



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría en Ciencias Bioquímicas

Crotoxina en el veneno de la serpiente de cascabel *Crotalus simus* en México: su
relación con la toxicidad y distribución geográfica

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
BIÓL. ISABEL ARELY HERNÁNDEZ DÁVILA

TUTOR PRINCIPAL:
Dr. Alejandro Alagón Cano
[Instituto de Biotecnología](#)

Miembros del comité:
Dr. Roberto Pablo Stock Silberman
[Instituto de Biotecnología](#)
Dr. Óscar Flores Villela
[Facultad de Ciencias Biológicas](#)

MÉXICO, D. F. enero, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Alejandro Alagón Cano. Se agradece el apoyo financiero para la realización del presente trabajo a CONACyT a través del proyecto INFR-2014 #224494, así como por la beca #333810 otorgada para estudios de posgrado y al Tecnológico de Monterrey a través del Premio Luis Elizondo 2014 por haber proporcionado el apoyo económico para la escritura de tesis.

DEDICATORIA

A mis papás: Luis Manuel Hernández Romero y María Elena Dávila Palafox, quienes me han ayudado a cruzar muchos mares para llegar a las distintas tierras que están conformando mi vida. Sus enseñanzas, consejos, apoyo y amor son los cimientos de lo que soy. Gracias.

A mis hermanos: Diana, Luis y Elliot, gracias por los regaños, risas, favores, pláticas, comprensión, ejemplo y sobre todo por el amor y la unión que a pesar de la distancia sigue creciendo.

A mis sobrinos: Kym, Luisito y la recién nacida Lilith, siempre serán mis principales razones para sonreír, su existencia me motiva a ser mejor persona a cada momento para ser un buen ejemplo.

A Ulises, que ha hecho de esta maestría una gran aventura, gracias por tu paciencia, entrega y consejos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Alejandro Alagón Cano por aceptarme en su grupo de trabajo, por las enseñanzas, consejos y apoyo que me brindó durante este proyecto.

Al Bioterio del Instituto de Biotecnología-UNAM por el apoyo con los animales experimentales.

A los Doctores que formaron parte de mi comité tutorial: Dr. Roberto Pablo Stock Silberman y Dr. Óscar Flores Villela. Agradezco sus opiniones, correcciones y el tiempo dedicado para guiar este proyecto.

A los miembros de mi comité sinodal: Dra. Yvonne Rosenstein Azouley, Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte, Dr. Baltazar Becerril Luján, Dr. José Estuardo López Vera y Dr. Jean Louis Charli Casalonga, quienes realizaron importantes comentarios para mejorar este trabajo.

Agradezco el apoyo administrativo por parte de Angélica Linares en el laboratorio, así como a Antonio Bolaños Guillén y Gloria Villa Herrera de la unidad de Docencia.

A los técnicos del laboratorio: M. en C. Alejandro Olvera Rodríguez, Biól. Felipe Olvera Rodríguez, Biól. Héctor Cardoso Torres y M. en C. Herlinda Clement Carretero, me llevo mucho aprendizaje de ustedes, gracias por sus consejos y apoyo.

A todos los integrantes del laboratorio Alagón/ Corzo: Melisa, Mariel, Hilda, María Fernanda, Arlene, Belém, Yelisseth, Irene, Dayanira, Nancy, Crysel, Ulises, Edgar, Sergio, Miguel, Nicolás, Daniel, Ricardo, Carlos, Raúl, Felipe, Luis, Irving, Raymundo, Mario, Francia, Vianey, Selma, Estefania, María José, Guillermo, Dr. Gerardo Corzo, les agradezco su participación en mis seminarios, su apoyo en el laboratorio y la grata convivencia que pasé.

En particular quiero resaltar mi agradecimiento a mi compañera de mesa Arlene, que de su experiencia aprendí mucho y disfruté todas nuestras pláticas. A Edgar Neri, que además de asesorarme con el proyecto, discutirlo y revisar este escrito, me invitó al campo en un par de ocasiones (ojalá se repita). A Alejandro Olvera, quien además de lo antes mencionado, a través de muy buenas charlas recibí consejos, confianza y ánimo. A Hilda, muchas gracias por tu ayuda con la revisión de la primera versión de la tesis y por tus recomendaciones. A Héctor, que con recibirme siempre con una gran sonrisa me ponía feliz, gracias por los consejos en cuestiones laborales y personales, eres una persona maravillosa.

Índice

I.	Introducción.....	1
I.1	<i>Serpientes de cascabel en México</i>	1
I.2	<i>Biología de Crotalus simus</i>	2
I.3	<i>Características del veneno</i>	4
I.4	<i>Neurotoxinas presentes en el veneno de vipéridos</i>	4
I.5	<i>Variación de veneno</i>	8
II.	Antecedentes	9
III.	Justificación	14
IV.	Hipótesis.....	15
V.	Objetivo general.....	15
VI.	Objetivos particulares	15
VII.	Metodología.....	16
VII.1	<i>Veneno</i>	16
VII.1.2	<i>Cuantificación del veneno por absorbancia a 280 nm (A_{280nm})</i>	17
VII.1.3	<i>Cuantificación del veneno por el método del ácido bicinconínico (BCA)</i>	17
VII.1.4	<i>Purificación de la proteína crotoxina a partir del veneno de la serpiente sudamericana Crotalus durissus terrificus</i>	17
VII.2	<i>Obtención de la potencia letal (DL_{50})</i>	18
VII.3	<i>Medición de la dosis efectiva media (DE_{50})</i>	18
VII.4	<i>Obtención de anticuerpos policlonales</i>	19
VII.4.2	<i>Purificación de anticuerpos policlonales mediante cromatografía de afinidad</i>	20
VII.4.3	<i>Análisis mediante Western Blot</i>	21
VII.5	<i>Obtención de anticuerpos monoclonales anti-crotoxina</i>	21
VII.5.2	<i>Descongelación de células de mieloma</i>	22
VII.5.4	<i>Clonación por dilución limitante</i>	24
VII.5.5	<i>Expansión celular</i>	24
VII.5.6	<i>Congelación</i>	24
VII.5.7	<i>Producción de líquido de ascitis</i>	25
VII.5.8	<i>Purificación de anticuerpos monoclonales mediante cromatografía de afinidad</i>	25
VII.6	<i>Análisis cualitativo y cuantitativo de crotoxina</i>	25
VII.6.2	<i>Análisis mediante slot blot</i>	26

VII.6.4	<i>Biotinación de anticuerpos monoclonales</i>	28
VII.6.5	<i>Cuantificación de crotoxina mediante ELISA tipo sándwich</i>	28
VIII.	Resultados	29
VIII.1	<i>Purificación de crotoxina</i>	29
VIII.2	<i>Obtención de anticuerpos policlonales anti-crotoxina en conejo</i>	31
VIII.2.1	<i>Purificación de anticuerpos policlonales anti-crotoxina de conejo</i>	31
VIII.3	<i>Obtención de anticuerpos monoclonales anti-crotoxina de ratón</i>	34
VIII.3.1	<i>Tipificación de anticuerpos monoclonales</i>	35
VIII.3.2	<i>Purificación anticuerpos monoclonales</i>	35
VIII.3.3	<i>Diálisis y concentración de anticuerpos</i>	36
VIII.3.4	<i>Ensayo de competencia de anticuerpos monoclonales 2F9 y 4F6</i>	38
VIII.4	<i>Potencia letal de la crotoxina y ensayo de neutralización de los anticuerpos obtenidos</i>	40
VIII.5	<i>Detección de crotoxina en el veneno individual de las subespecies de C. simus</i>	40
VIII.6	<i>Cuantificación de crotoxina en el veneno individual de las tres subespecies de Crotalus simus</i>	42
IX.	Discusión	45
IX.1	<i>Purificación</i>	45
IX.2	<i>Reconocimiento de anticuerpos policlonales</i>	45
IX.3	<i>Obtención de anticuerpos monoclonales</i>	46
IX.4	<i>Reconocimiento de anticuerpos monoclonales</i>	47
IX.5	<i>Análisis cualitativo por slot blot</i>	48
IX.6	<i>Análisis cuantitativo</i>	48
X.	Conclusiones	54
XI.	Perspectivas	55
XII.	Referencias bibliográficas	56
XIII.	Anexos	63

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Aparato venenoso de la familia Viperidae.
- Figura 2.** Distribución de *Crotalus simus* en México.
- Figura 3.** Representación esquemática de la estructura del complejo bimolecular de la crotoxina.
- Figura 4.** Proteoma de mezcla de venenos de ejemplares adultos y ejemplares juveniles de *C. simus simus* distribuidos en Costa Rica.
- Figura 5.** Proteoma de mezcla de venenos de dos subespecies de *C. simus* distribuidas en México.
- Figura 6.** Mapa de distribución de los ejemplares evaluados en este proyecto.
- Figura 7.** Cromatograma de la exclusión molecular en Sephadex G-75 del veneno de *Crotalus durissus terrificus*.
- Figura 8.** Gel SDS-PAGE 15% de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular del veneno de *Crotalus durissus terrificus*.
- Figura 9.** Curva sigmoidal dosis-respuesta de los sueros de los conejos inmunizados con crotoxina.
- Figura 10.** Inmunopurificación del suero policlonal de conejo anti-crotoxina.
- Figura 11.** Inmunopurificación negativa de los anticuerpos de conejo anti-crotoxina.
- Figura 12.** Curva de reconocimiento del anticuerpo policlonal de conejo anti-crotoxina hacia el veneno de *C. d. terrificus*, *C. s. scutulatus* tipo A y tipo B.
- Figura 13.** Curva sigmoidal dosis-respuesta de los ratones inmunizados con crotoxina.
- Figura 14.** Tipificación de anticuerpos monoclonales.
- Figura 15.** Purificación de los anticuerpos monoclonales anti-crotoxina a partir de líquido ascítico de ratón, columna Sepharosa-A.
- Figura 16.** SDS-PAGE de los anticuerpos monoclonales purificados en Sepharosa-A.
- Figura 17.** Curva de reconocimiento de los anticuerpos monoclonales hacia el veneno de *C. d. terrificus*, *C. s. scutulatus* tipo A y tipo B.
- Figura 18.** Diseño del ensayo de ELISA para evaluar la competencia entre el AcM 4F6 y AcM 2F9.

Figura 19. ELISA competitivo de los anticuerpos monoclonales anti-crotoxina 4F6B y 2F9.

Figura 20. Slot blots del veneno nativo de diferentes individuos de las subespecies *C. s. simus*, *C. s. tzabcan* y *C. s. culminatus*.

Figura 21. Slot blot de las fracciones obtenidas mediante exclusión molecular correspondientes a la subunidad B de la crotoxina y a la mezcla de la subunidad A de la crotoxina/crotamina.

Figura 22. Curva estándar de cuantificación de crotoxina mediante ELISA tipo sándwich.

Figura 23. Gráfica de barras del intervalo del porcentaje de crotoxina de tres grupos (promedio de tres mediciones) y la dosis letal media (DL_{50}) del veneno de *C. s. simus*, *C. s. tzabcan* y *C. s. culminatus*.

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Letalidad (DL_{50}) y abundancia relativa de crotoxina en el veneno de diversas especies de crotálidos.
- Tabla 2.** Esquema de inmunización con crotoxina de tres conejos para la obtención de anticuerpos policlonales.
- Tabla 3.** Esquema de inmunización para la obtención de anticuerpos monoclonales anti-crotoxina.
- Tabla 4.** Esquema de inmunización para la obtención de anticuerpos monoclonales anti-crotoxina.
- Tabla 5.** Absorbancia ($A_{280\text{ nm}}$) y $U.A_{280\text{ nm}}$ de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-75.
- Tabla 6.** Signología observada en ratones al inyectarles 20 μg (vía intravenosa) de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular del veneno de *C. durissus terrificus*.
- Tabla 7.** Rendimiento y concentración de los anticuerpos monoclonales después de dializarlos y concentrarlos.
- Tabla 8.** Porcentaje de crotoxina (rango y promedio) en el veneno de los ejemplares de las tres subespecies de *Crotalus simus* de acuerdo a su distribución geográfica.

Lista de abreviaturas

BCA	Ácido bicinconónico
A _{280 nm}	Absorbancia a 280 nanómetros
CA	Subunidad ácida de Crotoxina
CB	Subunidad básica de Crotoxina
DL ₅₀	Dosis letal media
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent assay (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
g	Gramo
Ig	Inmunoglobulina
kDa	Kilo Dalton
L	Litro
M	Molar
µg	Microgramo
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MPM	Marcador de peso molecular
PLA ₂	Fosfolipasas tipo A ₂
s	Segundo
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

RESUMEN

La víbora de cascabel *Crotalus simus* es una especie de serpiente venenosa que pertenece a la familia Viperidae. Su distribución ocurre de México a Costa Rica. Recientemente, Campbell y Lamar clasificaron a *C. simus* en tres subespecies: *C. s. simus* que se distribuye de Veracruz en México a Honduras, y en el Pacífico del Istmo de Tehuantepec a Costa Rica; *C. s. culminatus* que se encuentra de Michoacán al Istmo de Tehuantepec; *C. s. tzabcan* la cual tiene poblaciones en la Península de Yucatán, Belice y Guatemala.

El veneno de las tres subespecies de *C. simus* ha sido caracterizado y se encontró variación intraespecífica con respecto a sus actividades biológicas y bioquímicas. Hay una marcada diferencia en la letalidad del veneno de cada una de las tres subespecies: los venenos de *C. s. simus* tienen los mayores valores de toxicidad (DL_{50} 2.4-12.3 $\mu\text{g}/\text{ratón}$), los de *C. s. culminatus* tienen los menores valores (DL_{50} 65.0-303.3 $\mu\text{g}/\text{ratón}$), mientras que los venenos de *C. s. tzabcan* ocupan una posición intermedia (DL_{50} 2.4-155.9 $\mu\text{g}/\text{ratón}$). Adicionalmente, mediante análisis proteómico se determinó que en el veneno de *C. s. simus* se encontró una proteína neurotóxica conocida como crotoxina y la cantidad de ésta corresponde al 14.3% de la composición total del veneno, mientras que el veneno de *C. s. culminatus* carece de dicha proteína.

En el presente trabajo, se detectó y cuantificó crotoxina mediante el uso de inmunoensayos (Slot blot y ELISA). Se analizó el veneno de ejemplares de *Crotalus simus* distribuidos en México tanto a nivel individual como de subespecie. Se encontró que todos los individuos analizados de *C. s. simus* tuvieron alto contenido de crotoxina en su veneno (7.6-44.3%). Por el contrario, el veneno de *C. s. culminatus* careció de dicha neurotoxina, mientras que el veneno de seis de diez individuos analizados de la subespecie *C. s. tzabcan* tuvieron crotoxina en baja concentración (3.0-7.7%); además, se encontró una relación inversa entre la DL_{50} de los venenos con respecto a la cantidad de crotoxina, lo cual implica que la cantidad relativa de crotoxina tiene impacto en la letalidad del veneno de la serpiente de cascabel *C. simus*.

I. Introducción

I.1 Serpientes de cascabel en México

El género *Crotalus* ha sido clasificado dentro de la familia Viperidae, en la subfamilia Crotalinae. Dicha familia está constituida por serpientes venenosas caracterizadas por la presencia de dientes inoculadores de veneno (“colmillos”), es decir, con dentición solenoglifa. Los “colmillos” se encuentran asociados al hueso maxilar y conectados a glándulas de veneno por medio de un conducto (Figura 1). La clasificación de estas serpientes dentro de la subfamilia Crotalinae se debe a la presencia de un par de fosetas termorreceptoras, también llamadas fosetas loreales, las cuales permiten detectar diferencias de temperatura y de esta manera ubicar a sus presas y depredadores. El nombre del género se deriva del griego *Krotalon* que significa cascabel, en referencia al apéndice al final de la cola de estas serpientes (excepto *C. catalinensis*), el cual es utilizado como un mecanismo de advertencia frente a sus posibles depredadores (Calvete *et al.*, 2010; Campbell y Lamar, 2004).

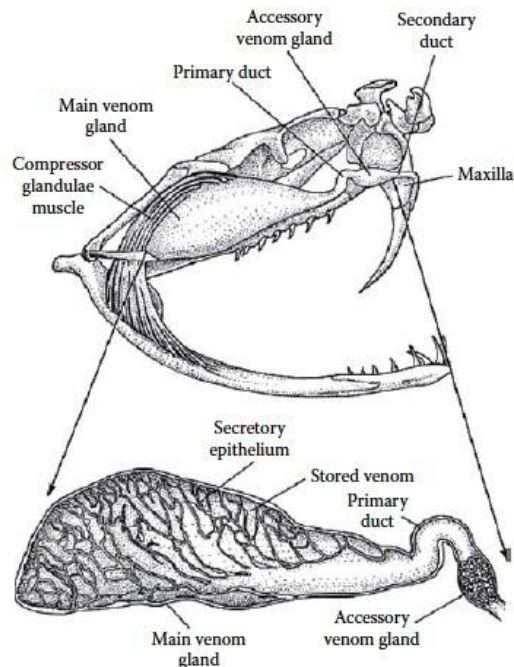


Figura 1. Aparato venenoso de la familia Viperidae (Mackessy, 2010).

Las serpientes de cascabel tienen importancia biológica, ecológica, cultural y de salud pública en México (Paredes-García *et al.*, 2011). La importancia biológica se debe a la riqueza de especies distribuidas en el país, ya que actualmente se reconocen 34 especies, de las cuales 22 son endémicas. Su importancia ecológica radica en que controlan poblaciones de especies consideradas plaga, como algunas especies de roedores (Campbell y Lamar, 2004). Las serpientes de cascabel tuvieron una presencia preponderante en las culturas prehispánicas, hallándose en códices, pinturas, esculturas, etc. En la actualidad algunas comunidades siguen utilizando a estos animales como productos alimenticios y medicinales (Castellón-Huerta, 2001; Gómez *et al.*, 2007; Reyna-Rojas, 2013). En cuestión de salud pública, el ofidismo es un problema al que debe prestársele especial atención a causa de los efectos que ocasionan las mordeduras (de Roodt *et al.*, 2004). Según el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de México, en el año 2009 se registraron 2,792 accidentes por mordedura de serpiente (SINAVE, 2010). Los estados con mayor incidencia de mordeduras fueron Oaxaca y Veracruz, siendo las especies *Bothrops asper*, *Crotalus simus*, *C. atrox* y *C. molossus*, las principales causantes de los accidentes ofídicos (Siria-Hernández y Arellano-Bravo, 2009).

1.2 Biología de *Crotalus simus*

El nombre de la serpiente de cascabel *Crotalus simus* deriva del latín *simus* que significa nariz plana, en referencia a la cabeza roma en comparación con las serpientes “cabeza de lanza”. Según la localidad la serpiente recibe varios nombres populares, por ejemplo: ah tsab ti'kkan y sakk ahaw kan en maya, shunu en zapoteco, teotlacozauhqui, tepocolcóatl y teuhltlacozauhqui en náhuatl (Campbell y Lamar, 2004).

Crotalus simus es una serpiente robusta que comúnmente excede los 130 cm de longitud, incluso, los machos pueden alcanzar 160 cm, ya que tienden a ser más grandes que las hembras. Los machos adultos generalmente poseen una cresta espinal conspicua y sus escamas dorsales son notables por tener prominentes quillas. Se caracterizan por tener de

21 a 32 manchas romboides en el dorso del cuerpo. Esta serpiente tiene una larga asociación en la literatura con *Crotalus durissus* en el sur y *Crotalus totonacus* en el noreste de México, especies con las cuales ha llegado a ser confundida (Campbell y Lamar, 2004).

Se conoce poco respecto a la alimentación de las poblaciones de *C. simus* distribuidas en México. En Guatemala se ha encontrado que los ejemplares adultos de *Crotalus simus* se alimentan de roedores, iguanas negras (*Ctenosaura similis*) y aves que anidan a nivel del suelo, mientras que los juveniles se alimentan de lagartijas como *Cnemidophorus* y pequeños roedores (Campbell, 1998).

Crotalus simus ha sido clasificada según Campbell y Lamar (2004) en tres subespecies: *Crotalus simus simus*, *Crotalus simus culminatus* y *Crotalus simus tzabcan*. *C. s. simus* se distribuye de la vertiente Atlántica del centro de Veracruz en México al oeste de Honduras, y en el Pacífico del Istmo de Tehuantepec al centro de Costa Rica; *C. s. culminatus* habita del sur de Michoacán al Istmo de Tehuantepec; *C. s. tzabcan* tiene poblaciones en la Península de Yucatán, norte de Belice y en Guatemala (Figura 2). Las subespecies se distinguen entre sí por color, talla, patrón de coloración y en menor medida por el tipo de escamas (Campbell y Lamar, 2004).

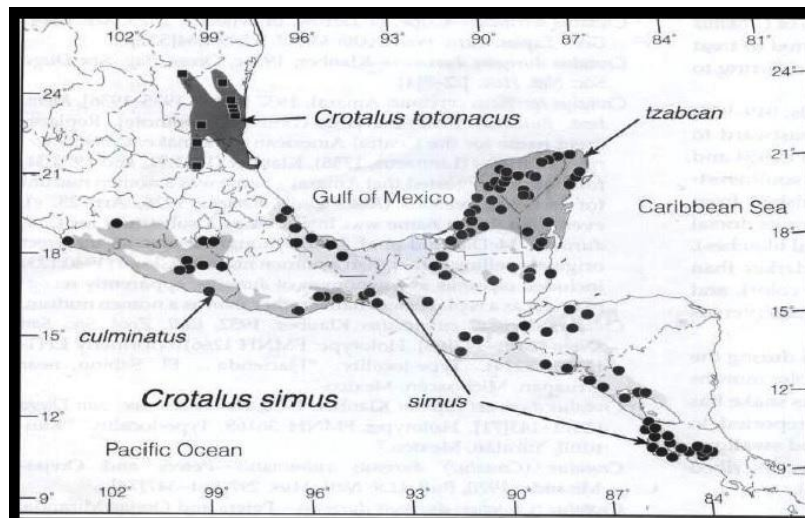


Figura 2. Distribución de *Crotalus simus* en México (Campbell y Lamar, 2014).

1.3 Características del veneno

El veneno de las serpientes es una mezcla de moléculas, entre las que destacan proteínas y polipéptidos producidos y almacenados en glándulas altamente especializadas (Mackessy, 2010). Dichos componentes tienen la función de asistir en la digestión de la presa, así como de inmovilizarla, en el caso de los elápidos, mientras que en los vipéridos los venenos pueden matar rápidamente a sus presas (Chippaux *et al.*, 1991). El aparato venenoso consta de un par de glándulas especializadas (glándulas de veneno o de Duvernoy), localizadas en la parte superior del labio, por debajo de los ojos y por detrás de las fosas nasales (Mackessy, 2010).

Se han reportado tres familias principales de proteínas presentes en el veneno: serinoproteasas, metaloproteasas y fosfolipasas (Doley y Kini, 2009). Las primeras tienen actividad coagulante y las metaloproteasas presentan actividad principalmente hemorrágica. Dentro de las fosfolipasas, se encuentran proteínas con actividades diversas: neurotóxicas, miotóxicas, analgésicas, anti-inflamatorias y citotóxicas, entre otras, las cuales han sido determinadas en varias líneas celulares (Gutiérrez, 2002; Costa *et al.*, 1998).

1.4 Neurotoxinas presentes en el veneno de vipéridos

Las proteínas del veneno de las serpientes han sido objeto de una rápida evolución dando como resultado la generación de múltiples actividades, como las observadas en las fosfolipasas A₂, las proteasas de serina y las desintegrinas (Mackessy, 2010).

Las fosfolipasas A₂ (PLA₂s), son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace 2-acil éster de glicerofosfolípidos, dando como productos lisofosfolípidos y ácidos grasos. Dichas enzimas son ubicuas, existen fosfolipasas de secreción, citosólicas e independientes de calcio. Las primeras han sido clasificadas en tres grupos con base en sus secuencias polipeptídicas. Al grupo I pertenecen fosfolipasas de páncreas de mamífero, veneno de elápidos y de serpientes marinas; en el grupo II se encuentran fosfolipasas del veneno de vipéridos y

fosfolipasas no pancreáticas de mamíferos; las PLA₂s del veneno de abeja y de *Heloderma* están clasificadas en el grupo III (Choumet *et al.*, 1991).

Ciertas PLA₂s del veneno de serpientes, definidas como β -neurotoxinas, evolucionaron hasta convertirse en bloqueadoras de la transmisión neuromuscular. Las β -neurotoxinas han sido clasificadas en diferentes subclases de acuerdo al complejo molecular que forman: a) covalente (bungarotoxina); b) homodimérico (trimucrotoxina); c) heterodimérico no covalente (crotoxina); d) heterotrimérico (taipoxina), e) oligomérico (taicatoxina) (Mackessy, 2010).

La mayoría de los venenos de especies pertenecientes a la familia Viperidae carecen de neurotoxicidad y basan su acción en la destrucción tisular, alteraciones cardiovasculares y de coagulación. Sin embargo, el principal componente del veneno de la serpiente de cascabel sudamericana *C. durissus terrificus* es la crotoxina, una proteína que posee una acción fundamentalmente neurotóxica (Gutiérrez, 2002; Calvete *et al.*, 2010). La giroxina, convulxina y crotamina son proteínas que también se encuentran en el veneno de dicha especie, la primera es una serinoproteasa de 30 kDa que al ser inyectada en ratones produce episodios caracterizados por rotaciones a lo largo del eje del animal a través de un mecanismo que aún no se conoce; la convulxina se describió inicialmente por su acción convulsivante y posteriormente se caracterizó como un potente agente agregante de plaquetas; la crotamina es un péptido de 4.2 kDa que activa los canales de sodio dependientes de voltaje de las fibras musculares, induciendo una despolarización que culmina en contractura muscular (Rangel-Santos *et al.*, 2004).

La crotoxina, es una β -neurotoxina que actúa impidiendo la liberación del neurotransmisor acetilcolina en la unión neuromuscular, por tal motivo, tiene efectos neurotóxicos y letales (Rangel-Santos *et al.*, 2004). Esta proteína es un complejo bimolecular unido mediante enlaces no covalentes, formado por una fosfolipasa A₂ básica (CB) (P.M. 14,350 Da, pI 8.2 y 122 aminoácidos) con actividad neurotóxica y enzimática, y una proteína ácida no tóxica denominada crotapotina (CA), conformada por tres cadenas polipeptídicas estabilizadas con siete puentes disulfuro (P.M. 9,490 Da, pI 3.4), la cual

funciona como una molécula chaperona dirigiendo a la fosfolipasa A₂ a su sitio blanco (Gutiérrez, 2002; Faure *et al.*, 1994) (Figura 3). A su vez, cada complejo está formado por diversas isoformas que intervienen directamente en la toxicidad del veneno. Faure *et al.*, 1991, identificaron cuatro isoformas para cada una de las subunidades de la crotoxina. Se ha reportado que las isoformas de la subunidad ácida (CA) son el resultado de modificaciones post-traduccionales de un precursor, mientras que las isoformas de la subunidad básica (CB) derivan de la expresión de diferentes RNA mensajeros presentes en el veneno individual (Faure *et al.*, 1994).

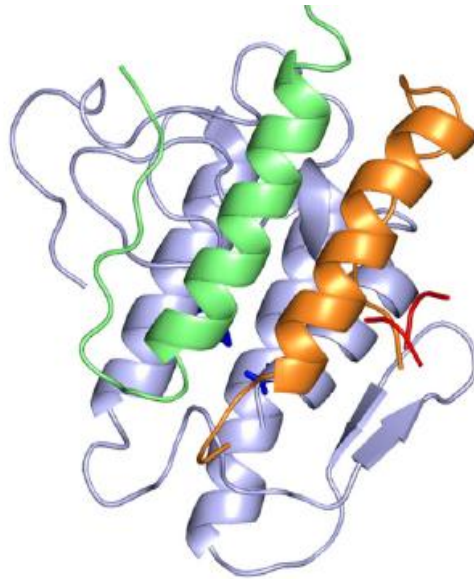


Figura 3. Representación esquemática de la estructura del complejo bimolecular de la crotoxina: subunidad básica (azul) y cadenas α , β y γ de la subunidad ácida (naranja, verde y rojo, respectivamente) (Faure *et al.*, 2011).

La toxicidad del complejo bimolecular es mayor en comparación con la exhibida por la subunidad CB por sí sola, lo que indica que el complejo depende de la interacción entre CB y CA (Rangel- Santos *et al.*, 2004). Canziani y colaboradores en 1983, encontraron que CA aumenta hasta en diez órdenes de magnitud la potencia letal de CB y que, a su vez, inhibe su actividad fosfolipasa. La actividad de fosfolipasa A₂ se asocia únicamente a CB, aunque

estudios de secuencia en la subunidad ácida, sugiere que ésta deriva de una fosfolipasa ancestral (Kaiser y Middlebrook, 1988).

La actividad neurotóxica ha sido reportada en el veneno de otras especies del género *Crotalus*. Éstas incluyen los venenos de *C. simus*, *C. scutulatus* (toxina Mojave), *C. viridis concolor* (toxina concolor), *C. tigris* (Mojave-like), *C. vegrandis* (toxina vegrandis) y *C. horridus* (toxina “cañaveral”) (Calvete *et al.*, 2012; Kaiser y Aird, 1987; Straight y Glenn, 1989). Estudios estructurales y moleculares han reportado que dichas neurotoxinas son similares a la crotoxina, con identidades de secuencia de 98 a 100%. Adicionalmente, la proporción de neurotoxina en la masa total del veneno de estas especies varía de manera interespecífica e incluso intraespecíficamente, lo cual se ve reflejado en la toxicidad del veneno (Tabla 1), de tal manera que se ha visto, que los venenos neurotóxicos tienen valores de dosis letal media (DL₅₀) de 10 a 80 veces más bajos en comparación a los venenos que no tienen componentes neurotóxicos (Glenn *et al.*, 1983).

Tabla 1. Potencia letal, expresada como dosis letal media (DL₅₀) y abundancia relativa de crotoxina (% del área bajo la curva del total de las proteínas separadas por HPLC) en el veneno de diversas especies de crotálicos.

Especie	DL ₅₀ µg /g	% de crotoxina en el veneno
<i>Crotalus tigris</i>	0.07*	66.2
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	0.06-0.09*	59.5
<i>Crotalus horridus</i>	0.22-1.0*	32
<i>Crotalus scutulatus scutulatus</i> “A”	0.22-0.46*	24.0
<i>Crotalus oreganus concolor</i>	0.46*	21
<i>Crotalus simus simus</i> (México)	0.21**	14.3
<i>Crotalus simus simus</i> (Costa Rica)	0.095*	52.7
	0.77*	4.1

*DL₅₀ obtenida inyectando ratones vía intraperitoneal (Calvete *et al.*, 2012).

** DL₅₀ obtenida inyectando ratones vía intravenosa (Neri-Castro *et al.*, 2013).

1.5 Variación de veneno

En la antigüedad, la variación del veneno de serpiente fue observada en casos clínicos, y fue atribuida a factores naturales exógenos. Aristóteles, en “*Historia Animalium*”, escribió que el calor era el factor que incrementaba la toxicidad del veneno (Chippaux *et al.*, 1991). En la literatura se ha reportado ampliamente la variación intraespecífica e interespecífica de venenos. Dichos cambios se han relacionado con la dieta, ontogenia, distribución geográfica, sexo, cautiverio, estación del año, etc. Sin embargo, hoy en día aún no se conocen los factores que regulan los genes que codifican a las proteínas del veneno (Mackessy, 2010). Cada población de serpientes tiene sus requerimientos particulares de acción del veneno (inmovilización, muerte y/o digestión de la presa), por tanto, la mezcla de veneno estará dada, en parte, por el tipo de presa (Chippaux, 1991).

La variación de la composición del veneno, en función de la distribución geográfica, es una parte integral de la variación intraespecífica; el significado biológico de estas diferencias no es claro, pero pueden ser resultado de estrategias evolutivas. Clínicamente, las diferencias geográficas pueden tener un gran impacto, ya que los envenenamientos presentarán diferente sintomatología dependiendo de la región (Mackesy, 2010). El amplio rango de distribución de las víboras de cascabel incrementa la posibilidad de investigar variaciones de veneno intra e inter específicas (Calvete *et al.*, 2010).

II. Antecedentes

Uno de los primeros logros en la Toxinología fue el realizado en 1938 por Slotta, K. H. y Fraenkel-Conrat, H., el cual consistió en la purificación y cristalización de crotoxina a partir del veneno de la serpiente de cascabel sudamericana *C. durissus terrificus*. Este trabajo representó el inicio del estudio de la bioquímica de proteínas tóxicas de los venenos (Gutiérrez, 2002; Doley y Kini, 2009). A partir de entonces, se han realizado numerosos estudios en los ámbitos molecular, farmacológico e inmunológico en torno a dicha proteína, debido a la fácil disponibilidad de la misma. La información obtenida, ha mejorado el entendimiento del papel patofisiológico de la crotoxina en el envenenamiento por mordedura de *C. d. terrificus* y de las especies relacionadas.

Se han realizado estudios notables sobre variabilidad geográfica y ontogenética del veneno de la serpiente de cascabel sudamericana antes mencionada. Por ejemplo, Vellard, en 1937, descubrió que algunas de las poblaciones de la especie *C. d. terrificus* distribuidas en el sur de América (Argentina, Paraguay y sureste de Brasil) tienen veneno altamente neurotóxico, mientras que las poblaciones del norte (Brasil y Venezuela) tienen veneno fuertemente hemotóxico.

Barrio y Brazil en 1954, examinaron la acción neuromuscular del veneno de *C. durissus terrificus* en ratas, y encontraron dos respuestas distintas, las cuales fueron clasificadas geográficamente en dos tipos: el tipo I, caracterizado por convulsiones, hipotonía y parálisis, se presentó en venenos provenientes de serpientes de Argentina, Paraguay y Bolivia; mientras que el tipo II, caracterizado por hipotonía inicial y flacidez muscular, fue encontrado en venenos de áreas de Brasil, junto a las áreas del tipo I. Las serpientes de Sao Paulo, tuvieron veneno de ambos tipos. Bober y colaboradores (1988), demostraron que las diferencias en las propiedades del veneno de serpientes de cascabel pueden ser significativas y que éstas pueden reflejarse en los signos clínicos, lo cual afecta la eficacia del antiveneno comercial para neutralizar la toxicidad del veneno.

Por otro lado, se han identificado dos diferentes tipos de veneno en poblaciones de la serpiente de cascabel *C. scutulatus scutulatus*. En el suroeste de Estados Unidos de América, el envenenamiento por *C. scutulatus scutulatus* se caracteriza por producir efectos neurotóxicos (incluyendo parálisis flácida), con efectos locales pequeños o sin ellos, mientras que los estudios clínicos en el centro y norte de Arizona indican que los envenenamientos producen efectos locales severos. La aparición de dos tipos de veneno en la misma especie, sugiere una explicación a la sintomatología clínica previamente reportada (Chippaux *et al.*, 1991). Basados en numerosos estudios, se sugirió la siguiente clasificación del veneno: el tipo A, que contiene a la toxina Mojave y con una baja actividad proteolítica y hemorrágica; el veneno tipo B, con actividades proteolíticas y hemorrágicas altas, pero sin la presencia de la toxina Mojave. La toxicidad de estos dos tipos de veneno son marcadamente diferentes; la dosis letal (DL₅₀) medida en ratones, del veneno tipo A es de 0.22 a 0.46 mg/kg, mientras que es de 2.0 a 6.0 mg/kg para el veneno B (Glenn *et al.*, 1983). Las poblaciones de serpientes con veneno tipo B, están restringidas principalmente al centro de Arizona, mientras que las poblaciones de serpientes con veneno tipo A se han encontrado en California, Nevada y Utah. Además, los dos tipos de veneno se traslapan en algunas áreas, produciendo un tercer tipo de veneno, denominado A+B (Wilkinson *et al.*, 1991).

Se han utilizado diferentes herramientas para determinar la variación en la composición del veneno de las serpientes, tales como la separación de los venenos y el análisis electroforético; los ensayos biológicos (practicados típicamente en ratones) como es el caso de la medición de la actividad letal; y el uso de sueros antiveneno para evaluar la presencia/ausencia de toxinas de acuerdo a la reactividad cruzada. Actualmente, también se utilizan otras técnicas para estudiar la composición de los venenos, entre éstas se encuentran el uso de anticuerpos monoclonales y la obtención de proteomas de venenos.

En 1986, Rael y colaboradores obtuvieron un anticuerpo monoclonal dirigido hacia la subunidad básica de la toxina Mojave. Con el anticuerpo se evaluó la reactividad cruzada hacia fosfolipasas no neurotóxicas del mismo veneno así como, también, hacia las

proteínas del veneno de otras serpientes de cascabel. *C. viridis concolor*, *C. horridus* y *C. basiliscus* resultaron positivas al análisis, mientras que no hubo reactividad cruzada con el veneno de *C. adamanteus*, *C. atrox*, *C. molossus* y *C. ruber* ni con las fosfolipasas no neurotóxicas del propio veneno de *C. scutulatus scutulatus*. Poco después, en 1988, Kaiser y Middlebrook, obtuvieron cuatro anticuerpos monoclonales anti-crotoxina, de los cuales, uno resultó neutralizar a la β -neurotoxina. Además, reportaron que los anticuerpos no tuvieron reactividad cruzada con los venenos de *C. atrox* y *C. adamanteus*, que contienen fosfolipasas no neurotóxicas. Más tarde, Choumet *et al.*, 1991, desarrollaron seis anticuerpos monoclonales dirigidos hacia la subunidad ácida de la crotoxina y ocho contra la subunidad básica; de los primeros mencionados, cuatro tuvieron reactividad cruzada con la subunidad básica, mientras que sólo uno de los anticuerpos anti-subunidad básica, tuvo reactividad cruzada con la subunidad ácida. Sin embargo, ninguno de los anticuerpos ha sido utilizado para detectar crotoxina en el veneno de otras víboras de cascabel. Por otro lado, ha sido reportado el proteoma del veneno de diversas especies de serpientes, entre las cuales, cabe mencionar a la serpiente de cascabel *C. durissus terrificus*, donde se encontró que la crotoxina ocupa el 50% de la composición total del veneno (Calvete *et al.*, 2010). En el mismo trabajo, fue estudiada y comparada la composición y letalidad de una mezcla de venenos de ejemplares adultos contra una mezcla de venenos de individuos juveniles de *Crotalus simus* distribuidos en Costa Rica (Figura 4). Entre dichas mezclas de veneno se encontraron las siguientes diferencias ontogénicas: el proteoma del veneno de los juveniles resultó tener 52.7% de crotoxina, presentando actividad principalmente neurotóxica, con un intervalo de dosis letal media (DL₅₀) de 1.8-2.6 $\mu\text{g}/\text{ratón}$. En contraste, el veneno de los individuos adultos tuvo solo 4.1% de crotoxina, presentando principalmente actividad hemorrágica y siendo el intervalo de dosis letal media de 14.6-17.6 $\mu\text{g}/\text{ratón}$. Con estos resultados, Calvete y colaboradores concluyen que la concentración de crotoxina está directamente relacionada con la actividad letal, es decir, que la alta letalidad del veneno de los ejemplares juveniles de *Crotalus simus* es, principalmente, atribuible a la presencia de altas concentraciones de crotoxina.

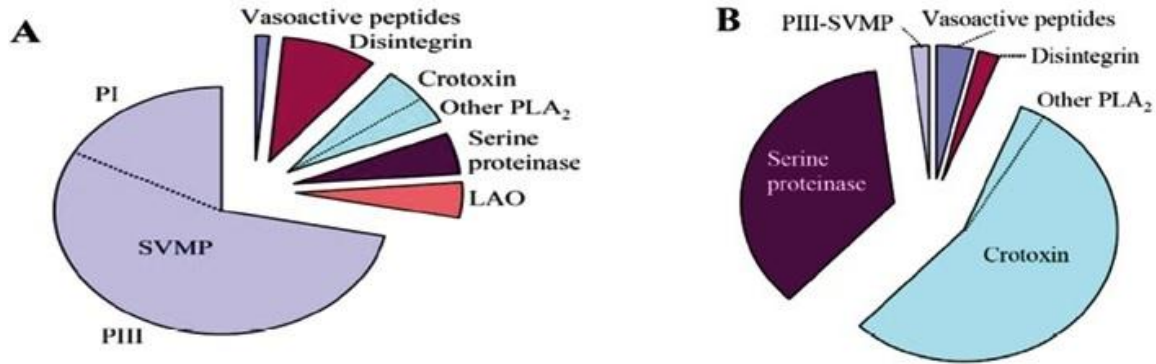


Figura 4. Resultados de la proteómica de mezcla de venenos de A) ejemplares adultos y B) ejemplares juveniles de *C. simus simus* distribuidos en Costa Rica (Calvete *et al.*, 2010).

Recientemente, Neri-Castro y colaboradores (2013) realizaron la caracterización bioquímica del veneno de las tres subespecies de *Crotalus simus* distribuidas en México. Entre otros resultados, se obtuvo la DL_{50} del veneno individual de *C. s. simus*, *C. s. tzabcan* y *C. s. culminatus* (Anexo 2). Dichos resultados muestran valores bajos de DL_{50} (2.4-12.3 $\mu\text{g}/\text{ratón}$) para la subespecie *C. s. simus*, mientras que *C. s. culminatus* tuvo valores altos (65.0-303.3 $\mu\text{g}/\text{ratón}$), por otro lado, los valores de DL_{50} obtenidos del veneno de ejemplares individuales de *C. s. tzabcan* se traslaparon con los obtenidos con las dos subespecies antes mencionadas (2.4-155.9 $\mu\text{g}/\text{ratón}$). También, fue determinado el proteoma de una mezcla de venenos de ejemplares adultos *C. simus simus* del estado de Veracruz, así como también, el proteoma de una mezcla de venenos de individuos adultos de *C. simus culminatus* del estado de Morelos. Se encontró que sólo la primer subespecie mencionada contiene crotoxina, en un porcentaje de 14.3% (Figura 5).

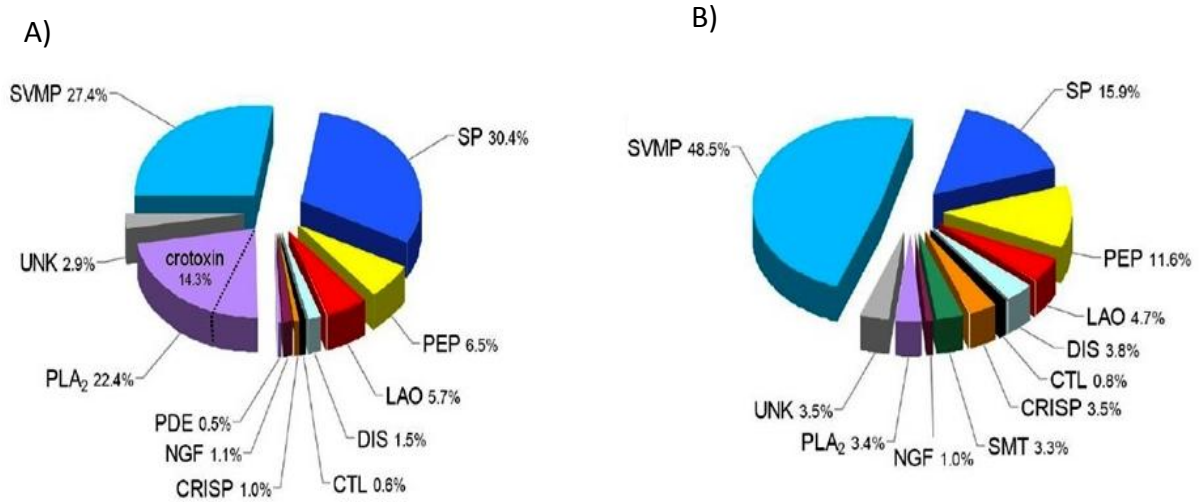


Figura 5. Proteómica de mezcla de venenos de dos subespecies de *C. simus* distribuidas en México. A) *C. s. simus* B) *C. s. culminates*. Metaloproteasas (SVMP), serino proteasas (SP), péptidos (PEP), L-amino oxidasas(LAO), desintegrinas (DIS), proteínas similares a lectinas tipo C (CTL), proteínas de secreción ricas en cisteína (CRISP), miotoxinas pequeñas (SMT), factor de crecimiento nervioso (NGF), fosfolipasa A₂ (PLA₂), desconocido (UNK) (Neri-Castro *et al.*, 2013).

III. Justificación

Actualmente, el antiveneno comercial utilizado en el tratamiento del envenenamiento por vipéridos que se usa en México, se produce a partir de sueros de caballos hiperinmunizados con veneno de las serpientes *Crotalus simus* y *Bothrops asper*. Sin embargo, la selección de los venenos de dichas especies no es rigurosa y muchas veces es aleatoria, sin que se tenga conocimiento de si los venenos contienen o no crotoxina. Por tal motivo, es importante determinar si los venenos que se utilizarán para inmunización contienen dicha neurotoxina, para así realizar una selección adecuada de los inmunógenos a utilizar en la producción del antiveneno, por otro lado, para tener un mayor conocimiento acerca de la biología de la especie.

IV. Hipótesis

Los venenos aislados a partir de individuos de *Crotalus simus* contienen distintas cantidades de crotoxina lo cual repercute en su letalidad.

V. Objetivo general

Obtener anticuerpos monoclonales y policlonales para detectar y cuantificar a la proteína crotoxina en el veneno de las tres subespecies de *Crotalus simus* distribuidas en México.

VI. Objetivos particulares

- Purificar crotoxina a partir del veneno de *Crotalus durissus terrificus*.
- Obtener anticuerpos policlonales y monoclonales dirigidos hacia la neurotoxina.
- Analizar cualitativamente la presencia de crotoxina en el veneno individual de las tres subespecies de *Crotalus simus*.
- Cuantificar a la neurotoxina mediante un inmunoensayo enzimático tipo ELISA.
- Estudiar la relación entre la letalidad del veneno y la concentración de crotoxina, así como, también, en relación a la distribución geográfica de la especie.

VII. Metodología

VII.1 Veneno

Los venenos utilizados en este proyecto corresponden a 30 ejemplares adultos de *Crotalus simus*. Los sitios de colecta se encuentran descritos en el Anexo 1, Figura 6. Los especímenes fueron colectados con el permiso del Dr. Alejandro Carbajal Saucedo (registro FAUT-232 SEMARNAT). El veneno de *C. durissus terrificus* pertenece a un ejemplar adulto y fue donado por el Dr. Adolfo de Roodt del Instituto Malbran de Buenos Aires, Argentina. Los venenos se encuentran liofilizados y están depositados en el banco de veneno del laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano en el Instituto de Biotecnología de la U.N.A.M.



Figura 6. Mapa de distribución de los ejemplares de *C. simus* evaluados en este proyecto (Neri-Castro *et al.*, 2013).

VII.1.2 *Cuantificación del veneno por absorbancia a 280 nm (A_{280nm})*

Las proteínas pueden ser cuantificadas a 280 nm debido a la presencia de aminoácidos aromáticos, pero la sensibilidad depende del número de dichos residuos. Los venenos se resuspendieron en buffer de fosfatos (PBS 1X) y se midieron en un espectrofotómetro (Eppendorph, Biophotometer) a 280 nm, usando una celda de cuarzo (Beckman) de 1 cm de longitud. La concentración de la proteína se estimó asumiendo que una absorbancia de uno equivale a 1 mg/mL con base en la ley de Lambert-Beer.

VII.1.3 *Cuantificación del veneno por el método del ácido bicinconínico (BCA)*

En su forma soluble, el ácido bicinconínico (BCA) es un reactivo sensible, estable y específico que reacciona con el ión cuproso (Cu^+). La presencia de enlaces peptídicos y las cadenas laterales de algunos aminoácidos (cisteína, fenilalanina, triptófano y tirosina), son los responsables de la reacción colorimétrica, puesto que en medio alcalino, la proteína reacciona con el ión cúprico (Cu^{++}) produciendo iones cuprosos (Cu^+). A su vez, cada uno de estos iones se une a dos moléculas de BCA produciendo un color púrpura. La metodología se realizó de acuerdo a las especificaciones del proveedor del kit comercial Pierce™ BCA Protein Assay Kit (García-Arellano y Vázquez-Duhalt, 1998).

VII.1.4 *Purificación de la proteína crotoxina a partir del veneno de la serpiente sudamericana *Crotalus durissus terrificus**

La purificación de crotoxina se realizó por cromatografía de exclusión molecular, utilizando una columna (1.96 m de altura con un diámetro de 0.9 cm) con Sefadex G-75. Este tipo de cromatografía se basa en el uso de una matriz porosa e inerte que discrimina entre el tamaño y/o forma de las moléculas. El rango de separación molecular de Sefadex G-75 es de 3,000 a 80,000 kDa. El procedimiento realizado fue el siguiente: 100 mg de veneno liofilizado de *C. d. terrificus*, se resuspendió en 1.5 mL de acetato de amonio 20

mM pH 4.7 en presencia de Urea 6M. La solución se centrifugó durante dos minutos a 14 000 r.p.m. El sobrenadante se aplicó a la columna equilibrada en el mismo buffer. La columna se eluyó con una velocidad de flujo fue de 16 mL/h y se colectaron tubos con 1.6 mL. A todos los tubos se les midió la absorbancia a 280 nm. Se juntaron las fracciones correspondientes y fueron analizadas por SDS-PAGE y toxicidad en ratones. Después, fueron concentradas por liofilización.

VII.2 *Obtención de la potencia letal (DL₅₀)*

La potencia letal, expresada en términos de dosis letal media (DL₅₀), se define como la cantidad de veneno o toxina necesaria para matar a la mitad del total de una población animal en experimentación (FEUM, 2009). El procedimiento consistió en la inyección intravenosa de diferentes dosis de crotoxina (en PBS 1X) a ratones CD1 de sexo indistinto (de 18 a 20 g de peso). Después de 24 horas se registró el número de muertos. El porcentaje de mortalidad se graficó en función del logaritmo de la cantidad de proteína administrada y el análisis se realizó en una curva sigmoidea a través del método de regresión no lineal utilizando el programa GraphPad Prism 4.03.

VII.3 *Medición de la dosis efectiva media (DE₅₀)*

La dosis efectiva media se define como el volumen de suero necesario para que sobreviva el 50% de una población animal inyectada con 3 DL₅₀ de veneno. Se incubó crotoxina (3 DL₅₀) con diferentes volúmenes de suero policlonal de conejo anti-crotoxina, durante 30 min a 37°C. Al término de la incubación, dicha mezcla fue inyectada vía intravenosa a ratones CD1 (18-20 g de peso), después de 24 h se realizó la lectura de sobrevivencia. El porcentaje de animales vivos se graficó en función del logaritmo de la cantidad de proteína administrada y el análisis se realizó en una curva sigmoidea a través del método de regresión no lineal utilizando el programa GraphPad Prism 4.03.

VII.4 Obtención de anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales anti-crotoxina se obtuvieron de tres conejos inmunizados subcutáneamente. El antígeno fue administrado en forma de emulsión, usando adyuvante completo de Freund (CFA) en la primera inmunización, mientras que en el resto de las inmunizaciones se alternó adyuvante incompleto de Freund (IFA) y alúmina. El esquema de inmunización se muestra en la Tabla 2.

El día de la séptima inmunización, se obtuvo una muestra de 0.5 mL de sangre a partir de la vena auricular de cada uno de los conejos, con el fin de evaluar los títulos de anticuerpos anti-crotoxina.

Posterior a la última inmunización, los animales fueron sangrados por punción cardiaca. La sangre obtenida se dejó coagular durante tres horas y el sobrenadante (suero) se transfirió a tubos cónicos de 50 mL.

Tabla 2. Esquema de inmunización con crotoxina de tres conejos para la obtención de anticuerpos policlonales.

Nº de inmunización	Día	Dosis antígeno µg/conejo	Adyuvante
1	0	10	CFA
2	7	10	IFA
3	14	10	IFA
4	21	20	IFA
5	28	40	Alúmina
6	35	80	IFA
7	42	80	Alúmina
8	56	100	IFA
9	70	160	Alúmina
10	84	300	IFA

VII.4.2 Purificación de anticuerpos policlonales mediante cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad se basa en la interacción específica y reversible entre una proteína y una molécula en particular (ligando) acoplada a una matriz porosa (resina). La interacción entre la proteína y el ligando puede ser electrostática, hidrofóbica, mediante fuerzas de Van Der Waals y/o puentes de hidrógeno. Después de lavar a las proteínas que no interaccionan con el ligando, la proteína de interés se puede separar del ligando por cambios de pH, fuerza iónica o competencia con un ligando libre (King, 1998).

La inmunopurificación del suero policlonal de conejo anti-crotoxina se realizó mediante cromatografía de afinidad. La crotoxina se acopló a la resina como se describe a continuación: En 20 mL de 1 mM HCl, se agregaron 0.5 g de Sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno (Sigma); se agitó la mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se dejó sedimentar y se eliminó el sobrenadante. Enseguida, la resina se lavó 5 veces con 20 mL de 1 mM HCl, y se le dio un último lavado con 20 mL de 0.1 M de NaHCO₃ (Parkhouse, 1984). Se recuperó en un tubo cónico de 15 mL y se le adicionaron 5 mg de la subunidad CB de crotoxina de *C. d. terrificus* en 3 mL de 0.1 M NaHCO₃. Se incubó con agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. Finalmente, se tomó una muestra del sobrenadante y se midió la absorbancia a 280 nm con el fin de determinar el porcentaje de acoplamiento.

Para purificar los anticuerpos anti-crotoxina, la Sefarosa 4B-crotoxina se cargó en una columna de 5 mL y se equilibró con 15 mL de 0.1 M Tris HCl pH 8. A continuación se adicionó lentamente el suero policlonal de conejo anti-crotoxina (5 mL), y posteriormente se recirculó. Después, la columna se lavó con 0.1 M Tris HCl pH 8+0.05 M NaCl; se colectaron fracciones de 20 gotas cada una y se midió su absorbancia a 280 nm, el lavado terminó cuando la absorbancia a 280 nm fue menor a 0.07.

Finalmente, los anticuerpos se eluyeron con 100 mM ácido acético; las fracciones de un mL se colectaron en tubos de ensaye que contenían 500 µL de 1 M Tris HCl pH 8 (para

neutralizar el ácido). La elución de los anticuerpos se siguió midiendo la absorbancia a 280 nm.

VII.4.3 *Análisis mediante Western Blot*

El análisis por Western Blot se realizó para evaluar el reconocimiento del anticuerpo policlonal de conejo hacia el veneno completo de *Crotalus durissus terrificus*, en condiciones reductoras y desnaturizantes.

La muestra a analizar fue reducida con β -mercaptoetanol y se separó en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%. Seis rectángulos de papel filtro y uno de membrana de nitrocelulosa fueron recortados del mismo tamaño que el gel, se remojaron en buffer de transferencia (Glicina 39 mM, Tris 48 mM, SDS 0.037% y metanol 20%) durante 15 minutos, y posteriormente, se colocaron en una cámara de transferencia en el siguiente orden: tres rectángulos de papel filtro, gel, membrana, tres rectángulos de papel filtro. La cámara se cerró y se conectó a una fuente de poder a corriente constante (400 mA) durante una hora. Una vez concluida la transferencia, la membrana se bloqueó con leche descremada al 5% durante dos horas, después, se lavó con TBST 1X pH 7.6 (Tris 10 mM, NaCl 150 mM y 0.05% Tween 20) y posteriormente se incubó durante una hora con una solución de 5 μ g/mL de anticuerpos anti-crotoxina. La membrana nuevamente se lavó y enseguida se agregaron 10 mL del anticuerpo secundario (marcado con peroxidasa de rábano) en una dilución 1: 2000.

Por último, la membrana se volvió a lavar y se reveló con una solución de 300 μ L del buffer BCIP, 300 μ L de solución NBT y 2400 μ L de agua destilada.

VII.5 *Obtención de anticuerpos monoclonales anti-crotoxina*

La obtención de anticuerpos monoclonales se realizó inmunizando intraperitonealmente a dos grupos de cinco ratones Balb/C adultos y de sexo femenino. Se usaron dos diferentes esquemas de inmunización, los cuales se muestran en las Tablas 3 y 4. Se siguió el

protocolo de fusión celular descrito por Gavilondo-Cowley, 1995 (modificado por Olvera-Rodríguez, 2007).

Tabla 3. Primer esquema de inmunización para la obtención de anticuerpos monoclonales anti-crotoxina.

Nº	Día	Dosis antígeno µg/ratón	Adyuvante
1	0	1.0	CFA
2	12	1.5	IFA
3	24	2.0	Alúmina
4	36	3.0	IFA
Booster	48	3.0	

Tabla 4. Segundo Esquema de inmunización para la obtención de anticuerpos monoclonales anti-crotoxina.

Nº	Fecha	Dosis antígeno µg/ratón	Adyuvante
1	0	1.0	CFA
2	12	1.5	IFA
3	24	2.0	Alúmina
4	36	3.0	IFA
5	48	4.0	Alúmina
Booster	54	5.0	

VII.5.2 Descongelación de células de mieloma

Se extrajo un vial de la línea celular de mieloma murino SP2/0 Ag14 ATCC® conservado en nitrógeno líquido (-196°C) y se colocó en baño María a 37°C hasta descongelación. Las células se transfirieron a un tubo cónico de 50 mL y se diluyeron con 20 mL de medio B (Anexo 3) a 37°C. Las células fueron centrifugadas a 1,800 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y las células se colocaron en un frasco de cultivo de 75 cm² con 20 mL de medio B. Se colocaron en una incubadora Sanyo® con inyección de CO₂ del 5% y a 37°C.

VII.5.3 *Fusión celular*

Previo a la fusión celular (24 h), las células de mieloma murino fueron centrifugadas a 1,000 rpm durante 5 minutos y posteriormente resuspendidas en 10 mL de medio DMEM (medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco), se realizó conteo celular en la cámara de Neubauer y se cultivaron a una densidad de 2.5×10^5 células por mililitro en medio de cultivo B.

En condiciones de esterilidad, en una campana de flujo laminar (VECO®), se extrajo el bazo del ratón inmunizado. El bazo se colocó en una rejilla dentro de una caja Petri y fue disgregado en 7 mL de medio cultivo DMEM. El paquete celular se transfirió a un tubo de 15 mL y se dejó sedimentar para eliminar el tejido no disgregado; el sobrenadante se transfirió a otro tubo de 15 mL y se centrifugó a 1,800 rpm/5 min; el paquete celular se lavó dos veces con medio DMEM.

Las células de mieloma murino se centrifugaron a 1,800 rpm/5 min y se lavaron con 30 mL de medio DMEM. Posteriormente se resuspendieron en 30 mL del mismo medio y se mezclaron con las células del bazo. La mezcla obtenida se centrifugó a 1,800 rpm/5 min, descartando el sobrenadante; al paquete celular se le agregó 1 mL de polietilenglicol 1500 (en 4 experimentos de Roche y en otros 4 de SIGMA) durante un lapso de un minuto con agitación suave; se continuó agitando durante dos minutos más; después se diluyó con 1 mL de medio DMEM en un lapso de 1 minuto y en enseguida se agregaron 9 mL más del mismo medio. Las células se centrifugaron a 1,800 rpm/5 min y se aspiró el sobrenadante; posteriormente, el paquete celular se resuspendió en 50 mL de medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) y se colocaron 100 μ L de cultivo celular por pozo en placas de 96 pozos. Después de 48 horas se agregó medio HT a cada uno de los pozos para disminuir el contenido de aminopterina.

Ocho días después de la fusión celular, se analizaron los pozos al microscopio. Las muestras de cultivo con crecimiento de células, fueron analizadas mediante ensayo de ELISA para evaluar las clonas positivas, productoras de anticuerpos anti-crotoxina.

VII.5.4 *Clonación por dilución limitante*

Se obtuvo un medio alimentador, el cual se le agregó a los hibridomas para administrarles factores de crecimiento. El medio se obtuvo del bazo de un ratón Balb/C sin inmunizar; el órgano se disgregó y se lavó tres veces con medio DMEM; las células se centrifugaron a 1,800 rpm/5 min y el pellet se resuspendió en 10 mL de medio DMEM. Se contaron células y se resuspendieron en medio HT a una concentración de 1×10^6 células/mL.

Se transfirieron 100 μ L del medio de cultivo de cada uno de los pozos con hibridomas, al primer pozo de una placa de 96 pozos y se hizo una dilución 1:2 con el medio alimentador. Después de 8 días se realizó el análisis de ELISA para comprobar la estabilidad del hibridoma, y se realizaron dos diluciones límite más para la obtención de una sola clona por pozo.

VII.5.5 *Expansión celular*

La clona productora de anticuerpos monoclonales anti-crotoxina, se expandió en 2 mL de medio B utilizando una caja de 24 pozos, posteriormente, las células se resuspendieron y fueron transferidas a un frasco de cultivo de 75 cm en 20 mL de medio B. Diez días después, las células se congelaron y descongelaron para probar su estabilidad a través de la evaluación de crecimiento y producción de anticuerpos.

VII.5.6 *Congelación*

Las células productoras de anticuerpos anti-crotoxina fueron centrifugadas a 2,000 rpm/5 min y lavadas con medio de cultivo DMEM. Posteriormente, se contaron células en una cámara de Neubauer y se diluyeron en medio de congelación 2 (Anexo 3), de tal manera que se obtuvo una concentración de 10×10^6 células/mL, enseguida se agregó el mismo volumen de medio de congelación 1 (Anexo 3) para tener una concentración final de 5×10^6 células/mL. Se colocó 1 mL de la solución en criotubos, los cuales se trasladaron a hielo y enseguida a -70°C ; posteriormente se pasaron a nitrógeno líquido (-170°C).

VII.5.7 *Producción de líquido de ascitis*

Una semana antes de la inducción de ascitis, los hibridomas se descongelaron y se crecieron en medio de cultivo B con sucesivos cambios de medio. Tres días antes de la inoculación de los hibridomas, 5 ratones adultos de sexo femenino de la cepa Balb/C, por clona, fueron inyectados vía intraperitoneal con 500 μ L de pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano). Pasados los tres días, se les inyectaron 500,000 células de hibridoma en 500 μ L de medio DMEM, por la misma vía de administración. Los ratones fueron observados diariamente y una vez que hubo crecimiento tumoral, se obtuvo el líquido ascítico con una aguja de calibre 18 G (1.2 mm de diámetro por 40 mm de longitud).

VII.5.8 *Purificación de anticuerpos monoclonales mediante cromatografía de afinidad*

Esta metodología se fundamenta en la unión específica de la región Fc de las inmunoglobulinas a la proteína A de *Staphilococcus aureus* (King, 1998).

Una columna con 1 mL de Sepharosa 4B acoplada a proteína A (Invitrogen™), fue equilibrada con 10 mL de buffer de lavado (50 mM Tris-HCl pH 8+ 0.5 M NaCl). Por otro lado, el líquido de ascitis se clarificó centrifugando a 10 000 rpm/15 minutos, y el sobrenadante obtenido se agregó lentamente a la columna. Enseguida, la columna se lavó con 20 mL de buffer de lavado y se colectaron fracciones de 1 mL, las cuales fueron cuantificadas por absorbancia a 280 nm hasta alcanzar una absorbancia menor a 0.07.

La elución de los anticuerpos se realizó con 100 mM ácido acético. Se colectaron fracciones de 20 gotas (un mL) en tubos con 100 μ L de 2 M Tris-HCl pH 8 (para prevenir desnaturalización).

VII.6 *Análisis cualitativo y cuantitativo de crotoxina*

La presencia de crotoxina en el veneno individual de las tres subespecies de *C. simus* se determinó por medio de slot blot en condiciones nativas de veneno. Por otro lado, la

cuantificación de la neurotoxina se llevó a cabo mediante la técnica de ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas) tipo sándwich.

VII.6.2 *Análisis mediante slot blot*

Este análisis se realizó para evaluar el reconocimiento de crotoxina en el veneno completo y en condiciones nativas de las subespecies de *C. simus*, debido a que algunos epítopes pudieran ser de tipo estructural y no lineal. La metodología que se realizó es la siguiente: Se utilizó una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF), la cual, debido a su grado de hidrofobicidad se sumergió en metanol 100% durante 15 segundos para poder transferir muestras en solución acuosa, y enseguida se equilibró en un recipiente con agua Mili-Q durante 2 min. Posteriormente, la membrana y dos tiras de papel filtro del tamaño de la membrana se remojaron durante 5 min en buffer de transferencia. En la cámara de slot blot, se colocaron las dos tiras de papel filtro por debajo de la membrana de PVDF y se cerró la unidad. Se colocaron las muestras en cada uno de los pozos de la cámara y se aplicó vacío hasta que todas las muestras fueron filtradas. Posteriormente, la membrana se sumergió durante 10 s en metanol al 100%, con el fin de secar la membrana y regresarla a su estado hidrófobo. La inmunodetección, se realizó incubando a la membrana con el anticuerpo de interés (diluido en TBST con 5% de leche descremada), durante una hora con agitación constante. Se realizaron tres lavados de la membrana con TBST y después se incubó durante 30 min con el anticuerpo secundario (diluido en TBST con 5% de leche descremada) con agitación constante. Por último, la membrana se volvió a lavar y se reveló con una solución de 300 μ L del buffer BCIP, 300 μ L de solución NBT y 2400 μ L de agua destilada.

VII.6.3 Inmunoensayo enzimático (ELISA)

En este apartado se explica de manera general el procedimiento efectuado para realizar ELISA indirecto, método que fue usado para la determinación de títulos de anticuerpos en suero de conejo y ratón, así como para la evaluación del reconocimiento de los anticuerpos secretados por los hibridomas. El título se define como la dilución en la cual se encuentra el 50% del máximo de reconocimiento de los anticuerpos hacia el antígeno (medido por absorbancia a 405 nm). La metodología que se llevó a cabo es la siguiente:

Se preparó una solución de la proteína crotoxina a una concentración de 5 µg/mL en buffer de sensibilizado (pH 9.5, 100 mM) se agregaron 100 µL de esta solución a cada uno de los pozos de la placa para ensayos de ELISA (Nunc MaxiSorp®) y se incubó durante dos horas a 37°C. Al término de la incubación, se desechó el sobrenadante y se agregaron 200 µL de solución de lavado (50 mM Tris/HCl pH 8 + 150 mM NaCl + 0.05% Tween 20), este paso se repitió dos veces más. Posteriormente, los pozos se bloquearon agregándoles 200 µL de solución de bloqueo (50 mM Tris/HCl pH 8 + 0.5% gelatina + 0.2% Tween 20) e incubando 2 horas a 37°C (todos los pasos de lavado y bloqueo en este procedimiento se realizaron de esta manera). Se repitió el lavado.

Cuando la finalidad fue evaluar los títulos de anticuerpos en suero, se realizaron diluciones seriadas 1:2 del suero en solución de reacción (50 mM Tris/HCl pH 8 + 50 mM NaCl + 1 mg/mL gelatina+ 0.05% Tween 20) e incubaron a 37°C. Si el propósito era analizar el sobrenadante de cultivo de hibridomas, se transfirieron 100 µL de medio de cultivo de cada pozo a los pozos previamente sensibilizados y bloqueados. Se repitieron los lavados. Después se incubó con 100 µL de una solución 1:1,000 de los anticuerpos marcados con peroxidasa en solución de reacción y se incubó una hora a 37°C. Se repitieron los lavados y finalmente la placa se reveló con 100 µL por pozo de solución de revelado: 1 mL de buffer para ABTS, 75 µL de ABTS, aforando a 10 mL de agua destilada (este método de revelado se empleó en todas las variantes de ELISA realizados).

VII.6.4 Biotinación de anticuerpos monoclonales

A un mililitro de una solución de 1 mg/mL de anticuerpo monoclonal (AcM) en PBS, se le agregó 8.5 mg de bicarbonato de sodio (NaHCO_3). Por otro lado, se disolvieron 3.4 mg de NHS-Biotina en 1 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) y se añadieron 13.2 μL de esta solución al tubo con la mezcla AcM/ NaHCO_3 . Se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente y finalmente los anticuerpos biotinados se dializaron contra PBS 1X.

VII.6.5 Cuantificación de crotoxina mediante ELISA tipo sándwich

En este apartado se detalla la técnica de ELISA tipo sándwich para la cuantificación de crotoxina en el veneno de *C. simus*. Se utilizaron buffers con la misma composición mencionada en la metodología de ELISA indirecto, y de igual manera, se realizaron lavados entre cada paso de la técnica así como el mismo proceso de revelado. La metodología de cuantificación de crotoxina fue la siguiente: se sensibilizaron placas de ELISA (Nunc MaxiSorp®) con 100 μL del anticuerpo monoclonal 4F6 a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en solución de sensibilizado, incubando durante dos horas a 37°C. Después del bloqueo, se realizó una curva estándar de crotoxina haciendo diluciones seriadas 1:2 de una solución de crotoxina a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en solución de reacción. En el caso de los venenos a cuantificar, se colocó una concentración conocida de cada veneno en el primer pozo, y de igual manera, se realizaron diluciones seriadas 1:2 en solución de reacción, se incubó una hora a 37°. Después, en todos los pozos se colocaron 100 μL de anticuerpo policlonal de conejo a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubó a 37°C durante 1 hora. La última incubación se realizó con 100 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ de anticuerpos anticonejo marcados con peroxidasa de rábano diluidos 1:2,000 en solución de reacción.

VIII. Resultados

VIII.1 Purificación de crotoxina

En la Figura 7 se muestra el cromatograma resultante de la separación del veneno de *C. durissus terrificus* por exclusión molecular en presencia de urea. Resultaron cuatro fracciones, de las cuales, la tercera (F3) destacó por su alta cantidad de proteína (58.1%, Tabla 5). En el gel SDS-PAGE (Figura 8) se aprecia que F3 corresponde a la subunidad básica de la proteína crotoxina (14.5 kDa), y además, se encontró pura; F1 no presentó bandas visibles en gel, mientras que F2 tuvo una banda en un peso de 30 kDa, correspondiente a la proteína giroxina y en el carril de la fracción F4 se observa una banda prominente en un peso aproximado de 5 kDa que corresponde a la proteína crotamina, así como a la subunidad ácida de la crotoxina. La fracciones fueron inyectadas por triplicado a ratones CD1 (con un peso de 18-20 g) vía intravenosa (20 µg/ratón). La signología observada en los ratones inyectados con la fracción 3 fueron parálisis flácida y muerte (tabla 6), lo cual demostró que las condiciones de purificación no afectaron la actividad tóxica de la proteína de interés.

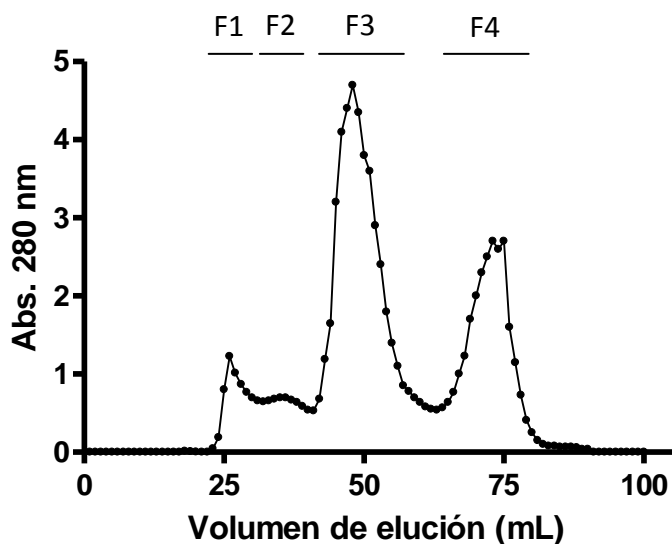


Figura 7. Exclusión molecular del veneno completo de *C. durissus terrificus* utilizando buffer de acetato de amonio 20 mM pH 4.7+ Urea 6M.

Tabla 5. Absorbancia (A_{280nm}) y U.A._{280 nm} de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-75 en condiciones desnaturalizantes (6M Urea). U.A. inicial=129; Σ U.A.=109.8 Rendimiento= 85.1%

Fracción	Volumen (mL)	A_{280nm}	U.A. _{280nm}
F1	11.5	0.78	8.9
F2	10.5	0.74	7.8
F3	32.5	1.97	64.0
F4	48	0.61	29.3

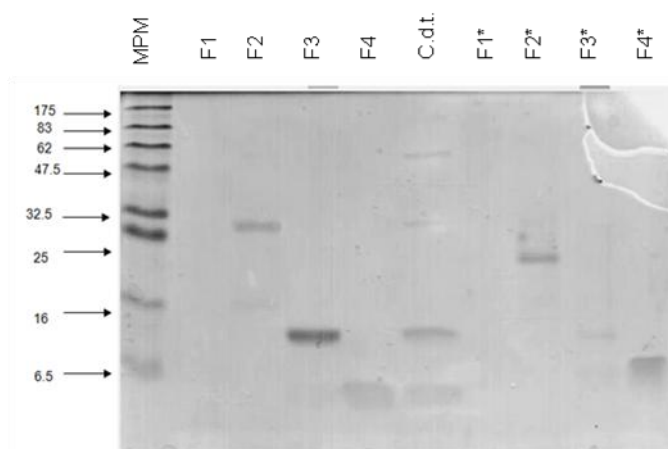


Figura 8. Gel SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras (*) de las fracciones obtenidas en la separación del veneno de *Crotalus durissus terrificus* por cromatografía de exclusión molecular en condiciones desnaturalizantes (urea 6M) (10 μ g/carril).

Tabla 6. Signología observada en grupos de tres ratones al inyectarles 20 μ g (vía intravenosa) de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular del veneno de *C. durissus terrificus*.

Fracción	Parálisis flácida	Parálisis rígida en patas posteriores	Giros involuntarios	Muerte
F1	0/3	0/3	0/3	0/3
F2	0/3	0/3	3/3	3/3
F3	3/3	0/3	0/3	3/3
F4	0/3	3/3	0/3	3/3

VIII.2 Obtención de anticuerpos policlonales anti-crotoxina en conejo

La producción de anticuerpos policlonales fue realizada siguiendo el esquema de inmunización descrito en la metodología. Los conejos fueron sangrados el día de la séptima inmunización y fue medido el título (EC₅₀) de cada suero, el resultado fue variable, siendo el suero del conejo 2 el que tuvo el título más alto (Figura 9A). Se procedió a realizar tres inmunizaciones más y tres días después de la décima inmunización, los conejos fueron sangrados por punción cardiaca y se mezcló el suero de los tres animales (volumen total: 241 mL); el título resultante del suero fue de 31,382 (Figura 9B).

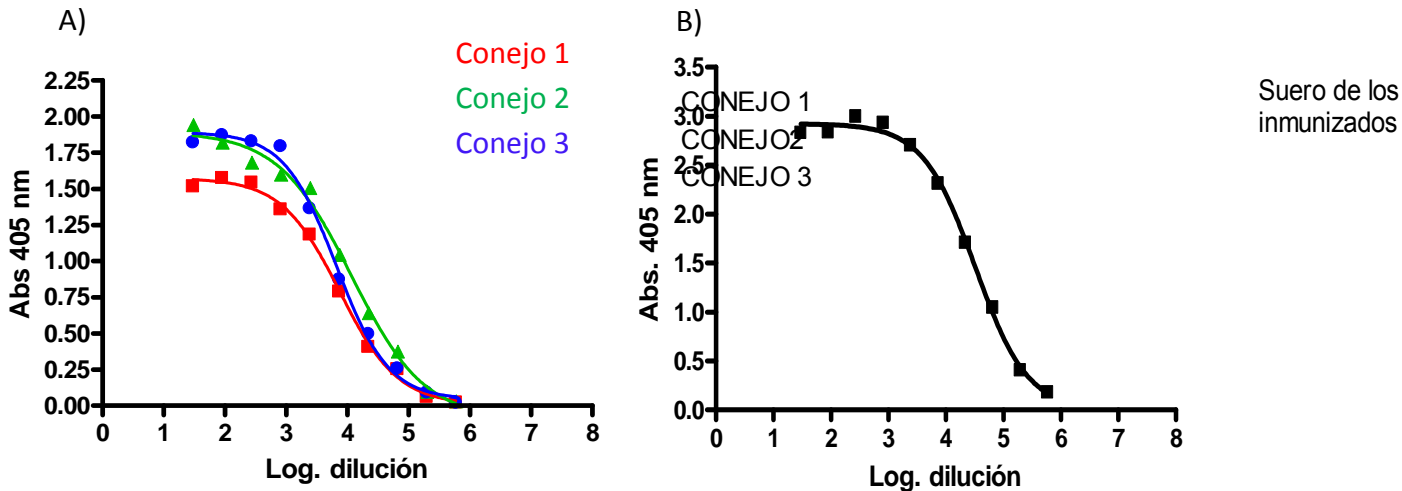


Figura 9. A) Curva sigmoideal dosis-respuesta de los sueros de los conejos inmunizados con crotoxina. EC₅₀ = ■ 7,505; ▲ 11,651; ● 6,615. B) Curva sigmoideal dosis-respuesta de la mezcla del suero de los tres conejos inmunizados contra crotoxina. EC₅₀ = 31,382.

Sigmoidal dose-response (variable slope)			
Best-fit values			
BOTTOM	0.006347	-0.09329	0.04348
TOP	1.574	1.894	1.891
LOGEC50	3.875	4.066	3.821
HILLSLOPE	-0.9129	-0.7263	-1.016
Std. Error			
BOTTOM	0.04232	0.1094	0.05290
TOP	0.03207	0.06192	0.04336
LOGEC50	0.05050	0.08485	0.05458
HILLSLOPE	0.09312	0.1137	0.1213
95% Confidence Intervals			
BOTTOM	0.000899 to 0.01179	-0.2129 to 0.01531	0.000899 to 0.00809
TOP	1.496 to 1.653	1.742 to 2.045	1.785 to 1.997
LOGEC50	3.752 to 3.999	3.834 to 4.298	3.687 to 3.954
HILLSLOPE	-1.011 to -0.8151	-1.004 to -0.4491	-1.194 to -0.7161
EC50	5646 to 9975	6828 to 19882	4864 to 8996
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom	6	6	6
R ²	0.9970	0.9939	0.9958
Absolute Sum of Squares	0.01102	0.02967	0.02299
Sy.x	0.04285	0.07032	0.06190

VIII.2.1 Purificación de anticuerpos policlonales anti-crotoxina de conejo

Se purificaron 25 mL del suero policlonal de conejo anti-crotoxina mediante cromatografía de afinidad, en una columna de crotoxina acoplada a Sepharosa 4B CNBr. El resultado del cromatograma se muestra en la figura 10A; se obtuvo una concentración de 240 µg/mL de anticuerpos anti-crotoxina (6 mg totales). Después, empleando la técnica de Western

blot, se probó el reconocimiento de los anticuerpos hacia el veneno completo de *C. d. terrificus*. En la Figura 10B se observa que hubo reconocimiento hacia la proteína crotoxina y, un poco, a la giroxina, por lo que se procedió a realizar una inmunopurificación negativa.

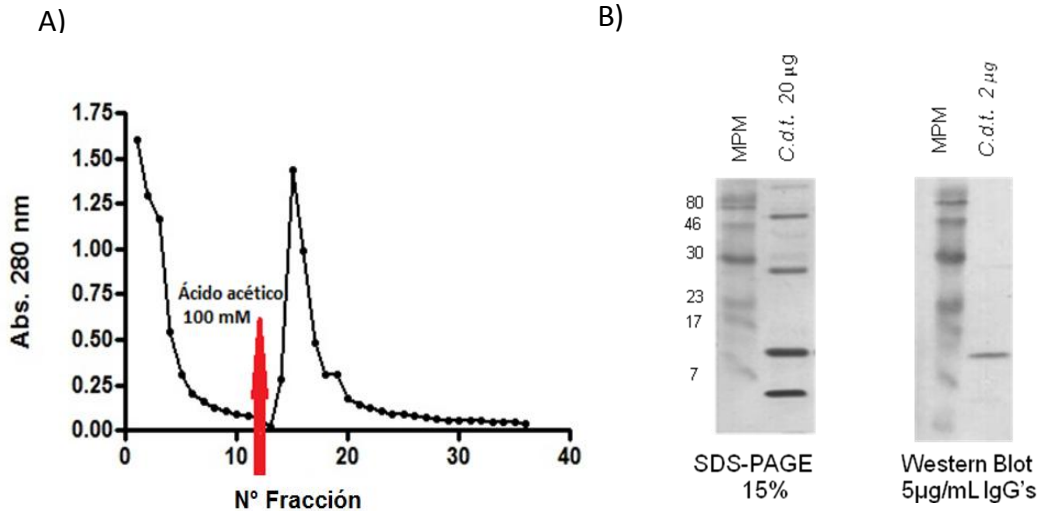


Figura 10. A) Inmunopurificación del suero policlonal de conejo anti-crotoxina. B) SDS-PAGE y Western Blot del veneno de *C. durissus terrificus*, incubación con anticuerpos obtenidos de la inmunopurificación del suero policlonal de conejo.

La inmunopurificación negativa se realizó acoplado giroxina a la resina Sepharosa 4B CNBr, por tanto, en la Figura 11 se muestra la fracción correspondiente a los anticuerpos anti-giroxina eluidos; por otro lado, la concentración obtenida de anticuerpos anti-crotoxina fue de 200 µg/mL. El resultado de Western blot incubando con 5 µg/mL del anticuerpo policlonal de conejo anti-crotoxina demostró la falta de reactividad hacia giroxina.

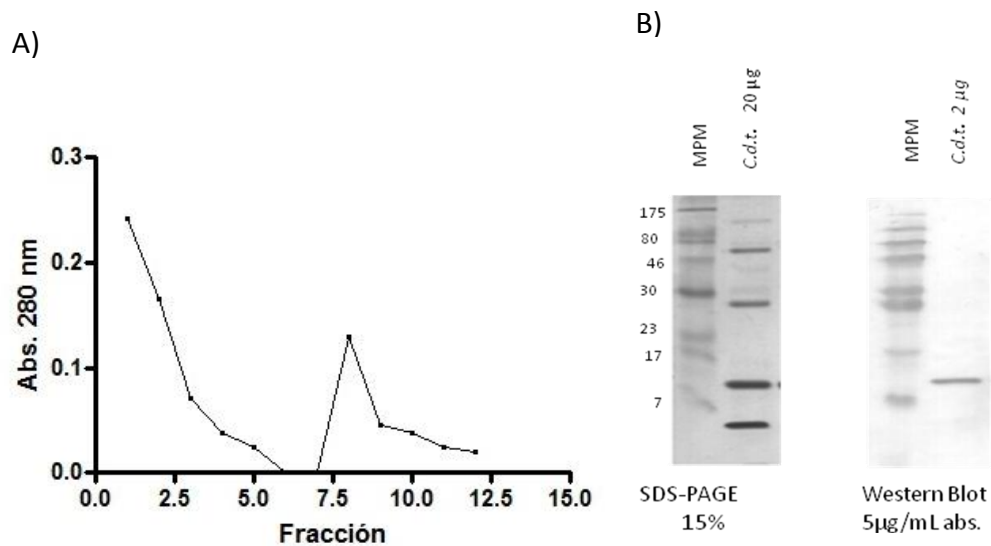


Figura 11. A) Inmunopurificación negativa de los anticuerpos policlonales de conejo anti-crotoxina. B) SDS-PAGE del veneno completo de *C. durissus terrificus* y Western blot incubado con los anticuerpos policlonales de conejo anti-crotoxina (5 µg/mL).

Se realizó un ensayo ELISA indirecto para evaluar el reconocimiento del anticuerpo policlonal de conejo anti-crotoxina, hacia el veneno completo de *C. durissus terrificus* y el veneno tipo A de *C. scutulatus scutulatus* como controles positivos, debido a que en su composición tienen a la neurotoxina, mientras que el veneno tipo B de *C. scutulatus scutulatus* fue usado como control negativo ya que tiene fosfolipasas pero no del tipo neurotóxico. Como se observa en la siguiente Figura (Figura 12), las curvas de reconocimiento hacia los controles positivos son parecidas (tan sólo fue 1.5 veces más grande el reconocimiento hacia *C. d. terrificus* que hacia *C. s. scutulatus* tipo A); sin embargo, también se observó que en el veneno del control negativo hubo cierto grado de reconocimiento, pero éste resultó ser 225 veces menor en comparación con el obtenido hacia el veneno de *C. durissus terrificus*.

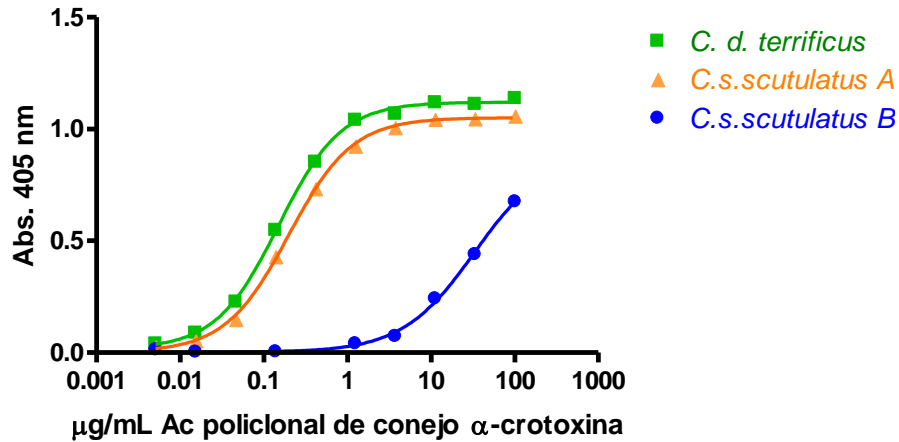


Figura 12. Curvas de reconocimiento del anticuerpo policlonal de conejo anti-crotoxina hacia el veneno de *C. d. terrificus* (C+), *C. s. scutulatus* tipo A (C+) y tipo B (C-).
 EC₅₀ = ■ 0.15; ▲ 0.20; ● 33.7.

VIII.3 Obtención de anticuerpos monoclonales anti-crotoxina de ratón

Se realizaron 16 fusiones celulares tal como se describió en la metodología, obteniéndose 676 hibridomas, de los cuales dos clonas resultaron ser productoras de anticuerpos anti-crotoxina. Los títulos de anticuerpos de los ratones Balb/C se muestran en la Figura 13. Como se observa, los títulos más altos corresponden a los ratones 5 a 8, los cuales tuvieron un esquema de inmunización más largo (Tabla 4).

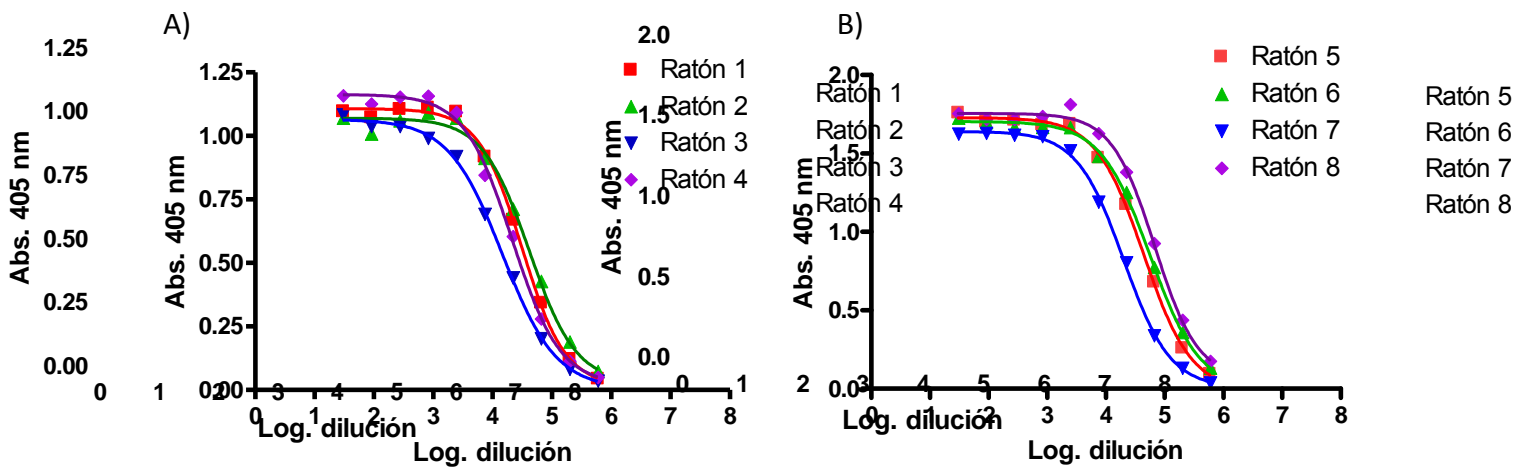


Figura 13. Curva dosis-respuesta de cuatro ratones inmunizados con crotoxina. A). EC₅₀= ■ 31, 158; ▲ 44, 441; ▼ 14, 651; ◆ 21, 409. B) EC₅₀= ■ 44, 004; ▲ 56, 671; ▼ 20, 005; ◆ 67, 668.

Las células del bazo de los ratones inmunizados, se fusionaron con células de la línea de mieloma SP2 de ratón y se obtuvieron 2 clonas productoras de anticuerpo monoclonal anti-crotoxina, las cuales se denominaron 4F6 y 2F9 por el pozo en el que se hallaron.

Los hibridomas obtenidos, fueron inoculados en ratones Balb/C vía intraperitoneal para obtener los anticuerpos monoclonales anti-crotoxina en el líquido ascítico.

VIII.3.1 Tipificación de anticuerpos monoclonales

El ensayo se realizó mediante ELISA directo, utilizando el kit comercial Mouse screening/Isotyping Kit (Zymed Laboratories). Ambos anticuerpos monoclonales pertenecen a la subclase IgG1 con cadena ligera kappa (Figura 14).

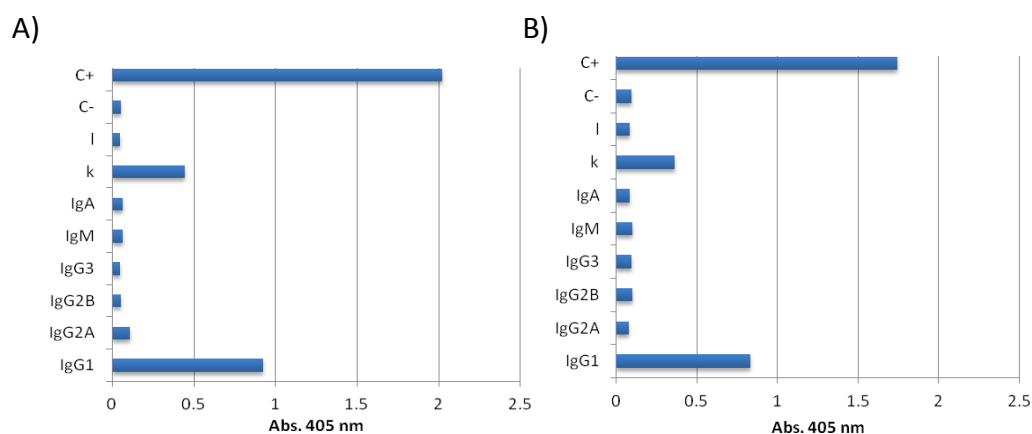


Figura 14. Tipificación de anticuerpos monoclonales. A) AcM 2F9 B) AcM 4F6. Crotoxina (C+); veneno de *C. s. scutulatus* tipo B (C-); cadenas ligeras λ y k.

VIII.3.2 Purificación anticuerpos monoclonales

La purificación de los anticuerpos monoclonales a partir de líquido de ascitis se realizó en una columna de proteína A acoplada a Sepharosa 4B. En la Figura 15A se encuentra el cromatograma de la purificación de 13.5 mL de líquido ascitis del ratón inoculado con el AcM 2F9, de éste, se obtuvo una concentración de 0.25 mg/mL de anticuerpos monoclonales (2.1 mg totales). Por otro lado, se purificaron 7.0 mL de líquido de ascitis del

ratón inoculado con el anticuerpo monoclonal 4F6 (Figura 15B) obteniéndose una concentración de 0.32 mg/mL del anticuerpo monoclonal 4F6 (2.2 mg totales).

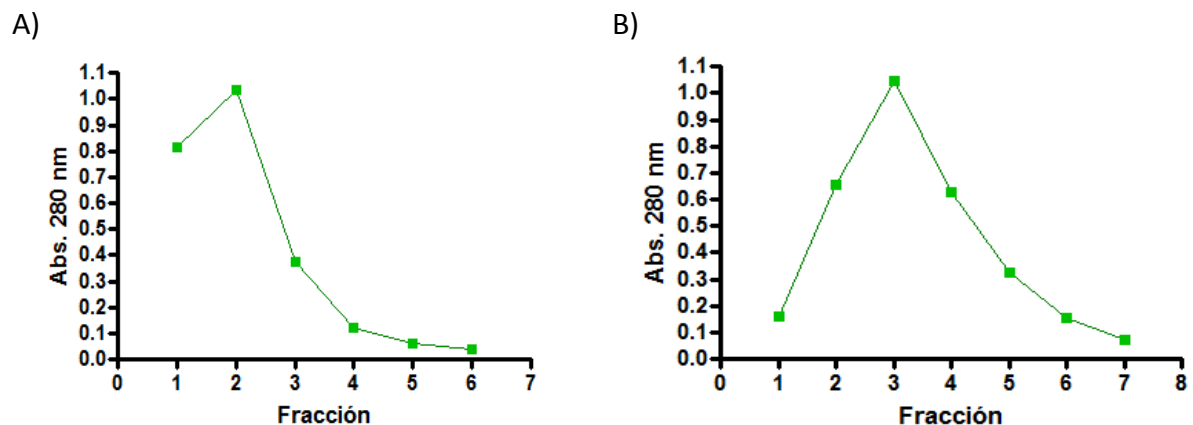


Figura 15. Purificación de los anticuerpos monoclonales 2F9 (A) y 4F6 (B) anti-crotoxina a partir de líquido ascitis de ratón, columna Sepharosa 4B-Proteína A.

VIII.3.3 Diálisis y concentración de anticuerpos

Las inmunoglobulinas fueron dializadas contra PBS 1X usando una membrana con tamaño de poro de 30 kDa. La concentración de los anticuerpos se hizo por ultrafiltración con un Amicon Ultra de Millipore con tamaño de poro de 10 kDa (Tabla 7). Posteriormente, las inmunoglobulinas se corrieron en un gel SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras para observar su grado de purificación (Figura 16).

Tabla 7. Rendimiento y concentración de los anticuerpos monoclonales después de dializarlos y concentrarlos.

		AcM 2F9	AcM 4F6
Diálisis	Rendimiento (%)	99.9	98.4
	Concentración (mg/mL)	0.26	0.31
	Total (mg)	2.1	2.2
Concentración	Rendimiento (%)	77	90.4
	Concentración (mg/mL)	0.6	1.1
	Total (mg)	1.6	2.0

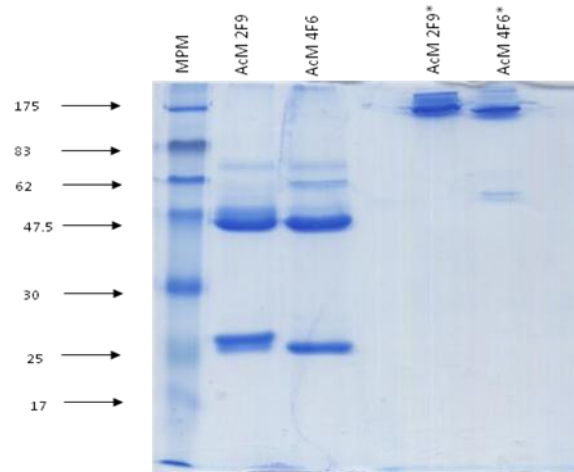


Figura 16. SDS-PAGE 12.5% de los anticuerpos monoclonales purificados en Sepharosa-A. (*) No reducido con β mercaptoetanol.

Mediante ELISA indirecto fue evaluado el reconocimiento de los dos anticuerpos monoclonales hacia el veneno de *C. d. terrificus* y *C. s. scutulatus* tipo A, como controles positivos, así como también, hacia el veneno tipo B de *C. s. scutulatus*, como control negativo (Figura 17). Ambos anticuerpos monoclonales reconocieron a los dos controles positivos y en ninguno de los dos casos existió reactividad cruzada con las fosfolipasas del veneno de *C. s. scutulatus* tipo B. Cabe resaltar que el AcM 4F6 presentó mayor reconocimiento hacia los controles positivos en comparación con el AcM 2F9, siendo la EC_{50} 1.5 veces más grande hacia el veneno de *C. d. terrificus* y 2 veces mayor hacia el veneno tipo A de *C. s. scutulatus*.

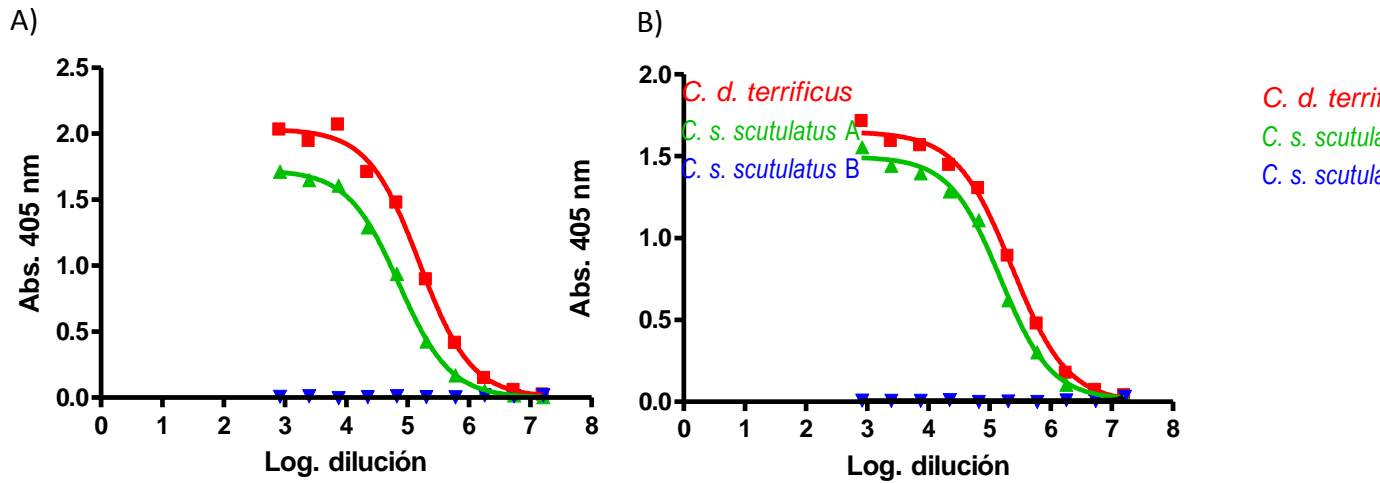


Figura 17. Curva de reconocimiento de los anticuerpos hacia el veneno de \blacksquare *C. d. terrificus* (C+), *C. s. scutulatus* \blacktriangle tipo A (C+) y \blacktriangledown tipo B (C-). A) AcM 2F9 EC_{50} = \blacksquare 156, 670; \blacktriangle 72, 310. B) AcM 4F6 EC_{50} = \blacksquare 233, 402; \blacktriangle 150, 552.

VIII.3.4 Ensayo de competencia de anticuerpos monoclonales 2F9 y 4F6

Se realizó un ensayo de ELISA para evaluar si los dos anticuerpos monoclonales anti-crotoxina (2F9 y 4F6) competían por el mismo epítipo. El experimento consistió en usar como anticuerpo de captura al AcM 2F9, mientras que el AcM 4F6 fue marcado con biotina y se utilizó como anticuerpo de detección (Figura 18A). Los controles positivos consistieron en el reconocimiento de cada uno de los anticuerpos monoclonales (2F9 y 4F6 biotinado) hacia la crotoxina (Figuras 18B y 18C, respectivamente). El control negativo consistió en usar como anticuerpo de captura al AcM 4F6 sin biotinar y de detección al mismo anticuerpo pero biotinado.

Como resultado, el AcM 4F6 biotinado tuvo menor reconocimiento en comparación a su control positivo (Figura 19), lo que se demuestra por la EC_{50} (92 veces menor), esto significa que el epítipo de ambos anticuerpos no es el mismo, pero debe encontrarse en un sitio cercano o traslapado.

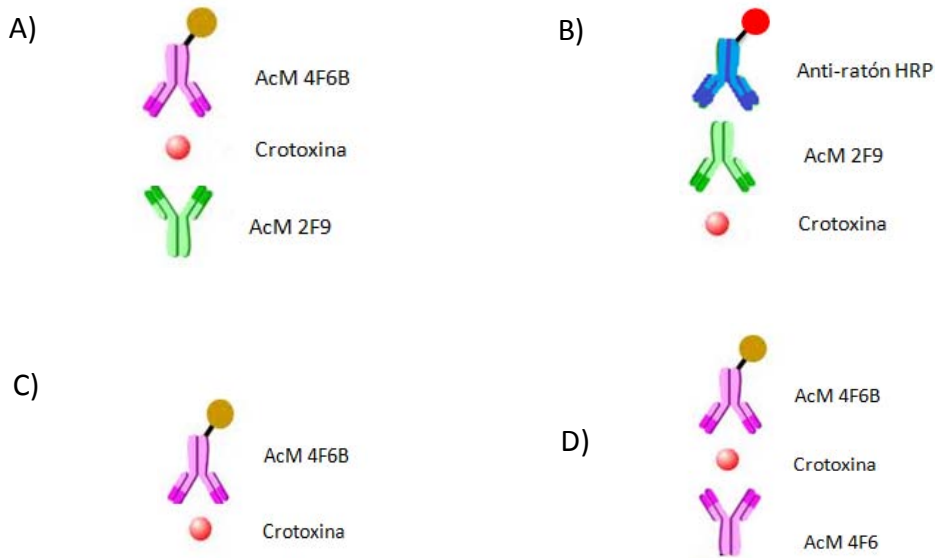


Figura 18. Diseño del ensayo de ELISA para evaluar la competencia entre el AcM 4F6 Y AcM 2F9.

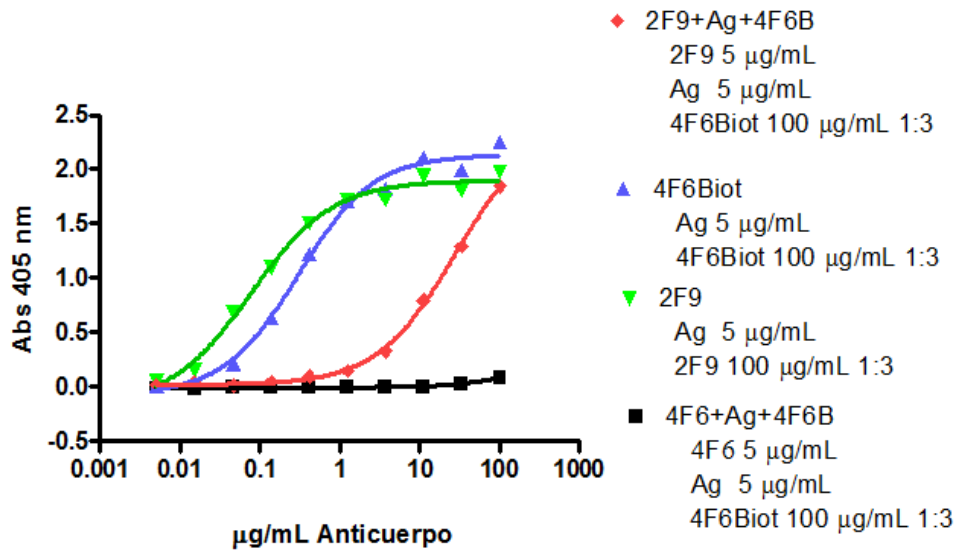


Figura 19. ELISA competitivo de los anticuerpos monoclonales anti-crotoxina 4F6Biot y 2F9. EC_{50} = ◆ 27.6; ▲ 0.3; ▼ 0.07.

VIII.4 Potencia letal de la crotoxina y ensayo de neutralización de los anticuerpos obtenidos

La DL_{50} de la fracción correspondiente a la crotoxina resultó ser de 1.9 $\mu\text{g}/\text{ratón}$. Posteriormente, se evaluó si cada uno de los anticuerpos anti-crotoxina obtenidos, era capaz de neutralizar a la neurotoxina. Esto se realizó inyectando ratones CD1 con 3 DL_{50} de la fracción antes mencionada, incubada con 300 μL de cada AcM y con el anticuerpo policlonal de conejo. Ninguno de los anticuerpos monoclonales neutralizaron a la neurotoxina, mientras que el anticuerpo policlonal de conejo sí neutralizó con dicho volumen, por lo que se procedió a la obtención de la DE_{50} del mismo, la cual fue de 94.9 $\mu\text{L}/3DL_{50}$.

VIII.5 Detección de crotoxina en el veneno individual de las subespecies de *C. simus*

Puesto que se observó que ambos anticuerpos monoclonales tienen un patrón de reconocimiento similar, se trabajó únicamente con el AcM 4F6 por ser el anticuerpo que tuvo mayor reconocimiento, por ELISA hacia la crotoxina.

La detección de crotoxina se realizó mediante la técnica de slot blot en condiciones nativas de veneno (sin SDS y en ausencia de agente reductor). Se analizaron 50 μg de cada uno de los venenos de la especie *Crotalus simus*, así como del veneno de *C. durissus terrificus* como control positivo y *C. s. scutulatus* tipo B como control negativo.

El resultado se da en la Figura 20. El AcM 4F6 reconoció a la proteína crotoxina y no presentó reactividad cruzada con el control negativo ni con las fosfolipasas de los venenos de *C. simus culminatus* (ejemplares: HK150, HK205, HK168, HK133, HK204, HK169, Csim2A, HK203 y Csim2B), por otro lado, en la subespecie *C. tzabcan*, el AcM reconoció a la neurotoxina en 6 individuos (ejemplares: HK212, HK218, HK217, HK211, HK216 y HK207) los cuales poseen dosis letales (DL_{50}) de 15.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 37.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que

en los individuos que poseen venenos con dosis letales por arriba de 89 µg/mL no hubo reconocimiento por parte del AcM 4F6 (ejemplares: HK255, HK254, HK214 y HK253).

Por otra parte, se realizó un slot blot donde se evaluó que hay reconocimiento del AcM 4F6 y del anticuerpo policlonal de conejo hacia la subunidad ácida de la crotoxina (Figura 21). El anticuerpo policlonal de conejo tampoco tuvo reactividad cruzada con el control negativo, pero sí con las fosfolipasas no neurotóxicas de *C. simus culminatus*.

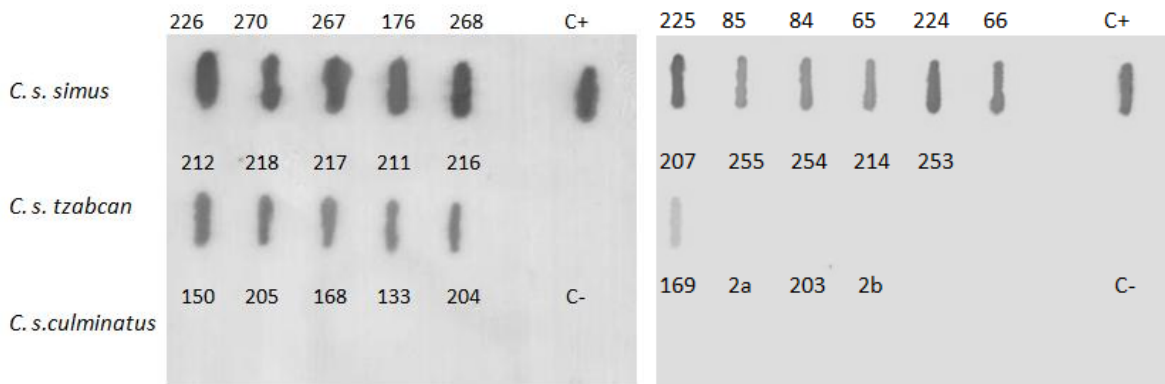


Figura 20. Slot blots del veneno nativo (50 µg) de diferentes individuos de las subespecies *C. s. simus*, *C. s. tzabcan* y *C. s. culminatus*. *C. d. terrificus* (C+) y *C. s. scutulatus* tipo B (C-). Incubación con el AcM 4F6 anti-crotoxina (2 µg/mL de anticuerpo).

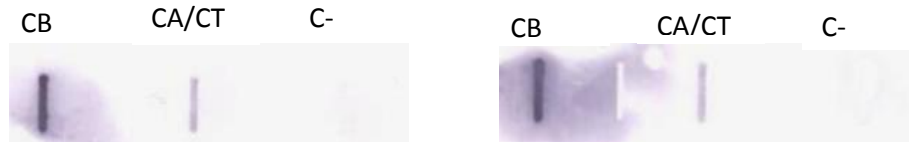


Figura 21. Slot blot de las fracciones obtenidas mediante exclusión molecular correspondientes a la subunidad B de la crotoxina (CB) y a la mezcla de la subunidad A de la crotoxina/crotamina (CA/CT). Veneno de *C. s. scutulatus* tipo B (C-). 10 µg/muestra en condiciones nativas. Izq. AcM 4F6; Der. Anticuerpo policlonal de conejo (2 µg/mL de anticuerpo).

Mci4F6+CBX+Pci

Sigmoidal dose-response (variable slope)

VIII.6 Cuantificación de crotoxina en el veneno individual de las tres subespecies de *Crotalus simus*

En la Figura 22 se encuentra representada la curva estándar que se diseñó para cuantificar crotoxina en el veneno de los individuos de *Crotalus simus*. Dicha curva se realizó empleando el AcM 4F6 y el anticuerpo policlonal de conejo anti-crotoxina (AcP) en un ensayo de ELISA tipo sándwich. Los venenos problema fueron cuantificados previamente por el método de BCA, para así, colocar en las placas de ELISA concentraciones conocidas del veneno total de cada individuo y posteriormente realizar diluciones seriadas 1:3 de los mismos. Los valores de absorbancia obtenidos fueron interpolados en la curva estándar de crotoxina y posteriormente procesados para obtener el porcentaje de concentración de la neurotoxina de cada veneno.

Best fit values	
BOTTOM	-0.02523
TOP	2.296
LOGEC50	-1.613
HILLSLOPE	0.9952
Std. Error	
BOTTOM	0.00000
TOP	0.04525
LOGEC50	0.03998
HILLSLOPE	0.07853
Sum of Squares	
BOTTOM	-0.1123 to 0.06187
TOP	0.05124 to 1
LOGEC50	-1.703 to -1.524
HILLSLOPE	0.9030 to 1.07
EC50	0.01981 to 0.02993
Degrees of Freedom	6
R ²	0.9983
Absolute Sum of Squares	0.01547
Stdev	0.05077

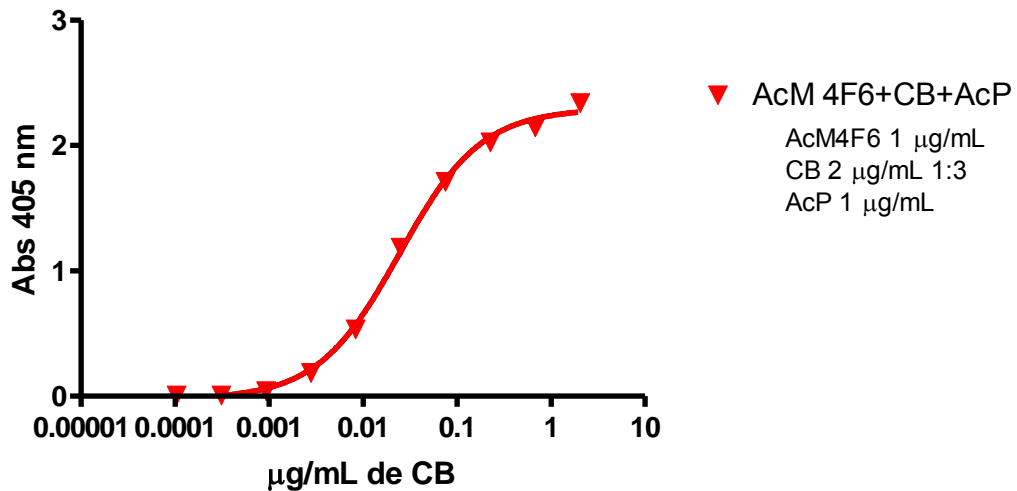


Figura 22. Curva estándar de cuantificación de crotoxina mediante ELISA tipo sándwich (CB=subunidad básica de la crotoxina). EC₅₀ = 0.024 µg/mL

Al igual que en el slot blot, en el ensayo de ELISA tampoco se encontró crotoxina en ninguno de los venenos de la subespecie *C. s. culminatus*.

En la Tabla 8, se encuentra el porcentaje de crotoxina promedio del veneno de los ejemplares de las tres subespecies de *C. simus*, de acuerdo a su distribución geográfica. El veneno de los individuos de *C. s. simus* distribuidos en el estado de Veracruz resultaron tener el mayor porcentaje de crotoxina (32.8%), seguidos por el único ejemplar de Oaxaca (14.5%), mientras que el veneno de los individuos distribuidos en Chiapas y Quintana Roo tuvieron los porcentajes de crotoxina más bajos (9.0%). El ejemplar HK225, resaltó por poseer el veneno con la mayor concentración de crotoxina (44.3%), semejante al porcentaje de crotoxina del veneno de *C. d. terrificus*, obtenido del mismo modo (44.8%). Por otro lado, no se reconoció crotoxina en el veneno de cuatro ejemplares de *C. s. tzabcan* (HK255, HK254, HK214 y HK253), de los cuales únicamente un individuo fue colectado en Quintana Roo, y el resto en Yucatán, como se mencionó anteriormente (Anexo 2).

Tabla 8. Porcentaje de crotoxina (rango y promedio) en el veneno de los ejemplares de las tres subespecies de *Crotalus simus* de acuerdo a su distribución geográfica.

Subespecie	Localidad	n	% de crotoxina promedio	% de crotoxina Rango
<i>C. s. simus</i>	Veracruz	6	32.8	21.6-44.3
	Oaxaca	1	14.5	14.5
	Chiapas	4	7.7	6.3-8.5
Total		11	22.0	6.3-44.3
<i>C. s. tzabcan</i>	Quintana Roo	7	4.6	0-7.7
	Yucatán	3	-	-
Total		10	3.2	0-7.7
<i>C. s. culminatus</i>	Morelos	8	-	-
	Guerrero	1	-	-
Total		9	-	-

En la Figura 23 se aprecia una gráfica de barras donde se agruparon los ejemplares de las tres subespecies de *C. simus*, de acuerdo a la concentración de crotoxina. Se observa que los venenos con mayor concentración de crotoxina tienen menores valores de DL₅₀, es decir, son más letales.

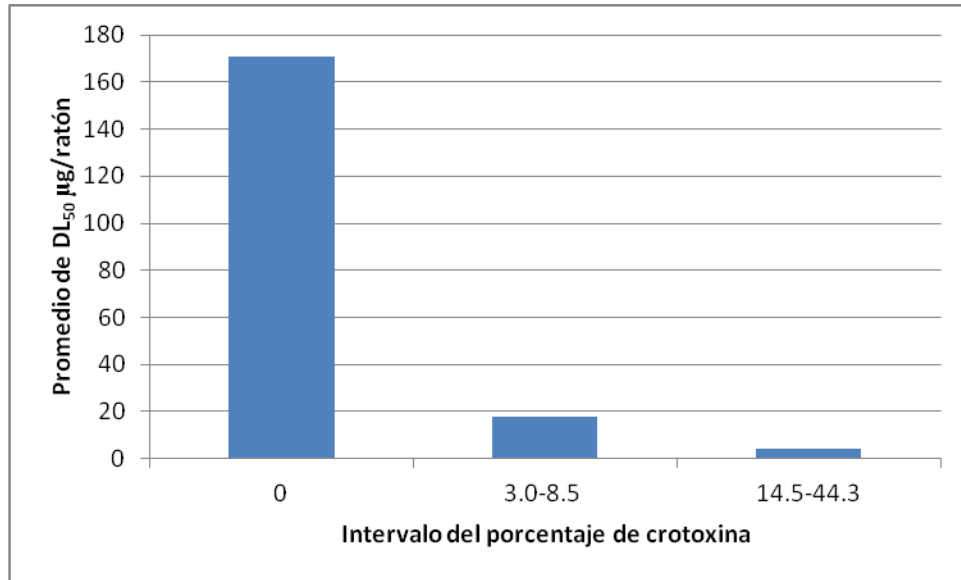


Figura 23. Gráfica de barras del intervalo del porcentaje de crotoxina de tres grupos (promedio de tres mediciones) y la dosis letal media (DL₅₀) del veneno de *C. s. simus*, *C. s. tzabcan* y *C. s. culminatus*.

IX. Discusión

IX.1 Purificación

La purificación se llevó a cabo a partir del veneno completo de la cascabel sudamericana *C. durissus terrificus*, debido a que la crotoxina constituye alrededor del 50% del total de su veneno (Calvete *et al.*, 2010). El uso de crotoxina purificada fue importante durante la inmunización para favorecer la producción de anticuerpos específicos hacia dicha proteína. La purificación consistió en una cromatografía de exclusión molecular utilizando una matriz de Sephadex G-75. El veneno de *Crotalus durissus terrificus* está compuesto principalmente por 4 proteínas: convulxina, giroxina, crotoxina y crotamina, las cuales tienen las siguientes masas moleculares: 73 kDa, 32 kDa, 24 kDa y 5 kDa, respectivamente. La masa molecular de crotoxina y giroxina difiere únicamente por 8 kDa, por lo que el veneno se puso en presencia de urea 6M, el cual es un agente caotrópico que logra desestabilizar la unión de las dos subunidades de la crotoxina sin influir en la estructura tridimensional de cada una de ellas, como lo demuestra la actividad de CB. El resultado de dicho proceso fue la obtención de cuatro fracciones, una de las cuales correspondió a la subunidad básica de la crotoxina.

IX.2 Reconocimiento de anticuerpos policlonales

El reconocimiento de los anticuerpos, previamente purificados, hacia el veneno de *C. durissus terrificus* (en condiciones reductoras) fue evaluado mediante Western blot, donde sólo hubo reconocimiento de la banda correspondiente a la subunidad básica de la crotoxina. Adicionalmente, se realizó un ensayo de ELISA para evaluar el reconocimiento de los anticuerpos hacia las proteínas nativas del veneno de *C. d. terrificus* y del veneno tipo A de *C. scutulatus scutulatus* como controles positivos, así como también, hacia el veneno tipo B de la serpiente antes mencionada, como control negativo. Se observó que los anticuerpos reconocieron a las fosfolipasas A₂ de ambos controles positivos, de manera muy parecida (solo 0.76 veces mayor el reconocimiento hacia el veneno de *C. durissus terrificus*), mientras que el reconocimiento hacia las fosfolipasas A₂ no

neurotóxicas del veneno de la población B de *C. scutulatus scutulatus* fue bajo (198 veces menos reconocimiento). La subunidad básica de la crotoxina tiene una identidad de secuencia de alrededor del 50% con respecto a fosfolipasas de tipo no neurotóxico (Aird *et al.*, 1986); dicha identidad, indica que existe la mitad de las probabilidades de obtener anticuerpos con reactividad cruzada entre las fosfolipasas neurotóxicas y no neurotóxicas. Sin embargo, se sabe que aunque una gran variedad de sitios antigénicos son presentados al sistema inmune del animal durante la inmunización, existen determinantes antigénicos que pueden estimular significativamente la producción de anticuerpos, algunos de los cuales pueden estar asociados con el sitio activo de cualquier toxina (Oshima-Francoa *et al.*, 1999). En torno a esto, se han realizado estudios de inhibición de la actividad PLA₂ del veneno de serpientes y de insectos. Con anticuerpos hacia fosfolipasas A₂ homólogas y heterólogas, se mostró una variedad de grados de reconocimiento e incluso, no hubo reactividad cruzada entre ciertas especies de la misma familia; dichas diferencias reflejan las variaciones en los sitios antigénicos de la enzima aún perteneciendo a la misma familia (Nair *et al.*, 1980). Además, Rael *et al.*, 1986 demostraron que los anticuerpos policlonales obtenidos contra fosfolipasas no neurotóxicas, no reconocieron la subunidad básica de la toxina Mojave, mostrando que, a pesar de la alta identidad de secuencias, las dos clases de fosfolipasas son diferentes antigénicamente.

IX.3 Obtención de anticuerpos monoclonales

Los ratones fueron inyectados con la fracción correspondiente a la subunidad B de la crotoxina (CB), la cual posee actividad enzimática y neurotóxica, y además, tiene una identidad de secuencia de 50% con fosfolipasas no neurotóxicas, menor a la que existe entre la subunidad ácida (CA) y las PLA₂ no neurotóxicas ($\geq 75\%$) (Aird *et al.*, 1990), disminuyendo así, la probabilidad de obtener anticuerpos monoclonales con reactividad cruzada hacia PLA₂ neurotóxicas.

Se lograron obtener dos AcM dirigidos hacia la neurotoxina en estudio. Se realizó un ensayo de ELISA tipo sándwich para determinar si ambos anticuerpos reconocían el mismo epítipo. Los resultados mostraron que, si bien no reconocían el mismo epítipo, éste podía

ser un sitio cercano. Existen determinantes antigénicos que pueden estimular significativamente la producción de anticuerpos (Oshima-Francoa *et al.*, 1999), razón por la cual, probablemente hay un sitio en la neurotoxina con mayor antigenicidad, pudiendo ser un blanco cercano de los dos anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales anti-crotoxina resultaron pertenecer a la clase IgG con cadena ligera Kappa, dicha cadena es la más común tanto en humanos como en ratones, presentándose en los ratones unas 10 veces más frecuentemente que las lambda (Abbas *et al.*, 2012).

IX.4 Reconocimiento de anticuerpos monoclonales

El reconocimiento de los dos anticuerpos monoclonales anti-crotoxina, fue evaluado mediante ensayos de ELISA indirecto. Los dos AcM anti-crotoxina tuvieron reactividad cruzada con la toxina Mojave, mientras que las fosfolipasas no neurotóxicas del veneno tipo B de *C. scutulatus scutulatus* no fueron reconocidas. El mismo fenómeno lo observaron Rael y colaboradores en 1986, al obtener un AcM dirigido hacia la subunidad básica de la crotoxina, el cual no tuvo reactividad cruzada con las fosfolipasas no neurotóxicas del propio veneno de donde se obtuvo, por lo que concluyen que a pesar de la alta identidad de secuencias entre las PLA₂ neuro y no neurotóxicas, probablemente la configuración tridimensional de la subunidad básica es diferente a las otras fosfolipasas. Cabe mencionar que el AcM del grupo de Rael *et al.*, 1986, reconoció mediante isoelectroenfoque a diversas isoformas de las dos subunidades de la crotoxina. En ese trabajo no se evaluó el reconocimiento hacia las diferentes isoformas que pueden existir en el veneno de *C. durissus terrificus* y *C. simus*, pero es altamente probable que ocurra dicho reconocimiento, puesto que ha sido demostrado que la identidad de secuencias entre las isoformas de la crotoxina de *C. durissus terrificus*, de *C. simus* (poblaciones de Costa Rica) y de la neurotoxina Mojave, es de entre 98 y 100%, lo cual sugiere que los epítopes estructurales son muy parecidos entre sí.

IX.5 Análisis cualitativo por slot blot

Debido a la amplia distribución geográfica y divergencia molecular entre las subespecies de *Crotalus simus*, esta especie constituye un importante caso para estudiar la variabilidad de la composición del veneno (Neri-Castro *et al.*, 2013).

En el presente trabajo, se realizó la detección de crotoxina en el veneno de *C. simus* en condiciones nativas, mediante la técnica de slot blot y usando el anticuerpo monoclonal obtenido. Se observó que no hubo reactividad cruzada con fosfolipasas no neurotóxicas del veneno tipo B de *C. scutulatus scutulatus*, y tampoco la hubo con proteínas de los venenos de la subespecie *C. s. culminatus*, coincidiendo con el resultado proteómico obtenido por Neri-Castro y colaboradores (2013). Adicionalmente, se pudo determinar que todos los individuos de *C. s. simus* y seis de diez ejemplares de la subespecie *C. s. tzabcan* tuvieron crotoxina en su veneno. Este ensayo no se realizó con el anticuerpo policlonal de conejo debido a que una desventaja en el uso de anticuerpos policlonales puede ser la reactividad cruzada (Atassi *et al.*, 1984) a causa de la variedad de epítopes que reconoce la mezcla de anticuerpos, y, en este caso, aunado a la alta identidad de secuencias entre las fosfolipasas neurotóxicas y no neurotóxicas.

Con los resultados antes mencionados, se sugiere que la detección de crotoxina en el veneno de serpientes de cascabel, mediante slot blot, en condiciones nativas de veneno y utilizando el AcM 4F6 anti-crotoxina, es un ensayo fácil, rápido, barato y confiable.

IX.6 Análisis cuantitativo

El propósito de la cuantificación de la proteína crotoxina en el veneno de las subespecies de *C. simus*, fue relacionar dicha cantidad, con respecto a la letalidad del veneno. Para ello, se trabajó con el veneno de los individuos adultos de *C. simus*, a partir de los cuales, Neri-Castro y colaboradores (2013) obtuvieron la DL₅₀ (vía intravenosa) de cada uno de

ellos, así como también, reportaron actividades biológicas, bioquímicas y el proteoma de mezclas (“pools”) de veneno de *C. s. simus* y *C. s. culminatus*.

La cuantificación de crotoxina se realizó empleando un ELISA tipo sándwich, utilizando como anticuerpo de captura al anticuerpo monoclonal 4F6, debido a su especificidad por la crotoxina, mientras que el anticuerpo de detección usado fue el anticuerpo policlonal de conejo anti-crotoxina.

Es importante mencionar, que hay reconocimiento del AcM 4F6 hacia la subunidad ácida de la crotoxina, por tal motivo, la cuantificación corresponde tanto a la subunidad básica como ácida de la neurotoxina. Como resultado de la cuantificación, se estableció que el veneno de los individuos de *C. s. simus* tuvieron las más altas concentraciones de crotoxina (6.3%-44.3%), seguidos por 6 ejemplares de *C. s. tzabcan* (3.0%-7.7%), mientras que el veneno de 4 individuos de *C. s. tzabcan*, así como los 9 ejemplares de *C. s. culminatus* evaluados, carecieron de la neurotoxina, lo cual concuerda con los resultados cualitativos obtenidos mediante Slot blot y con los perfiles cromatográficos obtenidos por Neri-Castro y colaboradores (2013).

Se realizó una gráfica de barras para evaluar de manera esquemática la relación entre la cantidad de crotoxina cuantificada y la DL_{50} del veneno de *C. simus*. Se observa que la concentración de crotoxina tiene impacto en la toxicidad del veneno completo de estas serpientes, puesto que los individuos que tienen valores bajos de DL_{50} (los más letales) tienen mayor concentración de crotoxina. De manera que podría ser posible establecer un valor de DL_{50} , por debajo del cual, sea posible suponer la presencia de crotoxina en el veneno de las serpientes de cascabel; según este trabajo, esa cantidad podría encontrarse entre 37.8 y 65 $\mu\text{g}/\text{ratón}$.

En el trabajo desarrollado por Calvete y colaboradores (2010), donde se hizo un análisis proteómico y biológico del veneno de las subespecies *C. s. simus* y *C. d. terrificus*, distribuidas en Centro y Sudamérica, respectivamente, se propuso que la concentración

de crotoxina en el veneno está directamente relacionada con la actividad letal, lo cual, en este trabajo se observa entre los ejemplares de la especie *C. simus* distribuida en México.

Es importante resaltar que el valor de DL_{50} del veneno de los ejemplares de *C. s. simus* es muy cercano uno con otro, incluso, en algunos casos se traslapa, mientras que el porcentaje de crotoxina obtenido fue muy diverso, como ejemplo se tiene al veneno de los ejemplares H225 y HK085, ambos con DL_{50} de 5 $\mu\text{g}/\text{ratón}$, los cuales tuvieron porcentajes de crotoxina muy diferentes entre sí, 44.3% y 7.6%, respectivamente. Existen diferentes razones por las cuales puede estar ocurriendo tal situación, una de ellas tiene que ver con la relación entre la cantidad de subunidad ácida (CA) y básica (CB) de la crotoxina; Canziani y colaboradores en 1983, encontraron que CA aumenta hasta diez veces la potencia letal de CB, y que a su vez, inhibe su actividad fosfolipasa. Por tanto, ha sido postulado que la toxicidad del veneno correlaciona con la concentración de CA, la cual aumenta la potencia neurotóxica de la PLA_2 (Calvete *et al.*, 2012) y que además, varía incluso de individuo a individuo. Otra de las posibles razones, son las isoformas que contiene cada uno de los venenos; dichas isoformas difieren ligeramente en su estructura molecular, así como también, en sus propiedades cromatográficas y movilidad electroforética. La composición aminoacídica de las isoformas, indica que difieren en un pequeño número de residuos de aminoácidos, típicamente de 4 a 8, y en algunos casos, estas diferencias resultan en modificaciones de las propiedades enzimáticas y farmacológicas de la toxina (Faure y Bon, 1988).

Actualmente, se han encontrado cuatro isoformas de cada una de las subunidades de la crotoxina del veneno de *C. durissus terrificus*. Faure *et al.*, 1991, reportan que la isoforma CBc se asocia con una alta afinidad a cualquier isoforma CA haciendo más tóxico al complejo crotoxina, mientras que el complejo menos estable es el obtenido por la asociación de cualquier isoforma de CA con la isoforma CBa2 (Faure *et al.*, 1994). Si bien, se desconocen las isoformas de CA y CB en el veneno de *C. simus*, una probable explicación de la variación en la toxicidad de los venenos puede ser la estabilidad de la interacción entre las subunidades de la neurotoxina.

Otro de los resultados obtenidos en el presente trabajo, es que la letalidad del veneno de las serpientes que no contienen crotoxina (*C. s. culminatus* y cuatro ejemplares de *C. s. tzabcan*), es de 26 a 100 veces menor con respecto a la DL_{50} de los individuos que si poseen dicha proteína. Anteriormente, ya se había reportado el mismo comportamiento en poblaciones de la serpiente *Crotalus scutulatus*, donde el veneno tipo B (que no contiene crotoxina) tiene una letalidad 20 veces menor en comparación al veneno tipo A (con Mojave toxina en su composición -Glenn *et al.*, 1983-). Las causas de este fenómeno nunca han sido explicadas, Durban *et al.*, 2013 y Daltry *et al.*, 1996, atribuyen las variaciones en la composición del veneno a adaptaciones locales, las cuales confirieren ventajas como la especialización en diferentes presas. Sin embargo, la información de la hábitos alimenticios de los adultos de las subespecies de *C. simus*, indica que tienen una dieta similar, basada en mamíferos.

Por otro lado, uno de los parámetros que afecta la toxicidad del veneno y causa resultados variables es la distribución geográfica de las serpientes (Salazar *et al.*, 2006). En torno a esto, se obtuvo que al Este de México, en el estado de Veracruz, se encuentran los ejemplares de *Crotalus simus* con mayor concentración de crotoxina; en el sureste del país, algunos ejemplares de *C. s. simus* y seis de diez individuos de *C. s. tzabcan* tuvieron baja concentración de crotoxina; mientras que al sur de México, en los estados de Morelos y Guerrero, la neurotoxina no fue hallada en ninguno de los ejemplares pertenecientes a *C. s. culminatus*, dicha subespecie tiene poblaciones en el estado de Oaxaca, donde se traslapa con la distribución de *C. s. simus*, debido a esto, es importante ampliar el muestreo de ambas subespecies, para así, determinar si existen poblaciones de *C. s. simus* sin crotoxina, así como ejemplares de *C. s. culminatus* con veneno neurotóxico. Este fenómeno, como ha sido anteriormente mencionado, se ha reportado en la subespecie *C. scutulatus scutulatus*, donde se encontró variación geográfica en la composición del veneno.

Hay dos posibles situaciones donde se puede observar la variación de veneno a causa de la distribución geográfica. La primera se da en poblaciones cercanas o simpátricas, como

es el caso mencionado de *C. scutulatus*, en donde hay dos poblaciones divergentes sin diferencias morfológicas significativas, pero que difieren en la presencia o ausencia de la toxina Mojave; hay evidencia de que poblaciones con el veneno tipo A y tipo B estaban históricamente aisladas, sin embargo, no hay una barrera física entre estas poblaciones, y de hecho, se ha descrito una población intermedia (Wilkinson *et al.*, 1991). La segunda forma de variación de veneno se ha visto en poblaciones aisladas: poblaciones pequeñas y aisladas, tienden a una producción homogénea del veneno, mientras que el aislamiento de poblaciones grandes, muestra conservación de muchos de sus componentes, pero también muestra variación en el espectro total del veneno en relación al tiempo de aislamiento (Chippaux *et al.*, 1991). El caso particular del complejo *C. simus* no ha sido estudiado. Sin embargo, se ha propuesto que en algún lugar en México se encuentra el centro de diversificación de las serpientes de cascabel, y que dicha diversidad, también reflejada en la composición y toxicidad del veneno, puede haber sido consecuencia de fluctuaciones fisiográficas y climáticas ocurridas en los últimos 50 millones de años (Flores-Villela, 1993; Wüster *et al.*, 2005). Adicionalmente, ha sido planteado que hay una tendencia a incrementar la concentración de crotoxina de norte a sur a través del continente Americano (Calvete *et al.*, 2010). No obstante, los resultados reportados en este trabajo al igual que los obtenidos a partir del proteoma de la serpiente norteamericana *Crotalus tigris* (Tabla 1) (Calvete *et al.*, 2012), muestran que existen venenos de serpientes de cascabel en Norteamérica cuyas composiciones poseen altas concentraciones de crotoxina, comparables con las de la cascabel sudamericana *C. durissus terrificus*.

Típicamente, la obtención del proteoma del veneno de serpientes, se realiza por medio de la técnica de MALDI-TOF SM, la cual, es una herramienta útil para conocer la composición de los venenos, pero dicho método tiene ciertas desventajas que pueden conducir a una estimación incorrecta de la cantidad de proteínas en el veneno. Algunas de las desventajas son las siguientes: baja reproducibilidad, baja resolución de masas para moléculas largas, pobre detección de moléculas pequeñas y la necesidad de fraccionar las muestras (Chen, 2008; Engwegen *et al.*, 2006), además, la estimación de la cantidad de las proteínas en el

veneno se lleva a cabo mediante la medición del área bajo la curva de las fracciones obtenidas por medio de HPLC, mientras que las proteínas que se encuentran en una misma fracción, son cuantificadas por densitometría, que si bien es un método aceptado, tiene algunas desventajas dependiendo del colorante que se utiliza (Medugorac, 1979). A diferencia de los métodos proteómicos, el uso de ELISA, es una técnica sensible y reproducible que en este trabajo, sirvió para detectar y cuantificar a la crotoxina en el veneno de la serpientes de cascabel *Crotalus simus*, lo cual permitirá seleccionar adecuadamente los venenos con los que se inmunizará a los animales para la producción de antiveneno. Así como también, se obtuvieron datos importantes acerca de la presencia/ausencia de crotoxina de acuerdo a la distribución geográfica de la especie.

X. Conclusiones

- Ningún anticuerpo monoclonal presentó reactividad cruzada con fosfolipasas no neurotóxicas, mientras que el anticuerpo policlonal tuvo baja reactividad cruzada (en condiciones nativas de veneno).
- El anticuerpo monoclonal 4F6 y el anticuerpo policlonal de conejo reconocen a ambas subunidades de crotoxina.
- Se detectó crotoxina en el veneno de los once ejemplares de *C. simus simus* y en seis de diez individuos de *C. simus tzabcan*, mientras que ningún ejemplar de *C. simus culminatus* tuvo dicha neurotoxina
- El veneno de los ejemplares distribuidos en el estado de Veracruz, correspondientes a *C. s. simus*, tuvieron altas concentraciones de crotoxina. Por otro lado, los ejemplares de *C. s. culminatus*, distribuidos en el estado de Morelos, no tuvieron crotoxina en su veneno mientras el veneno de *C. s. tzabcan* tuvo baja cantidad de la misma.
- Se encontró una relación inversa entre la dosis letal media y el porcentaje de crotoxina contenido en el veneno de las tres subespecies de *C. simus*.

XI. Perspectivas

Considerando los resultados obtenidos en este trabajo y haciendo uso del inmunoensayo enzimático descrito, se propone:

- Analizar el veneno de ejemplares de *C. s. culminatus* de los estados de Guerrero y Oaxaca, para aumentar el análisis geográfico de crotoxina en el veneno de *C. simus*.
- Realizar un análisis ontogénico con respecto a la cantidad de crotoxina en el veneno de la serpiente de cascabel *C. simus* en México.
- Evaluar la presencia de crotoxina en el veneno de otras especies de serpientes de cascabel.

XII. Referencias bibliográficas

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman y S. Pillai. 2012. *Inmunología Celular y Molecular*. Elsevier. España. Séptima edición. 546 pp.
- Aird, S. D., I. I. Kaiser, R. V. Lewis y W. G. Kruggel. 1986. A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 249(2): 296-300.
- Aird, S. D., J. R. Yates, P. A. Martino, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, I. I. Kaiser. 1990. The amino acid sequence of the acidic subunit B-chain of crotoxin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1040:217-224.
- Atassi, M. Z., C. J. Van-Oss, D. R. Absolom. 1984. *Molecular Immunology: A Textbook*. Macel Dekker. U.S.A. 728 pp.
- Barrio, A. y O. V. Brazil. 1954. Acción neuromuscular de los venenos de *Crotalus durissus terrificus*. *Revista del Instituto Malbran (Buenos Aires)*. 16(1): 22-40.
- Bober, M. A., J. L. Glenn, R. C. Straight y C. L. Owbnly. 1988. Detection of myotoxin a-like proteins in various snake venoms. *Toxicon*. 26: 665-673.
- Calvete, J. J., A. Pérez, B. Lomonte, E. E. Sánchez y L. Sanz. 2012. Snake venomomics of *Crotalus tigris*: the minimalist toxin arsenal of the deadliest Neartic rattlesnake venom: Evolutionary clues for generating a pan-specific antivenom against crotalid type II venoms. *Journal of Proteome Research*. 11(2): 1382-1390.
- Calvete, J. J., L. Sanz, P. Cid, P. de la Torre, M. Flores-Díaz, M. C. Dos Santos, A. Borges, A. Brems, Y. Angulo, B. Lomonte, A. Alape-Girón y J. M. Gutiérrez. 2010. Snake Venomomics of the Central American rattlesnake *Crotalus durissus* complex points to

- neurotoxicity as an adaptive pedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. *Journal of Proteome research*. 9:528-544.
- Campbell, J. A. 1998. The amphibians and reptiles of northern Guatemala, Yucatán and Belize. University of Oklahoma Press, Norman. 367 pp.
- Campbell, J. y W. W. Lamar. 2004. The venomous reptiles of the western hemisphere. Volumen 2. Comstock Publishing Associates. 870 pp.
- Canziani, G., C. Seki y C. Vidal. 1983. The mechanism of inhibition of phospholipase activity of crotoxin B by crotoxin A. *Toxicon*. 21(5): 663-674.
- Castellón-Huerta, B. 2001. Cúmulo de símbolos. La serpiente emplumada. *Arqueología Mexicana*. 53: 28-35.
- Chen, C. H. 2008. Review of a current role of mass spectrometry for proteome research. *Analytica Chimica Acta*. 624: 16-36.
- Chippaux, J. P., V. William y J. White. 1991. Snake Venom variability: Methods of study, results and interpretation. Review article. *Toxicon*. 29(11): 1279-1303.
- Choumet, V., G. Faure, A. Robbe-Vincent, B. Saliou, J. C. Mazié y C. Bon. 1991. Immunochemical analysis of a snake venom phospholipase A2 neurotoxin, crotoxin, with monoclonal antibodies. *Molecular Immunology*. 29(7-8):871-882.
- Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). 2009. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salud. 9° edición. México.
- Costa, L. A., H. Miles, C. E. Araujo, S. González y V. G. Villarrubia. 1998. Tumor regression

of advanced carcinomas following intra- and/or peri-tumoral inoculation with VRCTC-310 in humans: preliminary report of two cases. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 20:15-25.

Daltry, J. C., W. Wüster y R. S. Thorpe. 1996. Diet and snake venom evolution. *Nature*. 379(8): 537-540.

de Roodt, A. R., J. Estévez- Ramírez, J. F. Paniagua- Solís, S. Litwin, A. Carvajal- Saucedo, J. A. Dolab, L. E. Robles- Ortiz y A. Alagón. 2004. Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México. *Gaceta médica de México*. 141: 13-21.

Doley, R. y R. M. Kini. 2009. Protein complexes in snake venom. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 66:2851-2571.

Durban, J., L. Sanz, L. Gómez, F. Bonilla, S. Rodríguez, D. Chacón, M. Sasa, Y. Angulo, J. M. Gutiérrez y J. J. Calvete. 2013. Integrated “omics” profiling indicates that miRNAs are modulators of the ontogenetic venom composition shift in the Central American rattlesnake, *Crotalus simus simus*. *BMC Genomics*. 14:234.

Engwegen, Y. M. N., M. C. W. Gast, J. H. M. Schellens, y J. H. Beijnen. 2006. Clinical proteomics: searching for better tumour markers with SELDI-TOF mass spectrometry. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. 27(5):251-259.

Faure, G. y C. Bon. 1988. Crotoxin, a Phospholipase A₂ Neurotoxin from the South American Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: Purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. *Biochemistry*. 27:730-738.

Faure, G., H. Xu y F. A. Saul. 2011. Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric β -neurotoxin.

- Journal of Molecular Biology. 412: 176-191.
- Faure, G., J. L. Guillaume, L. Camoin y C. Bon. 1991. Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A₂ neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, results from posttranslational modifications. *Biochemistry*. 30: 8074-8083.
- Faure, G., V. Choumet, C. Bouchier, L. Camoin, J. L. Guillaume, B. Monegier, M. Vuilhorgne y C. Bon. 1994. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *European Journal of Biochemistry*. 223:161-164.
- García-Arellano, H. y R. Vázquez-Duhalt. 1998. Cuantificación de proteínas: una revisión. *Bio Tecnología*. 3: 77-88.
- Gavilondo-Cowley, J. V. 1995. Anticuerpos monoclonales. Elfos. La Habana. 180 p.
- Glenn, J. L., R. C. Straight, M. C. Wolfe y D. L. Hardy. 1983. Geographical variation in *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) venom properties. *Toxicon*. 21:119-130.
- Gómez, A., S. R. Reyes-Gómez, C. Teutli-Solano y R. Valadez-Azua. 2007. La medicina tradicional prehispánica, vertebrados terrestres y productos medicinales de tres mercados del valle de México. *Etnobiología*. 5:86-98.
- Gutiérrez, J. M. 2002. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Revista de Biología Tropical*. 50(2):337-394.
- Kaiser, I. I. y J. L. Middlebrook. 1988. Preparation of a crotoxin neutralizing monoclonal antibody. *Toxicon*. 26(9): 855-865.
- Kaiser, I. I. y S. D. Aird. 1987. A crotoxin homolog from the venom of the Uracoan

rattlesnake (*Crotalus vegrandis*). *Toxicon*. 25:1113-1120.

Kastin, A. J. 2006. *Handbook of Biologically Active Peptides*. Elsevier. U.S.A. p. 597.

King, D. J. 1998. *Applications and engineering of monoclonal antibodies*. Taylor and Francis group. Philadelphia, USA. 252 pp.

Mackessy, S. P. 2010. *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. CRC Press/ Taylor and Francis group. Florida, USA. 521 pp.

Mackessy, S. P., y L. M. Baxter. 2006. Bioweapons synthesis and storage: The venom gland of front-fanged snakes. *Zoologischer Anzeiger*. 245:147-59.

Medugorac, I. 1979. Quantitative determination of cardiac myosin subunits stained with fast green in SDS-electrophoresis gels. *Basic Research in Cardiology*. 74: 406-416.

Neri-Castro, E., B. Lomonte, M. C. Gutiérrez, A. Alagón y J. M. Gutiérrez. 2013. Intraspecies variation in the venom of the rattlesnake *Crotalus simus* from Mexico: Different expression of crotoxin results in highly variable toxicity in the venom of three subspecies. *Journal of Proteomics*. 87:103-121.

Oshima-Francoa, Y., S. Hyslopa, J. Prado-Franceschia, M. A. Cruz-Höflinb, L. Rodrigues-Simioni. 1999. Neutralizing capacity of antisera raised in horses and rabbits against *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and its main toxin, crotoxin. *Toxicon*. 37:1341-1357.

Paredes-García, D. M., A. Ramírez-Bautista y M. A. Martínez-Morales. 2011. Distribución y representatividad de las especies del género *Crotalus* en las áreas naturales protegidas de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 82: 689-700.

- Parkhouse, R. M. 1984. Immunopurification. *British Medical Bulletin*. 40(3): 297-301.
- Rael, E. D., R. J. Salo y H. Zepeda. 1986. Monoclonal antibodies to Mojave toxin and use for isolation of cross-reacting proteins in *Crotalus* venoms. *Toxicon*. 24 (7): 661-668.
- Rangel-Santos, A., E. C. Dos-Santos, M. Lopes-Ferreira, C. Lima, D. F. Cardoso e I. Mota. 2004. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* y *Crotalus durissus collineatus*. *Toxicon*. 43: 801-810.
- Reyna-Rojas, M. A. 2013. Conocimiento herpetológico en las comunidades de Barranca Honda y Ticumán, en la Reserva Estatal Sierra de Montenegro, Morelos, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. 97 pp.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE). 2010. Intoxicación por ponzoña de animales. *Boletín epidemiológico*. 38(27):1-27.
- Siria-Hernández, C. y Arellano-Bravo, A. 2009. Cartas al editor. Mordeduras por serpiente venenosa: panorama epidemiológico en México. *Salud pública de México*. 51(2):95-96.
- Straight, R. C. y J. Glenn. 1989. Isolation and characterization of basic phospholipase (PLA2) and acidic subunits of canebrake toxin from *Crotalus horridus atricaudatus* venom using HPLC. *Toxicon*. 27(1):80.
- Vellard, J. 1937. Variations géographiques des venin du serpent à sonnettes sudméricain, *Crotalus terrificus*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. 204:1679.
- Wilkinson, D.E., J. L. Glenn, R. G. Straight y J. W. Sites Jr. 1991. Distribution and genetic

variation in venom A and B populations of Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) in Arizona. *Herpetologica*. 47(1): 54-68.

Zola, H. 1987. Monoclonal antibodies: a manual of techniques. CRC Press Inc. U.S.A. 87 pp.

XIII. Anexos

Anexo 1. Sitios de colecta de los ejemplares de *Crotalus simus* ordeñados

Ejemplar	Estado	Localidad	Latitud	Longitud
HK270	Veracruz	Actopan	19°30'11"	96°36'08.87"
HK268	Veracruz	Actopan	19°30'42"	96°36'34.02"
HK267	Veracruz	Puente Nacional	19°21'14.37"	96°34'30.52"
HK226	Veracruz	La Tinaja	18°56'45.44"	96°19'51.51"
HK225	Veracruz	Tinajas	19°10'18.10"	96°07'23.23"
HK224	Veracruz	Playas del Conchal	19°10'14.62"	96°07'18.26"
HK085	Chiapas	Chiapa de Corzo	16°33'02.64"	93°00'49.58"
HK084	Chiapas	Chiapa de Corzo	16°35'26.90"	93°00'16.90"
HK066	Chiapas	Chiapa de Corzo	16°39'06.72"	93°00'52.27"
HK065	Chiapas	Copainalá	17°04'52.09"	93°12'22.66"
HK176	Oaxaca	Oaxaca	16°37'37.35"	94°44'16.41"
HK204	Morelos	Tlaltizapán	18°41'22.37"	99°07'01.94"
HK203	Morelos	Tlaltizapán	18°41'23.26"	99°07'01.32"
HK169	Morelos	Tepalcingo	18°35'19.99"	98°50'24.28"
HK168	Morelos	Tepalcingo	18°35'14.87"	98°50'24.28"
HK150	Morelos	Puente de Ixtla	18°37'10.09"	99°19'08.41"
HK133	Morelos	Alpuyeca	18°44'19.75"	99°15'52.74"
Csim2A	Morelos	Villa de Ayala	18°42'28.24"	98°59'25.17"
Csim2B	Morelos	Villa de Ayala	18°42'21.21"	98°59'00.66"
HK205	Guerrero	Chilpancingo	17°19'47.13"	100°33'15.72"
HK218	Quintana Roo	Chetumal	18°43'56.37"	88°16'36.59"
HK217	Quintana Roo	Chetumal	18°39'34.18"	88°18'00.62"
HK216	Quintana Roo	Chetumal	18°39'12.66"	88°19'12.13"
HK214	Quintana Roo	Solidaridad	20°34'05.19"	87°20'52.30"
HK212	Quintana Roo	Solidaridad	20°45'10.47"	87°28'58.32"
HK211	Quintana Roo	Solidaridad	20°42'50.55"	87°21'06.60"
HK207	Quintana Roo	Solidaridad	20°35'42.57"	87°26'09.86"
HK255	Yucatán	Mérida	20°58'45.59"	89°37'39.36"
HK254	Yucatán	Mérida	21°04'46.47"	89°30'58.21"
HK253	Yucatán	Mérida	20°58'23.10"	89°38'00.46"

Anexo 2a. Dosis letal media ($\mu\text{g}/\text{ratón}$) y porcentaje de crotoxina de los venenos correspondientes a *Crotalus simus simus*, \pm intervalos de confianza al 95%

Ejemplar	Localidad	DL ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ratón}$)	% Crotoxina
HK226	La Tinaja, Veracruz	3.4 \pm 0.6	38.5 \pm 0.7
HK270	Actopan, Veracruz	3.8 \pm 0.3	21.6 \pm 0.73
HK267	Puente Nacional, Veracruz	3.9 \pm 0.04	26.3 \pm 0.88
HK176	Santo Domingo, Oaxaca	4.0 \pm 0.002	14.5 \pm 0.4
HK268	Actopan, Veracruz	4.9 \pm 0.01	26.2 \pm 0.4
HK225	Tinajas, Veracruz	5.0 \pm 0.05	44.3 \pm 0.24
HK085	Chiapa de Corzo, Chiapas	5.0 \pm 0.8	7.6 \pm 0.5
HK084	Chiapa de Corzo, Chiapas	5.7 \pm 0.3	6.3 \pm 0.42
HK065	Copainalá, Chiapas	5.9 \pm 0.03	8.4 \pm 0.8
HK224	Playas del Conchal, Veracruz	6.0 \pm 0.003	39.7 \pm 0.8
HK066	Chiapa de Corzo, Chiapas	12.3 \pm 0.6	8.5 \pm 0.4

Anexo 2b. Dosis letal media ($\mu\text{g}/\text{ratón}$) y porcentaje de crotoxina de los venenos correspondientes a *Crotalus simus tzabcan*, \pm intervalos de confianza al 95%

Ejemplar	Localidad	DL ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ratón}$)	% Crotoxina
HK212	Solidaridad, Quintana Roo	15.3 \pm 1.8	7.7 \pm 0.45
HK218	Chetumal, Quintana Roo	17.3 \pm 0.3	4.4 \pm 0.34
HK217	Chetumal, Quintana Roo	20.5 \pm 2.2	3.0 \pm 0.16
HK211	Solidaridad, Quintana Roo	22.6 \pm 2.1	4.6 \pm 0.74
HK216	Chetumal, Quintana Roo	34.0 \pm 1.4	5.0 \pm 0.43
HK207	Solidaridad, Quintana Roo	37.8 \pm 2.8	7.3 \pm 0.45
HK255	Mérida, Yucatán	89.3 \pm 5.3	0
HK254	Mérida, Yucatán	137.0 \pm 25	0
HK214	Solidaridad, Quintana Roo	150.2 \pm 7.8	0
HK253	Mérida, Yucatán	155.9 \pm 3.9	0

Anexo 2c. Dosis letal media ($\mu\text{g}/\text{ratón}$) y porcentaje de crotoxina de los venenos correspondientes a *Crotalus simus culminatus*, \pm intervalos de confianza al 95%

Ejemplar	Localidad	DL ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ratón}$)	% Crotoxina
HK150	Puente de Ixtla, Morelos	65 \pm 1.0	0
HK205	Chilpancingo, Guerrero	66.5 \pm 2.3	0
HK168	Tepalcingo, Morelos	151.3 \pm 3.3	0
HK133	Alpuyeca, Morelos	162.4 \pm 2.4	0
HK204	Tlaltizapán, Morelos	177.4 \pm 4.4	0
HK169	Tepalcingo, Morelos	187.4 \pm 3.4	0
Csim2A	Villa de Ayala, Morelos	285.7 \pm 14.7	0
HK203	Tlaltizapán, Morelos	294.6 \pm 8.6	0
Csim2B	Villa de Ayala, Morelos	303.3 \pm 24.3	0

Anexo 3. Soluciones**OPI 100X**

0.15 g de oxaloacetato, 0.05 g de ácido pirúvico y 200 UI de Insulina en 10 mL de agua destilada.

Glutamina 100X

200 mM de L-glutamina en 10 mL de agua destilada.

Medio de cultivo DMEM

Disolver el contenido de un sobre de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) en un litro de agua destilada estéril, adicionar 3.7 g de bicarbonato de sodio, ajustar pH a 7.0 burbujeando CO₂.

Medio de cultivo completo A

889 mL de DMEM, 100 mL de suero fetal bovino, 10 mL de Glutamina 100X un 1 mL de antibiótico 1000X.

Medio de cultivo completo B

779 mL DMEM, 200 mL suero fetal bovino, 10 mL OPI 100X, 10 mL Glutamina 100X y 1 mL antibiótico 1000X.

Medio de cultivo HAT

77 mL DMEM, 20 mL suero fetal bovino, 1 mL OPI 100X, 1 mL Glutamina 100X, 1 mL HAT (100X Gibco) y 100 µL de antibiótico 1000X.