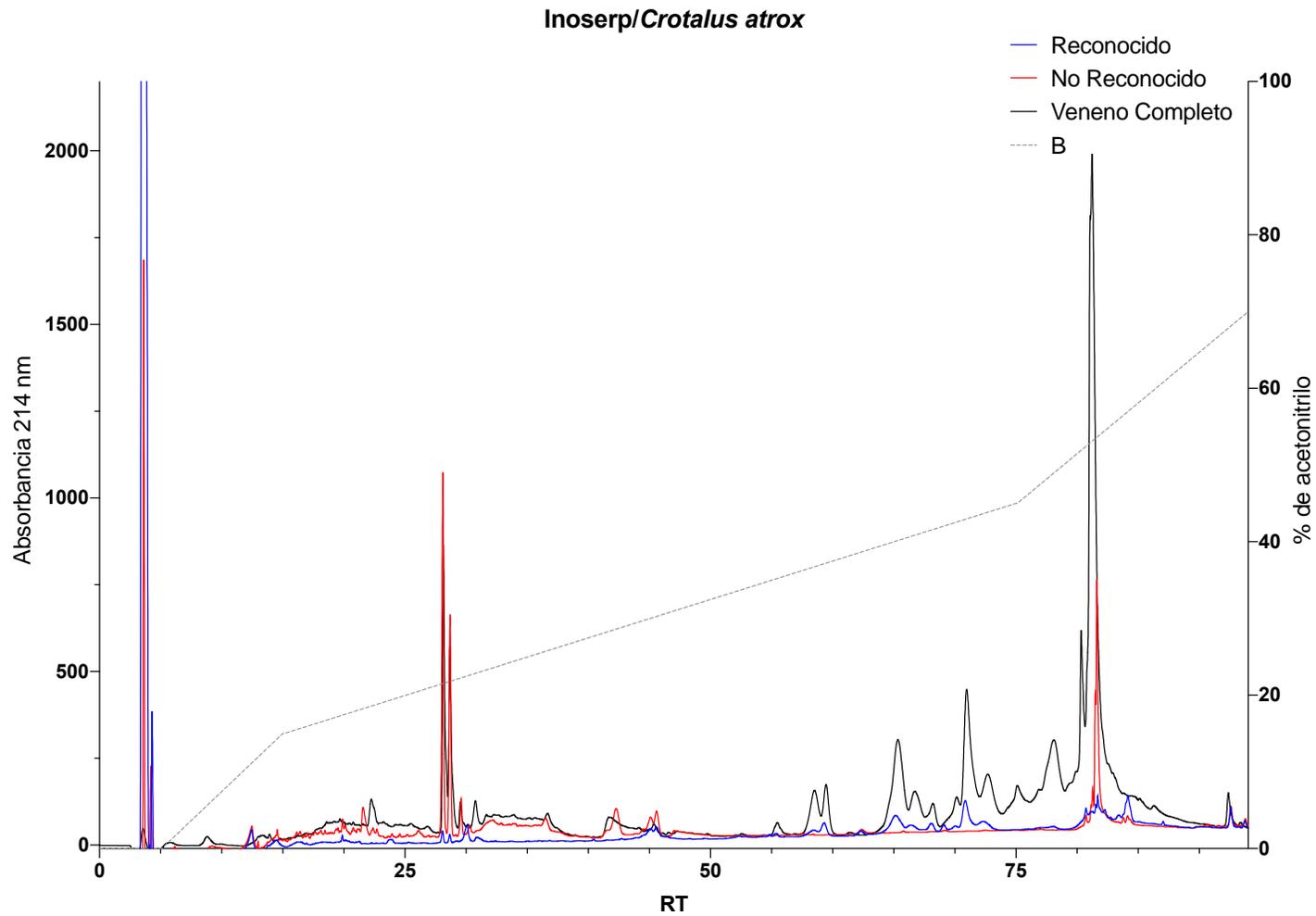
**Figura II.5.** Reconocimiento del lote FV045A de Birmex hacia el veneno de *Crotalus atrox* evaluado mediante un enfoque de antivenómica. Se muestran 3 cromatogramas sobrepuestos: veneno completo, fracción reconocida y fracción no reconocida en negro, azul y rojo, respectivamente. Además, se muestra el porcentaje de acetonitrilo (B) con una línea punteada.



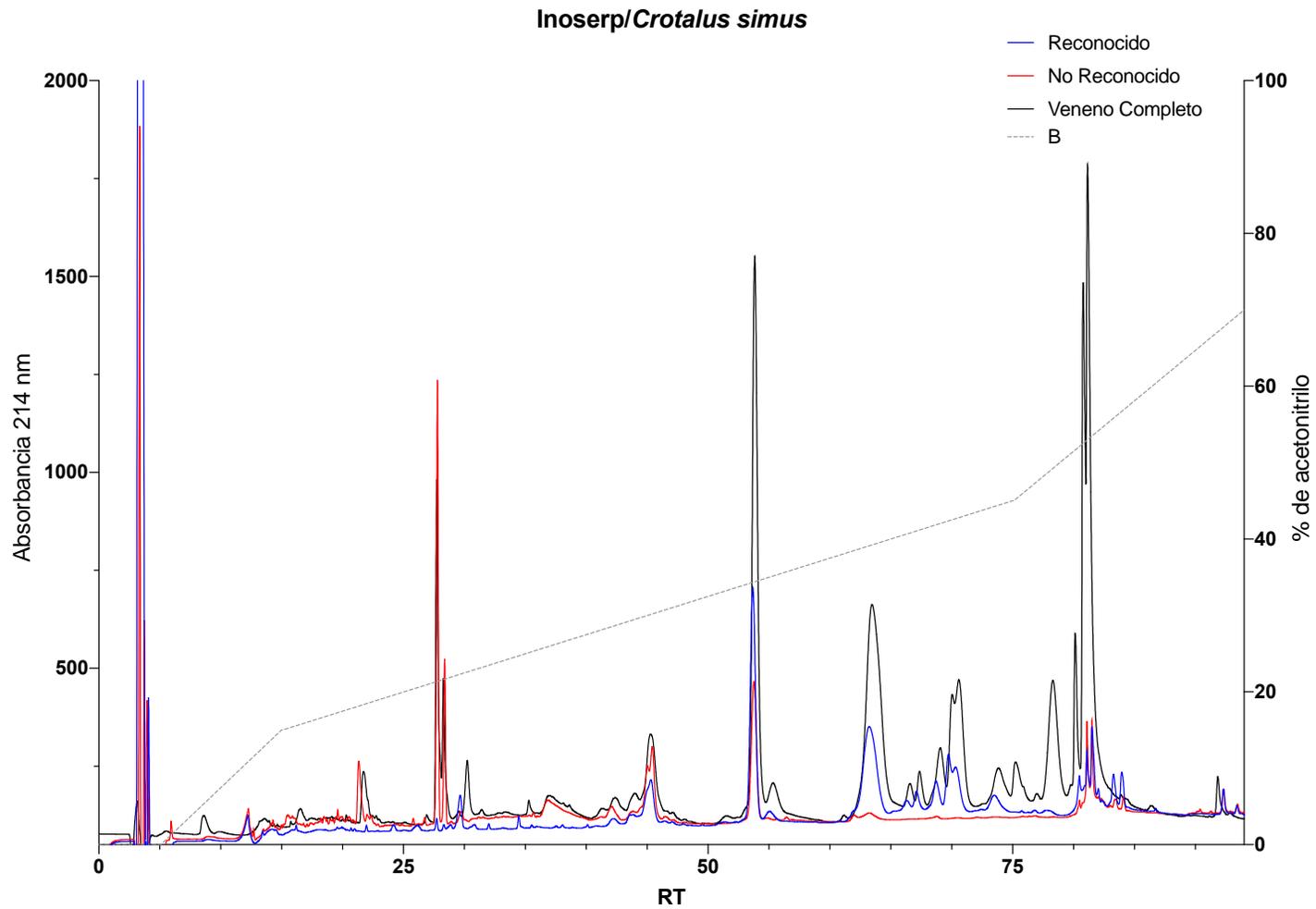
**Figura II.6.** Reconocimiento del lote FV045A de Birmex hacia el veneno de *Crotalus simus* evaluado mediante un enfoque de antivenómica. Se muestran 3 cromatogramas sobrepuestos: veneno completo, fracción reconocida y fracción no reconocida en negro, azul y rojo, respectivamente. Además, se muestra el porcentaje de acetonitrilo (B) con una línea punteada.



**Figura II.7.** Reconocimiento del lote 8805181002 de Inoserp hacia el veneno de *Bothrops asper* evaluado mediante un enfoque de antivenómica. Se muestran 3 cromatogramas sobrepuestos: veneno completo, fracción reconocida y fracción no reconocida en negro, azul y rojo, respectivamente. Además, se muestra el porcentaje de acetonitrilo (B) con una línea punteada.



**Figura II.8.** Reconocimiento del lote 8805181002 de Inoserp hacia el veneno de *Crotalus atrox* evaluado mediante un enfoque de antivenómica. Se muestran 3 cromatogramas sobrepuestos: veneno completo, fracción reconocida y fracción no reconocida en negro, azul y rojo, respectivamente. Además, se muestra el porcentaje de acetonitrilo (B) con una línea punteada.



**Figura II.9.** Reconocimiento del lote 8805181002 de Inoserp hacia el veneno de *Crotalus simus* evaluado mediante un enfoque de antivenómica. Se muestran 3 cromatogramas sobrepuestos: veneno completo, fracción reconocida y fracción no reconocida en negro, azul y rojo, respectivamente. Además, se muestra el porcentaje de acetonitrilo (B) con una línea punteada.