



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Caracterización y variación intraespecífica del veneno de la  
cascabel neotropical *Crotalus culminatus* (Klauber, 1952)

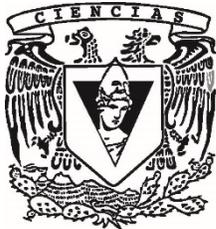
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

VANESSA GÓMEZ ZARZOSA



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.

## **Dedicatoria**

Este trabajo es dedicado a mi mamá María Teresa Zarzosa Quintero y mi papá Asael Edred Caneda de León por su incondicional amor, enseñanzas, cariño y apoyo durante toda mi vida. Gracias por ser mi fortaleza y mi soporte todos los días de mi vida. Los quiero, amo y admiro mucho, gracias por todo.

Gracias a Dios por sus vidas y por permitirme ser su hija.

## **Agradecimientos**

En primera instancia quiero agradecer a mi tutor y amigo el Dr. Edgar Neri por todo el apoyo y confianza que me ha brindado desde que entré al laboratorio. Agradezco sus enseñanzas y que me ha permitido realizar diversos trabajos y ha aportado mucho a mi formación académica. Así mismo, agradezco la amistad, las charlas, las salidas y todos los momentos que hemos compartido, pero sobre todo, agradezco el inmenso apoyo que me ha brindado en todo momento. Te admiro mucho Edgar.

A mi querida y amada familia. Mi mamá, Tere Zarzosa, y mi papá, Asael Caneda, por apoyarme todos los días, por siempre darme ánimos, instruirme, cuidarme y siempre hacerme saber lo orgullosos que están de mí. También, agradezco a mi hermano Fabián Zarzosa por alegrarme con sus bromas, sabes que siempre podrás contar conmigo y aquí estaré para escucharte y amarte incondicionalmente. Sin duda alguna, son y siempre serán la mayor bendición que Dios me ha dado, mi más grande aliento y admiración. Los quiero y amo con todo el corazón, por siempre.

A mis amistades más cercanas y familia por elección Marianita (mi mejor amiga que siempre tengo presente en mi corazón a pesar de la distancia), Andy, Mike, Juan, Mich y Fatty, ustedes saben lo mucho que los quiero y lo especiales que se han vuelto para mí. A todos les doy las gracias por llenarme el corazón y la vida de mucha felicidad, alegría y grandiosos momentos, gracias por consolarme cuando lo necesito, por las risas y lágrimas (muchas de mi parte), por ser mi refugio, mi lugar seguro y sobre todo gracias por su presencia en mi vida. Sin duda alguna son personas muy importantes y que me gustaría conservar para toda la vida. Los quiero con todo el corazón y siempre lo haré. Mich y Fatty, gracias por que en ustedes encontré grandes amigas que siempre está para escucharme y sacarme una sonrisa. Gracias por las pláticas, las risas, las lloraditas, los consejos y siempre darme ánimos. Las quiero mucho. Andy y Mike no tengo como agradecer todo el amor y apapacho que constantemente me brindan y el bonito hogar que hemos formado junto a Asper y Atheris, son los mejores roomies del mundo.

A mi “amiwa” Areli a quien tuve la oportunidad de conocer en el laboratorio y formar una linda amistad que atesoraré toda la vida. Amiwa, siempre te recuerdo con muchísimo cariño

y te extraño mucho. Gracias por estar en todo momento, sabes que acá ando para ti. Te quiero mucho.

A un gran amigo, Pichón, gracias por los consejos, las pláticas, gracias por la confianza, por darme ánimos en momentos complicados y por siempre estar ahí para escucharme.

A Felipe Olvera quien fue de las primeras personas en enseñarme muchas cosas en el laboratorio, por las risas y por los buenos momentos.

A la Dra. Melisa Bernard por las salidas, risas, buenos momentos y todo el apoyo académico.

A Iván por todos los momentos y salidas que sin duda han sido muy divertidas.

Al Dr. Gerardo Corzo por la convivencia tan amena y las enseñanzas académicas.

A mis amigos y compañeros del grupo Alid, Tania, Mitzy, Armando, Gibran y Manuel.

A todos mis compañeros y compañeras del laboratorio del Dr. Alejandro Alagón y Dr. Gerardo Corzo.

Y, por último, a mi persona especial e incondicional, mi confidente y sin duda una de las personas más importantes en mi vida, mi Sam, tú sabes que significás mucho para mí y te has convertido en una parte muy esencial en mi vida que deseo conservar siempre. Llegaste a mi vida y desde ese día me llenas de mucha felicidad. Siempre estaré para ti como sé que tu estarás para mí. I've waited here for you. Everlong.

### **Agradecimientos académicos**

Al Dr. Alejandro Alagón Cano quién me abrió las puertas a su laboratorio y me ha dado la oportunidad de contribuir en varios trabajos.

Al Dr. Edgar Neri por contribuir de gran manera a mi formación, por todas las correcciones, enseñanzas y sobre todo, por darme la oportunidad de seguir trabajando y colaborando en muchos proyectos.

A mi comité: Dr. Miguel Borja, Dra. Leticia Ochoa, Dr. Edgar Neri, Dr. Baltazar Becerril, Dr. José Estuardo por sus comentarios y correcciones para este escrito

Al M. en C. Alejandro Olvera Rodríguez por compartirme toda su experiencia, consejos y por el apoyo en distintos experimentos y ayuda técnica en todo el tiempo que llevó en el laboratorio.

A la Dra. Melisa Bernard por todo el apoyo técnico, experimental y consejos académicos.

Al Biol. Felipe Olvera Rodríguez por la ayuda técnica en varios experimentos.

Al Dr. Iván Arenas por sus consejos técnicos.

A Ricardo Mondragón, Angélica Linares, Carmen Segura, Manuela Ávila por su valioso trabajo en el laboratorio.

A la Dra. Elizabeth Mata, la Dra. Graciela Margarita Cabrera Pérez y al personal del bioterio por la ayuda técnica.

Al Dr. Miguel Borja, la M. en C. Sara Isabel Valenzuela Ceballos e integrantes de su equipo que me ayudaron a realizar el mapa de los sitios de colecta para este proyecto.

Al Dr. Rubén Carbajal por proporcionarme los datos necesarios para realizar el mapa de distribución de la especie.

Al Dr. Fernando Zamudio por la determinación de masas, consejos y apoyo técnico.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haber sido mi casa de estudios.

Al Instituto de Biotecnología, UNAM que me abrió las puertas, me siento muy honrada de haber realizado mi proyecto de licenciatura en tan prestigioso instituto.

### **Financiamiento**

El presente trabajo para obtener el grado de Licenciatura se realizó en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano, que pertenece al departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. Edgar Enrique Neri Castro. Agradezco el apoyo económico otorgado para la realización de esta investigación mediante los proyectos:

- CONACyT-FORDECyT #303045.
- DGAPA-PAPIIT IN- 211621
- CONACYT #264255
- Estímulo como Ayudante de Investigador SIN III: **EXP. AYTE. 20256**

# ÍNDICE

<b>I. Resumen</b> .....	<b>7</b>
<b>II. Introducción</b> .....	<b>9</b>
II.1 Serpientes en México .....	9
II.2 <i>Crotalus culminatus</i> .....	9
II.3 Composición general de los venenos de víboras.....	11
II.4 Envenenamiento .....	19
III.5 Antivenenos mexicanos .....	21
<b>III. Antecedentes</b> .....	<b>23</b>
III.1 Estudios de variación intra e interespecífica del veneno de especies del género <i>Crotalus</i> en México .....	23
III.2 Estudios de variación ontogénica del veneno de especies del género <i>Crotalus</i> en México. ....	24
<b>IV. Justificación</b> .....	<b>29</b>
<b>V. Hipótesis</b> .....	<b>29</b>
<b>VI. Objetivo general</b> .....	<b>29</b>
<b>VII. Objetivos específicos</b> .....	<b>29</b>
<b>VIII. METODOLOGÍA</b> .....	<b>30</b>
<b>VIII.1 Obtención de venenos</b> .....	<b>30</b>
VIII.1.1 Obtención de las muestras y ejemplares .....	30
VIII.1.2 Extracción de veneno.....	30
<b>VIII.2 Caracterización bioquímica</b> .....	<b>31</b>
VIII.2.1 Cuantificación proteica .....	31
VIII.2.2 Geles de poliacrilamida.....	31
VIII.2.3 Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC).....	31
<b>VIII.3 Zimogramas</b> .....	<b>33</b>
VIII.3.1 Actividad proteolítica realizada en zimogramas sobre gelatina.....	33
VIII.3.2 Actividad fosfolipasa en zimogramas sobre yema de huevo .....	34
<b>VIII.4 Actividades biológicas</b> .....	<b>35</b>
VIII.4.1 Actividad proteolítica sobre azocaseína.....	35
VIII.4.2 Inhibición de la actividad proteolítica sobre azocaseína con EDTA .....	35
VIII.4.3 Neutralización de actividad proteolítica sobre azocaseína con Antivipmyn.....	36
VIII.4.4 Ensayo titulométrico en yema de huevo para cuantificar la actividad enzimática de fosfolipasas .....	37
VIII.4.5 Actividad fibrinogenolítica .....	37
VIII.4.6 Inhibición de la actividad fibrinogenolítica con EDTA .....	38
VIII.4.7 Inhibición de las actividades proteolítica y fibrinogenolítica con BATIMASTAT.....	38
VIII.4.8 Actividad letal.....	39
VIII.4.9 Neutralización de la actividad letal.....	39
<b>VIII.5 Esquema de inmunización de conejos</b> .....	<b>40</b>
VIII.5.1 Obtención de anticuerpos Anti- <i>C. culminatus</i> .....	40
VIII.5.2 Medición de títulos mediante ensayo de ELISA .....	41
VIII.5.3 Purificación de inmunoglobulinas (Ig).....	42
VIII.5.4 Cuantificación de Ig anti- <i>C. culminatus</i> .....	43
VIII.5.5 Reconocimiento del veneno completo y crotamina de <i>C. culminatus</i> por el antiveneno e inmunoglobulinas inmunopurificadas por Western-Blot.....	43
<b>IX. RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>

<b>IX.1 Muestras de veneno obtenidas.....</b>	<b>44</b>
<b>IX.2 Perfiles electroforéticos por SDS-PAGE .....</b>	<b>45</b>
<b>IX.3 Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) y análisis de masas de crotamina.....</b>	<b>49</b>
<b>IX.4 Actividad proteolítica en gelatina .....</b>	<b>57</b>
<b>IX.5 Actividad fosfolipasa (PLA<sub>2</sub>) en zimograma usando sustrato yema de huevo.....</b>	<b>59</b>
<b>IX.6 Actividad proteolítica sobre azocaseína .....</b>	<b>61</b>
<b>IX.7 Neutralización de la actividad proteolítica.....</b>	<b>62</b>
<b>IX.8 Actividad fosfolipasa (PLA<sub>2</sub>) por ensayo titulométrico.....</b>	<b>63</b>
<b>IX. 10 Actividad letal .....</b>	<b>66</b>
<b>IX.1112 Nivel de reconocimiento de los sueros de conejo de inmunizados con veneno de C. culminatus.....</b>	<b>69</b>
<b>IX.12 Inmunoglobulinas específicas contra el veneno de C. culminatus .....</b>	<b>71</b>
<b>IX.11 Potencia neutralizante de la actividad letal</b>	
<b>IX.13 Potencia neutralizante de la actividad letal .....</b>	<b>72</b>
<b>IX.14 Reconocimiento del antiveneno hacia veneno completo y crotamina por Western-Blot .....</b>	<b>74</b>
<b>X. DISCUSIÓN .....</b>	<b>75</b>
<b>X.1 Actividades bioquímicas y biológicas .....</b>	<b>77</b>
<i>X.1.1 Actividad proteolítica .....</i>	<i>77</i>
<i>X.1.2 Actividad fibrinogenolítica .....</i>	<i>79</i>
<i>X.1.3 Actividad fosfolipasa .....</i>	<i>79</i>
<i>X.1.4 Letalidad.....</i>	<i>81</i>
<b>X.2 Variación geográfica y ontogénica.....</b>	<b>82</b>
<b>X.3 Reconocimiento y neutralización de las mezclas de veneno y crotamina con antiveneno Antivipmyn .....</b>	<b>83</b>
<b>XI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>85</b>
<b>XII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>86</b>

## I. Resumen

La variación intraespecífica en los venenos de víboras ha sido ampliamente reportada. Los estudios de caracterización enzimática y actividad letal en ratón proveen información valiosa que puede ser utilizada para predecir cuadros clínicos en un envenenamiento. El único tratamiento para un tratar a un paciente mordido por serpiente venenosa son los antivenenos. Por esta razón, el estudio de los venenos permite evaluar la eficacia de los antivenenos y en ciertos casos aporta información que es utilizada para mejorar las mezclas inmunogénicas en la producción de antivenenos. Sin embargo, en México se han realizado pocos estudios sobre los venenos de serpientes mexicanas. En el presente trabajo, se evaluó la variación intraespecífica de 57 muestras de veneno, de individuos 27 muestras de juveniles y 24 muestras de adultos de la especie *C. culminatus*. Adicionalmente, se prepararon dos mezclas de venenos, una de ellas compuesta por venenos de 23 adultos y la otra por 34 de juveniles y se evaluaron las propiedades inmunogénicas de ambas mezclas. Para cumplir este objetivo, los venenos se evaluaron por técnicas de SDS-PAGE en condiciones reductoras, cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC), espectrometría de masas, así como zimografía que permitieron cuantificar las actividades proteolítica y de fosfolipasa. Por otro lado, se evaluaron las actividades fibrinogenolítica, proteolítica y tóxica. Se realizaron ensayos de la neutralización de la toxicidad y se realizó una hiperinmunización de conejos con los venenos para la producción de anticuerpos policlonales. Los resultados mostraron que existe variación en las actividades enzimáticas y tóxicas entre individuos adultos y juveniles. Los venenos de los juveniles fueron más letales y con mayor abundancia de crotamina. Tanto juveniles como adultos mostraron una baja actividad fosfolipasa y una elevada cantidad de metaloproteinasas y serinoproteasas. Estos resultados se vieron reflejados en sus actividades proteolíticas y fibrinogenolíticas.

Finalmente, se evaluó la eficacia de tres lotes de antiveneno Antivipmyn, los cuales fueron capaces de reconocer pero y de neutralizar ambas mezclas de veneno completo. Sin embargo, no inhibieron el efecto crotamina (manifestado como una parálisis rígida). Además, mostraron deficiencia para reconocer y neutralizar crotamina purificada. En contraste, los anticuerpos policlonales provenientes de la hiperinmunización de los conejos con el veneno de *C. culminatus* mostraron un mejor reconocimiento hacia el veneno completo y la crotamina purificada de *C. culminatus* y *C. molossus nigrescens*. Así, los resultados sugieren que el veneno de *C. culminatus* debe ser adicionado a las mezclas inmunogénicas para la producción de antivenenos. En particular, el veneno de ejemplares juveniles es de gran importancia ya que las proporciones de crotamina son altas.

## II. Introducción

### II.1 Serpientes en México

La fauna de reptiles de México es una de las más diversas del mundo y además presenta un alto grado de endemismo. En México se distribuyen 864 especies de reptiles de las cuales 417 pertenecen al orden Squamata y dentro de este orden encontramos 393 especies de serpientes. Las dos familias importantes de serpientes de importancia médica en México son Viperidae y Elapidae (Castro et al., 2013; Flores-Villela and García-Vázquez, 2014).

En el territorio mexicano la familia Viperidae está representada por la subfamilia Crotalinae, la cual ésta conformada por 10 géneros. Dentro de estos últimos, se encuentran *Crotalus* y *Sistrurus*, donde se ubican las víboras conocidas como “serpientes de cascabel”. Su nombre común está dado por su principal y más conocida característica: la presencia de una estructura segmentaria en la punta de la cola, un “cascabel” o crótalo (Quintana-Castillo et al., 2017). Uetz et al. (2021) consideran la existencia de 53 especies dentro de los géneros *Crotalus* y *Sistrurus*, de las cuales 44 se distribuyen en México.

### II.2 *Crotalus culminatus*

*Crotalus culminatus* (Klauber, 1952) cuyo nombre común es cascabel neotropical, es una especie de serpiente de cascabel de talla grande, alcanzando hasta 160 cm de longitud total, donde los machos tienden a ser más grandes que las hembras. Esta especie se caracteriza por presentar un surco prominente en las vértebras que se acentúan hacia la parte posterior del cuerpo (Auerbach, 2005). Su distribución se centra principalmente en hábitats de bosques

caducifolios, en matorrales donde la presencia de rocas es abundante y pastizales que se conjuntan con bosques de pino (Carbajal-Márquez et al., 2020; Heimes, 2016). En cuanto a su dieta, Heimes (2016) menciona que estas cascabeles pueden consumir aves que suelen tener nidos en el piso, algunas lagartijas y mamíferos pequeños. Sin embargo, no existen investigaciones detalladas sobre la dieta de esta especie. Actualmente, *C. culminatus* es considerada como una especie. Sin embargo, ésta ha presentado diversos cambios taxonómicos.

Dentro del complejo de especies *Crotalus durissus* se encuentran algunas de las especies más grandes del género (Campbell and Lamar, 2004). Los miembros de este grupo fueron considerados durante muchos años una sola especie (*C. durissus* (Linnaeus, 1758)), constituida por múltiples subespecies y cuya distribución comprendía desde el norte de México, en los estados de Tamaulipas y Nuevo León, hasta el centro de Argentina. En 1952, Klauber describió dos subespecies para este grupo basándose en la morfología: *C. d. culminatus* y *C. d. tzabcan* (Reyes-Velasco et al., 2022). Posteriormente, el complejo *C. durissus* fue separado en dos especies: *C. durissus*, restringida a Sudamérica y *C. simus* con distribución desde México hasta Costa Rica, comprendiendo tres subespecies: *C. s. tzabcan*, *C. s. culminatus* y *C. s. simus* (Campbell and Lamar, 2004). En 2005, Wüster se basó en la secuenciación de mtDNA y algunas diferencias morfológicas reportadas anteriormente para considerar las subespecies del complejo *C. simus* como especies independientes con distribuciones distintas. De esta forma se reconoció a la especie *C. culminatus*, la cual tenía una distribución a lo largo de todas las llanuras costeras del pacífico, atravesando Michoacán hasta Oaxaca (Wüster et al., 2005).

Recientemente, Carbajal-Márquez y colaboradores (et al., 2020) revisaron la taxonomía del grupo *C. durissus* con muestreo adicional en México. Basándose en datos de mtDNA y algunos rasgos morfológicos propusieron la división de *C. culminatus* en tres especies: *C. culminatus*, *C. ehecatl* del sur de Oaxaca y Chiapas y *C. mictlantecuhtli* del centro de Veracruz. Estas últimas dos especies provienen de las poblaciones anteriormente incluidas en el complejo *C. simus*: *C. s. culminatus* (*C. ehecatl*) y *C. s. simus* (*C. mictlantecuhtli*) (Campbell and Lamar, 2004; Reyes-Velasco et al., 2022). Sin embargo, en un estudio más reciente realizado por Reyes y colaboradores (2022), se analizaron los datos mitocondriales y nucleares ya antes publicados para el grupo *C. durissus*, así como secuencias adicionales de dos genes mitocondriales de miembros del grupo *C. durissus*. Los resultados generados por el método de delimitación de especies, DELINEATE, respalda la validez de *C. mictlantecuhtli*, pero no la de *C. ehecatl*. Así mismo, el análisis de mtDNA sugirió que las diferencias moleculares podrían ser el resultado de aislamiento por distancia y no necesariamente debidos a eventos de especiación por lo que se sugiere que *C. ehecatl* no es una especie distinta de *C. culminatus* distribución en los estados de Guerrero, Morelos, Michoacán, Puebla, Oaxaca y Chiapas (Reyes-Velasco et al., 2022). Nuestro trabajo se enfocará en ejemplares colectados en Michoacán, Morelos, Puebla y Guerrero.

### **II.3 Composición general de los venenos de víboras**

El veneno de serpientes se define como una secreción que puede ser simple o compleja pero siempre producida en una glándula especializada y que es administrado a través de sistemas de envenenamiento como glándulas secretoras o dientes especializados (Mackessy, 2010). México tiene el primer lugar en herpetofauna venenosa en el continente americano y a pesar de esto se conoce poco acerca de la composición y características bioquímicas y biológicas de sus venenos (Castro et

al., 2013). Sin embargo, se sabe que las cantidades y concentraciones de los diferentes componentes de los venenos varían intra e interespecíficamente y que esta variabilidad es muy relevante ya que exhiben una amplia variedad en las actividades biológicas (Arnaud et al., 2019; Sunagar et al., 2016).

Las serpientes de cascabel, pertenecientes a la familia Viperidae, producen veneno en un par de glándulas especializadas situadas en la región posterior de la cabeza, justo detrás de los ojos. El veneno es dirigido a la base de cada colmillo solenoglifo, es decir colmillos huecos y ubicados en la parte anterior de la región bucal, lo que facilita la inyección en la presa logrando que el veneno sea depositado en el tejido (Mackessy, 2021).

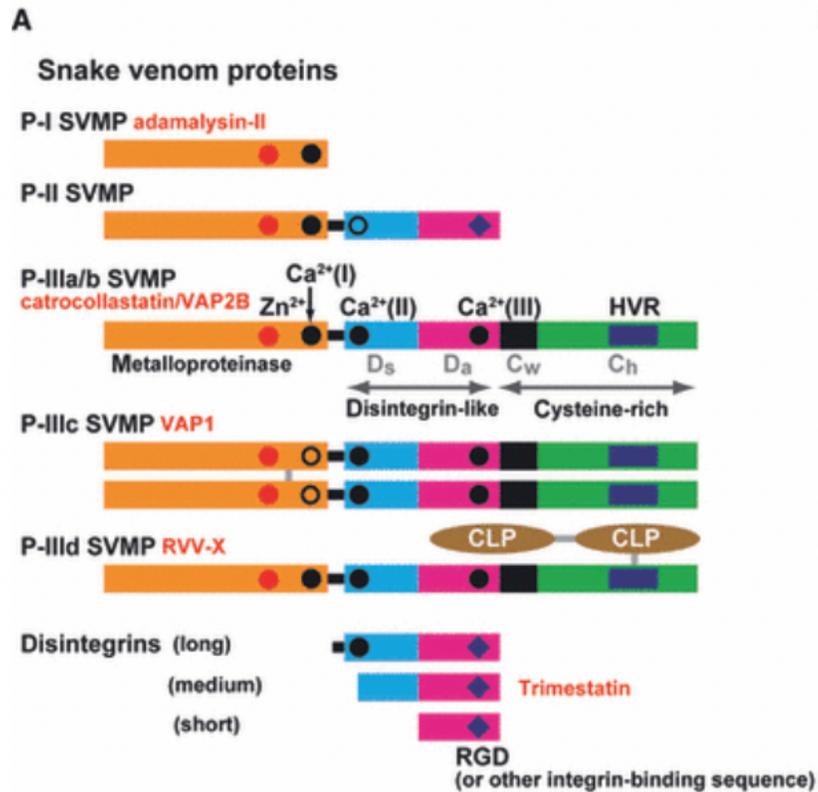
Los venenos de vipéridos se conforman de lípidos, sales, nucleótidos, entre otros, pero sobre todo presentan un mayor porcentaje de moléculas proteicas de donde adquieren los efectos tóxicos que les permiten a las serpientes la parálisis y muerte de sus presas (Boyer et al., 2015). Lo más importante es la predigestión de su presa, a esto se le conoce como digestión externa. (Calvete et al., 2010). Los efectos producidos por los venenos de la familia Viperidae nos indican un alto contenido de proteínas con actividad enzimática (Yarlequé et al., 2012).

A pesar de que existe una gran cantidad de proteínas con actividades distintas, éstas son agrupadas en familias proteicas con base en la similitud de su secuencia de aminoácidos así como del tipo de actividades que muestran (Wu et al., 2003). Hasta el momento se han reportado 63 familias proteicas en los venenos de serpientes; sin embargo, en vipéridos se han descrito principalmente tres familias proteicas que representan cerca del 70% de la composición y son las responsables de ocasionar la fisiopatología principal de los envenenamientos (Neri-Castro y Ponce-López, 2018; Neri-Castro et al., 2020a):

- Metaloproteinasas o SVMP's por sus siglas en inglés (Snake Venom Metalloproteinases), son de los componentes más abundantes en los venenos de serpientes pertenecientes a la familia Viperidae, constituyendo alrededor del 30% de las proteínas presentes en el veneno (Gaz et al., 2016). Éstas desempeñan un papel importante en el envenenamiento contribuyendo de manera directa con la patología local ya que son responsables del efecto hemorrágico y necrótico de los venenos. Estas proteasas son capaces de producir lesiones drásticas en los vasos capilares, células endoteliales y en la membrana basal, degradando componentes de la matriz extracelular, y de la microvasculatura. También afectan la cascada de coagulación y la función de las plaquetas, lo que ha permitido proponer la hipótesis de que estas enzimas tienen un rol clave en la toxicidad de los venenos (Gutiérrez et al., 2010; Gaz et al., 2016). Sin embargo, también inducen una serie de efectos sistémicos ya que poseen actividad proteolítica, fibrinolítica, apoptótica, inhiben la agregación plaquetaria por lo que juegan un papel importante en la predigestión y muerte de las presas (Mackessy, 2010).

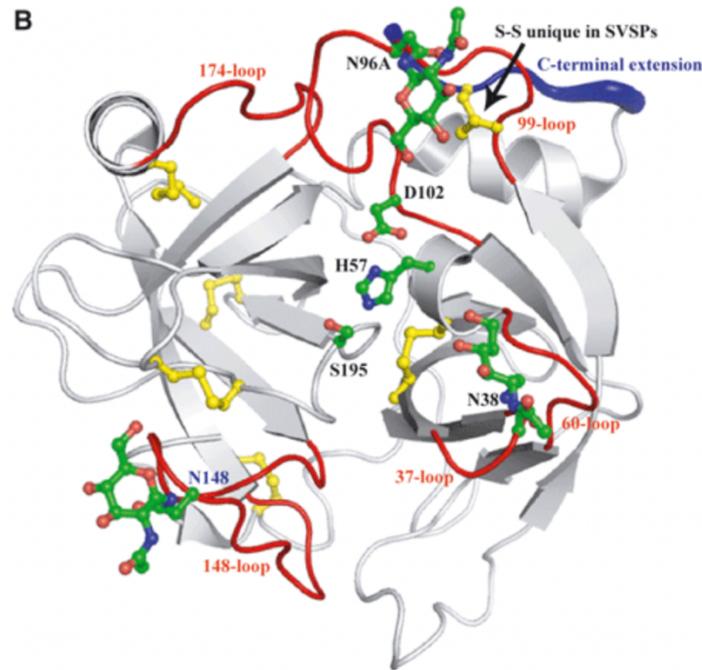
Las diferentes SVMP's varían notablemente en sus masas moleculares, que van desde 22 kDa hasta más de 70 kDa. Todas las SVMP's presentan un dominio metaloproteinasa de unión a zinc y aquellas metaloproteinasas que sólo presentan este dominio se ubican en la clase P-I (Fox y Serrano, 2005). Las SVMP's de la clase P-II presentan, además del dominio de metaloproteinasa, un dominio desintegrina. Las SVMPs de la clase P-III presentan 3 dominios, un dominio metaloproteinasa, un dominio tipo desintegrina y un dominio rico en cisteína (Dawson et al., 2021; Gutiérrez and Rucavado, 2000) (**Figura 1**).

A pesar de que han sido ampliamente estudiadas y se les han atribuido múltiples actividades bioquímicas y biológicas, aún quedan incógnitas sobre los mecanismos involucrados en la lesión tisular e inflamación (Gâz Florea et al., 2016).



**Figura 1. Clasificación y estructura de las SVMP's.** Representación esquemática de la estructura del dominio de SVMP y desintegrinas. Cada dominio o subdominio está representado por un color diferente. CLP, dominio similar a lectina de tipo C; Pro, dominio pro. (tomado de Kang et al., 2011).

- Serinoproteasas o Snake Venom Serineproteinases (SVSP's) son glicoproteínas que pertenecen a la gran familia de las peptidasas (Serrano and Maroun, 2005). Las SVSP's presentes en los venenos de serpientes están conformadas por estructuras de aproximadamente 245 residuos de aminoácidos (Kang et al., 2011) y contienen 12 residuos de cisteína, dos de ellas forman un puente altamente conservado entre SVSP's (Serrano and Maroun, 2005) (**Figura 2**).



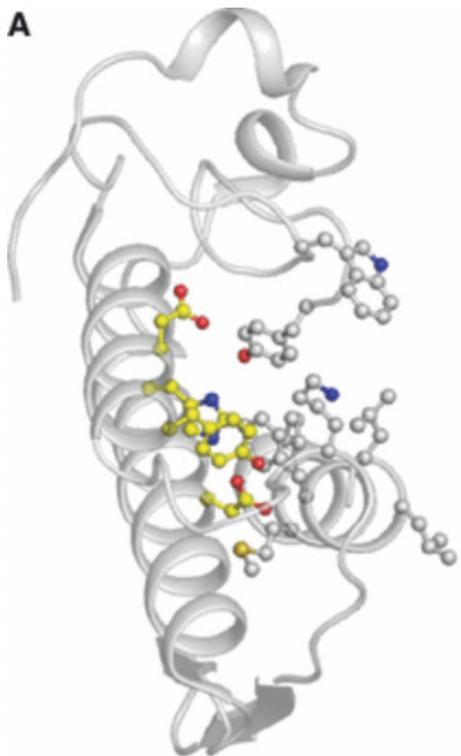
**Figura 2. Estructura general de las SVSP's.** Representación de una SVPS; en color azul se observa la extensión C-terminal que contiene un puente disulfuro. En amarillo se muestran los otros puentes disulfuro; también se incluye el sitio catalítico formado por los residuos His57, Asp102 y Ser195 (tomado de Kang et al., 2011).

Estas glicoproteínas reciben su nombre debido al sitio catalítico común que involucra un residuo de serina (Ser195) que en presencia de los residuos de histidina y ácido aspártico, forman la triada catalítica (Ser195, His57 y Asp102) que es capaz de cortar la región C-terminal de las cadenas polipeptídicas que contienen aminoácidos cargados positivamente (Kang et al., 2011). En geles SDS-PAGE, las serinoproteasas se observan como bandas con pesos moleculares desde los 26 kDa hasta los 67 kDa (Neri-Castro et al., 2020a). Presentan alta especificidad hacia diferentes sustratos como fibrinógeno, plasminógeno, factor V, proteínas tipo C, entre otros (Neri-Castro et al., 2020a; Serrano and Maroun, 2005; Villalobos, 2006).

Estas enzimas son capaces de hidrolizar una variedad de componentes de la cascada de la coagulación y en los sistemas fibrinolítico y calicreína-cinina. Los resultados de esta hidrólisis ocasionan efectos biológicos como procoagulación, anticoagulación, agregación plaquetaria, consumo de fibrinógeno y liberación de cinina (Neri-Castro et al., 2020a; Villalobos, 2006). Las SVSP's con actividad fibrinogenolítica pertenecen a un grupo denominado serinoproteasas de tipo trombina (SVSP's-TL). Las SVSP's-TL son enzimas capaces de hidrolizar regiones específicas de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del fibrinógeno, sin embargo, la mayoría de las serinoproteasas solo cortan una de las dos cadenas liberando fibrinopéptidos A (FPA) o fibrinopéptidos B (FPB). Adicionalmente, algunas SVSP's como la trombina son capaces de cortar ambas cadenas del fibrinógeno similar a como lo hace la trombina (Serrano and Maroun, 2005).

- Las fosfolipasas tipo  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>) son una superfamilia de enzimas lipolíticas presentes en el veneno de serpientes que catalizan la hidrólisis del enlace éster del ácido graso sn-2 de los fosfoglicéridos sn-3 produciendo ácidos grasos y lisofosfolípidos (Dennis et al., 2011; Kang et al., 2011). Son enzimas de masas entre 13 a 15 kDa (Neri-Castro et al., 2020a) y con 115-125 residuos de aminoácidos con numerosos puentes disulfuro. Los residuos de mayor importancia para ejercer la actividad catalítica es la diada histidilio y aspartilo (diada His-48/Asp-93), y una región de unión a calcio conservada (Asp-49) (Quintana-Castillo et al., 2017; Dennis et al., 2011). Sin embargo, en ocasiones pueden existir sustituciones en el ácido aspártico en la posición 49 por otros residuos, en su mayoría lisina lo que ocasiona que pierdan su actividad catalítica. Estas enzimas presentan 14 residuos de cisteína conservados que forman entre seis y siete puentes disulfuro brindándole estabilidad a la estructura terciaria (Dennis et al., 2011). Las PLA<sub>2</sub> de veneno de serpientes se componen de tres hélices  $\alpha$  y dos

láminas  $\beta$  antiparalelas unidas por un puente disulfuro y una asa de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  conservada (Figura 3) (Kang et al., 2011).



**Figura 3. Estructura tridimensional de PLA<sub>2</sub>.** Se muestra los residuos del sitio activo en amarillo. También se observa el canal de difusión del sustrato con residuos hidrofóbicos Leu2, Leu3, Phe5, Ile9, Tyr22, Trp31 y Lys69 (tomado de Kang et al., 2011).

Por su actividad catalítica ejercen efectos biológicos como parálisis flácida, anticoagulación, inflamación, miotoxicidad y citotoxicidad y algunos efectos farmacológicos interesantes como neurotoxicidad, cardiotoxicidad y edema (Neri-Castro et al., 2020a). Dentro de las PLA<sub>2</sub>'s presentes en los venenos de serpientes existen enzimas sin actividad enzimática como las Lys 49 que tienen efectos miotóxicos (Gutiérrez y Lomonte, 2013).

Existen otras familias de proteínas en los venenos de serpientes como L-amino oxidasas (LAAOs), proteínas secretadas ricas en cisteína (CRiSPs), lectinas tipo C (CTLs), desintegrinas (DIS), péptidos

natriuréticos (NP), crotamina también clasificadas como miotoxinas (Myo), inhibidores de metaloproteinasas de venenos de serpiente (MPi), péptidos tipo Kunitz (KUN), factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y cistatinas (CYS). Sin embargo, las funciones y su participación durante el envenenamiento aún no está claramente definida y los venenos de la subfamilia Crotalinae no presentan las tres últimas familias (KUN, VEGF y CYS) (Mackessy, 2010; Neri-Castro et al., 2020a).

Algunos otros componentes del veneno ofídico son componentes inorgánicos como zinc, calcio, potasio, magnesio, fósforo, sodio, hierro, entre otros así como proteínas y péptidos sin actividad enzimática tales como los péptidos vasoactivos, además de nucleasas, hialuronidasas y esterases (Mackessy, 2008; Watkins III, 2010).

Cabe desatacar que la abundancia relativa, presencia/ausencia y la abundancia relativa de estos componentes varía intra e interespecíficamente y ésto se ha correlacionado como resultado de diversos factores como puede ser la región geográfica donde habiten, la temporada, el sexo, la presencia/ausencia del gen que codifique para la toxina o la regulación a nivel transcripcional y/o postranscripcional, polimorfismos genéticos y el estadio de vida (Alape-Girón et al., 2008; Borja et al., 2018b; Glenn and Straight, 1978; Sunagar et al., 2014; Furtado et al., 2006; Menezes et al., 2006; Daltry et al., 1996; Mackessy et al., 2003; Willemse, 1978; Casewell et al., 2014; Durban et al., 2017; García et al., 2004; Neri-Castro et al., 2020a; Dagda et al., 2013; Borja et al., 2018a; Mackessy, 1988; Mackessy et al., 2018; Margres et al., 2015; Reid and Theakston, 1978; Saravia et al., 2002). A pesar de esto, los trabajos sobre la variación del veneno de vipéridos son relativamente escasos y en muchos no se muestra información sobre el sexo, el área de colecta y edad de los ejemplares (Neri-Castro et al., 2020a).

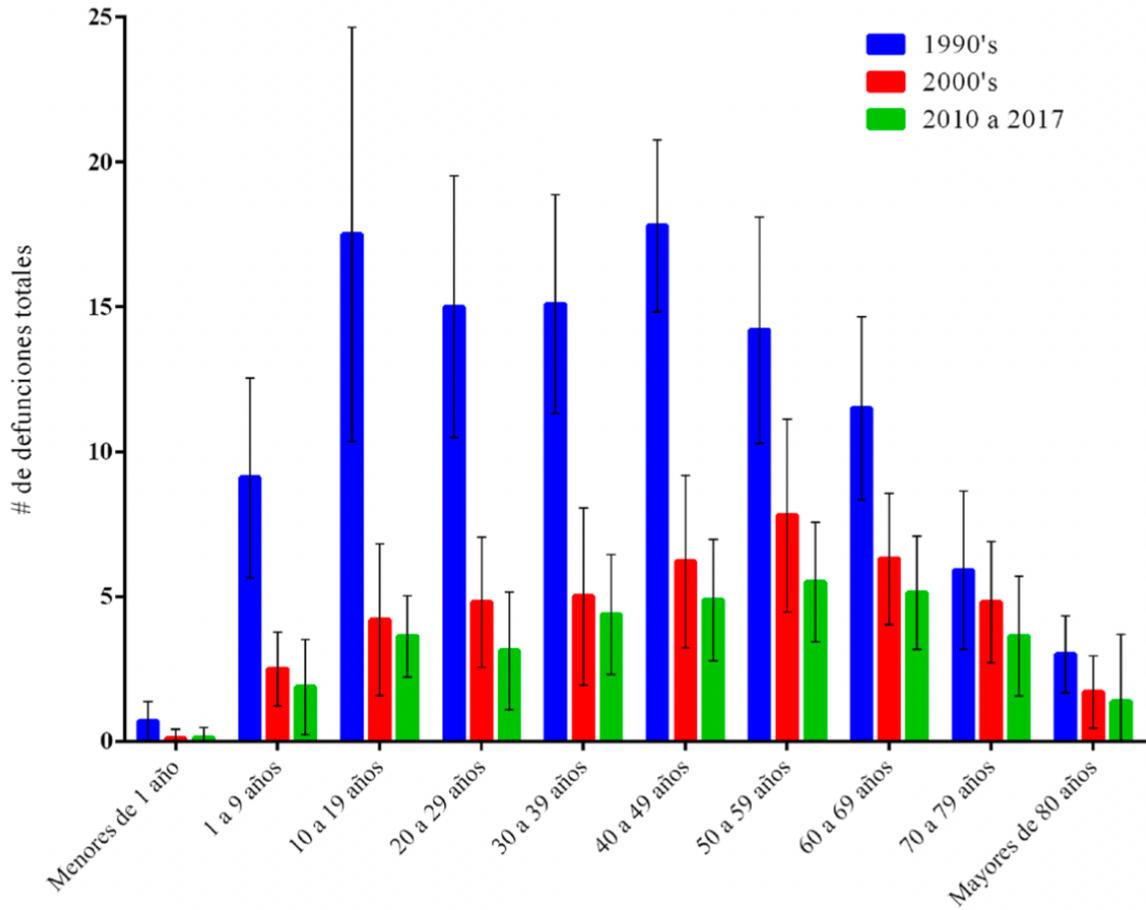
## II.4 Envenenamiento

Se define como envenenamiento al cuadro clínico producido por la inoculación de venenos de distintos géneros y especies de animales (Casewell et al., 2014). Después de la inoculación de sustancias tóxicas, el daño a los tejidos produce alteraciones locales y sistémicas de gravedad variable (Sotelo-Cruz, 2003).

El ofidismo, también conocido como accidente ofídicos se refiere a la mordedura por cualquier serpiente sea o no venenosa. Las especies que tienen la capacidad de inocular veneno ocasionan alteraciones fisiológicas que pueden producir secuelas en el paciente, y en el peor escenario puede llevar a la muerte. La aparición de signos y síntomas después de la mordedura de una serpiente varía ampliamente en el tipo de manifestaciones, las cuales están directamente relacionadas con la cantidad de veneno que es inoculado, de las toxinas que estén presentes en el mismo o del estado de salud del paciente entre otros muchos factores (Casewell et al., 2014; Sotelo-Cruz, 2003). Las mordeduras por vipéridos producen cuadros predominantemente hemotóxicos, ocasionando lesiones locales que pueden conducir a la amputación de miembros y daño tisular en forma de hemorragias, edema, mionecrosis, dolor intenso, y efectos sistémicos como alteraciones en la coagulación, liberación de sustancias activas y fenómenos hipotensivos; todo lo cual puede llevar a la muerte de la víctima (De Roodt et al., 2005; Orduna et al., 2007). En el caso del envenenamiento producido por una víbora de cascabel, el cuadro clínico que se presenta es un síndrome hemorrágico, en ocasiones neurotóxico y coagulante potencialmente letal (Orduna et al., 2007).

En México, así como en muchos países, los datos epidemiológicos referentes a envenenamientos por animales ponzoñosos son deficientes. La incidencia de los accidentes ofídicos empezó a ser registrada a partir del año 2003 por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), perteneciente a la Secretaría de Salud. Entre los años 2003 a 2019 se registró un promedio anual de

3,893 envenenamientos por serpiente en México. Por ejemplo, durante el año 2022 se registró un total de 3,896 casos. Los estados en los que se registraron más de 100 casos durante el año 2022 fueron: Puebla (443), Veracruz (421), Oaxaca (360), San Luis Potosí (334), Hidalgo (302), Ciudad de México (243), Guerrero (221), Chiapas (199), Quintana Roo (110), Chihuahua (105) y Sonora (102), mientras que el estado de Aguascalientes tiene el menor promedio de casos anuales (4 casos) (SINAVE, 2022). Sin embargo, estos datos no son del todo precisos pues en ciertas regiones las personas mordidas acuden a lugares que no recaban información en el SINAVE o bien recurren a prácticas locales para tratar el envenenamiento. Por tal motivo, los datos recabados siguen estando incompletos ya que no se tiene información sobre la localidad donde ocurrió el accidente, las características del paciente, del cuadro epidemiológico o el desarrollo del envenenamiento, la especie que ocasionó el envenenamiento, etcétera (Neri-Castro et al., 2020a). La mortalidad ocasionada por estos envenenamientos es recabada por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) y desde la década de 1990 el número de defunciones promedio por año ha ido disminuyendo, siendo así que en 1990 el promedio fue de 110.8, mientras que para los años 2010 a 2017 el promedio fue de 34 defunciones anuales (**Figura 4**). Ésta drástica disminución se atribuye a la generalización del uso de antivenenos a partir del año 1997, su disponibilidad y las mejoras en la calidad de los tratamientos (Alagón, 2002; Neri-Castro et al., 2020a).



**Figura 4.** Promedio anual defunciones por grupos de edad (tomado de Neri-Castro et al., 2020a).

Las especies que ocasionan un mayor número de mordeduras son: *Bothrops asper*, *Crotalus atrox*, *C. basiliscus*, *C. culminatus*, *C. tzabcan*, *C. miclantecuhтли*, *C. molossus* y sus subespecies, *C. simus* y *Agkistrodon bilineatus* (Neri-Castro et al., 2020a).

### III.5 Antivenenos mexicanos

Hasta la fecha el único tratamiento eficaz para tratar un envenenamiento por un animal ponzoñoso son los antivenenos. La mayoría de los antivenenos mexicanos son de origen equino y su composición se basa en fragmentos  $F(ab')_2$  de inmunoglobulinas que reconocen a las diferentes toxinas del veneno. La interacción  $F(ab')_2$ -toxinas forman un complejo que

neutraliza los efectos del veneno que ayuda a que el cuerpo lo elimine (Gil-Alarcón et al., 2011; Neri-Castro et al., 2020a). A pesar de su eficiencia, los faboterápicos no revierten los daños ocasionados por el envenenamiento, por lo que ante un accidente ofídico es importante administrar el antiveneno a la brevedad (Gil-Alarcón et al., 2011).

En el mercado mexicano existen dos antivenenos comerciales para el tratamiento de la mordedura de un vipérido: Faboterápico Polivalente Antiviperino, fabricado por BIRMEX y que utiliza como inmunógenos el veneno de *B. asper* y *C. basiliscus* y Antivipmyn, fabricado por SILANES y cuyos inmunógenos son el veneno de *B. asper*, *C. simus* (De Roodt et al., 2014, 2005).

Ambos antivenenos, son seguros y en la mayoría de los casos eficientes en la neutralización de las principales toxinas que se encuentran comúnmente en los venenos de serpientes de cascabel, la elevada variación ontogénica, geográfica e individual en los venenos genera la necesidad de considerar ciertos aspectos cuando se produce un antiveneno (Calvete et al., 2014). Principalmente, se debe considerar que los venenos utilizados para inmunizar deben representar toda o gran parte de la distribución de la especie y que las especies cuyos venenos sean utilizados como inmunógenos sean aquellas que causan la mayoría de los accidentes ofídicos en una región determinada (Fry et al., 2003). Por lo tanto, existen ciertas características en las que los antivenenos pueden ser mejorados en su capacidad neutralizante para poder cubrir las variaciones intra e interespecíficas que existan. Aunque los antivenenos existentes pueden neutralizar un gran número de venenos de diferentes especies, se ha reportado que algunos venenos que contienen proteínas de bajo peso molecular (crotamina y crotoxina) las cuales no son bien neutralizadas (Teixeira-Araújo et al., 2017; Borja et al., 2018).

### III. Antecedentes

En México se han realizado diversos estudios sobre la variación inter e intraespecífica y ontogénica del veneno de serpientes de cascabel pertenecientes al género *Crotalus*.

#### ***III.1 Estudios de variación intra e interespecífica del veneno de especies del género Crotalus en México***

El primer estudio formal de variación inter e intraespecífica en México fue realizado por Neri-Castro y colaboradores (2013) donde se reportaron variaciones bioquímicas y en las actividades biológicas en el veneno de adultos de lo que se consideraba el complejo *Crotalus simus* que incluía a *C. s. simus*, *C. s. culminatus* y *C. s. tzabcan* (en ese momento consideradas como subespecies, que actualmente son consideradas especies independientes). Se encontraron diferencias en la expresión de ciertas familias proteicas, siendo así que *C. s. simus* presentó una mayor expresión de crotoxina y serinproteasas así como una nula expresión de crotamina. *Crotalus s. culminatus* mostró una nula expresión de crotoxina, pero abundantes cantidades de crotamina y metaloproteinasas. *Crotalus s. tzabcan* presentó una expresión intermedia de crotoxina y crotamina en comparación de las otras dos subespecies. La presencia de crotoxina se relacionó con la letalidad de los venenos por lo que *C. s. simus* se identificó como el veneno con mayor actividad letal de las tres subespecies (Castro et al., 2013).

En 2013, Martínez y colaboradores realizaron un análisis y descripción de las variaciones entre *C. lepidus klauberi*, *C. l. lepidus* y *C. l. morulus*. Se encontraron diferencias en la abundancia de los componentes de los tres venenos. En el veneno de *C. l. morulus* se encontró una mayor proporción de SVMP's P-III, PLA<sub>2</sub>'s y lectinas. En sus actividades biológicas se determinó que la letalidad y actividad hemorrágica fue menor en comparación de los venenos de *C. l. lepidus* y *C. l. klauberi* que fueron mucho más hemorrágicos, miotóxicos y letales.

Sin embargo, *C. l. morulus* presentó una mayor actividad proteolítica, mientras que la hidrólisis de gelatina fue mayor en *C. l. klauberi*. No se determinaron diferencias significativas en las actividades fibrinogenolítica y de PLA<sub>2</sub> de las tres especies (Martínez-Romero et al., 2013).

Posteriormente, Rivas y colaboradores (2017) realizaron la caracterización general de los venenos de dos especies de cascabel *C. lepidus* y *C. aquilus* y una población integrada de *C. lepidus x aquilus* provenientes de las regiones de Aguascalientes y Zacatecas, encontrando que el veneno de *C. lepidus* es más letal en comparación con los venenos de *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus*. Esta letalidad se correlacionó con la presencia de crotoxina en los venenos, siendo así que en el veneno de *C. lepidus* se detectó esta neurotoxina mientras que en los venenos de *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus* la crotoxina se encontraba ausente (Rivas et al., 2017).

Un estudio más reciente sobre la variación intraespecífica fue realizado por Colis-Torres y colaboradores en 2022. Los autores describen la variación entre veintisiete individuos de la especie *C. basiliscus*, de los cuales diez correspondían a juveniles y diecisiete a adultos. Los resultados mostraron que existe variación en las actividades bioquímicas y biológicas entre los venenos de adultos y juveniles de *C. basiliscus*. Los venenos de los individuos juveniles fueron más letales y se detectó un mayor porcentaje de crotoxina y crotamina, mientras que los venenos de los adultos fueron más proteolíticos y hemorrágicos con un mayor porcentaje de SVMP's. Así mismo, se evaluó la eficiencia del tres lotes del antiveneno Birmex, observando que si fueron capaces de neutralizar la letalidad de los venenos pero no fueron capaces de neutralizar el efecto crotamina (Colis-Torres et al., 2022).

### ***III.2 Estudios de variación ontogénica del veneno de especies del género Crotalus en México.***

La variación ontogénica en los veneno ha sido demostrada para numerosas especies. En 1972 Fiero y colaboradores reportaron diferencias en el color del veneno de ejemplares recién nacidas y ejemplares adultos de *C. viridis viridis* del norte de Dakota siendo así que el veneno de las muestras de recién nacidos era incoloro incluso después de tres meses de su nacimiento (Fiero et al., 1972).

Reid y Theakston realizaron un seguimiento de la actividad hemorrágica del veneno de individuos desde los dos hasta los trece meses de edad de la especie *C. atrox* provenientes de Manchester, observando que la actividad hemorrágica es mayor en los primeros 8 meses de edad y a los 10 meses se observó una disminución de la actividad (Reid y Theakston, 1978).

Mackessy (1988) analizó las proteasas, fosfolipasas A<sub>2</sub>, L-aminoácido oxidasas, exonucleasas y toxicidad hacia una presa en los venenos de *C. viridis helleri* y *C. viridis oregonus*, encontrando que la actividad de las fosfolipasas A<sub>2</sub> disminuye significativamente con el tamaño del ejemplar al igual que la toxicidad del veneno y concluyó que el veneno de las serpientes adultas estudiadas es menos tóxico pero tiene una alta actividad de proteasas (Mackessy, 1988).

En 2003, Mackessy y colaboradores evaluaron las actividades bioquímicas y biológicas del veneno de individuos neonatos, juveniles y adultos de la especie *C. oregonus concolor*. Observaron que las actividades enzimáticas como plasmina, enzimas similares a la trombina (TLE) y fosfodiesterasa aumentaban conforme la talla del individuo. Por otra parte, la actividad enzimática sobre azocaseína disminuía conforme a la talla del individuo. Sin embargo, no se observó ningún tipo de relación entre la talla del cuerpo y las actividades de L-aminoácido oxidasas y fosfolipasa A<sub>2</sub>. tampoco se encontraron diferencias significativas en la letalidad del veneno y el estadio de vida de los ejemplares (Mackessy et al., 2003).

En 2010, Calvete y colaboradores observaron variación ontogénica en los proteomas del veneno de ejemplares de *C. simus* provenientes de Costa Rica, encontrando que las metaloproteinasas son el principal componente proteico en el veneno de los adultos representando un 71% del total del veneno, mientras que en las crías solo es del 2%. Por otra parte, en el veneno de las crías e individuos juveniles se encontró una mayor abundancia relativa de crotoxina y serinoproteasas a comparación de los adultos (Calvete et al., 2010).

En 2018, Mackessy y colaboradores colectaron individuos adultos y neonatos de la especie *C. polystictus* provenientes del Estado de México. Realizaron geles SDS-PAGE en los que observaron diferencias en el número de bandas correspondientes a metaloproteinasas de tipo P-I y P-III y desintegrinas, las cuales se encontraban de manera más abundante en el veneno de los adultos, por lo que estos venenos presentaron una mayor actividad azocaseinolítica que los de neonatos. La toxicidad fue más alta en los neonatos; esto se adjudicó a la alta actividad de la fosfolipasa presente en el veneno de neonatos. No se encontró ninguna diferencia significativa en las actividades enzimáticas de las enzimas similares a la trombina y fosfodiesterasa (Mackessy et al., 2018).

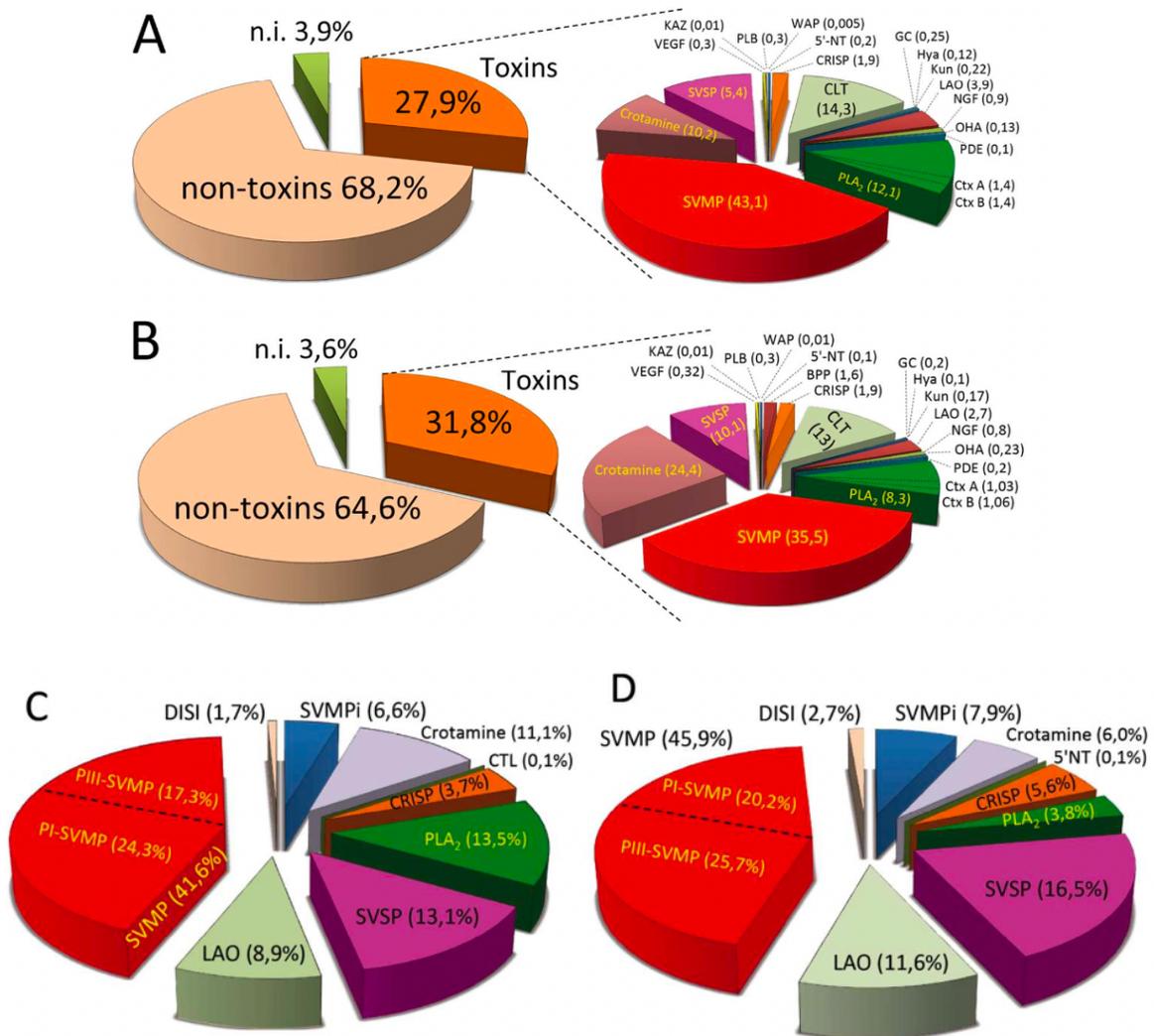
En el veneno de *C. simus*. Neri-Castro y Ponce-López (2018) describen que aunque tanto el veneno de adultos y crías de *C. simus* son bastante letales, el veneno de ejemplares juveniles posee una letalidad mayor, pero con una actividad hemorrágica nula y menor actividad proteolítica a comparación de los adultos (Neri-Castro y Ponce-López, 2018). En el 2018, Borja y colaboradores obtuvieron veintisiete muestras de veneno de ejemplares de *C. molossus nigrescens* de ocho estados de México de los cuales se registró la longitud total, este parámetro se relacionó con el estadio de vida del ejemplar, las actividades biológicas y bioquímicas. Los venenos de las serpientes de menor tamaño (< 70 cm) se consideraron juveniles, los resultados mostraron que contenían mayor abundancia de miotoxinas (enzimas

similares a la crotamina) (30-53%) y serinoproteasas (20-38%) mientras que las serpientes más grandes (> 70 cm) presentaron mayor porcentaje de metaloproteinasas (60%). De manera general, los venenos de juveniles fueron ~2.6 veces más tóxicos y procoagulantes que los venenos de adultos, sin embargo, estos últimos fueron más proteolíticos y ambos mostraron similar actividad hemorrágica. Se evaluó la capacidad neutralizante por parte de dos antivenenos mexicanos comerciales (Antivipmyn y Birmex) y se reportó que los antivenenos fueron capaces de reconocer con mayor eficacia componentes de alto peso molecular pero no fueron capaces de neutralizar el efecto crotamina (parálisis rígida) que era más evidente en los venenos de juveniles (Borja et al., 2018b).

En 2017, Durban y colaboradores determinaron los proteomas de la glándula de veneno de un ejemplar cría y un adulto de *C. simus*, *C. tzabcan* y *C. culminatus*. Reportaron que individuos neonatos de la especie *C. simus* presentan un perfil proteico del veneno con una mayor concentración de crotolina y un bajo porcentaje de SVMP's. Por otra parte, los individuos adultos de la misma especie poseen un perfil más hemorrágico y menos neurotóxico, relacionado a una disminución en la concentración de crotolina, por lo que se identificó como un veneno de tipo II. De igual manera, el veneno de *C. tzabcan* se consideró de tipo II debido al alto contenido de crotamina.

Respecto a *C. culminatus*, los resultados mostraron poca variación ontogénica, a comparación de lo encontrado en los venenos de *C. simus* y *C. tzabcan*. El transcriptoma de la glándula del veneno del recién nacido de *C. culminatus* comprendía una gran cantidad de transcritos para SVMP's (43.1%), PLA<sub>2</sub> (12.1%), crotamina (10.2%) y SVSP's (5.4%). Mientras que los transcritos de la glándula venenosa del individuo adulto para SVMP'S y PLA<sub>2</sub> se redujeron (35.5% y 8.3%, respectivamente) (**Figura 5A y 5B**), Sin embargo, la

abundancia relativa de las familias proteicas observadas en el proteoma es distinta (**Figura 5C y 5D**), concluyendo que *C. culminatus* tiene un veneno de tipo I. Sin embargo, falta realizar un estudio que contemple un mayor número de muestras y de distintas regiones geográficas para determinar si existe variación ontogénica y geográfica en toda la especie o si esta variación está asociada a algún factor ambiental (Neri-Castro *et al.*, 2020).



**Figura 5.** Gráficos circulares A y B muestran la expresión relativa de genes que codifican para toxinas, genes que no codifican para toxinas y genes no identificados (n.i.) detectados en la glándula venenosa de un neonato (A) y un adulto (B) de *C. culminatus*. Gráficos circulares C y D muestran la abundancia relativa (porcentaje

total de proteínas en el veneno) de las familias de toxinas identificadas en un individuo neonato (C) y adulto (D) de *C. culminatus*. (tomada de: Durban et al., 2017)

Los investigadores hallaron miRNAs que permiten el silenciamiento de la traducción de los RNAm para crotoxina (Crtx) y PLA<sub>2</sub> al mismo tiempo que se regula al alza los RNAm dirigidos a SVMP's, lo cual explicaría la variación intraespecífica y ontogénica entre los venenos de *C. culminatus*, *C. tzabcan* y *C. simus* (Durban et al., 2017).

#### IV. **Justificación**

El género *Crotalus* es de importancia clínica por lo que estudios referentes a los componentes proteicos del veneno y sus variaciones intra e interespecíficas servirían como base para el entendimiento de los mecanismos de acción de los venenos de individuos pertenecientes a esta especie y el desarrollo de antivenenos más eficaces.

#### V. **Hipótesis**

Existirán diferencias en las actividades bioquímicas y biológicas de los venenos de individuos crías/juveniles y adultos de *Crotalus culminatus*.

#### VI. **Objetivo general**

Realizar la caracterización bioquímica e inmunogénica del veneno de individuos juveniles y adultos de la cascabel neotropical *Crotalus culminatus* para evaluar si existe variación ontogénica y la neutralización del veneno por medio del antiveneno mexicano.

#### VII. **Objetivos específicos**

- Analizar la composición individual de los venenos, así como sus principales actividades bioquímicas y biológicas.

- Evaluar las propiedades inmunogénicas de los venenos juveniles y adultos mediante la hiperinmunización de conejos.
- Determinar las potencias neutralizantes de los anticuerpos de conejo y del antiveneno mexicano comercial hacia el veneno de crías y adultos de *C. culminatus* y crotamina.
- Determinar las potencias neutralizantes de los anticuerpos de conejo y del antiveneno mexicano comercial hacia crotamina purificada.

## VIII. METODOLOGÍA

### VIII.1 Obtención de venenos

#### *VIII.1.1 Obtención de las muestras y ejemplares*

Todos los venenos utilizados en el presente estudio pertenecen al banco de venenos de laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano y/o de ejemplares del Herpetario Cantil, ambos, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se obtuvo un total de 57 muestras individuales de ejemplares provenientes de 4 estados de la República Mexicana: Guerrero, Michoacán, Puebla y Morelos, de las cuales 34 corresponden a venenos de individuos juveniles y 23 a ejemplares adultos. Por otro lado, se realizó una mezcla de 27 individuos juveniles de Guerrero, Michoacán, Puebla y Morelos y una de 24 adultos de Morelos y Guerrero. Con las mezclas generadas se realizaron los siguientes experimentos.

#### *VIII.1.2 Extracción de veneno*

El veneno de aquellos ejemplares que se encuentran en el Herpetario Cantil se obtuvo mediante extracción manual. La extracción requiere de un procedimiento que consiste en inmovilizar la cabeza

de la serpiente. Primeramente, se sujeta la cabeza con un gancho herpetológico en un lugar firme. A continuación, se toma de la parte posterior de la cabeza con los dedos pulgar y medio, al mismo tiempo colocando el dedo índice en la parte superior de la cabeza, permitiéndole morder un recipiente esterilizado forrado con una capa de parafilm. Posteriormente los venenos se recuperaron en agua bidestilada, centrifugando durante 5 minutos a 12, 000 rpm para recuperar el sobrenadante, el cual fue almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 1 día y finalmente liofilizado.

## VIII.2 Caracterización bioquímica

### *VIII.2.1 Cuantificación proteica*

De las muestras de veneno que se encontraban liofilizadas se pesaron cantidades de entre 5 y 7 mg y se resuspendieron en 1 mL de tampón de fosfato salino (PBS) 1X y a continuación, se procedió a cuantificarlas mediante la técnica de ácido bicinconínico (BCA): las muestras de veneno en dilución 1:50 fueron procesadas por el método BCA utilizando el kit de cuantificación proteica de Pierce. El fundamento de esta técnica se basa en la medición de la colorimetría producida por la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{+}$  de las proteínas en un medio alcalino y la detección de  $\text{Cu}^{+}$  por el ácido bicinconínico. El complejo de  $\text{Cu}^{+}$  y BCA muestra un producto colorido que absorbe a 562 nm y cuya intensidad proporcional a la concentración de proteína.

### *VIII.2.2 Geles de poliacrilamida.*

Para realizar el perfil del contenido proteico y determinar el peso molecular de las proteínas de los venenos utilizados, se prepararon geles discontinuos de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Esta técnica nos permite observar la migración vertical de un conjunto de proteínas de acuerdo con su peso molecular. Para esto se prepararon geles al 15% y se corrieron en condiciones reductoras con  $\beta$ -mercaptoetanol lo que permite romper los puentes disulfuro. Se

cargaron en el gel 20 µg de cada veneno por carril, en una cámara de electroforesis marca BIO-RAD, a un voltaje inicial a 80 V y posteriormente a 120 V. Una vez finalizada la separación de las proteínas, los geles se tiñeron durante una noche con azul de Coomassie R-250 y se destiñeron con solución de destinción.

Obtenidos los perfiles electroforéticos de las muestras individuales, así como de la mezcla de venenos de juveniles y de la mezcla de venenos de adultos se procedió a seleccionar muestras individuales como representativas de cada estado de la república para la realización de los siguientes experimentos. Para ello, se seleccionaron los venenos que menos se parecieran o con diferencias importantes.

### *VIII.2.3 Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)*

La cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), es una técnica que permite la separación y purificación de proteínas y péptidos. La separación de los componentes de una mezcla se basa en diferentes tipos de interacciones hidrofóbicas. La técnica consiste en una fase estacionaria (apolar) y una fase móvil (polar). El tiempo de retención de la muestra aumenta con la adición de disolvente polar a la fase móvil y disminuye con la introducción de disolventes más hidrofóbicos (Mackessy, 2010).

Las muestras de veneno individuales previamente seleccionadas, la mezcla de venenos de juveniles y la mezcla de venenos de adultos fueron separados por RP-HPLC utilizando un equipo marca Agilent (modelo) y una columna analítica C-18 (250 x 4.6 mm) de la marca Agilent. Se cargó 1mg de veneno en 400 µL de agua con 0.1 % de ácido trifluoroacético (TFA) y se aplicó la muestra a un flujo de 1 mL/min (solución A), agua + 0.1% TFA. El gradiente de B (acetonitrilo) fue aplicado

durante los primeros 5 minutos de 5%, 5-15% de B en 10 minutos, 15-45% de B en 60 minutos y 45-70% de B en 12 minutos.

Las fracciones fueron monitoreadas por absorbancia a 214 nm y colectadas en tubos eppendorf de 1.5 mL para su posterior análisis mediante espectrofotometría de masas mediante MALDI-TOF y geles SDS-PAGE al 15% en condiciones reductoras.

Finalmente, para obtener los perfiles cromatográficos se utilizaron los datos de absorbancia a 214 nm los cuales fueron graficados en el programa GraphPad Prism 8 Versión 8.0.2 (263).

### **VIII.3 Zimogramas**

La zimografía es una técnica utilizada para el estudio de la actividad enzimática intrínseca de una proteína. La separación de las proteínas se realiza por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida que es copolimerizado con un sustrato. Todos los tipos de zimografía de sustrato se originan a partir de la zimografía de gelatina. Las técnicas son las mismas, excepto que el sustrato difiere según el tipo de enzima a detectar. Las proteínas son separadas por SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras y en ausencia de calor. El SDS ocasiona que las enzimas se desnaturalicen y se vuelvan inactivas. Después de la electroforesis, el gel es lavado lo que provoca el intercambio del SDS con Triton X-100, tras lo cual las enzimas se renaturalizan y recuperan su actividad. Posteriormente, el gel es incubado en un buffer de activación apropiado y finalmente, teñido con azul de Coomassie para detectar las bandas claras sobre el fondo azul de sustrato sin degradar (Snoek-van Beurden y Von de Hoff, 2005).

#### ***VIII.3.1 Actividad proteolítica realizada en zimogramas sobre gelatina***

Para realizar la zimografía sobre gelatina se preparó un gel de poliacrilamida al 12.5% copolimerizado con 1 mg/mL de gelatina marca Bio-Rad en el que se cargaron 15 µg por carril de

los venenos individuales anteriormente seleccionados, de la mezcla de venenos de juveniles y de la mezcla de venenos de adultos de *C. culminatus*. Las muestras de veneno se corrieron en ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol y sin hervir, en una cámara de electroforesis marca BIO-RAD, a un voltaje constante a 120 V.

Una vez finalizada la electroforesis, el gel fue lavado en buffer Tris HCl 0.1 M, pH 8 + Tritón X-100 al 5% durante dos horas con la finalidad de eliminar el SDS. Posteriormente, el gel fue sometido a un segundo lavado con buffer Tris HCl 0.1 M, pH 8 + Tritón X-100 al 0.05% durante una hora. Al finalizar este tratamiento, el gel fue sometido a un tercer lavado en buffer Tris HCl 0.1 M, pH 8 durante 10 minutos. Después de este tratamiento, el gel fue lavado por cuarta vez en buffer Tris HCl 0.1 M, pH 8 durante la noche. Al día siguiente los geles se tiñeron durante una noche con azul de Coomassie R-250 y se destiñeron con solución de destinción durante 10 minutos y así lograr solo una destinción parcial.

Los venenos de serpientes de la familia viperidae presentan, en general, una alta concentración de metaloproteinasas, todas dependientes de zinc. Existen algunos agentes que permiten la quelación del zinc, como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), lo que inhibe su actividad proteasa. Para determinar si la proteólisis efectuada sobre la gelatina es llevada a cabo por metaloproteinasas, los venenos se incubaron con EDTA durante 30 minutos a 37°C, posteriormente se realizaron los pasos ya descritos para la zimografía sobre gelatina.

### ***VIII.3.2 Actividad fosfolipasa en zimogramas sobre yema de huevo***

Las fosfolipasas son enzimas que degradan fosfolípidos. Se reconocen cinco clases de acuerdo con la posición en donde cortan. La clase que predomina en los venenos de serpientes son las fosfolipasas A<sub>2</sub>, (PLA<sub>2</sub>) las cuales liberan al ácido graso esterificado en la posición 2 del glicerol en los

fosfolípidos. Para la determinación de la actividad de las PLA<sub>2</sub> se realizaron dos procedimientos; un método cuantitativo y uno cualitativo. Para ambos casos se preparó una solución con yema de huevo al 10% (NaCl 0.1M, CaCl<sub>2</sub> 0.01M y Tritón X-100 0.5%, yema de huevo 10%), la cual se homogenizó en agitación durante 10 minutos y posteriormente se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos e inmediatamente después se recuperó el sobrenadante.

Para evaluar la actividad de PLA<sub>2</sub> se utilizó una placa de agarosa al 1.0% con yema de huevo al 2.0% y rodamina 6G. Primeramente, se preparó un gel de poliacrilamida al 15%, en el que se cargaron 15 µg por carril de las muestras, las cuales se corrieron en condiciones no reductoras, es decir, en ausencia de β-mercaptoetanol y sin hervir, en una cámara de electroforesis marca BIO-RAD, a un voltaje inicial de 90 V y posteriormente a 130 V a 4° C.

Concluida la electroforesis, el gel se lavó como se describió anteriormente, utilizando distintos buffers de lavado; el primero contenía buffer Tris HCl 500 mM, pH 8.0 + Tritón X-100 al 2.0%. La segunda solución contenía buffer Tris HCl 50 mM, pH 8.0 + Tritón X-100 al 1.0 %. El tercer lavado se realizó en buffer Tris HCl 50 mM, pH 8.0. Finalmente, el gel fue incubado durante 14 horas a temperatura ambiente sobre un gel de agarosa al 1.0 %, rodamina G6 y yema de huevo al 2.0 %.

#### **VIII.4 Actividades biológicas y bioquímicas**

##### ***VIII.4.1 Actividad proteolítica sobre azocaseína***

Con la finalidad de determinar la actividad proteolítica y endopeptidasa de las metaloproteinasas de los venenos de ejemplares juveniles y adultos de *C. culminatus* se procedió a realizar un ensayo sobre azocaseína. La acción de las enzimas produce azopéptidos que permanecen solubles en el sobrenadante luego de precipitar la azocaseína no hidrolizada. Los azopéptidos liberados por acción de las enzimas pueden cuantificarse al ponerse en contacto con NaOH 0.5 M.

Para ésto, se preparó una solución de azocaseína de 10 mg/mL en buffer de azocaseína. A continuación, se incubaron 20 µL de los venenos (1 mg/mL) con 100 µL de la mezcla de azocaseína durante 30 min a 37 ° C. Durante este tiempo las proteasas degradan la azocaseína liberando grupos azo, los cuales generan una coloración que posteriormente es cuantificada a 450 nm. Una vez finalizada la incubación se procedió a añadir 200 µL de ácido tricloroacético al 5% a cada tubo e inmediatamente se centrifugó por 5 min a 13,000 rpm. Posteriormente se colocaron 150 µL del sobrenadante y 150 µL de NaOH 0.5 M en placas de 96 pozos. Finalmente, para cuantificar la absorbancia a 450 nm de los grupos azo liberados por la proteólisis, se utilizó un lector de microplacas Bio Tek Elx800 y el software Gen5 Versión 2.0. Los resultados de tres repeticiones, se expresaron como U/mg ± SD en donde una unidad (U) se define como el cambio de 0.2 unidades de absorbancia a 492 nm por minuto.

#### ***VIII.4.2 Inhibición de la actividad proteolítica sobre azocaseína con EDTA***

Para determinar si la actividad proteolítica de los venenos está dada por metaloproteinasas se llevó a cabo la inhibición de las metaloproteasas con EDTA. Para esto, se incubaron 20 µL de cada veneno (1 mg/mL) y de las mezclas de venenos con 10 µL de EDTA 5 mM durante 30 min a 37° C, posteriormente se realizaron los pasos ya descritos anteriormente.

#### ***VIII.4.3 Neutralización de actividad proteolítica sobre azocaseína con Antivipmyn***

Con la finalidad de evaluar la eficacia del antiveneno comercial para neutralizar la actividad proteolítica de los venenos se incubaron durante 30 min a 37° C 20 µL de las mezclas de venenos de juveniles y adultos de *C. culminatus* con diferentes volúmenes de tres lotes diferentes de antiveneno comercial Antivipmyn (Lotes: B-8K-35 caducidad: Octubre/2022, B-7B-31 caducidad: Enero/2021 y B-0A-32 caducidad: Octubre/2023) resuspendidos en 10 mL de PBS por cada vial; posteriormente

se realizaron los pasos ya descritos para el ensayo de actividad proteolítica sobre azocaseína. Finalmente, los datos fueron analizados con el software GraphPad Prism Versión 8.0.2, donde el porcentaje de neutralización de la actividad proteolítica en cada grupo experimental se graficó en función del logaritmo de la dosis.

#### ***VIII.4.4 Ensayo titulométrico en yema de huevo para cuantificar la actividad enzimática de fosfolipasas***

Se preparó una solución de yema de huevo al 10.0% como se describió anteriormente. Después se colocaron 500  $\mu$ L de la solución de yema de huevo en un tubo de 1 mL en agitación constante y bajo ligero burbujeo de nitrógeno. La solución fue llevada a un pH ligeramente mayor a 8 con ayuda de una solución de NaOH 50 mM, posteriormente, se agregó 1  $\mu$ L de veneno. Al momento de agregar el veneno el pH cambió a 7.99 e inmediatamente se añadió NaOH 50 mM para regresar el pH a un valor mayor a 8 y se accionó el cronómetro para registrar el tiempo que tardó el pH en regresar a 7.99. Este procedimiento se repitió cinco veces y se realizaron tres ensayos por cada veneno. En cada repetición se aumentó el volumen de NaOH empleado.

Finalmente, se realizaron análisis de regresión lineal, donde el tiempo acumulado es empleado como variable dependiente, sobre la cantidad de  $\mu$ mol de NaOH consumidas como variable independiente y la pendiente de la regresión representa la actividad enzimática la cual es reportada como  $\mu$ mol de NaOH/min

#### ***VIII.4.5 Actividad fibrinogenolítica***

Los venenos de la familia Viperidae contienen proteasas, muchas de las cuales actúan sobre una variedad de componentes fibrinolíticos y de coagulación provocando un desequilibrio sobre el sistema hemostático. La actividad fibrinogenolítica se atribuye a componentes del veneno como enzimas tipo trombinas (Thrombine-like), proteinasas fibrinogenolítica, entre otras (Salazar *et al.*,

2007). Para determinar la actividad fibrinogenolítica de los venenos individuales y las mezclas de venenos de adultos y juveniles de *C. culminatus* se procedió a incubar en tubos eppendorf de 2 mL durante 30 minutos a 37° C, 14 µL de fibrinógeno de borrego a una concentración de 2.6 mg/mL con 10 µg de cada veneno y se aforaron a un volumen final de 50 µL. Tras la incubación se tomaron 5 µL de la muestra y se realizó una electroforesis discontinua en geles al 12.5% en condiciones reductoras siguiendo el método descrito anteriormente.

#### ***VIII.4.6 Inhibición de la actividad fibrinogenolítica con EDTA***

Para la inhibición de las SVMPs se utilizó EDTA. Para esto, se incubaron 10 µg de cada veneno y de las mezclas de venenos con 5 µL de EDTA 5 mM y 19 µL de fibrinógeno de borrego a una concentración de 2.6 mg/mL durante 30 min a 37° C, posteriormente se realizaron los pasos ya descritos anteriormente.

#### ***VIII.4.7 Inhibición de las actividades proteolítica y fibrinogenolítica con BATIMASTAT***

Para la inhibición de metaloproteinasas se utilizó Batimastat. El BB-94; [4- (N-hidroxiamino) -2R isobutil-3S- (tieniltiometil) -succinil] -L-fenilalanina N-metilamida o mejor conocido como Batimastat es un inhibidor de tipo hidroxamato, el cual es capaz de unirse al zinc formando quelatos inhibiendo la actividad de las metaloproteinasas.

Para esto se pesaron 0.9 mg de Batimastat (Lote: #0000085158) los cuales se disolvieron en 0.5 mL de PBS que contenía Tween 80 al 0.01%. Esta solución se mantuvo en agitación constante durante 10 minutos. La concentración final de la solución es de 3700 µM. Posteriormente para realizar la inhibición de las metaloproteinasas se incubaron 4 mg de las mezclas de veneno de crías/juveniles y adultos de *C. culminatus* con 40 µM de la solución de Batimastat durante 30 min a 37° C con períodos de agitación de 1 minuto cada 10 minutos.

Finalmente se realizaron los procedimientos descritos anteriormente para las actividades proteolítica sobre azocaseína y fibrinogenolítica.

#### ***VIII.4.8 Actividad letal***

La dosis letal media ( $DL_{50}$ ) se define como la cantidad de veneno necesaria para matar la mitad de una población animal. Para esto, se inyectaron grupos de 3 ratones de la cepa CD-1 en un rango de peso de 18 a 20 g, se administraron diferentes cantidades de veneno por vía intravenosa en un volumen final de 0.5 mL/ratón. A las 24 horas de la inyección se registró el número de animales muertos en cada grupo.

Finalmente, los resultados fueron analizados con el software GraphPad Prism Versión 8.0.2, para esto, se graficó el porcentaje de mortalidad en función del logaritmo de la cantidad de veneno utilizando el método de regresión no lineal tipo sigmoide dosis-respuesta.

#### ***VIII.4.9 Neutralización de la actividad letal***

Para evaluar la eficacia de un antiveneno comercial *in vivo* se realizaron pruebas de potencia neutralizante, reportada como dosis efectiva media ( $DE_{50}$ ). Ésta se define como el volumen de antiveneno necesario para salvar a la mitad de una población animal a los que se les administra tres dosis letal media. Para esto, se incubaron durante 30 min a 37° C cantidades equivalentes a tres dosis letales medias de las mezclas de venenos generados de juveniles y adultos de *C. culminatus*. Se utilizaron diferentes volúmenes de tres lotes de Antivipmyn (Lotes: B-8K-35, B-7B.31 y B-0A-32), los cuales habían sido resuspendidos en 1.5 mL. Posteriormente, la mezcla fue inoculada por vía intravenosa en grupos de 3 ratones y transcurridas 24 h después de la inyección se registró la mortalidad de cada grupo experimental. Finalmente, los resultados fueron analizados con el software GraphPad Prism Versión 8.0.2, para esto se graficó el porcentaje de sobrevida en función del

logaritmo de la cantidad de antiveneno utilizando el método de regresión no lineal tipo sigmoide dosis-respuesta.

## VIII.5 Esquema de inmunización de conejos

### VIII.5.1 Obtención de anticuerpos Anti-*C. culminatus*

El esquema de inmunización consistió en la inoculación subcutánea quincenal de cuatro conejos, con clave de bioterio 40, 41, 42 y 43, iniciando el mes de noviembre del 2020 y terminando en el mes de febrero del 2021. En los conejos 40 y 41 se utilizó como inmunógeno la mezcla de veneno de juveniles de *C. culminatus* y la mezcla de adultos fue utilizado en los conejos 42 y 43. En todos los casos el veneno fue inyectado en cantidades crecientes iniciando con de 30 µg de veneno por conejo y se terminó con 7500 µg/conejo. Todas las inmunizaciones se realizaron en un volumen final de 1100 µL/conejo. Se empleó adyuvante incompleto de Freund (IFA) e hidróxido de aluminio (ALUM) de manera alternada (**Tabla 1**). Las sangrías fueron obtenidas mediante punción de la vena marginal de la oreja para colectar aproximadamente 2 mL de sangre, la cual fue centrifugada para aislar suero. La evolución de los títulos se realizó de manera individual y además, se realizaron dos mezclas: una de los sueros de los conejos 40-41 y la segunda de los sueros de los conejos 42-43.

<b>Tabla 1. Esquema de inmunización con las mezclas de veneno de adultos y crías/juveniles de <i>C. culminatus</i></b>					
<b>No. de inmunización</b>	<b>Fecha</b>	<b>Dosis (µg/conejo)</b>	<b>Adyuvante</b>	<b>Ruta</b>	<b>Sangría</b>
1	30-nov-20	30	IFA	SC	Sí
2	07-dic-20	60	ALUM	SC	

3	14-dic-20	120	ALUM	SC	Sí
4	21-dic-20	250	ALUM	SC	
5	28-dic-20	500	IFA	SC	Sí
6	04-ene-21	750	ALUM	SC	
7	11-ene-21	1000	IFA	SC	Sí
8	18-ene-21	2000	ALUM	SC	
9	25-ene-21	4000	IFA	SC	Sí
10	01-feb-21	6000	NO	SC	
11	08-feb-21	7000	IFA	SC	Sí
12	22-feb-21	7500	NO	SC	
13	19-mar-21	-	-	SC	Sí

### *VIII.5.2 Medición de títulos mediante ensayo de ELISA*

Con la finalidad de medir y observar la evolución de los títulos, es decir el nivel de anticuerpos en la sangre, se realizó el ensayo ELISA, para ésto, se sensibilizaron placas de ELISA marca Thermo Scientific (96 pozos) con 5 µg/mL de las mezclas de venenos con buffer de sensibilizado (100 mM de bicarbonato, pH 9.5). Una vez finalizada la incubación se procedió a realizar lavados por triplicado con buffer de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 + NaCl 150 mM + 500 µL Tween 20). A continuación, las placas se incubaron durante una noche con buffer de bloqueo y seguido de esto se

realizaron lavados por triplicado en toda la placa. Posteriormente, se colocó el suero de conejo anti *C. culminatus* iniciando con una dilución 1:50 y diluciones seriadas 1:3 en buffer vehículo (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 + NaCl 0.5 M + 1 mg/mL de gelatina + 0.05% Tween 20) y se procedió a incubar la placa por 1 h a 37° C. Una vez finalizada la incubación se realizaron lavados por triplicado.

Seguidamente, como anticuerpo secundario se colocaron 100 µL en cada pozo de una solución 1:3000 de anticuerpo Goat-Anti Rabbit IgG HRP conjugated marca Thermo Scientific en buffer vehículo para dejar incubar durante 1 h a 37° C. Al término de la incubación la placa fue lavada tres veces e inmediatamente se aplicaron 100 µL por pozo de una solución de revelado y la reacción se dejó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la placa se leyó a 450 nm utilizando un espectrofotómetro de ELISA marca Magallan. Los resultados fueron analizados con el software GraphPad Prism Versión 8.0.2.

### ***VIII.5.3 Purificación de inmunoglobulinas (Ig)***

Para determinar el porcentaje de anticuerpos específicos hacia las mezclas de veneno se purificaron las Ig de las mezclas de suero de conejo por el método de precipitación con ácido caprílico. Este método permite la separación de las Ig del resto de las proteínas presentes en el suero. Así, de cada mezcla de suero se emplearon 22 mL, los cuales fueron mezclados con 22 mL de agua destilada, ajustando el pH a 5 con ácido acético 3 N. Posteriormente, se añadió ácido caprílico en agitación constante (30 minutos) para obtener una concentración final de 4% (V/V). Después, las muestras se centrifugaron durante 30 minutos. El sobrenadante, que contiene los anticuerpos, fue separado del pellet y a continuación fue filtrado con papel filtro Whatman 3MM. Finalmente, se dializaron los anticuerpos contra PBS 1X y se cuantificó el total de la proteína por absorbancia 280 nm, (coeficiente de extinción = 1.44) y se realizaron geles SDS-PAGE al 12.5% para comprobar el estado de purificación de los anticuerpos.

#### ***VIII.5.4 Cuantificación de Ig anti-C. culminatus***

Para determinar el porcentaje de Ig específicas se realizaron inmunopurificaciones por afinidad. Para ello se utilizaron columnas acopladas a 14 mg de veneno completo de *C. culminatus*. Una vez lavadas las columnas, se añadieron 4 mg de anticuerpos, obtenidos a partir de la mezcla de suero de conejos. En la columna acoplada a venenos de juveniles se añadieron los anticuerpos de conejos hiperinmunizados con la mezcla de venenos de juveniles, mientras que, en la columna acoplada a venenos de adultos se añadieron los anticuerpos de conejos hiperinmunizados con la mezcla de venenos de adultos. Para ambos casos, las columnas se incubaron durante 5 minutos para asegurar el pegado de los anticuerpos hacia el veneno. Posteriormente se realizaron múltiples lavados, y se añadieron 3 mL de buffer de elusión (100 mM ácido acético) seguido de 9 mL de PBS 1X y el volumen eluido fue colectado en tubos eppendorf con 200  $\mu$ L de solución amortiguadora (Tris 1M, pH 9.0). A continuación, se midió Abs 280 nm (coeficiente de extinción = 1.44) a cada tubo y aquellos con un valor mayor a 0.05 fueron mezclados y se cuantificó el total de anticuerpos obtenidos.

#### ***VIII.5.5 Reconocimiento del veneno completo y crotamina de C. culminatus por el antiveneno e inmunoglobulinas inmunopurificadas por Western-Blot***

Para evaluar el reconocimiento de los anticuerpos hacia crotamina de *C. molossus* y crotamina de *C. culminatus*, se realizó un Western-Blot. Para ésto, se corrieron 5 ug de las mezclas de venenos de juveniles y adultos de *C. culminatus* en un gel SDS-PAGE al 15% de poliacrilamida en condiciones reductoras. Una vez finalizada la corrida, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Trans-blot0.45 $\mu$ m Bio Rad) colocando tres capas de papeles filtro (3M) por debajo, a continuación, se coloca el gel y la membrana de nitrocelulosa, seguido de 3 capas de papel filtro por encima. La electrotransferencia se realizó en una cámara semi-seca marca INVITROGEN, a una corriente constante de 400 mAmps durante 1 h con buffer de transferencia. Finalizada la transferencia, la

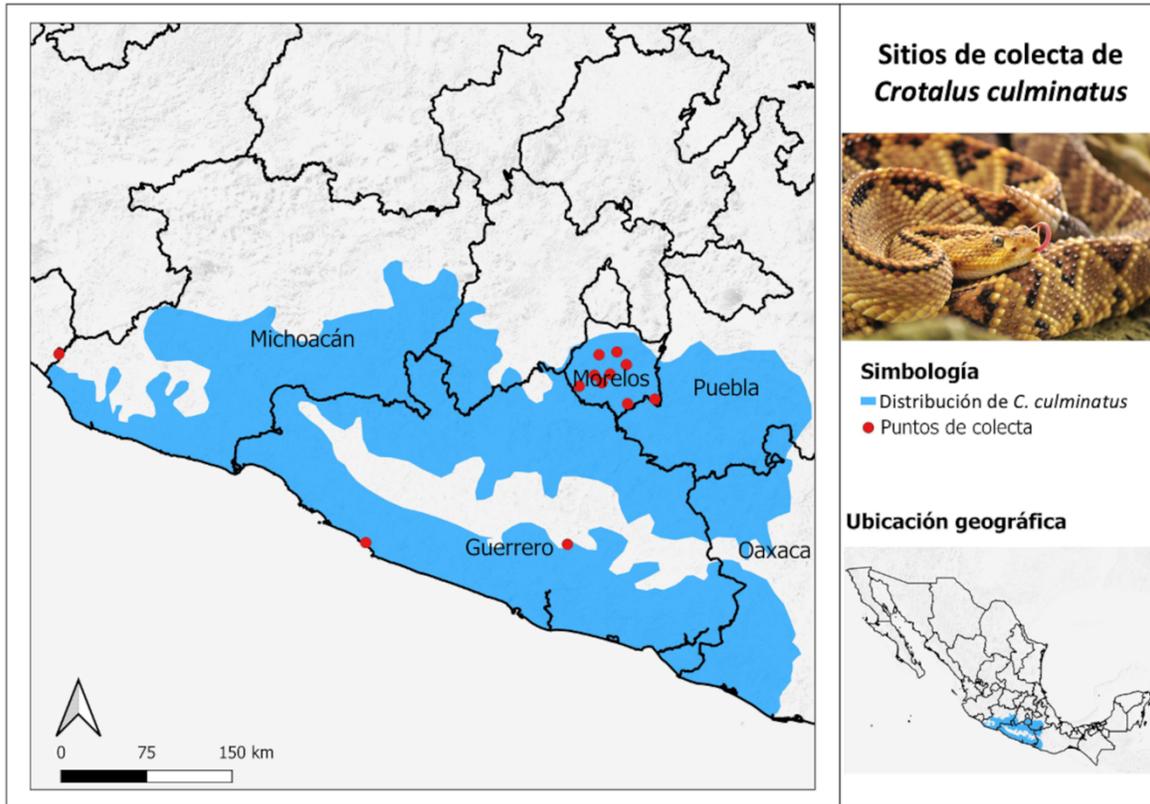
membrana se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente durante una noche con buffer TBST + 5% de leche descremada Svelty. Posteriormente se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con TBST. Seguidamente, se dejó incubar 1 h con Ig anti-*C. culminatus* en una concentración de 2 µg/mL en 10 mL de TBST. A continuación, se realizaron lavados por triplicado de 10 min con TBST y se procedió a incubar la membrana durante 1 h con anticuerpos secundarios Goat Anti-Rabbit IgG HRP en una dilución 1:4000 en 10 mL de solución TBST. Finalmente se volvió a lavar la membrana y se reveló con 3 mL de buffer TMB hasta observar nítidamente las bandas correspondientes realizando lavados con agua destilada para parar la reacción.

## IX. RESULTADOS

### *IX.1 Muestras de veneno obtenidas*

Se obtuvieron 57 muestras de veneno de *Crotalus culminatus* provenientes de cuatro estados de la República Mexicana de las cuales, 38 son de Morelos (20 adultos y 18 juveniles), 10 de Guerrero (2 adultos y 8 juveniles), 5 de Michoacán (todas juveniles), 2 de Puebla (todas juveniles). Además, en el banco de venenos se contaba con 2 muestras: la primer muestra era una mezcla de 10 ejemplares juveniles que correspondían a 5 individuos de Michoacán y 5 de Morelos y la segunda era una mezcla de 2 individuos adultos (1 de Michoacán y 1 de Morelos).

De las 57 muestras totales se realizaron dos mezclas nuevas con las que se realizaron los siguientes experimentos. Una de ellas estaba compuesta por 27 venenos de juveniles (20 de Morelos, 4 de Michoacán, 2 de Puebla y 1 de Guerrero) y la segunda fue una mezcla de 24 venenos de adultos (20 de Morelos, 2 de Michoacán y 2 de Guerrero) (**Figura 6**).



**Figura 6.** Distribución y sitios de colecta de las muestras de veneno de *C. culminatus*. En azul se resaltan los estados donde se distribuye la especie y en rojo se señalan las localidades de donde provienen las muestras utilizadas en este proyecto (basado en Campbell y Lamar, 2004).

### ***IX.2 Perfiles electroforéticos por SDS-PAGE***

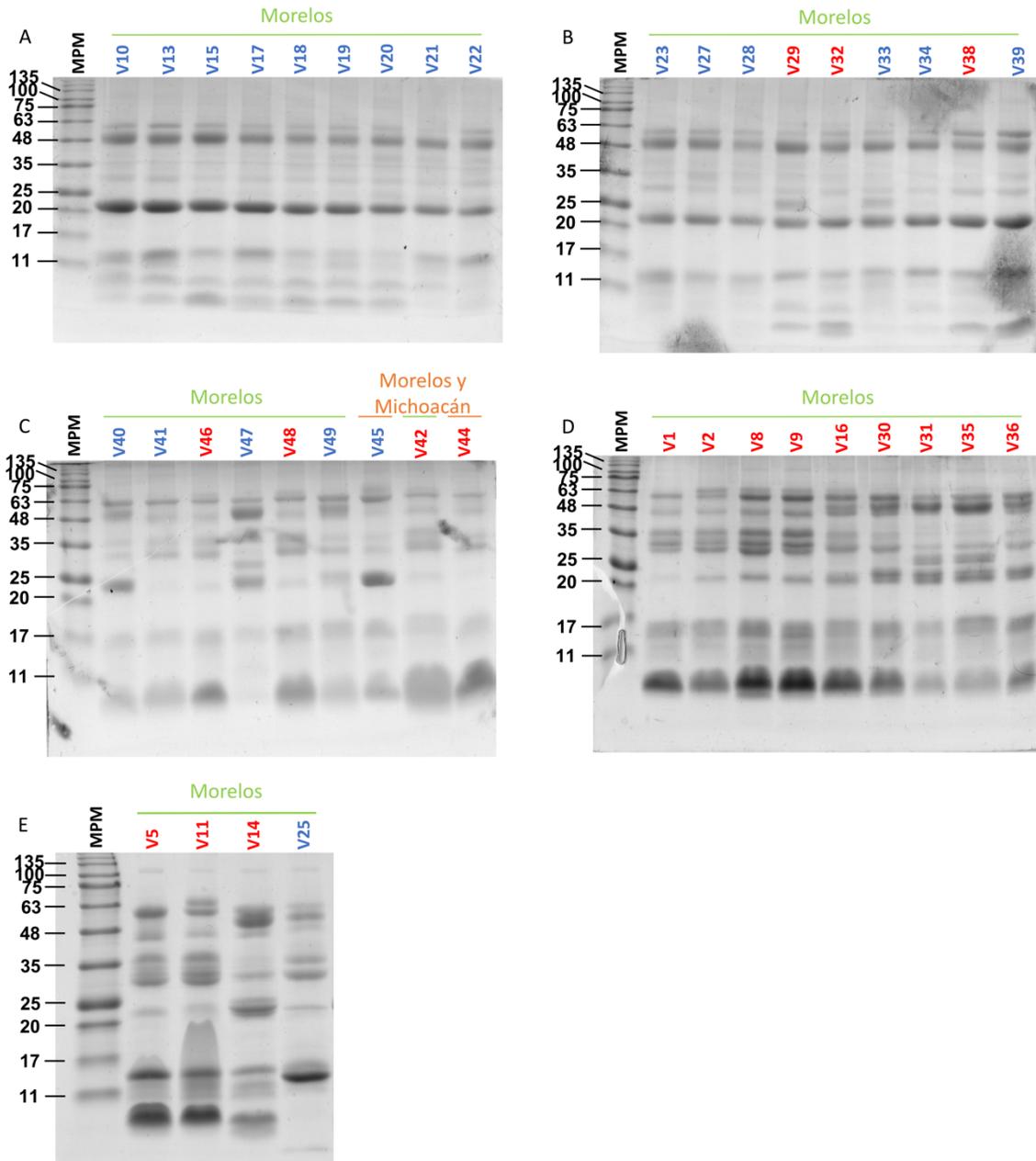
Como paso inicial para la caracterización de los venenos, se realizaron los perfiles electroforéticos por SDS-PAGE de los 57 venenos y de las mezclas de juveniles y adultos de *C. culminatus* pertenecientes a los estados de Morelos, Michoacán, Puebla y Guerrero (**Figura 7**). De manera general se observa que los venenos presentan bandas de alto, medio y bajo peso molecular. Podemos observar variaciones individuales y geográficas. Por trabajos anteriores las bandas de mediano peso molecular (37-50 kDa) podrían ser SVMP's y entre 20-25 kDa encontramos bandas de SVMPs P-III y SVMP's P-I. Las bandas de pesos entre 25 y 37 kDa, podrían corresponder a SVSP's, las PLA<sub>2</sub>'s que migran alrededor de los 15 kDa y una banda proteica característica en venenos de juveniles

menor a 11 kDa que corresponde a crotamina (Segura et al., ).2017) Además en la gran mayoría de los venenos se observó un doblete proteico debajo de los 35 kDa.

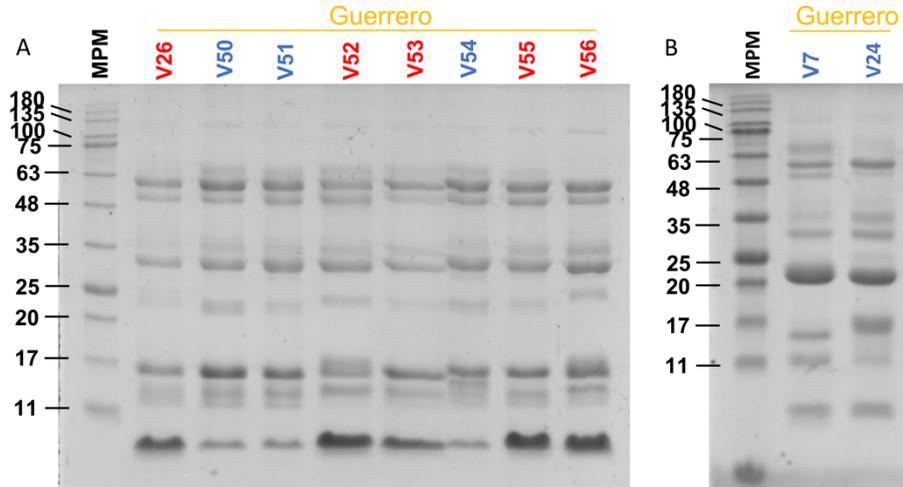
En general, los venenos de adultos individuales y la mezcla de venenos de adultos mostraron similitudes en las bandas que migran alrededor de los 48 kDa y 25 kDa y en la mayoría de las muestras se observan bandas menores a 11 kDa pero en menor abundancia. Los adultos de Morelos mostraron mayor abundancia en las bandas proteicas de 20 y 48 kDa, mientras que los adultos de Guerrero presentan un perfil con mayor número de bandas que migraron en distintos rangos, desde <11 kDa y hasta por arriba de 63 kDa. Además, los venenos de adultos de Guerrero mostraron un triplete proteico entre los 48 y 63 kDa, mientras que los adultos de Morelos mostraban dos bandas. El perfil de la muestra V25 muestra una banda menor a 17 kDa que es más abundante a comparación de otros adultos (**Figura 7A, 7B, 7C, 7E, 8A y 8B**).

Por otra parte, las muestras individuales de juveniles y la mezcla de venenos juveniles mostraron bandas que migraron desde los 63 hasta por debajo de los 11 kDa, en especial se observó que todos los juveniles presentaban una banda proteica muy abundante menor a 11 kDa. Los juveniles de Morelos mostraron tres bandas proteicas alrededor de los 35 kDa, mientras que los juveniles de Michoacán, Guerrero y Puebla mostraron un doblete a excepción de la muestra V37 de Puebla que mostró tres bandas. Existen casos (V29 y V32) donde la banda menor a 11 kDa es menos abundante a comparación de los otros venenos de juveniles (**Figura 7B, 7C, 7D, 7E, 8A y 9**).

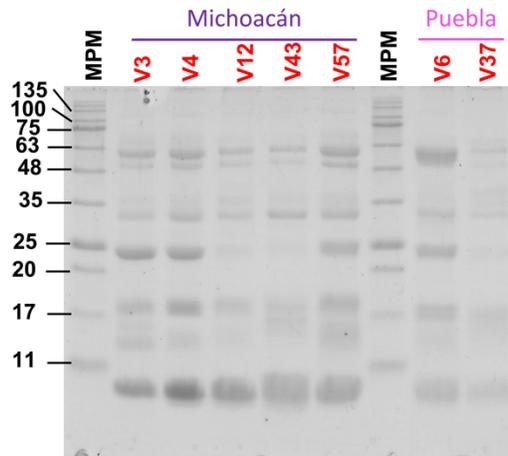
Finalmente se analizaron los perfiles de la mezclas de venenos, se observaron diferencias en la abundancia de algunas bandas como lo son las bandas de 48 y 20 kDa que pudieran ser serin proteasas y la banda de crotamina (<11 kDa) (**Figura 10**).



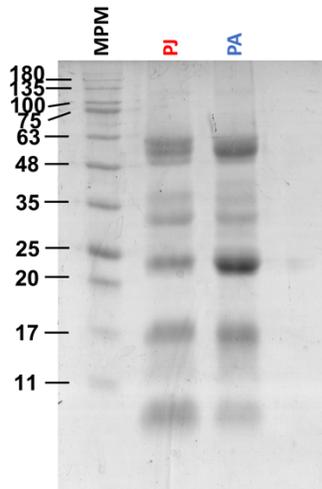
**Figura 7.** SDS-PAGE (15%) de venenos individuales y mezclas de venenos de *C. culminatus*. Las muestras se separaron según el estado del que provenían: Morelos (verde) y mezcla de Michoacán y Morelos (naranja) y su estadio de vida. Individuos juveniles se distinguen por su clave de identificación en color rojo, mientras que los adultos se resaltan en azul. MPM: Marcador de peso molecular (AccuRuler RGB PLUS prestained protein ladder, MAESTROGEN); Venenos (V#). La electroforesis se realizó en condiciones reductoras y se cargaron 20 µg por carril de cada muestra.



**Figura 8.** SDS-PAGE (15%) de venenos individuales de *C. culminatus* de Guerrero. Los individuos juveniles se distinguen por su clave de identificación en color rojo, mientras que los adultos se resaltan en azul. MPM: Marcador de peso molecular (AccuRuler RGB PLUS prestained protein ladder, MAESTROGEN); Venenos (V#). La electroforesis se realizó en condiciones reductoras y se cargaron 20  $\mu$ g por carril de cada muestra.



**Figura 9.** SDS-PAGE (15%) de venenos individuales de *C. culminatus* de Michoacán (morado) y Puebla (rosa). Los individuos juveniles se distinguen por su clave de identificación en color rojo, mientras que los adultos se resaltan en azul. MPM: Marcador de peso molecular (AccuRuler RGB PLUS prestained protein ladder, MAESTROGEN); Venenos (V#). La electroforesis se realizó en condiciones reductoras y se cargaron 20  $\mu$ g por carril de cada muestra.



**Figura 10.** SDS-PAGE (15%) de las mezclas de venenos de *C. culminatus*. MPM: Marcador de peso molecular (AccuRuler RGB PLUS prestained protein ladder, MAESTROGEN); PJ: Mezcla de juveniles; PA: Mezcla de adultos. La electroforesis se realizó en condiciones reductoras y se cargaron 20 µg por carril de cada muestra.

Basándonos en los perfiles electroforéticos, seleccionamos veinticuatro muestras de venenos de los cuales 10 correspondían a adultos (6 de Morelos, 3 de Guerrero, y 1 mezcla de dos individuos de Michoacán y Morelos) y 14 de juveniles (5 de Morelos, 3 de Michoacán, 3 de Guerrero, 2 de Puebla y 1 mezcla de diez individuos, 5 de Michoacán y 5 de Morelos) y las mezclas de 27 juveniles y 24 adultos para realizar las siguientes actividades. Los resultados de las actividades evaluadas se resumen en las **Tabla 3** y **Tabla 4**.

### ***IX.3 Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) y análisis de masas de crotamina***

En los perfiles cromatográficos de juveniles se mostraron diferencias en cantidad de las fracciones que eluyen entre el minuto 20 y 30, en los minutos 30 al 40 se observaron entre 4 y 5 fracciones pero con diferencias en la abundancia, del minuto 41 al 60 la mayoría de los perfiles no presentó fracciones de importancia, mientras que entre el minuto 61 y 75 hay diferencias importantes en el número y abundancia de las fracciones, por ejemplo, en el

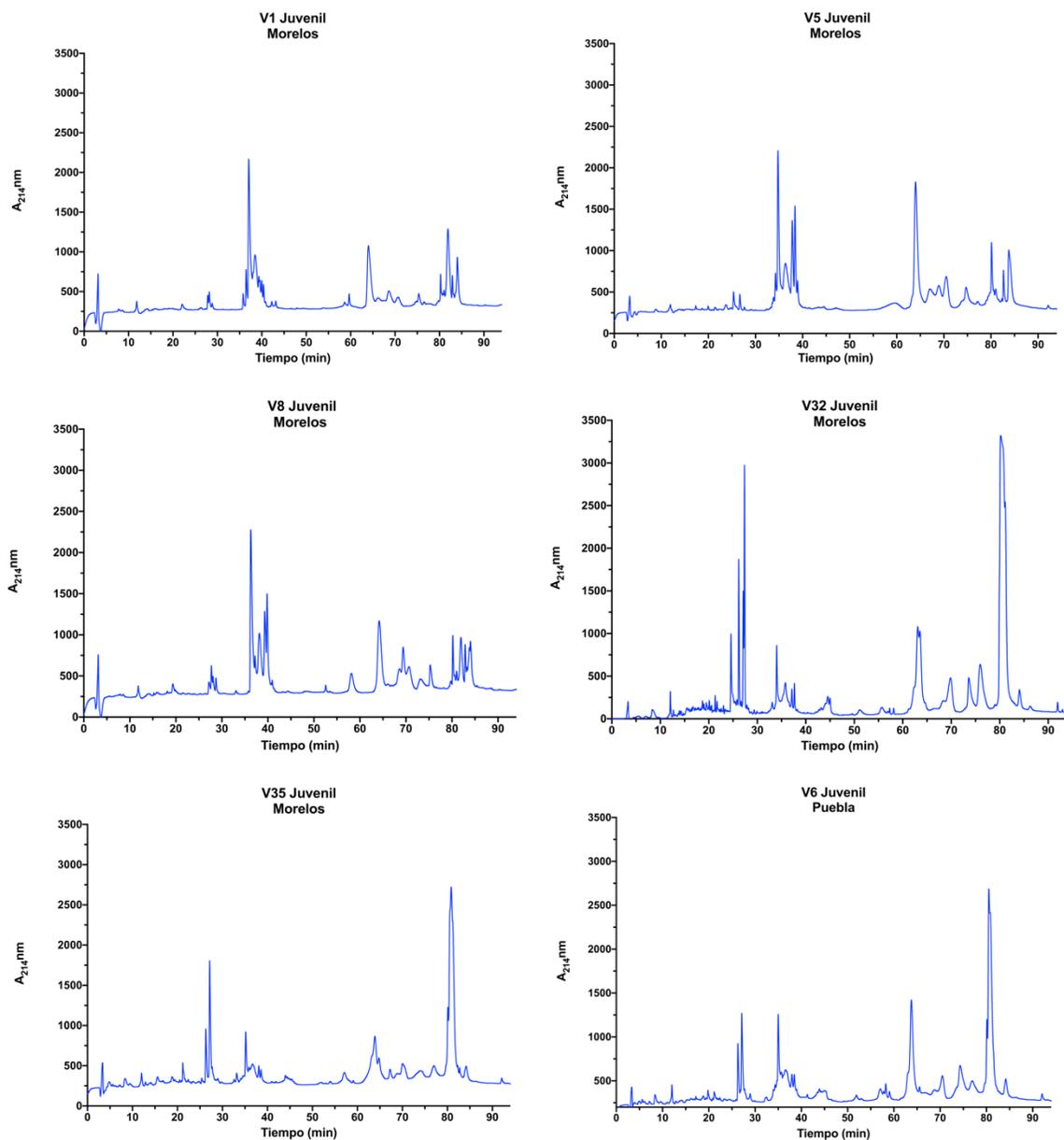
veneno V1 tenemos 3 fracciones, mientras que en la muestra V57 observamos 6 fracciones. Por último del minuto 75 al 94 observamos variación en la abundancia de las fracciones algunos venenos (V32, V35, V6, V26 y V57), los cuales mostraron una fracción muy abundante alrededor del minuto 80 (**Figura 11**).

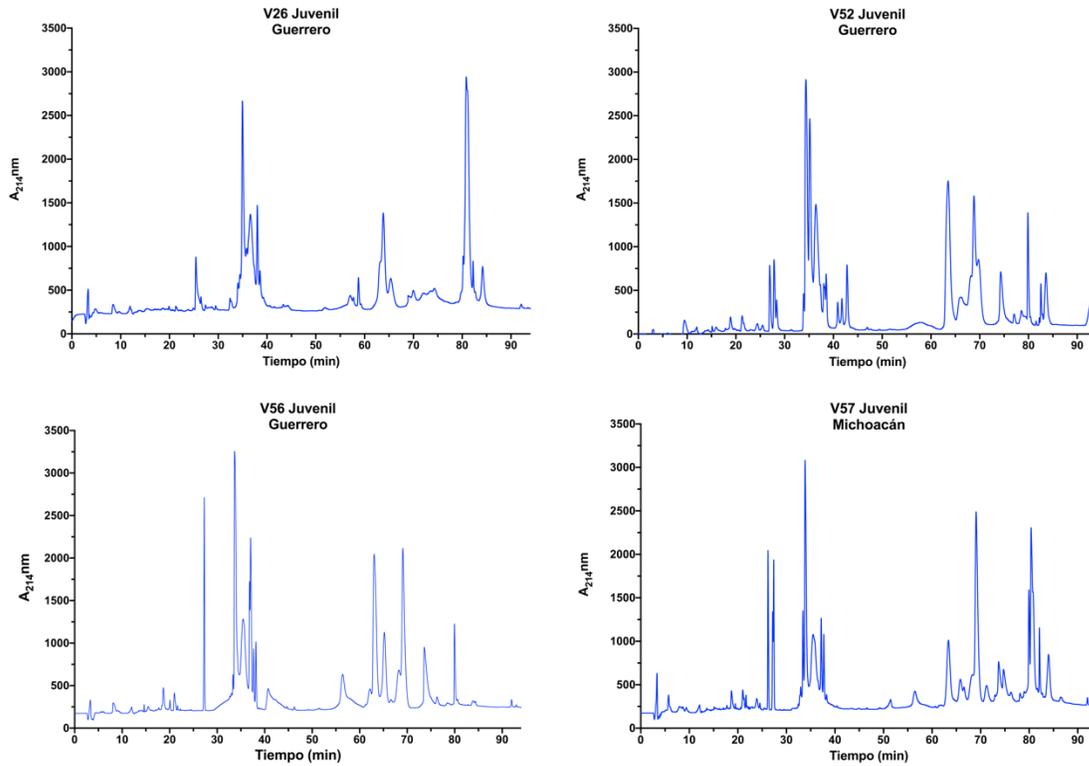
Por otro lado, en los perfiles de adultos vemos diferencias en la abundancia de las fracciones que eluyen entre el minuto 20 y 30, por ejemplo, el V10 presentó 3 fracciones, mientras que la muestra V47 no mostró fracciones durante ese tiempo. Del minuto 41 al 60 casi todos los venenos no mostraron fracciones, a excepción del veneno V25 que mostró una fracción de importancia. Del minuto 61 en adelante se observó mayor cantidad de fracciones, por ejemplo, el veneno V54 de Guerrero presentó 12 fracciones mientras que todos los otros venenos de adultos mostraron 10 o menos fracciones durante esos minutos (**Figura 12**).

Finalmente, en las muestras de las mezclas de veneno observamos una mayor cantidad de fracciones para la mezcla de adultos (45 fracciones) que para la mezcla de juveniles (34 fracciones). Del minuto 10 al 30 no se observaron diferencias, del minuto 31 al 40 la abundancia de las fracciones de la mezcla de juveniles fue mayor. Entre los minutos 40 y 60 observamos que hay diferencias, la mezcla de adultos mostró mayor cantidad de fracciones. Del minuto 60 al 85 hay un número importante de fracciones con variaciones en la abundancia de éstas. Las fracciones que corresponden a crotamina en ambos venenos (fracciones 6, 7, 8, 9 y 10 en juveniles y 14, 15, 16, 17 y 18 en adultos) fueron evaluados en ensayos *in vivo* en ratones (**Figura 15**).

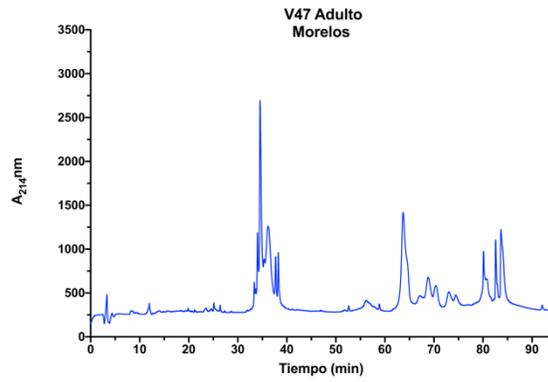
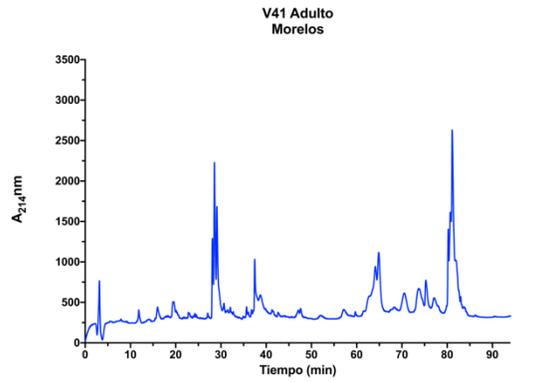
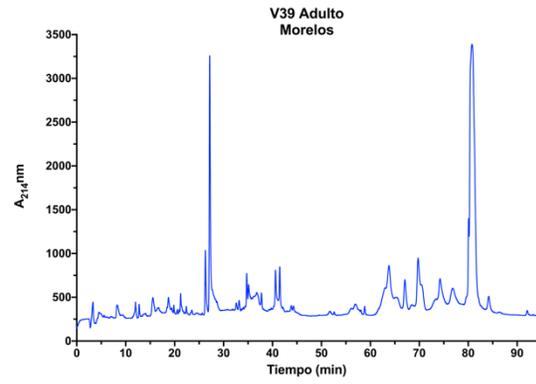
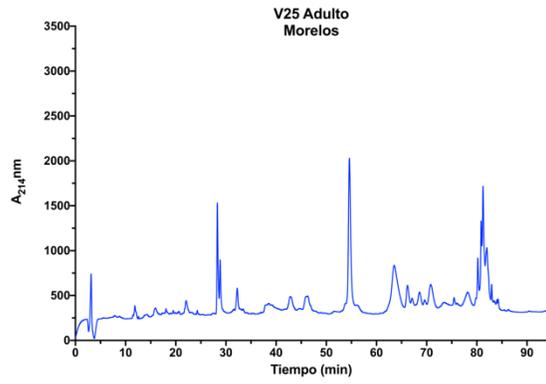
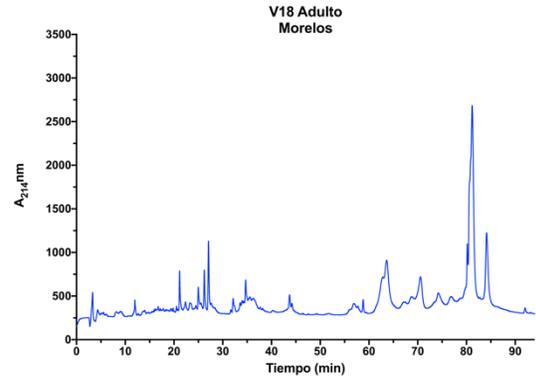
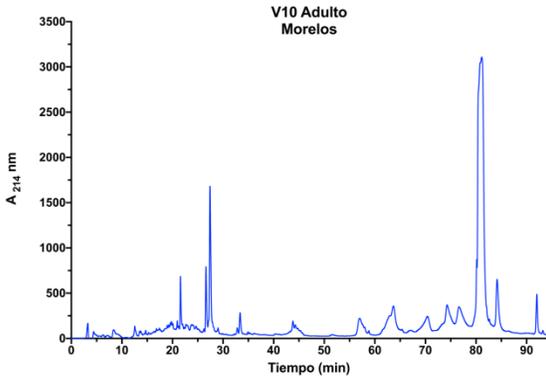
De las mezclas de venenos realizamos SDS-PAGE de las fracciones que eluyen en los minutos 65 al 70. En la mezcla de juveniles observamos bandas desde los 48 kDa, mientras que en la mezcla de adultos vemos bandas de 35 kDa. Existieron diferencias en el patrón de bandeo las fracciones que eluyeron del minuto 75 en adelante. Por ejemplo, la fracción del

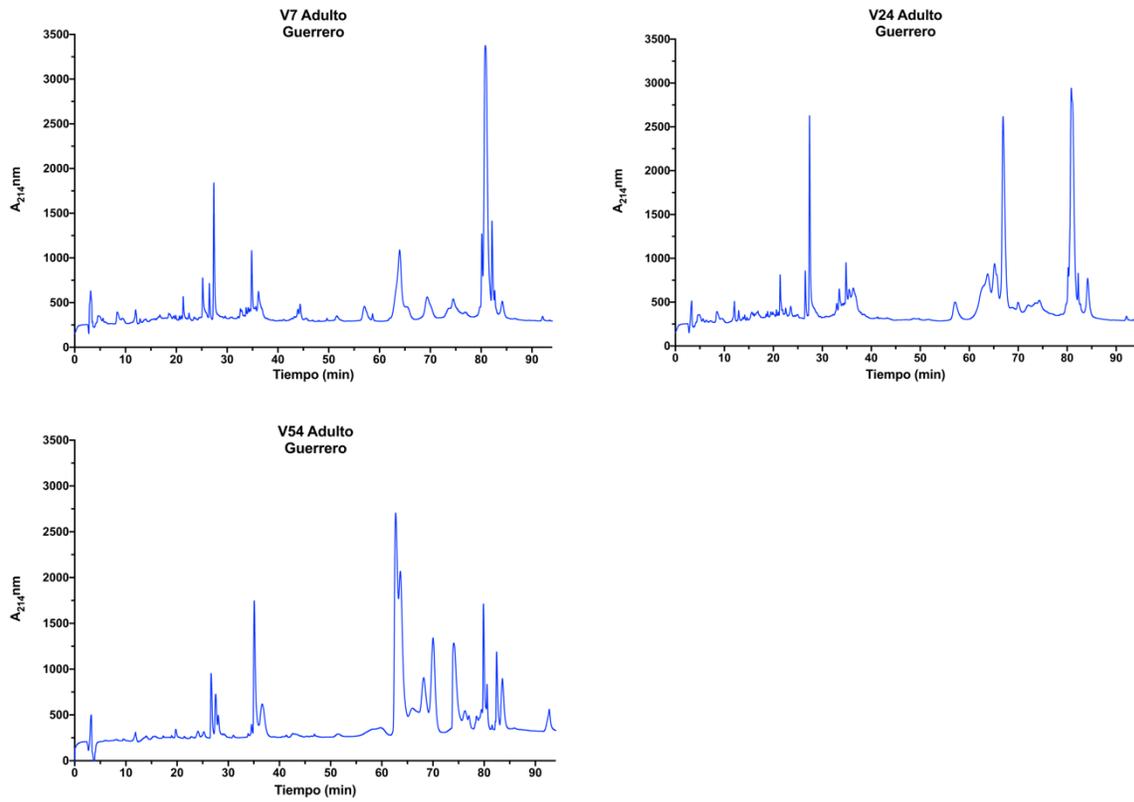
minuto 75 en la mezcla de crías mostró mayor cantidad de bandas que la mezcla de los adultos (Figura 13 y 14). Finalmente, se determinaron las masas de las fracciones por espectrometría de masas (ESI/MS) (Figura 15).



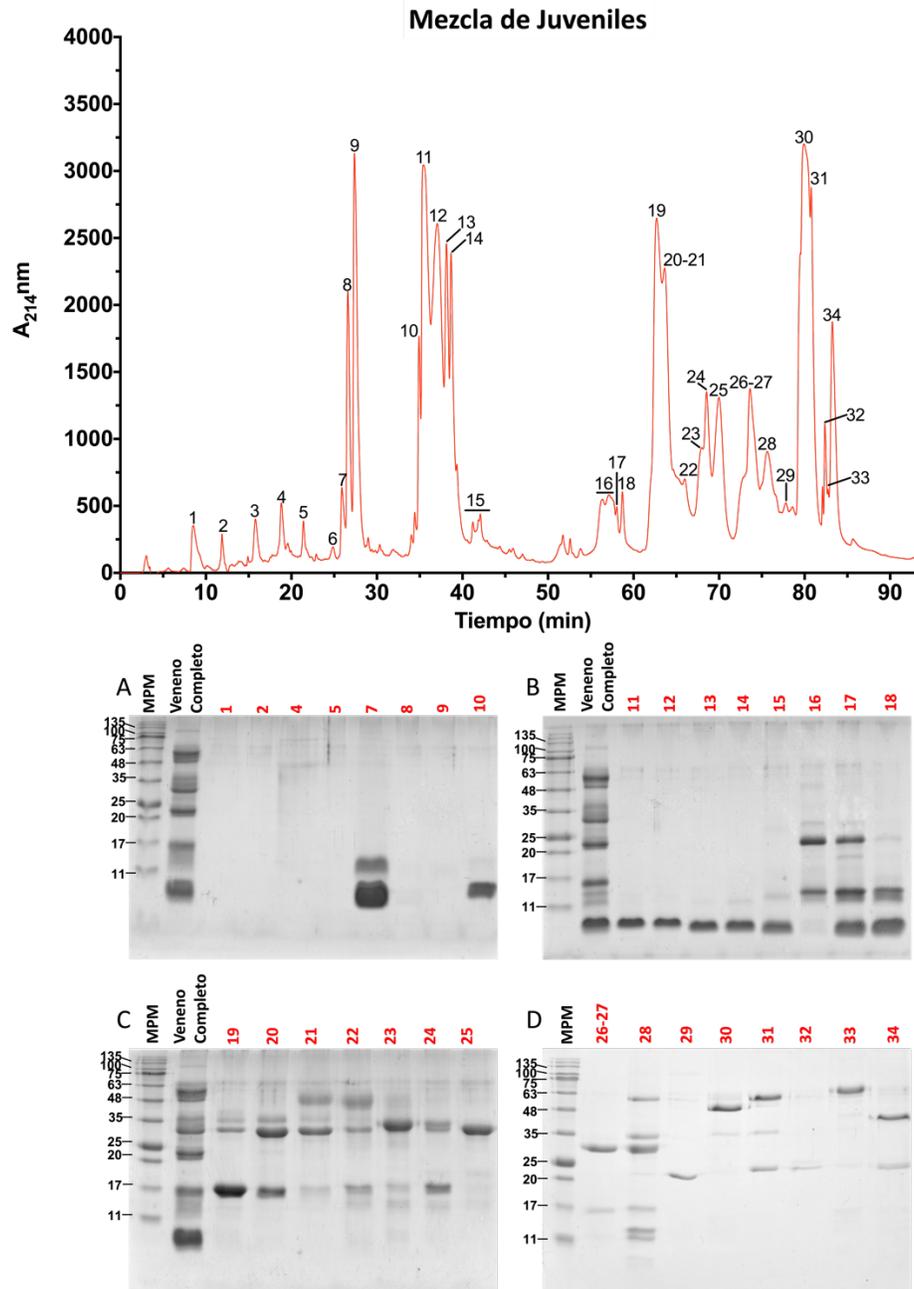


**Figura 11.** Perfiles cromatográficos por RP-HPLC. Se analizaron 1 mg de veneno de *C. culminatus* juveniles los cuales muestran variaciones geográficas e individuales. Las proteínas se detectaron a 214 nm y la absorbancia se indica en el eje izquierdo.

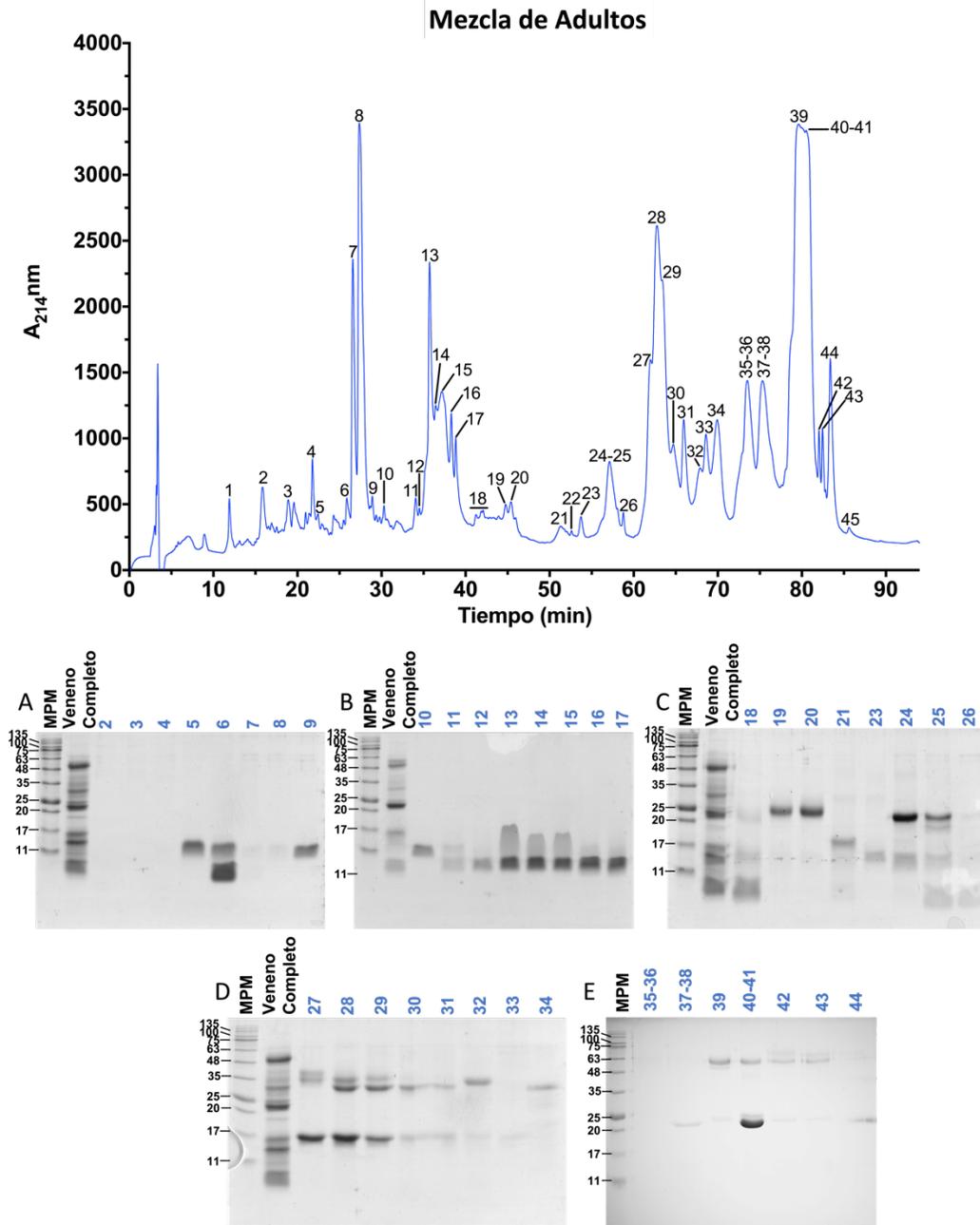




**Figura 12.** Perfiles cromatográficos por RP-HPLC. Se analizaron 1 mg de veneno de *C. culminatus* adultos, los cuales muestran variaciones geográficas e individuales. Las proteínas se detectaron a 214 nm y la absorbancia se indica en el eje izquierdo.



**Figura 13.** Perfil cromatográfico por RP-HPLC de 4 mg de veneno de una mezcla de 27 juveniles *C. culminatus*. Las proteínas se detectaron a 214 nm y la absorbancia se indica en el eje izquierdo. A continuación, las fracciones se separaron mediante SDS-PAGE 15% en condiciones reductoras y teñidos con azul de Coomassie R-250. MPM (Marcador de peso molecular, AccuRuler RGB PLUS prestained protein ladder, MAESTROGEN). Fracciones de la mezcla de venenos (1-34). La electroforesis se realizó en condiciones reductoras y se cargaron 20 µg por carril de cada muestra.



**Figura 14.** Perfil cromatográfico por RP-HPLC de 4 mg de veneno de una mezcla de 24 adultos *C. culminatus*. Las proteínas se detectaron a 214 nm y la absorbancia se indica en el eje izquierdo. A continuación, las fracciones se separaron mediante SDS-PAGE 15% en condiciones reductoras y teñidos con azul de Coomassie R-250. MPM (Marcador de peso molecular, AccuRuler RGB PLUS prestained protein ladder, MAESTROGEN). Fracciones de la mezcla de venenos (1-45). La electroforesis se realizó en condiciones reductoras y se cargaron 20  $\mu$ g por carril de cada muestra.

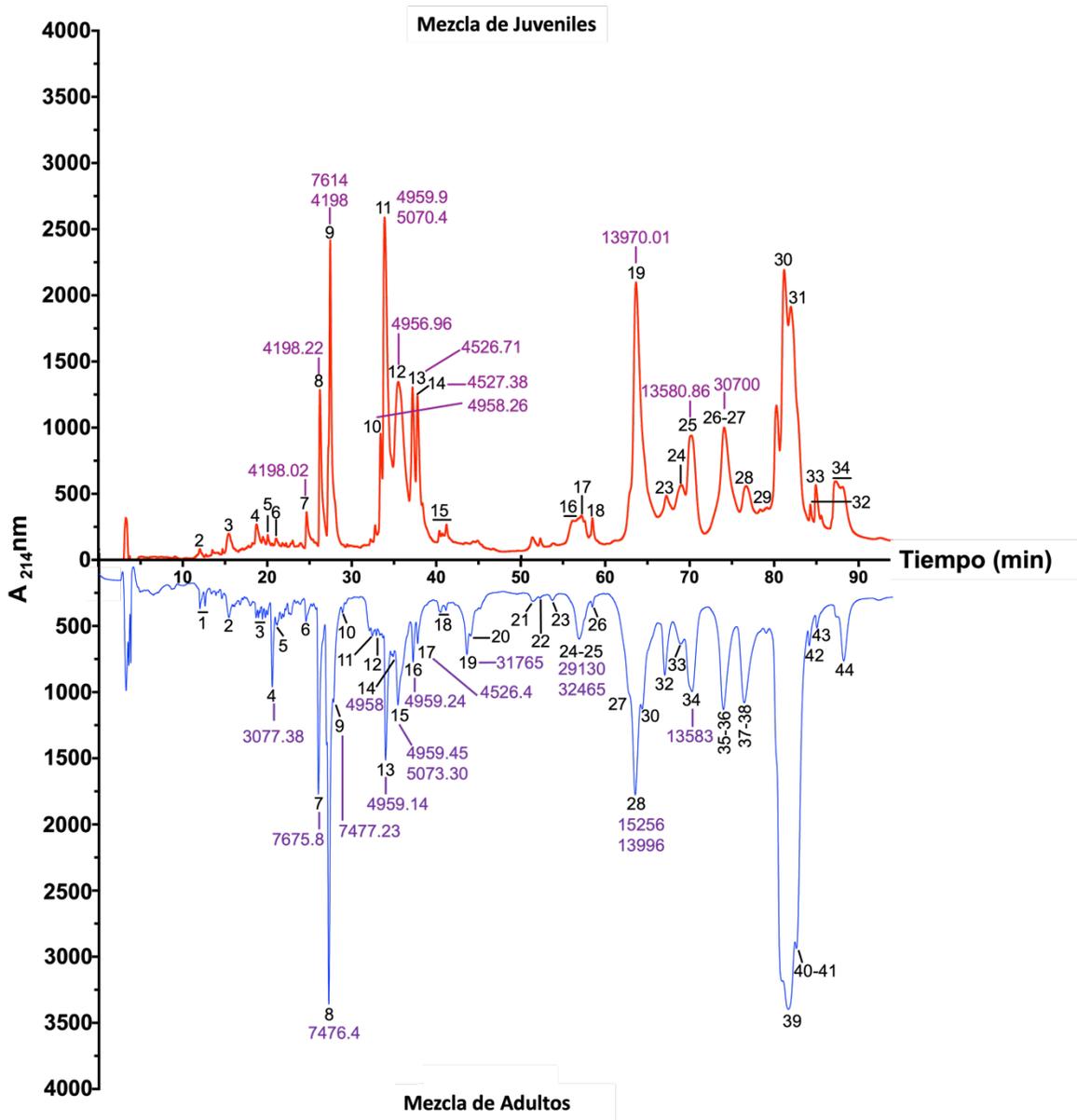
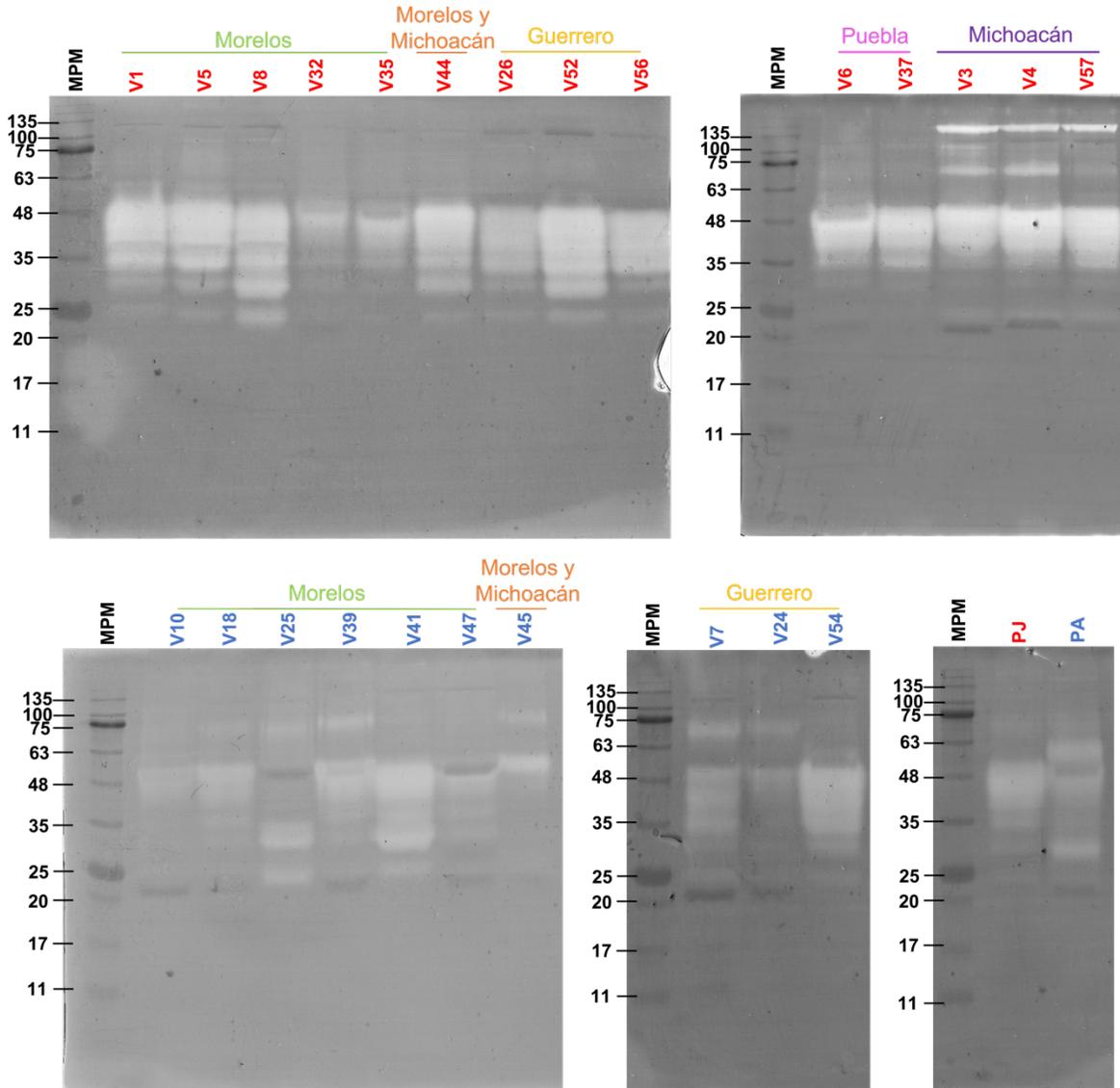


Figura 15. Perfiles cromatográficos por RP-HPLC de 2.5 mg de las mezclas de venenos de juveniles y adultos. Para algunas fracciones se determinaron las masas moleculares por medio de electrospray.

#### *IX.4 Actividad proteolítica en gelatina*

Los venenos evaluados hidrolizaron algunos componentes de la gelatina. Los venenos de individuos juveniles (rojo) muestran un patrón muy similar entre ellos degradando alrededor los componentes con masas de 35 y 48 kDa; sin embargo, presentan algunas diferencias. Por

ejemplo, los venenos de juveniles de Michoacán (V3, V4 y V57) muestran actividad proteolítica desde los 135 kDa, mientras que los demás venenos no muestran actividad por arriba de los 63 kDa. Por otro lado, tienen actividad sobre componentes de masas cercanas a los 25 kDa (V1, V5, V8, V44, V26, V52 y V56). Los venenos individuales de adultos (azul) muestran patrones más heterogéneos entre ellos y, a comparación de los juveniles, una degradación con menor intensidad. La mayoría de los venenos de adultos hidrolizaron los componentes con masas por debajo de los 63 kDa; sin embargo, algunos de ellos como V25, V41, V7 y V54 muestran degradación de los componentes de la gelatina con masas de 20 a 25 kDa. Las mezclas de veneno de juveniles y adultos son contrastantes con la degradación observada en los venenos individuales, siendo así que la mezcla de venenos de juveniles (PJ) presenta una degradación más intensa de los componentes de la gelatina con masas alrededor de los 48 kDa, mientras que la mezcla de venenos de adultos (PA) las principales bandas de hidrólisis se observan a los 63 kDa y por arriba de la banda de 25 kDa (**Figura 16**).

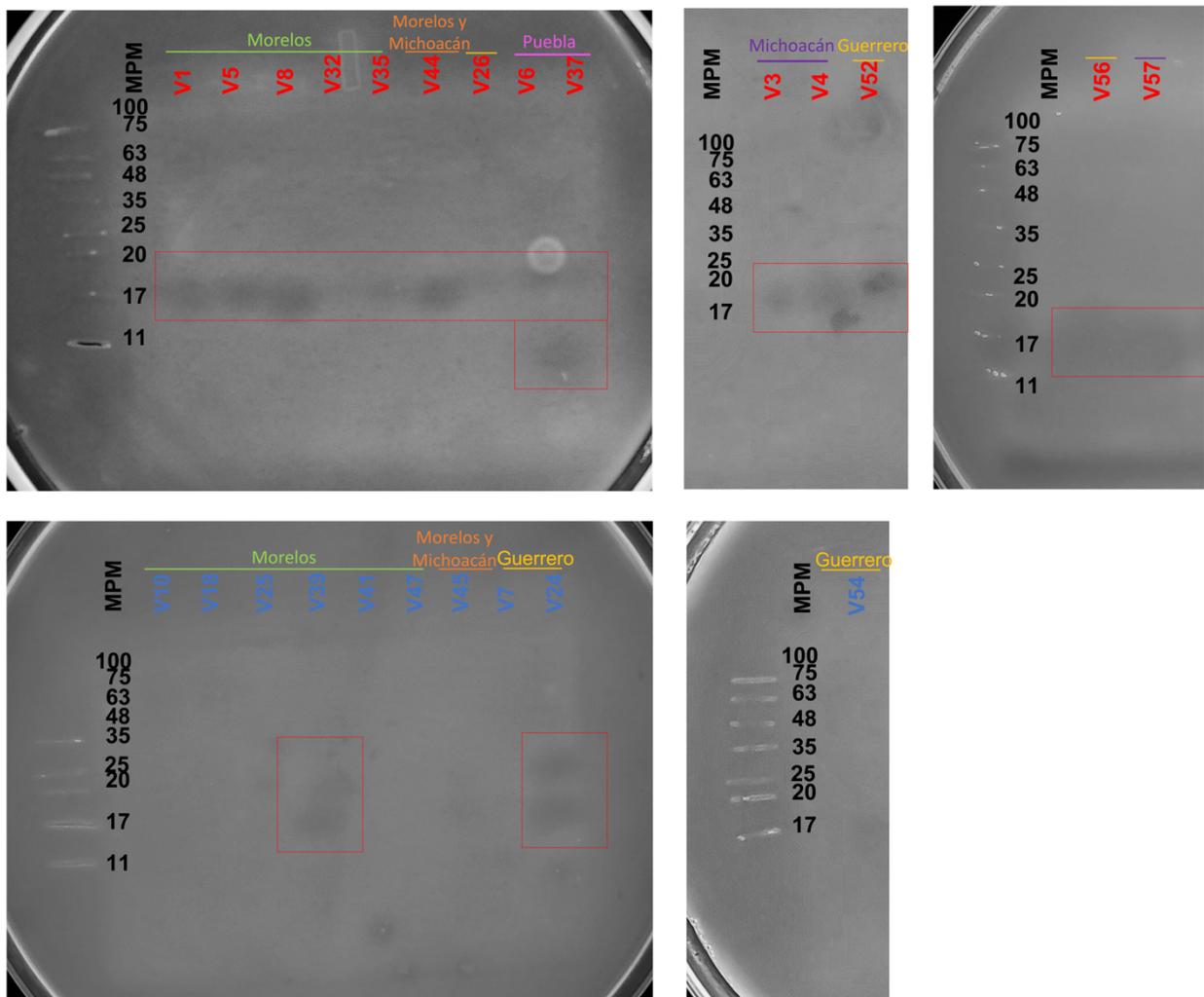


**Figura 16.** Actividad gelatinolítica de venenos individuales de *C. culminatus* juveniles (rojo) y adultos (azul). La hidrólisis de la gelatina que se traduce como actividad proteolítica se observa como zonas claras. MPM: Marcador de peso molecular (AccuRuler RGB PLUS prestained protein ladder, MAESTROGEN). V#; venenos. PJ; mezcla de 27 venenos de juveniles de *C. culminatus*. PA; mezcla de 24 venenos de adultos de *C. culminatus*. La electroforesis se realizó en condiciones no reductoras, se cargaron 10 µg por carril de cada muestra y los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250.

#### *IX.5 Actividad fosfolipasa (PLA<sub>2</sub>) en zimograma usando sustrato yema de huevo*

La actividad fosfolipasas de los 24 venenos individuales se evaluó realizando zimogramas con solución de yema de huevo al 2% como sustrato. La actividad fosfolipasa se observa

cómo la región más oscura. Los venenos de juveniles (rojos) evaluados hidrolizaron los componentes de la yema de huevo con una masa de 17 kDa, mientras que solo dos venenos de adultos (V39 y V24) presentaron actividad fosfolipasa observado como halos de degradación la zona donde están los componentes con masas de 25 y 11 kDa. Los venenos individuales de juveniles muestran degradación de la zona en la que se encuentran componentes de 17 kDa y en el caso del veneno V37 se observa un halo de degradación de la zona de componentes con masa inferior a los 11 kDa. (Figura 17).

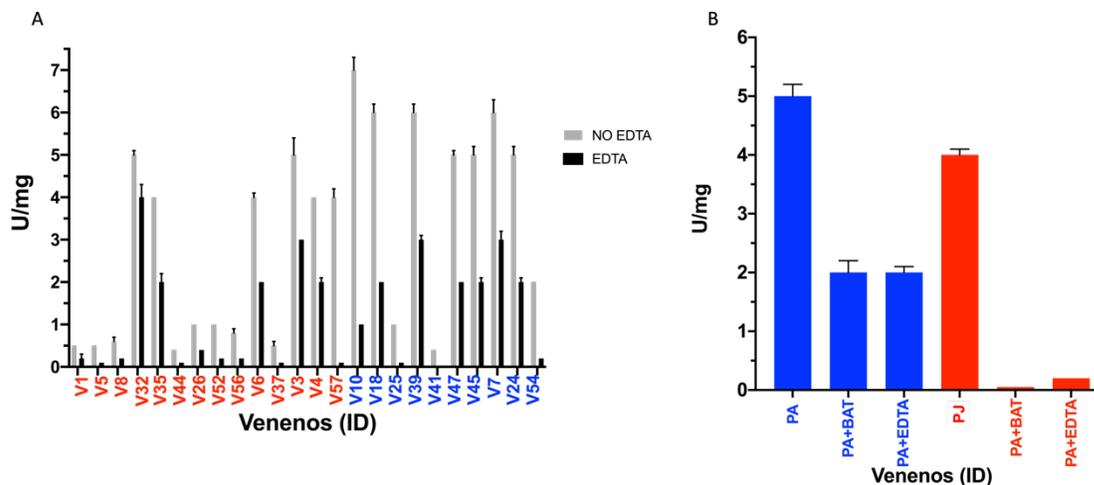


**Figura 17.** Actividad fosfolipasa (PLA<sub>2</sub>) de venenos individuales de *C. culminatus* juveniles (rojos), adultos (azules). La actividad se ve como un halo de degradación sobre la placa de solución de yema de huevo

al 2% y rodamina 6G. MPM: marcador de peso molecular (AccuRuler RGB PLUS prestained protein ladder, MAESTROGEN); V#: venenos. La electroforesis se realizó en condiciones reductoras, se cargaron 10 µg por carril de cada muestra y las placas fueron observadas con luz ultravioleta.

### *IX.6 Actividad proteolítica sobre azocaseína*

Los venenos individuales hidrolizaron la azocaseína en rangos de actividad de 0.4 U/mg (V44) a 7 U/mg (V10) (Tabla 2 y 3). Los venenos de individuos juveniles presentan actividades de entre 0.4 a 5 U/mg, en comparación con los venenos de adultos (0.5 a 7 U/mg) (**Figura 18 A**). De igual manera, la mezcla de venenos de juveniles presenta una menor actividad (4 U/mg) que la mezcla de venenos de adultos (5 U/mg) (**Figura 18 B**). Al inhibir la actividad proteolítica de las SVMP's con EDTA, aún quedó una actividad residual de los venenos individuales. Algunos de los venenos conservaron gran parte de la actividad (V32, V35, V3, V4, V10, V18, V39, V47, V45, V7, V24 y PA), hidrolizando hasta 4 U/mg (V32). Las mezclas de venenos de juveniles y adultos también fueron preincubados con el inhibidor de SVMP's, BATIMASTAT. Estos resultados fueron muy similares a los obtenidos a partir de la inhibición de las mezclas de venenos con EDTA (**Figura 18 B**), lo que indica que la actividad total está siendo mediada tanto por SVMP's como por SVSP's y que existen diferencias individuales en cuanto a la abundancia de las enzimas proteolíticas dentro de los venenos (**Figura 18 A**).



**Figura 18. Actividad proteolítica sobre azocaseína. A)** Proteólisis de 24 venenos individuales. Las barras grises corresponden a venenos no tratados y las barras negras a venenos preincubados con EDTA. **B)** Proteólisis de las mezclas de venenos de adultos (PA) y juveniles (PJ) sin inhibir y con dos inhibidores, EDTA y BATIMASTAT. Los datos de proteólisis se reportan como U/mg  $\pm$  DS. Los datos rojos corresponden a las muestras de juveniles y los datos azules a adultos.

### IX.7 Neutralización de la actividad proteolítica

Los tres lotes de antiveneno fueron capaces de neutralizar la actividad proteolítica de ambas mezclas. La actividad proteolítica de la mezcla de venenos de juveniles (PJ) fue mejor neutralizada por el lote B-0A-32, mientras que se requirió mayor cantidad de los lotes B-8K-35 y B-7B-31 para la neutralización de la actividad proteolítica sobre azocaseína. De manera similar, la actividad proteolítica de la mezcla de los venenos de adultos (PA) fue mejor neutralizada por el lote B-0A-32 a comparación de los otros dos lotes de antiveneno. En todos los casos se necesitaron mayores cantidades de antiveneno para poder neutralizar la actividad de la mezcla de venenos de adultos. (Tabla 2)

**Tabla 2.** Neutralización de la actividad proteolítica por tres lotes de Antivipmyn

Lote de Antivipmyn			
ID	B-8K-35	B-7B-31	B-0A-32

EC <sub>50</sub> (µg)			
PJ	74.31 (63.10 a 88.37)	71.09 (34.70 a 967.4)	58.54 (33.15 a 312.4)
PA	228.5 (191.8 a 279.8)	308.0 (207.4 a 1000)	86.89 (63.76 a 127.3)

\*EC<sub>50</sub> Concentración media efectiva. El intervalo de confianza del 95% se muestra entre paréntesis. Los resultados se presentan como µg de antiveneno capaces de neutralizar la actividad de 20 µg de veneno.

### IX.8 Actividad fosfolipasa (PLA<sub>2</sub>) por ensayo titulométrico

En cuanto a la actividad fosfolipasa se evaluó la actividad de la mezcla de venenos de individuos juveniles (PJ), la mezcla de venenos de adultos (PA) y como control positivo de la actividad se utilizó el veneno de *Micrurus browni*.

El control positivo presentó un valor de 116.2 (± 22) U/mg, mientras que la mezcla de venenos de adultos (PA) mostró un valor de 10.7 (± 0.5) U/mg, y la mezcla de venenos juveniles (PJ) dio un valor de 6.9 (± 0.8) U/mg (**Tabla 4**). Por lo tanto, a comparación del veneno de *M. browni*, ambas mezclas de venenos mostraron valores bajos de actividad siendo la mezcla de venenos de juveniles la que presenta la menor actividad.

### IX.9 Actividad fibrinogenolítica

Todos los venenos de adultos (azul), juveniles (rojo) y ambas mezclas degradaron la cadena α del fibrinógeno y la mayoría de los venenos fueron capaces de degradar de manera completa (V32, V35, V10, V18, V25, V39, V45, V7, PC y PA) o parcialmente (V1, V5, V44, V26, V6, V37, V4, V57, V41, V47 y V24) la cadena β (**Figura 19A**). La mayoría de los venenos de juveniles también degradaron parcialmente la cadena γ (V26, V52, V56 y V57)

y solo dos venenos lo hicieron por completo (V32 yV4). Los venenos de adultos no degradaron la cadena  $\gamma$ , a excepción de los venenos V18 y V7. Estos resultados indican que los individuos juveniles presentan una mayor actividad fibrinogenolítica en comparación de los venenos de adultos.

Tanto la mezcla de juveniles como la mezcla de adultos fueron capaces de degradar las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  por completo pero no la  $\gamma$  (**Figura 19 C**). Los venenos inhibidos con batimastat perdieron por completo su actividad fibrinogenolítica.

Al preincubar los venenos con EDTA la degradación de las cadenas disminuyó. Ambas mezclas de venenos recuperaron completamente las tres cadenas, sin embargo, en los venenos V25, V39, V44, V3 y V57 observamos degradación parcial de la cadena  $\alpha$  y  $\beta$  (**Figura 19 B**). Estos resultados confirman que tanto las SVMP's como las SVSP's contribuyen a la actividad fibrinogenolítica.

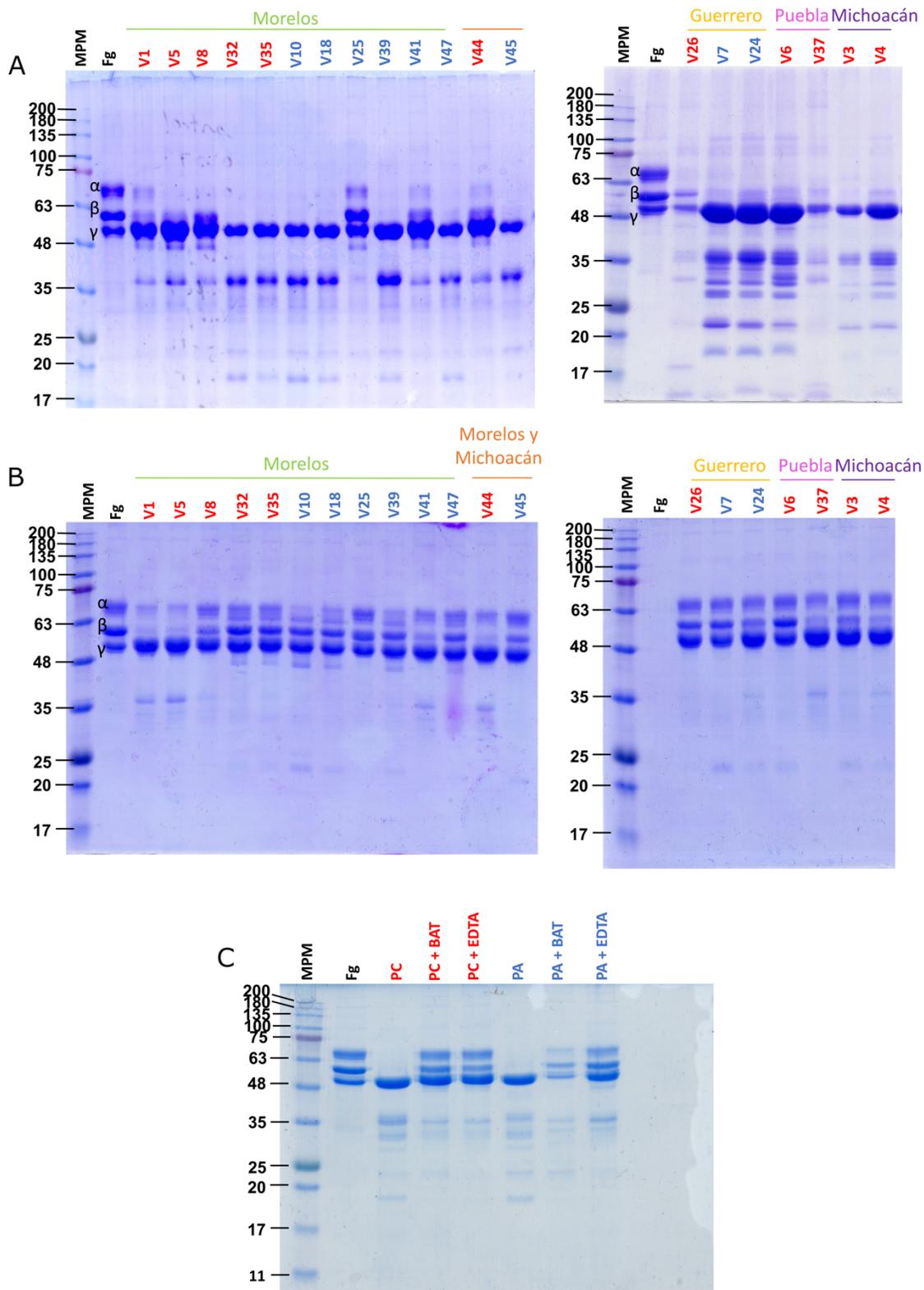


Figura 19. Actividad fibrinolítica de 24 muestras individuales, mezcla de venenos de juveniles y mezcla de venenos de adultos de *C. culminatus*. La actividad fibrinolítica se evaluó en SDS-PAGE al

12,5% en condiciones reductoras. A) Actividad fibrinogenolítica de venenos individuales. Las muestras juveniles están marcadas con rojo, las muestras adultas con azul. B) Actividad fibrinogenolítica de venenos individuales preincubados con el inhibidor EDTA. C) Evaluación de la actividad fibrinogenolítica del veneno incubado con EDTA y Batimastat de las dos mezclas de venenos. MPM; marcador de peso molecular (AccuRuler RGB PLUS prestained protein ladder, MAESTROGEN). Fg; Fibrinógeno, V#; venenos, PC; mezcla de venenos de juveniles de *C. culminatus*), PA; mezcla de venenos de adultos de *C. culminatus*).

## IX. 10 Actividad letal

La letalidad fue expresada como  $DL_{50}$ . Los venenos de *C. culminatus* presentaron un amplio rango que va desde 7  $\mu\text{g}/\text{ratón}$  (I.C. 6 a 7) hasta 323  $\mu\text{g}/\text{ratón}$  (I.C. 289 a 351) (**Tabla 3; Figura 20**). Los venenos de juveniles fueron más letales ( $DL_{50}$ : 7 a 97  $\mu\text{g}/\text{ratón}$ ) que los venenos de adultos ( $DL_{50}$ : 12 a 323  $\mu\text{g}/\text{ratón}$ ). En general para los juveniles los venenos de la región de Morelos fueron los más letales, mientras que para los venenos de adultos lo fueron los de Guerrero y los menos letales los del estado de Morelos. Durante los ensayos se observó que la mayoría de los venenos tanto de juveniles como de adultos ocasionaban una parálisis rígida en las extremidades de los ratones inyectados. Este efecto se relacionó con la actividad de crotamina y fue más consistente en los venenos de juveniles (**Tabla 3; Tabla 4**). Finalmente, se determinó la  $DL_{50}$  de crotamina purificada por cromatografía de exclusión molecular a partir del veneno de crías de *C. culminatus* y se obtuvo un valor de 50.4  $\mu\text{g}/\text{ratón}$ .

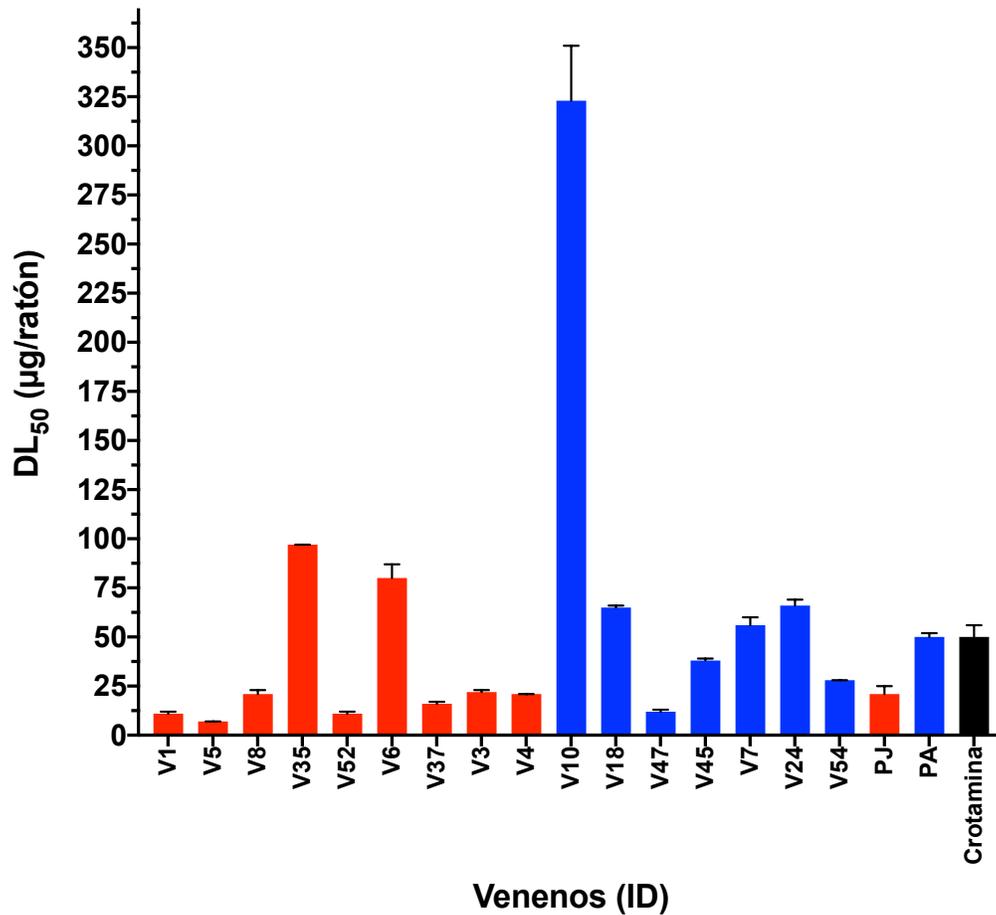


Figura 20. Letalidad (DL<sub>50</sub>) de venenos de *C. culminatus*. Los datos de DL<sub>50</sub> (µg/ratón) Las barras rojas corresponden a las muestras de crías/juveniles y las azules a los adultos

Tabla 3. Actividades bioquímicas y biológicas de crías y adultos de *C. culminatus*

ID	Estado	Letalidad (DL <sub>50</sub> )		Actividad	Actividad Fibrinogenolítica
		(µg/ratón)	(µg/g)	Proteolítica (U/mg)	
<b>JUVENILES</b>					
V1	Morelos	11 (11-12)	0.6 (0.5 - 0.6)	0.5 ± 0	α β*
V5	Morelos	7 (6 - 7)	0.3 (0.3 - 0.4)	0.5 ± 0	α β*
V8	Morelos	21 (19 - 23)	1 (0.9 - 1)	0.6 ± 0.1	α
V32	Morelos	ND		5 ± 0.1	α β γ
V35	Morelos	97 (96-97)	5 (5-6)	4 ± 0	α β

V44	Morelos/Michoacán		ND	0.4 ± 0	α β*
V26	Guerrero		ND	1 ± 0	α β* γ*
V52	Guerrero	11 (10-12)	0.5 (0.5-0.6)	1 ± 0	α β* γ*
V56	Guerrero		ND	0.8 ± 0.1	α β* γ*
V6	Puebla	80 (71 - 87)	4 (4 - 5)	4 ± 0.1	α β*
V37	Puebla	16 (16-17)	0.8 (0.8-0.9)	0.5 ± 0.1	α β*
V3	Michoacán	22 (22-23)	1 (1-2)	5 ± 0.4	α
V4	Michoacán	21 (20-21)	1 (0.9-1)	4 ± 0	α β*
V57	Michoacán		ND	4 ± 0.2	α β* γ*
<b>ADULTOS</b>					
V10	Morelos	323 (289 - 351)	17 (16 - 18)	7 ± 0.3	α β
V18	Morelos	65 (64 - 66)	9 (8 - 9)	6 ± 0.2	α β γ*
V25	Morelos		ND	1 ± 0	α β
V39	Morelos		ND	0.5 ± 0	α β
V41	Morelos		ND	6 ± 0.2	α β*
V47	Morelos	12 (11-13)	0.6 (0.5-0.7)	5 ± 0.1	α β*
V45	Morelos/Michoacán	38 (36-39)	2 (1-2)	5 ± 0.2	α β
V7	Guerrero	56 (51 - 60)	3 (2 - 3)	6 ± 0.3	α β γ*
V24	Guerrero	66 (64 - 69)	3 (3 - 4)	5 ± 0.2	α β*
V54	Guerrero	28 (27-28)	2 (1-2)	2 ± 0	α β*
En ensayos in vivo se observó efecto crotamina (parálisis)					
* Degradación parcial					

**Tabla 4.** Actividades bioquímicas y biológicas de la mezcla de venenos de juveniles y la mezcla de venenos de adultos de *C. culminatus*

ID	Estado	Letalidad (DL <sub>50</sub> )		Actividad Proteolítica	Actividad PLA <sub>2</sub>	Actividad Fibrinogenolítica
		(µg/ratón)	(µg/g)	(U/mg)	(U/mg)	αβγ
PJ	Morelos/Michoacán /Guerrero/Puebla	21 (18-26)	1 (0.9-1)	4 ± 0.1	11 ± 0.5	α β*
PA	Morelos/Michoacán /Guerrero/Puebla	50 (28-52)	3 (1-3)	5 ± 0.2	7 ± 1	α β*
En ensayos in vivo se observó efecto crotamina (parálisis)						
* Degradación parcial						

---

*IX.11 Nivel de reconocimiento de los sueros de conejo inmunizados con veneno de C. culminatus*

Se analizaron los títulos para las mezclas de juveniles (PJ), de adultos (PA) así como de crotamina previamente purificada de *C. molossus nigrescens* y *C. culminatus*. Se evaluaron los sueros de los conejos 40 y 41 los cuales fueron inmunizados con la mezcla de venenos de juveniles y de los conejos 42 y 43 que fueron inmunizados con la mezcla de venenos de adultos. También se evaluaron los títulos de las mezcla de sueros que se obtuvieron en la sangría a blanco (mezcla 40/41 y mezcla 42/43).

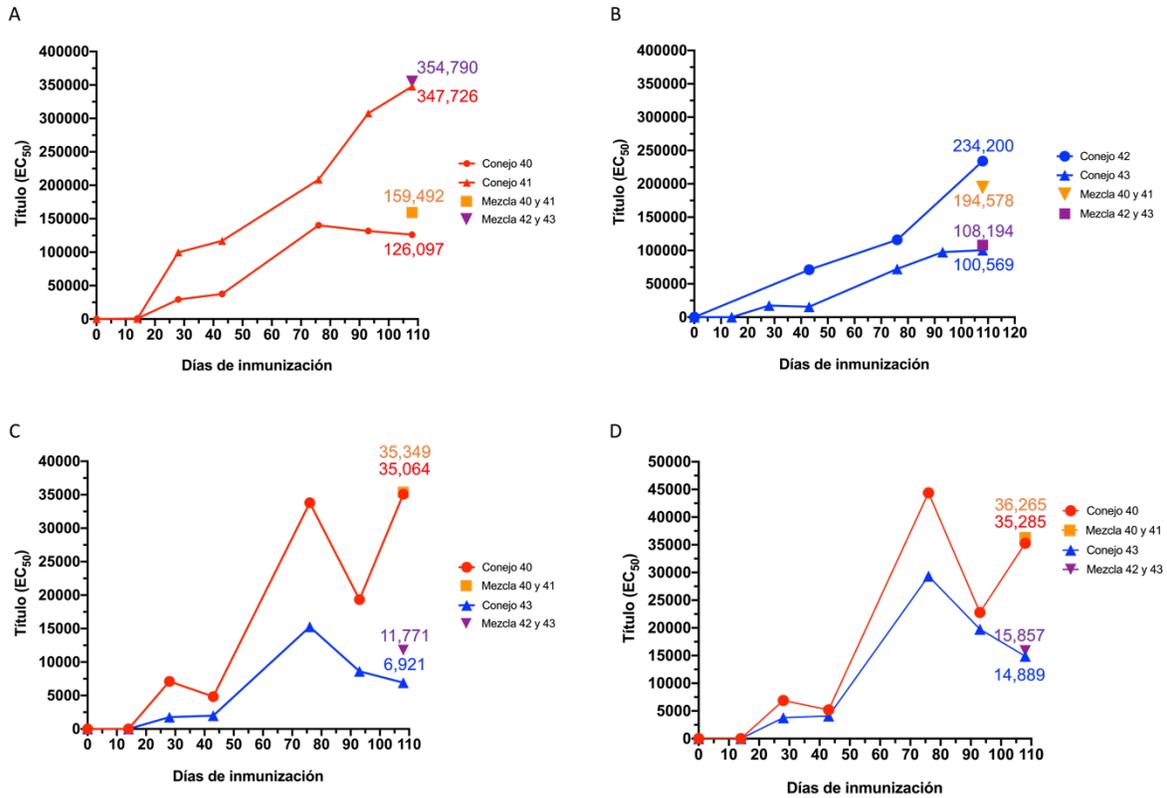
En el ensayo de ELISA contra el veneno completo de juveniles el suero del conejo 40, en el día 28 (segunda sangría), presentó un título de 29,202 y fueron incrementando hasta llegar a 126,097 (día 108, sexta sangría), mientras que del conejo 41 presentó títulos mayores, en donde el día 28 se tuvo un valor de 99,708 y en el día 108 de 347,726. Además la mezcla de sueros de los conejos 40 y 41 mostró un título de 159,492, mientras que para la mezcla de sueros de los conejos 42 y 43 el valor fue de 354,790 (**Figura 21 A**).

Para el conejo 42 no fue posible obtener las sangrías 1, 2 y 5. En el ensayo contra el veneno completo de adultos, el suero del conejo 42 en el día 43 (tercera sangría) llegó a un título de 71,128 y para el día 108 se incrementó a 234,200. Para el conejo 43 en el día 43 tuvimos un título de 15,720 que para el día 108 llegó a 100,569. La mezcla de sueros de los conejos 40 y 41 contra el veneno de adultos mostró un título de 194,578 y para la mezcla de sueros de los conejos 42 y 43 el título fue de 108,194 (**Figura 21 B**).

En el ensayo para el reconocimiento de la crotamina de *C. m. nigrescens* el suero del conejo 40 en el día 76 (quinta sangría y onceava inmunización) mostró un título de 33,789, sin embargo, para el día 108 el título del conejo 40 disminuyó a 35,064, mientras que, para el suero del conejo 43 el título del día 76 fue de 15,267 y el título final (día 108) fue de 6,921. La mezcla de sueros de los conejos 40 y 41 mostró un título de 35,349, mientras que la mezcla de los conejos 42 y 43 fue menor dando un valor de 11,771 (**Figura 21 C**).

Finalmente, el título del suero del conejo 40 contra crotamina de *C. culminatus* en el día 76 fue de 44,388 que para el día 108 finalizó en 35,285. Por otra parte, en el día 76 el suero del conejo 43 contra crotamina de *C. culminatus* mostró un título de 29,345 y para el día 108 el valor del título disminuyó a 14,889. El título de la mezcla de sueros de los conejos 40 y 41 fue de 36,265, mientras que la mezcla de los conejos 42 y 43 fue menor con un valor de 15,857 (**Figura 22 D**).

Para los casos de reconocimiento de crotamina los títulos de la mezcla de los sueros 40 y 41 fue mayor a comparación de la mezcla de sueros de los conejos 42 y 43.



**Figura 21. Medición de títulos contra la mezcla de venenos.** De juveniles *C. culminatus* (A), mezcla de venenos de adultos (B), crotamina de *C. molossus nigrescens* (C) y crotamina de *C. culminatus* (D). Se graficó el número de títulos generados (EC<sub>50</sub>) contra los días en los que se realizó la sangría para obtener los anticuerpos.

### IX.12 Inmunoglobulinas específicas contra el veneno de *C. culminatus*

Después de obtener los sueros de cada conejo se procedió a realizar una mezcla de sueros de conejos hiperinmunizados con veneno de juveniles y una mezcla de sueros de conejos hiperinmunizados con veneno de adultos, su purificación mediante ácido caprílico (véase ANEXO 2) e inmunopurificación. El porcentaje de anticuerpos específicos fue de 31.9 y 10.7 para los anticuerpos de PJ y PA, respectivamente. Lo que nos indica que hay mayor cantidad de anticuerpos hacia el veneno de *C. culminatus* por parte de los Ig producidos por

la hiperinmunización con el veneno de juveniles a comparación del veneno de adultos (Figura 22).

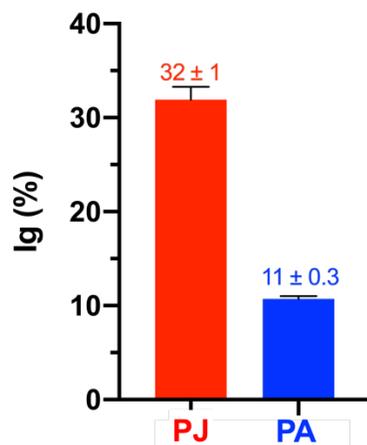


Figura 22. Porcentaje promedio de inmunoglobulinas específicas para el veneno de *C. culminatus*.

### IX.13 Potencia neutralizante de la actividad letal

Los tres lotes de antiveneno Antivipmyn fueron capaces de neutralizar la letalidad de la mezcla de venenos de juveniles (PJ) y la mezcla de venenos de adultos (PA). La hoja de especificaciones de la empresa SILANES que acompaña al vial de Antivipmyn indica que un vial es capaz de neutralizar no menos de 790 DL<sub>50</sub> de *Crotalus sp.* Los resultados mostraron una buena neutralización hacia los venenos de *C. culminatus*. La mezcla de venenos de juveniles fue la que requirió 1.2 veces más que PA con los lotes B-7B-31 y B-8K-35, mientras que el lote B-0A-32 neutralizó mejor el PJ (Tabla 5). De igual manera, para el caso de las inmunoglobulinas de conejos hiperinmunizados, la mezcla de venenos de juveniles (PJ) requirió ~1.8 veces más que la mezcla de venenos de adultos (Tabla 6).

Finalmente, se evaluó la neutralización del efecto crotamina “parálisis rígida” por medio del antiveneno comercial y las inmunoglobulinas de conejos. Tanto los antivenenos como las

inmunoglobulinas de conejos hiperinmunizados con mezcla de venenos de adultos no lograron neutralizar el efecto. Por otra parte, se encontró que 3.7 mg de inmunoglobulinas de conejos hiperinmunizados con veneno de juveniles fueron capaces de neutralizar el efecto crotamina de la mezcla de venenos de juveniles. Además, estos anticuerpos se retaron contra 50 µg de crotamina pura de *C. culminatus* y se necesitaron 1.035 mg de anticuerpos para neutralizar la actividad.

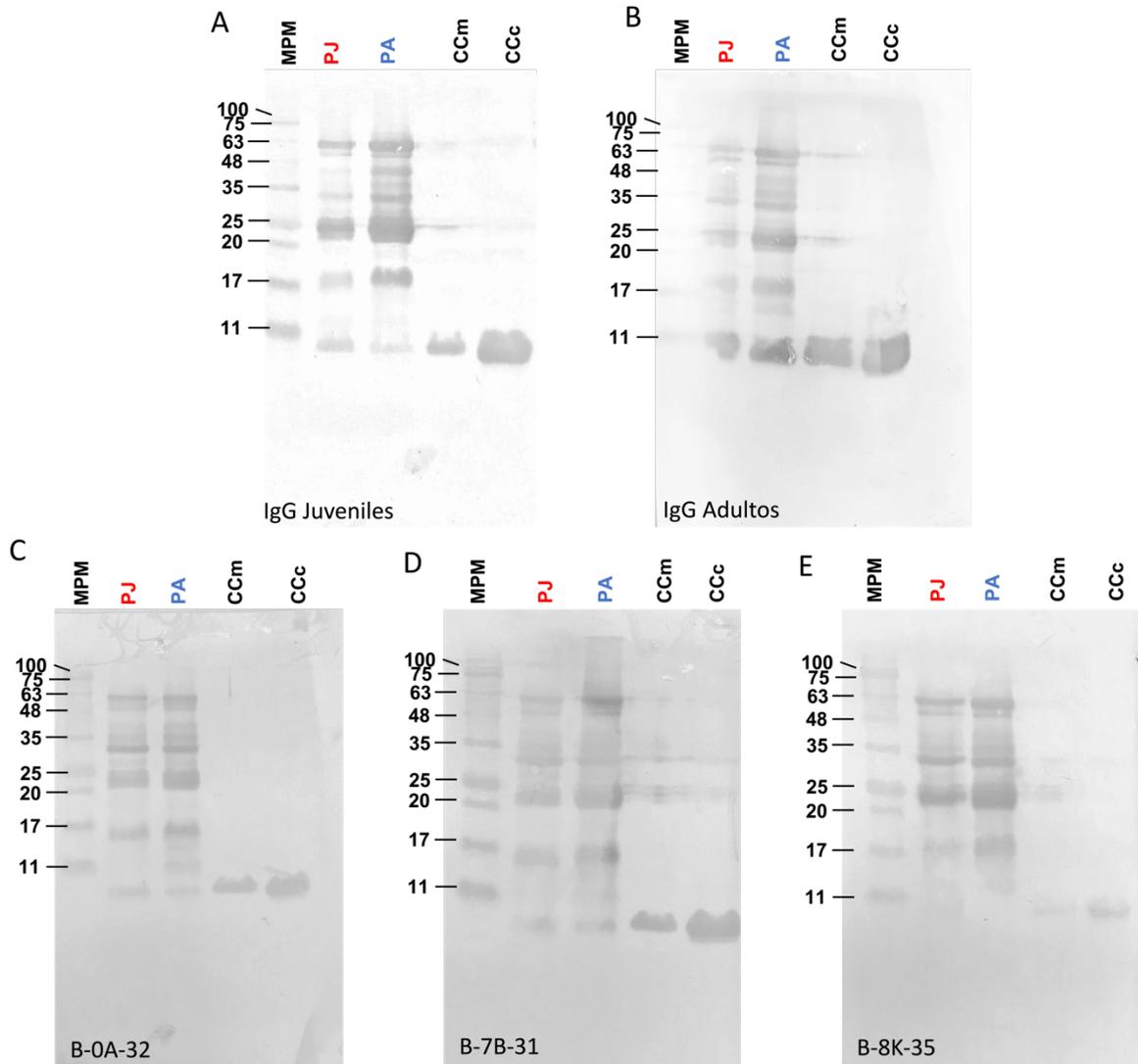
<b>Tabla 5. Dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>) de tres lotes de antiveneno Antivipmyn</b>				
<b>ID</b>	<b>3DL<sub>50</sub></b> <b>(µg)</b>	<b>Lotes de Antiveneno</b>		
		<b>B-0A-32</b> <b>(mgAV/ mgV)</b>	<b>B-7B-31</b> <b>(mgAV/ mgV)</b>	<b>B-8K-35</b> <b>(mgAV/ mgV)</b>
<b>PJ</b>	63.03	5 (4.5 a 5.5)	11.8 (10.7 a 12.5)	7.5 (5.3 a 8.9)
<b>PA</b>	149.7	6.1 (5.9 a 6.1)	9.7 (9.6 a 9.8)	6.1 (5.9 a 6.7)
Los resultados se muestran como mg de antiveneno necesarios para neutralizar 1 mg de veneno (mg AV/mg V).				

<b>Tabla 6. Potencia neutralizante (DE<sub>50</sub>) de inmunoglobulinas de conejo purificadas por afinidad</b>		
<b>Veneno/Ig</b>	<b>Ig de conejo hiperinmunizado con veneno de juveniles</b>	<b>Ig de conejo hiperinmunizado con veneno de adulto</b>
	<b>(mg Ig/ mg V)</b>	
<b>PJ</b>	10.9 (10.4 – 11.5)	12.3 (12.2 – 12.3)
<b>PA</b>	5.9 (5.8 – 5.9)	6.3 (6.1 – 6.6)
Los resultados se muestran como mg de inmunoglobulinas necesarios para neutralizar 1 mg de veneno (mg Ig/mg V).		

#### ***IX.14 Reconocimiento del antiveneno hacia veneno completo y crotamina por Western-Blot***

Las IgGs previamente inmunopurificadas de juveniles y adultos mostraron mejor reconocimiento hacia todas las proteínas observadas en los geles y en ambos casos observamos un mejor reconocimiento hacia crotamina (**Figura 23 A y 23 B**).

Los tres lotes de antiveneno mostraron un buen reconocimiento de las bandas con pesos moleculares altos (75 a 25 kDa), mientras que las proteínas con menores pesos fueron mal reconocidas (<11 kDa). Los lotes B-7B-31 y B-0A-32 mostraron un mejor reconocimiento hacia crotamina (**Figura 21 C y 21 D**) en comparación del lote B-8K-35 donde hubo nulo reconocimiento hacia crotamina de *C. molossus nigrescens* y muy poco hacia la crotamina de *C. culminatus* (**Figura 21 E**).



**Figura 21. Western-Blot de anticuerpos inmunopurificados A) IgG anti-*C. culminatus* de conejos hiperinmunizados con una mezcla de venenos crías, B) IgG anti-*C. culminatus* de conejos hiperinmunizados con venenos de adultos y tres lotes de Antivipmyn C) B-0A—32, D) B-7B-31 y E) B-8K-35. Mezcla de venenos de adultos (PA) Mezcla de venenos de juvenils (PJ), crotamina de *C. molossus nigrescens* (CCm) y crotamina de *C. culminatus* (CCc).**

## X. DISCUSIÓN

Debido a la gran diversidad de serpientes de cascabel en México y la alta variación en la composición del veneno intra e interespecífica encontrada en algunas especies, es de suma

importancia que los antivenenos mexicanos sean efectivos en el tratamiento clínico de cualquier envenenamiento por una víbora de cascabel en todo el territorio mexicano. Sin embargo, el reto es complejo dada la gran diversidad. Así mismo comprender las variaciones de los venenos ayudaría a los médicos a comprender y predecir la fisiopatología (Amazonas et al., 2019).

En primera instancia se evaluó si existían diferencias bioquímicas entre los venenos de individuos juveniles y adultos de *C. culminatus*. La separación en geles de poliacrilamida y el fraccionamiento mediante RP-HPLC de los venenos de individuos juveniles y adultos nos permitió identificar diferencias existentes entre los venenos. En los geles de poliacrilamida se observaron perfiles muy similares entre los ejemplares adultos y juveniles de Morelos, Michoacán, Puebla y Guerrero con variaciones en las abundancias de las bandas.

La banda proteica que por medio de SDS-PAGE permite ser ubicada por debajo de los 11 kDa fue identificada mediante espectrometría de masas y por actividad biológica como crotamina. Este corrimiento anómalo ya ha sido reportado en el veneno de *C. m. nigrescens* y nosotros lo corroboramos para *C. culminatus*. El efecto crotamina también conocido como parálisis rígida, tetánica o espástica se caracteriza por provocar una inmovilización de las extremidades traseras de ratones (Ponce-López et al., 2021). Ponce y colaboradores (2021) hallaron cinco isoformas de crotamina en el veneno de *C. m. nigrescens* (Ponce-López et al., 2021) y Smith y Schmidt (1990) encontraron variantes polimórficas de crotamina en el veneno de *C. d. terrificus*. En este trabajo encontramos por RP-HPLC 10 fracciones con pesos moleculares de 4958.26, 4959.9, 4956.96, 4526.71, 4527.38 para la mezcla de venenos de juveniles y 4958, 4959.14, 4959.45, 4959.24 y 4526.4 para la mezcla de venenos de adultos.

A pesar de que esta toxina fue identificada en ambas mezclas de venenos, en los perfiles electroforéticos y cromatográficos individuales de algunos ejemplares adultos se observó nula o poca abundancia de dicha banda y/o fracción lo que nos indica variaciones ontogénicas e intraespecíficas en el veneno de *C. culminatus*. De manera similar, Borja y colaboradores, hallaron variación ontogénica en la presencia de crotamina para *C. m. nigrescens*, donde el veneno de crías (LT: < 70 cm) contiene crotamina en proporciones importantes, mientras que en los adultos (LT: < 70 cm) se reducen prácticamente a cero pero una mayor abundancia de SVMP's (Borja et al., 2018b). Por otro lado, Durban y colaboradores quienes determinaron los perfiles proteómicos y transcriptómicos de la glándula de veneno de un ejemplar cría y un adulto de *C. culminatus* de la región de Morelos (Durban et al., 2017). El proteoma del individuo cría tuvo un menor porcentaje de SVMP's P-I (24.3%) y P-III (17.3%) en comparación del adulto donde las SVMP's representaban aproximadamente el 46% de la composición total del veneno (P-I 20.2%; P-III 25-7%), pero en la cría el porcentaje de crotamina y PLA<sub>2</sub> era mayor (cría 11.1% y 13.5%; adulto 6.0% y 3.8%, respectivamente) (Durban et al., 2017). La variación ontogénica de crotamina se ha reportado para otras especies de cascabel como: *C. basiliscus*, *C. m. nigrescens*, *C. adamanteus* y *C. tzabcan* (Borja et al., 2018b; Colis-Torres et al., 2022; Margres et al., 2015).

## **X.1 Actividades bioquímicas y biológicas**

### *X.1.1 Actividad proteolítica*

Los resultados mostraron que la actividad está dada por SVMP's y SVSP's debido a que la pre-incubación de los venenos individuales y las mezclas de venenos con el agente quelante (EDTA) inhibió parcialmente la actividad. Los adultos son más proteolíticos con rangos de 0.5 a 7 U/mg, en comparación de los venenos de individuos crías con rangos entre 0.4 a 5

U/mg (ANEXO 3). Por otra parte, los resultados obtenidos a partir de la zimografía sobre gelatina apoyan la variación ontogénica y geográfica en los venenos de *C. culminatus*. Los patrones de degradación ocasionados por los venenos de adultos en los geles son muy variables, a diferencia de los juveniles donde el patrón de degradación es similar entre todos los venenos evaluados. Durban y colaboradores hallaron SVMP's P-I y P-III en los venenos de *C. culminatus* (Durban et al., 2017) y basándonos en la clasificación de Mackessy los venenos con alta actividad proteolítica se clasifican como venenos tipo I, por lo que podemos inferir que la abundancia de SVMP's P-I es mayor en juveniles que en adultos debido a los halos de degradación que se observan en los ensayos de actividad gelatinolítica se ubican entre los 48 y 35 kDa, a diferencia de los adultos donde el patrón de degradación es más heterogéneo y la mayoría de ellos hidrolizaron componentes con masas de alrededor de los 63 kDa por lo que el veneno de adultos podría estar compuesto mayoritariamente por SVMP's P-III, lo cual es contrastante con el proteoma reportado por Durban para un adulto de *C. culminatus* (Durban et al., 2017). La acción de esta clase de proteasas contribuye a una mayor actividad. Dentro de la clase P-I de SVMP existen enzimas que ejercen alta actividad proteolítica en constituyentes de la cascada de la coagulación (Dawson et al., 2021). Los resultados que se obtuvieron referentes a estas dos actividades indican una variación entre ejemplares juveniles y adultos las cuales se correlacionan con los perfiles electroforéticos y cromatográficos en los que se observa abundancia de las bandas y fracciones proteicas que corresponden a SVMP's. Esto se correlaciona con lo reportado por Neri y colaboradores para una mezcla de venenos de *C. s. culminatus* (actualmente *C. culminatus*), donde observaron una alta actividad proteolítica que se relaciona con alto porcentaje de metaloproteinasas P-I y P-III (48.5%) (Castro et al., 2013).

### *X.1.2 Actividad fibrinogenolítica*

El fibrinógeno es una proteína plasmática que interviene en la cascada de coagulación. Está formada por dos moléculas simétricas unidas por dos puentes disulfuro. Cada molécula se compone de tres cadenas,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  con pesos moleculares de 63.4, 56 y 47 kDa, respectivamente. Las fibrinogenasas de los venenos de serpiente suelen degradar las cadenas  $\alpha$  o  $\beta$ . Se sabe que las SVMP's actúan en el sitio de inyección del veneno degradando colágeno y otras proteínas de matriz extracelular, ocasionando daños locales tisulares. Mientras que, las SVSP's son absorbidas y se mantienen en circulación sanguínea contribuyendo a la degradación de fibrinógeno (Neri-Castro et al., 2020b). Se observaron variaciones ontogénicas, todos los adultos degradaron las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , mientras que en los juveniles se observó una mayor variación en donde 2 de los 14 venenos individuales degradaron solo la cadena  $\alpha$ , 12 de los 14 degradaron las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  y 5 de los 14 degradaron las tres cadenas. Ambas mezclas fueron capaces de degradaron la cadena  $\alpha$  y solo de manera parcial la cadena  $\beta$ . Al realizar la inhibición de la actividad con el agente quelante EDTA la actividad se inhibió parcialmente en casi todos los venenos a excepción de la mayoría de los venenos de Morelos (V1, V4, V10, V18, V25, V39, V41 y V44), donde aún se observaba una degradación parcial de las cadenas  $\alpha$  y/o  $\beta$  (**Tabla 3 y 4**). Estos resultados mostraron que todos los venenos analizados tuvieron actividad fibrinogenolítica siendo las SVMP's y SVSP's de los venenos las principales responsables de la actividad.

### *X.1.3 Actividad fosfolipasa*

Para determinar la actividad fosfolipasa (PLA<sub>2</sub>'s) se realizaron dos ensayos: Ensayo titulométrico para evaluar la actividad enzimática de las mezclas de venenos y zimografía

para evaluar la actividad en los venenos individuales. En ambos casos se utilizó una solución de yema de huevo como sustrato. Se encontró variación en los venenos relacionada a la edad. Los venenos de individuos juveniles y la mezcla de venenos de juveniles (PJ) tuvieron mayor actividad enzimática que los venenos de ejemplares adultos y la mezcla de venenos de adultos (PA) (PA  $6.9 \pm 0.8$  U/mg; PJ  $10.7 \pm 0.5$  U/mg). En la zimografía, todos los venenos individuales de crías mostraron halos de degradación entre los 17 y 11 kDa. Por otra parte, solo 2 de los venenos individuales de los adultos (V24 y V39) mostraron bandas de degradación entre los 25 y 17 kDa. A pesar de la variación encontrada, si comparamos nuestros resultados con el control utilizado (*M. browni*) y lo reportado para otras serpientes de cascabel, podemos concluir que los venenos de *C. culminatus* tienen baja actividad fosfolipasa. En individuos de *C. basiliscus* se ha reportado alta actividad fosfolipasa con valores de entre 60-134 U/mg (Colis-Torres et al., 2022). Además, por experiencia dentro del laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano, los venenos con una importante actividad fosfolipasa como los venenos de elápidos que se caracterizan por presentar un elevado contenido de PLA<sub>2</sub>'s (Neri-Castro et al., 2020a) presentan actividades con valores de hasta 600 U/mg en *Micrurus laticollaris*, 290 en *M. diastema* (datos no publicados), 284.6 U/mg para *M. browni* (Bénard-Valle et al., 2020) y 492 U/mg en *M. fulvius* (Vergara et al., 2014). La yema de huevo se compone en un 65% de triaciglicéridos, 28.3% de fosfolípidos, 5.2% de colesterol y ~1% de ésteres de colesterol. Las clases de lípidos encontradas en la yema de huevo suelen ser variables pero se compone principalmente de fosfatidilcolina (~70%), fosfatidiletanolamina (~25%), esfingolípidos (~5%) así como fosfatidilinositol y fosfatidilserina (~1%) (Abousalham y Verger, 2000). La composición variable de la yema de huevo puede explicar la variación en los venenos (Colis-Torres et al., 2022).

#### *X.1.4 Letalidad*

La letalidad ocasionada por los venenos de cascabeles es un efecto producido por la acción en conjunto de uno o varios componentes del veneno (Colis-Torres et al., 2022). Nuestros resultados indican que la letalidad de los venenos de *C. culminatus* fue diferente entre individuos juveniles y adultos, siendo que la  $DL_{50}$  de los juveniles es menor, lo que representa una mayor letalidad. La letalidad de los venenos dentro de *C. culminatus* parece estar relacionada con el alto porcentaje y abundancia de SVMP's y crotamina o, alternativamente de una sinergia entre varias toxinas lo que puede permitir que un veneno alcance una potencia alta con menos toxinas (Laustsen, 2016).

Mackessy realizó una clasificación de los venenos de serpientes en la que considera que los venenos que muestran niveles más altos de actividad de metaloproteasa y menor toxicidad ( $>1 \mu\text{g/g}$  de peso corporal de ratón) se denominarán venenos de tipo I, mientras que aquellos con baja actividad de metaloproteasa y mayor toxicidad ( $<1 \mu\text{g/g}$  de peso corporal de ratón) se denominarán venenos de tipo II. De acuerdo a esta clasificación y a los resultados de los perfiles bioquímicos, de actividades biológicas y la letalidad observada, la mayoría de los venenos de individuos juveniles de *C. culminatus* y la mezcla de juveniles evaluado en este proyecto corresponden a venenos tipo II ya que muestra una menor actividad proteolítica, y una  $DL_{50}$  con un rango entre 0.3 a 4  $\mu\text{g/g}$ . Por otra parte, la mayoría de los venenos de los adultos y la mezcla de venenos de adultos, tienen alta actividad proteolítica y  $DL_{50}$  mayores a 1  $\mu\text{g/g}$  por lo que corresponderían a venenos de tipo I. Algunos venenos de juveniles presentan características intermedias con  $DL_{50} < 1 \mu\text{g/g}$  y alta actividad proteolítica (**Tabla 3**).

Se ha reportado que la abundancia de SVMP's en los venenos de serpientes se relaciona con una mayor actividad proteolítica, sin embargo, en este trabajo se encontró que la importante abundancia de SVMP's para los juveniles de *C. culminatus* no necesariamente se ve reflejada en la actividad proteolítica. Como se había mencionado la letalidad reportada para los venenos juveniles de *C. culminatus* podría estar dada por la abundancia de crotamina o una sinergia entre toxinas. Para ello haría falta un trabajo que separe y evalúe la letalidad de los componentes de manera individual y realizando mezclas de las fracciones con el objetivo de comprobar si existen sinergias entre ellas que potencien la letalidad.

## **X.2 Variación geográfica y ontogénica**

Las variaciones intraespecíficas en los venenos de cascabeles han sido descritas para muchas especies como *C. mictlantecuhtli*, *C. basiliscus*, *C. m. nigrescens*, *C. simus*, *C. tzabcan*, *C. lepidus*, *C. atrox*, *C. viridis*, *C. scutulatus*, *C. s. scutulatus* *C. oreganus* (Borja et al., 2018b, 2018a; Castro et al., 2013; Colis-Torres et al., 2022; Durban et al., 2017; Neri-Castro et al., 2018; Reid and Theakston, 1978; Rivas et al., 2017; Strickland et al., 2018). Anteriormente, se había reportado variación ontogénica en los proteomas y transcriptomas entre dos individuos de *C. culminatus*; sin embargo, en este estudio se empleó un mayor número de muestras y se evaluaron diversas actividades bioquímicas y biológicas encontrando tanto variación ontogénica como geográfica. Los cambios ontogenéticos en la composición de los venenos pueden ocasionar variaciones en las actividades bioquímicas y/o biológicas de los venenos (Schonour et al., 2020). Dichos cambios tienen relevancia biológica, ya que los cambios ontogenéticos en la composición del veneno pueden afectar la capacidad de las serpientes para incapacitar a sus presas (Mackessy, 1988). Se ha propuesto que los cambios ontogénicos de componentes proteicos de los venenos son graduales, sugiriendo que el

cambio de la abundancia de las proteínas de los venenos se da a lo largo de la vida y crecimiento del individuo (Schonour et al., 2020). Una de las teorías que explica los mecanismos moleculares que generan la variación de los venenos indica que la variación está mediada por miRNAs complementarios a RNAs que codifican para ciertas proteínas presentes en el veneno (Durban et al., 2017).

### **X.3 Reconocimiento y neutralización de las mezclas de veneno y crotamina con antiveneno Antivipmyn**

Se ha propuesto que los antivenenos comerciales deben ser capaces de neutralizar los efectos tóxicos ocasionados por las tres principales familias proteicas presentes en los venenos de serpientes de cascabel: SVMP's, SVSP's y PLA<sub>2</sub>'s, Sin embargo, también es importante que sean capaces de neutralizar componentes neurotóxicos como lo es crotamina (Durban et al., 2017). La crotamina es una toxina de bajo peso molecular que se caracteriza por la generación de parálisis rígida de extremidades en animales experimentales. Además, es una molécula cargada positivamente lo que le confiere facilidad de interacción con membranas celulares cargadas negativamente (Ponce-López et al., 2021). La parálisis ocasionada por la crotamina genera una imposibilidad en el desplazamiento del roedor que puede durar minutos y ser reversible si la dosis es baja o si la dosis es muy cercana a la DL<sub>50</sub>. Sin embargo, dicha parálisis puede generar la muerte del ratón (Lima et al., 2018). Todo lo referente a la toxicidad de crotamina y sus actividades biológicas descritas tiene grandes implicaciones clínicas en pacientes mordidos por una víbora de cascabel, por lo tanto, es de suma importancia garantizar que los antivenenos actuales neutralicen a esta toxina (Ponce-López et al., 2021).

Existe evidencia de la neutralización de las principales actividades biológicas de algunos venenos; sin embargo, nuestros resultados en los ensayos de medición de títulos en suero sanguíneo, Western-Blot y ELISA mostraron que a pesar de existir un elevado número de títulos, un alto porcentaje de Ig's específicas hacia los venenos y un buen reconocimiento por parte de los antivenenos e inmunoglobulinas purificadas hacia los venenos completos y la crotamina purificada de *C. culminatus* y *C. m. nigrescens*, la neutralización de la parálisis rígida en ensayos *in vivo* y de la letalidad de los venenos sigue siendo deficiente. Estas observaciones permiten concluir que los venenos son mal neutralizados. Anteriormente había sido comprobado que la crotamina presente en venenos de importancia médica en México, no es neutralizada por ninguno de los antivenenos mexicanos comerciales que actualmente existen (Borja et al., 2018b; Ponce-López et al., 2021). Una explicación a la deficiente neutralización de la parálisis rígida ocasionada por la crotamina tiene que ver con una baja inmunogenicidad de la crotamina debido a algunas características de la toxina como su bajo peso molecular (4.8 kDa) y su rápida internalización en las células evitando su reconocimiento y por ende no hay una buena respuesta de producción de anticuerpos contra la proteína (Kerkis et al., 2014; Losoya, 2019). Por otro lado, al ser una molécula de bajo peso molecular y al ser abundante, el número de moléculas a neutralizar puede ser muy grande por lo que se requieren grandes cantidades de antiveneno.

La producción del antiveneno Antivipmyn utiliza como inmunógenos los venenos de *Bothrops asper* y *Crotalus simus* (De Roodt et al., 2014, 2005) y por experiencia dentro del laboratorio se sabe que se utilizan venenos de *C. culminatus* y *C. tzabcan* debido a la anterior clasificación de estas especies propuesta por Campbell y Lamar en 2004. Sin embargo, nuestros resultados mostraron una mala neutralización del veneno de *C. culminatus*, en

especial de los venenos de crías que contienen un mayor porcentaje de crotamina, esto es contrastado con estudios previos que describen un completo reconocimiento, aunque no la neutralización de componentes del veneno de vipéridos como lo es para el caso de la crotamina (Ponce-López et al., 2021).

Finalmente, debido a los resultados obtenidos en este estudio se recomienda a los productores de antivenenos tomar en consideración la variación intraespecífica en los venenos de las especies de serpientes y en este caso recomendamos utilizar como inmunógenos venenos que contengan altos porcentajes de crotamina, como es el caso de los venenos de individuos juveniles de *C. culminatus*. Basándonos en la composición del veneno de esta especie se recomienda utilizar una mezcla de venenos de crías y adultos de diversos estados para abarcar la mayor distribución geográfica y variación ontogénica existente entre los venenos.

## XI. CONCLUSIONES

- Existe variación ontogénica en los venenos de *C. culminatus*.
- En ensayos con animales experimentales todos los venenos de *C. culminatus* ocasionaron parálisis rígida de las extremidades traseras en diferentes niveles.
- Existe variación geográfica entre los venenos de *C. culminatus*, la variación se encuentra asociada a la abundancia de los componentes proteicos. Dentro de la distribución de la especie encontramos que los venenos de Guerrero y Michoacán fueron los únicos capaces de degradar parcialmente la cadena  $\gamma$  del fibrinógeno y generaron una mayor cantidad de fibrinopéptidos.
- Tanto las SVMP's como las SVSP's presentes en el veneno de *C. culminatus* juegan un papel muy importante en la actividad proteolítica y fibrinogenolítica.

- Los venenos de *C. culminatus* presentan una baja actividad de fosfolipasa.
- Los antivenenos de Antivipmyn reconocieron los venenos de juveniles y adultos de *C. culminatus* pero no fueron capaces de neutralizar la actividad crotamina (parálisis rígida) de los venenos.
- A diferencia de los antivenenos evaluados, los sueros de conejos hiperinmunizados con venenos de juveniles y adultos de *C. culminatus* mostraron un mejor reconocimiento hacia el veneno completo y la crotamina purificada.
- Las inmunoglobulinas de conejos hiperinmunizados con la mezcla de venenos juveniles fue capaz de neutralizar la parálisis rígida ocasionada por la crotamina.
- Debido a la abundancia de la crotamina en los venenos de individuos principalmente crías de *C. culminatus* y a la variación intraespecífica de los venenos, se recomienda incluir el veneno de *C. culminatus* en las mezclas inmunogénicas para la producción de antivenenos.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

- Abousalham, A., Verger, R., 2000. Egg yolk lipoproteins as substrates for lipases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1485, 56–62. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00033-0](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00033-0)
- Alagón, A., 2002. Anticuerpos seguros y eficaces: La revolución de los nuevos antivenenos. *Rev. la Univ. México* 1–4.
- Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M., Calvete, J.J., 2008. Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*. Geographic, individual, and ontogenetic variations. *J. Proteome Res.* 7, 3556–3571. <https://doi.org/10.1021/pr800332p>

- Amazonas, D.R., Freitas-De-Sousa, L.A., Orefice, D.P., de Sousa, L.F., Martinez, M.G., Mourão, R.H.V., Chalkidis, H.M., Camargo, P.B., Moura-Da-Silva, A.M., 2019. Evidence for snake venom plasticity in a long-term study with individual captive *Bothrops atrox*. *Toxins* (Basel). 11, 294. <https://doi.org/10.3390/toxins11050294>
- Arnaud, G., Carbajal, A., Park, S.B., Fumero, S., Pozas-Ocampo, F., 2019. Understanding the rattlesnake venom: components, effects and potential uses. *Áreas Nat. Protegidas Scr.* 5, 39–56. <https://doi.org/10.18242/anpscripta.2019.05.05.02.0003>
- Auerbach, P.S., 2005. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. *Wilderness Environ. Med.* 16, e13–e13. [https://doi.org/10.1580/1080-6032\(2005\)16\[e13a:br\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1580/1080-6032(2005)16[e13a:br]2.0.co;2)
- Bénard-Valle, M., Neri-Castro, E., Yañez-Mendoza, M.F., Lomonte, B., Olvera, A., Zamudio, F., Restano-Cassulini, R., Possani, L.D., Jiménez-Ferrer, E., Alagón, A., 2020. Functional, proteomic and transcriptomic characterization of the venom from *Micrurus browni browni*: Identification of the first lethal multimeric neurotoxin in coral snake venom. *J. Proteomics* 225, 103863. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103863>
- 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., 2018a. Biological and proteolytic variation in the venom of *Crotalus scutulatus scutulatus* from Mexico. *Toxins* (Basel). 10. <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., 2018b. Ontogenetic change in the venom of mexican blacktailed rattlesnakes (*Crotalus molossus nigrescens*). *Toxins (Basel)*. 10. <https://doi.org/10.3390/toxins10120501>
- Boyer, L., Alagón, A., Fry, BG, Jackson, T., Sunagar, K., Chippaux, J., 2015. Signs, symptoms and treatment of envenomation: Evolution, Pathophysiology and Biodiscover, in: Fry, B (Ed.), *Venomous Reptiles and Their Toxins: Evolution, Pathophysiology and Biodiscovery*. Oxford University Press, New York, pp. 32–60.
  - Calvete, J.J., Sanz, L., Cid, P., De La Torre, P., Flores-Díaz, M., Dos Santos, M.C., Borges, A., Bremó, A., Angulo, Y., Lomonte, B., Alape-Girón, A., Gutiérrez, J.M., 2010. Snake venomics of the Central American Rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive pedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. *J. Proteome Res.* 9, 528–544. <https://doi.org/10.1021/pr9008749>
  - Calvete, J.J., Sanz, L., Pla, D., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., 2014. Omics meets biology: Application to the design and preclinical assessment of antivenoms. *Toxins (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/toxins6123388>
  - Campbell, J., Lamar, W., 2004. *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. CORNELL UNIVERSITY P.
  - 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*. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4729.4.1>
  - Casewell, N.R., Wagstaff, S.C., Wušter, W., Cook, D.A.N., Bolton, F.M.S., King,

- S.I., Pla, D., Sanz, L., Calvete, J.J., Harrison, R.A., 2014. Medically important differences in snake venom composition are dictated by distinct postgenomic mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 9205–9210. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405484111>
- 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. *J. Proteomics* 87, 103–121. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.024>
  - 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>
  - Dagda, R.K., Gasanov, S., De La Oiii, Y., Rael, E.D., Lieb, C.S., 2013. Genetic basis for variation of metalloproteinase-associated biochemical activity in venom of the mojave rattlesnake (*crotalus scutulatus scutulatus*). *Biochem. Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2013/251474>
  - Daltry, J.C., Wüster, W., Thorpe, R.S., 1996. Diet and snake venom evolution. *Nature* 379, 537–542. <https://doi.org/10.1038/379537a0>
  - Dawson, C.A., Ainsworth, S., Albuлесcu, L.-O., Casewell, N.R., 2021. Snake Venom Metalloproteinases, in: Mackessy, S. (Ed.), *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. Boca Raton, Florida, USA, pp. 363–374. <https://doi.org/10.1201/9780429054204>

- 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. *Clin. Toxicol.* 52, 594–603. <https://doi.org/10.3109/15563650.2014.925561>
- De Roodt, A.R., Estévez-Ramírez, J., Paniagua-Solís, J.F., Litwin, S., Carvajal-Saucedo, A., Dolab, J.A., Robles-Ortiz, L.E., Alagón, A., 2005. Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México. *Gac. Med. Mex.* 141, 13–21.
- Dennis, E.A., Cao, J., Hsu, Y.H., Magrioti, V., Kokotos, G., 2011. Phospholipase A2 enzymes: Physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem. Rev.* <https://doi.org/10.1021/cr200085w>
- Durban, J., Sanz, L., Trevisan-Silva, D., Neri-Castro, E., Alagón, A., Calvete, J.J., 2017. Integrated Venomics and Venom Gland Transcriptome Analysis of Juvenile and Adult Mexican Rattlesnakes *Crotalus simus*, *C. tzabcan*, and *C. culminatus* Revealed miRNA-modulated Ontogenetic Shifts. *J. Proteome Res.* 16, 3370–3390. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00414>
- Fiero, M.K., Seifert, M.W., Weaver, T.J., Bonilla, C.A., 1972. Comparative study of juvenile and adult prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venoms. *Toxicon* 10, 81-113. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(72\)90095-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(72)90095-5)
- Flores-Villela, O., García-Vázquez, U.O., 2014. Biodiversity of reptiles in Mexico. *Rev. Mex. Biodivers.* 85, S467–S475. <https://doi.org/10.7550/rmb.43236>
- Fry, B.G., Winkel, K.D., Wickramaratna, J.C., Hodgson, W.C., Wüster, W., 2003. Effectiveness of snake antivenom: Species and regional venom variation and its clinical impact. *J. Toxicol. - Toxin Rev.* <https://doi.org/10.1081/TXR-120019018>

- Furtado, M.F.D., Travaglia-Cardoso, S.R., Rocha, M.M.T., 2006. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca*(Serpentes: Viperidae). *Toxicon* 48, 401–410. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.06.005>
- García, L.T., Parreiras E Silva, L.T., Ramos, O.H.P., Carmona, A.K., Bersanetti, P.A., Selistre-De-Araujo, H.S., 2004. The effect of post-translational modifications on the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 138, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.04.004>
- Gâz Florea, Ş.A., Gâz Florea, A., Kelemen, H., Muntean, D.-L., 2016. Snake Venom Metalloproteinases. *Acta Medica Marisiensis* 62, 106–111. <https://doi.org/10.1515/amma-2015-0114>
- Gil-Alarcón, G., Sánchez-Villegas, M. del C., Reynoso, V.H., 2011. Tratamiento prehospitalario del accidente ofídico: revisión, actualización y problemática actual. *Gac. Med. Mex.* 147, 195–208.
- Glenn, J.L., Straight, R., 1978. Mojave rattlesnake *Crotalus scutulatus scutulatus* venom: variation in toxicity with geographical origin. *Toxicon* 16, 81–84. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(78\)90065-X](https://doi.org/10.1016/0041-0101(78)90065-X)
- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., 2000. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie.* [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)01163-9](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01163-9)
- Heimes, P., 2016. Snakes of Mexico.
- Kang, T.S., Georgieva, D., Genov, N., Murakami, M.T., Sinha, M., Kumar, R.P., Kaur, P., Kumar, S., Dey, S., Sharma, S., Vrielink, A., Betzel, C., Takeda, S., Arni, R.K., Singh, T.P., Kini, R.M., 2011. Enzymatic toxins from snake venom: Structural

characterization and mechanism of catalysis. FEBS J. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08115.x>

- Kerkis, I., Hayashi, M.A.F., Prieto Da Silva, A.R.B., Pereira, A., De Sá Júnior, P.L., Zaharenko, A.J., Rádis-Baptista, G., Kerkis, A., Yamane, T., 2014. State of the art in the studies on crotamine, a cell penetrating peptide from South American rattlesnake. Biomed Res. Int. <https://doi.org/10.1155/2014/675985>
- Laustsen, A.H., 2016. Toxin synergism in snake venoms. Toxin Rev. <https://doi.org/10.1080/15569543.2016.1220397>
- Lima, S. de C., Porta, L. de C., Lima, Á. da C., Campeiro, J.D., Meurer, Y., Teixeira, N.B., Duarte, T., Oliveira, E.B., Picolo, G., Godinho, R.O., Silva, R.H., Hayashi, M.A.F., 2018. Pharmacological characterization of crotamine effects on mice hind limb paralysis employing both ex vivo and in vivo assays: Insights into the involvement of voltage-gated ion channels in the crotamine action on skeletal muscles. PLoS Negl. Trop. Dis. 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006700>
- Losoya, F.L., 2019. Obtención de anticuerpos monoclonales anticrotamina del veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mackessy, S.P., 2021. Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles, 2nd Editio. ed, Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles. Boca Raton, Florida, USA. <https://doi.org/10.1201/9780429054204>
- Mackessy, S.P., 2010. Evolutionary trends in venom composition in the Western Rattlesnakes (*Crotalus viridis* sensu lato): Toxicity vs. tenderizers. Toxicon 55, 1463–1474. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.02.028>
- Mackessy, S.P., 2008. Venom composition in rattlesnakes. Biol. Ratt. 495–510.
- Mackessy, S.P., 1988. Venom Ontogeny in the Pacific Rattlesnakes *Crotalus viridis*

- helleri and C. v. oreganus. *Copeia* 1988, 92. <https://doi.org/10.2307/1445927>
- Mackessy, S.P., Leroy, J., Mociño-Deloya, E., Setser, K., Bryson, R.W., Saviola, A.J., 2018. Venom ontogeny in the mexican lance-headed rattlesnake (*Crotalus polystictus*). *Toxins (Basel)*. 10. <https://doi.org/10.3390/toxins10070271>
  - Mackessy, S.P., Williams, K., Ashton, K.G., 2003. Ontogenetic Variation in Venom Composition and Diet of *Crotalus oreganus concolor*. A Case of Venom Paedomorphosis? *Copeia* 769–782. <https://doi.org/10.1643/HA03-037.1>
  - Margres, M.J., Wray, K.P., Seavy, M., McGivern, J.J., Sanader, D., Rokyta, D.R., 2015. Phenotypic integration in the feeding system of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *Mol. Ecol.* 24, 3405–3420. <https://doi.org/10.1111/mec.13240>
  - Martínez-Romero, G., Rucavado, A., Lazcano, D., Gutiérrez, J.M., Borja, M., Lomonte, B., Garza-García, Y., Zugasti-Cruz, A., 2013. Comparison of venom composition and biological activities of the subspecies *Crotalus lepidus lepidus*, *Crotalus lepidus klauberi* and *Crotalus lepidus morulus* from Mexico. *Toxicon* 71, 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.05.006>
  - 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, 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.11.007>
  - Neri-Castro, Edgar, Ponce-López, R., 2018. Ontogenic variation in the venom of *Crotalus simus* in México. *Árido Cienc.* 3, 42–47.
  - Neri-Castro, E., Bénard-Valle, M., Gil, G., Borja, M., León, J.L. de, Alagón, A., 2020a. Serpientes venenosas en México: Una revisión al estudio de los venenos, los

antivenenos y la epidemiología. *Rev. Latinoam. Herpetol.* 3, 5–22.

- Neri-Castro, E., Bénard-Valle, M., Gil, G., Borja, M., López De León, J., Alagón, A., Ponce-López, R., 2018. Variación ontogénica en el veneno de *Crotalus simus* en México. *Árido-Ciencia* 3, 42–47.
- Neri-Castro, E., Bénard-Valle, M., Paniagua, D., Boyer, L. V., Possani, L.D., López-Casillas, F., Olvera, A., Romero, C., Zamudio, F., Alagón, A., 2020b. Neotropical rattlesnake (*Crotalus simus*) venom pharmacokinetics in lymph and blood using an ovine model. *Toxins (Basel)*. 12, 455. <https://doi.org/10.3390/toxins12070455>
- Orduna, T., Lloveras, S., Roodt, A., García, S., Haas, A., Moreno, I., 2007. Guía de prevención, diagnóstico, tratamiento y vigilancia epidemiológica de los envenenamientos ofídicos. Ministerio de Salud de la Nación. Programa Nacional de Prevención y Control de las Intoxicaciones, Buenos Aires, Argentina.
- Ponce-López, R., Neri-Castro, E., Olvera-Rodríguez, F., Sánchez, E.E., Alagón, A., Olvera-Rodríguez, A., 2021. Neutralization of crotamine by polyclonal antibodies generated against two whole rattlesnake venoms and a novel recombinant fusion protein. *Toxicon* 197, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.04.005>
- Quintana-Castillo, J.C., Ávila-Gómez, I.C., Ceballos-Ruiz, J.F., Vargas-Muñoz, L.J., Estrada-Gómez, S., 2017. Efecto citotóxico de fosfolipasas A2 del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* de Colombia. *Rev. Investig. en Salud Univ. Boyacá* 4, 16–37. <https://doi.org/10.24267/23897325.194>
- Reid, H.A., Theakston, R.D.G., 1978. Changes in coagulation effects by venoms of *Crotalus atrox* as snakes age. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27, 1053–1057. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1978.27.1053>
- Reyes-Velasco, J., Cox, C.L., Jones, J.M., Borja, M., Campbell, J., 2022. How many

species of rattlesnakes are there in the *Crotalus durissus* species group (Serpentes: Crotalidae)? Rev. Latinoam. Herpetol. 05, 43–55.

<https://doi.org/https://doi.org/10.22201/fc.25942158e.2022.1.330> HOW

- 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>
- Saravia, P., Rojas, E., Arce, V., Guevara, C., López, J.C., Chaves, E., Velásquez, R., Rojas, G., Gutiérrez, J.M., 2002. Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: Pathophysiological and therapeutic implications. *Rev. Biol. Trop.* 50, 337–346.
- Schonour, R.B., Huff, E.M., Holding, M.L., Claunch, N.M., Ellsworth, S.A., Hogan, M.P., Wray, K., McGivern, J., Margres, M.J., Colston, T.J., Rokyta, D.R., 2020. Gradual and discrete ontogenetic shifts in rattlesnake venom composition and assessment of hormonal and ecological correlates. *Toxins (Basel)*. 12, 659. <https://doi.org/10.3390/toxins12100659>
- Serrano, S.M.T., Maroun, R.C., 2005. Snake venom serine proteinases: Sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon* 45, 1115–1132. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.020>
- Sotelo-Cruz, N., 2003. Envenenamiento por mordedura de serpiente de cascabel, daños a la salud y su tratamiento en edad pediátrica. *Gac. Med. Mex.* 139, 317–324.
- Strickland, J.L., Mason, A.J., Rokyta, D.R., Parkinson, C.L., 2018. Phenotypic variation in Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus*) venom is driven by four toxin

families. *Toxins* (Basel). 10. <https://doi.org/10.3390/toxins10040135>

- Sunagar, K., Morgenstern, D., Reitzel, A.M., Moran, Y., 2016. Ecological venomomics: How genomics, transcriptomics and proteomics can shed new light on the ecology and evolution of venom. *J. Proteomics* 135, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.09.015>
- Sunagar, K., Undheim, E.A.B., Scheib, H., Gren, E.C.K., Cochran, C., Person, C.E., Koludarov, I., Kelln, W., Hayes, W.K., King, G.F., Antunes, A., Fry, B.G., 2014. Intraspecific venom variation in the medically significant Southern Pacific Rattlesnake (*Crotalus oreganus helleri*): Biodiscovery, clinical and evolutionary implications. *J. Proteomics* 99, 68–83. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.01.013>
- Teixeira-Araújo, R., Castanheira, P., Brazil-Más, L., Pontes, F., Leitão de Araújo, M., Machado Alves, M.L., Zingali, R.B., Correa-Netto, C., 2017. Antivenomics as a tool to improve the neutralizing capacity of the crotalic antivenom: A study with crotamine. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 23. <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0118-7>
- Vergara, I., Pedraza-Escalona, M., Paniagua, D., Restano-Cassulini, R., Zamudio, F., Batista, C.V.F., Possani, L.D., Alagón, A., 2014. Eastern coral snake *Micrurus fulvius* venom toxicity in mice is mainly determined by neurotoxic phospholipases A2. *J. Proteomics* 105, 295–306. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.027>
- Villalobos, M.M., 2006. Serina proteasas de *Lachesis stenophrys* y *Bothrops asper*: producción de anticuerpos mediante inmunización con ADN y subclonaje.
- Willemse, G.T., 1978. Individual variation in snake venom. *Comp. Biochem. Physiol.* -- Part B *Biochem.* 61, 553–557. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(78\)90049-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(78)90049-4)
- Wu, C.H., Huang, H., Yeh, L.S.L., Barker, W.C., 2003. Protein family classification

and functional annotation. *Comput. Biol. Chem.* 27, 37–47.

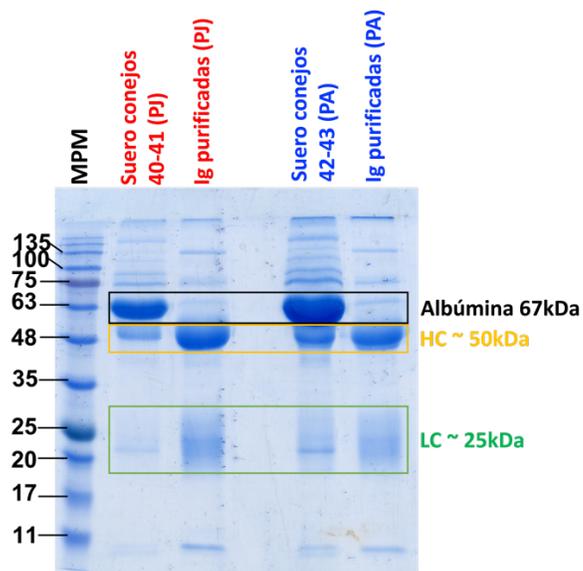
[https://doi.org/10.1016/S1476-9271\(02\)00098-1](https://doi.org/10.1016/S1476-9271(02)00098-1)

- 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*). *Mol. Ecol.* 14, 1095–1108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02471.x>
- Yarlequé, M., Ortiz, C., Morante, Y., Yarlequé, A., 2012. ESTUDIO COMPARATIVO DE ALGUNAS PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE VENENOS DE SERPIENTES DE DIFERENTES REGIONES DEL MUNDO. *Rev. la Soc. Química del Perú* 78, 27–36.
- Uetz, P. Freed, P. y Hošek, J. 2018. The reptile data base, <http://www.reptile-database.org/> (consultado el 03 de diciembre de 2019).
- Uetz, P. Freed, P. y Hošek, J. 2019. The reptile data base, <http://www.reptile-database.org/> (consultado el 25 de febrero de 2020).

<b>ANEXO 1. Datos de procedencia</b>					
<b>ID</b>	<b>Estado</b>	<b>Estadio de vida</b>	<b>ID</b>	<b>Estado</b>	<b>Estadio de vida</b>
V1	Morelos	Juvenil	V31	Morelos	Juvenil
V2	Morelos	Juvenil	V32	Morelos	Juvenil
V3	Michoacán	Juvenil	V33	Morelos	Adulto
V4	Michoacán	Juvenil	V34	Morelos	Adulto
V5	Morelos	Juvenil	V35	Morelos	Juvenil
V6	Puebla	Juvenil	V36	Morelos	Juvenil
V7	Guerrero	Adulto	V37	Puebla	Juvenil
V8	Morelos	Juvenil	V38	Morelos	Juvenil
V9	Morelos	Juvenil	V39	Morelos	Adulto
V10	Morelos	Adulto	V40	Morelos	Adulto

V11	Morelos	Juvenil
V12	Michoacán	Juvenil
V13	Morelos	Adulto
V14	Morelos	Cría
V15	Morelos	Adulto
V16	Morelos	Juvenil
V17	Morelos	Adulto
V18	Morelos	Adulto
V19	Morelos	Adulto
V20	Morelos	Adulto
V21	Morelos	Adulto
V22	Morelos	Adulto
V23	Morelos	Adulto
V24	Guerrero	Adulto
V25	Morelos	Adulto
V26	Guerrero	Juvenil
V27	Morelos	Adulto
V28	Morelos	Adulto
V29	Morelos	Juvenil
V30	Morelos	Juvenil

V41	Morelos	Adulto
V42	Morelos	Juvenil
V43	Michoacán	Juvenil
V44	Morelos y Michoacán	Cría
V45	Morelos y Michoacán	Adulto
V46	Morelos	Juvenil
V47	Morelos	Adulto
V48	Morelos	Juvenil
V49	Morelos	Adulto
V50	Guerrero	Adulto
V51	Guerrero	Adulto
V52	Guerrero	Juvenil
V53	Guerrero	Juvenil
V54	Guerrero	Adulto
V55	Guerrero	Juvenil
V56	Guerrero	Juvenil
V57	Michoacán	Juvenil



**ANEXO 2. Purificación de anticuerpos a partir de suero de conejos hiperinmunizados con veneno de *C. culminatus*.** La purificación de las mezclas de suero de conejos hiperinmunizados con venenos de *C. culminatus* crías y adultos se corroboró mediante SDS- PAGE 15%. La banda negra encierra las bandas proteicas correspondientes a albúmina, la banda amarilla corresponde a las bandas de las cadenas pesadas (HC) y la banda amarilla corresponde a las bandas de las cadenas ligeras de los anticuerpos (LC). MPM (Marcador de peso molecular, AccuRuler RGB PLUS prestained protein ladder, MAESTROGEN); Suero conejos 40-41 (PJ); Ig purificadas (PJ); Suero conejos 40-41 (PJ); Ig purificadas (PA).