



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización biológica, bioquímica e inmunoquímica del veneno de *Micrurus laticollaris*: bases para el desarrollo de un antiveneno de amplio espectro contra coralillos

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

ALEJANDRO CARBAJAL SAUCEDO

TUTOR PRINCIPAL: Dr. Alejandro Alagón Cano
Instituto de Biotecnología, UNAM

COMITÉ TUTOR

Dr. Baltazar Becerril Luján
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Carlos Rosales Ledezma
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

MÉXICO, D. F. Enero, 2014



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.

Resumen

El envenenamiento por *Micrurus sp.* puede resultar en serio riesgo de muerte para el accidentado aún mas cuando el antiveneno comercial es solo parcialmente efectivo contra algunas especies. En este trabajo el veneno de *Micrurus laticollaris*, ha sido estudiado y caracterizado. Al ser administrado via endovenosa en ratones, provoca parálisis flácida, acompañada de sangrado nasal y bucal, que lleva a la muerte en menos de 20 minutos. Provoca además severos daños en corazón, pulmón, hígado y riñón. En preparación neuromuscular provoca un aumento de la respuesta indirecta que disminuye hasta convertirse en bloqueo. Estos fenómenos se relacionan a la presencia y actividad de fosfolipasas A2 (más del 30% del total del veneno) y alfa neurotoxinas (entre 2 y 5% del total). De las primeras, se caracterizaron cuatro proteínas altamente tóxicas (DL50 entre 0.33 y 0.36 $\mu\text{g/g}$), dos de las cuales reproducen el comportamiento del veneno completo sobre preparación neuromuscular, mientras que las cuatro provocan alteraciones sobre distintos órganos. Se caracterizó además un alfa neurotoxina (MlatA1) capaz de bloquear el receptor nicotínico de acetilcolina. El gen de MlatA1 fue clonado y expresado en bacteria. Sin embargo, la toxina recombinante no mostró actividad tóxica. Por último, se obtuvieron sueros hiperinmunes contra veneno completo (en caballo) y MlatA1 (en conejo). El suero de caballo mostró una potencia neutralizante de 0.552 mg de veneno/ml suero y neutralizó las cuatro fosfolipasa tóxicas (con potencias de 1.23 a 1.79 mg toxina/ml) así como el veneno de distintas especies de coralillos (con potencias de (0.19 a 2.5 mg de Veneno/ml), pero fue incapaz de neutralizar la toxina MlatA1. El suero de conejo anti-MlatA1 no mostró capacidad neutralizante contra la toxina, sin embargo, mostró reactividad diferencial contra varias especies de coralillos lo que sugiere la existencia de dos grupos antigénicos de alfa neurotoxinas en estos venenos.

ABSTRACT

Envenoming by coral snake bite could result in serious risk of death, especially when commercial antivenom is only partially effective against some species. In this work, *Micrurus laticollaris* venom has been studied and characterized. This venom cause flaccid paralysis, accompanied by oral and nasal hemorrhage, that leads to death in less than 20 minutes when administered intravenously in mice. Serious damage in heart, lungs, liver, and kidney were also caused. Increase in indirect response, that turns into blockage, was caused on isolated neuromuscular preparation. All these phenomena are related to presence and activity of phospholipases A2 (more than 30% of whole venom proteins) and alpha neurotoxins proteins (between 2 and 5% of whole venom proteins). Four highly toxic phospholipases A2 (LD50 between 0.33 and 0.36 $\mu\text{g/g}$) were characterized; two of them reproduce behavior of whole venom on isolated neuromuscular preparation, while all four causes tissue damage in different organs. A new alpha neurotoxin protein (MlatA1), able to block nicotinic acetylcholine receptor, was characterized. MlatA1 gene was subcloned and expressed in bacteria. Recombinant proteins was deprived of toxic activity. By last, hiperimmune horse (anti-crude venom) and rabbit (anti-MlatA1) sera were obtained. Horse anti-crude venom show neutralizing potency of 0.552 mg of venom/ml serum and neutralize all toxic phospholipases A2 proteins (potencies ranging from 1.23 to 1.79 mg of toxin/ml serum) as well as venoms of wide variety of coral snake species (ranging from 0.19 to 2.5 mg of venom/ml serum); nevertheless, it was unable to neutralize MlatA1 toxin. Rabbit serum against MlatA1 did not neutralize native toxin, however it show differential reactivity against various coral snake venoms, suggesting the existence of two antigenic groups for alpha neurotoxins proteins in these venoms.

Índice general

1		Introducción	6
	1.1	Epidemiología del accidente ofídico	6
	1.2	Diversidad de reptiles venenosos	8
	1.3	Serpientes de coral	11
	1.4	Aparato de inoculación de veneno	12
	1.5	Modo de acción de veneno de coral	15
	1.6	Bioquímica de venenos de serpientes de coral	20
	1.7	Antivenenos contra serpientes de coral	24
2		Hipótesis	32
3		Objetivos	32
4		Materiales y Métodos	33
	4.1	Serpientes	33
	4.2	Venenos	33
	4.3	Geles	33
	4.4	Histología	33
	4.5	Acción sobre unión neuromuscular	34
	4.6	Potencial de reposo	34
	4.7	Potencial de placa terminal	34
	4.8	Cromatografía de intercambio iónico	35
	4.9	Cromatografía de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)	35
	4.10	Actividad fosfolipasa	35
	4.11	Actividad proteasa sobre gelatina	35
	4.12	Actividad defibrinogenante	36
	4.13	Actividad hemorrágica	36
	4.14	Letalidades	36
	4.15	Proteólisis y secuenciación	36
	4.16	Análisis proteómico	37
	4.17	Determinación de masas por ESI	37
	4.18	Antivenenos	37
	4.19	Neutralización	38
	4.20	Expresión, clonación y purificación de rMlatA1	38
5		Resultados	39
	5.1	Primera parte: Características biológicas del veneno de <i>Micrurus laticollaris</i>	39
		5.1.1 Actividades bioquímicas	39
		5.1.2 Letalidades y actividades biológicas	40
		5.1.3 Actividad sobre unión neuromuscular	41
	5.2	Segunda parte: Separación y caracterización de los componentes del veneno	45
		5.2.1 Separación, caracterización y potencia de fracciones	45
		5.2.2 Clonación y purificación de la toxina recombinante	55
		5.2.3 Caracterización de subfracciones obtenidas por RP-HPLC	62
	5.3	Tercera parte: Reconocimiento y neutralización específica	67
	5.4	Cuarta parte; Reconocimiento y neutralización heteróloga	73
6		Discusión	76
7		Conclusiones	81
8		Literatura citada	82

Índice de Cuadros

1	Casuísticas de mordedura por serpiente entre 2005 y 2012	7
2	Cantidades de veneno obtenidas por ordeña de corales	20
3	Resumen histórico de potencias neutralizantes de antivenenos contra coralillos	26
4		
5	Características generales de fracciones obtenidas por intercambio catiónico	45
6	Análisis proteómico de fracciones obtenidas por intercambio catiónico	50
7	Características generales de fracciones obtenidas por RP-HPLC	51
8	Características generales de proteínas tóxicas	62
9	Evolución de títulos de suero de caballo anti-Veneno completo	67
10	Evolución de títulos de suero de conejo anti-MlatA1	68
11	Evolución de potencia neutralizante de suero de caballo anti-Veneno completo	69
12	Comparación de potencia neutralizante entres suero de caballo anti- <i>Micrurus laticollaris</i> y Coralmyn	71
13	Definición de grupos antigénicos	74

Índice de figuras

1	Distribución aproximada de especies de coralillos en México	13
2	Alteraciones tisulares causadas por veneno completo	42
3	Efecto de veneno sobre preparación neuromuscular	44
4	Separación de veneno por cromatografía de intercambio catiónico	46
5	Separación de fracciones por cromatografía de alta resolución en fase reversa	48
6	Comparación de secuencia de MlatA1 contra diferentes toxinas de elápidos	52
7	Actividad de la toxina MlatA1 sobre receptor nicotínico de acetilcolina	54
8	Alineamiento de secuencias de toxinas de tres dedos de elápidos y secuencia del iniciador antxPS	56
9	Traducción de secuencias génicas de las MlatA1 y MlatA2	58
10	Producción de proteína recombinante en BL21	60
11	Modificaciones morfológicas en varios órganos provocadas por toxinas fosfolipásicas	63
12	Actividad de varias toxinas fosfolipásicas sobre preparación neuromuscular	66
13	Esquema de inmunización y evolución de títulos de suero de caballo	70
14	Reconocimiento de fracciones por suero de caballo y Coralmyn	72
15	Reconocimiento heterólogo por suero de conejo anti-MlatA1	75

1. Introducción.

1.1 Epidemiología del accidente ofídico

El registro de casos de accidentes y envenenamientos por animales ponzoñosos es actualizado semanalmente por el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE) que reporta los nuevos casos a nivel nacional dentro del Boletín de Epidemiología de la Secretaría de Salud.

Con base en los datos reportados por el CENAVECE, entre 2005 y 2012 (CENAVECE, 2006; CENAVECE, 2007; CENAVECE, 2008; CENAVECE, 2009; CENAVECE, 2010; CENAVECE, 2011; CENAVECE, 2012) se registraron un total de 22,504 casos de mordeduras por serpiente (clave X20) lo que significa un promedio anual de 3,844.9 casos (desviación estándar = 238.2). Las entidades federativas que presentan, por año, constantemente el mayor número de casos son Oaxaca (472.9 ± 56.2), Veracruz (406.3 ± 52.0), San Luis Potosí (344.1 ± 44.2), Puebla (302.5 ± 37.0), Hidalgo (274.6 ± 17.9) y Chiapas (204.3 ± 15.0) (Cuadro 1).

Lamentablemente nuestro país no cuenta con una metodología eficiente para el registro y seguimiento de los accidentes causados por serpientes. Este problema se manifiesta en las diferencias entre los datos estadísticos. Entre 1994 y 1998, el Instituto Mexicano del Seguro Social reportó un total de 2,620 casos de los cuales 23 (0.9%) resultaron en muerte, siendo los estados de Chihuahua, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas y Veracruz los más afectados (Tay-Zavala et al., 2002).

El Hospital General de Zona No. 8 de Córdoba, Veracruz, recibió un total de 151 casos de mordeduras (incluyendo dos defunciones) entre 1995 y 2001 lo que significa un promedio de 21.6 casos por año, la mayoría de ellos asignados a la nauyaca real *Bothrops asper* (Luna-Bauza et al., 2004). El Hospital General de Tampico recibió, durante el periodo comprendido entre 2004 y 2006, un total de 610 casos de envenenamiento (que significa un promedio de 203 casos por año), de los cuales el 28% involucraba menores de 15 años. La mayoría de los accidentados (38%) provenían del estado de Veracruz.

El Hospital Infantil del Estado de Sonora admitió 55 menores de edad con evidencia de envenenamiento en el periodo comprendido entre 1977 y 2001, un promedio de 2.3 casos por año (Sotelo-Cruz, 2003). Diferentes especies del género *Crotalus* (serpientes de cascabel) fueron las responsables de los accidentes que documentados en esta región del país.

Los estudios que tratan de recopilar mayor número de datos dibujan un panorama aún más serio. En 2006 recopilando los datos aportados por el INEGI y el INSP, se contabilizan un total de 2,728

muerres para el periodo comprendido entre 1979 y 2003 (sin mencionar el número total de accidentados(Frayre-Torres et al., 2006). A decir de los autores las entidades con mayor índice de mortalidad por encuentro con reptiles venenosos son Oaxaca, Quintana Roo, Campeche, Veracruz e Hidalgo.

Cuadro 1. Casos de mordedura por serpiente reportados al Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE) entre 2005 y 2012.

Entidad	Promedio	Desv. Est.	Mínimo	Máximo
Oaxaca	472.9	56.2	414	587
Veracruz	406.3	52.0	353	500
San Luis Potosí	344.1	44.2	288	405
Puebla	302.5	37.0	264	371
Hidalgo	274.6	17.9	242	301
Chiapas	204.3	15.0	182	230
México, Edo	154.6	28.3	113	206
Guerrero	142.3	35.8	99	188
Tabasco	131.9	37.3	74	198
Quintana Roo	110.1	18.4	79	130
Tamaulipas	101.5	13.8	83	124
Guanajuato	99.3	13.8	84	115
Chihuahua	93.4	17.0	69	120
Michoacán	88.5	23.7	54	131
Jalisco	86.4	12.1	69	111
Yucatán	84.3	10.6	69	104
Tlaxcala	78.8	19.8	50	106
Nuevo León	77.9	17.0	65	113
Zacatecas	71.9	19.9	37	95
Distrito Federal	68.0	43.3	33	169
Sonora	66.1	11.9	50	79
Sinaloa	58.3	7.3	47	68
Campeche	57.6	9.9	47	77
Nayarit	49.8	10.9	35	71
Durango	43.1	13.8	18	66
Querétaro	41.4	7.9	26	50
Coahuila	28.5	9.1	17	45
Colima	28.5	11.9	13	44
Morelos	23.9	7.8	14	37
Aguascalientes	19.0	6.5	10	31
Baja California	18.3	7.1	9	26
Baja California Sur	17.3	6.2	7	27

Fuente: Boletín del CENAVECE, cuadro 12, clave X20. Datos anuales acumulados (masculinos y femeninos), última actualización 13 de febrero de 2013.

Tomando como base los datos de la Dirección General de Epidemiología (en donde se incluye el IMSS, ISSSTE, DIF, PEMEX, Sedena, Semar, y otras dependencias), (Siria-Hernández & Arellano-Bravo, 2009) reportan 18,848 casos entre 2003 y 2007 (con 2,912 fallecimientos) señalando a los estados de Oaxaca, Veracruz, San Luís Potosí, Hidalgo y Puebla como las entidades con mayor índice de accidentes en el país. La nauyaca real *Bothrops asper* es la principal responsable de los accidentes (48% del total). (Véase también (Tay-Zavala, Diáz et al., 2002; Luna-Bauza, Martínez-Ponce et al., 2004; Frayre-Torres, Sevilla-Godínez et al., 2006; García-Willis et al., 2009) para descripciones más detalladas de zonas particulares).

Es importante resaltar que aunque algunos reportes incluyen la identidad de la especie agresora, la gran mayoría de ellos no lo hace por lo que resulta muy complicado ubicar a aquéllas que representen un mayor riesgo para la población. Tomando en cuenta los hábitos, distribución y capacidad de adaptación a ambientes perturbados, es posible señalar algunas especies de importancia médica: *Bothrops asper* (nauyaca real), a lo largo de la costa del Golfo hacia Centro América incluyendo la península de Yucatán; *Crotalus simus* (siguiendo la clasificación propuesta por (Campbell & Lamar, 2004); *Agkistrodon bilineatus* por las costas Pacífico y Atlántico adentrándose hacia centro América; *Crotalus scutulatus* y *Crotalus atrox*, desde la frontera con Estados Unidos hasta el centro del país (Juliá-Zertuche, 1981).

Aunque el ofidismo es un problema que puede presentarse dentro de ambientes urbanos, la realidad es que la población rural es la más afectada por este problema pues la naturaleza de su trabajo los expone a una mayor probabilidad de encuentro con animales venenosos. Si a ello se suma la carencia o falta absoluta de servicios de salud -sobre todo en áreas remotas- el problema toma un tinte más preocupante en el que la morbilidad y no la mortalidad se convierte en el principal efecto a tratar (Maraboto, 2001; Frayre-Torres, Sevilla-Godínez et al., 2006).

1.2 Diversidad de reptiles venenosos

México es clasificado como un país megadiverso (CONABIO, 2009), especialmente hablando de reptiles (cerca del 10% del total mundial). La enorme diversidad de reptiles venenosos de México (la más alta de América) obedece a una serie de factores bióticos y abióticos del país (Benítez y Bellot, 2003) que permiten el establecimiento de una gran variedad de hábitats y micro hábitats. Siguiendo la clasificación de Campbell y Lamar (2004), los reptiles venenosos de México se agrupan en tres familias

- a) Helodermatiidae (un género, dos especies): En la que se encuentran los únicos lagartos venenosos de América conocidos

comúnmente como lagarto enchaquirado, Acaltetepon o monstruo de Gila. Estos reptiles poseen una glándula venenosa a cada lado de la mandíbula inferior que desemboca en la base de los dientes. El veneno se acumula en la base de los dientes y asciende por capilaridad a lo largo de los colmillos que rasgan el tejido de la presa facilitando la inoculación.

- b) Viperidae (diez géneros, 52 especies): Esta familia de serpientes destaca porque el hueso maxilar presenta una forma cuboidal -ligeramente alargada en su eje dorso-ventral- que posee dos huecos anteriores que albergan los colmillos. Las uniones de los huesos de la cabeza permiten que el maxilar (y por lo tanto el colmillo) se mueva cerca de 180 grados sobre el eje antero-posterior de la cabeza. El colmillo es hueco (similar a una aguja hipodérmica) y se encuentra directamente conectado a la glándula de veneno por medio de un canal especializado. La glándula posee dos músculos asociados con los cuales el ejemplar modula la cantidad de veneno a inyectar (Klauber, 1972). Las especies representativas de esta familia son comúnmente llamadas cascabeles, nauyacac, cantiles, entre otros nombres.
- c) Elapidae (tres géneros, 17 especies): Una especie de serpiente marina y 16 especies de coralillos son los integrantes de esta familia en nuestro país. El hueso maxilar es alargado sobre el eje anteroposterior y en algunas especies puede albergar tanto al colmillo como a otros dientes. La estructura ósea craneana permite un movimiento muy limitado de la boca y los colmillos. Los colmillos poseen un surco anterior a lo largo del cual viaja el veneno. La glándula venenosa se encuentra asociada con un solo músculo que, si bien permite modular la cantidad de veneno inyectado lo hace con poca fuerza, lo que obliga a la serpiente a morder a la presa durante un periodo prolongado a fin de inocular una cantidad suficiente de veneno (Roze, 1996).

A lo largo del territorio nacional, desde el nivel del mar hasta más allá de los 3500 metros de altitud, es posible encontrar miembros de alguna de estas tres familias. Los vipéridos son los representantes más comunes (cascabeles en el norte, nauyacac en el sur) y muestran una importante capacidad de adaptación a ambientes perturbados. Por otro lado, los miembros de la familia Helodermatiidae son poco comunes dentro de las áreas de distribución que ocupan aunque es posible hallarlos con mayor frecuencia en épocas de sequía. Los elápidos son, posiblemente, el grupo más difícil de encontrar en campo y es seguro que a ello se deba el bajo número de accidentes en los que están involucrados.

Sin duda, el envenenamiento causado por miembros de la familia Viperidae es el que causa mayores problemas a la población ya que afecta a un número importante de personas (véase sección 1.1). Por otro lado, aún cuando se desconoce el número real de casos de envenenamiento por *Heloderma sp.*, éstos suelen no poner en riesgo

la vida del accidentado aunque la sintomatología referida por algunos testigos pone de manifiesto el sentimiento de muerte debido al inmenso e intenso dolor que se provoca (observación personal) y suelen ser tratados sin necesidad de antiveneno (Strimple et al., 1997).

El caso de los envenenamientos causados por serpientes de coral resulta muy especial ya que puede poner en serio riesgo la vida del accidentado por lo que todos los accidentes causados por coralillos deben ser tratados como emergencias médicas (Bucarechi et al., 2006; Manock et al., 2008) y deben recibir el antiveneno lo más pronto posible.

Cabe aquí hacer mención sobre la confusión que existe entre coralillos (géneros *Micrurus* y *Micruroides* en América) también llamados corales verdaderos o corales machos, y los falsos corales (varios géneros de distintas familias, entre los que destacan *Lampropeltis*, *Cemophora*, *Ninia*). El conocimiento popular utiliza el patrón de coloración para diferenciar éstos dos grupos de serpientes; Rojo-Amarillo-Negro-Amarillo (RANA) a lo largo de cuerpo (iniciando desde la cabeza) es el patrón que suele utilizarse para ubicar a un coralillo verdadero. Algunas especies en las que es posible observar el patrón "RANA" son *Micrurus browni*, *M. diastema* y *M. distans*, por mencionar sólo algunos ejemplos

Sin embargo, una importante proporción de especies del género *Micrurus* presentan patrones muy distintos al citado RANA. *Micrurus ephippifer* (cuya distribución abarca centro-sur del estado de Oaxaca) el anillo rojo presenta una fuerte pigmentación negra que a primera vista impide diferenciar los anillos dando un aspecto uniformemente negro a lo largo del cuerpo. En el caso de *M. bernadi* (localizada al Norte de Puebla y noreste de Veracruz) el cuerpo presenta un patrón de anillos rojos y negros mientras que el color amarillo se limita al anillo nual y los anillos caudales. En especies como *M. laticollaris* y *M. elegans* los anillos negros se presentan en grupos de tres bandas negras encerrando dos bandas blancas. El coral de Los Tuxtlas, *M. limbatus*, es uno de las pocas especies que no presenta patrón de anillos sino que el color negro se manifiesta en forma de manchas sobre un fondo rojo, mientras que el color amarillo sólo aparece en el anillo nual.

La variación en patrones de coloración de los coralillos verdaderos hace casi imposible, para un ojo poco entrenado, diferenciarlos de serpientes inofensivas a simple vista. La única vía confiable para diferenciar estos dos grupos involucra el manejo del ejemplar a fin de contar escamas (15 hileras a medio cuerpo), determinar la presencia de escama loreal y localizar los colmillos. La mayor parte de los accidentes causados por serpientes del género *Micrurus* se deben a una mala identificación de la especie lo que lleva a su

manipulación descuidada (de la Torre-Loranca et al., 2006) (observación personal).

Por ningún motivo se debe manipular un ejemplar sin la debida capacitación y tomando todas las precauciones posibles.

1. 3 Serpientes de coral

Los coralillos se distinguen de otros miembros de la familia Elapidae por: a) haber perdido el hueso postorbital; b) presentar una bolsa basal del hemipene; c) presentar un hemipene uniformemente espinoso, y; d) presentar un origen bipartita del músculo aductor mandibular superficial externo (Castoe, 2004). A nivel mundial, los coralillos se dividen en cuatro géneros, distribuidos en el Sureste Asiático (*Sinomicrurus* y *Calliophis*) y América (*Micrurus* y *Micruroides*).

El género *Micrurus* (latín *micro* = pequeño y *urus* = cola) es el más diversificado de todos los géneros de coralillos (incluso el más diversificado de todos los géneros de serpientes venenosas) con aproximadamente 75 especies (Uetz, 2010). Su área de distribución abarca desde la Patagonia en Argentina, hasta las Carolinas en Estados Unidos, incluyendo algunas islas (Roze, 1996; Campbell & Lamar, 2004). Resulta muy importante resaltar que tanto la composición de cada especie como las relaciones filogenéticas entre las distintas especies sigue siendo un tema de amplia discusión. La taxonomía utilizada a lo largo de esta tesis se basa en la propuesta por Campbell y Lamar (2004) con el apoyo constante del Dr. Eric N. Smith (Universidad de Texas en Arlington).

Las serpientes de coral son animales de talla pequeña – la mayoría se encuentra entre los 60 y 80 cm-, aunque algunas especies rebasan los 120 cm (Roze, 1996). La gran mayoría de las especies son de hábitos fosoriales lo que significa que están adaptados a la excavación o vida subterránea (ello puede explicar la dificultad de encontrarlos en campo). Sin embargo, existen algunas especies (como *M. surinamensis* o *M. latifasciatus*) que pasan la mayor parte del tiempo nadando en ríos y riveras lo que las hace muy difícil de encontrar sobre tierra. En general, suelen ser poco agresivas (prefieren huir del depredador) lo que facilita su manejo que, aunado a lo llamativo de sus colores, las hace muy atractivas para los niños que llegan a jugar con ellas durante largos periodos (de Roodt et al., 2006)

Una alta proporción de especies del género *Micrurus* presentan un patrón de anillos rojos, negros y amarillos o blancos a lo largo del cuerpo cuya intensidad es bastante más elevada justo después de cada evento de muda. El grosor de cada anillo, el número total de anillos y la disposición de los mismos son caracteres claves para diferenciar especies (Slowinski, 1991; Roze, 1996), aunque actualmente se busca utilizar otro tipo de marcadores para

disminuir el efecto de la homoplasia (relación cercana debido a convergencia; Castoe et al., 2007; Dr. Eric N. Smith, comunicación personal).

Las serpientes de coral que habitan territorio mexicano pertenecen a los géneros *Micruroides* (1 especie) y *Micrurus* (15 especies). La distribución de estos animales incluye una gran proporción del territorio a lo largo de ambas costas exceptuando las regiones más secas de Coahuila, Chihuahua y Durango (Campbell y Lamar, 2004). Hasta el momento no se han registrado especies de coral en la Península de Baja California (Figura 1).

1.4 Aparato de inoculación de veneno

Todas las especies de coralillos son venenosas y potencialmente peligrosas. Aún a finales de la década de 1960 se suponía que un sólo rasguño de estos animales era suficiente para asegurar una horrible muerte a la víctima (Flowers, 1966). A partir de entonces se han realizado diversos estudios para determinar la letalidad (Cohen et al., 1967), los efectos (Weiss & McIsaac, 1971; Ramsey et al., 1972) y las características (Possani et al., 1979; Fix, 1980) de los venenos así como la potencia de algunos antivenenos para contrarrestar los efectos de la mordedura de estas serpientes (Cohen et al., 1968; Kocholaty et al., 1971; Bolaños et al., 1975, 1978; Gutiérrez et al., 1991).

El aparato inoculador se encuentra en la cabeza del animal (a todo lo largo de Latinoamérica existe la falsa creencia que los coralillos pueden envenenar "picando con la cola"; Roze, 1996) y consta de una par de glándulas donde se fabrica el veneno, asociadas a un par de colmillos fijos acanalados (en algunas ocasiones el canal se encuentra parcialmente cerrado) ubicados en la región anterior de la maxila (al frente de la boca).

Los dientes se localizan en tres huesos: el palatino, el pterigoideo y el maxilar, siendo este último el hueso en el que se sitúan los colmillos. La arquitectura craneal relacionada con el mecanismo de movimiento de estos huesos se ha tomado como base para separar dos grandes subfamilias dentro de la familia Elapidae: Elapinae e Hydrophiinae. Durante la mordida, los miembros de la primera subfamilia (Elapinae, a la que pertenecen los coralillos, cobras, mambas y otras especies relacionada) mueven ligeramente el hueso palatino hacia delante y hacia arriba por lo que reciben el nombre de "erectores del palatino". Por otro lado, los miembros de la subfamilia Hydrophiinae (serpientes marinas y un género terrestre australiano) —conocidos como "arrastradores del palatino"— no son capaces de realizar la mencionada erección ("palatine erectors" y "palatine draggers", respectivamente) (McDowell, 1987)

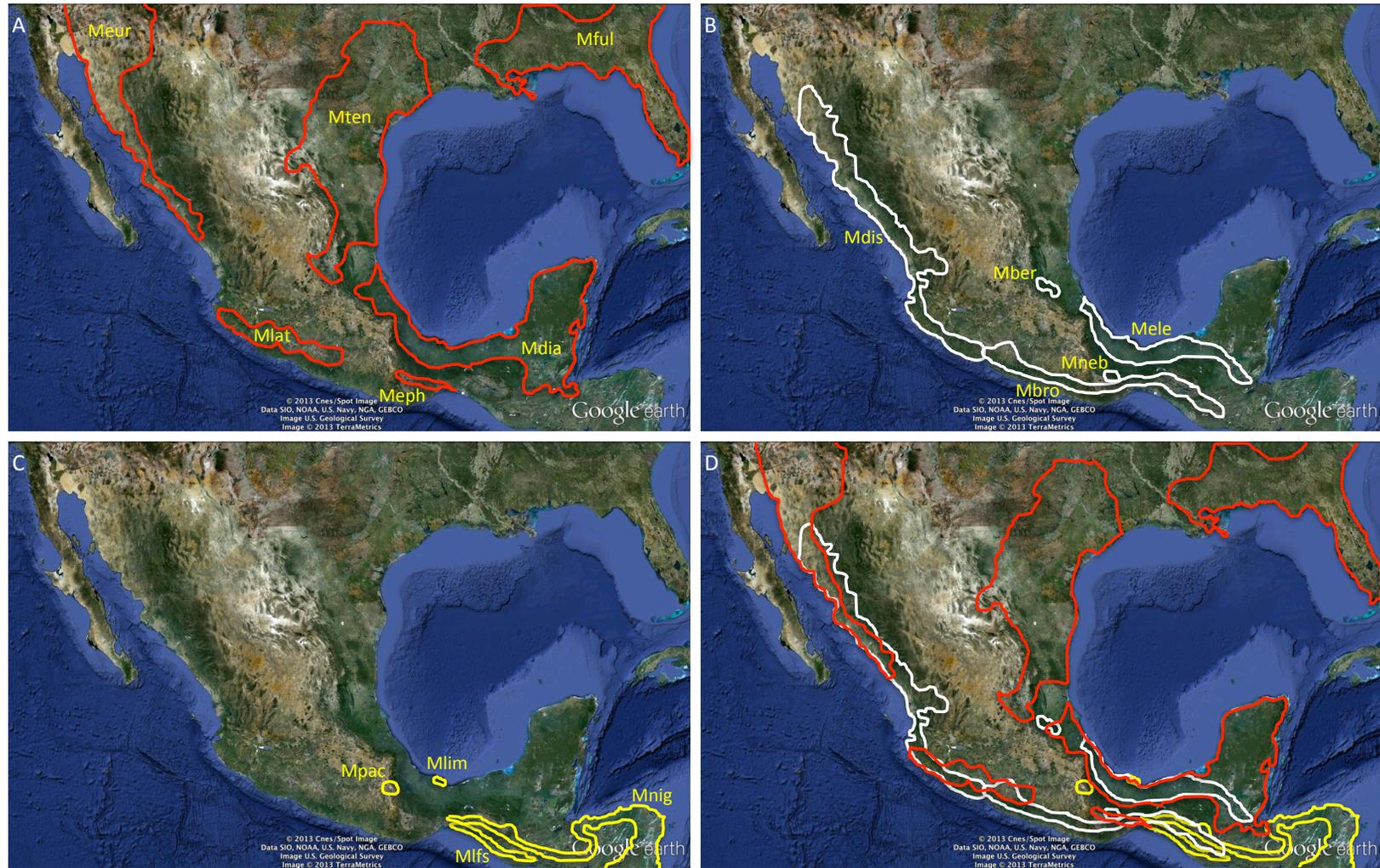


Figura 1. Diversidad y distribución aproximada de especies de serpientes de coral en Norte América. Las especies se han dividido arbitrariamente en los paneles A-C para facilitar la observación de las áreas de distribución. En el panel D todas las distribuciones aparecen sobrepuestas. A) *Micruruoides euryxanthus* (Meur), *Micrurus diastema* (Mdia), *M. laticollaris* (Mlat), *M. fulvius* (Mful) y *M. tener* (Mten). B) *Micrurus bernadi* (Mber), *M. browni* (Mbro), *M. distans* (Mdis), *M. elegans* (Mele) y *M. nebularis* (Mneb). C) *Micrurus latifasciatus* (Mlfs), *M. limbatus* (Mlim), *M. nigrocinctus* (Mnig) y *M. pachecogili* (Mpac). Modificado de Campbell y Lamar, 2004. Fuente del mapa: "México" 19° 25' 57.59''N; 99° 07' 59.55''W, elevación 2250 msnm. Google Earth (Ver 7.0.3.8452). Imagen adquirida el 3 de Abril de 2013.

Existen dos glándulas salivares ubicadas en la región superior e inferior de la boca -además de la glándula venenosa- cuyo principal papel es lubricar el alimento y, probablemente, asistir durante la pre digestión. Adicionalmente, existe una glándula nasal que, al igual que en la mayoría de los reptiles, es responsable de secretar una solución salina altamente concentrada con lo cual se evita el gasto excesivo de agua. Un tercer tipo de glándula es la hederiana que tiene la función de lubricar el órgano vomeronasal (o de Jacobson) implicado en la comunicación química y la caza de la presa (Roze, 1996).

La glándula de veneno, ubicada a cada lado de la cabeza en posición postero-inferior al ojo, está constituida por una región posterior secretoria -donde se fabrica el veneno- que se va estrechando hacia la región anterior hasta formar un tubo secretor o ducto de veneno, justo por detrás y encima de los colmillos. Rodeando al ducto de veneno se encuentra una glándula mucosa que, por medio de pequeños túbulos secreta su contenido hacia el mismo ducto. Tanto la glándula de veneno como la glándula mucosa e incluso el ducto de veneno están cubiertos por una cápsula de tejido conectivo que los protege de daños (Roze, 1996).

Solamente un músculo, el *levator anguli oris* (LAO), se asocia directamente a la glándula de veneno. La región dorsal del LAO se origina como fibras en la región postorbital por encima del hueso parietal. La región ventral del LAO se origina en la superficie lateral de la mandíbula y se inserta en la glándula de veneno por medio de un tendón. Sólo en *Micruroides* las fibras musculares se insertan directamente en la glándula (Roze, 1996). Aún cuando los coralillos tienen una gran capacidad para controlar la cantidad de veneno que inoculan, este mecanismo de inyección es uno de los menos sofisticados en serpientes. Se dice que la inoculación es tan lenta que cuando el animal muerde no suelta a la presa en ningún momento mientras busca su cabeza para iniciar la ingestión (Greene, 1973) con la finalidad de administrar el veneno.

El aparato inoculador descrito anteriormente tiene como finalidad liberar el veneno hacia el tejido donde el animal esta mordiendo. La cantidad de veneno que un coralillo pueda depositar varía directamente en función del tamaño del ejemplar (Fix, 1980). La mayor cantidad de veneno obtenido para una coralillo en una sola ordeña ha sido de 160 mg a partir de un ejemplar de *M. s. surinamensis* de Colombia. Mientras que la menor cantidad de veneno reportada ha sido de 6 mg para *Micruroides euryxanthus* (Roze, 1996).

1.5 Modo de acción de venenos de coral

El envenenamiento por serpientes de coral se caracteriza por provocar dolor local (desde leve a moderado) y enrojecimiento local (que puede o no estar acompañado de inflamación leve) (Ramsey y Klickstein, 1962; Russell, 1967; Peterson, 2006). En casos severos el accidentado desarrolla un parálisis muscular generalizada que puede provocar la relajación completa de los músculos esqueléticos incluido el diafragma por lo que puede comprometer la vida debido a insuficiencia respiratoria (Maseley, 1966; Vital-Brazil y Fontana, 1983/84).

En gatos (Weiss & McIsaac, 1971) la administración endovenosa de veneno de *M. fulvius* (Florida, E.U.A) provoca una importante disminución de la presión arterial (mayor al 30%) que no responde a vasoconstrictores, además de una disminución paulatina del volumen tidal (volumen de aire introducido en cada respiración) y una disminución total de la capacidad del músculo tibial anterior a responder a la estimulación directa o indirecta. En preparación nervio frénico-diafragma se observa un bloqueo completo en cuatro horas que no es afectado por neostigmina o edofronio (inhibidores de acetilcolinesterasa). Aunque existe un evidente bloqueo del receptor de acetilcolina, los autores sugieren que éste no es el principal responsable de la muerte de los animales.

El mismo veneno, ahora administrado en perros, provoca una importante disminución de la potencia cardíaca y la presión aórtica (cerca del 75 y el 60%, respectivamente) así como una elevación significativa de la presión en la vena hepática y en la vena porta (más del doble en ambos casos) dentro de los primeros 10 minutos posteriores a la administración endovenosa del veneno (Ramsey, Taylor et al., 1972). Adicionalmente, la presión de la arteria pulmonar se eleva dentro de la misma ventana de tiempo pero permanece elevada durante todo el experimento. Los autores sugieren que la muerte se debe a los cambios hemodinámicos que provocan un secuestro inicial de la sangre en el compartimento hepato-esplénico que posteriormente es acumulado en pulmones lo que lleva a la disminución de la contractilidad cardíaca.

En 1976, se muestra que la administración endovenosa -en perros- de veneno de *M. frontalis* (Brasil) provoca una dramática disminución de la presión sanguínea. Sin embargo, la administración intramuscular sólo provoca un ligero efecto en el sistema cardiovascular y lleva a los perros a la muerte por insuficiencia respiratoria. Los resultados muestran que el bloqueo de los receptores colinérgicos ubicados en la membrana muscular provocado por la(s) toxina(s) es el principal responsable de la muerte de los animales (Vital Brazil et al., 1976/77).

Con base en los resultados descritos para veneno de *M. fulvius* (Ramsey, Taylor et al., 1972), se describen las alteraciones

provocadas por veneno de *M. nigrocinctus* en ratón (Gutierrez et al., 1980). Al ser administrado por vía intramuscular, el veneno de esta especie provoca un elevado aumento de los niveles séricos de creatínfosfocinasa (CPK) con un máximo a las 3 horas de inoculación que disminuye paulatinamente a las 24 horas. El análisis miográfico muestra importantes alteraciones de la fibras musculares que se regeneran a los 7 días.

El veneno de *M. corallinus* (otra especie de gran importancia médica en Brasil) ejerce el bloqueo neuromuscular reversible sobre preparación neuromuscular aumentando la liberación espontánea de acetilcolina y disminuyendo la liberación inducida por el nervio, además de aumentar la frecuencia los potenciales de placa terminal en miniatura y reduciendo su amplitud sin afectar la respuesta de las fibras a estimulación directa (Vital Brazil & Fontana, 1983-84).

Gracias a los trabajos antes mencionados, se ha establecido que el principal blanco de acción de estos venenos es la placa neuromuscular. Sin embargo, aunque no parecen clínicamente relevantes, existen otra serie de efectos provocados por estos venenos cuya comprensión puede facilitar el entendimiento de la fisiopatología de estos envenenamientos.

El veneno de *M. lemniscatus* (Brasil) incrementa la permeabilidad vascular en piel de rata, provoca un rápido desarrollo de edema - que disminuye a las 24 hrs- y provoca degranulación de mastocitos en mesenterio de ratas, lo que muestra un importante efecto pro inflamatorio (Silva y Texeira, 2000). Al mismo tiempo, este veneno muestra un importante potencial antinociceptivo (Leite dos Santos et al., 2012) y provoca diversas alteraciones en hipocampo de rata (Oliveira et al., 2008)

Los venenos de *M. lemniscatus*, *M. frontalis*, *M. surinamensis* y *M. nigrocinctus* provocan un importante nivel de miotoxicidad (actividad de CPK) y edema, sin afectar los tiempos de coagulación (Cecchini et al., 2005).

Los venenos de *M. isozonus* (Venezuela, varias localidades), *M. fulvius* (Florida) y *M. tener* (Texas) muestran una importante capacidad de inhibición de la agregación plaquetaria *in vitro* así como diferentes niveles (desde nulo hasta muy importante) de inhibición de las actividades de Plasmina, Factor Xa y Trombina. El veneno de *M. tener* muestra una inusual capacidad de degradar la cadena alfa del fibrinógeno (Salazar et al., 2011).

Los venenos de *M. altirostris*, *M. baliocoryphus*, *M. fulvius*, *M. nigrocinctus*, *M. pyrrhocryptus* y *M. surinamensis* muestran una baja capacidad edematogénica y urémica y sólo los representantes centro y norteamericanos (*M. nigrocinctus* y *M. fulvius*) muestran un importante nivel de miotoxicidad (actividad de CPK). Resulta

interesante observar que los venenos de *M. baliocoryphus* y *M. surinamensis* presentan muy baja actividad PLA2 (de Roodt et al., 2012)

Con base en los trabajos antes mencionados, se reconocen tres tipos de mecanismos de acción para venenos de serpientes de coral (Vital Brazil, 1987):

- a) Bloqueo de los receptores postsinápticos de acetilcolina que impide la despolarización de la membrana muscular mediada por el neurotransmisor y que puede ser revertida por fármacos anticolinesterásicos como neostigmina. Éste bloqueo es ejercido por un grupo particular de toxinas conocidas como alfa-neurotoxinas (véase más adelante). Algunos ejemplos de venenos bloqueadores postsinápticos son *Micrurus frontalis* (Vital Brazil et al., 1973/74) y *M. spixii* (Vital-Brazil et al., 1995).
- b) El bloqueo de los receptores postsinápticos es acompañado por ligera y momentánea disminución de la liberación de acetilcolina desde la pre sinapsis, que rápidamente se transforma en una liberación masiva e inmediata para posteriormente, manifestarse como un bloqueo paulatino. La modulación de la liberación del neurotransmisor no es afectada por anticolinesterásicos. Este mecanismo ha sido descrito para el veneno de *M. corallinus* y se sospecha que puede estar presente en el veneno de *M. dumerilii carinicauda* (Serafim et al., 2002; dal Belo, 2004; dal Belo et al., 2005)
- c) Venenos como *M. fulvius* (Ramsey, et al., 1972; Weiss y Mac Isaac, 1977) y *M. nigrocinctus* (Goularte, 1993; Goularte et al., 1995; Goularte et al., 1999) provocan un importante nivel de despolarización de la membrana muscular en preparaciones neuromusculares que a su vez disminuyen la capacidad del músculo de responder a estimulación directa. Adicionalmente, se observa un importante nivel de alteraciones morfológicas musculares. Se ha propuesto que esta acción es mediada por acción de cardiotoxinas o fosfolipasas A2 miotóxicas. Sin embargo hasta el momento no ha sido reportada ninguna cardiotoxina¹ en venenos de coral.

Estos mecanismos involucran la actividad de dos grandes grupos de proteínas: las alfa neurotoxinas y las fosfolipasas A2. Las alfa neurotoxinas son proteínas no enzimáticas de entre 60 y 75 amino ácidos estabilizadas por cuatro o cinco puentes disulfuro y que adoptan una estructura tridimensional similar a una mano con los

¹ El nombre "cardiotoxina" se refiere a un grupo particular de proteínas básicas no enzimáticas que poseen una estructura plana estabilizada por cuatro puentes disulfuro de los cuales emergen tres "loops" o "dedos" ricos en hojas beta antiparalelas. Kumar, T. K., G. Jayaraman, C. S. Lee, A. I. Arunkumar, T. Sivaraman, D. Samuel & C. Yu. 1997. Snake venom cardiotoxins-structure, dynamics, function and folding. *J. Biomol. Struct. Dyn.*: 15, 431

tres dedos centrales estirados. Estas proteínas se unen con fuerte afinidad (10^{-9} a 10^{-11} M) al receptor nicotínico de acetilcolina impidiéndole generar el cambio conformacional necesario para el paso de los iones sodio al interior celular lo que a su vez impide la despolarización de la membrana y por tanto inhibe la contracción muscular (Tsetlin, 1999; Nirthanan y Gwee, 2004).

Las alfa neurotoxinas pueden, a su vez, dividirse en dos grandes subgrupos dependiendo de la longitud de la cadena y el número de puentes disulfuro que posean. Por un lado las alfa neurotoxinas cortas se caracterizan por poseer cadenas polipeptídicas de entre 60 y 62 aminoácidos y cuatro puentes disulfuro; las alfa neurotoxinas largas, por otro lado, se reconocen por presentar cadenas de entre 66 y 75 aminoácidos y poseer un puente disulfuro adicional en el extremo del "dedo" II lo que, al parecer, les permite reconocer ciertos subtipos de receptores (Tsetlin, 1999).

A pesar de la similitud estructural y funcional entre las alfa neurotoxinas cortas y largas existen diferencias importantes entre ellas. Las toxinas cortas se asocian entre 5 y 6 veces más rápido y se disocian entre 5 y 9 veces más rápido que las toxinas largas. Esta característica puede explicar el efecto más prolongado que se presenta en envenenamientos por elápidos que poseen mayoritariamente toxinas largas (Karlsson, 1979). Trémeau y colaboradores (1986) reportaron la obtención un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer y neutralizar una gran variedad de alfa neurotoxinas cortas pero que resulta incapaz de reconocer toxinas largas. Grognet y colaboradores (1986) reportan que una misma molécula de alfa neurotoxina corta puede ser reconocida por cuatro fragmentos Fab al mismo tiempo pero que sólo dos de estos sitios resultan importantes para neutralizar el efecto de la toxina. Interesantemente uno de estos sitios forma parte del corazón de la toxina y topológicamente se encuentra muy distante del sitio por el que la toxina reconoce al receptor. En toxinas largas sólo se ha reportado un epítipo localizado sobre el sitio de reconocimiento al receptor. Los anticuerpos que reconocen éste epítipo son capaces de neutralizar la letalidad de varias toxinas largas pero son incapaces de reconocer toxinas cortas (Grognet et al., 1986).

El segundo grupo de toxinas relevantes en el envenenamiento por coralillos es el de las fosfolipasas tipo A2 (PLA2), enzimas que hidrolizan el enlace 2-*sn*-acil-éster de los glicero-fosfolípidos. En este enorme grupo de proteínas (Six & Dennis, 2000) pueden encontrarse miembros cuya actividad biológica está restringida a fines puramente digestivos, como las fosfolipasas pancreáticas, o bien miembros que están involucrados en fenómenos de neurotoxicidad, miotoxicidad, cardiotoxicidad, efectos anticoagulantes, modulación de la agregación plaquetaria, edema, entre otras (Kini, 2003)

Las PLA2 neurotóxicas evitan la liberación del neurotransmisor desde la región pre sináptica de la unión neuromuscular. Aún no se conoce el mecanismo por el cual sucede este bloqueo, conocido como acción beta-neurotóxica, pero al parecer la PLA2 utiliza receptores propios de la célula para introducirse y de alguna forma evitar que las vesículas cargadas con el neurotransmisor puedan fusionarse a la membrana plasmática (Montecucco y Rossetto, 2000). La presencia de cationes (principalmente Ca^{2+}) resulta de gran importancia para que se presente la actividad neurotóxica (Rowan, 2001), lo que podría sugerir que la actividad enzimática resulta importante para la actividad biológica.

El bloqueo de la liberación de acetilcolina por PLA2 en la terminal de la placa nerviosa es una de las actividades más importantes en algunas especies de elápidos (p.ej., *Notechis scutatus*, *Bungarus multicinctus*, *Oxyuranus scutellatus*) y de hecho resulta la actividad tóxica más importante en el veneno de la cascabel sudamericana *Crotalus durissus terrificus*. No parece existir una relación entre la letalidad de estas toxinas con respecto al nivel de la actividad fosfolipásica que presenten (Montecucco y Rossetto, 2000). Estructuralmente, estas proteínas pueden presentar desde una hasta cinco subunidades sin que hasta el momento se haya descrito algún motivo o estructura particular que sugiera la existencia de algún sitio de unión a receptor común a todas ellas. Tampoco se han reportado estudios inmunológicos que permitan establecer si comparten o no epítopes neutralizantes.

La presencia de actividad PLA2 es un común denominador en las especies de serpientes de coral estudiadas hasta el momento (Tan y Ponnudurai, 1992; da Silva y Aird, 2001). Los venenos de *Micrurus corallinus* (Sudeste de Brasil, Vital-Brazil, 1987) y *M. dumerilii carinicauda* (origen desconocido; Serafim et al., 2002) son los únicos ejemplos de serpientes de coral en los que se ha demostrado actividad beta neurotóxica (bloqueo de la liberación de acetilcolina) y sólo en el segundo de ellos se ha logrado aislar la toxina responsable (Serafim et al., 2002; dal Belo, 2004; dal Belo et al., 2005).

Por otro lado, el veneno de *M. nigrocinctus*, ha mostrado poseer un importante nivel de actividad miotóxica *in vitro* (Goularte, 1993; Goularte et al., 1995) e *in vivo* (Gutiérrez, et al., 1986) atribuida a dos proteínas particulares con actividad PLA2 conocidas como nigroxinas A y B (Arroyo et al., 1987, Alape-Girón, et al., 1996). Estos resultados permiten suponer que el efecto neurotóxico de este veneno se desarrolla tanto por el daño causado a la membrana muscular como por el bloqueo hacia los receptores nicotínicos de acetil colina (Alape-Girón et al., 1996)

Si bien existen trabajos que demuestran la existencia de ambos tipos de toxinas, alfa neurotoxinas y fosfolipasas tipo A2, en venenos de coral (Alape-Girón et al., 1996; Francis et al., 1997;

Dokmetjian et al., 2009) ninguno de ellos establece claramente la proporción de estas proteínas en cada veneno y, más importante aún, no se ha establecido la magnitud en la cual son responsables del efecto neurotóxico. Adicionalmente, se desconoce si todos los componentes del veneno son igualmente inmunogénicos o si la respuesta inmune se dirige preferencialmente hacia alguno de ellos.

1.6 Bioquímica de venenos de serpientes de coral

Las serpientes de coral son animales difíciles de encontrar en campo (Roze, 1996) cuyo mantenimiento en cautiverio requiere de una alimentación muy especial (Greene, 1973; Marques y Sazima, 1997; Urdaneta et al., 2004; Oliveira et al., 2005) y de las cuales se obtienen pequeñas cantidades de veneno (Fix y Minton, 1976; Fix, 1980, Roze, 1996, Oliveira et al., 2005; Cuadro 2).

Cuadro 2. Cantidades de veneno obtenida por ordeña reportadas para algunas especies de coralillos.

Especie	Cantidad (mg)	Referencia
<i>Micrurus fulvius</i>	2 a 23	Fix, 1980
<i>Micrurus corallinus</i>	3.99 ± 1.99	Oliveira et. al., 2005
<i>Micrurus frontalis</i>	8.63 ± 2.84	Oliveira et. al., 2005
<i>Micrurus hemprichii</i>	1.63 ± 1.66	Oliveira et. al., 2005
<i>Micrurus ibiboboca</i>	3.16 ± 2.46	Oliveira et. al., 2005
<i>Micrurus lemniscatus</i>	1.93 ± 0.92	Oliveira et. al., 2005
<i>Micrurus spixii</i>	96.9	Oliveira et. al., 2005

Adicionalmente, los accidentes causados por coralillos en México, al igual que en toda América, son poco frecuentes (Russell et al., 1997; Maraboto, 2005) y suelen suceder al manipular un ejemplar suponiendo que se trata de una serpiente inofensiva. Como consecuencia, la investigación bioquímica enfocada a estos venenos ha recibido poca atención comparada con los venenos de otras serpientes.

La caracterización de las moléculas responsables de los diferentes cuadros clínicos se desarrolló lentamente entre finales de la década de los 60s y finales de los 90s, y ha mostrado un aumento significativo durante los últimos 12 años.

Uno de los primeros trabajos publicados sobre la bioquímica de estos venenos (Possani, Alagon et al., 1979) describe la obtención de cinco fracciones proteicas del veneno de *Micrurus fulvius microgalbinaeus*² utilizando una columna de exclusión molecular. Los componentes tóxicos y enzimáticamente activos representaron el

² Reconocida actualmente como *Micrurus tener microgalbinaeus* (Campbell, J. A. & W. Lamar. 2004. The venomous reptiles of the western hemisphere. Cornell University, 898 pp.

77% del total de veneno. En una segunda etapa de purificación, utilizando intercambio aniónico, logran obtener nueve fracciones, de las cuales sólo dos (14% del total del veneno) muestran toxicidad en ratón. Éste es el primer trabajo donde se reporta la secuencia parcial de una fosfolipasa A2 no tóxica de coralillos.

Doce años después, gracias a los trabajos relacionadas con una planta hidroeléctrica, se logra la obtención de una importante variedad y cantidad de venenos de coralillos. Un primer trabajo (Aird & da-Silva, 1991), se centra en la determinación de actividades enzimáticas en estos venenos, mientras que en un segundo esfuerzo, se publican los perfiles cromatográficos de los venenos obtenidos (da Silva et al., 1991). Los resultados de estos dos trabajos demuestran, por una lado, que los venenos de *Micrurus* poseen componentes similares a toxinas canónicas de otras serpientes y, por otro, que existe un importante nivel de variación entre las diferentes especies de coralillos.

Un año más tarde (Tan & Ponnudurai, 1992) se incrementa el número de especies a la lista. Para 1993, haciendo uso del avance en la tecnología de análisis de proteínas se hace posible determinar una gran variedad de péptidos en veneno de *M. fulvius* cuyas masas moleculares se encuentran entre los 6000 y 13000 da (Perkins et al., 1993; Perkins & Tomer, 1995).

En 1996, Rosso y colaboradores comparan la composición de los venenos de *M. alleni*, *M. nigrocinctus* y *M. multifasciatus*, purificando –por primera ocasión– alfa neurotoxinas de coralillos y demostrando la existencia de dos tipos de estas toxinas (cortas y largas) en estos venenos e incluso proponiendo un hipótesis de relación evolutiva entre con otros miembros de toxinas de elápidos (Rosso et al., 1996).

Con el trabajo de Alape-Girón y colaboradores (1996) no solo se demuestra la existencia de una importante cantidad y variedad de proteínas tipo alfa neurotoxinas en el veneno de *Micrurus nigrocinctus* sino que además, se demuestra –por primera ocasión– la capacidad de estas toxinas por inhibir la unión de la toxina II de *Naja naja oxiana* al receptor nicotínico de acetil colina. Adicionalmente, se purifican dos fosfolipasas tipo A2, nigroxinas A y B, que posteriormente formaran parte esencial de la comprensión de la fisiopatología del envenenamiento por esta especie (Alape-Giron et al., 1996).

Una año más tarde, se describe la existencia de una gran variedad de proteínas tipo alfa neurotoxinas y tipo fosfolipasas A2 en veneno de *Micrurus frontalis frontalis* (Francis, et al., 1997). Aunque este trabajo habla de la existencia de fosfolipasas hemorrágicas en el veneno estudiado, no muestra ninguna evidencia más allá de una comparación a nivel de secuencias.

Ho y colaboradores (1997), haciendo uso de técnicas de biología molecular, aíslan –por primera ocasión– un péptido natriurético del veneno de *M. corallinus* que guarda una relación estrecha con péptidos natriuréticos de *Dendroaspis angusticeps* (mamba verde) pero que no se relaciona con otros miembros del grupo (atrial, cerebral o tipo-C) (Ho et al., 1997). Con base en los resultados obtenidos dentro de este trabajo, tres años más tarde, el grupo de Ho purifica, clona y expresa – por primera ocasión, aunque sin actividad biológica – un alfa neurotoxina de coralillo (Silveira de Oliveira et al., 2000). Posteriormente, logran la clonación, expresión y purificación de una fosfolipasa A2 de este veneno (no se menciona actividad biológica o bioquímica)(Castro de Oliveira et al., 2003).

En 2001, en un intento por relacionar la composición bioquímica de los venenos de corales con la letalidad hacia ciertas especies de presas naturales y potenciales, Da Silva y Aird ofrecen un amplio panorama de las diferencias en composición de varias especies y muestran que los venenos de estas serpientes presentan una mayor letalidad contra sus presas naturales (reptiles y peces) que contra mamíferos (da Silva & Aird, 2001).

A partir de 2008, obedeciendo las tendencias del momento en el área toxinológica, inician los estudios “omicos” de los venenos de coralillos.

El primer trabajo sobre el tema (Olamendi-Portugal et al., 2008), muestra una alta proporción de moléculas menores a 10,000 daltones (80.2% del total de masas determinadas por MALDI-TOF/MS y 64.8% de las masas determinadas por ESI-IT/MS); mientras que el análisis de las bandas separadas por SDS-PAGE, muestra la presencia de proteínas relacionadas con neurotoxinas de serpientes, anémonas, caracoles marinos y alacrán, así como fosfolipasas, inhibidores de proteasas citotoxinas y aminoácido oxidasas de serpientes. Adicionalmente, se describen las secuencias, y algunas características biológicas y bioquímicas, de seis miembros de la familia de toxinas de tres dedos (Ms1-5 y Ms11), de las cuales cuatro resultan tóxicas para peces (sus presas naturales) y únicamente dos (Ms1 y Ms3) resultan tóxicas contra mamífero.

En 2009 (Dokmetjian et al., 2009) se describen las características del veneno de *M. pyrrhocryptus* -lo que la convierte en la primera especie sudamericana cuyo veneno fue caracterizado en un nivel relativamente elevado-. Un porcentaje importante de los componentes (aunque resulta difícil cuantificarlos) muestran masas moleculares de entre 6,000 y 14,000 daltones con algunos componentes con masas superiores a los 20,000 da. Resulta muy importante señalar que cuatro de las doce fracciones analizadas (33%) presentan alguna secuencia homóloga a PLA2, mientras que la mayoría poseen secuencias similares a toxinas de tres dedos, lo que se relaciona con que el 71% de las fracciones probadas mostraron alguna

capacidad de unión con el receptor nicotínico de acetilcolina y sugiere la presencia de una amplia variedad de alfa neurotoxinas. Adicionalmente, se establece la secuencia completa de D1, la primer alfa neurotoxina corta de un coralillo sudamericano.

En 2009, se publica el análisis transcriptómico (análisis de los RNA mensajeros presentes en un tejido y en un momento dado) de la glándula venenosa de *M. corallinus* (Leão et al., 2009). El 46.2% del total de transcritos corresponden a proteínas involucradas en procesos metabólicos (como es de esperarse en un tejido activo), mientras que 45.9% del total corresponden a proteínas relacionadas a toxinas. Dentro de los transcritos relacionados a toxinas, los más abundantes corresponden a toxinas de tres dedos (24.0%), PLA2 (15.3%) y lectinas tipo C (4.8%). Resulta interesante notar que ninguna de las funciones celulares catalogadas alcanza un porcentaje mayor al 20% del total de transcritos de esta glándula.

En 2010 se describen las masas y las secuencias completas de cuatro neurotoxinas asiladas del veneno de *Micrurus frontalis* (Moreira et al., 2010), algunas de las cuales (MfTxII, MfTxIII y MfTxIV) son capaces de disminuir el tamaño y la frecuencia de los potenciales miniatura de placa terminal de manera similar a la δ -tubocurarina.

En 2011, se describen las composiciones de los venenos de *M. frontalis*, *M. lemniscatus* y *M. ibiboboca* (Ciscotto et al., 2011). Similar a lo reportado para otras especies del género, la mayoría de los componentes (más del 70% del total de masas) se ubican por debajo de los 10,000 daltones, mientras que entre 14 y 20% (dependiendo de la especie) corresponde a masas de entre 12,000 y 14,000 daltones. Las secuencias obtenidas de algunos componentes los ubican dentro de la toxinas de tres dedos, fosfolipasas A2, algunos miembros de metaloproteasas, lectinas tipo C y L-amino ácido oxidasas.

En el mismo año se reporta un extenso trabajo de relación entre la venómica (análisis de las proteínas presentes en un veneno en un momento dado) y la transcriptómica de *Micrurus altirostris* y *M. corallinus* (Correa-Neto et al., 2011). El análisis proteómico muestra que más del 75% del total de secuencias obtenidas corresponden a miembros de las toxinas de tres dedos; las fosfolipasas A2 representan cerca del 15% del total y el resto se encuentra representado por enzimas diversas (metaloproteasas, Serino proteasas, enzimas tipo trombina, L-amino ácido oxidasas).

El análisis transcriptómico de la glándula de *M. altirostris* muestra que, a diferencia de lo reportado para *M. corallinus* (Leão, Ho et al., 2009), los transcritos identificados con proteínas tóxicas rebasan el 61% del total. Más del 52% del total de transcritos pertenecen al grupo de toxinas de tres dedos, mientras que ninguno de los otros grupos de toxinas (PLA2, péptidos tipo

Kunitz, lectinas tipo C, metaloproteasas, etc.) rebasa el 3% del total (Correa-Neto, Junqueira-de-Azevedo et al., 2011).

También en 2011, se publica la comparación del análisis proteómico de venenos de *M. mipartitus* provenientes de Colombia y Costa Rica (Rey-Suárez et al., 2011). La muestra de Colombia presenta 61.1% de toxinas de tres dedos y 29% de PLA2, mientras que la muestra de Costa Rica presenta 83% de péptidos relacionados a toxinas de tres dedos y tan solo 8.2% de PLA2. En ambos casos, ninguno de los otros tipos de toxinas (péptidos tipo Kunitz, lectinas tipo C, metaloproteasas, L-aminoácido oxidasas y serinoproteasas) rebasan el 4% el total.

A diferencia de los resultados obtenidos para la mayoría de las especies sudamericanas, el veneno de *M. nigrocinctus* (Costa Rica), posee una mayor proporción de PLA2 (48%) que de toxinas de tres dedos (38%) además de una importante variedad de otras proteínas (metaloproteasas, toxina tipo-Ohanina, lectinas tipo C, L-aminoácido oxidasas y nucleotidasas) (Fernandez et al., 2011).

En 2012 se describe la caracterización de Mipartoxina-I, un nuevo miembro de las toxinas de tres dedos aislada del veneno de *M. mipartitus* (Rey-Suárez et al., 2012). La letalidad (0.06 $\mu\text{g/g}$), masa (7030.0 da), secuencia y capacidad de bloqueo de la preparación neuromuscular (0.1 y 0.5 $\mu\text{g/ml}$) identifican a esta proteína como un miembro canónico de las alfa neurotoxinas de serpiente.

1.7 Antivenenos contra serpientes de coral

Los antivenenos son el único tratamiento eficaz para tratar los envenenamientos por especies ponzoñosas. Sin embargo, el desarrollo y mejoramiento de antivenenos contra coralillo ha tenido un desarrollo muy lento en los últimos 50 años debido, entre otras cosas, a la dificultad de obtener cantidades suficientes de venenos. El cuadro 3 muestra un resumen de los diferentes antivenenos obtenidos durante estos años.

Al igual que sucedió con los antivenenos contra vipéridos del continente americano, el primer antiveneno contra serpientes de coral fue desarrollado en Brasil en lo que hoy es el Instituto Butantan. La mezcla utilizada desde entonces para inmunizar caballos incluye los venenos de las dos especies de mayor importancia epidemiológica en el país: *Micrurus frontalis* y *M. corallinus*.

Los primeros trabajos de reacción y protección cruzada se iniciaron a finales de la década de 1960, junto con el desarrollo de nuevos sueros mono y polivalentes. En 1966 se demuestra que diferentes subespecies de *M. frontalis*, de varias regiones de Argentina,

reaccionaban con el suero del Butantan dando lugar a diferentes líneas de precipitación, comprobando así la existencia de antígenos comunes, con identidad total o parcial, y la existencia de antígenos no comunes entre los distintos taxa (Barrio y Miranda, 1966).

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

En 1967, se estudia la capacidad neutralizante de sueros de conejos inmunizados contra venenos de *M. f. fulvius*. Los resultados mostraron que el veneno es capaz de generar una elevada respuesta específica, con una potencia neutralizante de 38 DL50/ml, y sugieren que las neurotoxinas de diferentes especies pueden generar respuestas antigénicas diferentes.

En 1971 se obtuvo un suero de cabra contra el veneno de *M. f. fulvius* (Kocholaty et al.). Para 1975 el Instituto Clodomiro Picado, en Costa Rica, ya producía un antiveneno en caballos (inmunoglobulinas precipitadas con sulfato de amonio) contra los venenos de *M. nigrocinctus* y *M. alleni* (Bolaños et al., 1973) que no sólo neutralizaba los venenos homólogos sino también el de *M. f. fulvius* y el de *M. dumerilii carinicauda*³ pero no el de *M. mipartitus*; dos años después, los mismos autores (Bolaños et al. 1975) logran obtener un antiveneno de caballo contra el veneno de *M. mipartitus hertwigi* que muestra un buen grado de neutralización contra los venenos de las especies antes señaladas.

En 1978 (Bolaños et al., 1978) se plantea la idea de que los venenos de diferentes especies de coralillos pueden dividirse en tres grupos dependiendo del grado en el que son reconocidos por un antiveneno. A estos grupos se les llama grupos antigénicos y se propone que la inclusión de una especie representativa de cada uno de ellos en una mezcla antigénica para inmunización produciría los anticuerpos necesarios para neutralizar a los miembros restantes de su grupo.

³ En diferentes artículos se reporta esta especie como *M. carinicauda dumerilii*, sin embargo debido a cambios taxonómicos ahora es conocida como *M. dumerilii carinicauda*

Cuadro 3. Comparación de potencias neutralizantes entre los diferentes antivenenos contra serpiente de coral reportados desde 1967 hasta 2013

País	Tipo	Huésped	Conc. Prot. (mg/ml)	Antígeno	Venenos retados	Potencia		Referencia
						DL50/ml	mgV/ml	
EUA	E. Suero	Conejo	?	<i>M. fulvius</i>	<i>M. fulvius</i> (13 IP)	38.0	0.494	Cohen et. al., 1967
EUA	E. Suero	Conejo	100	<i>M. fulvius</i>	<i>M. fulvius</i> (6 IV)	80.0	0.480	Flowers et al., 1966
Brasil	C. Ig SA	Caballo	100	<i>M. corallinus</i> <i>M. frontalis</i>	<i>M. fulvius</i> (6 IV)	80.0	0.480	
EUA	E. Suero	Conejo	?	<i>M. fulvius</i>	<i>M. c. dumerilii</i> (11.9 IP)	23.5	0.240	Cohen et. al., 1968
					<i>M. fulvius</i> (10.2 IP)	19.9	0.260	
	E. Suero	Conejo	Nota 1	<i>M. c. dumerilii</i>	<i>M. c. dumerilii</i> (11.9 IP)	42.4	0.530	
					<i>M. fulvius</i> (10.2 IP)	18.4	0.210	
EUA	E. Ig SA	Cabra	?	<i>M. fulvius</i> (Nota 2)	<i>M. fulvius</i> (16 IP)	20-25	0.32- 0.40	Kocholaty et al., 1971
Costa Rica	E. Ig SA	Caballo	0.1	<i>M. mipartitus</i>	<i>M. alleni</i> (12 IP)	6.3	0.075	Bolaños et al., 1975
				(Nota 3)	<i>M. c. dumerilii</i> (17.5 IP)	14.3	0.250	
					<i>M. fulvius</i> (8.6 IP)	5.8	0.050	
					<i>M. m. anomalus</i> (2)	62.5	0.125	
					<i>M. mipartitus hertwigi</i> (23 IP)	19.6	0.450	
					<i>M. nigrocinctus</i> (14.4 IP)	3.5	0.050	
	C. Ig SA	Caballo	0.1	<i>M. alleni</i>	<i>M. alleni</i> (12 IP)	39.6	0.475	
				<i>M. nigrocinctus</i>	<i>M. c. dumerilii</i> (17.5 IP)	42.9	0.750	
					<i>M. fulvius</i> (8.6 IP)	17.4	0.150	
					<i>M. m. anomalus</i> (2)	-	-	
					<i>M. mipartitus hertwigi</i> (23 IP)	3.3	0.075	
					<i>M. nigrocinctus</i> (14.4 IP)	27.8	0.400	

Cuadro 3. Continuación...

País	Tipo	Huésped	Conc.Prot. (mg/ml)	Antígeno	Venenos retados	Potencia		Referencia
						DL50/ml	mgV/ml	
Costa Rica	E. Ig SA	Caballo	0.1	<i>M. m. hertwigi</i> <i>M. nigrocinctus</i> <i>M. pyrrochryptus</i>	<i>M. alleni</i> (12 IP)	17.0	0.200	Bolaños et al., 1978
					<i>M. c. dumerilii</i> (17 IP)	59.0	1.000	
					<i>M. corallinus</i> (20-25 IP)	75.0	1.500	
					<i>M. fulvius</i> (9 IP)	44.0	0.400	
					<i>M. lemniscatus</i> (5 IP)	120.0	0.600	
					<i>M. mipartitus hertwigi</i> (23 IP)	9.0	0.200	
					<i>M. nigrocinctus</i> (13 IP)	46.0	0.600	
					<i>M. pyrrochryptus</i> (15-20 IP)	27.0	0.400	
					<i>M. spixii</i> (10-15 IP)	30.0	0.300	
				<i>M. surinamensis</i> (5-10 IP)	20.0	0.100		
EUA	E. Fab	Oveja	100	<i>M. fulvius</i>	<i>M. fulvius</i> (10.65 IV)	385	1.110	Rawat et. al., 1994 (Nota 4)
EUA	C. Ig	Caballo	37.9	<i>M. fulvius</i>	<i>M. fulvius</i> (10.65 IV)	-	-	
Brasil	C. F(ab)'2	Caballo	80	<i>M. corallinus</i> <i>M. frontalis</i>	<i>M. fulvius</i> (10.65 IV)	-	-	
Costa Rica	C. IgG AC	Caballo	18	<i>M. nigrocinctus</i>	<i>M. nigrocinctus</i>		0.500	Arce et. al., 2003
					<i>M. fulvius</i> (6 IV)	39.4	0.241	
México	C. F(ab)'2	Caballo	40	<i>M. nigrocinctus</i>	<i>M. fulvius</i> (17 IP)			Wisniewski et al., 2003
México	C. F(ab)'2	Caballo	40	<i>M. nigrocinctus</i>	<i>M. fulvius</i> (10.6 IP)	76.9	0.812	de Roodt et al, 2004
					<i>M. nigrocinctus</i> (18.7 IP)	47.6	0.890	
					<i>M. surinamensis</i> (8.4 IP)	< 6	< 0.050	
					<i>M. pyrrochryptus</i> (28.6 IP)	< 6	< 0.172	
Argentina	C. F(ab)'2	Caballo	55	<i>M. pyrrochryptus</i>	<i>M. fulvius</i> (10.6 IP)	7.8	0.082	
					<i>M. nigrocinctus</i> (18.7 IP)	24.4	0.256	
					<i>M. surinamensis</i> (8.4 IP)	83.3	0.875	
					<i>M. pyrrochryptus</i> (28.6 IP)	34.1	0.358	

Cuadro 3. Continuación...

País	Tipo	Huésped	Conc.Prot (mg/ml)	Antígeno	Venenos retados	Potencia		Referencia
						DL50/ml	mgV/ml	
México	C. F(ab)'2	Caballo	40	<i>M. nigrocinctus</i>	<i>M. browni</i> (6.1 IV)	490	3.333	Carbajal- Saucedo, 2004
					<i>M. diastema</i> (5.1 IV)	108	0.546	
					<i>M. distans</i> (15 IV)	75	1.124	
					<i>M. fulvius</i> (11.5 IV)	49	0.562	
					<i>M. laticollaris</i> (13 IV)	37	0.476	
					<i>M. limbatus</i> (19.9 IV)	27	0.529	
					<i>M. nigrocinctus</i> (11.5 IV)	280	3.226	
México	C. F(ab)'2	Caballo	40	<i>M. nigrocinctus</i>	<i>M. fulvius</i> (5.6 IV)	98.2	0.550	Sánchez et al., 2008
					<i>M. tener</i> (15.6 IV)	71.6	1.117	
EUA	C. IgG	Caballo		<i>M. fulvius</i>	<i>M. fulvius</i> (5.6 IV)	42.7	0.239	
					<i>M. tener</i> (15.6 IV)	< 4.9	< 0.076	
México	E. Suero	Caballo	94.5	<i>M. laticollaris</i>	<i>M. browni</i> (11.1 IV)	227	2.512	Bénard-Valle, 2010
					<i>M. diastema</i> (5.1 IV)	164	0.829	
					<i>M. distans</i> (15 IV)	60-75	0.9-1.12	
					<i>M. ephippifer</i> (24.5 IV)	40	0.971	
					<i>M. fulvius</i> (11.5 IV)	23	0.262	
					<i>M. laticollaris</i> (13 IV)	44	0.440	
					<i>M. latifasciatus</i> (10 IV)	< 12	< 0.150	
					<i>M. limbatus</i> (19.9 IV)	< 12	< 0.239	
					<i>M. nigrocinctus</i> (11.5 IV)	17	0.190	
<i>M. tener</i> (22.7 IV)	< 9	< 0.195						

País: Lugar en el que se originó el antiveneno

C = Comercial

E = Experimental

Suero = Suero completo

IgSA = Inmunoglobulina completa purificada por precipitación con sulfato de amonio

Fab = Fragmento de anticuerpo

F(ab')₂ = Fragmento de anticuerpo

Antígeno = Veneno(s) utilizado(s) para generar la mezcla antigénica usada para la producción del antiveneno

Venenos de reto = Especies que no fueron incluidas dentro de la mezcla antigénica y utilizadas para comprobar la potencia neutralizante

Potencia = Capacidad neutralizante del antiveneno. Se expresa como cantidad de DL50 neutralizadas por volumen de antiveneno (DL50/ml) y también como masa de veneno (mg) neutralizada por volumen de antiveneno (mg/ml)

NOTA 1. El suero de conejo anti-*M. carnicauda dumerilii* fue resuspendido en 40% del volumen inicial debido al bajo título neutralizante que presentaba su versión original. La potencia neutralizante aquí mostrada se refiere a este concentrado y por tanto los valores deben dividirse entre 2.5 para obtener la potencia real.

NOTA 2. Veneno detoxificado 18 veces por foto oxidación

NOTA 3. Los autores no especifican si el antígeno se trata de *M. mipartitus anomalus* o *M. mipartitus hertwigi* o una mezcla de ambos.

NOTA 4. La potencia neutralizante que aquí se muestra corresponde únicamente a la sangría 14 (64 semanas de inmunización). La sangría 7 (34 semanas) muestra una potencia neutralizante cuatro veces menor.

El antiveneno obtenido a partir de una mezcla equivalente de los venenos de *M. nigrocinctus*, *M. frontalis* y *M. mipartitus* es capaz de neutralizar los venenos de *M. f. fulvius*, *M. nigrocinctus*, *M. d. carinicauda*, *M. frontalis*, *M. corallinus*, *M. spixii* y *M. lemniscatus*, todos ellos miembros de los grupos 1 y 2, de los cuales, *M. nigrocinctus* y *M. frontalis* son los representantes. Sin embargo, los venenos de *M. mipartitus* y *M. alleni* resultan neutralizados con baja potencia, mientras que el veneno de *M. surinamensis* no pudo ser neutralizado. Los resultados que arroja este trabajo no sólo ayudaron a la obtención de un antiveneno de mayor espectro sino que también aportan evidencias de la existencia de componentes tóxicos que no son fácilmente neutralizables.

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

En 1995, en Brasil (Higashi et al., 1995), se produjeron tres antivenenos monovalentes en caballo contra los venenos de *M. spixii*, *M. corallinus* y *M. frontalis* y un bivalente contra una mezcla de *M. corallinus*-*M. frontalis*. Las pruebas de neutralización demuestran que en todos los casos los antivenenos monovalentes presentan mayor potencia neutralizante contra los venenos homólogos que el antiveneno bivalente contra los mismos venenos (neutralizan entre 50 y 70% mayor cantidad de veneno por mililitro de antiveneno).

En 2001 (Prieto da Silva et al., 2001) utilizando los antivenenos producidos seis años antes (Higashi et al., 1995), se muestra (por western blot) la existencia de epítopes comunes en los venenos de diferentes especies de coralillos sudamericanos e incluso se muestra reactividad cruzada contra venenos de *Dendroaspis*, *Notechis*, *Bungarus*, la cardiotoxina de *Naja kouthia* (subfamilia Elapinae) y algunos componentes de los venenos de *Crotalus durissus terrificus* y *Bothrops jararaca* (familia Viperidae).

Entre 1995 y 2006, aproximadamente, se comercializó en México un antiveneno generado con venenos de *Micrurus nigrocinctus* (probablemente *M. n. nigrocinctus* y *M. n. mosquitensis*) de origen equino (Coralmyn). Sin embargo, es hasta 2003 que se demuestra la efectividad de este antiveneno contra veneno de *M. fulvius* (Wisniewski et al., 2003). También en 2003 se muestra que el antiveneno producido en Costa Rica es capaz de neutralizar el

veneno de *M. fulvius* con una potencia de 39.4 DL50/ml de antiveneno (Arce et al., 2003).

En 2004 se muestra que un antiveneno generado contra *M. pyrrhocryptus* neutraliza el veneno de *M. surinamensis* con una potencia 2.4 veces mayor comparada con la potencia contra el veneno homólogo, mientras que la potencia contra venenos norteamericanos resulta entre tres y cinco veces menor a la homóloga. Adicionalmente, el antiveneno generado contra veneno de *M. nigrocinctus* neutraliza veneno de *M. fulvius* con la misma potencia que la mostrada contra veneno homólogo mientras que la potencia neutralizante contra especies sudamericanas resulta entre seis y veinte veces menor comparada con el homólogo (de Roodt et al., 2004).

En 2008, la compañía Wyeth detiene la producción del antiveneno contra serpientes de coral que producía desde 1967. La búsqueda de antivenenos que suplan a este producto lleva a la determinación de la potencia neutralizante de Coralmyx contra las dos especies de coralillos de importancia médica en Estados Unidos. La potencia resultante de Coralmyx fue 2.3 y 14.6 veces mayor que la mostrada por el antiveneno de Wyeth contra venenos de *M. fulvius* y *M. tener*, respectivamente (98.2 y 71.6 DL50/ml de Coralmyx contra 42.7 y 4.9 DL50/ml de Wyeth) (Sánchez et al., 2008)

En 2011, incluyendo a los antivenenos contra coral dentro de la tendencia "ómica", se analiza la modificación en perfil proteómico de veneno de *M. nigrocinctus* al ser incubado con antiveneno específico. Los resultados revelan que los anticuerpos reconocen primordialmente componentes de altos pesos moleculares que posiblemente no están implicados en la letalidad del veneno. Este resultado sugiere un importante cambio de estrategia en el desarrollo de antivenenos para dirigirlo contra toxinas poco inmunogénicas.

El trabajo que aquí se presenta pretende establecer algunas características biológicas, bioquímicas e inmunoquímicas del veneno de *M. laticollaris*, una especie endémica de la depresión del Balsas cuyo veneno es difícilmente neutralizado por el antiveneno comercial. Los resultados que se muestran pueden formar la base para el mayor entendimiento de la fisiopatología del envenenamiento por serpiente de coral y permitir el desarrollo y mejoramiento de los antivenenos actuales.

2. Hipótesis

Sólo una baja proporción de los componentes del veneno de *M. laticollaris* cumplen una función activa durante el envenenamiento. Por lo tanto, el desarrollo de un antiveneno con adecuada potencia neutralizante debe contener una elevada proporción de anticuerpos capaces de reconocer y neutralizar a las toxinas relevantes en la fisiopatología del envenenamiento.

3. Objetivo general

Determinar el nivel de reconocimiento y neutralización de los antivenenos hacia los componentes letales más importantes del veneno de *M. laticollaris*.

Objetivos particulares

- Determinar algunas actividades biológicas del veneno de *Micrurus laticollaris*
- Identificar las toxinas más importantes (mayor letalidad y/o proporción) del veneno de *M. laticollaris*
- Generar un antiveneno experimental en caballo contra el veneno de *M. laticollaris*
- Determinar el nivel de reconocimiento y neutralización de los antivenenos hacia el veneno y toxinas específicas de *M. laticollaris*.
- Determinar la capacidad de neutralización heteróloga de los antivenenos obtenidos

4. Materiales y Métodos

4.1 Serpientes

Se utilizaron un total de siete ejemplares de *Micrurus laticollaris* capturados en la zona sur (n = 3) y norte (n = 1) del Estado de Morelos así como en los Estados de Guerrero (n = 2) y Michoacán (n = 1). Los animales fueron mantenidos en peceras y alimentados cada 30 días con un ejemplar de *Conopsis sp.* (culebra borreguera). El agua era reemplazada cada tres días. Los cuerpos de los ejemplares muertos fueron preservados en etanol y forman parte del catálogo de la colección Herpetario Kiinam⁴

4.2 Veneno

El material fue obtenido por ordeña directa obligando a los especímenes a morder una cucharilla previamente lavada y esterilizada cubierta con parafilm. El veneno fue recuperado en acetato de amonio 20 mM pH 4.7 y centrifugado a 13,000 rpm durante un minuto. El sobrenadante fue congelado inmediatamente, liofilizado y almacenado a 4° C hasta su utilización.

4.3 Geles

Los venenos y las toxinas fueron corridos en geles de poliacrilamida-bis acrilamida (39:1) en presencia de lauril sulfato de sodio (Laemmli, 1970). Las muestras fueron mezcladas con agua desionizada y buffer de carga (10% glicerol + 2.5% SDS + 50 mM Tris-HCl, pH 6.8 + 5% 2-mercaptoetanol + 0.02% azul de bromofenol) en un volumen total de 20 μ l, incubadas 5 min en agua hirviendo y cargadas en el gel. La corrida se realizó a 70V por 30 min seguida de 130V por 2 hrs. Los geles fueron teñidos (25% Isopropanol + 10% Acido Acético + 0.2% Azul de Coomasie R250) por 24 hrs y lavados con solución de destinción (10% isopropanol+ 10% de Acido Acético) para revelar las bandas proteicas.

4.4 Histología.

Corazón, riñón, pulmón e hígado de animales control y aquéllos a los que fueron administrados veneno o fracciones, fueron fijadas en buffer formalina (4%) durante 24 hrs para ser procesadas por métodos estandarizados y embebidas en parafina para ser posteriormente seccionadas. Las placas (6-8 μ m de espesor) de cada órgano fueron montadas en laminillas precubiertas con poli-L-lisina y teñidas con hematoxilina-eosina. Este trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Armando Pérez Torres, Facultad de Medicina, UNAM.

⁴ Herpetario Kiinam fue aceptado dentro del padrón de colecciones científicas de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales el 13 de Octubre de 2008 con el número de permiso DF-REP-208-10-08 bajo responsabilidad del autor de este escrito.

4.5 Acción sobre la unión neuromuscular

NOTA IMPORTANTE: los experimentos correspondientes a los apartados 4.5, 4.6 y 4.7 se realizaron en el "Laboratorio da Junção Neuromuscular", Universidade de Campinas, Campinas Brasil, bajo la dirección de la Dra. Lea Rodrigues Simioni.

Ratones machos de entre 25 y 30 g (Swiss, Centro Multidisciplinario para la InvestigaçãO Biológica, Campinas, Brasil) fueron sacrificados por inhalación de isofluorano (Abbott) y utilizados para aislar la preparación nervio frénico-diafragma por métodos convencionales. La preparación fue sumergida en buffer Tyrode (NaCl 137mM, KCl 2.7mM, CaCl₂ 1.8mM, NaH₂PO₄ 0.49mM, KH₂PO₄ 0.42mM, NaHCO₃ 11.9mM, glucosa 11.1mM) con aireación constante de O₂/CO₂ (95/5%) y colocada en cubeta de 5 ml. El músculo fue sometido a una tensión inicial de 5g. El nervio frénico se estimuló por medio de electrodos bipolares utilizando un estimulador Grass S88 (3V, 0.12Hz, 0.2ms). Las respuestas obtenidas por medio de un transductor isométrico fueron graficadas en un fisiógrafo Gould Universal Amplifier RS3400 (Gould Inc, OH, EUA).

4.6 Potencial de reposo.

Se utilizaron hemidiafragmas de ratones macho sin nervio. La preparación fue fijada en una cubeta plástica por medio de alfileres entomológicos en un volumen final de 2 ml de buffer Tyrode. Los potenciales de membrana muscular fueron determinados por medio de un micro electrodo lleno de solución 3M KCl acoplado a un osciloscopio (Tektronix) para una mejor observación de los datos. Los potenciales fueron registrados utilizando el Software Aqdatos a diferentes tiempos (0, 5, 15, 30, 60, 90, y 120 min). La determinación de potencial de reposo se realizó tanto en presencia (5 µg/ml) como en ausencia de d-Tubocurarina (Abbott) con el fin de conocer el efecto ejercido por los receptores de acetilcolina.

4.7 Potenciales de placa terminal.

Con el fin de conocer el efecto del veneno sobre la liberación de acetilcolina se determinó la variación que existe en los potenciales de placa terminal en preparación nervio frénico-diafragma de ratón. La preparación fue aislada de ratones macho y recuperada en buffer Tyrode con aireación constante de O₂/CO₂. La preparación fue seccionada para obtener un área aproximada de 7 X 3 mm, en cuyo centro se localiza el nervio frénico, la cual fue fijada a una cubeta plástica por medio de alfileres entomológicos en un volumen total de 2 ml de buffer Tyrode. El potencial de las fibras fue determinado por medio de un micro electrodo lleno de solución 3M KCl acoplado a un osciloscopio (Tektronix) para una mejor observación de los datos. Los potenciales fueron registrados utilizando el Software Aqdatos. La estimulación del nervio fue generada por medio de un estimulador Grass S88 utilizando entre 3 y 8 V, cada 0.2 a 0.4 ms. Los registros de potencial de placa fueron adquiridos utilizando el software antes descrito. Para estimar el

tamaño cuántico (TC, potencial de placa evocado por la liberación de un quantum de acetilcolina) así como el contenido cuántico (CC, cantidad de acetilcolina que genera un potencial de placa terminal) se siguió la metodología descrita por Dal Belo (2004). Básicamente, el TC y el CC pueden ser calculados con base en la varianza de las amplitudes de los potenciales de placa terminal, bajo el supuesto que éstos siguen la distribución de Poisson

4.8 Cromatografía de intercambio iónico.

Se utilizó un equipo FPLC (Pharmacia), columna Mono S HR 5/5 (código 17-0547-01) bajo un flujo de 1 ml/min. El amortiguador acetato de amonio 50 mM pH 4.7 fue usado como buffer de equilibrio y carga (Buffer A) mientras que la elusión se realizó con acetato de amonio 50 mM pH 4.7 + 2M NaCl (Buffer B) en cuatro etapas: 5 minutos sin presencia de buffer B seguidos de 80 minutos en gradiente lineal de 0 a 60% B, seguido de un aumento a 80% B en diez minutos, para terminar con un aumento al 100% en 5 minutos. Las fracciones se dializaron contra acetato de amonio 20 mM pH 4.7, se liofilizaron y se guardaron a -20° C hasta su utilización.

4.9 Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC).

Las fracciones obtenidas por intercambio catiónico en columna MonoS se re-cromatografiaron en columna C18 (Vydac, 250mm longitud, 4.6 mm diámetro interno, 7 μ m tamaño de partícula, cat# 218TP104) en equipo HPLC serie 1100 (Agilent). Todas las muestras se corrieron bajo gradiente lineal de acetonitrilo de 0-60% en 60 min con una velocidad de flujo de 1 ml/min. Los picos resultantes fueron colectados a mano, secados por centrifugación al vacío en Savant y almacenados a -20° C hasta su utilización. Bajo esta metodología se obtuvo, entre otras toxinas, la proteína MlatA1, cuya caracterización fue el tema principal del artículo que acompaña a esta tesis.

4.10 Actividad fosfolipasa.

Se determinó siguiendo método título métrico reportado por Shiloah y colaboradores (1973). Básicamente, se ajustó el pH de una solución de yema de huevo 10% (0.1 M NaCl, 0.01M CaCl_2 , 0.5% Triton X100) a un valor entre 8.1 y 8.15, con NaOH 0.05 M. Una vez ajustado el pH, se añadieron las muestras de veneno o fracción (diferentes volúmenes desde 1 hasta 50 μ l a diferentes concentraciones) y se buscó mantener el valor de pH por encima de 8 adicionando volúmenes constantes de NaOH 0.05M cronometrando el tiempo necesario entre una adición de NaOH y la siguiente. Una Unidad enzimática fue definida como μ moles de NaOH consumidos por minuto (μ mol NaOH/min).

4.11 Actividad proteolítica sobre gelatina

Se determinó utilizando geles de poliacrilamida (17%) copolimerizados con gelatina (1.5 mg/ml; BioRad). El corrimiento en gel se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.3

en condiciones no reductoras y cargando 20 μg por carril. Al finalizar, los geles se lavaron tres veces con buffer Tris/HCl 0.1 M pH 8 con concentraciones decrecientes de Triton X100 (5, 0.5 y 0%) por treinta minutos (por lavado). Finalmente el gel fue teñido y desteñido siguiendo la metodología antes descrita.

4.12 Actividad defibrinogenante

Diferentes cantidades de veneno (desde 2 hasta 100 μg) disueltas en un volumen final de 0.5 ml de acetato de amonio 20 mM pH 4.7 (por ratón) fueron administradas por vía intraperitoneal en ratones (CD1, 18 a 20g). Luego de 60 minutos, se tomaron muestras de sangre del seno ocular (aproximadamente 200 μl). Los capilares fueron quebrados a la mitad luego de una hora de incubación a temperatura ambiente. La dosis mínima defibrinogenante se definió como la cantidad de veneno necesaria para impedir la formación de un coágulo evidente (de Roodt, 2002).

4.13. Actividad hemorrágica

Diferentes cantidades de veneno (desde 2 hasta 100 μg) disueltas en un volumen final de 0.05 ml de acetato de amonio 20 mM pH 4.7 fueron administradas por vías intradérmica sobre el lomo rasurado de ratones (CD1, 20-22 g). Luego de 3 hrs de incubación, los ratones fueron sacrificados por inhalación de CO₂ y los pieles retiradas para medir los halos hemorrágicos (de Roodt, 2002).

4.14 Letalidades.

La determinación preliminar de la potencia del veneno o de fracciones específicas se realizó inyectando, por vía intravenosa, diferentes cantidades de veneno o fracción en cuatro grupos de tres ratones cada uno. Una vez delimitada, el cálculo fino se realizó utilizando cinco grupos de cinco ratones por dosis (CD-1 de entre 18 y 20 g de peso); la toma de los datos se realizó a las 24 hrs. Los datos se trabajaron en el programa Graph Pad Prism 4.0 tomando el porcentaje de mortalidad en función del logaritmo de la cantidad de veneno. La dosis letal media (DL50) se definió como la cantidad de veneno o fracción capaz de matar el 50% de una población de ratones.

4.15 Proteólisis y secuenciación.

La proteólisis se realizó utilizando Tripsina y endoproteasas, Asp-N o Glu-C (Roche). Básicamente alrededor de 50 nmoles de péptido (distintas fracciones obtenidas por RP-HPLC) se incubaron en 100 μl de carbonato de amonio 25 mM pH 7.8 en presencia de enzima (1:20 enzima:sustrato) a temperatura ambiente durante toda la noche. Posteriormente se incubaron 115 minutos a 50° C en presencia de DTT para inmediatamente después pasar la muestra por RP-HPLC, descrito anteriormente. La secuencia de aminoácidos se obtuvo por degradación de Edman en un secuenciador Beckman LF 3000.

4.16 Análisis proteómico.

Las fracciones de MonoS fueron corridas en gel de dos dimensiones y teñidas con azul brillante de Coomassie. Estos puntos fueron desteñidos, reducidos, carboximetilados, digeridos con tripsina y extraídos del gel utilizando métodos estándar (Kinter & Sherman, 2000). Los volúmenes de los extractos fueron ajustados a 20 μ l con 1% ácido fórmico. Los puntos reactivos fueron sometidos a análisis de masa utilizando un sistema 3200 QTRAP (Applied Biosystems/MDS Sciex, Ontario, Canada), equipado con una fuente de nanoelectrospray y un sistema de LC de nano flujo (Agilent 1100 Nano Pump, Waldbronn, Germany). Los iones precursores fueron seleccionados en Q1, fragmentados (por CAD) en Q2 y analizados en Q3. La búsqueda en bases de datos (Swiss-Prot, NCBIInr, or MSDB) y la identificación de proteínas fueron realizadas utilizando el programa MASCOT (<http://www.matrix.science.com>). Los experimentos realizados en esta sección se llevaron a cabo por el Dr. Guillermo Mendoza Hernández, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

4.17 Determinación de masas por ESI.

Las fracciones fueron disueltas en 50% acetonitrilo/0.1% TFA y aplicadas a un espectrómetro de masas ESI-IT LCQ (Thermo Electron, San Jose, CA) con una fuente de nanospray. Los espectros MS/MS de los péptidos generados enzimáticamente fueron analizados manualmente y utilizando el programa SEQUEST. Los resultados de esta sección fueron obtenidos por la Unidad de Proteómica del IBt.

4.18 Antivenenos.

Durante la realización de este trabajo se generaron dos antivenenos experimentales:

- a) Suero de caballo anti-veneno completo. Se utilizó una yegua de 450 kg para la producción de un suero hiperinmune (concentración de proteína = 94.5 mg/ml) contra el veneno completo de *M. laticollaris*, siguiendo el esquema que se muestra en el anexo 1.
- b) Suero de conejo anti-MlatA1 (toxina purificada, ver sección 4.9). Se utilizaron dos conejos New Zeland White entre 2.5 y 3 kg, para obtener un suero hiperinmune contra la toxina MlatA1 siguiendo el esquema que se muestra en el anexo 2. El suero de conejos mostró una buena capacidad de reconocimiento *in vitro* (títulos superiores a 1:18000), sin embargo no mostró ninguna capacidad neutralizante contra dicha toxina o el veneno completo.

Adicionalmente, se utilizó el antiveneno comercial Coralmyn (Lote B2D06), elaborado por Instituto Bioclon, con fines comparativos. Este antiveneno se distribuye en forma liofilizada y está constituido por fragmentos F(ab')₂ obtenidos por digestión enzimática (con pepsina) del plasma de caballos hiperinmunizados con veneno completo de *Micrurus nigrocinctus* (concentración de proteína = 56.4 mg/ml).

4.19 Neutralización.

La capacidad neutralizante preliminar de los antivenenos fue probada en cuatro grupos de dos o tres ratones (CD-1, de 18 a 20 g de peso) cada uno. La determinación fina se realizó en cinco grupos de cinco ratones cada uno. Una cantidad equivalente a 3DL50 de veneno o fracción se incubó con volúmenes variables del antiveneno correspondiente a 37° C durante 30 minutos antes de inyectarlos por vía intravenosa a los ratones. La lectura se realizó a las 24 hrs. El manejo de los datos se realizó en el programa Graph Pad Prism 4.0 tomando el porcentaje de supervivencia como función del logaritmo del volumen de antiveneno. La dosis efectiva media (EC50) se definió como el volumen de antiveneno necesario para evitar la muerte de la mitad de una población de ratones.

4.20 Expresión, clonación y purificación de rMlatA1.

Ambas glándulas venenosas de un ejemplar recién fallecido (HK172) fueron maceradas en 1 ml de Trizol para extraer el RNA y obtener el correspondiente cDNA siguiendo el protocolo señalado en el Anexo 3. El cDNA de diferentes alfa neurotoxinas se obtuvo utilizando el Kit 3'RACE (Gibco) mediante el primer antxPS (5' ATG AAA ACT CTG CTG CTG AC 3') que reconoce todas los miembros de esta familia por el péptido señal y el primer AUAP. La secuencia específica de MlatA1 se obtuvo utilizando el iniciador antxPMUP (5'**GGA TCC AGG ATA TGT TAC AAC CAA CAG T** 3') junto con el iniciador anxtPmlow (5'**AGA TCT ACC GTT GCA TTT GTC TGA TGT** 3'); la secuencia de MlatA1 se muestra en itálicas mientras que los sitios BamHI (en anxtPMUP) o BglII (en anxtPmlow) se muestran en negritas). El gen fue posteriormente subclonado en el vector de expresión pQE60 (Quiagen, Alemania) dentro de los sitios de restricción BamHI-BglII en la cepa *E. coli* BL21 Gold DE3 (Stratagene, Agilent). La inducción se llevó a cabo a 20° C con 10 mM IPTG por 8hrs. La proteína soluble fue obtenida utilizando el kit de extracción Bug buster® (Novagen, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La fracción soluble fue cargada en una matriz de agarosa-NiNTA con la finalidad de purificar la proteína recombinante haciendo uso de la cola de histidinas que el vector de expresión adicional en el extremo amino. La elusión de proteínas de pegado inespecífico se llevó a cabo con buffer PBS + 25 mM imidazol. La elusión de la proteína recombinante se llevó a cabo con buffer PBS + 250mM imidazol. La proteína recombinante purificada fue dializada contra concentraciones decrecientes de imidazol (de 200-0 mM) y almacenada a 4° C hasta su uso.

5. RESULTADOS

Con el fin de presentar los aspectos biológicos, bioquímicos e inmunoquímicos del veneno de *Micrurus laticollaris* y compararlos, de la manera más completa posible, con la literatura existente, esta sección se presenta en cuatro partes:

- 1) Caracterización biológica del veneno de *Micrurus laticollaris*
- 2) Separación y caracterización de los componentes de *M. laticollaris*
- 3) Reconocimiento y neutralización específica
- 4) Reconocimiento y neutralización heteróloga

Para este trabajo se utilizaron los venenos de siete ejemplares de *M. laticollaris* capturados en diversas localidades de los estados de Michoacán, Morelos y Guerrero. Actualmente, ninguno de estos animales permanece con vida. Sin embargo, sus cuerpos se mantienen preservados en alcohol en espera de ingresar al catálogo de la colección "Herpetario Kiinam" con el fin de ser utilizados en futuras referencias.

Desde 2003 y hasta 2008 se recibieron cerca de 100 ejemplares (vivos y muertos) de diversas especies de reptiles de varias regiones del país. Debido a que en esas fechas no se contaba con un registro formal de Colección Científica que amparara la posesión de los animales, se decidió solicitar dicho registro ante las autoridades correspondientes. El 7 de Octubre de 2008 se otorgó el registro de Colección Científica a Herpetario Kiinam por la Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental de la Dirección General de Vida Silvestre, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, con clave de registro D.F.-REP-208-10-08 y adicionalmente fue aceptada dentro del padrón de personas físicas y morales con capacidad de solicitar ejemplares de vida silvestre de los Centros de Investigación de Vida Silvestre (CIVS) el 4 de Marzo de 2011 (Ver anexos). Anualmente la colección envía un informe de actividades a SEMARNAT con el fin de mantener actualizado el estado legal de cada uno de los ejemplares que la conforman.

5.1 Primera parte: Caracterización biológica del veneno de *Micrurus laticollaris*

5.1.1 Actividades bioquímicas

El veneno de *M. laticollaris* no muestra actividad proteolítica sobre gelatina y tampoco muestra actividad defibrinogenante ni actividad hemorrágica (no se muestran datos).

5.1.2 Letalidad y actividades biológicas

La potencia letal, medida como dosis letal media (DL50) definida como cantidad de veneno necesario para matar al 50% de la población animal, de este veneno administrado por vía endovenosa alcanzó un valor de 9.83 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ (intervalo de confianza del 95%: 9.43-10.24).

La administración por vía endovenosa de cantidades superiores a 1DL50 provoca que los ratones pierdan, paulatinamente, fuerza motriz y terminen depositados sobre el sustrato sin responder a estímulos externos (estímulo manual). No se observa pilo erección; tampoco se muestran evidencias de dolor. Luego de unos cuantos minutos (entre 3 y 15, dependiendo de la dosis) los músculos intercostales se mueven rápidamente, evidenciando la dificultad para respirar. La muerte acontece entre 15 y 60 minutos después de la administración de veneno. Cuando se administran altas dosis (25 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ o más) es posible observar sangrado nasal y bucal así como orina color rojo oscuro (no fue posible determinar si se trata de hemoglobina o mioglobina).

El análisis macroscópico de los cadáveres no muestra daño muscular o dérmico evidente en ninguna zona corporal, aunque es posible observar una coloración blanquecina rosa pálido en la parte interna de la piel (los ratones control mostraron una coloración rosada). Dentro de la cavidad abdominal es posible observar una ligera dilatación de los vasos mesentéricos. Sólo en ratones que recibieron dosis mayores a 1DL50 es notorio observar que la vejiga contiene un líquido rojo oscuro. Otros órganos, hígado, bazo, riñones, intestinos, vesícula biliar, no muestran alteraciones macroscópicas importantes.

Dentro de la cavidad torácica se observa una coloración roja intensa en los pulmones que, dependiendo de la dosis, se manifiesta como un ligero puntilleo en algunas áreas del órgano o bien una gran mancha que abarca la totalidad del pulmón. Al ser retirados y colocados en solución salina, los pulmones se hunden hasta el fondo del recipiente (docimasia positiva) lo que sugiere un edema pulmonar agudo.

En algunos ejemplares el corazón se arresta en diástole (se muestra agrandado) y también en algunos es posible observar coágulos depositados sobre el miocardio, sin que esto signifique se hayan originado en el pericardio. Al seccionarlo el miocardio, es posible observar coágulos dentro de la arteria pulmonar.

En el análisis de las preparaciones histológicas de los distintos órganos se descartan alteraciones en bazo, músculo esquelético o piel (no se analizaron muestras de estómago, intestino o cerebro). En tanto que en el pulmón se evidencia un daño alveolar difuso

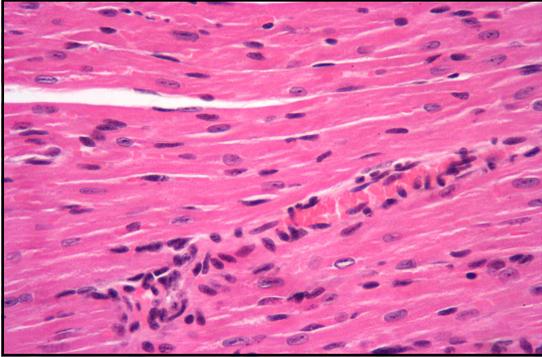
acompañado de proteinosis alveolar que podrían explicar el intenso color rojo de los pulmones.

En tejido hepático se observa un importante nivel de necrosis (evidenciada por un importante nivel de vacuolización) mientras que en riñón se muestra necrosis glomerular acompañada de una gran cantidad de material proteináceo dentro de los túbulos distales y proximales. Finalmente en tejido cardíaco se generan cambios isquémicos en la fibra que sugieren un bajo o nulo funcionamiento del miocardio (Figura 2).

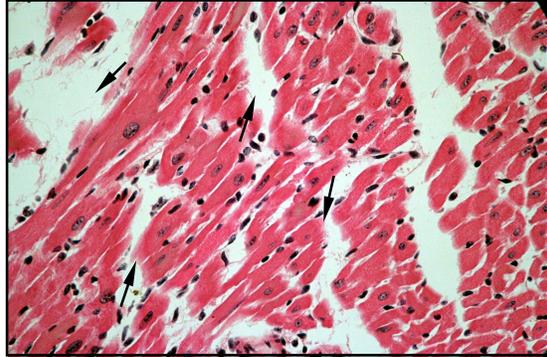
5.1.3 Actividad sobre preparación neuromuscular

En preparaciones aisladas de nervio frénico-diafragma de ratón, el veneno provoca un bloqueo irreversible dependiente de concentración (Figura 3A). Resulta importante destacar que al utilizar concentraciones de 3 y 1 $\mu\text{g/ml}$ aumenta la fuerza de contracción por un corto periodo para posteriormente dar lugar al bloqueo franco. Este resultado sugiere una actividad facilitadora de la liberación del neurotransmisor desde la terminal nerviosa, efecto que fue comprobado al determinar los niveles de acetilcolina liberados (Figura 3B). Finalmente, el veneno también provoca un importante nivel de despolarización de la membrana muscular (Figura 3C) sugiriendo un daño directo a esta estructura. No fue posible comprobar ni, en su caso, describir, el daño muscular en preparaciones histológicas.

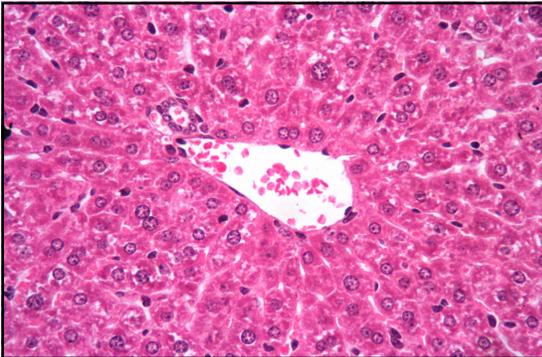
A1



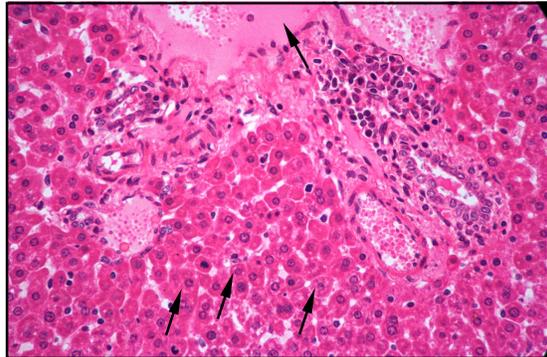
B1



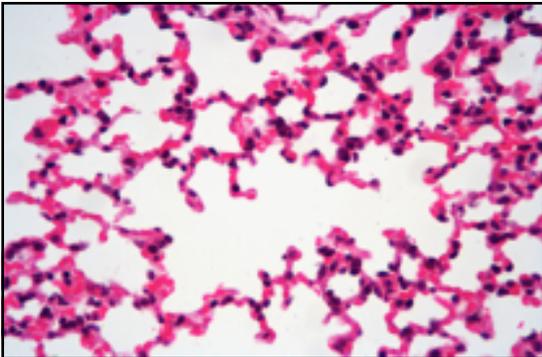
A2



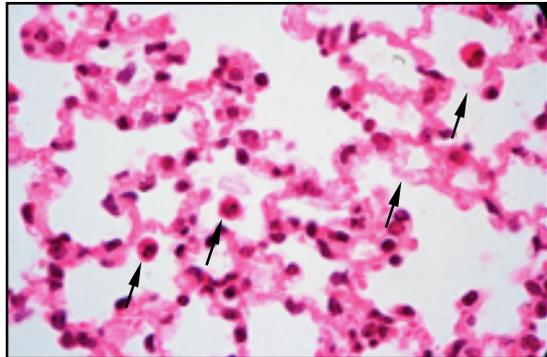
B2



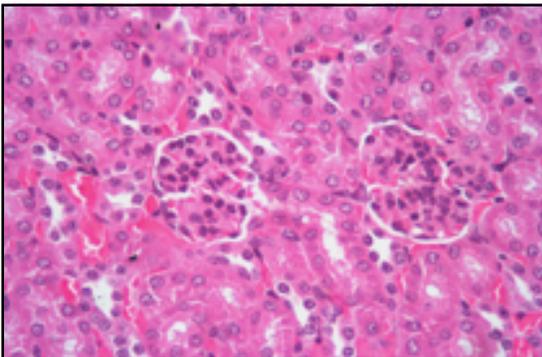
A3



B3



A4



B4

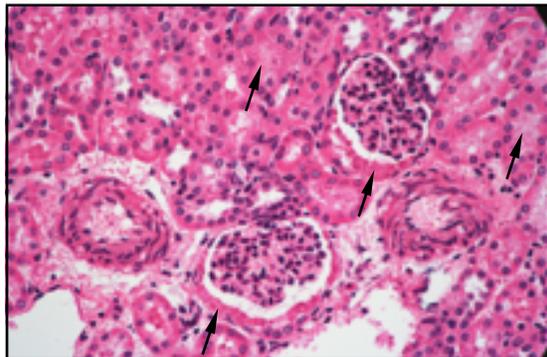
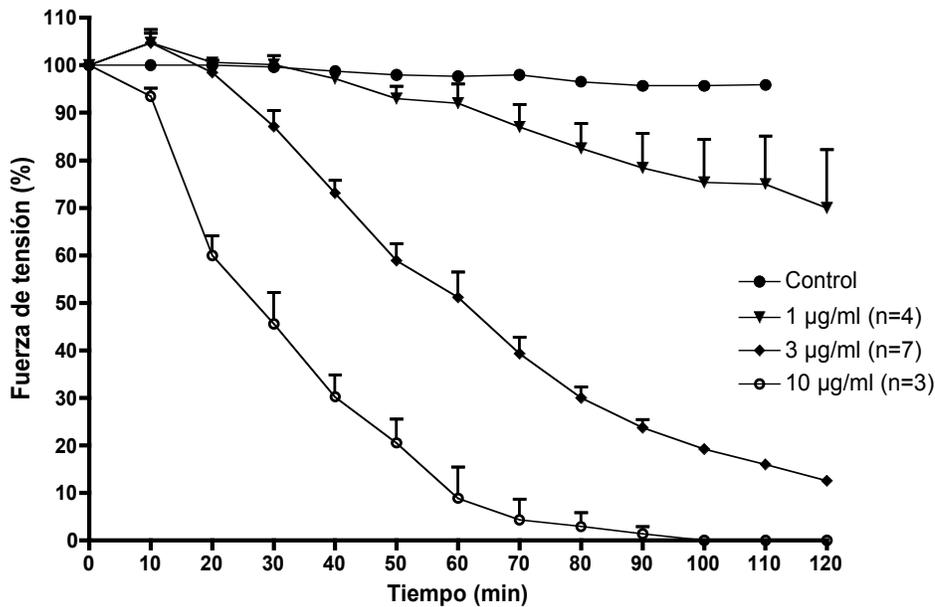
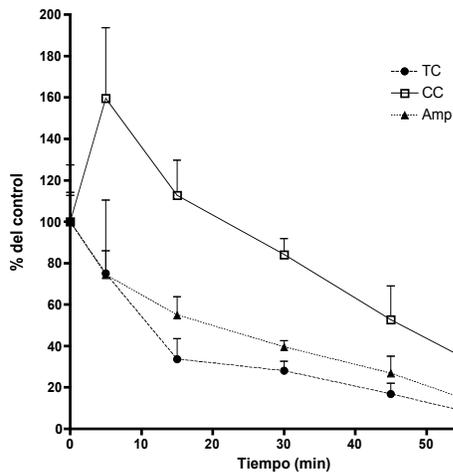


Figura 2. Alteraciones tisulares generadas por la administración endovenosa de veneno de *M. laticollaris*. Muestras de corazón (1), hígado (2), pulmón (3) y riñón (4), fueron tomadas inmediatamente después de la muerte de los ratones, fijadas y teñidas con hematoxilina/eosina. A) Control (PBS); B) Veneno (3DL50/ratón, n=3). Las flechas señalan la infiltración de líquido y pérdida de estructura de las fibras del miocardio en B1; aparición de material proteináceo en y vesículas necróticas en células hepáticas en B2; pérdida de la estructura y ruptura de paredes así como presencia de macrófagos alveolares en B3, y; presencia de material proteináceo en el espacio glomerular así como en la luz de las túbulos proximales en B4.

A)



B)



C)

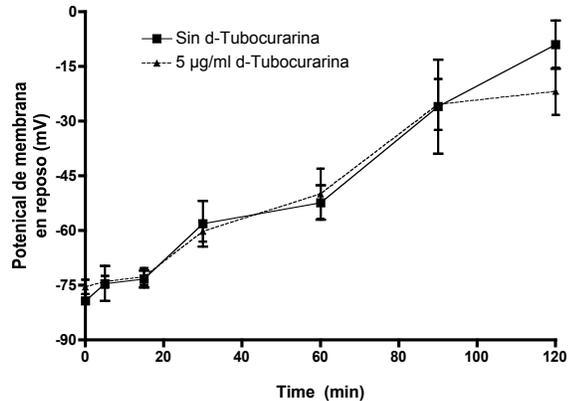


Figura 3. Efecto de veneno de *M. laticollaris* sobre preparación nervio frénico-diafragma de ratón. A) Bloqueo progresivo de la fuerza de tensión provocado por diferentes concentraciones de veneno. Note el efecto facilitador (i.e. liberación de acetilcolina) provocado por bajas concentraciones de veneno (1 y 3 µg/ml) previo al bloqueo. B) Efecto del veneno (1µg/ml) sobre el tamaño cuántico (TC), contenido cuántico (CC) y amplitud (Amp) de los potenciales de placa terminal. Note el aumento significativo en tamaño cuántico (i.e. cantidad de acetilcolina liberada) a los pocos minutos de incubación con veneno. C) Despolarización de las fibras del diafragma provocado por veneno (10µg/ml) sobre preparación curarizada (5µg/ml d-Tubocurarina) como no curarizada. En todos los gráficos se muestra la media ± error estándar.

5.2 Segunda parte: Separación y caracterización de los componentes del veneno de *M. laticollaris*

5.2.1 Separación, purificación y potencia de fracciones

El veneno colectado, un total de 276 mg, fue sometido a separación por cromatografía de intercambio catiónico en columna MonoS, bajo las condiciones antes descritas. De esta manera se obtuvieron un total de 12 fracciones (Figura 4A), cada una de las cuales representa entre el 1 y el 15% del total del veneno (Cuadro 5). Estas fracciones están constituidas, en su mayor parte, por componentes protéicos cuyas masas moleculares aparentes oscilan entre los 7,000 y 14,000 Da (Figura 4B). De las doce fracciones obtenidas por este método, diez mostraron actividad fosfolipásica sobre yema de huevo. Por otro lado, siete de las doce fracciones resultaron ser letales al ser administradas vía endovenosa en ratones (Cuadro 5). Resulta importante resaltar que los ratones muestran síntomas similares a los que se observan al administrar veneno completo, aunque con algunas particularidades que se detallarán más adelante.

Cada una de las doce fracciones obtenidas por intercambio catiónico fue sometida a estudios proteómicos descritos en Materiales y Métodos. Las secuencias parciales obtenidas muestran que los componentes pueden agruparse en dos grandes familias proteicas: a) Alfa neurotoxinas, y; b) Fosfolipasas tipo A2 (PLA2) (Cuadro 6). Secuencias homólogas a alfa neurotoxinas fueron encontradas en las fracciones 2 y 8 que en conjunto representan aproximadamente el 3% del total del veneno, mientras que las fosfolipasas A2, encontradas en ocho de las doce fracciones, representa el 67% del total del contenido proteico del veneno (Cuadro 6).

A fin de conocer la diversidad de componentes contenidos dentro de cada una de las fracciones obtenidas por Mono S, se realizó un segundo paso de purificación utilizando una columna C18 dentro de un sistema RP-HPLC (Figura 5). Esta estrategia permitió la obtención de 24 subfracciones, de las cuales el 56% (n=14) presentaron actividad fosfolipásica sobre yema de huevo (Cuadro 7).

Con el objetivo de identificar las fracciones más importantes de este veneno (en términos de letalidad), se administraron (vía endovenosa a ratones CD1, 18 a 20g) 20 microgramos de cada una de ellas. Se seleccionaron únicamente las fracciones que causaron muerte para estudios posteriores. Con base en este criterio, se identificó una toxina tipo alfa neurotoxina (Fracción 2.1) y cinco toxinas tipo PLA2 (Fracciones 7.1, 8.2, 9.2, 10.2 y 11.1b).

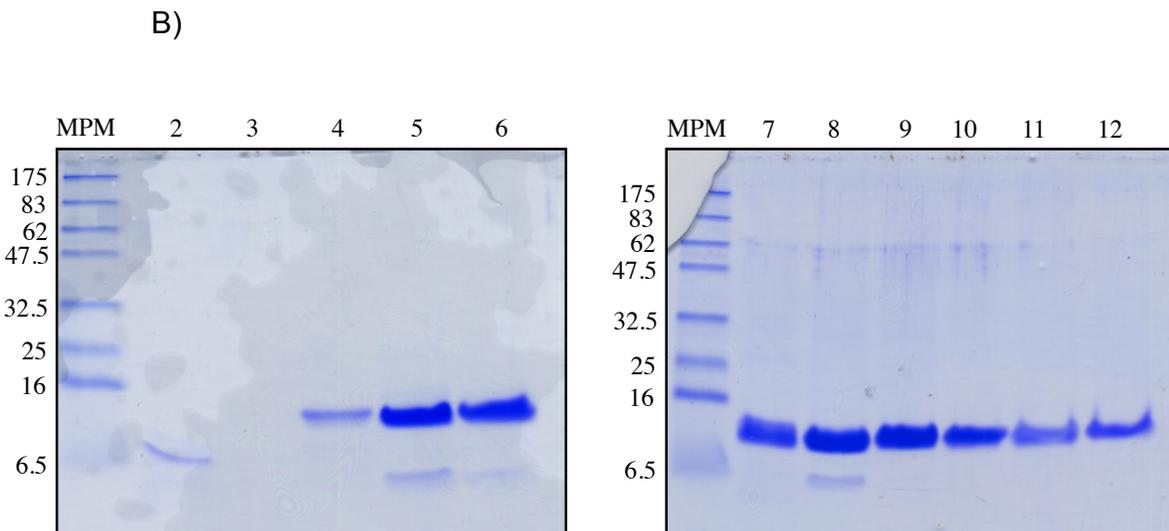
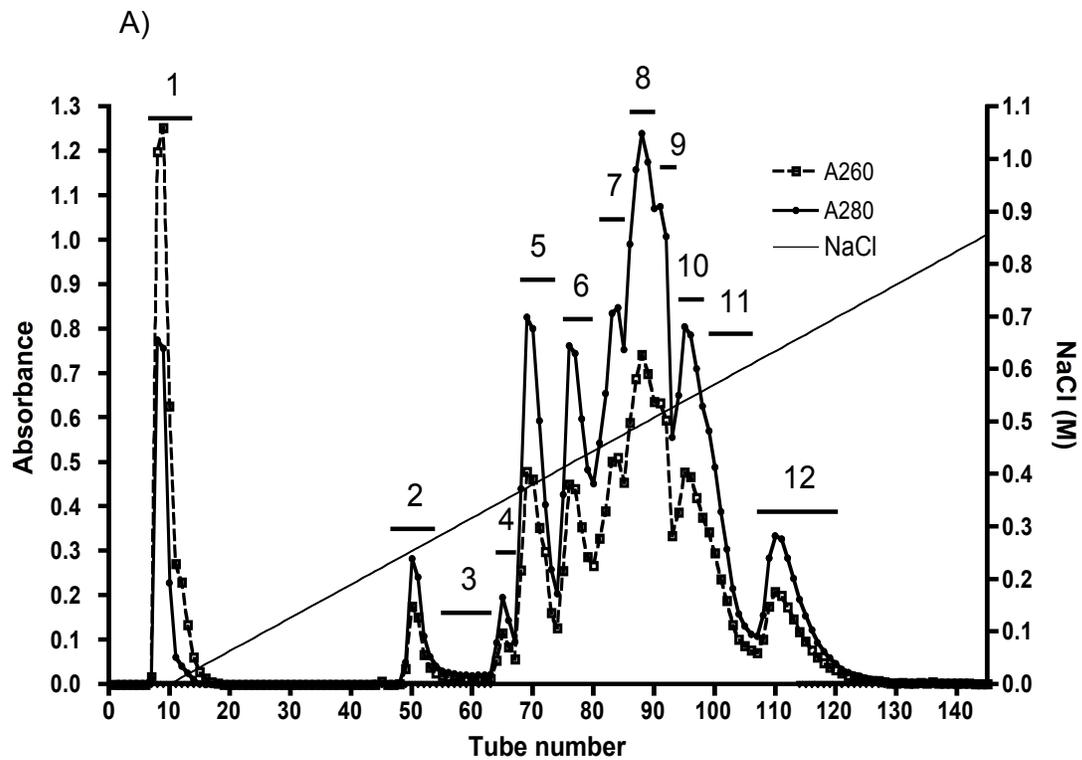


Figura 4. A) Separación de veneno de *M. laticollaris* en columna de intercambio iónico (MonoS H/R 5/5, Pharmacia). Buffer A: Acetato de amonio 50 mM pH 4.7; Buffer B: Buffer A + 2M NaCl. Gradiente: 0-60% B en 80 min, 1 ml/min. La figura es representativa de 16 corridas. B) Patrón electroforético de las fracciones obtenidas por intercambio catiónico. MPM=Marcadores de peso molecular (Kda). Los números corresponden a cada una de las fracciones. SDS-PAGE 15% Tris/tricina en presencia de 2 mercaptoetanol.

Cuadro 5. Características de las fracciones de veneno obtenidas por intercambio catiónico

Fracción	Porcentaje del veneno total	PLA2 (U/mg)	DL50 ($\mu\text{g}/\text{ratón}$)
1	6.3 \pm 1.9	0	NL
2	3.4 \pm 1.1	0	2.04 (2.034-2.042)
3	1 \pm 0.6	89	NL
4	2.2 \pm 2.8	183	NL
5	10.6 \pm 2	278	NL
6	8.7 \pm 2.5	1523	10.94 (10.57-11.33)
7	11.2 \pm 3.1	823	6.44 (6.145-6.752)
8	15.3 \pm 4.4	1060	15.31 (15.25-15.37)
9	13 \pm 2.9	1065	6.27 (5.664-6.93)
10	10.3 \pm 2.9	973	8.42 (7.442-9.532)
11	8.8 \pm 4.5	1544	6.40 (5.897-6.953)
12	9 \pm 3.6	371	NL
Veneno completo	100	1218	9.65 (9.61-9.69)

PLA2 = Actividad enzimática sobre yema de huevo 10%. U = $\mu\text{mol NaOH}/\text{min}$

DL50 = Dosis letal media, cantidad de veneno o fracción necesaria para matar al 50% de la población animal (n=25-40). Entre paréntesis se muestran los intervalos de confianza

NL = No letal inyectando 20 μg a cada ratón (n = 3)

La administración endovenosa de la toxina 2.1 provoca una rápida parálisis flácida caracterizada por el poco o nulo movimiento de los animales y la nula respuesta a estímulos externos. Entre 1 y 3 minutos, post-administración, se observa una marcada dificultad para respirar caracterizada por el hundimiento de los músculos intercostales. Los ratones mueren en un periodo de 3 a 7 minutos. El examen histopatológico no muestra alteraciones importantes en ninguno de los órganos examinados (Figura 12).

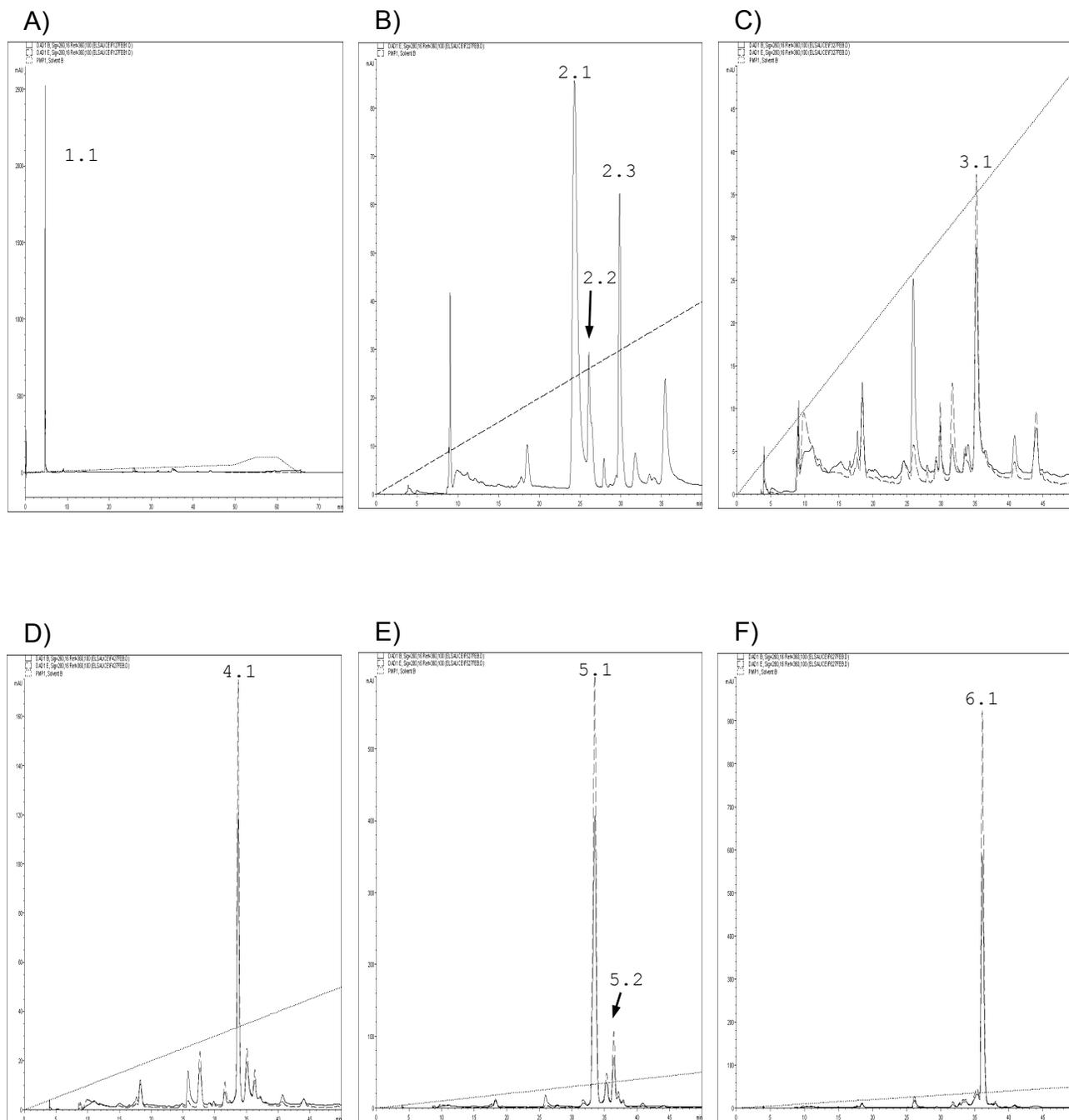


Figura 5. Separación de las fracciones obtenidas por intercambio catiónico en RP-HPLC C18. Buffer A: 0.1% TFA. Buffer B: acetonitrilo + 0.1%TFA. Gradiente 0-60%B en 60 min, 1 ml/min. A) Fracción 1; B) Fracción 2; C) Fracción 3; D) Fracción 4; E) Fracción 5; F) Fracción 6; G) Fracción 7; H) Fracción 8; I) Fracción 9; J) fracción 10; K) Fracción 11; L) Fracción 12. A_{280nm} (----), A_{260nm} (—). Cada subfracción fue numerada de acuerdo a su aparición en el gradiente.

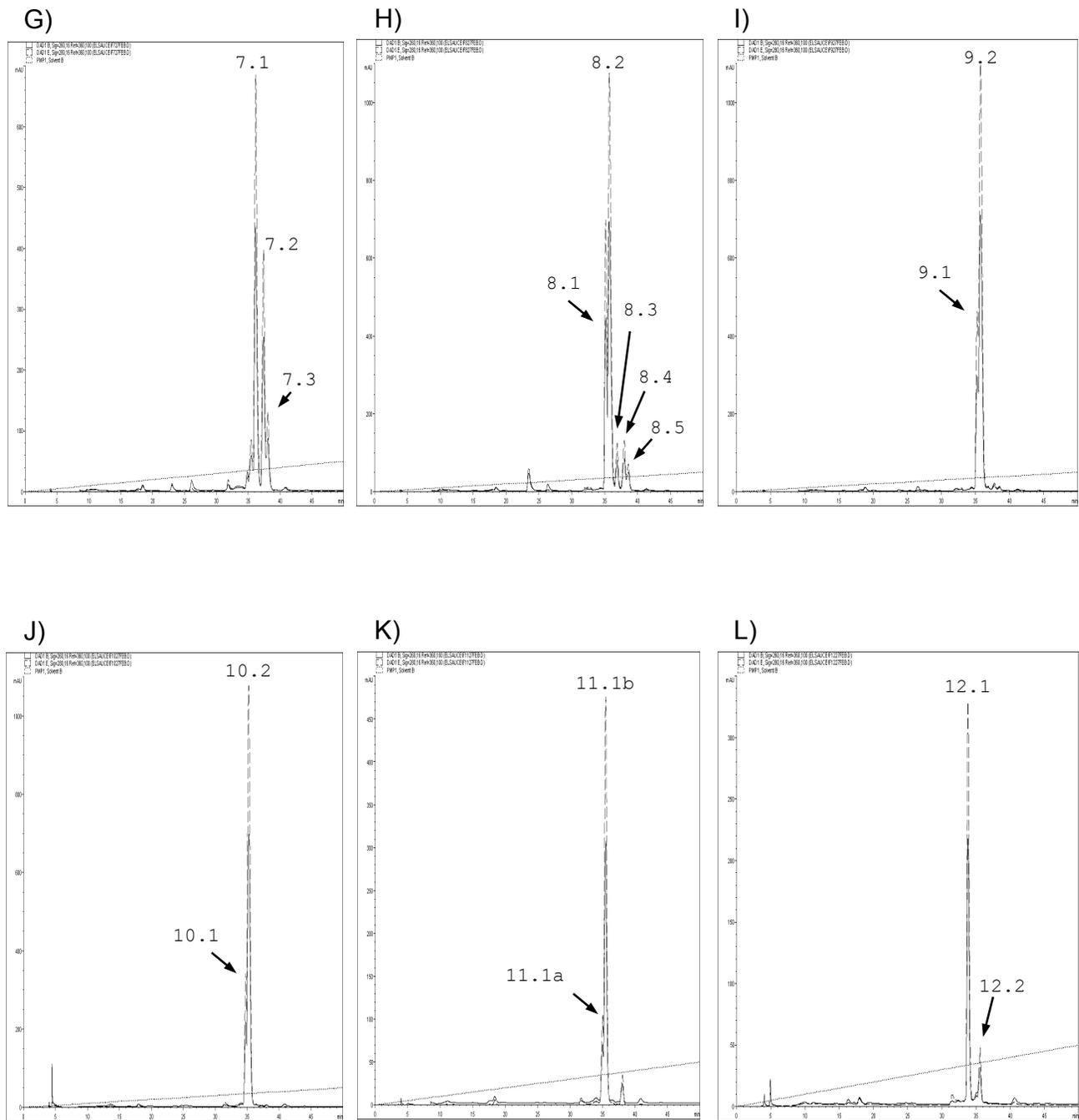


Figura 5. Continuación...

Cuadro 6. Análisis proteómico de las fracciones de veneno obtenidas por intercambio catiónico

Fracción	Secuencia	Homólogo
1	Sin secuencia	
2	MIGHNQSSQPPTK- TCSEGQCYK- GTIER-	Neurotoxina 1 <i>M. nigrocinctus</i>
3	Sin secuencia	
4	DFVCNCDR- GTPVDDLDR-	PLA2 <i>M. nigrocinctus</i> PLA2 <i>N. melanoleuca</i>
5	CKDFVCNCDR- GGSGTPVDELDR-	PLA2 <i>M. nigrocinctus</i> PLA2 <i>B. caeruleus</i>
6	NMIQCTTK- AALCFAK- CYDEAEK-	PLA2 <i>M. nigrocinctus</i> PLA2 <i>L. colubrina</i> PLA2 <i>N. melanoleuca</i>
7	CKDFVCNCDRTAALCFAK-	PLA2 <i>M. nigrocinctus</i>
8	No realizado	
9	No realizado	
10	DYNLDLK LYCELAK NLLHFK YGCYCKGGSC	PLA2 <i>N. kouthia</i> Inhibidor de proteasa PLA2 <i>B. fasciatus</i> PLA2 <i>Naja atra</i>
11	NMIECTTK NFDCP LYSYTCS TLYSYT LTYSYTCVT	PLA2 <i>M. nigrocinctus</i> PLA2 <i>L. colubrina</i> PLA2 <i>B. candidus</i> PLA2 <i>B. arietans</i> PLA2 <i>T. biscutatus</i>
12	No determinada	

Sin secuencia = No fue posible obtener secuencia proteica alguna
 ND = No Determinado

La toxina 2.1, a la que se le dio el nombre de MlatA1, constituye cerca del 2% del total de las proteínas del veneno (Cuadro 7), posee una masa molecular de 6673.0 da (determinada por ESI/MS), no posee actividad fosfolipásica (Cuadro 7) y guarda una estrecha relación a nivel de estructura primaria con la familia de las alfa neurotoxinas de serpientes (Figura 7) así como una alta afinidad hacia el receptor nicotínico de acetilcolina (Figura 8). A pesar de su pequeño tamaño, MlatA1 es capaz de inducir la generación de anticuerpos cuando es administrada a conejos (títulos de suero cercanos a los 18,000). Sin embargo, el suero obtenido no mostró capacidad neutralizante aún utilizando altas dosis (más de 400 μ l para neutralizar 3DL50; no se muestran datos). Tomando en cuenta la baja cantidad de MlatA1 que puede obtenerse en cada extracción (200 μ g por cada 10 mg de veneno), se trató de obtenerla de manera recombinante.

Cuadro 7. Características de las subfracciones de veneno obtenidas por RP-HPLC

Subfracción	Tiempo de retención (min)	Porcentaje de la fracción*	Porcentaje del veneno completo**	PLA2 (U/mg)	Letalidad
1.1	ND	ND	6.6 ± 0		-
2.1	23.945 ± 0.1	51.9 ± 5.7	1.8 ± 0.2	0	+
5.1	32.898 ± 0.0	82.4 ± 1.2	8.7 ± 0.1	33	-
6.1	35.960 ± 0.3	74.2 ± 9.0	6.4 ± 0.8	721	-
7.1	36.003 ± 0.2	53.3 ± 9.0	5.9 ± 0.1	1228	+
7.2	37.336 ± 0.2	14.1 ± 6.5	1.6 ± 0.7	0	-
7.3	37.906 ± 0.2	11.8 ± 1.0	1.3 ± 0.1	0	-
8.1	34.546 ± 0.1	30.0 ± 8.4	4.6 ± 1.3	1798	-
8.2	35.213 ± 0.9	26.4 ± 9.6	3.9 ± 1.5	1627	+
8.3	36.199 ± 0.9	21.1 ± 4.9	3.2 ± 0.8	1092	-
8.4	37.597 ± 0.2	15.7 ± 2.9	2.4 ± 0.4	0	-
8.5	38.078 ± 0.2	5 ± 1	0.8 ± 0.8	0	-
9.1	34.527 ± 0.2	29.0 ± 8.7	3.8 ± 1.1	3222	-
9.2	35.155 ± 0.2	47.0 ± 10.8	6.1 ± 1.4	772	+
9.3	36.354 ± 0.1	12.8 ± 0.6	1.7 ± 0.1	ND	-
9.4	37.316 ± 0.2	4.3 ± 3.4	0.5 ± 0.4	ND	-
9.5	37.923 ± 0.2	3.4 ± 0.2	0.4 ± 0.0	ND	-
9.6	37.916 ± 0.0	2.5 ± 0.1	0.3 ± 0.0	ND	-
10.1	34.526 ± 0.9	24.3 ± 6.8	2.5 ± 0.7	1366	+
10.2	35.077 ± 0.1	59.6 ± 6.2	6.2 ± 0.6	990	+
10.3	36.356 ± 0.1	7.9 ± 0.4	0.8 ± 0.0	0	-
10.4	37.336 ± 0.0	4.1 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0	-
10.5	37.926 ± 0.0	3.4 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0	-
11.1a	34.551 ± 0.0	14.8 ± 1.0	1.3 ± 0.9	1577	+
11.1b	34.994 ± 0.0	66.2 ± 8.3	5.8 ± 0.7	1026	+
11.2	ND	1.4	0.1	ND	-
12.1	33.200 ± 0.0	59.7 ± 11.7	5.4 ± 1	33	-
12.2	35.200 ± 0.1	21.1 ± 5.8	1.9 ± 0.1	304	+

Proporción (%) que la subfracción representa dentro de la fracción obtenida por intercambio catiónico

Proporción (%) que la subfracción representa dentro del veneno completo

PLA2 = Actividad enzimática sobre yema de huevo 10%. U = $\mu\text{mol NaOH}/\text{min}$

Letalidad = Capacidad de la subfracción para matar (+) o no (-) ratones CD1 de 18 a 20 g (n=3) al administrar 20 μg por vía endovenosa.

A)

N-ter RICYNQSSQPPTTKTCSEGCYXKT
 GluC RICYNQSS GQCYKKTWRDH
 AspN RICYNQSSQPPTTKTCSEGC XGCACPNVKPGIQISCCQXD
 cDNA RICYNQSSQPPTTKTCSEGCYKKTWRDHRGTIIERGACPNVKPGIQISCC~~T~~SDKCN

MlatA1 RICYNQSSQPPTTKTCSEGCYKKTWRDHRGTIIERGACPNVKPGIQISCC~~T~~SDKCN

rMlatA1

MGGRICYNQSSQPPTTKTCSEGCYKKTWRDHRGTIIERGACPNVKPGIQISCC~~T~~SDKCNGRSRSHHHHHH

B)



Figura 7. A) Secuencia parcial obtenida por degradación de Edman del extremo amino terminal (NH₂), hidrólisis con endopeptidasas Glu-C (GluC) y Aspártico-N (AspN) y secuencia traducida del cDNA obtenido de extracto glandular. La secuencia completa de la proteína se muestra al final de la figura; note que la G obtenida por hidrólisis con Asp-N aparece como T en el cDNA. Las secuencias traducidas de BamHI y BglII en los extremos 5' y 3' se muestran subrayados. La subclonación en el vector de expresión pQE60 adiciona dos aminoácidos extra en cada extremo (*cursiva*). La cola de Histidinas (negritas-subrayado) fue utilizada para la posterior purificación por cromatografía de afinidad. B) Comparación de secuencia de aminoácidos entre MlatA1 y otras toxinas de serpientes de coral. El alineamiento se realizó utilizando ClustalX y añadiendo correcciones manuales mínimas. Los números a la derecha representan el porcentaje de

identidad entre cada secuencia y MlatA1; los valores se obtuvieron por comparación pareada utilizando LALIGN (http://www.chembnet.org/software.LALIGN_form/html). MALT0044C, MALT0051C, MALT0052C, MALT0057C, MALT0058C, MALT0059C, MALT0063C, MALT0065C y MALT070C de *M. altirostris* (Correa-Neto et al., 2011); Mcor0092C, Mcor0100C, Mcor0120C, Mcor0599 y Mcor0604C de *M. corallinus* (Correa-Neto et al., 2011); MfTxI, MfTxII, MfTxIII, MfTxIV y MfTxV de *M. frontalis* (Moreira et al., 2010); MnnI de *M. nigrocinctus* (Rosso et al., 1996); D1 de *M. pyrrhocryptus* (Dokmetjian et al., 2009); Ms1, Ms2, Ms3, Ms4, Ms5 y Ms11 de *M. surinamensis* (Olamendi-Portugal et al., 2008); MlatA2 de *M. laticollaris* (este trabajo). Los puentes disulfuro fueron asignados por homología (Nirthanan y Gwee, 2004). Los aminoácidos implicados en el reconocimiento al receptor nicotínico de acetil colina se muestran en negritas.

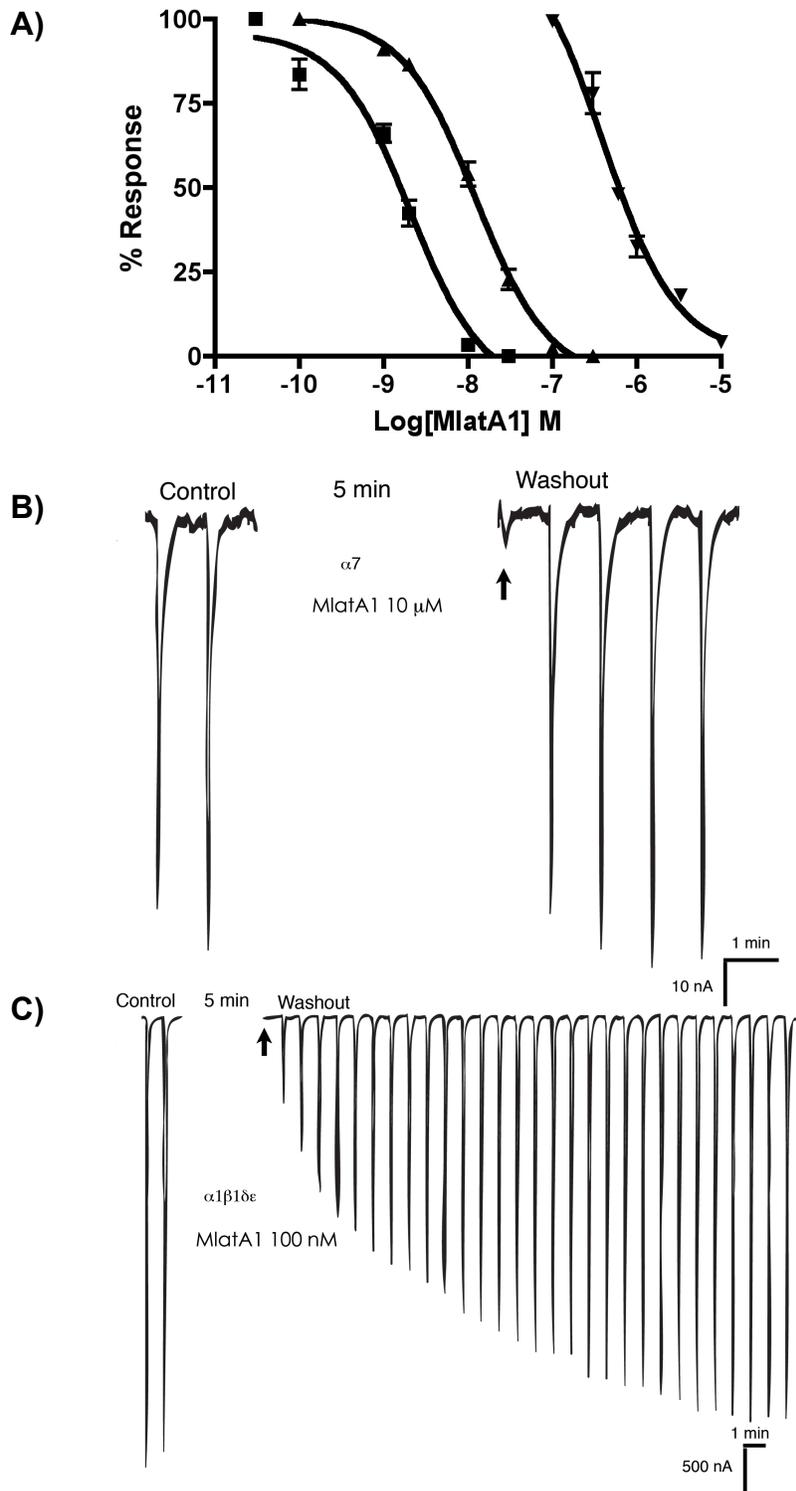


Figura 8. Curvas dosis-respuesta para la toxina MlatA1 sobre el receptor nicotínico de acetilcolina subtipos fetal (circulo, $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$) y adulto (cuadrado, $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$). Las curvas fueron generadas graficando la amplitud de la corriente luego de la aplicación de la toxina como porcentaje de la amplitud antes de la aplicación (% de respuesta). Cada punto representa el promedio de tres oocitos. Subtipo fetal IC₅₀ = 1.43nM (C.I. 1.26-1.62), subtipo adulto IC₅₀ = 12nM (C.I. 10-14).

5.2.2 Clonación y purificación de la toxina recombinante *rMlatA1*

Se realizó una búsqueda exhaustiva en la bases de datos del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para obtener las secuencias nucleotídicas reportadas de alfa neurotoxinas de elápidos, el análisis final se realizó con 51 secuencias no redundantes, la mayoría de las cuales (50/51) poseen la secuencia completa del péptido señal (Figura 9). Dado al enorme grado de conservación de esta secuencia se diseñó el iniciador antxPS (5' ATG AAA ACT CTG CTG CTG AC 3') que tiene la capacidad de reconocer el péptido señal de todos los miembros de la familia. Al ser utilizado en conjunto con el iniciador universal AUAP puede, en teoría, posibilitar la amplificación de prácticamente todas las alfa neurotoxinas de esta especie y de especies relacionadas.

El material obtenido luego de la amplificación con los iniciadores antxPS y AUAP fue utilizado para transformar células XL1Blue competentes con el plásmido TOPO-TA. Se obtuvieron un total de 6 clonas (nombradas 1.1, 2.1, 2.2, 2.3, 3.1 y 3.2) de la cuales tres (1.1, 3.1 y 3.2) mostraron la secuencia correspondiente a la toxina *MlatA1* y cuya única diferencia se encuentra en el nucleótido 59 - que corresponde a la sección del péptido señal - en el que A, presente en 1.1 y 3.2, aparece como G en 3.1. Este cambio se traduce en la modificación del aminoácido Histidina por Arginina (Figura 10A).

También resulta muy importante resaltar que el uso de los iniciadores antxPS y AUAP permitió la amplificación de una segunda secuencia homóloga a alfa neurotoxinas de elápidos, a la que se le nombró *MlatA2* (clonas 2.1 y 2.3, Figura 10B). No fue posible encontrar la proteína correspondiente a esta secuencia nucleotídica en el veneno.

La secuencia completa del gen de *MlatA1* fue utilizada para generar los iniciadores antxPMUP (5'**GGA TCC** AGG ATA TGT TAC AAC CAA CAG T 3') y anxtPMlow (5'**AGA TCT** ACC GTT GCA TTT GTC TGA TGT 3') con la finalidad de subclonar la secuencia correspondiente al producto maduro (eliminando el péptido señal) dentro del vector de expresión pQE60 agregando los sitios de restricción BamHI (GGATCC) y BglII (AGATCT). La adición de 6 histidinas en el extremo carboxilo de la proteína recombinante permitió su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad.

	Peptido señal	Peptido maduro
82570084	-----ATGAAAACCTGCTGCTGACCTTCTTGGTGGTAACAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATATACCTTGATAT	GTCACCAA
51105388	-----GCAAGATGAAAAATCTGCTGCTGACCTTCTTGGTGGTAACAATCGTGTGCCTGGATTAGGATACACCTTGATAT	GTAACCGA
82570088	-----ATGAAAACCTGCTGCTGACCTTCTTGGTGGTAACAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATATACCTTGATAT	GTCAC---
51105392	-----CTCCAGAGAAGATTGCAAGATGAAAAATCTGCTGCTGACCTTCTTGGTGGTAACAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATATACCTTGATAT	GTCAC---
62499	-----CTCCAGAGAACATCACAAGATGAAAAATCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATACACCAATAAT	GTCGCA---
82570090	-----ATGAAAACCTGCTGCTGACCTTCTTGGTGGTAACAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATATACCTTGATAT	GTCACCA-
51105384	-----CGGACGCGTGGGGCAAGATGAAAAATCTGCTGCTGACCTTCTTGGTGGTAACAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATACACCTTGATAT	GTCACCA-
51105396	-----AGAAGATCGCGAGATGAAAAATCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATACACAGGAAAT	GTCCTCAA-
82570104	-----ATGAAAACCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATACAGCTTGACAT	GTCCTCAAT
82570102	-----ATGAAAACCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATACAGCTTGATAT	GTTTTAAC
64055	-----GCAAGATGAAAAATCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATACACAGGATAT	GTTTTAAC
6467953	-----CGGCACGAGAGAGAAGATCGCAAGATGAAAAATCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCGTGTGCCTGGACTTCCGATACACCATAGTAT	GTTACAAG
6467951	-----CGGCACGAG-----GCAAGATGAAAAATCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCGTGTGCCTGGACTTCCGATACACCATAGTAT	GTTACAAG
6467955	-----CAGAGAAGA-----TCGCAAGATGAAAAATCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCGTGTGCCTGGACTTCCGATACACCATAGTAT	GTTACAAG
64053	-----TCCGAAAAAG-----ATCGCAAGATGAAAAATCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATACACAGGATAT	GTTTTAAC
2688937	-----AGATCGCAAGATGAAAAATCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATACACCTTGAAT	GTCACAAC
2688935	-----AGATCGCAAGATGAAAAATCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATACACCTTGAAT	GTCACAAC
6650220	-----ATGAAAACCTGTTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATACACCTTGAAT	GTCACAAC
12002777	-----ATGAAAACCTGTTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATACACCTTGAAT	GTCACAAC
5230711	-----ATGAAAACCTACTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCATGTGCCTGGACTTAGGATACACCTAACAT	GTTACAAG
5230709	-----ATGAAAACCTACTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCATGTGCCTGGACTTAGGATACACCTAACAT	GTTACAAG
5230702	-----ATGAAAACCTACTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCATGTGCCTGGACTTAGGATACACCTAACAT	GTTACAAG
5230700	-----ATGAAAACCTACTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCATGTGCCTGGACTTAGGATACACCTAACAT	GTTACAAG
5230704	-----ATGAAAACCTACTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCATGTGCCTGGACTTAGGATACACCTAACAT	GTTACAAG
5230706	-----ATGAAAACCTACTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCATGTGCCTGGACTTAGGATACACCTAACAT	GTTACAAG
5230698	-----ATGAAAACCTACTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCATGTGCCTGGACTTAGGATACACCTAACAT	GTTACAAG
5305771	-----TACGGATCCATGAAAACCTGTTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATACACTATGCAGT	GTAAGACA
5081371	-----TCCAGAAAAGATCGCAAGATGAAAAATCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATACACCTTGAAT	GTCCTCAAT
5081369	-----TCCAGAAAAGATCGCAAGATGAAAAATCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATACACCTTGAAT	GTCCTCAAT
2645536	-----TCCGAAAAGATGGCAAGATGAAAAATCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATACACCTTGAAT	GTCCTCAAT
2645538	-----TCCGAAAAGATGGCAAGATGAAAAATCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATACACCTTGAAT	GTCCTCAAT
62487	-----TCCAGAGAAGATCGCAAGATGAAAAATCTGTTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATACACCATGAAAT	GTAAGATA
62481	-----TCCAGAGAAGATTGCAAGATGAAAAATCTGTTGCTGCTTGGTGGTGGTACCAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATACACAGGACAT	GCCTCATA
62477	-----GCAAGATGAAAAATCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATATACCAAGACAT	GCCTCAAA
82570078	-----ATGAAAACCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCATGTGCCTGGACTTAGGATACACCAAGAAAT	GCTACGTA
82570082	-----ATGAAAACCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCATGTGCCTGGACTTAGGATACACCAAGAAAT	GCTACAAA
82570074	-----ATGAAAACCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCATGTGCCTGGACTTAGGATACACCTTGAAT	GCTTCATA
5305769	-----TAAGATCCGATGATGACAACTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATATACCATCGTAT	GCCACACA
3820495	GACACTTTCAGGCTCCAGAGAAGATCGCAAGATGAAAAATCTGTTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATATACCATCGTAT	GCCACACA
82570076	-----ATGAAAACCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCATGTGCCTGGACTTAGGATACACCAAGAAAT	GCTACAAA
82570080	-----ATGAAAACCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCATGTGCCTGGACTTAGGATACACCTTGAAT	GCTTCATA
51105382	-----GAAAACCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCATGTGCCTGGACTTAGGATACACCAAGAAAT	GCTTCATA
82570072	-----ATGAAAATCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCATGTGCCTGGACTTAGGATACACCAAGAAAT	GCTACAAA
51105374	-----CGCAAGATGAAAAATCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCATGTGCCTGGACTTAGGATACACCAAGAAAT	GCTACGTA
51105370	-----GAGAAGAACGCAAGATGAAAAATCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCATGTGCCTGGACTTAGGATACAGCTTGATAT	GCTTCATA
51105376	-----AGAAGATTGCAAGATGAAAAATCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCATGTGCCTGGACTTAGGATACACCAAGAAAT	GCCAC---
51105372	-----GCAAGATGAAAAATCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCATGTGCCTGGACTTAGGATACACCAAGAAAT	GCTACGTA
82570086	-----ATGAAAACCTGCTGCTGACCTTCTTGGTGGTAACAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATACACCTTGATAT	GT--CACC
51105394	-----GGCTCCAGAGAAGATTGCAAGATGAAAAATCTGCTGCTGACCTTCTTGGTGGTAACAATCGTGTGCCTGGACTTAGGATACACCTTGATAT	GT--CACC
51105390	-----AGAAGATTGTGAGATGAAAAATCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCATGTGCCTGGACTTAGGATACACCTTGATAT	GTGTCAAA
51105366	-----GCTGACCTTGGTGGTGGTACCAATCATGTGCCTGGACTTAGGATACACCTTGATAT	GTCTCATT

Iniciador antxPS ATGAAAACCTGCTGCTGAC

Figura 9. Alinamiento múltiple de secuencias correspondientes a precursores de homólogos de alfa neurotoxinas. La secuencia correspondiente al péptido señal se muestra dentro del recuadro negro. La fracción de secuencias utilizada para generar el iniciador antxPS se muestra al fondo en negritas. 62477, 62481, 62487, 62499, 3820495, 5305769 y 5305771 *Bungarus multicinctus*; 64053 y 64055 *Laticauda semifasciata*; 6467951, 6467953 y 6467955 *Micrurus corallinus*; 12002777 *Naja atra*; 6650220 *Naja naja*; 2645536, 2645538, 2688935, 2688937, 5081369 y 5081371 *Naja sputatrix*; 51105366, 51105370, 51105372, 51105374, 51105376, 51105382, 51105384, 51105388, 51105390, 51105392, 51105394, 51105396, 82570072, 82570074, 82570076, 82570078, 82570080, 82570082, 82570084, 82570086, 82570088, 82570090, 82570102 y 82570104 *Ophiophagus hannah*; 5230698, 5230700, 5230702, 5230704, 5230706, 5230709 y 5230711 *Pseudonaja textilis*.

A)

	10	20	30	40	50	60
Mlata1	<u>ATGAAAACCTCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTGACAATCGTGTGCCCTGGACTTCGGACAC</u>					
952-11	<u>ATGAAAACCTCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTGACAATCGTGTGCCCTGGACTTCGGACAC</u>					
956-32	<u>ATGAAAACCTCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTGACAATCGTGTGCCCTGGACTTCGGACAC</u>					
963-31	<u>ATGAAAACCTCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTGACAATCGTGTGCCCTGGACTTCGGACGC</u>					
	***** *					
	70	80	90	100	110	120
Mlata1	<u>ACCAGGATATGTTACAACCAACAGTCATCGCAACCTCCAACCCTAAAACCTTGTTCAGAA</u>					
952-11	<u>ACCAGGATATGTTACAACCAACAGTCATCGCAACCTCCAACCCTAAAACCTTGTTCAGAA</u>					
956-32	<u>ACCAGGATATGTTACAACCAACAGTCATCGCAACCTCCAACCCTAAAACCTTGTTCAGAA</u>					
963-31	<u>ACCAGGATATGTTACAACCAACAGTCATCGCAACCTCCAACCCTAAAACCTTGTTCAGAA</u>					

	130	140	150	160	170	180
Mlata1	<u>GGGCAGTGCATAAAAAGACTTGGCGTGATCACCGTGGAACATAATCGAAAGAGGATGT</u>					
952-11	<u>GGGCAGTGCATAAAAAGACTTGGCGTGATCACCGTGGAACATAATCGAAAGAGGATGT</u>					
956-32	<u>GGGCAGTGCATAAAAAGACTTGGCGTGATCACCGTGGAACATAATCGAAAGAGGATGT</u>					
963-31	<u>GGGCAGTGCATAAAAAGACTTGGCGTGATCACCGTGGAACATAATCGAAAGAGGATGT</u>					

	190	200	210	220	230	240
Mlata1	<u>GCTTGCCCTAATGTGAAGCCCGGTATTCAAATTAGCTGTTGCACATCAGACAAATGCAAC</u>					
952-11	<u>GCTTGCCCTAATGTGAAGCCCGGTATTCAAATTAGCTGTTGCACATCAGACAAATGCAAC</u>					
956-32	<u>GCTTGCCCTAATGTGAAGCCCGGTATTCAAATTAGCTGTTGCACATCAGACAAATGCAAC</u>					
963-31	<u>GCTTGCCCTAATGTGAAGCCCGGTATTCAAATTAGCTGTTGCACATCAGACAAATGCAAC</u>					

Mlata1	GGTTAG					
952-11	GGTTAG					
956-32	GGTTAG					
963-31	GGTTAG					

B)

	10	20	30	40	50	60
958-21	<u>ATGAAAACCTCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTGACAATCGTTTGCCTGGACTTAGGGAAC</u>					
960-23	<u>ATGAAAACCTCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTGACAATCGTTTGCCTGGACTTAGGGAAC</u>					
Mlata2	<u>ATGAAAACCTCTGCTGCTGACCTTGGTGGTGGTGACAATCGTTTGCCTGGACTTAGGGAAC</u>					

	70	80	90	100	110	120
958-21	<u>AGCCTAGTATGTTACGTTTCAGGGGCGTGGCAGAAGACTTGTCCAGAAGGGCAGAACAAA</u>					
960-23	<u>AGCCTAGTATGTTACGTTTCAGGGGCGTGGCAGAAGACTTGTCCAGAAGGGCAGAACAAA</u>					
Mlata2	<u>AGCCTAGTATGTTACGTTTCAGGGGCGTGGCAGAAGACTTGTCCAGAAGGGCAGAACAAA</u>					

	130	140	150	160	170	180
958-21	<u>TGCGAGAAATATGCAGTTGGGACTATGCATGGTAGTTGGATATACTTACGGGGATGTGCT</u>					
960-23	<u>TGCGAGAAATATGCAGTTGGGACTATGCATGGTAGTTGGATATACTTACGGGGATGTGCT</u>					
Mlata2	<u>TGCGAGAAATATGCAGTTGGGACTATGCATGGTAGTTGGATATACTTACGGGGATGTGCT</u>					

	190	200	210	220	230	240
958-21	<u>TCTACTTGCCATGAAGGACCATATAATGTGTGTTGCTCAACAGACCTCTGCAACAAGTAG</u>					
960-23	<u>TCTACTTGCCATGAAGGACCATATAATGTGTGTTGCTCAACAGACCTCTGCAACAAGTAG</u>					
Mlata2	<u>TNTACTTGCCATGAAGGACCATATAATGTGTGTTGCTCAACAGACCTTNTGCAACAAGTAG</u>					
	* *****					

Figura 10. Traducción de las secuencias obtenidas de la clonación del gene mlataA1 dentro del vector de TOPO-TA. La secuencia correspondiente al péptido señal se muestra subrayado. A) Las clonas 1.1, 3.1 y 3.2 resultaron prácticamente idénticas a la de Mlata1 excepto porque el nucleótido 59 (2ª posición del codón) existe una transición de A (en Mlata1) por G (en 3.1), lo que se traduce en un cambio de H (en Mlata1) por R (en 3.1). B) Las clonas 2.1 y 2.3 resultaron casi idénticas a la secuencia obtenida del gen mlata2 excepto porque los nucleótidos 182 y 228 que no habían sido identificados en Mlata2 aparecen como C en ambas clonas.

La inducción del cultivo celular de *Escherichia coli* BL21 transformada con el vector PQE60-rMlatA1 se realizó a 20°C por 8 horas en agitación constante una vez que el pre-cultivo alcanzó una densidad óptica cercana a 0.6. Con base en el patrón de bandeo observado en gel (Figura 11A), es posible señalar que la mayor parte de la proteína recombinante es producida de manera soluble y puede ser reconocida por los anticuerpos generados contra la proteína nativa (Figura 11A).

El sobrenadante de cultivo fue cargado en una columna NiNTA, en tres ocasiones para asegurar el pegado de los seis residuos de histidina, para, posteriormente, eluir las proteínas absorbidas en presencia de baja y alta concentración de imidazol. El análisis en SDS-PAGE muestra tres bandas cercanas a los 7, 25 y 62 Kda al utilizar 25 mM imidazol mientras que, al utilizar 250 mM imidazol, se observa una sola banda cercana a los 7 Kda, masa molecular que coincide con la de la toxina nativa (Figura 11B). Estos resultados se corroboran en un segundo ensayo en donde se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-histidinas para revelar la presencia de la proteína recombinante (Figura 11C y 11D)

Resulta importante señalar que la proteína recombinante fue reconocida por el suero de conejo anti-toxina nativa (no se muestran datos). Sin embargo, no mostró capacidad letal aún administrando dosis equivalentes a 15 veces la DL50 de la toxina nativa (20 µg/ratón).

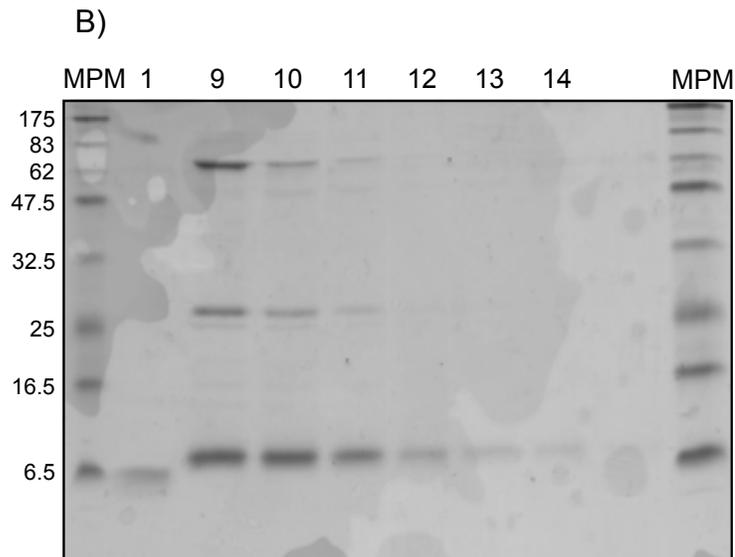
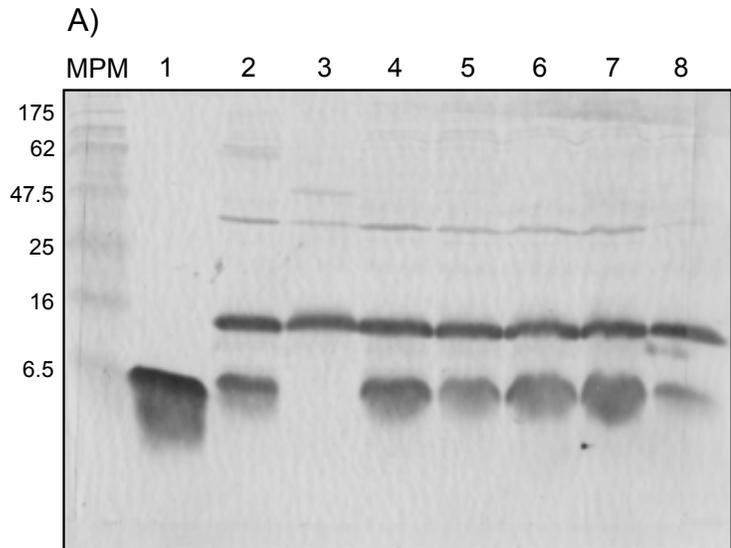


Figura 11. A) Producción de toxina recombinante rMlatA1 en *E. coli* BL21. La inducción se llevó a cabo con 10mM IPTG a 20°C. Una muestra de 1ml de cultivo fue centrifugada y el paquete celular resuspendido en 40µl de PBS + 10 µl de buffer de carga. Un total de 10 µl de este lisado fue cargado por carril. Carril 1, MlatA1 (1.3 µg); carril 2, cultivo pre-inducción; carril 3, BL21 no transformada (control negativo); carriles 4 a 8, inducción por 5, 6, 7 y 8 hrs, respectivamente. B) Purificación de rMlatA1 por medio de cromatografía de afinidad en columna agarosa-NiNTA (Qiagen). Carril 1, MlatA1 (1.3 µg); carriles 9 a 11, elusión con PBS+25mM imidazol; carril 12 a 14, elusión con PBS+250mM imidazol.

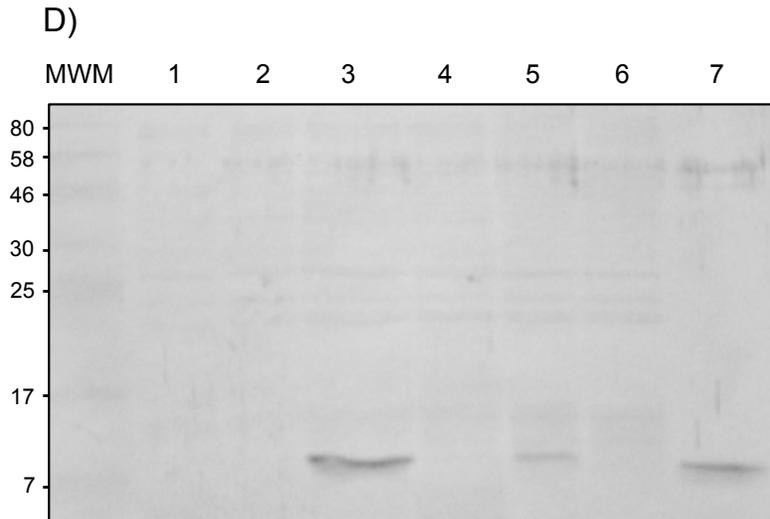
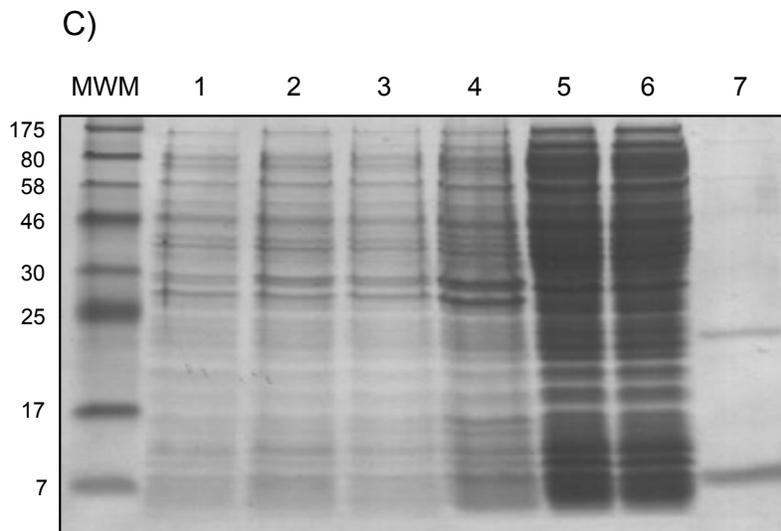


Figura 11. *Continuación...* Producción de toxina recombinante rMlatA1 en *E. coli* BL21. C) SDS-PAGE 12.5%. D) Revelado de la proteína recombinante mediante anticuerpo monoclonal anti-Histidinas (1:5000). Carril 1 = BL21 no transformada proteína total (control negativo); Carril 2 = Cultivo de BL21 transformado no inducido (proteína total); Carril 3 = Cultivo transformado e inducido (proteína total); Carril 4 = Lisado celular de cultivo inducido luego de tratamiento con BugBuster (proteína insoluble); Carril 5 = Sobrenadante obtenido del tratamiento de cultivo transformado e inducido con BugBuster (proteína soluble); Carril 6 = Proteína no unida a la columna NiNTA; Carril 7 = Toxina recombinante purificada. La inducción se llevó a cabo con 10mM IPTG a 20° C. Una muestra de 1 ml de cultivo fue centrifugada y el paquete celular resuspendido en 40 μ l de PBS + 10 μ l de buffer de carga. Un total de 10 μ l de este lisado fue cargado por carril.

5.2.3 Caracterización de subfracciones obtenidas por RP-HPLC

Las fracciones 7.1, 8.2, 9.2, 10.2 y 11.1b fueron seleccionadas para su posterior caracterización debido a que fueron las únicas que presentaron actividad letal (Cuadro 7). El análisis de las secuencias amino terminal obtenidas por degradación de Edman así como las masas moleculares obtenidas por ESI/MS muestran que éstas proteínas pertenecen a la familia de las PLA2 de elápidos (Cuadro 8). La administración endovenosa de estas fracciones provoca sintomatología muy similar a la descrita para veneno completo. La muerte acontece entre los 20 y 25 minutos posteriores a la administración de cantidades equivalentes a 1DL50.

Cuadro 8. Características de subfracciones letales obtenidas por RP-HPLC

Fracción	DL50 ($\mu\text{g}/\text{ratón}$)	PLA2 (U/mg)	Masa (Da)	Secuencia
2.1	1.3	0	6673	MlatA1
6.1	ND	721	13320	NLIHFKNMIECTTT
7.1	7.1	1228	13323	NLIHFKNMIECTTT
8.2	7.6	1627	13365	ND
9.1	7	772	13411	ND
10.2	7	990	13414	NLIHFKNMIE
11.1b	6.3	1026	13408	NLIHFKNMIECTTKRSAWDFADYGCYCGAGGXG

DL50 = Dosis letal media, cantidad de fracción (μg) necesaria para matar al 50% de la población animal (ratones CD1, 18 a 20 g; n=25-40). Administración endovenosa.

PLA2 = Actividad enzimática sobre yema de huevo 10%. U = $\mu\text{mol NaOH}/\text{min}$

Masa = Determinada por ESI/MS

NOTA = La secuencia completa de la fracción 2.1 (MlatA1) se muestra en la Figura 5

En los estudios *post-mortem* se observa que el color de la piel en su cara interna es blanquecino o rosa-pálido, mientras que en la cavidad abdominal los vasos mesentéricos se muestran ligeramente dilatados. Resulta muy difícil suponer algún grado de importancia biológica de éstos hallazgos.

Por otro lado, en la cavidad torácica se registraron alteraciones que incluyen coloración roja intensa en los pulmones; cuando son retirados y colocados en solución salina, se hunden hasta el fondo del recipiente lo que sugiere la infiltración de líquido hacia los alvéolos (edema pulmonar). Los ratones que recibieron las toxinas 10.2 y 11.1b presentaron sangre con burbujas en cavidad nasal y bucal. Adicionalmente, la orina de estos mismos ratones tuvo color rojo oscuro, indicativo de la presencia de mioglobina, hemoglobina o ambas).

El daño tisular causado por las toxinas fosfolipásicas es similar al que se observa con el veneno completo (Figura 12) aunque es posible identificar una mayor daño a tejidos específicos con ciertas toxinas.

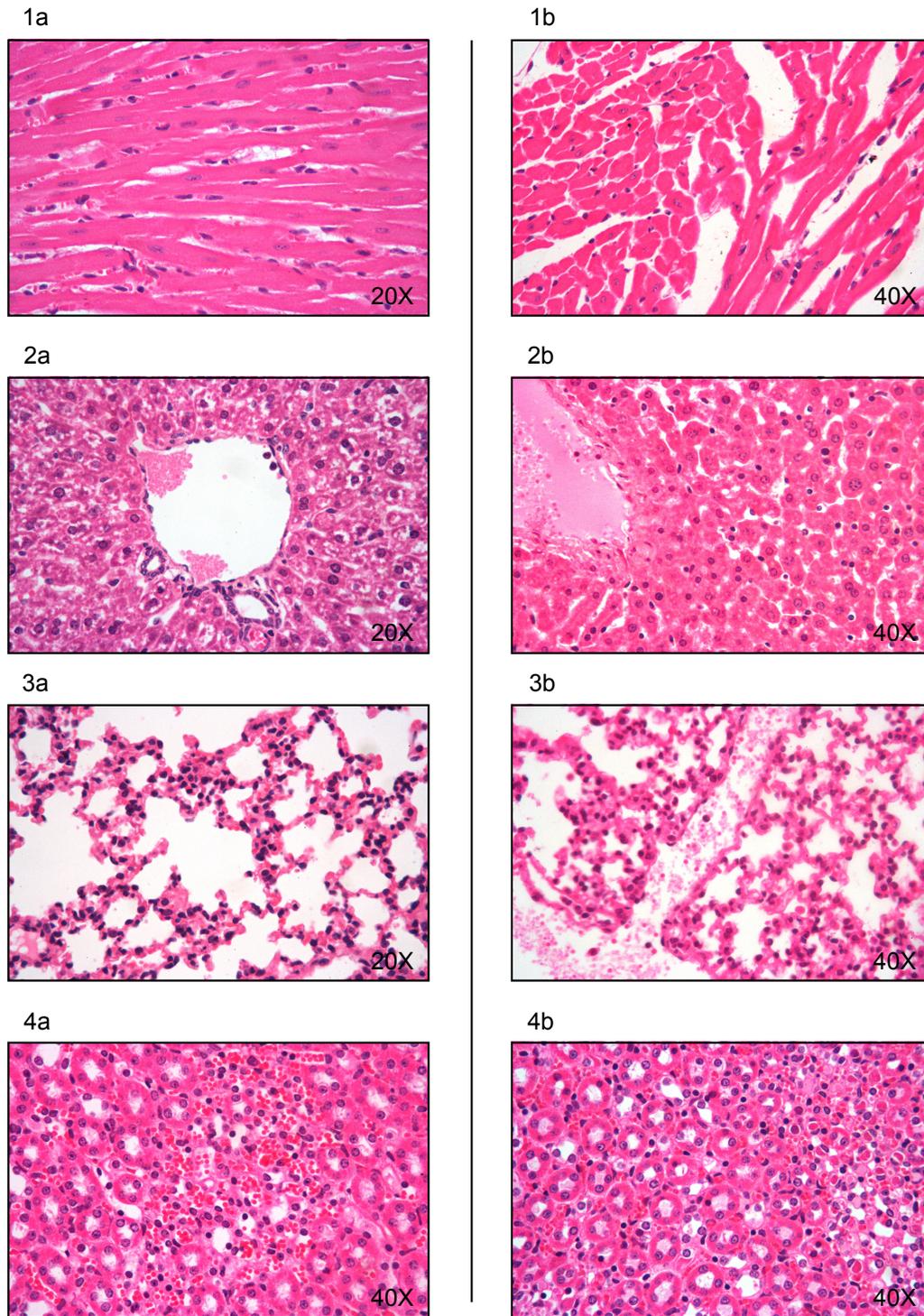


Figura 12. Modificaciones morfológicas ejercidas por fracciones tóxicas de veneno de *M. laticollaris*. Una cantidad equivalente a $3DL_{50}$ de cada fracción fue administrada (iv) en ratones (CD1, 18-20g). Muestras de corazón (1) pulmón (2), hígado (3) y riñón (4) fueron tomadas inmediatamente después de la muerte de los ratones, fijadas y teñidas con hematoxilina/eosina. a) Fracción 2.1 (MlatA1); b) Fracción 9.2; c) Fracción 10.2; d) Fracción 11.1b. Los controles (PBS) se muestran en la Figura 2.

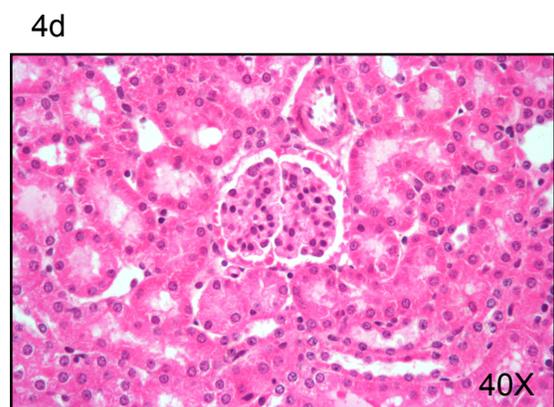
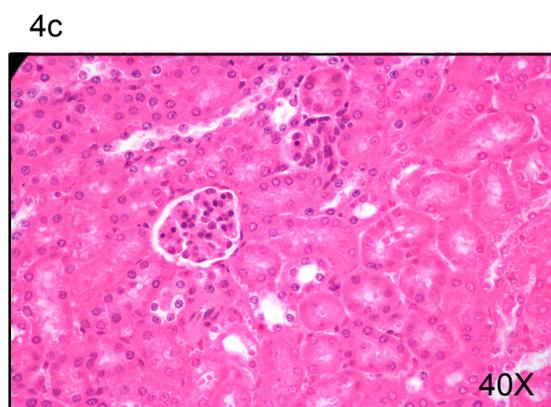
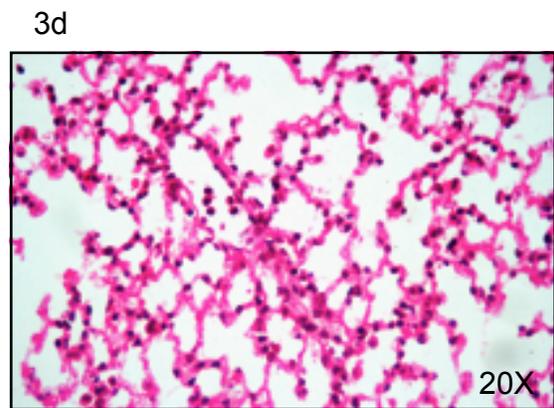
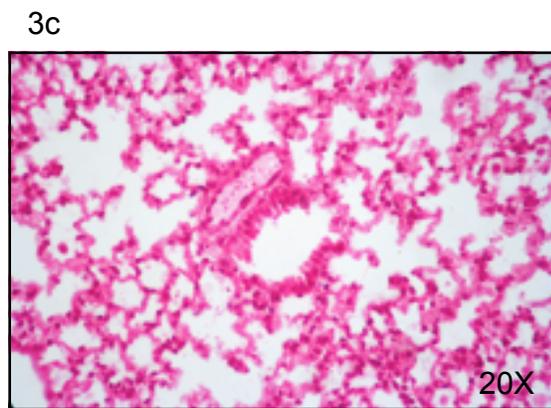
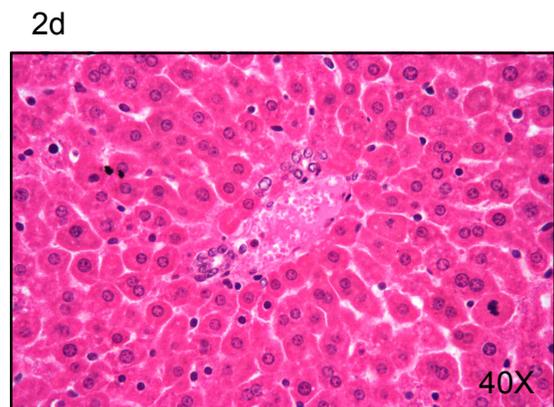
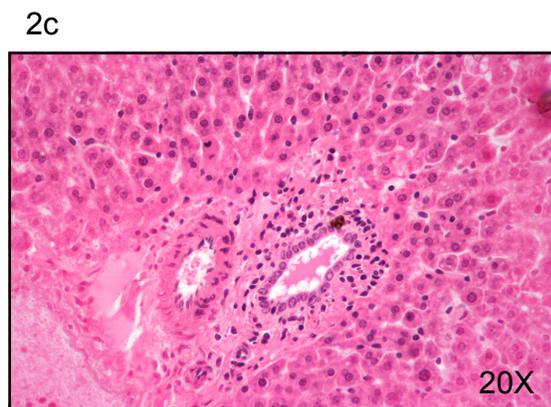
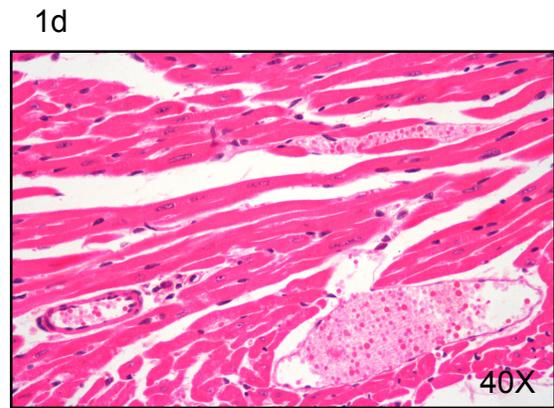
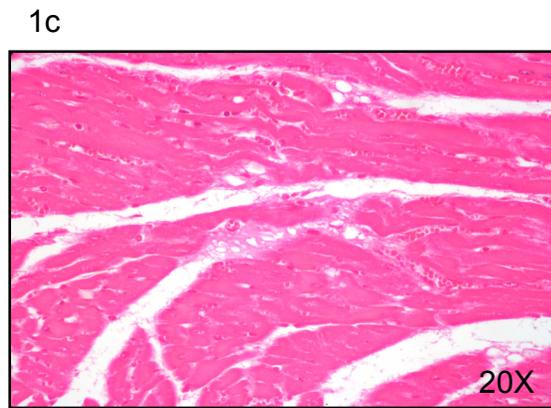


Figura 12. *Continuación...*

El daño mencionado se ejemplifica como una mayor distensión de las fibras cardiacas en presencia de la fracción 9.1 (Figura 12B), mayor nivel de necrosis glomerular y daño alveolar en presencia de la 10.2 (Figura 12C) y la 11.1b (Figura 12D). La neurotoxina MlatA1 no afecta la estructura general de los tejidos examinados (Figura 12A). El análisis histopatológico no fue suficientemente concluyente para relacionar el daño a tejido cardiaco y/o pulmonar con el sangrado buco/nasal presente en varios ratones.

Resulta muy importante resaltar que éstas fracciones también participan activamente en el desarrollo del bloqueo neuromuscular al ser probadas en preparaciones aisladas nervio frénico-diafragma (Figura 13). En los primeros 30 minutos del experimento las fracciones PLA2 provocan un aumento considerable de la respuesta del diafragma a la estimulación indirecta, mismo que disminuye paulatinamente hasta llegar a un bloqueo mayor al 70% en los casos de las toxinas 8.2, 9.1 y 10.2. y menores al 50% para las toxinas F7.1 y F11.1b (Figura 13A).

Es posible suponer que las toxinas F7.1 y F8.2 y, en menor proporción, la F9.1, facilitan la liberación de un gran número de vesículas cargadas con neurotransmisor desde la terminal nerviosa dado el importante incremento en el valor de tamaño cuántico (Figura 13B). Esas vesículas, en bajo o alto número, contienen cantidades variables de neurotransmisor (Figura 13C). Las fracciones 8.2 y 9.1 provocan una disminución importante del contenido cuántico (del 20% en el caso de 9.1 a casi 40% en el caso de 8.2) que se recupera en los siguientes 5 a 15 minutos para finalmente disminuir a casi el 50% del control (Figura 13C). Por su parte, la fracción 11.1b induce una disminución severa en éste parámetro en los primeros 15 minutos, y se mantienen cercano al 50% del control durante todo el tiempo del experimento. La fracción 10.2 provoca un ligero incremento en los primeros 5 minutos que fluctúa (del 95 al 105% del control) durante los siguientes 20 minutos para, finalmente, disminuir hasta un 60% del control al final del experimento.

La actividad del veneno completo sobre la membrana muscular de hemidiafragma de ratón provoca una disminución del potencial de reposo, en preparación aislada, elevando el potencial de -70 mV a -40 mV en los primeros 30 minutos del experimento para finalizar con un valor cercano a los -20 mV luego de dos horas de experimentación (Figura 13D). Este resultado sugiere un daño directo a la estructura celular. Lamentablemente, no fue posible analizar histológicamente estas preparaciones por lo que no existe el dato estructural correspondiente. Resulta interesante observar que ninguna de las fracciones probadas muestra una actividad similar contra la misma preparación aunque es posible que el daño observado se encuentre mediado por un componente no tóxico (no incluido en estos ensayos) o bien por la actividad conjunta de todas las fosfolipasas estudiadas (Figura 13D).

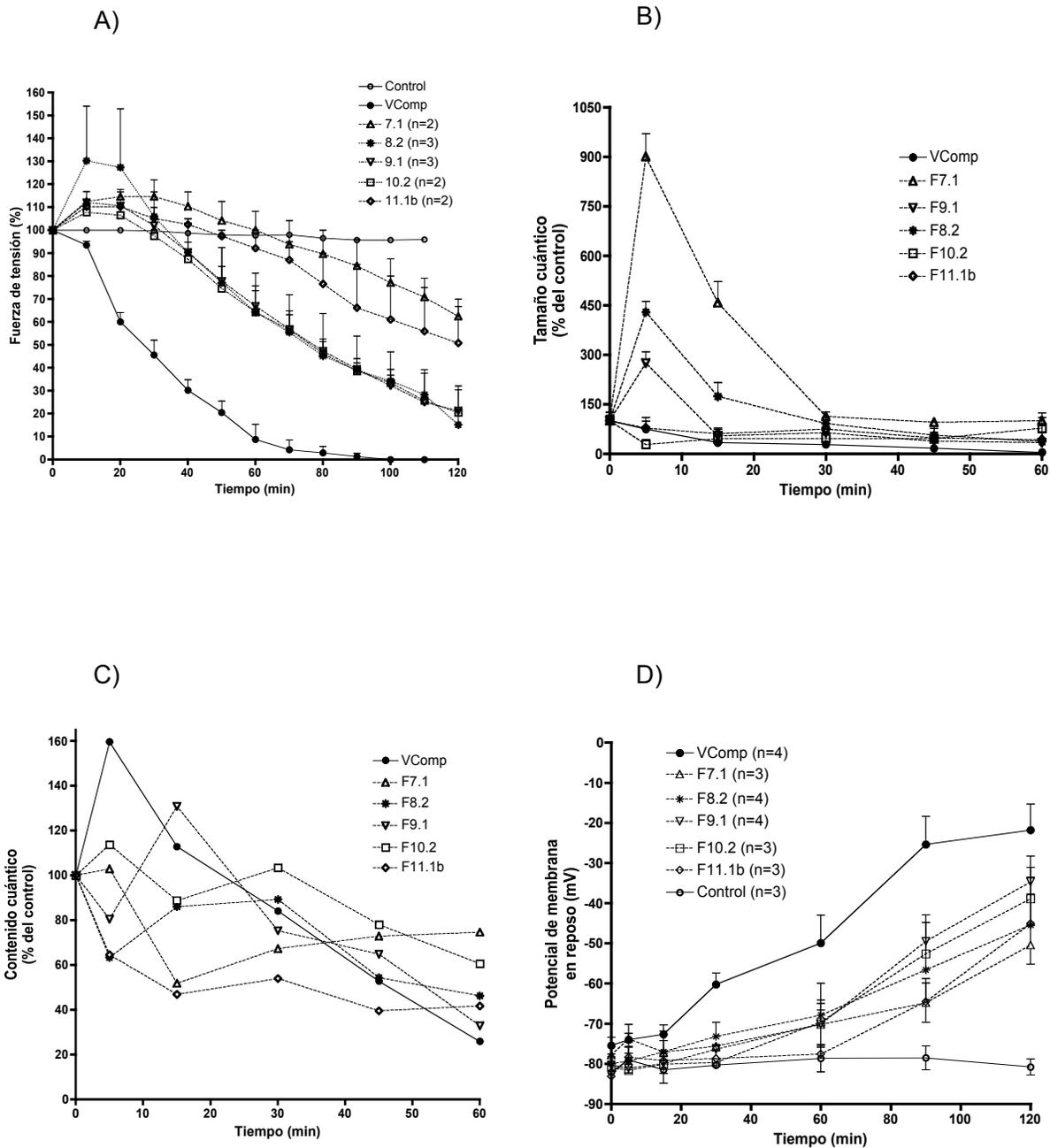


Figura 13. Efectos de fracciones de veneno de *M. laticollaris* sobre preparación nervio frénico-diafragma de ratón. A) Comparación de la capacidad bloqueadora de las fracciones PLA2 (10 $\mu\text{g/ml}$) y el veneno completo (10 $\mu\text{g/ml}$). B) Alteraciones en la magnitud del tamaño cuántico (TC, potencial de placa generado por al liberación de un quantum de acetilcolina). Note el efecto elevado y prolongado ejercido por las fracciones 7.1 y 8.2. C) Alteraciones en la magnitud del contenido cuántico (CC, potencial de placa generado por la liberación orquestada de un cierto número de quantas de acetilcolina). Note el efecto trifásico ejercido por la fracción F9.2. D) Efecto sobre el potencial de reposo de fibras musculares de diafragma de ratón (preparación curarizada, 5 $\mu\text{g/ml}$ de d-Tubocurarina). Cada punto representa la media \pm error estándar de la media de 3 a 4 experimentos.

5.3 Tercera parte: Reconocimiento y neutralización específica

Para la realización de este trabajo se generaron dos sueros hiperinmunes, siguiendo los esquemas que se muestran en los anexos 1 y 2:

- a) Suero de caballo anti-veneno completo de *M. laticollaris*
- b) Suero de conejo anti-MlatA1 (toxina purificada, ver apartado 5.2.1 y 5.2.2)

Adicionalmente, se utilizó el esquema previamente reportado (Carbajal-Saucedo, 2004) para obtener suero de conejo anti-veneno completo de *M. laticollaris*.

El veneno completo de *M. laticollaris* es capaz de generar una muy importante respuesta inmune en conejo tal como lo muestran los valores de títulos de anticuerpos específicos. A partir de los primeros 20 días de inmunización es posible observar valores que rebasan títulos de 3000 que, luego de 70 días rebasan los 50,000. Incluso, uno de los tres conejos utilizados rebasa el valor de 120,000 luego de 84 días de inmunización (Cuadro 9).

Cuadro 9. Evolución de títulos de suero de conejo anti-*M. laticollaris*

Conejo	Días de inmunización			
	21	49	77	84
42	3316 (2401 - 4581)	18373 (11486 - 29390)	60913 (24699 - 150225)	NR
44	8866 (5725 - 13729)	20567 (10666 - 39662)	51059 (36222 - 71975)	NR
46	ND	ND	116445 (91150 - 148760)	123102 (109540 - 138343)

Título = Dilución de suero a la cual se alcanza el 50% de la respuesta máxima (A405 nm)

El antígeno fue administrado vía subcutánea siguiendo el esquema que se muestra en los anexos

Se muestra el título obtenido el día señalado. Entre paréntesis se muestra el intervalo de confianza (95%)

NR. No realizado

ND. No determinado

NOTA: Ninguno de estos sueros logró neutralizar la letalidad del veneno (3DL50/ratón) en ensayos de pre incubación aún utilizando el máximo volumen posible por ensayo (450 µl/3DL50)

Por su parte, la toxina purificada MlatA1 logra despertar una importante respuesta inmune dentro de los 60 días del esquema utilizado, alcanzando títulos superiores a 18,000 (Cuadro 10).

Cuadro 10. Evolución de títulos de suero anti-MlatA1 (toxina purificada)

Conejo	Días de inmunización			
	Pre inmune	23	44	65
276	46.04 (23.84 - 88.89)	2309 (1920 - 2776)	6949 (5734 - 8422)	18849 (14004 - 25368)
	4.51	15723	8746 (5992 -	30019
277	(0.07 - 284)	(10486 - 23575)	12765)	(22614 - 39848)

Título = Dilución de suero a la cual se alcanza el 50% de la respuesta máxima (A405 nm)

El antígeno fue administrado vía subcutánea siguiendo el esquema que se muestra en los anexos

Se muestra el título obtenido el día señalado. Entre paréntesis se muestra el intervalo de confianza (95%)

NR. No realizado

ND. No determinado

NOTA: Ninguno de estos sueros logró neutralizar la letalidad del veneno (3DL50/ratón) en ensayos de pre incubación aún utilizando el máximo volumen posible por ensayo (450 µl/3DL50)

Resulta indispensable, para fines de la discusión que se llevará más adelante, resaltar el hecho de que ninguno de los sueros de conejo mencionados en los párrafos anteriores fue capaz de neutralizar el efecto letal del veneno o de la fracción purificada, ni siquiera al utilizar las más altas dosis de antiveneno que el ensayo permite (400 a 450 µl de suero pre incubados con el equivalente a 3DL50 de veneno o toxina). Estos resultados motivaron la decisión de modificar el modelo de producción de antiveneno. Dado que Coralmyn (el antiveneno comercial), al igual que otros varios antivenenos, es generado en caballo, se decidió utilizar a este animal para generar el tercer suero experimental.

En caballo, fue posible obtener anticuerpos específicos contra veneno completo de *M. laticollaris* a partir del día 45, superando títulos de 70,000 que, 45 días después, disminuirían a poco más de 50,000 para posteriormente elevarse hasta un valor máximo superior a 100,000 en el día 195 del esquema (Figura 14). La capacidad neutralizante aparece hasta el día 150 y alcanza su máximo nivel el día 196 (0.552 mg de veneno neutralizados por mililitro de suero; Cuadro 11). De manera comparativa, el antiveneno comercial Coralmyn (el único antiveneno disponible en México y que es generado contra el veneno completo de *M. nigrocinctus*⁵) muestra una potencia

⁵ A lo largo del desarrollo y defensa de este trabajo se modificó el esquema de inmunización para la generación de Coralmyn incluyendo los venenos de *M. tener* y *M. fulvius* (Calderón-Corona, 2011). Este nuevo Coralmyn no fue utilizado en ninguna etapa del presente trabajo.

neutralizante de 0.442 mg/ml contra este mismo veneno (Carbajal-Saucedo, 2004).

Cuadro 11. Evolución de títulos y potencia neutralizante de suero de caballo anti-*M. laticollaris*.

Suero (días de inmunización)	Título	Potencia		
		EC50*	(mg/ml)**	DL50/ml***
150	82387	200.4 (156-257.4)	0.148	15
196	108936	53.63 (42.8-67.2)	0.552	55.9
225	43979	150.6 (137.1-165.3)	0.196	19.9
240	68071	67.97 (60.38-76.53)	0.435	44.1

* Volumen de antisuero (μ l) necesario para neutralizar 3DL50 de veneno (vía endovenosa; 30 minutos de pre incubación a 37° C)

** Cantidad de veneno (mg) neutralizada por volumen de suero (ml)

*** Cantidad de DL50 neutralizadas por volumen de antiveneno (ml)

Entre paréntesis se muestra el intervalo de confianza

Los tres antivenenos (suero de conejo y caballo anti veneno completo de *M. laticollaris* y Coralmyl) mostraron una marcada tendencia a reconocer las fracciones tipo PLA2 de este veneno, aunque existen diferencias significativas entre el reconocimiento que cada antiveneno muestra hacia cada una de las fracciones probadas (Figura 15).

Tanto el suero de caballo anti-*M. laticollaris* como el antiveneno comercial Coralmyl mostraron una importante capacidad para neutralizar la actividad letal de algunas fracciones PLA2 (Cuadro 12). Resulta muy interesante resaltar que ninguno de los sueros (conejo o caballo) generados contra veneno completo de *M. laticollaris*, fueron capaces de neutralizar la actividad letal de la toxina MlatA1, aún usando el máximo volumen posible de suero (450 μ l de suero por 3DL50).

Coralmyl resultó ser el único antiveneno capaz de neutralizar la letalidad de la toxina MlatA1, aunque fue necesario utilizar volúmenes grandes de antiveneno para hacerlo (Cuadro 12).

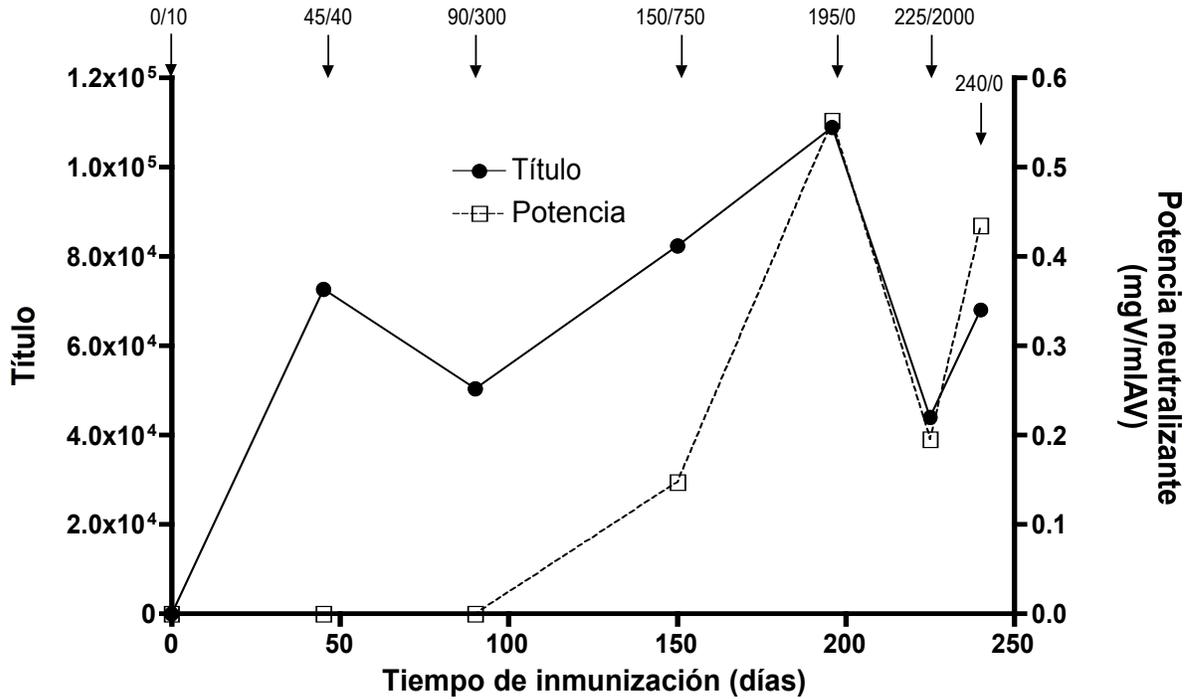


Figura 14. Desarrollo de suero de caballo anti-*M. laticollaris*. Cantidades crecientes de veneno fueron administradas a una yegua de 450 kg vía subcutánea, inyectando tanto en lomo como en la base del cuello. Título (-●-) se define como la dilución de suero a la cual se alcanza el 50% de la respuesta máxima (A405nm. Potencia neutralizante (-○-), se muestra como cantidad de veneno (mg) neutralizada por 1 ml de suero. Las flechas indican el día de inmunización / cantidad (μ g) administrada.

Cuadro 12. Comparación de la potencia neutralizante del suero de caballo anti-*M. laticollaris*, y el antiveneno comercial Coralmyl contra las subfracciones letales obtenidas por RP-HPLC

Fracción	DL50 ($\mu\text{g}/\text{ratón}$)	Potencia neutralizante				
		suero anti- <i>M. laticollaris</i>			Coralmyl +	
		Conejo ($\mu\text{l}/3\text{DL50}$) *	Caballo		($\mu\text{l}/3\text{DL50}$)*	(mg/ml)**
			($\mu\text{l}/3\text{DL50}$) *	(mg/ml) **		
2.1 (1.22-1.32)	1.27	> 450	> 450	< 0.009	250-300	0.013-0.016
7.1 (0.78-63.78)	7.09	> 450	17	1.253	40-100	0.213-0.533
8.2 (6.97-8.31)	7.6	> 450	12.7	1.795	< 100	> 0.228
9.2 (6.87-7.19)	7.0	> 450	17.1 (16.19-18.01)	1.228	40-100	0.210-0.525
10.2 (5.82-6.74)	6.30	> 450	12.2 (12.09-12.38)	1.721	\pm 40	\pm 0.525
11.1b (6.76-7.2)	6.97	> 450	14.7 (13.82-15.63)	1.286	\pm 40	\pm 0.473
Veneno (9.61-9.69)	9.65	> 450	53.6 (42.79-67.22)	0.554	82.2 (34.25-197.2)	0.437

* Volumen (μl) de antiveneno necesario para neutralizar 3DL50 de veneno o toxina

** Cantidad (mg) de veneno o toxina neutralizados por volumen de antiveneno (ml)

\pm = se muestran los valores en los que se obtiene el 0 y el 100% de supervivencia (el valor preciso de potencia neutralizante debe encontrarse dentro de este rango). No fue posible obtener un valor más acerado debido a la falta de antiveneno.

Entre paréntesis se muestra el intervalo de confianza

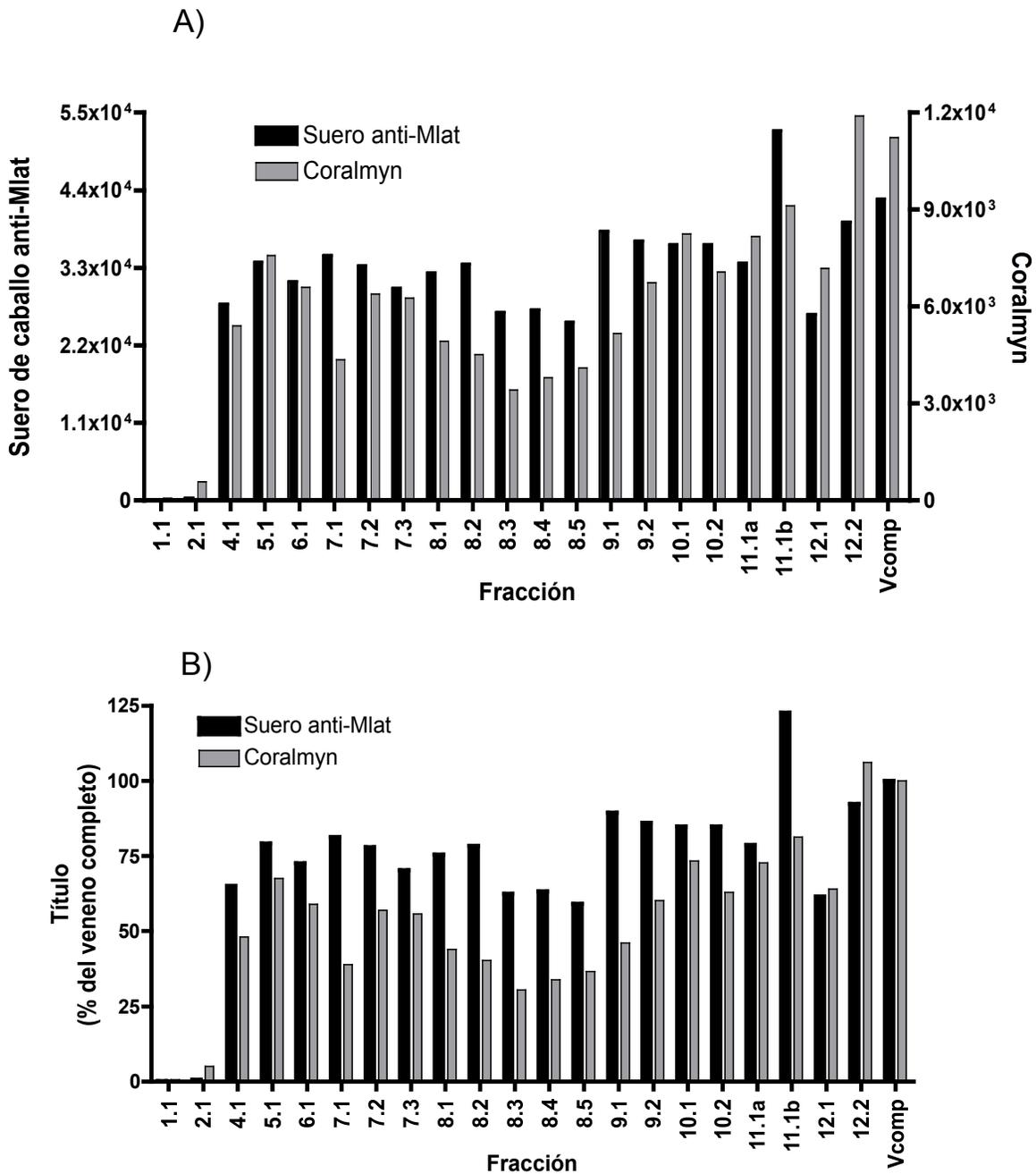


Figura 15. Reconocimiento de fracciones de veneno de *M. laticollaris* por antivenenos. A) Suero de caballo anti-*M. laticollaris* y Coralmyn (ambos en dilución 1:500). B) Los títulos mostrados son presentados como porcentaje relativo tomando como 100% el valor que cada antiveneno mostró hacia el veneno completo.

5.4 Cuarta parte: Reconocimiento y neutralización heteróloga

Resulta indispensable recordar que a lo largo de este trabajo se generaron tres sueros hiperinmunes:

- a. Suero de conejo anti-*Micrurus laticollaris*. Generado contra veneno completo. Título promedio superior a 70,000 (Cuadro 9). No mostró capacidad de neutralización contra veneno completo o fracciones selectas (Cuadro 12).
- b. Suero de conejo anti-MlatA1. Generado contra la neurotoxina MlatA1. Título promedio superior a 20,000 (Cuadro 10). No mostró capacidad neutralizante contra la toxina homóloga o el veneno completo (Cuadro 12).
- c. Suero de caballo anti-*M. laticollaris*. Generado contra veneno completo de *Micrurus laticollaris*. Mostró una potencia neutralizante de 0.554 mg de veneno por mililitro de suero (Cuadro 11). Mostró capacidad de reconocimiento y neutralización de las fracciones PLA del veneno de *M. laticollaris* aunque no logró neutralizar la letalidad de la toxina MlatA1 (Cuadro 12).

Adicionalmente, se utilizó el antiveneno comercial Coralmyl (fragmentos F(ab')₂ de inmunoglobulinas de caballo específicos contra veneno de *M. nigrocinctus*) con fines comparativos.

La comparación de reconocimiento y neutralización heteróloga de estos antivenenos formó parte del trabajo de titulación por etapas presentado por Melisa Bénard Valle para obtener el título de Bióloga por la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (fecha de obtención de grado: 15 de Enero de 2010; Bénard-Valle, 2010). Debido a que el suero de conejo anti-veneno completo no mostró ninguna capacidad neutralizante no fue tomado en cuenta en los análisis posteriores.

Para la obtención de los resultados de esta sección se utilizaron los venenos de 12 especies de coralillos (ver Anexo 3). Ninguno de los ejemplares utilizados continua con vida, sin embargo, los especímenes se encuentran dentro de la sección de preservados de la colección Herpetario Kiinam.

Los venenos de todas las especies probadas mostraron poseer altos niveles de similitud inmunoquímica con los componentes de *M. laticollaris* y *M. nigrocinctus*, como lo muestran los altos niveles de títulos alcanzados por el suero de conejo anti toxina MlatA1, el suero de caballo anti-*M. laticollaris* y el antiveneno comercial Coralmyl (Cuadro 13). Los antivenenos generados contra venenos completos (suero de caballo anti-*Micrurus laticollaris* y Coralmyl) reconocen la mayoría de las bandas proteicas de las diferentes especies (Bénard-Valle, 2010).

Resulta de enorme importancia resaltar que el suero de conejo anti-MlatA1 únicamente reconoce una banda proteica en sólo algunos venenos (Figura 16) lo que sugiere que las especies que la presentan (*M. diastema*, *M. elegans*, *M. latifasciatus*, *M. limbatus* y *M. surinamensis*) poseen una o varias toxinas inmuoquímicamente similares a MlatA1 en cantidad suficientemente elevada como para ser reconocidas bajo las condiciones descritas. Adicionalmente, el veneno de *Naja melanoleuca*, un miembro de la familia Elapidae del que ya han sido descritas varias alfa neurotoxinas, no mostró reactividad contra este suero.

En cuanto a los antivenenos generados contra venenos completos, al tomar los valores de títulos obtenidos para los venenos específicos (*M. laticollaris* para el suero de caballo anti-*M. laticollaris* y *M. nigrocinctus* para Coralmyn) como un 100% es posible observar que los valores para venenos no específicos oscilan entre 56 y el 114% utilizando el suero de caballo anti-*M. laticollaris* y entre el 54 y el 128% para Coralmyn. En ambos casos, el título obtenidos contra veneno de *M. diastema* superó los valores mostrados contra los venenos específicos (Cuadro 13).

Cuadro 13. Comparación de potencia neutralizante entre tres diferentes antivenenos y propuesta de grupos antigénicos en venenos de coralillos

Grupo antigénico	Especie	Caballo a-Mlat		Conejo a-MlatA1		Coralmyn	
		Título	(mgV/Mlat)	Título	Presencia	Título (mgV/mlAV)	
A	<i>M. diastema</i>	17183	0.829	7452	+	10459	0.546
	<i>M. laticollaris</i>	15013	0.440	18414	+	5246	0.476
B	<i>M. browni</i>	10933	2.512	602	-	6806	3.333
	<i>M. distans</i>	10005	0.999	926	-	4612	1.124
	<i>M. ephippifer</i>	12832	0.971	290		5879	ND
C	<i>M. latifasciatus</i>	10962	0.150	3303	+	7305	ND
	<i>M. limbatus</i>	8385	0.239	8065	+	6045	0.529
D	<i>M. fulvius</i>	11498	0.262	20	-	5197	0.562
	<i>M. nigrocinctus</i>	14193	0.190	799	-	8178	3.226
	<i>M. tener</i>	10940	0.195	927	-	4434	ND

La potencia neutralizante es expresada como cantidad (mg) de veneno neutralizada por volumen de antiveneno (ml)

Título = Dilución de suero a la cual se alcanza el 50% de la respuesta máxima (A405nm)

Presencia de proteínas inmuoquímicamente similares a MlatA1. Se considera positivo (+) cuando el título de suero de conejo anti-MlatA1 es mayor al 10% del mostrado contra el veneno homólogo (*M. laticollaris*)

ND = N Determinado

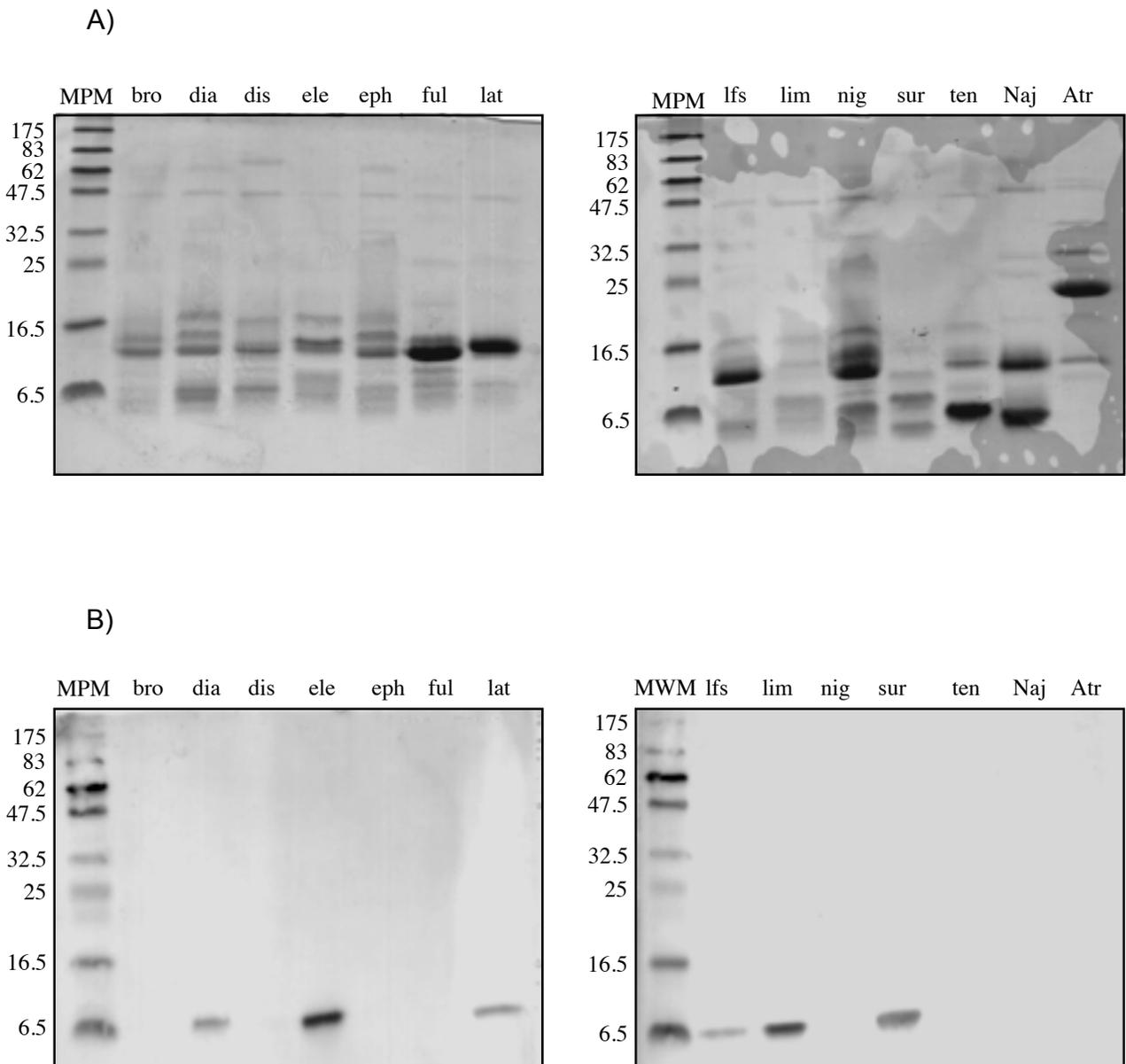


Figura 16. Capacidad de reconocimiento heterólogo del suero de conejo anti-MlatA1. A) Perfil electroforético de venenos de coralillos (SDS-PAGE 17% en condiciones reductoras, 10 μg /carril). B) Un gel similar al mostrado en el panel A (excepto porque fueron cargados 2 μg de veneno por carril) fue incubado con suero de conejo anti-MlatA1 (1:500) y revelado conforme se establece en materiales y métodos. bro=*Micrurus browni*, dia=*M. diastema*, dis=*M. distans*, ele=*M. elegans*, eph=*M. ehippifer*, ful=*M. fulvius*, lat=*M. laticollaris*, lfs=*M. latifasciatus*, lim=*M. limbatus*, nig=*M. nigrocinctus*, sur=*M. surinamensis*, ten=*M. tener*. Venenos de cobra (Naj=*Naja nigricollis*) y un vipérido (Atr=*Atropoides nummifer*) fueron incluidos con fines comparativos. MPM=Marcadores de peso molecular (Kda).

En cuanto a la capacidad neutralizante de estos antivenenos, el suero experimental de caballo generado contra el veneno de *M. laticollaris* neutralizó venenos de especies que no fueron incluidas dentro del esquema de inmunización con potencias que van desde 0.15 hasta 2.51 mg de veneno por mililitro de suero, mostrando la menor potencia (entre 0.3 y 0.6 mg de veneno por mililitro de suero) contra los venenos de *M. fulvius*, *M. latifasciatus*, *M. limbatus*, *M. nigrocinctus* y *M. tener* (Bénard-Valle, 2010), mientras que los venenos de *M. browni*, *M. diastema*, *M. distans* y *M. ephippifer* fueron neutralizados entre dos y seis veces mejor que el propio veneno de *M. laticollaris* (1.9 a 5.7 mg de veneno por mililitro de suero; Cuadro 13).

El antiveneno comercial Coralmyn mostró potencias neutralizantes entre 0.476 y 3.226 mg de veneno por mililitro de antiveneno que se traduce en potencias entre 3 y 7 veces menor que las mostrada contra el veneno específico (3.333 mg de veneno por mililitro de antiveneno; Cuadro 13; Carbajal-Saucedo, 2004).

6. Discusión

RECONOCIMIENTO Y NEUTRALIZACIÓN

El envenenamiento por serpiente sigue siendo un importante problema de salud pública global (Chippaux, 1998; Chippaux, 2006; World-Health-Organization, 2010) y nuestro país no es una excepción en el problema (Tay-Zavala, Diáz et al., 2002) aunque los datos epidemiológicos sean insuficientes para brindar un panorama más adecuado (Frayre-Torres, Sevilla-Godínez et al., 2006).

Dada la potencia y actividades biológicas de los venenos de coral, la neutralización efectiva (homóloga o heteróloga) ha sido uno de los grandes retos a afrontar desde finales de la década de los 60s (Cohen et al., 1967; Cohen et al., 1968) y ha sido un tema de particular atención para los grupos de investigación centro y sudamericanos, quienes han desarrollado la mayor experiencia en esta área (Cuadro 4). Vale la pena mencionar que en la mayoría de los casos, la selección de los antígenos a utilizar se ha basado en la disponibilidad de los venenos más que en rigurosos estudios epidemiológicos o de reactividad cruzada (observación personal).

Con el desarrollo del suero polivalente anticoral en Brasil a inicios del siglo XX quedó demostrada la capacidad de los venenos de coralillos Sudamericanos (*Micrurus corallinus* y *M. frontalis*) para generar anticuerpos que neutralizaran las actividades biológicas de sus toxinas. Años después se obtendrían resultados similares utilizando veneno de una especie Norteamericana (*M. fulvius*) (Cohen, Seigmann et al., 1967).

Aún más importante resultó la demostración de la capacidad de reconocimiento y neutralización heteróloga obtenido al utilizar el

antiveneno brasileño contra el veneno de la especie norteamericana (Cohen, Dawson et al., 1968) (Cuadro 4). Sin duda, estos resultados permitirían suponer que los venenos de coralillos Norte y Sudamericanos guardasen tal nivel de similitud —sin importar la distancia geográfica— que bastaría incluir alguna especie Centroamericana para cubrir por completo el continente con un antiveneno del más amplio espectro.

Sin embargo, para mediados de la década de los 70s se demostró que aún dentro de especies centroamericanas que comparten áreas de distribución (*M. alleni*, *M. nigrocinctus* y *M. mipartitus*), la capacidad de neutralización homóloga y heteróloga sería una meta más difícil de conseguir de los que se habría supuesto (Bolaños et al., 1975), particularmente contra el veneno de *M. mipartitus*.

A finales de la década de los 70s, en un nuevo intento por obtener un antiveneno de amplio espectro, se planteó incluir el veneno de la especie de mayor importancia médica en Centroamérica (*M. nigrocinctus*), el más difícil de neutralizar en la misma zona (*M. mipartitus*) y un representante sudamericano (*M. pyrrhocryptus*). Los resultados encontrados permiten hacer algunas sugerencias:

- a) Venenos como *M. carinicauda dumerilii* (CA) y *M. corallinus* (SA), que fueron neutralizados con mayor potencia que los venenos homólogos, no sólo contienen toxinas similares a las de los venenos usados en la mezcla antigénica sino que incluso podrían estar presentes en menor proporción comparados con aquellos.
- b) En venenos como *M. fulvius* (NA) y *M. lemniscatus* (SA) las toxinas responsables de la letalidad deben ser bastante similares y estar presentes en proporciones parecidas a aquellas de los venenos homólogos, ya que fueron neutralizados con potencias similares a las de *M. nigrocinctus* y *M. pyrrhocryptus*.
- c) La naturaleza y/o proporción de las toxinas letales de *M. surinamensis* y, en menor proporción pero de gran relevancia, *M. spixii*, debe ser fuertemente disímil a la de cualquiera de los tres venenos utilizados en la mezcla antigénica ya que la potencia neutralizante mostrada resulta mucho menor que la obtenida para cualquiera de los venenos homólogos
- d) Incluir veneno de *M. mipartitus* en una mezcla antigénica provoca la disminución de respuesta neutralizante comparado al uso del veneno como antígeno único (Bolaños, Cerdas et al., 1975). Aunque la diferencia pudiera deberse a una modificación del esquema de inmunización, la presencia de otros inmunógenos pudiera distraer la producción de anticuerpos neutralizantes contra este veneno.
- e) Dada la disminución de potencia neutralizante contra veneno de *M. alleni* (Bolaños, Cerdas et al., 1975) es posible que éste (al igual que los venenos mencionados en el tercer inciso), guarde una baja similitud y/o proporción de toxinas letales con los venenos utilizados en la mezcla antigénica.

Estas observaciones no solo tienen relevancia dentro del contexto del trabajo de Bolaños y colaboradores, sino que —a pesar de haber pasado inadvertidos— pueden ayudar a comprender los resultados obtenidos hasta ahora con diversos antivenenos anti coralillos (Cuadro 4).

En este trabajo se demostró que el veneno de *M. laticollaris* posee dos grandes grupos de toxinas relevantes durante el envenenamiento. Por lado, MlatA1 —y toxinas similar no descritas durante este proyecto—, dada su alta afinidad por el receptor de acetilcolina pueden provocar una rápida disminución de la respuesta de contracción en la unión neuromuscular. Sin embargo, dada la baja proporción que representa en el veneno, la actividad sola de esta proteína no es responsable de la muerte de los ratones.

La mayor parte de las proteínas que forman el veneno de *M. laticollaris* son miembros de la familia de las fosfolipasas A2 (PLA2) enzimáticamente activas y con una importante variedad de actividades biológicas (neuro, hepato, nefro y/o cardiotoxicas). Son ellas, además, los blancos principales de la respuesta inmune del caballo en la generación de anticuerpos neutralizantes homólogos y provocando, de manera secundaria, una baja respuesta de hacia toxinas como MlatA1 (Figura 15). Cabe mencionar que en veneno de *M. nigrocinctus* la proporción de toxinas similares a MlatA1 es mayor que en *M. laticollaris* (Alape-Giron, Stiles et al., 1996; Rosso, Vargas-Rosso et al., 1996), lo que podría explicar la capacidad de Coralmyn para reconocer (Figura 15b) y neutralizar la actividad tóxica de MlatA1 (Cuadro 12).

Centrando la discusión momentáneamente en toxinas de tres dedos provenientes de coralillos, la evidencia mostrada en este trabajo pone de manifiesto la necesidad de incluir estas proteínas como parte de los antígenos a utilizar dentro de los esquemas de inmunización, tal como ya había sido sugerido con toxinas de tres dedos provenientes de cobras (Chotwiwatthanakun et al., 2001). La expresión de alfa neurotoxinas de coral en modelos bacterianos ya había sido reportada con resultados muy similares a los presentados en este trabajo (Silveira de Oliveira, Rossan de Brandao Prieto da Silva et al., 2000). Nuevas metodologías para la expresión heterólogas de toxinas con alta cantidad de puentes disulfuro (Estrada et al., 2007) pueden ayudar a la obtención de proteínas recombinantes completamente activas

Resulta indispensable continuar la investigación sobre las diferencias inmunoquímicas entre los diferentes miembros de toxinas de tres dedos contenidas en venenos de coralillos con la finalidad de definir grupos biológica e inmunoquímicamente similares. Los venenos de *Micrurus* norteamericanos estudiados hasta ahora muestran una baja proporción de componentes tipo alfa neurotoxina mientras que muestran una gran variedad de compuestos tipo fosfolipasa A2,

tanto por perfil electroforético como por comportamiento en cromatografía de intercambio iónico (Possani et al., 1979; Alape-Girón et al., 1994; Bénard-Valle, 2010), a diferencia de lo que se observa con especies sudamericanas en las que la proporción de componentes similares a alfa neurotoxinas es mucho mayor (da Silva et al., 1991; Higashi et al., 1995; Moraes et al., 2003).

El bajo nivel de neutralización heteróloga mostrado por el antiveneno anti-*M. multifasciatus*⁶ contra los venenos de *M. alleni*, *M. dumerilii carinicauda*, *M. fulvius* y *M. nigrocinctus* (Bolaños et al., 1975) puede deberse a que el veneno utilizado como inmunógeno es rico en componentes tipo alfa neurotoxinas (Rosso et al., 1994) mientras que los otros venenos contienen una mayor proporción de componentes tipo PLA2 (Rosso et al., 1994; Dal Belo, 2004; Bénard-Valle, 2010). Aún más interesante resulta el hecho de que la mezcla inmunogénica de los venenos de *M. multifasciatus*, *M. nigrocinctus* y *M. pyrrhocryptus* genera un antiveneno con baja potencia neutralizante contra el veneno de *M. multifasciatus* (Bolaños et al., 1978) lo que sugiere que existe un cierto grado de competencia antigénica entre los componentes tipo alfa neurotoxinas y aquellos tipo PLA2, en la que los últimos muestran una mayor probabilidad de ser reconocidos por el sistema inmune del caballo (Carbajal-Saucedo, 2004; Este trabajo).

Colocando la discusión dentro de los componentes tipo PLA2, también parecen formarse grupos inmoquímicamente afines. El antiveneno brasileño generado contra venenos de *M. corallinus* y *M. frontalis* muestra un buen nivel de neutralización contra el veneno de *M. fulvius* (Cohen, Dawson et al., 1968; Rawat et al., 1994). De la misma forma, distintos antivenenos generados contra veneno de *M. nigrocinctus* neutralizan de manera adecuada los venenos de *M. alleni*, *M. corallinus* y *M. fulvius* (Bolaños, Cerdas et al., 1975; Rawat, laing et al., 1994; Carbajal-Saucedo, 2004; de Roodt, Paniagua-Solis et al., 2004) lo que sugiere un importante nivel de similitud entre estos venenos. Resulta muy interesante observar que el antiveneno generado en caballo contra *M. laticollaris* muestra prácticamente el mismo nivel de neutralización contra los venenos de *M. nigrocinctus* y *M. fulvius* lo que apoya la idea del parecido entre los dos últimos venenos y al mismo tiempo señala la diferencia que guardan con el veneno de *M. laticollaris*.

Los grupos antigénicos propuestos en este trabajo (Cuadro 13) se basan tanto en la capacidad neutralizante mostrada por el suero de caballo anti-*M. laticollaris* como por el reconocimiento mostrado

⁶ Durante años *M. mipartitus* y *M. multifasciatus* fueron consideradas la misma especie (*M. mipartitus*). Sin embargo, actualmente se reconoce que *M. mipartitus* se distribuye en la región norte de Sudamérica (E de Panamá, Colombia, N de Venezuela, E de Ecuador) mientras que *M. multifasciatus* alcanza el NE de Nicaragua, N/E de Costa Rica, E/C de Panamá y Colombia. En resumen, la especie reportada por Bolaños et al. (1978) y por Rosso et al. (1994) debe ser *M. multifasciatus* (Uetz, 2007).

por el suero de conejo anti-MlatA1. Bajo estos criterios, se sugiere que los grupos A y B (*Micrurus browni*, *M. diastema*, *M. distans* y *M. ephippifer*) ejercen su actividad letal por medio de PLA2 muy similares a las descritas en este trabajo y que, al mismo tiempo aún cuando muestren (i.e. *M. diastema*), o no, presencia de toxinas similares a la neurotoxina MlatA1, su participación durante el envenenamiento debe ser baja.

Por otro lado, sería posible sugerir que los venenos de *M. latifasciatus* y *M. limbatus* (grupo C, Cuadro 13) ejerzan su acción letal debido, principalmente, a la actividad de alfa neurotoxinas similares a MlatA1. Sin embargo, los perfiles electroforético (de ambos) y cromatográfico (sólo de *M. latifasciatus*) sugieren una mayor proporción de componentes tipo PLA2 ((Bénard-Valle, 2010). Por ello, se propone que estos venenos poseen PLA2 tóxicas cuyos epítopes letales son distintos a los de *M. laticollaris* a tal grado que son difícilmente neutralizados por el antiveneno.

Basado en el mecanismo de acción de los venenos, Vital-Brazil (1987) reconoce que *M. nigrocinctus* y *M. fulvius* se diferencian de los otros venenos debido a que provocan un marcado efecto despolarizante. Este efecto puede deberse al daño causado a la membrana muscular asociado a la actividad miotóxica (Weiss y McIsaac, 1971; Gutiérrez et al., 1983; Arroyo et al., 1987, Gutiérrez et al., 1992; Goularte et al., 1995). Resulta interesante resaltar que estos dos venenos, cuando son probados en preparaciones nervio frénico-diafragma de ratón, provocan un lento bloqueo de la respuesta de tensión que no responde a anticolinesterásicos mientras que disminuye la respuesta del músculo a estimulación directa (Weiss y McIsaac, 1971; Goularte, 1993). Este comportamiento apunta a que el principal efecto tóxico responsable del bloqueo y las alteraciones morfológicas esta mediado por componentes tipo PLA2

Con base en los trabajos antes citados y debido a la baja potencia neutralizante mostrada por el suero de caballo anti-*M. laticollaris* (un antiveneno que reconoce principalmente toxinas fosfolipásicas) es posible señalar que *M. nigrocinctus* y *M. fulvius* pertenecen a un grupo antigénico particular que guarda gran similitud entre ellos, tanto en modo de acción como a nivel de epítopes neutralizantes. Es posible que la similitud antigénica se encuentre más relacionada con la historia filogenética de los grupos que con la distribución geográfica que ocupan.

Por último, con base en la evidencia mostrada en este trabajo, se propone que el envenenamiento causado por *Micrurus laticollaris*, y posiblemente por otras especies relacionadas, inicia con la rápida difusión de los componentes alfa neurotóxicos hacia la unión neuromuscular donde se unen al receptor nicotínico de acetilcolina. Aún cuando no es posible, con los datos aquí presentados, establecer un tiempo de acción de estas toxinas se puede suponer

que el establecimiento del complejo toxina-receptor demora entre 5 y 20 minutos ya que la sintomatología mostrada por los ratones así lo sugiere.

Casi al mismo tiempo que las alfa neurotoxinas bloquean los receptores de acetilcolina, algunas fracciones (particularmente F7.1 y F8.2) promueven una importante liberación del neurotransmisor mientras que otra fracción (F9.2) lleva a un progresivo bloqueo de la comunicación neuromuscular (Figura 13). Es posible que la gran mayoría de la acetilcolina liberada sea degradada por la actividad de la acetilcolinesterasa endógena provocando una depleción en los niveles de neurotransmisor en la terminal nerviosa. Las pocas moléculas restantes de acetilcolina no serían suficientes para deflagrar un potencial de acción en la membrana muscular, aún cuando existan receptores que no hayan sido ocupados por las alfa neurotoxinas.

7. Conclusiones

- Particulares
 - El veneno de *Micrurus laticollaris* está compuesto, en su mayor parte, por fosfolipasas A2 y alfa neurotoxinas.
 - Todas las fosfolipasas de este veneno poseen puntos isoeléctricos superiores a 4.7
 - La principal actividad letal se debe a un progresivo bloqueo de la unión neuromuscular acompañado de daño directo a diversos tejidos (músculo cardiaco, riñón e hígado)
 - La toxina MlatA1 es un nuevo miembro de la familia de alfa neurotoxinas con alta afinidad por el receptor nicotínico de acetilcolina.
 - La metodología utilizada permite la obtención de una proteína recombinante carente de actividad biológica (posiblemente por una inadecuada formación de puentes disulfuro)
 - El veneno de *M. laticollaris* es capaz de generar altos títulos de anticuerpos en conejo y caballo
 - La toxina MlatA1 genera elevados títulos de anticuerpo en conejo sin que dichos anticuerpos muestren capacidad neutralizante
- Generales
 - Las toxinas letales de venenos de coralillos pueden agruparse en dos grandes familias proteicas: Fosfolipasas A2 y Toxinas de tres dedos
 - Las Fosfolipasa A2 de coralillos poseen diversas actividades biológicas entre las que destacan la despolarizante/miotóxica y, en menor proporción, la neurotóxica pre sináptica
 - Las toxinas de tres dedos de coralillos presentan actividades de alfa neurotoxina (bloqueadores del

receptor de acetilcolina) y algunas otras actividades aún no descritas (liberadores de acetil colina)

- Al igual que sucede con otras especies, los antivenenos contra coralillos deben seguir un esquema de regionalización tomando en cuenta las especies de mayor importancia médica para el área
- Los antivenenos contra serpientes de coral deben tomar en cuenta la relación filogenética entre las especies y las actividades biológicas de sus venenos para proponer mezclas antigénicas adecuadas

8. Literatura citada

- Aird, S. D. & N. J. da-Silva. 1991. Comparative enzymatic composition of brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comp Biochem Physiol B*: 99, 287
- Alape-Giron, A., B. Stiles, J. Schmidt, M. Giron-Cortes, M. Thelestam, H. Jornvall & T. Bergman. 1996. Characterization of multiple nicotinic acetylcholine receptor binding proteins and phospholipase a2 from the venom of coral snake *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. *FEBS Letters*, 29
- Arce, V., E. Rojas, C. L. Ownby, G. Rojas & J. M. Gutierrez. 2003. Preclinical assessment of the ability of polyvalent (crotalinae) and anticoral (elapidae) antivenoms produced in costa rica to neutralize the venoms of north american snakes. *Toxicon*: 41, 851
- Bénard-Valle, M. 2010. Similitud bioquímica e inmunoquímica entre venenos de coralillos norteamericanos Licenciatura en Biología. Licenciatura, Trabajo de titulación por etapas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 47 p.
- Bolaños, R., L. Cerdas & R. Taylor. 1975. The production and characteristics of a coral snake (*Micrurus mipartitus hertwigi*) antivenin. *Toxicon*: 13, 139
- Bucarechi, F., S. Hyslop, R. J. Vieira, A. S. Toledo, P. R. Madureira & E. M. de Capitani. 2006. Bites by coral snakes (*Micrurus* spp.) in campinas, state of sao paulo, southeastern brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*: 48, 141
- Campbell, J. A. & W. Lamar. 2004. The venomous reptiles of the western hemisphere. Cornell University, 898 pp.
- Carbajal-Saucedo, A. 2004. Comparación inmunoquímica del veneno de serpeintes de coral (elapidae: *Micrurus*, micruroides) mexicanas Instituto de Biotecnología. Maestría en Ciencias Bioquímicas, Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, UNAM.
- Castoe, T. A., Smith, E., Brown, R.M., Parkinson, C.L. 2004. Higher-level phylogeny of asian and american coralsnakes, their placement within the elapidae (squamata), and the systematic affinities of the enigmatic asian coralsnake *hemibungarus calligaster* (wiegmann, 1834). *Zoological Journal of the Linnean Society*: 151, 809
- Castro de Oliveira, U., A. Assui, A. Prieto-da-Silva, J. Silveira de Oliveira & P. L. Ho. 2003. Cloning and characterization of a basic phospholipase a2 homologue from *Micrurus corallinus* (coral snake) venom gland. *Toxicon*: 42, 249
- Cecchini, A. L., S. Marcussi, L. B. Silveira, C. R. Borja-Oliveira, L. Rodrigues-Simioni, S. Amara, R. G. Stabeli, J. R. Giglio, E. C. Arantes & A. M. Soares. 2005. Biological and enzymatic activities of *Micrurus* sp. (coral) snake venoms. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*: 140, 125
- CENAVECE. 2006, Boletín epidemiología. . Epidemiología Sistema Único de Información, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. p. 24.

- CENAVECE. 2007, Boletín epidemiología. . Epidemiología Sistema Único de Información, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. p. 24.
- CENAVECE. 2008, Boletín epidemiología. . Epidemiología Sistema Único de Información, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. p. 23.
- CENAVECE. 2009, Boletín epidemiología. . Epidemiología Sistema Único de Información, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. p. 24.
- CENAVECE. 2010, Boletín epidemiología. . Epidemiología Sistema Único de Información, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. p. 24.
- CENAVECE. 2011, Boletín epidemiología. . Epidemiología Sistema Único de Información, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. p. 24.
- CENAVECE. 2012, Boletín epidemiología. . Epidemiología Sistema Único de Información, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. p. 24.
- Chippaux, J.-P. 1998. Snake-bites: Appraisal of the global situation. Bulletin of the World Health Organization: 76, 515
- Chippaux, J.-P. 2006. Snake venoms and envenomations. Krieger Pub., Malabar, Fla. xii pp.
- Chotwiwatthanakun, C., R. Pratanaphon, S. Akewan, S. Sriprapat & K. Ratanabanangkoon. 2001. Production of potent polyvalent antivenom against three elapid venoms using a low dose, low volume, multi-site immunization protocol. Toxicon: 39, 1487
- Ciscotto, P. H., B. Rates, D. Silva, M. Richardson, L. Silva, H. Andrade, M. F. Donato, G. A. Cotta, W. S. Maria, R. J. Rodrigues, E. Sanchez, M. de Lima & A. M. Pimenta. 2011. Venomics analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of south american *Micrurus* species. Journal of Proteomics: 74, 1810
- Cohen, P., J. H. Dawson & E. Seligman. 1968. Cross-neutralization of *Micrurus fulvius fulvius* (coral snake) venom by anti-*Micrurus carinicauda dumerilii* serum. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene: 17, 308
- Cohen, P., E. B. Seigmann, Jr. & W. H. Berkeley. 1967. Coral snake venom: Antibody response in rabbits. Nature: 213, 820
- Correa-Neto, C., I. Junqueira-de-Azevedo, D. Silva, P. L. Ho, M. Leitão-de-Araujo, M. L. Alves, L. Sanz, D. Fogel, R. B. Zingali & J. J. Calvete. 2011. Snake venomics and venom gland transcriptomic analysis of brazilian coral snakes, *Micrurus altorostris* and *m. Corallinus*. Journal of Proteomics: 74, 1795
- da Silva, N. J. & S. D. Aird. 2001. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. Comparative Biochememistry and Physiology. Part C. Toxicology and Pharmacology: 128, 425
- da Silva, N. J., P. R. Griffin & S. D. Aird. 1991. Comparative chromatography of brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. Comp Biochem Physiol B: 100, 117
- de la Torre-Loranca, M., G. Aguirre-León & M. A. López-Luna. 2006. Coralillos verdaderos (serpentes: Elapidae) y coralillos falsos (serpentes: Colubridae) de veracruz, méxico. . Acta Zoológica Mexicana.: 22, 11
- de Roodt, A. R. 2002. Estudio inmunobiológico del veneno de serpientes de importancia sanitaria de la argentina Buenos Aires. Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, 313 p.
- de Roodt, A. R., N. R. Lago & R. Stock. 2012. Myotoxicity and nephrotoxicity by *Micrurus* venoms in experimental envenomation. Toxicon: 59, 356
- de Roodt, A. R., J. Paniagua-Solis, J. Dolab, J. Estévez-Ramírez, B. Ramos-Cerrillo, S. Litwin & A. Alagón. 2004. Effectiveness of two common antivenoms for north, central and south american *Micrurus* envenomations. Journal of Toxicology Clinical Toxicology.: 42, 171

- Dokmetjian, J. C., S. Del Canto, S. Vinzon & M. B. de Jimenez Bonino. 2009. Biochemical characterization of the *Micrurus pyrrhocryptus* venom. *Toxicon*: 53, 375
- Estrada, G., B. I. Garcia, E. Schiavon, E. Ortiz, S. Cestele, E. Wanke, L. D. Possani & G. Corzo. 2007. Four disulfide-bridged scorpion beta neurotoxin cssii: Heterologous expression and proper folding in vitro. *Biochim Biophys Acta*: 1770, 1161
- Fernandez, J., A. Alape-Giron, Y. Angulo, L. Sanz, J. M. Gutierrez, J. J. Calvete & B. Lomonte. 2011. Venomic and antivenomic analyses of the central american coral snake, *Micrurus nigrocinctus* (elapidae). *J Proteome Res*: 10, 1816
- Fix, J. D. 1980. Venom yield of the north american coral snake and its clinical significance. *South Med J*: 73, 737
- Flowers, H. H. 1966. A comparison of the neutralization ability of a heterologous vs homologous coral snake (*Micrurus fulvius*) venom. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*: 15, 1003
- Frayre-Torres, M. J., E. Sevilla-Godínez, M. J. Orozco-Valerio, J. Armas & A. Celis. 2006. Mortalidad por contacto traumático con serpietnes y lagartos venenosos. México 1979-2003. *Gaceta Médica de México*: 142, 209
- García-Willis, C., R. Vela-Ortega & M. E. Maya. 2009. Epidemiology of accidental snake poisoning in the pediatric population. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*.: 66, 36
- Greene, H. W. 1973. The food habits and feeding behavior of the new world coral snakes. Master Biology, University of Texas at Arlington.
- Gutierrez, J. M., F. Chaves, E. Rojas & R. Bolanos. 1980. Efectos locales inducidos por el veneno de la serpiente coral *Micrurus nigrocinctus* en raton blanco. *Toxicon*: 18, 633
- Higashi, H. G., R. Guidolin, C. P. Caricati, I. Fernandes, J. R. Marcelino, J. F. Morais, I. K. Yamagushi, M. A. Stephano, W. Dias-da-Silva & H. A. Takehara. 1995. Antigenic cross-reactivity among components of brazilian elapidae snake venoms. *Braz J Med Biol Res*: 28, 767
- Higashi, H. G., R. Guidolin, C. P. Caricati, I. Fernandes, J. R. Marcelino, J. F. Morais, I. K. Yamagushi, M. A. Stephano, W. Dias-da-Silva & H. A. Takehara. 1995. Antigenic cross-reactivity among components of brazilian elapidae snake venoms. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 767
- Ho, P. L., M. B. Soares, T. Maack, I. Gimenez, G. Puerto, Furtado & I. Raw. 1997. Cloning of an unusual natriuretic peptide from the south american coral snake *Micrurus corallinus*. *European Journal of Biochemistry*, 144
- Juliá-Zertuche, J. 1981. Reptiles mexicanos de importancia para la salud pública y su distribución geográfica. *Salud Pública de México*: 23, 329
- Kinter, M. & N. E. Sherman. 2000. Protein sequencing using and identification using tandem mass spectrometry. John Wiley & Sons Inc., New York.
- Klauber, L. 1972. Rattlesnakes: Their habitat, life histories and their influence on mankind. University of california press,
- Kumar, T. K., G. Jayaraman, C. S. Lee, A. I. Arunkumar, T. Sivaraman, D. Samuel & C. Yu. 1997. Snake venom cardiotoxins-structure, dynamics, function and folding. *J Biomol Struct Dyn*: 15, 431
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*: 227, 680
- Leão, L. I., P. L. Ho & I. Junqueira-de-Azevedo. 2009. Transcriptomic basis for an antiserum against *Micrurus corallinus* (coral snake) venom. *BMC Genomics*: 10, 112

- Leite dos Santos, G. G., L. L. Casais e Silva, S. M. Pereira & V. C. Florea. 2012. Antinociceptive properties of *Micrurus lemniscatus* venom. *Toxicon*: 60, 1005
- Luna-Bauza, E. M., G. Martínez-Ponce & A. C. Salazar. 2004. Mordeduras por serpiente. Panorama epidemiológico de la zona de Córdoba, Veracruz. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*: 47, 149
- Manock, R. S., G. Suarez, D. Graham, M. L. Avila-Aguero & D. A. Warrell. 2008. Neurotoxic envenoming by south american coral snake (*Micrurus lemniscatus helleri*): A case report from eastern Ecuador and review. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*: 102, 1127
- Maraboto, J. 2001. Panorama epidemiológico de las intoxicaciones causadas por animales ponzoñosos. In 5ª reunión de expertos en envenenamiento por animales ponzoñosos, I. M. d. S. Socials (ed.). Puebla de los Ángeles, Puebla.
- McDowell, S. B. 1987. Systematics. In *Snakes: Ecology and evolutionary biology*, R. A. Siegel, J. T. Collins and S. S. Novaks (eds.). MacMillan Publ. Co., New York p. 3.
- Moreira, K. G., M. V. Prates, F. A. Andrade, L. P. Silva, P. S. Beirao, C. Kushmerick, L. A. Naves & C. Bloch, Jr. 2010. Frontoxins, three-finger toxins from *Micrurus frontalis* venom, decrease miniature endplate potential amplitude at frog neuromuscular junction. *Toxicon*: 56, 55
- Olamendi-Portugal, T., C. V. Batista, R. Restano-Cassulini, V. Pando, O. Villa-Hernandez, A. Zavaleta-Martinez-Vargas, M. C. Salas-Arruz, R. C. Rodriguez de la Vega, B. Becerril & L. D. Possani. 2008. Proteomic analysis of the venom from the fish eating coral snake *Micrurus surinamensis*: Novel toxins, their function and phylogeny. *Proteomics*: 8, 1919
- Oliveira, D. A., C. Harasawa, C. S. Seibert, L. L. Casais-e-Silva, D. C. Pimenta, I. Lebrun & M. Sandoval. 2008. Phospholipase a2 isolated from *Micrurus lemniscatus* coral snake venom: Behavioral, electroencephalographic and neuropathological aspects. *Brain Research Bulletin*, 629
- Perkins, J. R., B. Smith, R. T. Gallhager, D. S. Jones, S. C. Davis & A. D. Hoffman. 1993. Application of electrospray mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for molecular weight assignment of peptides in complex mixtures. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*: 4, 670
- Perkins, J. R. & K. B. Tomer. 1995. Characterization of the lower-molecular-mass fraction of venoms from *Dendroaspis jamesoni kaimosae* and *Micrurus fulvius* using capillary-electrophoresis electrospray mass spectrometry. *Eur J Biochem*: 233, 815
- Possani, L. D., A. C. Alagon, P. L. Fletcher, Jr., M. J. Varela & J. Z. Julia. 1979. Purification and characterization of a phospholipase a2 from the venom of the coral snake, *Micrurus fulvius microgalbineus* (brown and smith). *Biochem J*: 179, 603
- Prieto da Silva, A. R., I. K. Yamagushi, J. F. Morais, H. G. Higashi, I. Raw, P. L. Ho & J. S. Oliveira. 2001. Cross reactivity of different specific *Micrurus* antivenom sera with homologous and heterologous snake venoms. *Toxicon*: 39, 949
- Ramsey, H. W., W. J. Taylor, I. B. Boruchow & G. K. Snyder. 1972. Mechanism of shock produced by an elapid snake (*Micrurus f. Fulvius*) venom in dogs. *Am J Physiol*: 222, 782
- Rawat, S., G. laing, D. Smith, D. Teakston & J. Landon. 1994. A new antivenin to treat eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) envenoming. *Toxicon*: 32, 185
- Rey-Suárez, P., V. Núñez, J. M. Gutierrez & B. Lomonte. 2011. Proteomic and biological characterization of the venom of the redbellied coral snake, *Micrurus mipartitus* (Elapidae), from Colombia and Costa Rica. *Journal of Proteomics*: 75, 655
- Rey-Suárez, P., R. F. Stuardi, S. Rostelato-Ferreira, M. Saldarriaga-Córdoba, V. Núñez, L. Rodrigues-Simioni & B. Lomonte. 2012. Mipartoxin-i, a novel three-finger toxin, is the

- major neurotoxic component in the venom of the retail coral snake *Micrurus mipartitus* (elapidae). *Toxicon*: 60, 851
- Rosso, J. P., O. Vargas-Rosso, J. M. Gutierrez, H. Rochat & P. E. Bougis. 1996. Characterization of alpha-neurotoxin and phospholipase a2 activities from *Micrurus* venoms. Determination of the amino acid sequence and receptor-binding ability of the major alpha-neurotoxin from *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. *Eur J Biochem*: 238, 231
- Roze, J. A. 1996. Coral snakes of the americas: Biology, identification and venoms. Krieger,
- Salazar, A. M., J. Vivas, E. E. Sanchez, A. Rodriguez-Acosta, C. Ibarra, A. Gil, Z. Carvajal, M. E. Giron, A. Estrella, L. F. Navarrete & B. Guerrero. 2011. Hemostatic and toxinological diversities in venom of *Micrurus tener tener*, *Micrurus fulvius fulvius* and *Micrurus isozonus* coral snakes. *Toxicon*: 58, 35
- Sánchez, E. E., J. C. Lopez-Johnston, A. Rodríguez-Acosta & J. C. Pérez. 2008. Neutralization of two north american coral snake venoms with united states and mexican antivenoms. *Toxicon*: 51, 297
- Silveira de Oliveira, J., A. Rossan de Brandao Prieto da Silva, M. B. Soares, M. A. Stephano, W. de Oliveira Dias, I. Raw & P. L. Ho. 2000. Cloning and characterization of an alpha-neurotoxin-type protein specific for the coral snake *Micrurus corallinus*. *Biochem Biophys Res Commun*: 267, 887
- Siria-Hernández, C. G. & A. Arellano-Bravo. 2009. Mordeduras por serpientes venenosa: Panorama epidemiológico en México. *Salud Pública de México*: 51, 95
- Six, D. A. & E. A. Dennis. 2000. The expanding superfamily of phospholipase a(2) enzymes: Classification and characterization. *Biochim Biophys Acta*: 1488, 1
- Slowinski, J., B. 1991. The phylogenetic relationships of the new world coral snakes (elapidae: *Leptomicrurus*, *Micrurus*, *micruroides*) based on biochemical and morphological data. Doctor of Philosophy (Ph.D), Biology, University of Miami.
- Sotelo-Cruz, N. 2003. Envenenamiento por mordedura de serpiente de cascabel, daños a la salud y su tratamiento en edad pediátrica. *Gaceta Médica de México*: 139, 317
- Strimple, P. D., A. J. Tomassoni, E. J. Otten & D. Bahner. 1997. Report on envenomation by a gila monster (*Heloderma suspectum*) with a discussion of venom apparatus, clinical findings, and treatment. *Wilderness Environ Med*: 8, 111
- Tan, N. H. & G. Ponnudurai. 1992. The biological properties of venoms of some american coral snakes (genus *Micrurus*). *Comp Biochem Physiol B*: 101, 471
- Tay-Zavala, J., S. Díaz, V. J. Sánchez, S. D. Ruíz & L. Castillo. 2002. Serpientes y reptiles de importancia médica en México. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*: 45, 212
- Uetz, P. 2010. The original descriptions of reptiles. *Zootaxa*: 2334, 59
- Vital Brazil, O. 1987. Coral snake venoms: Mode of action and pathophysiology of experimental envenomation (1). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*: 29, 119
- Vital Brazil, O. & M. D. Fontana. 1983-84. Ações pré-juncionais e pós-juncionais da peçonha da cobra coral *Micrurus corallinus* na junção neuromuscular. *Memorias do Instituto Butantan*: 47/48, 13
- Vital Brazil, O., M. D. Fontana & F. Pellegrini. 1976/77. Physiopathologie et therapeutique de l'envenomation experimentale causé par le venin de *Micrurus frontalis*. *Memorias do Instituto Butantan*: 40/41, 221
- Weiss, R. & R. J. McIsaac. 1971. Cardiovascular and muscular effects of venom from coral snake *Micrurus fulvius*. *Toxicon*: 9, 219
- Wisniewski, M. S., R. E. Hill, J. M. Havey, G. M. Bogdan & R. C. Dart. 2003. Australian tiger snake (*notechis scutatus*) and mexican coral snake (*micrurus* species) antivenoms prevent

death from united states coral snake (*Micrurus fulvius fulvius*) venom in a mouse model. J
Toxicol Clin Toxicol: 41, 7

World-Health-Organization. 2010. Who guidelines for the production, control and regulation of
snake antivenom immunoglobulins. WHO, Geneva.

Anexo 1. Esquema de inmunización de caballo contra veneno completo de *Micrurus laticollaris*

Día	veneno (µg)	20% extra	Total (µg)	Vol (µl)	PBS	Adyuvante	Ady (µl)	Total (µl)	Sangría
0	10	2	12	2.4	1797.6	CFA	1800	3600	Preimmune
15	20	4	24	4.9	1795.1	IFA	1800	3600	
30	40	8	48	9.7	1790.3	ALUM	1800	3600	
45	40	8	48	9.7	1790.3	IFA	1800	3600	1a
60	80	16	96	19.5	1780.5	ALUM	1800	3600	
75	150	30	180	36.5	1763.5	IFA	1800	3600	
90	300	60	360	73.0	1727.0	ALUM	1800	3600	2a
105	300	60	360	73.0	1727.0	IFA	1800	3600	
120	500	100	600	7	1678.3	IFA	1800	3600	
150	750	150	900	6	1617.4	IFA	1800	3600	3a
165	1000	200	1200	4	1556.6	IFA	1800	3600	
180	1000	200	1200	4	1556.6	IFA	1800	3600	
196	0	0	0	0	0	-	0	3600	4a
225	2000	400	2400	9	3113.1	-	-	3600	5a
240	0	0	0	0	0	-	0	0	6a

CFA: Adyuvante completo de Freund
 IFA: Adyuvante incompleto de Freund
 ALUM: Hidróxido de aluminio

Anexo 2. Esquema de inmunización de conejos contra la toxina purificada MlatA1.

Semana	Cantidad de toxina (μg)	20% extra	Adyuvante	Sangría
1	1	1.2	CFA	Pre inmune
2	2	2.4	IFA	
3	2	2.4	IFA	
4	5	6	IFA	1a
5	10	12	IFA	
6	20	24	IFA	
7	40	48	IFA	2a
8	80	96	IFA	
9	150	180	IFA	
10	250	300	IFA	3a
11	-	-	-	
12	-	-	-	Blanco

CFA: Adyuvante completo de Freund

IFA: Adyuvante incompleto de Freund

Anexo 3. Relación de especies y ejemplares utilizados en este trabajo

Especie	País	Estado	Localidad	Catálogo*
<i>Micrurus browni</i>	México	Chiapas	Tuxtla Gutiérrez	HK134
<i>M. diastema</i>	México	Veracruz	Córdoba	HK135
<i>M. distans</i>	México	Jalisco	Chamela	HK136
	México	Jalisco	Chamela	HK137
<i>M. elegans</i>	México	Veracruz	Zongolica	HK138
<i>M. ephippifer</i>	México	Oaxaca	Mixtequilla	HK139
<i>M. fulvius</i>	EUA	Florida		
<i>M. l. laticollaris</i>	México	Guerrero	Iguala	HK140
	México	Guerrero	Iguala	HK141
	México	Morelos	Huahutla	HK013
	México	Morelos	Yautepec	HK023
	México	Morelos	Tepoztlán	HK142
	México	Morelos		HK172
<i>M. l. maculirostris</i>	México	Michoacán	Villa Victoria	HK148
<i>M. latifasciatus nuchalis</i>	México	Oaxaca	Zanatepec	HK143
<i>M. limbatus</i>	México	Veracruz	Los Tuxtlas	HK144
	México	Veracruz	Los Tuxtlas	HK145
	México	Veracruz	Los Tuxtlas	HK146
	México	Veracruz	Los Tuxtlas	HK147
<i>M. nigrocinctus</i>	Costa Rica			
<i>M. surinamensis</i>	Colombia	Amazonas		
<i>M. tener</i>	México	Tamaulipas	Ciudad Victoria	HK014

* Ejemplares catalogados dentro de la colección "Herpetario Kiinam" (clave SEMARNAT: DF.-REP-208-10-08)