



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

EVALUACIÓN DEL NIVEL DE RECONOCIMIENTO Y POTENCIA  
NEUTRALIZANTE DEL SUERO DE CONEJOS HIPERINMUNIZADOS  
CON EL VENENO DE *Crotalus simus*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:

JOSÉ ROBERTO PONCE LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS:

M. en B. EDGAR ENRIQUE NERI CASTRO  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México, febrero del 2018



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.



*Fotografía: Roberto Ponce*

*Coatepantli con significado en náhuatl "Muro de serpientes" en Tula Hidalgo, México.*

*Estas figuras esculpidas en las lápidas del muro Coatenpatli muestran víboras de cascabel devorando esqueletos humanos, personificando sacrificios humanos.*

**El presente trabajo de grado (Licenciatura) fue realizado en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano, que pertenece al departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría directa del candidato a Doctor Edgar Enrique Neri Castro. Agradecemos el apoyo económico otorgado para efectuar este proyecto y la escritura de esta tesis mediante los programas:**

**-DGAPA-PAPIIT IN205214. “Identificación, análisis molecular y expresión heteróloga de neurotoxinas provenientes de elápidos y vipéridos para la generación de antivenenos de alta calidad”.**

**-CONACYT CB-2013-221343. “CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE VENENOS DE *Agkistrodon*, ASI COMO LA RESPUESTA INMUNE EN CABALLOS A LOS MISMOS”.**

**-DGAPA-PAPIIT IN207218. “Investigación de venenos de serpientes para el mejoramiento de antivenenos”.**

**-Ebola P-364. Por concepto de beca de tesis de Licenciatura.**



## Agradecimientos

En esta sección quiero agradecer a una gran cantidad de personas que estuvieron conmigo durante la realización de esta tesis.

En primera instancia, al Dr. Alejandro Alagón Cano quien desde el primer día que pisé su laboratorio (9 de diciembre del 2016), y aún temeroso de los enfrentamientos económicos que me avecinaban, me dijo “tú entra al laboratorio, yo te apoyo”. Así, con mucho respeto, admiración y cariño le quiero agradecer por la ayuda académica y personal recibida, desde el inicio, hasta la finalización de esta tesis.

Al candidato a Doctor Edgar Enrique Neri Castro por haber contestado aquel correo donde describía mi entusiasmo por entrar al laboratorio, e hizo todo lo posible por facilitarme el ingreso, a tal grado que se convirtió en mi tutor y amigo. Además, agradezco que aún cuando tenía otras responsabilidades, siempre estuvo al tanto de mi progreso académico y personal, cuestiones que valoro en demasía.

Con amor a mi madre Mary Carmen Irlanda López Molina y a mis hermanos: Kevin, Víctor y Ángel, por ser mi inspiración en todo momento, a pesar de las adversidades, y por el apoyo incondicional que he recibido por parte de ustedes.

A mis sinodales: M. en C. Felipe Correa Sánchez y M. en C. Beatriz Rubio Morales, por todas las sugerencias y opiniones para el mejoramiento de este proyecto, así como por haberme aceptado en mi inducción a la herpetología. De igual manera, al sínodo M. en C. María Teresa Ortiz Melo, por sus valiosas observaciones en esta tesis y por haber sido mi mentora en Biomoléculas durante la licenciatura. Además, también sínodo de esta tesis, agradezco al Dr. José Rafael Jiménez Flores por las discusiones fructuosas sobre el presente trabajo que se tradujeron en un enriquecimiento importante para el mismo.

A la candidata a Doctora Melisa Bernard Valle por los consejos académicos y experiencias de convivencia.

Al M. en C. Alejandro Olvera Rodríguez por todas las discusiones y aclaraciones sobre los procesos metodológicos de este trabajo, y por todos los consejos académicos y personales compartidos a mi persona.

Al M. en C. Antonio Heriberto Maruri García por la autorización de ordeña de ejemplares de *C. simus* en el herpetario de la Facultad de Biología de la Universidad Veracruzana campus Xalapa. Asimismo, al Biól. Luis Alberto López Castro por su consentimiento en la ordeña de ejemplares de vipéridos de su colección. Al Biól. Felipe Agustín Lara Hernández por la atención brindada en la ordeña de ejemplares que forman parte de su colección “Palancoatl” con registro SEMARNART-PIMVS-CR-IN-0013. A la UMA

---

<sup>1</sup> Imágenes tomadas de: Jordan, K. (2013). Serpents, Skeletons, and Ancestors?: The Tula Coatepantli Revisited. *Ancient Mesoamerica*, 24(2), 243-274.

Desarrollo Comunitario y Vida Silvestre Tequecholapa (SEMARNAT-UMA-EX0170-VER/12) y UMA Estación ambiental Tequecholapa (SEMARNAT-UMA-IN-CR-0165-VER/13) del Biól. Roberto Mora Gallardo, por su amable contribución en la colecta de venenos de vipéridos mexicanos, incluyendo *C. simus*, veneno que fue clave y fundamental en la realización de esta investigación.

Al candidato a Doctor Juan Miguel Borja Jiménez por la convivencia de trabajo y conocimientos compartidos, además de los venenos de *C. basiliscus* donados para este trabajo.

Al Dr. Gerardo Corzo Burguete por permitirme convivir, aprender de usted y de su equipo de trabajo.

A la Dra. Hilda Vázquez López por el apoyo y consejos académicos brindados.

A la M. en C. Herlinda Catalina Clement por la atención recibida en el laboratorio.

A la M.V.Z. María Elena Elizabeth Mata y M.V.Z. Graciela Margarita Cabeza, por la amable y valiosa atención recibida con el uso de animales del bioterio del IBt de la UNAM.

A mis amigos del laboratorio: Edgar Neri, Melisa Bernard, Manuel Yáñez, Luis Román, Belem García, Mariel Valdés, Luis Ángel, Óscar Germán, Irene Castillo, Fernando Losoya, Óscar Pérez, Mitzi Guadalupe, Óscar Aguayo, Irving Archundia, Nicolás Elizalde, Jesús Ángel, Germán Obed, Alondra Gabriela, Raúl Sánchez y Félix Leonardo, por la confianza brindada y todas las experiencias de convivencia dentro y fuera del laboratorio.

A la secretaria del laboratorio Angélica Linares Labastida por su apoyo desinteresado y amable.

A los técnicos del laboratorio: Biól. Felipe Olvera Rodríguez y al M. en C. Alejandro Olvera Rodríguez, así como al auxiliar de laboratorio Ricardo Mondragón Cortés, por sus valiosas asesorías técnicas a lo largo de este proyecto.

A la Sra. Manuela Ávila por su gran aportación al laboratorio, porque su trabajo se ve reflejado en los logros de este espacio.

A la Dra. Georgina Ponce Romero por invitarme a dar diferentes charlas sobre animales venenosos a niños de educación primaria y secundaria. No cabe duda que la divulgación científica fue de las cosas que más disfruté en el IBt, y más cuando los niños aprendían algo nuevo de mi parte, pero era aún mejor lo que yo aprendía de ellos.

A Estefanía de Allende por ser mi mejor compañía en esta aventura llamada: "haciendo la tesis en el IBt".

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (la FESI) por ser mi casa y mi nido académico, para que tuviera una ideal formación y me diera herramientas para ser una mejor persona, así como un buen biólogo.

A la M. en C. Julieta Orozco Martínez por la orientación de trámites en la FES Iztacala durante mi estancia en el IBt.

A la M. en C. Gabriela Sánchez Fábila por el apoyo moral y académico durante mi estancia en el IBt.

A mis amigos de la FES Iztacala: Octavio Solís, Isaac Chiu, Luis Pacheco, Manuel Romero, Brenda Yáñez, Mauricio Hernández, Diana Labastida y Bruno Nájera, quienes, con su simpatía y buen sentido del humor, me acompañaron en las asignaturas cursadas en la facultad.

A la Universidad Autónoma de México por ponerme la piel chinita con una “Goya” desde que tengo el honor de ser puma cuando cursé el bachillerato.

En general, a la UNAM, a la FES Iztacala, al laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano y al instituto de Biotecnología, por abrirme sus puertas para la realización del presente trabajo de grado, el servicio social y mi primera contribución a una publicación de investigación científica (ver página 72).

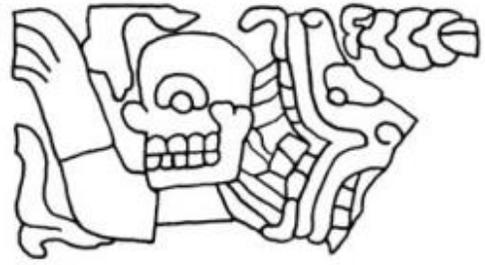


2

*Guerrero Serpiente de Tzompantli, Chichén Itzá, Yucatán, México.*

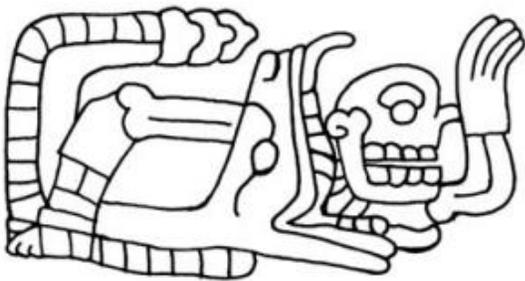
---

<sup>2</sup> *Ibidem*



3

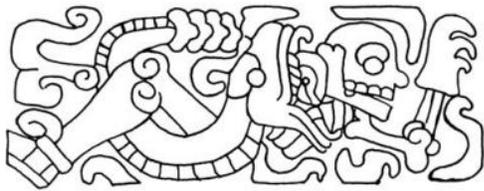
***In memoriam* de Roberto Ponce Santillán, quien fuera mi padre.**



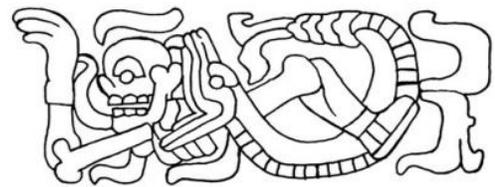
“And, in the end  
The love you take  
Is equal to the love you make”  
The Beatles

---

<sup>3</sup> *Ibidem.*



## Índice



4

1. <b>Resumen</b> .....	3
2. <b>Introducción</b> .....	4
2.1 Riqueza de serpientes en México .....	4
2.2 Víboras de cascabel.....	5
2.3 <i>Crotalus simus</i> .....	6
2.4 Componentes de venenos de serpientes .....	7
2.5 Accidente ofídico .....	12
1.6 Antivenenos.....	13
3. <b>Antecedentes</b> .....	17
4. <b>Justificación</b> .....	22
5. <b>Hipótesis</b> .....	22
6. <b>Objetivo general</b> .....	22
7. <b>Objetivos particulares</b> .....	22
8. <b>Estrategia experimental</b> .....	23
9. <b>Materiales y métodos</b> .....	24
9.1 Animales de laboratorio.....	24
9.2 Obtención de venenos .....	24
9.3 Cuantificación proteica de venenos.....	25
9.4 Geles SDS-PAGE de venenos.....	25
9.5 Hiperinmunización de conejos y obtención de suero .....	26
9.6 Purificación de proteínas del veneno de <i>C. simus</i> .....	27
9.7 Purificación de familias proteicas del veneno de <i>C. simus</i> por RP-HPLC .....	27
9.8 Determinación de reconocimiento mediante ELISA .....	28
9.9 Purificación de Ig por el método de ácido caprílico .....	29
9.10 Preparación de columna de afinidad con veneno de <i>C. simus</i> .....	30
9.11 Determinación de Ig anti- <i>C. simus</i> por cromatografía de afinidad.....	30

---

<sup>4</sup> *Ibidem*.

9.12 Reconocimiento por Western-blot de Ig anti- <i>C. simus</i> hacia venenos .....	31
9.13 Reconocimiento por Western-blot de Ig anti-crotoxina hacia crotamina.....	31
9.14 Reconocimiento por ELISA de Ig anti-crotoxina hacia crotamina.....	32
9.15 Determinación de Dosis letal media (DL <sub>50</sub> ) de venenos .....	32
9.16 Determinación de potencia neutralizante (DE <sub>50</sub> ) del suero de conejos .....	33
9.17 Ensayo rescate tras envenenamiento experimental por <i>C. simus</i> .....	33
9.18 Análisis de estadístico .....	34
<b>10. Resultados</b> .....	<b>35</b>
10.1 Perfiles electroforéticos SDS-PAGE de venenos estudiados.....	35
10.2 Cromatografía de exclusión molecular del veneno de <i>C. simus</i> .....	36
10.3 Obtención de familias proteicas del veneno de <i>C. simus</i> por RP-HPLC .....	37
10.4 Evolución de títulos de reconocimiento de sueros de los tres conejos hacia el veneno de <i>C. simus</i> .....	38
10.5 Purificación de anticuerpos específicos hacia el veneno de <i>C. simus</i> .....	39
10.6 Western-blot del veneno homólogo y heterólogos .....	41
10.7 Western-blot de crotamina por medio de Ig anti-crotoxina .....	42
10.8 Reconocimiento y pruebas de neutralización hacia crotoxina y crotamina .....	43
10.9 Reconocimiento y neutralización del pool de suero hacia el veneno homólogo y venenos heterólogos .....	44
10.10 Ensayo rescate tras envenenamiento experimental por <i>C. simus</i> .....	46
<b>11. Discusión</b> .....	<b>47</b>
11.1 Perfiles electroforéticos de venenos.....	47
11.2 Evolución de títulos de reconocimiento hacia el veneno completo de <i>C. simus</i> .....	48
11.3 Evolución de títulos de reconocimiento hacia familias proteicas de <i>C. simus</i> ....	49
11.3 Purificación de anticuerpos hacia el veneno de <i>C. simus</i> .....	50
11.4 Reconocimiento conformacional y lineal cruzado hacia venenos heterólogos ...	51
11.5 Reconocimiento conformacional y lineal cruzado hacia crotamina .....	52
11.6 Potencia neutralizante del suero hacia venenos .....	54
11.7 Ensayo rescate tras envenenamiento experimental por <i>C. simus</i> .....	56
<b>12. Conclusiones</b> .....	<b>58</b>
<b>13. Perspectivas</b> .....	<b>59</b>
<b>14. Literatura citada</b> .....	<b>60</b>
<b>15. Anexos</b> .....	<b>67</b>

## 1. Resumen

Los casos de mordedura de serpiente u ofidismo en México representan una importante tasa de mortalidad dada la relevante riqueza y distribución de serpientes de la familia Viperidae en este país, como aquellas del género *Crotalus* conocidas como víboras de cascabel. Por otro lado, el tratamiento para un envenenamiento de esta magnitud consiste en la aplicación de un antiveneno. Así, el veneno de *C. simus* ha sido empleado como inmunógeno para la generación de antivenenos en Centroamérica. Sin embargo, resulta importante evaluar las propiedades inmunogénicas del veneno completo de esta víbora de cascabel y las tres familias proteicas más importantes que lo conforman, así como, la evaluación del empleo de este inmunógeno para la generación de anticuerpos neutralizantes del veneno de la misma especie (homólogo) y de otras especies del mismo género (heterólogos). De este modo, el objetivo del presente estudio fue evaluar el nivel de reconocimiento y potencia neutralizante de sueros de conejos hiperinmunizados con el veneno de *C. simus*. La estrategia experimental consistió en la inmunización de tres conejos con dosis crecientes del veneno completo de *C. simus* empleando adyuvante incompleto de Freund e hidróxido de aluminio de manera alterna durante el esquema de inmunización. Seguidamente, las metaloproteasas, serinoproteasas y crotoxina fueron aisladas del veneno de *C. simus* por cromatografía de exclusión molecular seguida de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) para realizar ensayos de ELISA y medir el reconocimiento de muestras de sueros de los tres conejos hacia el inmunógeno completo y estas tres familias proteicas. Además, se determinó la potencia neutralizante de la mezcla del suero de los tres conejos contra la letalidad del veneno de las especies neurotóxicas: *C. simus*, *C. scutulatus salvini*, *C. basiliscus* y *C. durissus terrificus* y una no neurotóxica: *C. tzabcan*. Los resultados indican que el veneno completo de *C. simus* genera altos títulos de reconocimiento en los tres conejos hiperinmunizados con este veneno. Por otro lado, las metaloproteasas generan altos títulos de reconocimiento a comparación de las serinoproteasas y la crotoxina. Asimismo, existió reconocimiento y neutralización de las especies neurotóxicas evaluadas, a excepción del veneno no neurotóxico (*C. tzabcan*) el cual fue reconocido, pero no fue neutralizado.

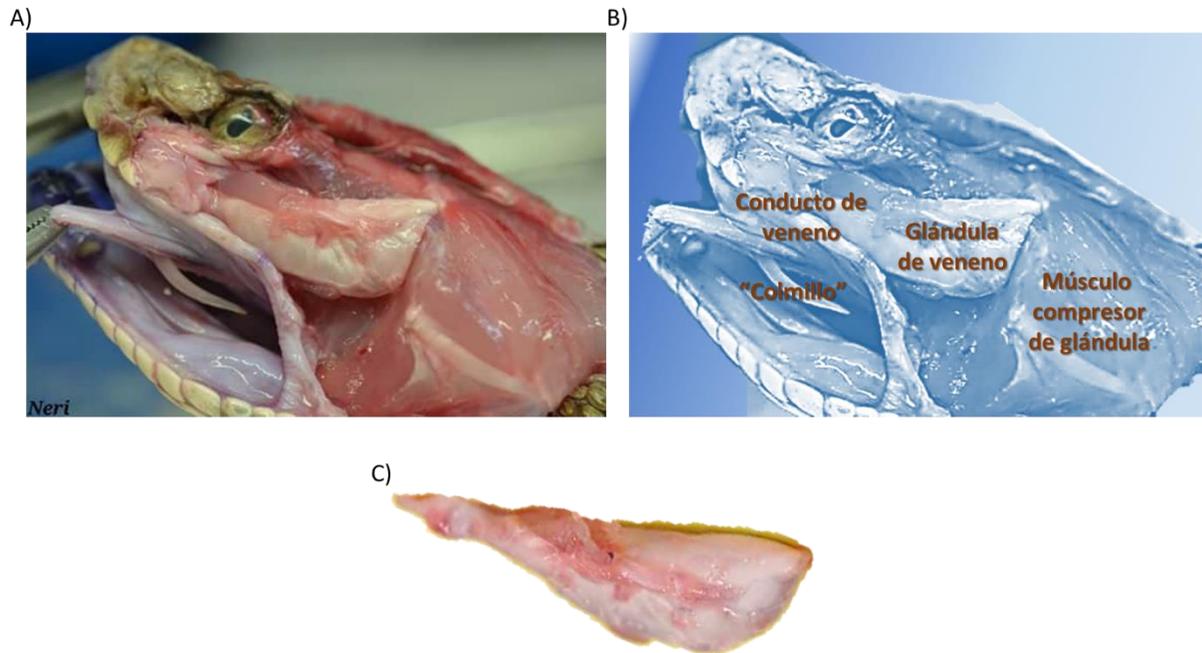
## 2. Introducción

### 2.1 Riqueza de serpientes en México

México ha sido catalogado como uno de los países megadiversos más importantes en el mundo (Mittermeier y Goettsch, 1992). Por ejemplo, en el caso de los reptiles, cuenta con el 9% del total de especies a nivel mundial (10,450), siendo más del 50% endémicas, además ocupa el segundo lugar de los países con mayor número de especies de estos vertebrados (Uetz *et al.*, 2017). Así, un grupo bien representado de reptiles en nuestro país lo comprenden las serpientes, reportándose un total de 393 especies, perteneciendo el 4.6%, 15.3% y 33.8% a las familias Elapidae, Viperidae (subfamilia: Crotalinae) y Colubridae, respectivamente (Flores-Villela y García-Vázquez, 2014).

Por otro lado, México presenta 10 de los 23 géneros de vipéridos de la subfamilia Crotalinae distribuidos en el mundo, mientras que, en número de especies, presenta cerca del 28% de las 216 especies distribuidas a nivel mundial (Uetz *et al.*, 2017).

Los vipéridos son un grupo de serpientes venenosas con dentición solenoglifa. Este tipo de dentición se caracteriza por la presencia de dos “colmillos” en el hueso maxilar superior, estos dientes tienen movimientos independientes, son retráctiles para erectarlos al momento de morder y plegarlos hacia el paladar superior al cerrar la boca. Además, los miembros de esta familia, tienen cuerpos robustos y cabeza triangular debido a la presencia de glándulas del veneno de cada lado cefálico lateral superior (Figura 1). La subfamilia Crotalinae se caracteriza por presentar dos fosetas termoreceptoras por debajo de las narinas (Caldwell y Vitt, 2014). Dentro de este grupo se encuentran las víboras responsables de generar más del 90% de envenenamientos en el continente americano como lo son las nauyacacas (*Bothrops sp.*) y las víboras de cascabel (*Crotalus sp.* y *Sistrurus sp.*) (de Roodt *et al.* 2005).



**Figura 1. Aparato venenoso de una serpiente de la familia Viperidae.** A) Disección de un ejemplar del género *Crotalus*. B) Diagrama con anotaciones de la disección. C) Glándula del veneno aislada. (Fotografías: Edgar Neri).

## 2.2 Víboras de cascabel

Las víboras de cascabel son endémicas del continente americano y pertenecen a los géneros *Crotalus* (del griego κρόταλον krotalón que significa cascabel) y *Sistrurus* (del griego Σείστρουρος, *Seistrouros* que significa cola de cascabel). Con base en la evidente presencia de un cúmulo de escamas queratinizadas en la región terminal posterior, mejor conocido como cascabel (a excepción de *C. catalinensis*) (Figura 2), se ha sugerido que ambos géneros están filogenéticamente relacionados, formando un grupo monofilético cuya radiación temprana ocurrió en las regiones montañosas de México hace cerca de 9 millones de años, de donde también se ha propuesto que apareció el ancestro común de todas las víboras de cascabel (Campbell y Lamar, 2004; Parmley y Holman, 2007).

Un total de 45 especies de serpientes del género *Crotalus* se distribuyen en el continente americano mientras que sólo se distribuyen tres especies de *Sistrurus*. En México se distribuyen 40 especies del género *Crotalus* y una especie del género *Sistrurus* (*S. tergeminus*) (Uetz et al., 2017).



**Figura 2.** Carácter morfológico de la mayoría de especies del género *Crotalus*. (Fotografía: E. Neri).

### **2.3 *Crotalus simus***

*Crotalus simus* (Latreille, 1801) también es conocida como víbora de cascabel centroamericana o neotropical y se caracteriza por un achatamiento en la región cefálica anterior que le confiere su nombre “*simus*”, que en latín significa “nariz plana” o “chata”, además de ser una serpiente que llega a alcanzar los 2 m de longitud (Figura 3).

Actualmente, *C. simus* es considerada como una especie. Sin embargo, puede ser encontrada con sinonimias como *C. durissus* (Campbell y Lamar, 1989) y como subespecie, junto con *C. s. culminatus* y *C. s. tzabcan* (Campbell y Lamar, 2004). En el presente trabajo, se consideró a *C. simus* como especie dada la investigación hecha por Wüster *et al.* (2005) y la revisión de Quijada-Mascareñas y Wüster (2006).

En cuanto a su dieta, Pérez-Higareda *et al.* (2007) mencionan que estos organismos se alimentan principalmente de roedores como ratas, ratones y ardillas. Sin embargo, no existen investigaciones detalladas sobre la dieta del complejo *C. simus*. Esta serpiente se distribuye en zonas secas y subhúmedas desde los estados de Veracruz, Chiapas, Tabasco y el sureste de Oaxaca, en México, hasta Costa Rica pasando por Guatemala, el Salvador, Honduras y Nicaragua. Asimismo, en nuestro país, esta víbora de cascabel

se distribuye en altitudes no mayores a 1,000 m, aunque se tiene registro de poblaciones entre los 1,500-2,200 m, mientras que en los demás países se distribuye en altitudes mayores a 1,000 m (Campbell y Lamar, 2004).

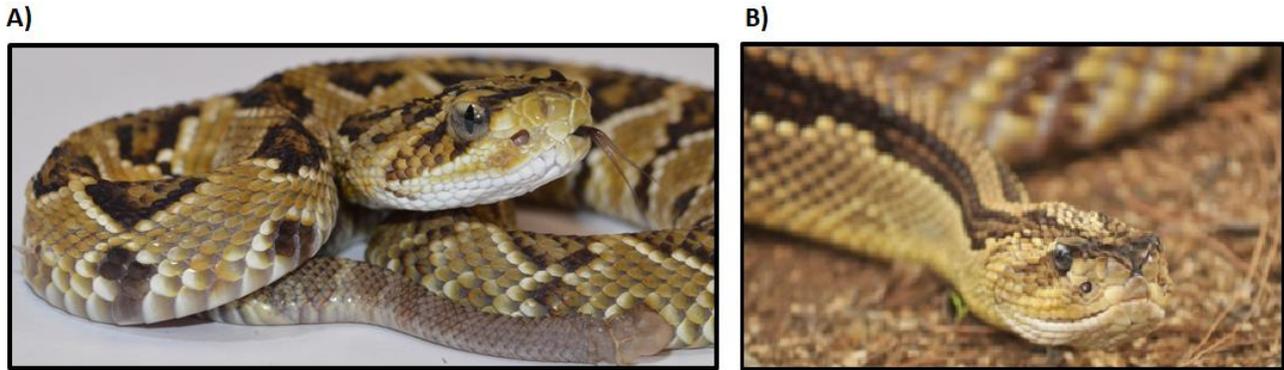


Figura 3. Ejemplares de *C. simus* de Veracruz. A) Cría. B) Adulto (Fotografías: E. Neri).

## 2.4 Componentes de venenos de serpientes

Dado que el concepto de qué es un veneno sigue siendo tema de discusión entre los investigadores de este campo, numerosas son las definiciones que se han dado al respecto. Sin embargo, tomando en cuenta las consideraciones de distintos autores, Arbuckle (2015) define al veneno como:

“Sustancia biológica producida por un organismo, que contiene moléculas que interfieren o alteran los procesos fisiológicos y bioquímicos de otro, y que ha evolucionado en este individuo para proveer de un beneficio para sí mismo una vez que es inoculado. Además, este veneno es producido o almacenado en una estructura especializada y activamente transferida a otro organismo a través de una herida, por un sistema de liberación específico”.

De este modo, entrando en materia, el veneno de serpientes es un complejo de polipéptidos y enzimas, además de otros componentes como iones metálicos, cuya funcionalidad radica en la defensa, muerte de presas y pre-digestión de éstas (Lomonte *et al.*, 2014).

La clasificación de los venenos de serpiente depende de su actividad tóxica, por ejemplo, los venenos de la familia Hydrophiidae son neurotóxicos, mientras que los venenos de los miembros de las familias Elapidae y Viperidae son mezclas más complejas, incluyendo un gran número de enzimas que inducen daño local, hemorragias y comúnmente coagulopatías. Dentro de las proteínas más importantes destacan las fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) que son enzimas esterolíticas de alrededor de 14 kDa que catalizan la hidrólisis del C-2 de glicerofosfolípidos, actuando en diferentes sustratos o diferentes tejidos diana (Sunagar *et al.*, 2015). Estas PLA<sub>2</sub>, a su vez, se dividen en los grupos I y II. Mientras que los miembros de la familia Hydrophinae y Elapidae tienen PLA<sub>2</sub> del grupo I, que mantienen la estructura primaria de las PLA<sub>2</sub> pancreáticas de mamífero, en miembros de la familia Viperidae encontramos PLA<sub>2</sub> con la misma asociación de cisteínas, pero no son pancreáticas de mamífero y se clasifican en el grupo II (Heinrikson *et al.*, 1977). En cuanto a las actividades tóxicas de ambas PLA<sub>2</sub> se incluyen las neurotóxicas, miotóxicas, hemolíticas, anticoagulantes e inductoras de edema. Sin embargo, la actividad más letal de algunas de estas PLA<sub>2</sub> está involucrada con la inhibición de la liberación de acetilcolina por un mecanismo aún desconocido. Pero, es bien sabido que el botón presináptico es degradado por estas enzimas y esto conlleva a la inhibición de la transmisión neuromuscular (Kini y Evans, 1989).

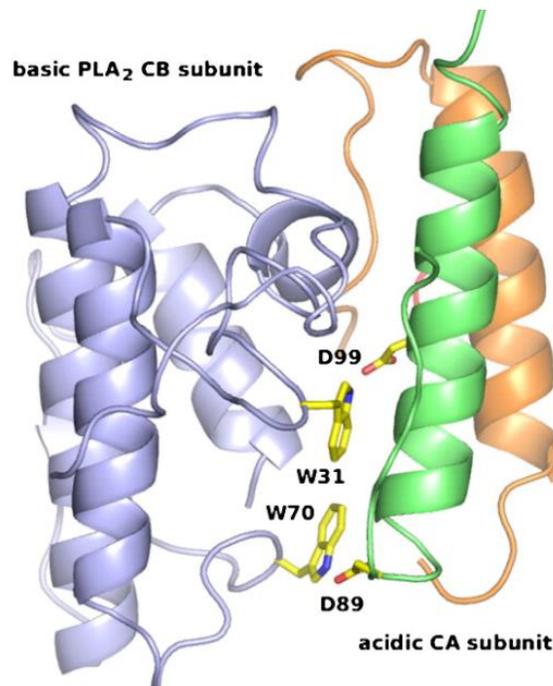
Por otro lado, la familia de proteínas hemorrágicas son las metaloproteasas, las cuales son enzimas con pesos moleculares de entre 20-100 kDa con actividad hidrolítica y se caracterizan por presentar una secuencia zinc-quelante, es decir que dependen de este ion para su actividad (Gutiérrez *et al.*, 2005). Se ha propuesto que el mecanismo de acción *in vivo* de estas proteasas se puede dividir en dos pasos: 1) degradan las proteínas de la membrana basal y membrana extracelular como colágenos (IV, VI y XV), laminina, fibronectina y perlecano, debilitando así, la pared capilar y alterando las interacciones entre células endoteliales; 2) la presión transmural provoca distensión y las células endoteliales se tornan muy delgadas hasta que la integridad de la pared capilar se pierde dando paso a la extravasación vascular (Gutiérrez *et al.*, 2005; Escalante *et al.*, 2011).

Dentro de las metaloproteasas anteriormente descritas, se encuentran aquellas del tipo P-II y P-III cuya transducción y traducción se realizan a la par con un grupo de moléculas pequeñas (4-14 kDa) carentes de actividad enzimática llamadas desintegrinas (Ramos y Selietre de Araujo, 2006). Estas toxinas resultan de un corte postraduccional de las metaloproteasas P-II y se encuentran bien representadas en venenos de vipéridos (Fox y Serrano, 2005). En cuanto a su actividad biológica se ha reportado que consiste en la inhibición de agregación plaquetaria, al bloquear selectivamente la función de los receptores celulares de integrina (Calvete, 2013).

Otro grupo de enzimas bien representadas en los venenos de vipéridos son las serinoproteasas, las cuales, en su mayoría, son glicoproteínas de una sola cadena con tamaños moleculares de entre 26-67 kDa, aunque también existen ejemplos de complejos conformados por múltiples subunidades y serinoproteasas de más de una cadena (Doley y Kini, 2009; Serrano, 2013). A pesar de no ser un componente letal del veneno, su actividad está relacionada con afectaciones en determinados pasos de la cascada de coagulación. De hecho, la actividad biológica de algunas de estas enzimas es conocida como “Thrombin-like”, debido a que cortan inespecíficamente el fibrinógeno lo que, aunado a su incapacidad de activar al factor XIII de la cascada para generar el factor XIIIa, resulta en la formación de coágulos inestables y con ello hemorragias, aún más agravadas, con la acción paralela de las metaloproteasas (Braud *et al.*, 2000; Kini, 2005).

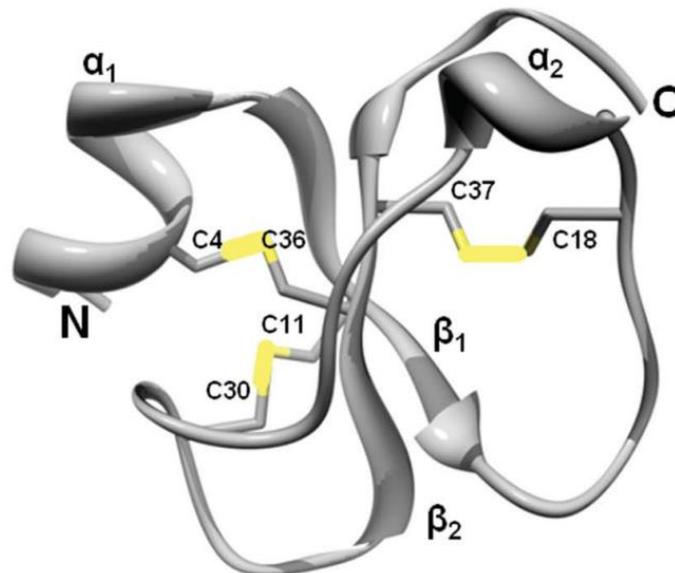
Otro componente muy común en los venenos de serpientes son las L-amino oxidasas, las cuales son flavoenzimas que catalizan la desaminación de L-amino ácidos a  $\alpha$ -keto ácidos con la liberación de peróxido de hidrógeno y amonio. Estos componentes son los responsables de brindarle un color amarillento a los venenos de estos reptiles y se han visto implicados en la inducción de apoptosis debido a su citotoxicidad (Du y Clemetson, 2002).

Por otro lado, un componente neurotóxico bien descrito en algunas especies de vipéridos, como *C. d. terrificus*, es la crotoxina. Éste es un compuesto heterodimérico conformado por dos subunidades con asociación no covalente: una PLA<sub>2</sub> básica (subunidad B) con actividad enzimática formada de una cadena poli-peptídica de 122 aminoácidos (14.4 kDa) y una PLA<sub>2</sub> ácida no enzimática (subunidad A), llamada crotapotina, conformada por 3 cadenas polipeptídicas ligadas por siete puentes disulfuro y ausente de toxicidad (9.4 kDa) (Aird *et al.*, 1985; Doley y Kini, 2009). Esta neurotoxina es un ejemplo de sinergismo entre dos moléculas, ya que se ha demostrado que la afinidad de la subunidad B hacia los receptores presinápticos incrementa con la acción chaperona de la subunidad A y es esta última la que le confiere mayor letalidad al formar un complejo estable por la interacción de los residuos Trp31 y Trp70 de la sub. B con Asp99 y Asp89, respectivamente, de la cadena β de la sub. A. (Figura 4) (Faure *et al.*, 2011). Hasta la fecha, se ha sugerido que el mecanismo de acción de esta neurotoxina consiste en un bloqueo de la liberación de acetilcolina del botón pre-sináptico, impidiendo su comunicación con la placa neuromuscular. En ensayos con ratones, genera parálisis flácida de las extremidades posteriores, acompañada con un bloqueo neuromuscular periférico que conlleva a la muerte por falla respiratoria (Chang y Lee, 1977).



**Figura 4. Estructura 3D de crotoxina por cristalografía de rayos X.** Se observan las dos subunidades que la conforman y los residuos que le brindan estabilidad al complejo. (Tomado de: Faure *et al.*, 2011).

Las miotoxinas son otro componente importante dentro del veneno de vipéridos debido a que, a pesar de carecer de actividad enzimática, estas toxinas están involucradas en la degradación de fibras musculares, por un proceso aún desconocido para la mayoría de ellas (Lomonte y Ragel, 2012). Dentro de éstas, destaca la crotamina presente en el veneno de *C. d. terrificus*, la cual es una toxina de bajo peso molecular (4.88 kDa) compuesta por 42 aminoácidos y tres puentes disulfuro en un plegamiento tipo  $\beta$ -defensina (Laure, 1975; Coronado *et al.*, 2013) (Figura 5). Esta toxina genera necrosis muscular por un proceso de penetración celular y de despolarización de mitocondria (Kerkins *et al.*, 2014). Sin embargo, la principal alteración fisiológica en ratones descrita para crotamina se conoce como “efecto foca” caracterizada por la evidente e inmediata presencia de una serie de espasmos musculares que generan parálisis rígida en las patas traseras. Esto debido a que esta miotoxina induce la despolarización del potencial de membrana en células del músculo esquelético, afectando a los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje 1.1-3 (Peigneur *et al.*, 2012).



**Figura 5. Estructura 3D de crotamina por cristalografía de rayos X.** Se observa el plegamiento típico de una  $\beta$ -defensina (Tomado de: Coronado *et al.*, 2013).

De esta manera y dado los numerosos componentes que conforman el veneno de vipéridos, un envenenamiento de esta magnitud representa un cuadro de afecciones fisiológicas múltiples y complejas en un individuo.

## 2.5 Accidente ofídico

El ofidismo, se define como aquel encuentro entre una serpiente y un humano que resulta en una mordedura, y con ello en un posible envenenamiento si se trata de serpientes venenosas, constituyendo así un problema de salud pública. A nivel mundial se ha descrito que la mayor incidencia del ofidismo se concentra en determinadas regiones de Asia, África, así como el centro y sur de América. Asimismo, se ha estimado que anualmente en el mundo ocurren cerca de 2.5 millones de envenenamientos que resultan en 125, 000 fallecimientos humanos y hasta 100, 000 personas sufren secuelas graves tanto físicas como psicológicas (Chippaux, 1998).

En cuanto a esta situación en México no se cuentan con un buen registro, debido a su alta frecuencia en zonas rurales donde resulta problemático la identificación y el registro epidemiológico del ofidismo dada la escasez de servicios médicos. Sin embargo, existen estimaciones de la frecuencia del ofidismo en determinados períodos de tiempo. Así, en 1997, la Secretaría de Salud registró cerca de 27, 500 casos anuales, mientras que entre los años 2003 y 2007 se reportaron un total de 18, 848 casos, de los cuales el 15.44% resultó en decesos humanos en los estados de Veracruz, Oaxaca, San Luis Potosí, Hidalgo y Puebla (Hernández y Bravo, 2009; González-Rivera *et al.*, 2009). Sin embargo, es importante destacar la disparidad de los datos, ya que una investigación reciente sobre ofidismo en México, en los años 2003-2015, reportó un promedio de mordeduras anuales de 4,000 y una tasa de mortalidad anual mayor en el sur del país (7/100,000 habitantes) en comparación con la región norte (2/100,000 habitantes) (Chippaux, 2017) (Figura 6).

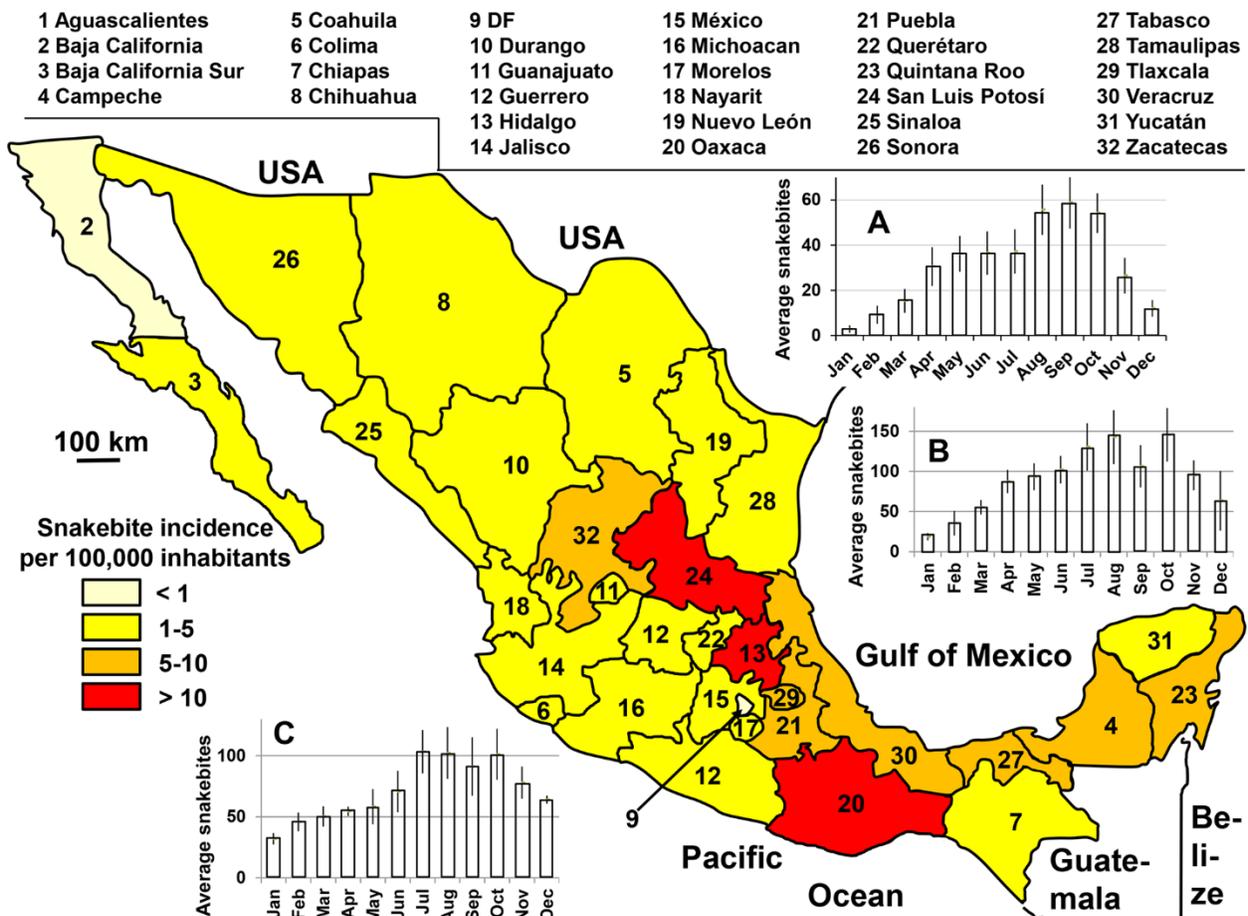
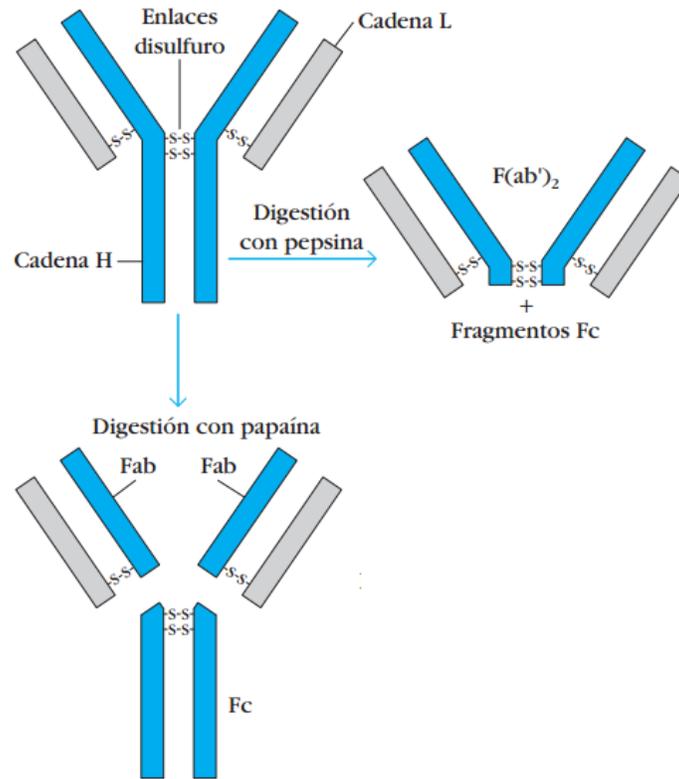


Figura 6. Incidencia de accidente ofídico en México del 2003 al 2015 (Tomado de: Chippaux, 2017).

### 1.6 Antivenenos

Hasta la fecha, el único tratamiento comprobado científicamente para tratar casos de envenenamiento por mordedura de serpiente venenosa es el uso de antivenenos. Éstos también son llamados faboterápicos o antivenenos de tercera generación, debido a que su composición consiste en fragmentos  $F(ab')_2$  liofilizados de inmunoglobulinas G (IgG), comúnmente de caballos, que fueron digeridas con pepsina, aunque también los hay del tipo Fab cuando la digestión es con papaína. En ambos casos se logra la eliminación del fragmento cristalizante (Fc), el cual está altamente relacionado con casos de reacciones secundarias en un individuo (Figura 7). Sin embargo, pese a la implementación de esta tecnología, aún hay antivenenos comerciales con la molécula IgG completa, en determinadas regiones del mundo y estos son considerados antivenenos de segunda generación (Bénard-Valle *et al.*, 2015).



**Figura 7. Esquema de IgG.** Se pueden observar los productos de la digestión con papaína y pepsina (Tomado de: Kindt *et al.* 2007).

El fundamento de producción de estos antídotos se basa en la respuesta inmune humoral que desarrolle un animal que es hiperinmunizado, es decir, que es inyectado frecuentemente con dosis crecientes de veneno, para generar anticuerpos neutralizantes. La gama de antígenos presentes en venenos de serpientes que pueden fungir como buenos inmunógenos depende de su tamaño molecular y sus propiedades estructurales, principalmente. Sin embargo, dentro de un esquema de inmunización debe de tomarse en cuenta el empleo de adyuvantes, los cuales son compuestos que, inyectados simultáneamente con un antígeno, promueven una respuesta inmune más eficaz al reducirse el tiempo de generación de anticuerpos hacia dicho antígeno.

Tales adyuvantes están hechos a base de aceites minerales como el adyuvante incompleto y completo de Freund, estos tienen la capacidad de formar una emulsión en el sitio de inoculación, lo que genera una liberación lenta del antígeno agilizando su reconocimiento por macrófagos y células dendríticas para su presentación a los linfocitos.

Otro tipo de adyuvantes son los que contienen sales de aluminio como el hidróxido de aluminio cuyo mecanismo de acción es semejante a los descritos anteriormente, salvo que se ha sugerido, que estos adyuvantes también generan inflamación local para reclutar y activar a las células presentadoras de antígeno, además de que se ven implicadas en la conversión del antígeno soluble a una forma más viable de fagocitar por parte de los macrófagos, células dendríticas, así como células B (Lambrecht *et al.*, 2009).

Durante el esquema de inmunización establecido se obtiene suero, el cual es procesado en pruebas de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima) para evaluar su reconocimiento (cálculo de títulos) hacia el veneno utilizado como inmunógeno. Posteriormente, es necesario realizar pruebas de neutralización de la actividad letal de los venenos debido a que esta prueba es determinante en la decisión de los productores de antivenenos de extraer sangrías de mayor volumen para poder generar un antiveneno comercial. Así, estas evaluaciones son de suma importancia para asegurar que los valores de título, por la inmunización, corroboren el reconocimiento maduro y estable del inmunógeno por parte de los anticuerpos (Casasola *et al.*, 2009).

Con respecto a las especies de vipéridos empleadas para la producción de antivenenos en Centro América, comúnmente se usan los venenos de *C. simus*, *Lachesis stenophrys* y *B. asper* para preparar una mezcla de inmunógenos (Calvete *et al.*, 2009). Por ejemplo, los únicos antivenenos de uso humano que se encuentran en el mercado para tratar este tipo de envenenamientos en México son: el faboterápico polivalente antiviperino<sup>®</sup> fabricado por la empresa BIRMEX<sup>®</sup> y el faboterápico Antivipmyn<sup>®</sup> manufacturado por Bioclon<sup>®</sup>, ambos antivenenos tienen en común el empleo del veneno de *B. asper* como inmunógeno mezclado con el veneno de *C. simus* y *C. basiliscus* para el antiveneno de Bioclon<sup>®</sup> y BIRMEX<sup>®</sup>, respectivamente. No obstante, el criterio del uso de estos inmunógenos se basó en la alta incidencia de casos de ofidismo en las que se han visto implicadas estas especies, sin embargo, ninguna investigación se había realizado para evaluar si estos venenos resultaban ser buenos inmunógenos para generar anticuerpos neutralizantes del veneno de la misma especie (veneno homólogo) y de otras especies de vipéridos (venenos heterólogos).

Por otro lado, en México se utilizan caballos para la producción de antivenenos, ya que éstos presentan varias ventajas. Por mencionar algunas, son organismos dóciles, se les pueden extraer volúmenes grandes de suero y toleran altas concentraciones de veneno. Sin embargo, el mantenimiento de estos animales resulta muy costoso, por lo que su empleo se realiza cuando lo que se pretende es producir lotes de antiveneno para su comercialización, mientras que, para términos de investigación biotecnológica sobre la inmunogenicidad de venenos, un modelo conveniente por su fácil y bajo costo de manejo es el conejo.

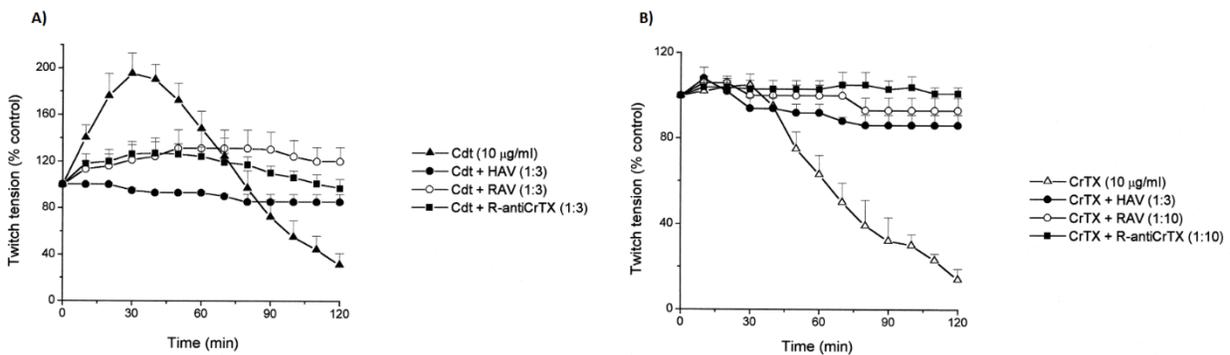
### 3. Antecedentes

El primer antiveneno contra mordedura de serpiente lo generó Henry Sewall en 1887, quien demostró que la letalidad del veneno de la víbora de cascabel *Sistrurus catenatus tergeminus*, eventualmente, se veía reducida en palomas inmunizadas con dosis muy diluidas a menos diluidas del mismo veneno. Sin embargo, no fue hasta 1895 cuando el primer antiveneno fue utilizado como tratamiento en humanos tras la mordedura de una cobra (Calmette, 1895), y así comenzó la producción de antivenenos comerciales a nivel mundial. Sin embargo, la innovación y optimización de los antivenenos ha dependido en gran medida de la caracterización de los venenos utilizados como inmunógenos y su capacidad de generar anticuerpos neutralizantes de la letalidad de las serpientes de importancia médica en determinada región geográfica.

La búsqueda de buenos inmunógenos para su utilización en la producción de antivenenos en el continente americano, y especialmente en Latinoamérica, ha llevado a la realización de investigación científica sobre las propiedades inmunogénicas de venenos de vipéridos, sobretodo de las especies neurotóxicas. Así, Kaiser *et al.* (1986) estudiaron la actividad cruzada de sueros de conejo inmunizados con diferentes moléculas de crotoxina presentes en las siguientes especies de víbora de cascabel: *C. d. terrificus* (crotoxina), *C. s. scutulatus* (toxina monjave), *C. viridis concolor* (toxina concolor). Entre sus descubrimientos, destaca el hecho de que estas neurotoxinas están relacionadas antigénicamente, por lo que no sólo son reconocidas, sino también son neutralizables con anticuerpos policlonales generados contra cualquiera de estas moléculas homólogas intactas o la subunidad básica que las conforma.

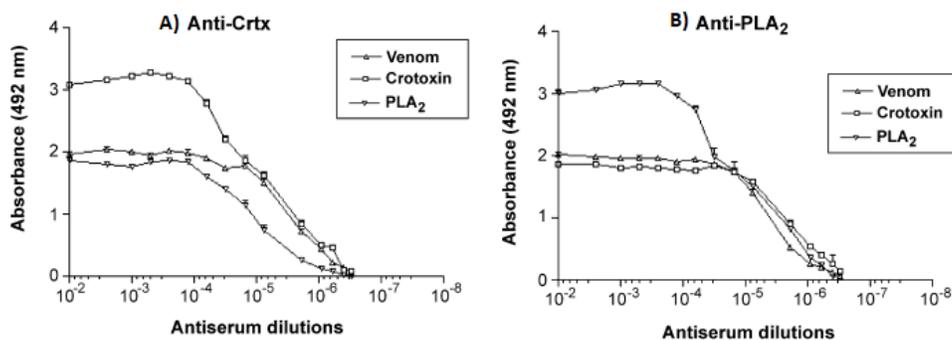
Bajo la misma tendencia, Oshima-Franco *et al.* (1999), evaluaron la capacidad neutralizante de la actividad neurotóxica del veneno de *C. d. terrificus* por un suero de conejos inmunizados con crotoxina del veneno de esta especie. Entre sus hallazgos resalta el hecho de que dicho suero resultó eficiente para la neutralización del bloqueo neuromuscular inducido por el veneno completo de *C. d. terrificus* y crotoxina, lo anterior, en una preparación de nervio frénico de diafragma de ratón (Figura 8). Asimismo, estos autores demostraron que la actividad letal de esta víbora de cascabel depende en gran

medida de la crotoxina, debido a que los anticuerpos generados contra esta neurotoxina, fueron capaces de neutralizar la letalidad del veneno completo en ensayos *In vivo*.



**Figura 8. Neutralización *ex vivo* de antivenenos experimentales de caballo (HAV), conejo (RAV) y un suero de conejo anti-crotoxina (R-antiCrTX) hacia el veneno completo de *C. d. terrificus* (Cdt) y su crotoxina (CrTX).** En ambas, resalta la neutralización del R-antiCrTX hacia el bloqueo neuromuscular provocado por Cdt (A) y CrTX (B). (Tomado de: Oshima-Franco *et al.*, 1999).

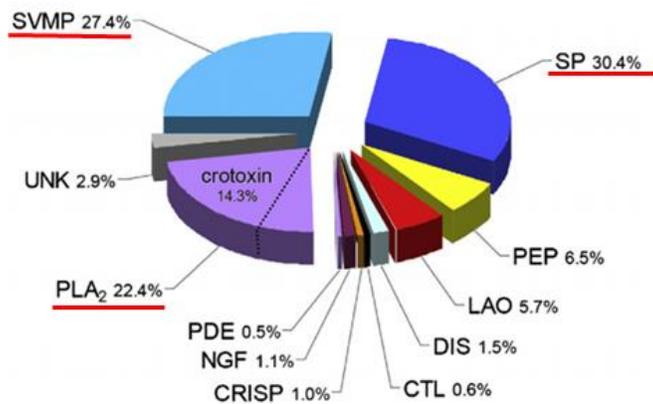
De igual manera, Beghini *et al.* (2004), reportaron que el suero de conejos inmunizados con la subunidad B de crotoxina del veneno de *C. d. cascavella*, presentaron una eficiente actividad neutralizante del bloqueo neuromuscular inducida por el veneno completo y la crotoxina en preparaciones de nervio frénico de diafragma de ratón. Aunado a lo anterior, los mismos autores reportaron valores altos de título de reconocimiento (ELISA) hacia la crotoxina por parte de los anticuerpos presentes en el suero (Figura 9).



**Figura 9. Reconocimiento por ELISA del suero de conejos inmunizados con crotoxina (A) y la subunidad básica PLA<sub>2</sub> de crotoxina (B) hacia el veneno completo de *C. d. cascavella* y ambos inmunógenos.** (Tomado de: Beghini *et al.*, 2004).

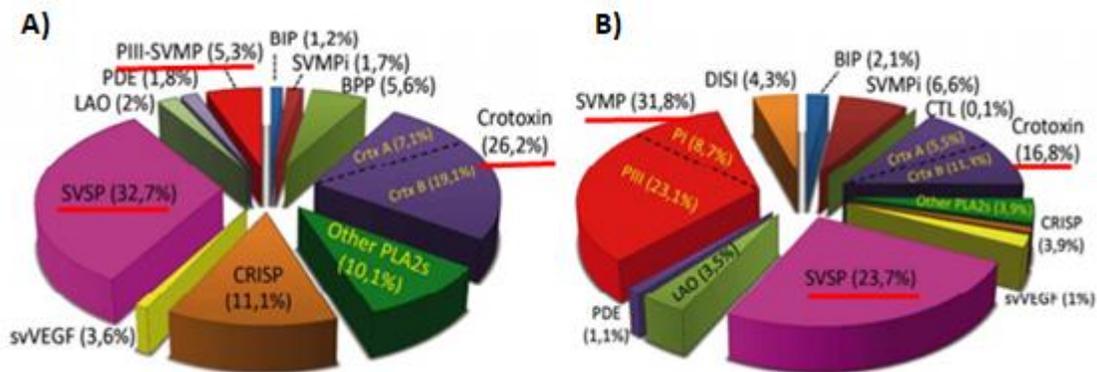
Por el lado de la caracterización de venenos, reportes anteriormente realizados confirmaban la ausencia de crotoxina en el veneno de ciertas especies de víbora de cascabel nativas de México. Sin embargo, gracias a investigaciones centradas en caracterizar venenos con muestras más representativas de una población, se ha reportado la presencia de esta neurotoxina en más especies del género *Crotalus* de nuestro país. Así, destaca la investigación realizada por Rivas *et al.* (2017), quienes reportan que el veneno de la especie *C. lepidus klauberi*, con distribución en el estado de Aguascalientes en México, es de carácter neurotóxico al presentar componentes crotoxin-like en un 10.8%.

Bajo la misma línea de investigación, Neri *et al.* (2013), caracterizaron el veneno de *C. simus*, *C. culminatus* y *C. tzabcan* con distribución en México. Entre sus aportaciones, se describió la variación en letalidad inter e intra específica de poblaciones de diferente localidad de estas especies de cascabel, siendo esta actividad biológica fuertemente potenciada por la presencia de crotoxina, la cual se presentó en el veneno de *C. simus*. En cuanto a la composición del veneno de esta especie, se encontró que éste es homogéneo entre los individuos adultos y está compuesto de 30.4% de serinoproteasas, 27.4 % de metaloproteasas y 22.4% de PLA<sub>2</sub> (incluyendo crotoxina) (Figura 10).



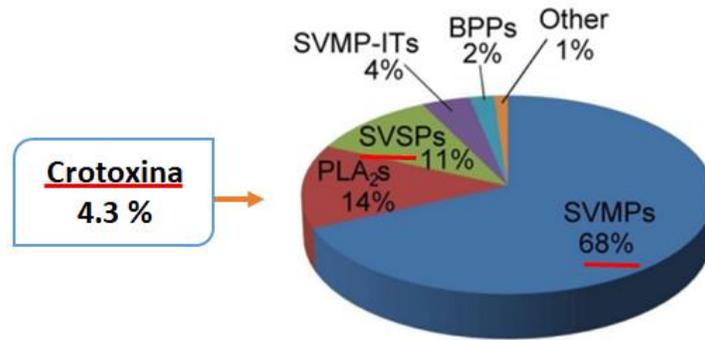
**Figura 10. Porcentaje de familias proteicas que componen el veneno de *C. simus*.** Metaloproteasas (SVMP), serinoproteasas (SP), péptidos vaso-activos (PEP), L-aminoácidos oxidasas (LAO), desintegrinas (DIS), proteínas tipo C lectinas (CTL), proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISP), fosfodiesterasas (PDE), factor nervioso de crecimiento (NGF), fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>, incluye crotoxina) y desconocida (UNK). (Modificado de: Neri *et al.*, 2013).

Aunado al reporte anterior, el veneno de *C. simus* con distribución en México ha sido reportado por presentar variación ontogenética. Esto quiere decir que el porcentaje de cada familia proteica que compone el veneno varía dependiendo del estadio de desarrollo del individuo. Así, Durban *et al.* (2017) reportaron que individuos en estadio neonato de esta especie presentan un perfil proteico del veneno con una mayor concentración de crotoxina (26.2%) y bajo porcentaje de metaloproteasas (5.3%). Mientras que, los venenos de los individuos en estadio adulto de la misma especie, poseen un perfil menos neurotóxico (crotoxina: 16.8%), presentando así, un fenotipo hemorrágico dado su alto contenido de metaloproteasas (31.8%) (Figura 11).



**Figura 11. Abundancia relativa en porcentaje de familias proteicas del veneno de *C. simus*, tanto de individuos neonatos (A) como de adultos (B).** Péptidos inhibidores de bradikina (BIP) y se muestran otras siglas como en la figura 9. (Modificado de: Durban *et al.*, 2017).

El veneno de *C. basiliscus* también ha sido estudiado. Así, Segura *et al.* (2017) estudiaron la composición de este veneno y su parecido con el veneno de *C. simus*. Entre sus hallazgos destaca la descripción del veneno de esta especie, el cual está compuesto de: 68% de metaloproteasas; 14% de PLA<sub>2</sub> incluyendo crotoxina (4.3 %) y 11% de serinoproteasas (Figura 12). Asimismo, estos autores demostraron que los antivenenos comerciales generados con el veneno de *C. basiliscus* y *C. simus*, son capaces de neutralizar la letalidad de cada una de estas especies por separado.



**Figura 12. Abundancia relativa de componentes proteicos del veneno de *C. basiliscus*.** Péptidos potenciadores de bradikitina (BPPs) y otras siglas presentes en las figuras 10 y 11. (Modificado de: Segura *et al.*, 2017).

Los estudios de caracterización de venenos han ayudado a mejorar el tratamiento de envenenamientos y optimizar los antivenenos al emplear mejores inmunógenos. Al respecto, resulta importante evaluar la capacidad de cada inmunógeno en mezcla con otros y por separado, para generar anticuerpos neutralizantes del mismo u otros venenos, previo a decidir si la mezcla de inmunógenos resulta eficiente para cumplir dicho fin. Así, una investigación reciente elaborada por Arroyo *et al.* (2017), demostró que existe baja actividad cruzada de reconocimiento y neutralización entre los anticuerpos de caballos inmunizados con los venenos de *B. asper* y *C. simus*, justificando el uso de ambos inmunogenos en la generación de antivenenos comerciales. Asimismo, el veneno de *C. simus* no afectó la generación de anticuerpos hacia el veneno de *B. asper*. Sin embargo, estos autores no evaluaron la actividad cruzada de los anticuerpos generados con el inmunógeno *C. simus* hacia otras especies del mismo género con importancia médica.

#### **4. Justificación**

El veneno de *C. simus* es utilizado para la producción de antivenenos en Centroamérica. Sin embargo, no existen trabajos sistemáticos que demuestren el seguimiento del nivel de reconocimiento y potencia neutralizante del suero de animales inmunizados, con dicho veneno, hacia el homólogo y venenos heterólogos.

Por otro lado, es necesario conocer la proporción de anticuerpos generados hacia las tres familias proteicas más importantes del veneno homólogo, ya que estos resultados nos ayudarán a comprender la potencia neutralizante del suero.

#### **5. Hipótesis**

El suero de conejos hiperinmunizados con el veneno de *C. simus* reconocerá y neutralizará el veneno homólogo y venenos heterólogos con componentes neurotóxicos. Por otro lado, existirán diferencias inmunogénicas relevantes entre las tres familias proteicas más importantes del veneno de *C. simus*.

#### **6. Objetivo general**

Evaluar el nivel de reconocimiento y potencia neutralizante del suero de conejos hiperinmunizados con el veneno de *C. simus* hacia el veneno homólogo y venenos heterólogos.

#### **7. Objetivos particulares**

- ✓ Determinar los títulos de reconocimiento hacia el veneno completo de *C. simus* de diferentes sangrías obtenidas de tres conejos inmunizados con diez estímulos antigénicos del mismo veneno.
- ✓ Comparar los títulos de las diferentes sangrías hacia metaloproteasas, serinoproteasas y crotoxina purificadas del veneno de *C. simus*.
- ✓ Determinar el porcentaje de anticuerpos, al término del esquema de inmunización, hacia el veneno completo de *C. simus*, así como hacia las metaloproteasas, serinoproteasas y crotoxina purificadas del mismo veneno.

- ✓ Evaluar los títulos de la última sangría hacia el veneno homólogo y los heterólogos.
- ✓ Determinar la potencia neutralizante de la última sangría contra la actividad letal de los venenos neurotóxicos: *C. simus*, *C. basiliscus*, *C. d. terrificus* y *C. scutulatus salvini*; así como un veneno no neurotóxico: *C. tzabcan*.

## 8. Estrategia experimental

La figura 13 muestra el diagrama de la estrategia experimental en la cual se basó la presente investigación.

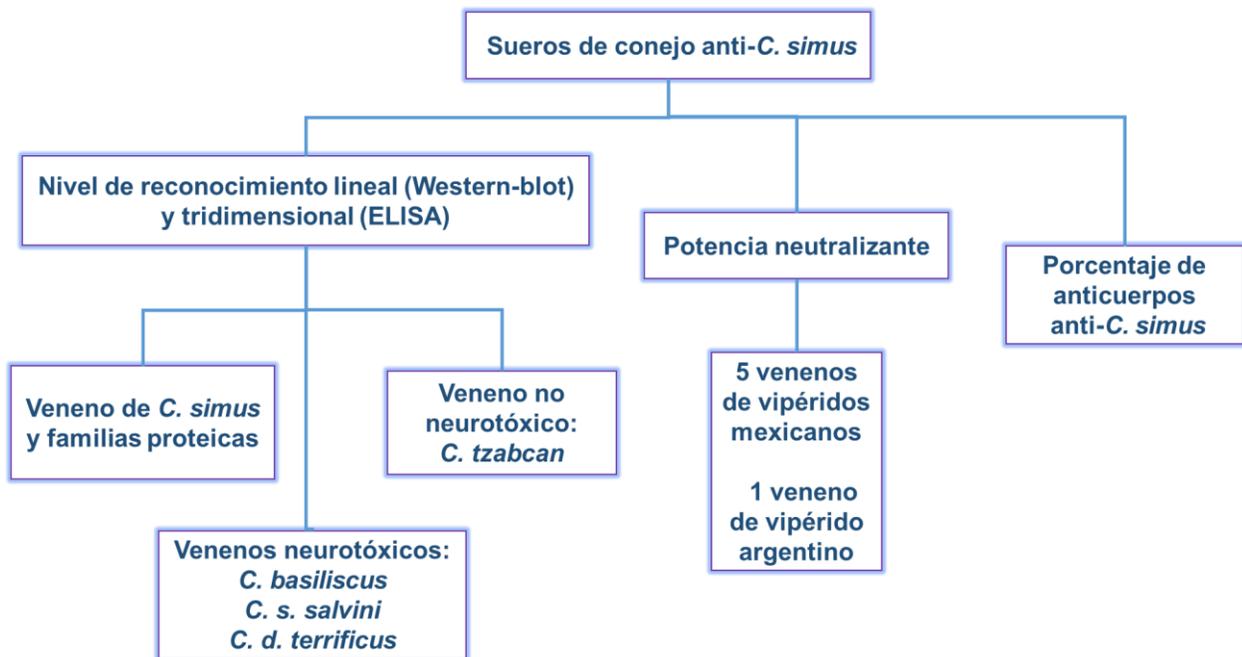


Figura 13. Estrategia experimental para la realización del presente estudio.

## 9. Materiales y métodos

### 9.1 Animales de laboratorio

En el presente estudio se utilizaron ratones CD-1, sexo indistinto con pesos de entre 18 y 20 g, alimentados con pellets proteicos *ad libitum* en un fotoperiodo de 12/12 h luz/noche. Asimismo, se utilizaron conejos machos de la cepa Nueva Zelanda con peso de 3 Kg mantenidos a un mismo fotoperiodo. Todos los animales fueron adquiridos del bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM y el proyecto fue aprobado por el comité de bioética del IBt, con clave de registro 319.

### 9.2 Obtención de venenos

Todos los venenos utilizados en el presente estudio pertenecen al banco de venenos del laboratorio del Dr. Alejandro A. Cano del Instituto de Biotecnología de la UNAM. El veneno utilizado de *C. simus* proviene de una mezcla de 21 individuos adultos de diferentes localidades del Estado de Veracruz, mientras que los venenos de *C. s. salvini* y *C. tzabcan* se obtuvieron de la ordeña de un individuo por especie, de los estados de México y Yucatán, respectivamente. Por otro lado, las dos muestras del veneno de *C. basiliscus* provinieron de la ordeña de dos individuos del estado de Colima y Jalisco (Tabla 1).

Tabla 1. Datos de procedencia de las muestras de veneno utilizadas en este estudio.

Especie	Sitio de Colecta	Clave del veneno
<i>C. simus</i>	Diferentes municipios de Veracruz	Pool de <i>C. simus</i>
<i>C. d. terrificus</i>	Argentina	C.d.t. Argentina
<i>C. s. salvini</i>	La paz, Estado de México	CSSalvini50
<i>C. basiliscus</i>	Sierra de Quila, Tecolotlán, Jalisco	Ext-1020
<i>C. basiliscus</i>	Ixtlahuacán, Colima	Ext-19
<i>C. tzabcan</i>	Mérida, Yucatán	IBTHK253

### 9.3 Cuantificación proteica de venenos

Las muestras de veneno se encontraban liofilizadas, por lo que se pesaron cantidades de 5-10 mg para resuspender en 1 mL de PBS (NaCl 0.14 M, KCl 3 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.7 mM. pH.7.2) y así, se procedió a cuantificar los venenos a través de las siguientes técnicas:

- Absorbancia 280 nm (A 280): Las muestras anteriormente resuspendidas, fueron diluidas en el mismo buffer para su cuantificación por A 280 nm. Esta técnica, se basa en la presencia de aminoácidos aromáticos cuya absorción máxima es a esa longitud de onda. Para la interpretación del resultado, se asumió que una unidad de absorbancia es equivalente a 1 mg/mL en una cubeta de 1 cm de longitud.
- Ácido bicinconínico (BCA): Las muestras de veneno en dilución fueron procesadas por el método de BCA utilizando el kit de cuantificación de Pierce®. El fundamento de esta técnica consiste en la medición de la colorimetría producida por la reducción de Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>1+</sup> por parte de las proteínas en un medio alcalino y la detección de Cu<sup>1+</sup> por el ácido bicinconínico. De esta manera, el complejo BCA/Cu<sup>1+</sup> exhibe una alta absorbancia lineal a 562 nm, la cual es directamente proporcional a la concentración de proteína (Ver anexo I). Los valores de cuantificación obtenidos con esta técnica, fueron empleados para la realización de los siguientes experimentos, salvo en algunas excepciones indicadas.

Finalmente, todos los stocks de veneno cuantificado fueron almacenados a -70°C.

### 9.4 Geles SDS-PAGE de venenos

Con la finalidad de identificar los componentes proteicos de los venenos utilizados en el presente estudio, se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Esta técnica permite visualizar la migración vertical de un conjunto de proteínas de acuerdo a su peso molecular. Así, se prepararon geles al 15 % y se corrieron en condiciones reductoras (con β-mercaptoetanol) y no reductoras. Después, se cargaron 25 µg de cada veneno por cada carril, en una cámara de electroforesis marca BIO-RAD® en un voltaje constante de 120 V. Terminada la

separación, se tiñeron los geles durante toda la noche con azul brillante de Coomassie R-250 y se destiñeron con solución de destinción (Ver anexo II).

### 9.5 Hiperinmunización de conejos y obtención de suero

Los sueros de conejo ya se encontraban disponibles en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano. El esquema de inmunización consistió en la inoculación subcutánea quincenal (desde el mes de julio hasta octubre del 2016), de tres conejos machos de la cepa Nueva Zelanda con clave de bioterio de 86, 87 y 88, fungiendo como inmunógeno el veneno completo de *C. simus*, el cual fue inyectado en cantidades crecientes partiendo de 5 hasta 6,000 µg/conejo en un total final de 13.88 mg/conejo. Se empleó adyuvante incompleto de Freund (IFA) e hidróxido de aluminio (ALUM) de manera alterna hasta la penúltima sangría del esquema de inmunización (Tabla 2). Así, las sangrías fueron obtenidas mediante la punción de la vena marginal de la oreja para colectar ~2 mL de sangre, la cual fue centrifugada para aislar el suero, mientras que la última sangría (día 150), se realizó por medio de punción cardíaca administrando Ketamina y Xilacina, de acuerdo con las recomendaciones de anestecia por el bioterio del IBt, finalmente el suero de los tres conejos fue mezclado (pool de suero).

**Tabla 2. Esquema de inmunización de tres conejos con el veneno completo de *C. simus*.**

Día	Fecha	No. inmunización	Dosis (µg/conejo)	Adyuvante	Ruta	Sangría
0	11-06-16					Preimmune
21	01-07-16	1	5	IFA	SC	1 <sup>ra</sup>
28	08-07-16	2	5	ALUM	SC	-
49	22-07-16	3	25	IFA	SC	2 <sup>da</sup>
63	05-08-16	4	100	ALUM	SC	-
77	19-08-16	5	250	IFA	SC	3 <sup>ra</sup>
91	2-09-16	6	500	ALUM	SC	-
105	27-09-16	7	1,000	IFA	SC	4 <sup>ta</sup>
108	30-09-16	8	2,000	ALUM	SC	-
119	14-10-16	9	4,000	IFA	SC	5 <sup>ta</sup>
133	28-10-16	10	6,000	S/A	SC	-
150	14-11-16					Pool

IFA: Adyuvante incompleto de Freund; ALUM: Hidróxido de aluminio; SC: inyección vía subcutánea; S/A: sin empleo de adyuvante; -: día sin toma de sangría.

## 9.6 Purificación de proteínas del veneno de *C. simus*

La obtención de las fracciones proteicas del veneno de *C. simus* se realizó por cromatografía de exclusión molecular, empleando una columna de 2 m de altura con 0.9 cm de diámetro con Sefadex G-75, como medio de filtración, hasta 1.9 m de altura y con un rango de separación molecular de 3 a 80 kDa. Así, se cargaron 100 mg de veneno liofilizado de *C. simus* resuspendidos en 1.8 mL de buffer PBS con un flujo de 13.8 mL/h. La recolección se llevó a cabo con un colector de 78 tubos marca BIORAD® modelo 2128. Una vez obtenidos los tubos, se les midió A 280 nm con ayuda de un espectrofotómetro marca Agilent® 8453. Seguidamente, se restó la absorbancia de 320 nm a los valores de 280 nm para eliminar la turbidez de las muestras y se realizó una gráfica con los valores de absorbancia y mL eluidos. Posteriormente, los tubos pertenecientes a un mismo pico se mezclaron y se les realizó diálisis contra acetato de amonio 20 mM utilizando una membrana de corte de poro de 3 kDa durante toda la noche a una temperatura de 4°C. Al día siguiente, se cuantificó cada fracción por A 280, posteriormente las muestras congeladas en nitrógeno líquido, fueron liofilizadas utilizando una liofilizadora Freezone 2.5 marca LABCONCO® a una temperatura de -50°C y una presión constante de 5.5 Pa. Finalmente, se resuspendieron las fracciones con PBS y se corrieron geles SDS-PAGE al 12.5% para verificar el estado de purificación.

## 9.7 Purificación de familias proteicas del veneno de *C. simus* por RP-HPLC

Obtenidas las fracciones del veneno por cromatografía de exclusión molecular, se procedió a purificar las metaloproteasas, serinoproteasas y la subunidad B de crotovina, por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), utilizando un equipo marca Agilent1100® y una columna analítica tipo C-18 (250 x 4.6 mm) marca GRACE®. De esta manera, 5-13 mg de cada fracción obtenida por exclusión molecular fueron diluidos en 1.8 mL de agua con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1 % (solución A) y se cargó la muestra a una velocidad de 1 mL/min con un gradiente establecido de solución B (Acetonitrilo con 0.1% de TFA) de: 0% durante los primeros 5 min, 0-15% en 10 min, 15-45% en 60 min, 45-70% en 10 minutos y 70% en los últimos 5 min. Seguidamente, los picos de absorbancia medidos a 280 nm y 214 nm descritos por Neri *et al.* (2013), fueron recolectados en tubos eppendorf para juntar los volúmenes

manualmente. Seguidamente, los volúmenes de los tubos mezclados fueron dializados contra PBS usando una membrana de corte de poro de 3 kDa para su posterior cuantificación por BCA y A 280 para el caso de la sub. B de crotoxina ( $\epsilon=1.74$ ). Por último, se corrieron geles SDS-PAGE 12.5 %, y las muestras fueron mantenidas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para los siguientes ensayos de reconocimiento por ELISA. Por otro lado, una muestra de crotamina del veneno de *C. d. terrificus* ya se encontraba disponible en el laboratorio y fue utilizada para los ensayos descritos a continuación.

### **9.8 Determinación de reconocimiento mediante ELISA**

Con la finalidad de detectar los anticuerpos específicos hacia cada veneno evaluado, se llevó a cabo el ensayo ELISA de tipo indirecto con el diseño mostrado en la figura 14. Para ello, las familias proteicas previamente purificadas, así como todos los demás venenos fueron utilizados en una concentración de  $5\ \mu\text{g/mL}$  en buffer de sensibilizado ( $100\ \text{mM}$  de  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{pH } 9.5$ ), añadiendo  $100\ \mu\text{L}$  por pozo a placas de ELISA marca Thermo Scientific® (96 pozos) a excepción de la columna 12 que fungió como control. Después de 1 h de incubación ( $37^{\circ}\text{C}$ ), las placas fueron lavadas con buffer de lavado ( $50\ \text{mM}$  de Tris-HCl  $\text{pH } 8$ ,  $150\ \text{mM}$  de NaCl,  $0.05\%$  de Tween 20) y se agregaron  $200\ \mu\text{L}$  de solución de bloqueo ( $50\ \text{mM}$  Tris-HCl  $\text{pH } 8$ ,  $5\text{mg/mL}$  gelatina,  $0.02\%$  de Tween 20) para dejar la placa en incubación a  $4^{\circ}\text{C}$  por toda la noche. Al día siguiente, la placa fue lavada y se colocó el suero de cada sangría de conejos en dilución inicial de 1:10 y/o 1:50 en buffer vehículo ( $50\ \text{mM}$  de Tris-HCl  $\text{pH } 8$ ,  $0.5\ \text{M}$  de NaCl,  $1\ \text{mg/mL}$  de gelatina,  $0.05\%$  de Tween 20) en un volumen de  $150\ \mu\text{L}$  en los pozos de la columna 1 mientras que a los demás pozos sólo se le colocaron  $100\ \mu\text{L}$  de la solución vehículo. Inmediatamente, se realizaron diluciones seriadas 1:3 para dejar todos los pozos con  $100\ \mu\text{L}$  y se procedió a incubar la placa por 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Para la fase de aplicación del anticuerpo secundario, lavada la placa, se procedió a aplicar  $100\ \mu\text{L/pozo}$  del anticuerpo comercial Goat-anti rabbit IgG HRP conjugated marca Thermo Scientific® en dilución 1: 4,000 en buffer vehículo para dejar incubar por 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, para la fase de revelado, se lavó la placa e inmediatamente se aplicaron  $100\ \mu\text{L/pozo}$  de solución de revelado (buffer para ABTS + ABTS y  $0.02\%$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y la reacción se dejó correr por 15 min a temperatura

ambiente e inmediatamente se leyó la absorbancia a 405 nm utilizando un espectrofotómetro de ELISA marca Magallan® (Ver anexo III).

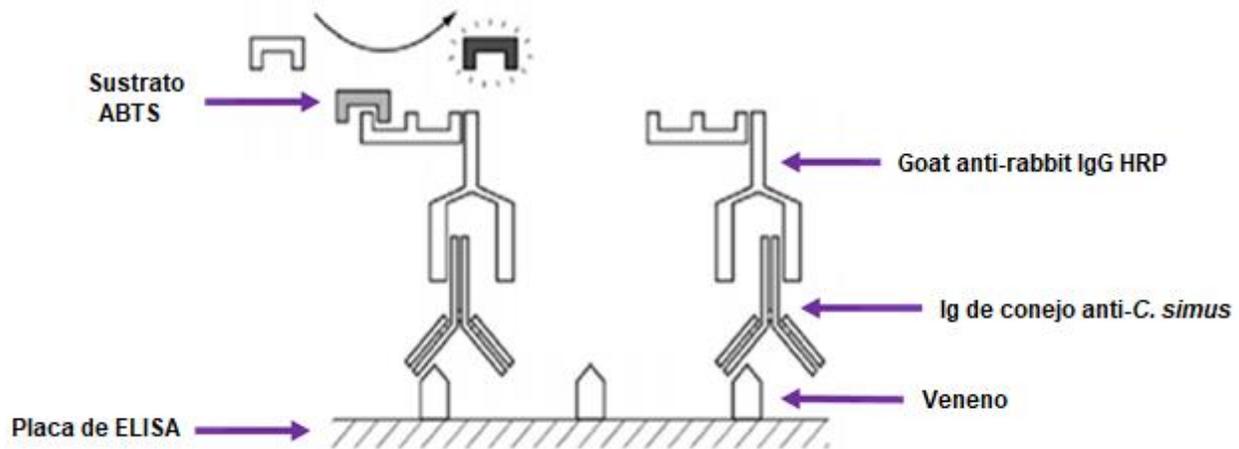


Figura 14. Ensayo ELISA indirecto para detección de anticuerpos (Modificado de: Wild 2013).

### 9.9 Purificación de Ig por el método de ácido caprílico

Con la finalidad de conocer el porcentaje de anticuerpos específicos hacia el veneno de *C. simus*, primero se purificaron las Ig generales del pool de suero de conejo por el método de ácido caprílico. Así, 5 mL del suero de fueron mezclados con 5 mL de PBS y se ajustó el pH a 5 con ácido acético 3 N. Seguidamente, se colocaron 0.4 mL de ácido caprílico ( $C_8H_{16}O_2$ ) para alcanzar una concentración final de 4 % (V/V) con la mezcla anterior (ver anexo IV). Después, se dejó la muestra en agitación constante a temperatura ambiente por 6 h. Pasado el tiempo de agitación y una vez observado el precipitado de albúmina y otras proteínas propias del suero, se procedió a centrifugar la muestra a 12,000 rpm por 15 min a una temperatura de 4°C. El sobrenadante con los anticuerpos, fue filtrado con una membrana millipore® hidrofílica de 0.45  $\mu m$  y el precipitado conservado en refrigeración. Posteriormente, se dializaron los anticuerpos contra PBS y se cuantificó el total de proteína por A 280 ( $\epsilon=1.4$ ) para correr geles SDS-PAGE (12.5%) y verificar el estado de purificación de los anticuerpos.

### **9.10 Preparación de columna de afinidad con veneno de *C. simus*.**

Una vez conocida la proporción aproximada de anticuerpos generales presentes en el pool de suero de conejo, se procedió a determinar los específicos hacia el veneno de *C. simus*. Para ello, primero se preparó una columna de afinidad de la siguiente manera. 0.8 g de resina CNBr 4B Sepharosa® fue mezclada con 10 mL de buffer de suspensión de resina (HCl 1mM) y se mantuvo por 15 min en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, se separó la resina utilizando papel filtro sobre un soporte de porcelana con el fin de remover finos y ésta se mezcló con 8.1 mg del veneno de *C. simus* en un volumen final de 10 mL con buffer de carbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M + NaCl 0.15 M), después, se centrifugó una pequeña alícuota a 3,000 rpm por 3 min y se cuantificó el sobrenadante (A 280) para determinar el porcentaje de veneno acoplado a la resina, y así traspasar la resina en una columna de cromatografía de afinidad. Por otro lado, las columnas con metaloproteasas, serinoproteasas y crotoxina (subunidad B) del veneno de *C. simus*, ya se encontraban en el laboratorio. Así, todas las columnas fueron mantenidas a 4°C en buffer de lavado (Tris HCl 100 mM + 0.5 M de NaCl, pH:8), y 0.05% de azida de sodio (NaN<sub>3</sub>), para evitar contaminación de hongos, hasta su utilización en los siguientes experimentos (Ver anexo V).

### **9.11 Determinación de Ig anti-*C. simus* por cromatografía de afinidad**

Con el propósito de hacer una estimación de los anticuerpos específicos hacia el veneno de *C. simus* y de las familias proteicas que lo conforman, se realizaron inmunopurificaciones por afinidad. Así, una vez lavada la columna de cada antígeno, con solución de lavado (Tris HCl 100 mM + 0.5 M de NaCl, pH:8), se agregó 1 mL del pool de suero de conejos y el volumen eluído fue pasado 2 veces más a la columna para asegurar el pegado de los anticuerpos hacia el veneno. Después de realizar lavados y asegurar un valor de A 280 cercano a 0 del volumen eluído, se procedió a pasar 6 mL de buffer de elusión (100 mM ácido acético) seguido de 6 mL buffer amortiguador (Tris HCl 1 M, pH:8) y el volumen eluído fue colectado en tubos eppendorf con 200 µL de solución amortiguadora, seguidamente se midió A 280 ( $\epsilon=1.4$ ) a cada tubo y aquellos con un valor mayor a 0.01 fueron mezclados para determinar la concentración neta de Ig específicos. Asimismo, la estimación de anticuerpos hacia cada familia proteica del veneno también

fue calculado a partir de 1.5 mg de Ig anti-*C. simus* bajo las mismas condiciones de inmunopurificación (Ver anexo VI).

### **9.12 Reconocimiento por Western-blot de Ig anti-*C. simus* hacia venenos**

El reconocimiento lineal de los anticuerpos hacia los venenos utilizados en el presente estudio también fue evaluado. Así, 5 µg de cada veneno fueron corridos en un gel SDS-PAGE al 15 % de poliacrilamida en condiciones reductoras. Terminada la corrida, el gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa (Trans-blot 0.45µm Bio Rad®) colocando tres papeles filtro por debajo, seguido del gel y la membrana de nitrocelulosa, además de otros tres papeles filtro por encima. Inmediatamente, se realizó dicha preparación en una cámara semi-húmeda HEP-1 owl® para comenzar la electrotransferencia a corriente constante de 420 mA por 1 h con buffer de transferencia (39 mM glicina, 48 mM Tris-base, 0.037% SDS, 20% metanol). Después, la membrana se colocó en agitación constante a temperatura ambiente toda la noche con buffer TBST (10 mM Tris-HCl pH: 7.5, 150 mM de NaCl, 0.05 % Tween-20) + 5% de leche descremada Svelty® con la finalidad de bloquear sitios inespecíficos para los anticuerpos. Al día siguiente, se le dieron cinco lavados a la membrana con solución TBST y se dejó incubar 1 h con Ig anti-*C. simus* en una concentración de 2 µg/mL en 10 mL de buffer TBST. Después, se volvieron a realizar lavados y se dejó incubar la membrana por 1 h, esta vez con el anticuerpo secundario Goat anti-rabbit IgG HRP en dilución 1: 3,000 en 10 mL de solución TBST. Finalmente, se volvió a lavar la membrana y se reveló con 3 mL de buffer TMB (Thermo®), parando la reacción con lavados de agua destilada hasta verificar una clara tinción de bandas (Ver anexo VII). Paralelamente, se corrió un gel SDS-PAGE testigo bajo las mismas condiciones, salvo que se corrieron 25 µg de cada veneno y 15 µg de crotamina, y éste se tiñó con azul de Coomassie R-250.

### **9.13 Reconocimiento por Western-blot de Ig anti-crotoxina hacia crotamina**

Con la finalidad de responder a la pregunta de investigación sobre la compartición de epitopes entre crotoxina y crotamina, se realizaron dos ensayos de inmunotransferencia de tipo Western-blot bajo el mismo procedimiento descrito anteriormente, variando que, en estos ensayos se cargaron 5 µg del veneno de *C. d. terrificus* y 3 µg de crotamina en

los geles SDS-PAGE transferidos. En el primer ensayo, el anticuerpo primario consistió en Ig anti-crotoxina purificadas anteriormente en una concentración de 1 µg/mL en 10 mL de buffer TBST, y el anticuerpo secundario empleado fue el Goat anti-rabbit IgG AP millipore® en dilución 1: 3,000. Por otro lado, en el segundo ensayo, como anticuerpo primario se empleó el anticuerpo monoclonal hacia crotamina con clave 5D1, obtenido por Fernando Losoya, en una concentración de 10 µg/mL en 10 mL de Buffer TBST y como anticuerpo secundario se utilizó el Goat anti-mouse IgG AP millipore® en dilución 1: 2,000. Ambos ensayos de Western-blot fueron revelados con 10 mL del kit de BCIP/NBT kit invitrogen®. Paralelamente, se corrió un gel SDS-PAGE testigo con 20 µg del veneno de *C. d. terrificus* y 5 µg de crotamina bajo las mismas condiciones descritas.

#### **9.14 Reconocimiento por ELISA de Ig anti-crotoxina hacia crotamina**

La actividad cruzada de reconocimiento conformacional de anticuerpos anti-crotoxina hacia crotamina también fue evaluado por el ensayo ELISA, para ello se realizaron los mismos pasos que la sección descrita con anterioridad salvo que el sensibilizado de placa se realizó con crotamina y sub. B de crotoxina por separado, y el anticuerpo primario, que en este caso fueron los Ig anti-crotoxina purificados anteriormente por afinidad, fueron empleados aplicando una concentración inicial de 33.3 µg/mL y, de igual manera, se realizaron diluciones seriadas 1:3 para seguir con la fase de aplicación de anticuerpo secundario y el revelado bajo las condiciones ya descritas.

#### **9.15 Determinación de Dosis letal media (DL<sub>50</sub>) de venenos**

Para evaluar el grado de toxicidad de los venenos liofilizados de *C. basiliscus* y *C. s. salvini* se determinó la dosis letal media (DL<sub>50</sub>). Así, se inyectaron grupos de 3 ratones de la cepa CD-1, en la vena caudal lateral por vía intravenosa con diferentes cantidades de veneno disuelto en PBS para inyectar un volumen máximo de 0.5 mL/ratón. Después de 24 h se tomó lectura de mortalidad de cada grupo experimental. Por otro lado, la DL<sub>50</sub> del pool de venenos de *C. simus* y del ejemplar de *C. tzabcan* fueron determinadas por Neri *et al.* (2013), la cual fue de 3 µg/ratón y 155.9 µg/ratón, respectivamente, mientras que la DL<sub>50</sub> del veneno de *C. d. terrificus* ya se encontraba calculada en el laboratorio con un valor de 3 µg/ratón.

### **9.16 Determinación de potencia neutralizante (DE<sub>50</sub>) del suero de conejos**

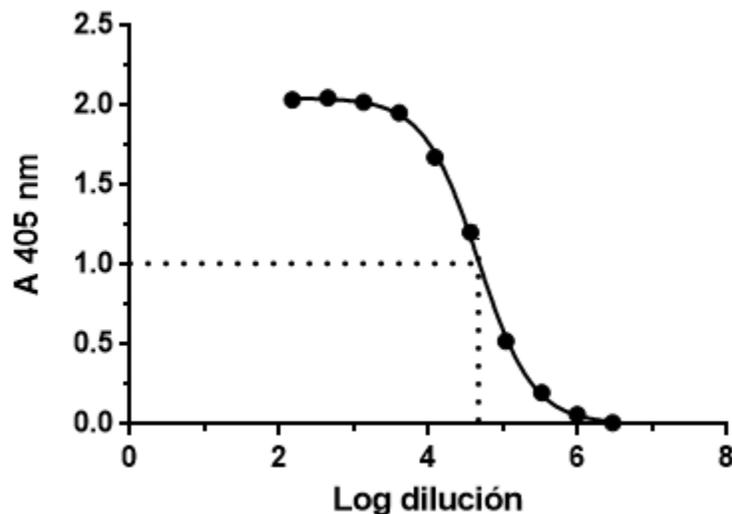
Para evaluar la potencia neutralizante del pool de suero de la última sangría contra el veneno de todas las especies, es necesario retar el suero contra 3DL<sub>50</sub> del veneno. Para ello, cantidades equivalentes a 3DL<sub>50</sub> del veneno completo de cada especie fueron incubadas con diferentes volúmenes de suero durante 30 min a 37 °C. Seguidamente, se inyectaron ratones de la cepa CD-1 vía intravenosa y después de 24 h, se tomó lectura de la sobrevida de cada grupo experimental. Con el propósito de evaluar la actividad cruzada neutralizante de este suero hacia la principal actividad de crotamina, se inyectaron bajo las mismas condiciones 490 µL del pool de sueros contra 10 µg de esta toxina y se observaron los ratones durante 10 min. Asimismo, se inyectaron tres ratones con la misma cantidad de crotamina con 70 µg de anticuerpos anti-crotoxina/ratón. Paralelamente, se realizaron controles inyectando dos ratones con 0.5 mL de suero y PBS.

### **9.17 Ensayo rescate tras envenenamiento experimental por *C. simus***

Con la finalidad de evaluar la capacidad del suero de conejos para neutralizar la letalidad del veneno de *C. simus* después de determinados tiempos de evolución de un envenenamiento experimental, se procedió a realizar experimentos de tipo rescate tras la inyección de 3DL<sub>50</sub> de este veneno por cada ratón. Así, grupos de 3 ratones fueron inyectados por vía intravenosa con dosis de 9 µg del veneno de *C. simus* en un volumen final de 0.5 mL con PBS. Después de 5, 15 y 50 min se inyectaron, por la vena que no había sido punzada previamente, 500 µL del pool de suero de conejos por cada ratón del grupo experimental y se tomó lectura de la tasa de supervivencia a las 24 h después de la aplicación del suero. De la misma manera, se empleó el antiveneno comercial Antivipmyn® (Lote: B-2H-22) resuspendido en 10 mL de PBS/vial. Cabe destacar, que únicamente se procedió a calcular la DE<sub>50</sub> de los antivenenos evaluados en el tiempo transcurrido de envenenamiento que mejor lo permitió el ensayo. Asimismo, bajo las mismas condiciones de rescate, se inyectó un grupo de ratones solamente con PBS para descartar posibles efectos negativos por dicho buffer.

### 9.18 Análisis estadístico

Los datos obtenidos para la determinación de la DL<sub>50</sub> y la DE<sub>50</sub> fueron analizados de acuerdo a Casasola *et al.* (2009), graficando el porcentaje de mortalidad (DL<sub>50</sub>) o supervivencia (DE<sub>50</sub>) en función de la dosis de veneno o antiveneno inoculado expresado en logaritmo, para ello se utilizó el método de regresión no lineal tipo sigmoideal de dosis-respuesta con el software GraphPad Prism® Versión 6.01. Por otro lado, el valor de título de reconocimiento definido como; la dilución del suero en la cual se encuentra el 50 % del máximo de reconocimiento (A 405 nm) hacia el veneno, fue calculado graficando los datos obtenidos de la prueba ELISA en función del logaritmo de la dilución del suero evaluada y la absorbancia obtenida para, de igual manera, obtener una curva sigmoideal empleando el software previamente mencionado (Figura 15). Finalmente, se realizaron de 2-3 repeticiones intraensayo para el cálculo de título (ELISA), y los resultados del reconocimiento del suero hacia los venenos heterólogos fueron analizados mediante ANOVA de un solo factor para determinar diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ).

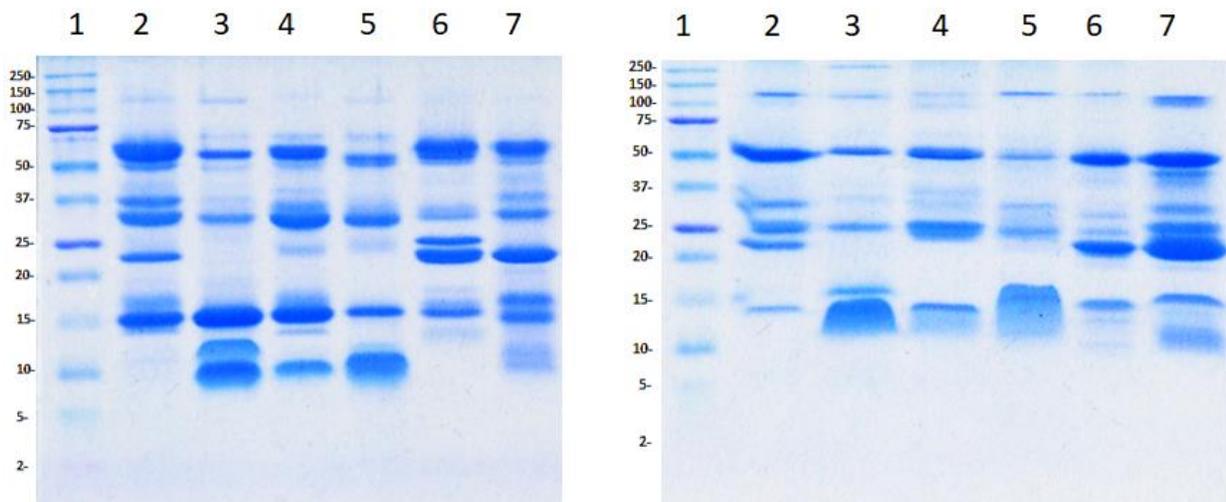


**Figura 15. Ejemplo de ajuste de regresión sigmoideal dosis-respuesta mediante GraphPad Prism® a partir de datos obtenidos por ensayo ELISA.** Se observa la interpolación del valor de título (línea punteada del eje de las abcisas) a partir del 50 % del máximo de absorbancia (línea punteada del eje de las ordenadas). Nota: cada punto en la curva representa un valor de absorbancia obtenido por cada dilución del suero evaluada.

## 10. Resultados

### 10.1 Perfiles electroforéticos SDS-PAGE de venenos estudiados

Con la finalidad de identificar los componentes proteicos de los venenos utilizados en el presente estudio se realizaron geles SDS-PAGE. Así, un total de seis venenos pertenecientes a cinco especies fueron procesados (Figura 16). En términos generales, todos los venenos presentaron componentes de alto, mediano y bajo peso molecular. Dentro de las proteínas de alto peso molecular destacan las metaloproteasas P-III las cuales se encuentran en una proporción variable al mostrarse distintos grados de tinción de la banda de ~60 kDa, además de posibles L-amino oxidasas o hialuronidasas en la banda de peso molecular de ~140 kDa. Por el lado de los componentes de mediano peso molecular se encuentran las serinoproteasas cuya banda es notoria en el peso molecular de ~35 kDa, además, de posibles metaloproteasas P-I presentes en el peso molecular de ~23 kDa. Finalmente, con respecto a la región de bajo peso molecular, destacan las PLA<sub>2</sub> con corrimiento de ~14 kDa y una banda de 10 kDa para el veneno de *C. s. salvini*, misma que pudiera tratarse de una miotoxina. Paralelamente, en el veneno de *C. d. terrificus* y *C. basiliscus* 19 destaca la banda de crotamina con corrimiento anómalo de ~10 kDa.



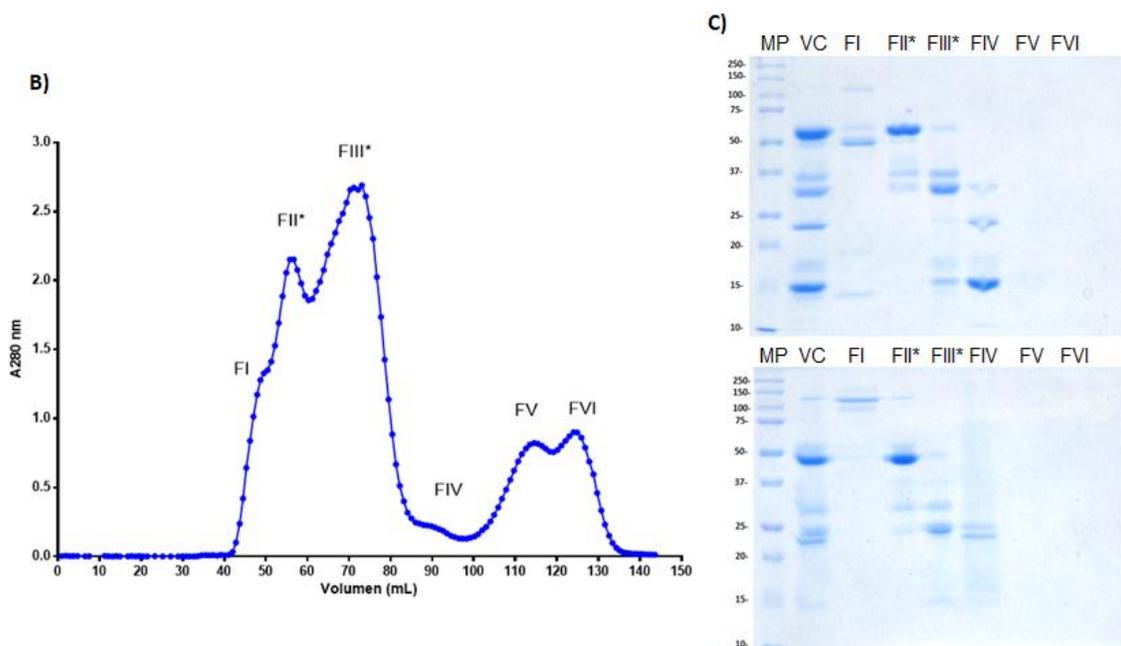
**Figura 16. Perfiles electroforéticos de venenos utilizados en este estudio.** SDS-PAGE al 15 %, condiciones reductoras (izquierda) y no reductoras (derecha), 25 µg/carril. 1: Marcador de peso molecular; 2: *C. simus*; 3: *C. d. terrificus*; 4: *C. s. salvini*; 5: *C. basiliscus* 19; 6: *C. basiliscus* 1020; 7: *C. tzabcan*.

## 10.2 Cromatografía de exclusión molecular del veneno de *C. simus*

Los componentes del veneno de *C. simus* fueron obtenidos por cromatografía de exclusión molecular (Figura 17). Así, 100 mg de este veneno fueron cargados a la columna obteniéndose un total de seis fracciones, las cuales representaron el 85.4 % de la cantidad inicial. Asimismo, todos los componentes observados en el gel SDS-PAGE del veneno completo fueron recuperados en las fracciones I-VI obtenidas por exclusión molecular, a excepción de las últimas dos fracciones donde no se obtuvieron componentes proteicos importantes del veneno tras no evidenciarse bandas teñidas en los geles.

A)

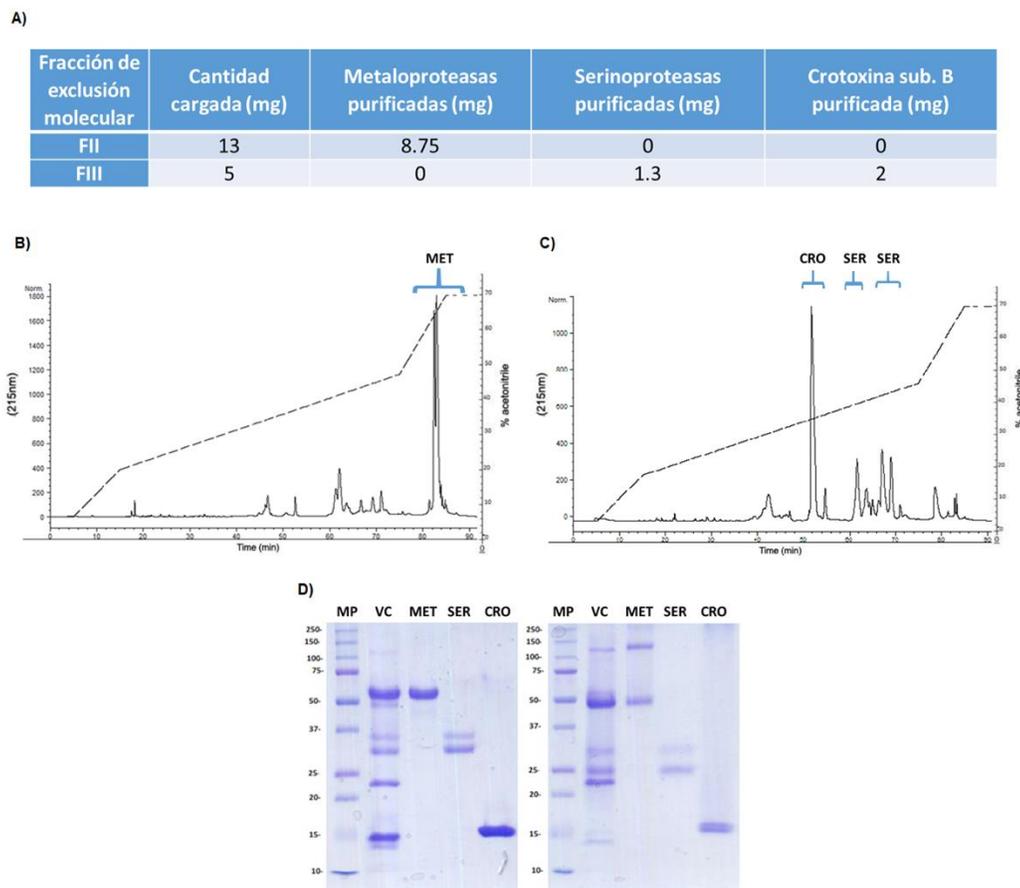
Fracción	Tubos	Volumen (mL)	A 280 nm	U.A.	Volumen (mL/tubo)	Porcentaje (%)
FI	1 a 10	9.2	0.73	6.8	0.84	6.8
FII*	11 a 22	10.8	1.76	19	0.9	19
FIII*	23 a 47	22	1.81	39.9	0.92	39.9
FIV	48 a 63	14.2	0.19	2.7	0.95	2.7
FV	64 a 85	20	0.5	10	0.95	10
FVI	86 a 98	11.2	0.63	7.1	0.86	7.1
Total	98	87.4	-	85.4	-	85.4



**Figura 17. Cromatografía de exclusión molecular del veneno de *C. simus*.** A) Rendimiento de corrida. B) Fracciones cuantificadas. C) SDS-PAGE (12.5 %), condiciones reductoras (arriba) y no reductoras (abajo). MP; VC: 20  $\mu$ g de *C. simus*; FI: 7  $\mu$ g; FII: 7  $\mu$ g; FIII: 10  $\mu$ g; FIV: 10  $\mu$ g; FV: 4  $\mu$ g; FVI: 4  $\mu$ g. -: No aplica; \* fracción procesada por RP-HPLC; U.A.: Unidades de absorbancia.

### 10.3 Obtención de familias proteicas del veneno de *C. simus* por RP-HPLC

Habiendo obtenido una separación de los componentes proteicos del veneno de *C. simus*, se procedió a purificar las familias proteicas más importantes que conforman este veneno por RP-HPLC (Figura 18). De este modo, las metaloproteasas fueron purificadas a partir de la FII de exclusión molecular presentando un pico de elución de gran tamaño después de los 80 minutos de la corrida. Seguidamente, la sub. B de crotoxina y las serinoproteasas fueron purificadas de la FIII de exclusión molecular. Por un lado, la sub B. de crotoxina mostró un pico de elución a los 52 min de corrida, mientras que las serinoproteasas eluyeron a los minutos 61 y 69. Finalmente, sólo se observaron las bandas correspondientes a cada familia proteica en los geles SDS-PAGE (Figura 18.D).



**Figura 18. Purificación de principales familias proteicas del veneno de *C. simus*.** A) Rendimiento de corridas de RP-HPLC. B) RP-HPLC de fracción II para purificación de metaloproteasas (MET). C) RP-HPLC de fracción III para purificación de serinoproteasas (SER) y sub. B de crotoxina (CRO). La línea punteada indica el gradiente de acetonitrilo. D) SDS-PAGE al 12.5 %, condiciones reductoras (Izquierda) y no reductoras (derecha). VC: 25 µg de veneno *C. simus*; MET: 13.9 µg; 4 µg de SER; CRO: 4.32 µg.

## 10.4 Evolución de títulos de reconocimiento de sueros de los tres conejos hacia el veneno de *C. simus*

Con respecto a la evolución de los títulos de reconocimiento hacia el veneno homólogo de los sueros de los tres conejos, se puede observar que el título más alto se encontró en el día 77 para los conejos 86 (57,463) y 88 (32,426), mientras que para el conejo 87 se presentó en el día 119 (48,296). Por otro lado, en cuanto al reconocimiento de los sueros de cada conejo hacia las familias proteicas del veneno de *C. simus*, el conejo 86 presentó, para todas las sangrías, títulos más altos para metaloproteasas y, a pesar de tener pesos moleculares distintos, los títulos de reconocimiento para las serinoproteasas y para la sub. B de crotoxina se mantuvieron casi idénticos. Los títulos del conejo 87 mantuvieron un patrón semejante al observado en el conejo 86 salvo que los títulos más altos se encontraron en la penúltima sangría (día 119). Asimismo, los títulos más altos para el conejo 88 correspondieron a aquellos hacia las metaloproteasas (Figura 19).

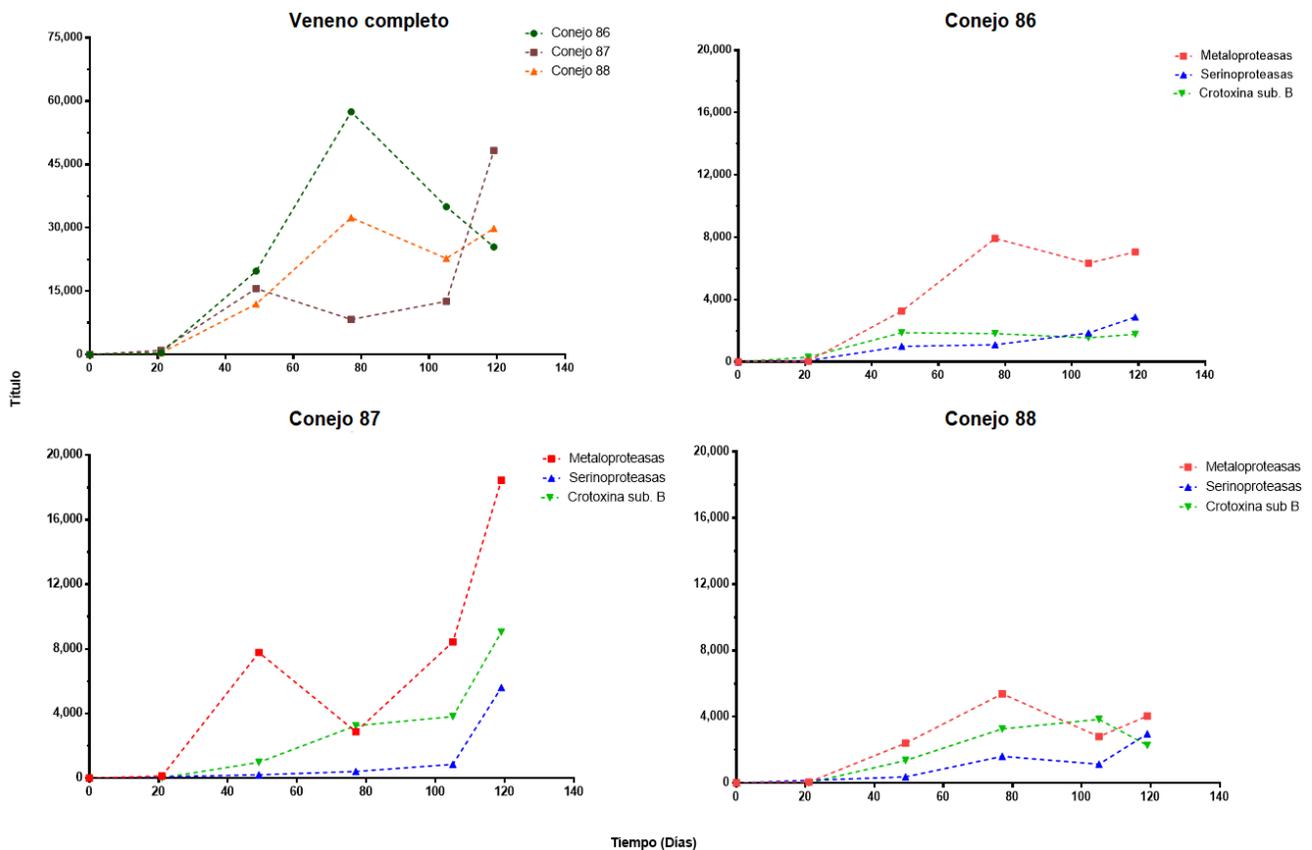
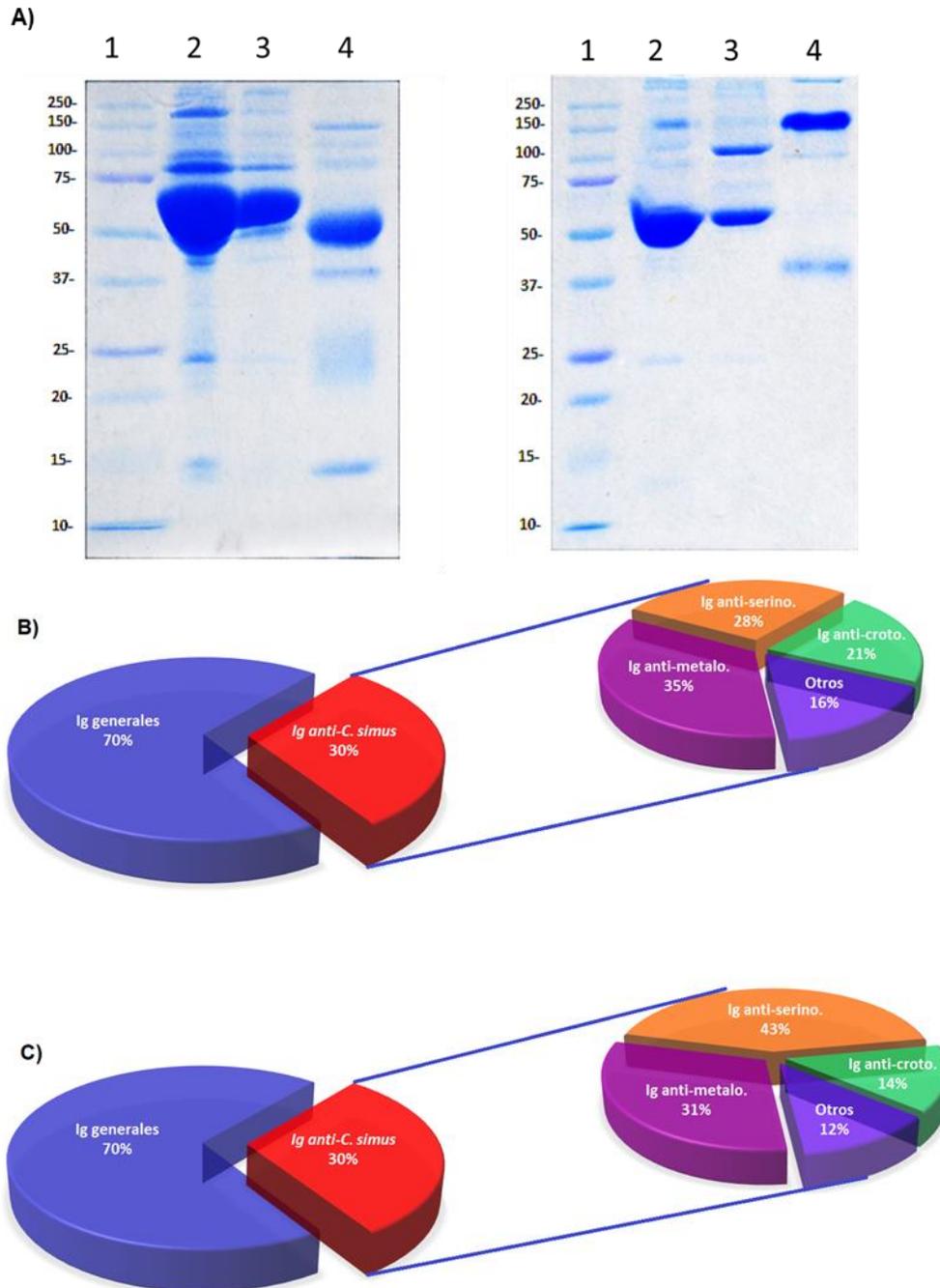


Figura 19. Evolución de títulos de reconocimiento (ELISA) de los sueros de los tres conejos hacia el veneno completo de *C. simus* y familias proteicas.

### 10.5 Purificación de anticuerpos específicos hacia el veneno de *C. simus*

Respondiendo a la pregunta sobre qué cantidad de anticuerpos específicos hacia el veneno homólogo se generaron en los conejos inmunizados, se realizó la purificación de Ig específicas del veneno. Para esto, el primer paso de purificación contempló la separación de las Ig generales del pool de suero de conejos por el método de ácido caprílico. Así, se determinó una concentración de Ig en el suero de 2.8 mg/mL, siendo este valor confiable dado el grado de purificación adecuado, al separar la mayor parte de proteínas propias del suero, como la albúmina (Figura 20.A).

Posteriormente, se preparó una columna de afinidad con 8.1 mg del veneno de *C. simus*, obteniendo un rendimiento de acoplamiento de 84%. A esta columna se le hizo pasar 1 mL del pool de suero de conejos para obtener la proporción de Ig anti-*C. simus*, la cual fue de 0.84 mg/mL de suero. Seguidamente, tomando la porción de Ig anti-*C. simus* como un 100%, se realizó una estimación de los Ig específicos hacia las familias proteicas más importantes de este veneno, empleando una columna de afinidad para cada una de éstas. Cabe destacar que esta estimación se realizó retando directamente en cada columna, 1 mL del pool de suero y 1.5 mg de Ig anti-*C. simus* purificados previamente. Primeramente, la purificación directa con suero crudo arrojó un porcentaje de 35%, 21.4% y 28.5% para los anti-metaloproteasas, anti-crotoxina sub. B y anti-serinoproteasas, respectivamente (Figura 20.B). Por otro lado, la purificación a partir de 1.5 mg de Ig anti-*C. simus* resultó en los siguientes porcentajes: 31.3% (anti-metaloproteasas), 14% (anti-crotoxina sub. B) y 42.6% (anti-serinoproteasas) (Figura 20.C).

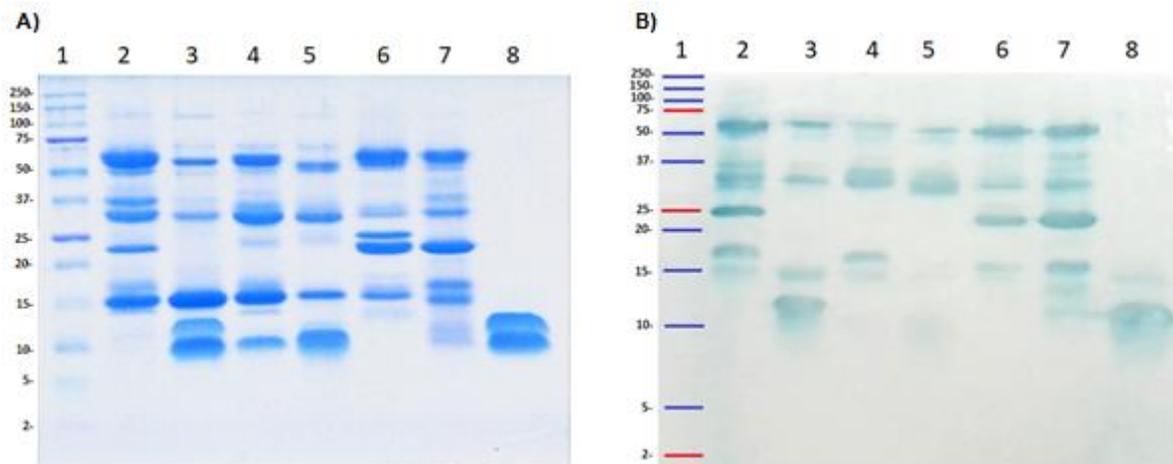


**Figura 20. Purificación de anticuerpos hacia el veneno completo de *C. simus* y familias proteicas.**

A) Grado de purificación de anticuerpos generales del pool de sueros de conejo mediante la técnica de ácido caprílico. SDS-PAGE al 12.5 %, condiciones reductoras (Izquierda) y no reductoras(derecha), 15 µg/carril: 1: marcador de peso molecular; 2: Pool de sueros de conejos; 3: pellet precipitado; 4: Ig purificadas en suspensión. B) Interpretación en gráfica de pastel de cromatografía de afinidad a partir de 1 mL de suero crudo corrido en cada columna. C) Interpretación en gráfica de pastel de cromatografía de afinidad a partir de 1.5 mg de Ig anti-*C. simus* corridos en cada columna.

## 10.6 Western-blot del veneno homólogo y heterólogos

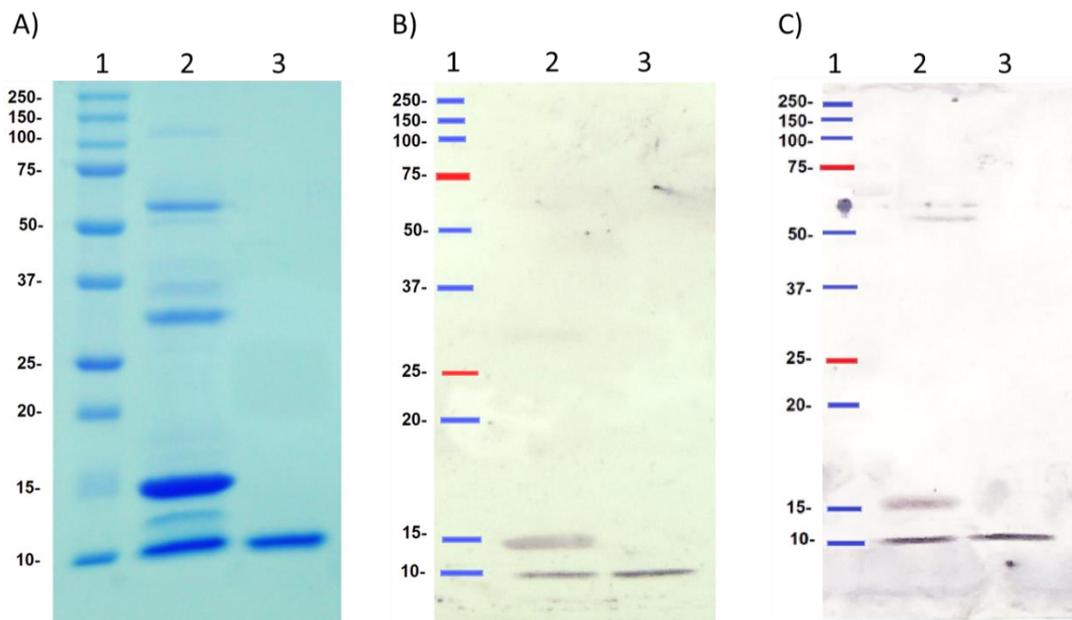
Para conocer el grado de reconocimiento de estructura primaria de cada componente de los venenos utilizados por parte de las Ig anti-*C. simus* se realizó una inmunotransferencia tipo Western-blot (Figura 21). Los resultados obtenidos confirman un 100% de reconocimiento hacia cada componente del veneno homólogo dada la tinción de todas las bandas de este veneno. La mayor parte de bandas reconocidas también fue observada en el veneno de *C. d. terrificus*, *C. tzabcan* y *C. basiliscus* 1020. Sin embargo, en la región de bajo peso molecular destaca el reconocimiento hacia crotamina en el veneno de *C. d. terrificus* con una banda bien marcada de 10 kDa a comparación del veneno de *C. basiliscus* 19, en el cual dicha banda apenas es perceptible al igual que la banda de ~15 kDa. Asimismo, en el carril 4 correspondiente al veneno de *C. s. salvini* destaca la ligera tinción de bandas de los componentes de 10 kDa y ~15 kDa.



**Figura 21. Western-blot de Ig anti-*C. simus* hacia venenos.** A) SDS-PAGE al 15 % testigo, condiciones reductoras 25 µg/carril a excepción del carril 8 (5 µg): 1: Marcador de peso molecular; 2: *C. simus*; 3: *C. d. terrificus*; 4: *C. s. salvini*; 5: *C. basiliscus* 19; 6: *C. basiliscus* 1020; 7: *C. tzabcan*; 8: crotamina B) SDS-PAGE al 15 % transferido a membrana de nitrocelulosa, 5 µg/carril bajo el mismo orden. Anticuerpo primario: 2 µg/mL de anticuerpos anti-*C. simus*. Anticuerpo secundario: Goat-anti-Rabbit HRP en dilución 1:3,000. Revelado: 3 mL TMB®.

## 10.7 Western-blot de crotamina por medio de Ig anti-crotoxina

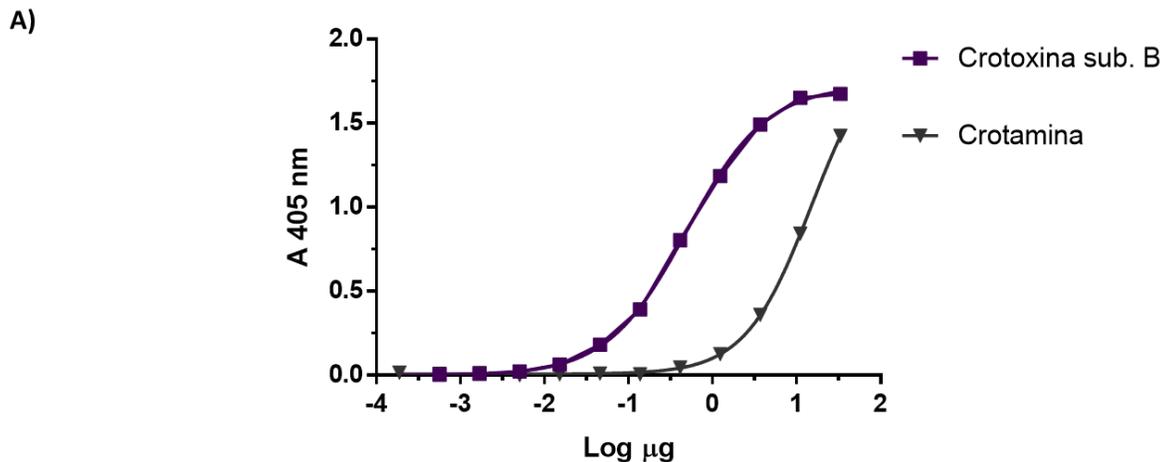
Para descartar que el reconocimiento cruzado hacia crotamina evidenciado en el ensayo anterior pudiera ser debido a un ruido de señal, se procedió a realizar un nuevo ensayo Western-blot, utilizando anticuerpos policlonales anti-crotoxina purificados del suero y un anticuerpo monoclonal hacia crotamina con clave 5D1 disponible en el laboratorio. Así, en la figura 22, se puede observar que los anticuerpos evaluados sí mostraron reconocimiento lineal hacia la sub. B de crotoxina y la crotamina del veneno de *C. d. terrificus*.



**Figura 22. Western-blot de Ig anti-crotoxina y anticuerpo monoclonal de crotamina hacia el veneno completo de *C. d. terrificus* y crotamina.** A) SDS-PAGE al 15 % testigo, condiciones reductoras: 1: Marcador de peso molecular; 2: 20µg de *C. d. terrificus*; 3: 5 µg de crotamina. B) SDS-PAGE al 15 % transferido a membrana de nitrocelulosa: 5 µg de *C. d. terrificus* y 3 µg de crotamina, bajo el mismo orden. Anticuerpo primario: 1 µg/mL de anticuerpos anti-crotoxina. Anticuerpo secundario: Goat-anti-Rabbit AP millipore® en dilución 1:3,000. Revelado: 10 mL del kit BCIP/NBT invitrogen®. C) SDS-PAGE al 15 % transferido a membrana de nitrocelulosa bajo mismas cantidades y mismo orden que B. Anticuerpo primario: 10 µg/mL de anticuerpos monoclonales anti-crotamina 5D1. Anticuerpo secundario: Goat anti-mouse AP millipore® en dilución 1:2,000. Revelado: 10 mL del kit BCIP/NBT invitrogen®.

### 10.8 Reconocimiento y pruebas de neutralización hacia crotoxina y crotamina

Dado el resultado anterior de reconocimiento hacia una toxina no presente en el veneno homólogo y de suma importancia médica, se decidió evaluar el reconocimiento y neutralización de la actividad característica de esta miotoxina por parte de Ig anti-crotoxina. De este modo se determinó que el reconocimiento de Ig anti-crotoxina hacia crotoxina es hasta 30 veces mayor al observado en crotamina. Sin embargo, la actividad de esta miotoxina no fue neutralizada por las Ig anti-crotoxina, aún cuando se retaron 450  $\mu$ L del pool de suero y 70  $\mu$ g de Ig anti-crotoxina contra 10  $\mu$ g de crotamina/ratón (Figura 23).



B)

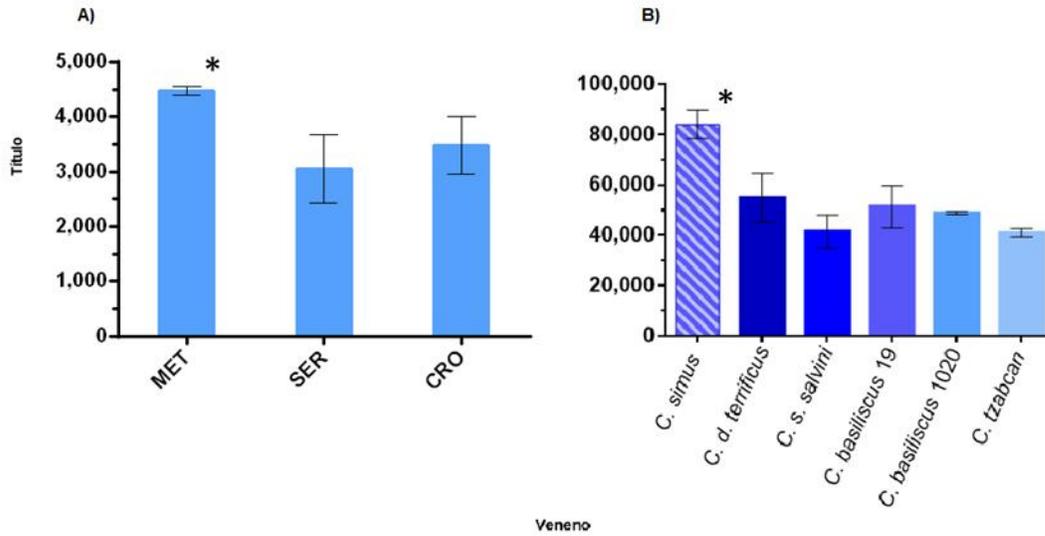
Toxina	Título $\mu$ g de Ig anti-crotoxina (ELISA)	R <sup>2</sup>	I.C. 95%	Neutralización de actividad
Crotoxina sub. B	0.496	0.999	0.46 a 0.53	Sí
Crotamina	14.96	0.999	13.32 a 16.8	No

**Figura 23. Títulos de ELISA y neutralización de actividad de Ig anti-crotoxina hacia la sub. B de crotoxina y crotamina purificada del veneno de *C. d. terrificus*.** A) Ajuste sigmoideal dosis-respuesta de absorbancias obtenidas por ELISA. B) Valores de título en  $\mu$ g Ig anti-crotoxina, valores de intervalo de confianza (I.C.) y coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>). Neutralización de actividad de toxinas. 10  $\mu$ g de crotamina retados con 450  $\mu$ L de pool de suero y 70  $\mu$ g de anticuerpos anti-crotoxina/ratón.

## 10.9 Reconocimiento y neutralización del pool de suero hacia el veneno homólogo y venenos heterólogos

Las evaluaciones de reconocimiento y neutralización del pool de suero (última sangría) se muestran en la figura 24. El valor de título hacia las familias proteicas más importantes del inmunógeno fueron muy cercanos para las serinoproteasas y la sub. B de crotovina, los cuales no mostraron diferencias estadísticas significativas ( $P>0.05$ ), mientras que el título de reconocimiento hacia las metaloproteasas permaneció por encima de las otras dos familias proteicas evaluadas. Por otro lado, el valor de título de reconocimiento del pool de sueros hacia el veneno completo homólogo fue alto y mostró diferencias estadísticamente significativas ( $P<0.05$ ) con un valor de 84,108, mientras que el valor de título más bajo se presentó hacia el veneno de *C. tzabcan* (40,958), seguido de *C. s. salvini* (41,516) y *C. basiliscus* 1020 (48,886). Finalmente, los venenos de *C. basiliscus* 19 y *C. d. terrificus* fueron reconocidos por el mismo pool de sueros con valores de título de 51,334 y 54,516, respectivamente.

Una vez realizados los ensayos de reconocimiento, se procedió a calcular la potencia neutralizante del pool de suero retando cantidades diferentes preincubadas con  $3DL_{50}$  fijas de cada veneno (Figura 24.C). Así, todos los venenos fueron neutralizados en diferente magnitud, a excepción del veneno de *C. tzabcan* con el cual, aún cuando se evaluó con un máximo de volumen de suero (425  $\mu$ L) e inclusive contra  $2DL_{50}$  del veneno no se logró obtener porcentajes de sobrevida. Con respecto a los venenos neutralizados, se obtuvieron valores muy bajos de  $DE_{50}$  para el veneno homólogo (7.9  $\mu$ L/ $3DL_{50}$ ) seguido del veneno de *C. s. salvini* (13  $\mu$ L/ $3DL_{50}$ ) y *C. basiliscus* 1020 (28.9  $\mu$ L/ $3DL_{50}$ ), mientras que, interesantemente, los valores más altos de  $DE_{50}$  se obtuvieron para aquellos venenos con crotamina: *C. basiliscus* 19 (37.2  $\mu$ L/ $3DL_{50}$ ) y *C. d. terrificus* (56.7  $\mu$ L/ $3DL_{50}$ ). Asimismo, tomando en cuenta la concentración de Ig anti-*C. simus* en el pool de suero calculada anteriormente (0.84 mg/mL), se realizó la conversión para obtener los mg de estos anticuerpos que neutralizan 1 mg del veneno completo. Los valores obtenidos con esta conversión indican, ordenados de manera descendente, una mayor cantidad de anticuerpos necesarios para la neutralización de: *C. d. terrificus* > *C. basiliscus* 19 > *C. s. salvini* > *C. simus* > *C. basiliscus* 1020.



c)

Veneno	Título (ELISA)	3DL <sub>50</sub> i.v. (µg/ratón)	DE <sub>50</sub> i.v. (µL de suero/3DL <sub>50</sub> )	DE <sub>50</sub> i.v. (DL <sub>50</sub> /mL de suero)	DE <sub>50</sub> i.v. (mg de Ig anti- <i>C. simus</i> / mg veneno)
<i>C. simus</i>	84,108	9	7.9 (7.3 a 8.6)	380	0.7
<i>C. d. terrificus</i>	54,890	9	56.7 (56.3 a 57)	53	5.3
<i>C. s. salvini</i>	41,516	8.2	13 (12.3 a 13.8)	231	1.3
<i>C. basiliscus 19 +</i>	51,334	15.9	37.2 (36.3 a 38.1)	81	2
<i>C. basiliscus 1020 -</i>	48,886	53.8	28.9 (26.9 a 31)	104	0.4
<i>C. tzabcan</i>	40,958	467.7	> 425	N.D.	N.D.

**Figura 24. Reconocimiento y neutralización del pool de suero hacia veneno homólogo y heterólogos.** A) Títulos de reconocimiento (ELISA) hacia las familias proteicas purificadas del veneno de *C. simus* B) Títulos de reconocimiento (ELISA) hacia el homólogo y venenos heterólogos. C) Actividad cruzada de reconocimiento y neutralización del pool de suero hacia todos los venenos.

\*: Diferencia significativa con n=2 ( $P < 0.05$ ); +: veneno con 28.8% crotamina y 6.8% crotoxina; -: veneno con 0% crotamina y 6.1% crotoxina; N.D.: No determinado; i.v.: inyección intravenosa; ( a ): intervalos de confianza 95%.

### 10.10 Ensayo rescate tras envenenamiento experimental por *C. simus*

Con el objeto de simular la condición de aplicación de antiveneno después de determinado tiempo de evolución de un envenenamiento por *C. simus*, se realizaron experimentos de rescate evaluando un antiveneno comercial y el pool de suero de conejos en un modelo murino. Así, en la figura 25 se puede apreciar que las potencias neutralizantes en tiempo 0 (preincubación) de ambos antivenenos fue muy parecida con valores de 5 y 7.9  $\mu\text{L}/3\text{DL}_{50}$  para el antiveneno Antivipmyn® y el pool de suero de conejos, respectivamente. Asimismo, la capacidad de inhibición de la letalidad después de 5 minutos de un envenenamiento por  $3\text{DL}_{50}$  del veneno de *C. simus* por ratón, fue muy semejante para ambos antivenenos con valores por encima de 400  $\mu\text{L}/\text{ratón}$ . No obstante, ninguno de los dos antivenenos pudo neutralizar la misma dosis de veneno tras 15 y 50 minutos de envenenamiento ya que, aún retando con el máximo de antiveneno (500  $\mu\text{L}$ ), los ratones presentaban los mismos patrones de envenenamiento que el control negativo con puro veneno: parálisis flácida a los 100 min y, eventualmente, aunque con retraso, la muerte. Es importante señalar que el grupo control inoculado solamente con PBS no mostró mortalidad en tiempo cero ni en los diferentes tiempos de rescate.

		Tiempo de envenenamiento (min) por <i>C. simus</i> $3\text{DL}_{50\text{i.v.}}/\text{ratón}$			
		0 (Preincubación)	5	15	50
$\text{DE}_{50\text{i.v.}}$ ( $\mu\text{L}/3\text{DL}_{50\text{i.v.}}$ )	Antivipmyn®	5 (4 a 6)	443.5 (417 a 471)	>500	>500
	Pool de suero de conejos	7.9 (7.3 a 8.6)	400-500	>500	>500

**Figura 25. Ensayo rescate con antiveneno a diferentes tiempos tras envenenamiento por  $3\text{DL}_{50}$  del veneno de *C. simus*.**  $\text{DE}_{50}$  por preincubación de veneno y antiveneno (tiempo 0): Incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 min utilizando 9  $\mu\text{g}$  del veneno de *C. simus* mezclado con Antivipmyn® o pool de suero de conejos en PBS para completar un volumen final de inyección de 0.5 mL/ratón.  $\text{DE}_{50}$  tipo rescate, utilizando Antivipmyn® o pool de suero de conejos, tras 5, 15 y 50 min de envenenamiento por  $3\text{DL}_{50}/\text{ratón}$  del veneno de *C. simus*.

i.v.: inyección intravenosa; ( a ): intervalos de confianza 95%.

## 11. Discusión

### 11.1 Perfiles electroforéticos de venenos

En el caso particular del continente americano, el accidente ofídico ha resultado en un incidente delicado de tratar dada la gran diversidad de especies de serpientes, principalmente de la familia Viperidae, como es el caso de las serpientes endémicas del continente americano pertenecientes al género *Crotalus*. Asimismo, la variación de los venenos a nivel inter e intraespecífico es un tema que ha causado interés científico por la investigación biomédica con el objetivo de mejorar los antivenenos, pero también por las dicotomías de magnitud de envenenamiento que se pueden presentar en casos de ofidismo.

De esta manera, en la presente investigación se emplearon los venenos de dos especies bien estudiadas como es el caso de *C. simus* (Neri *et al.*, 2013; Valdés, 2013; Durban *et al.*, 2017; Hernández, 2017) y *C. d. terrificus* (de Roodt, 2002; Oguiura *et al.*, 2009; Calvete *et al.*, 2010), además de 3 venenos parcialmente estudiados: *C. tzabcan* (Neri *et al.*, 2013; Durban *et al.*, 2017), *C. basiliscus* (Segura *et al.*, 2017) y *C. s. salvini* (Dobson *et al.*, 2017).

En los perfiles electroforéticos de cada veneno se presenciaron los componentes proteicos descritos por los autores anteriormente mencionados. No obstante, destacan los venenos de *C. basiliscus* ya que ambos individuos, entre otros componentes, presentaron crotoxina, pero la muestra 19 (Colima) también presentó crotamina debido a que el efecto foca fue observado en los ensayos con ratones, resultado que se corrobora con una determinación del 28.8% de esta miotoxina para dicha muestra de veneno mediante RP-HPLC (Neri, comunicación personal, 8 de Julio del 2017). Estos resultados podrían ser homólogos con los patrones de presencia de crotamina en las subespecies de *C. durrisus* en Suramérica, debido a que se ha reportado que poblaciones con distribución simpátrida mantienen un número variable de copias del gen codificante de crotamina (Crt-p1) en la región telomérica del cromosoma 2, mientras que las poblaciones en distribución peripátrida no presentan copias de dicho gen y, por lo tanto, no contienen crotamina en su veneno (Oguiura *et al.*, 2009). Sin embargo, el veneno de *C. basiliscus* debe ser más estudiado.

## 11.2 Evolución de títulos de reconocimiento hacia el veneno completo de *C. simus*

Dada las variaciones importantes en los venenos, resulta fundamental formular las mejores mezclas de inmunógenos que, en conjunto, generen anticuerpos neutralizantes del veneno de diferentes especies y sus poblaciones. Una alternativa para solucionar este problema, ha sido evaluar la respuesta humoral que genere un animal hiperinmunizado con los venenos comúnmente empleados en la generación de antivenenos comerciales procedentes de diferentes regiones geográficas e inclusive, actualmente, se busca la manera de incluir el veneno de neonatos de estas especies en la mezcla de inmunógenos (Neri, comunicación personal, 15 de noviembre del 2017).

En el presente trabajo se evaluó la capacidad del inmunógeno *C. simus*, específicamente con distribución en el estado de Veracruz en México, para generar anticuerpos que reconozcan y neutralicen otros venenos del mismo carácter neurotóxico. Además, es importante mencionar que, según nuestro conocimiento, este es el primer estudio de evaluación de la respuesta inmune humoral de un animal inmunizado con el veneno de *C. simus*.

Cabe destacar que durante el esquema de inmunización se emplearon adyuvantes, los cuales tienen la capacidad de formar una emulsión en el sitio de inoculación, lo que genera una lenta liberación del antígeno agilizando su reconocimiento por macrófagos y células dendríticas para su presentación a los linfocitos, además de que se vean implicados en la conversión del antígeno soluble a una forma más viable para fagocitosis por parte de los macrófagos, células dendríticas y células B (Lambrecht *et al.*, 2009).

En cuanto a la evolución de títulos de reconocimiento hacia el veneno completo de *C. simus*, los valores obtenidos en el presente estudio fueron parecidos a los reportados por Clissa *et al.* (1999), quienes reportan valores de título de 48,000 en sueros de conejos inmunizados con el veneno de *C. d. terrificus*. Sin embargo, nuestros valores fueron muy bajos respecto a los reportados por Fusco *et al.* (2015), quienes inmunizaron conejos con el veneno completo de *C. d. terrificus* y reportaron valores de título de hasta  $1 \times 10^6$  en la última sangría obtenida al día 150 tal como se hizo en este estudio. Lo anterior puede deberse a que en la investigación realizada por Fusco *et al.* (2015) se utilizaron 20 y 80

mg/conejo de veneno totales durante todo el esquema de inmunización, mientras que en el presente estudio se emplearon un total de 13.88 mg/conejo. Asimismo, es importante destacar que existe variación individual de generación de anticuerpos inclusive en animales de laboratorio, ya sea por un compromiso de respuesta inmune debido a una lesión local no determinada, o a cierto grado de estrés provocado por la inyección frecuente de estos organismos (Olvera, comunicación personal, 4 de noviembre del 2017).

### **11.3 Evolución de títulos de reconocimiento hacia familias proteicas de *C. simus***

Dadas las dosis tan pequeñas de partida en el esquema de inmunización, no se presentaron alteraciones patofisiológicas en los conejos, sino por el contrario, se estimuló una mejor respuesta inmune tras cada inyección. Tal como lo menciona León *et al.* (2011), las inmunizaciones con el veneno completo no garantizan la generación proporcional de anticuerpos específicos hacia cada componente del veneno, debido principalmente, a la concentración nativa en que cada grupo de toxinas se encuentra en el veneno y los pesos moleculares que presentan.

Sin embargo, en esta investigación se detectaron valores de título más altos para las metaloproteasas durante la evolución de la respuesta inmune humoral, así como en la sangría final, a comparación con los dirigidos hacia serinoproteasas y crotoxina. Además, estos datos correlacionaron con los rendimientos obtenidos por inmunopurificaciones de afinidad a partir del suero crudo. Por tal motivo, lo anterior indica que el peso molecular pudo haber sido el principal factor para la generación de anticuerpos hacia cada componente del veneno de *C. simus* bajo las condiciones de la presente investigación.

Aunado a lo descrito anteriormente, la baja en los valores de título en la última sangría hacia las familias proteicas que componen el veneno homólogo, también puede ser resultado de la elevada producción de anticuerpos policlonales, mismos que fueron cada vez más específicos, mediante la selección clonal de células plasmáticas, hacia los componentes del veneno conforme avanzaban los refuerzos (inmunizaciones).

### 11.3 Purificación de anticuerpos hacia el veneno de *C. simus*

Para definir la proporción de Ig anti-*C. simus* presente en el suero, primero se determinó la proporción de Ig's generales que se presentaban en el mismo suero de conejo. El valor de concentración proteica de estas moléculas fue de 2.8 mg/mL de suero, lo cual fue cercano con el valor reportado en la literatura para estos organismos (de manera natural) el cual es de ~5-20 mg/mL de suero (Mage, 1998).

Por otro lado, la proporción de anticuerpos específicos hacia el veneno de *C. simus* observados en el presente estudio (30%), presenta mucho parecido con aquel obtenido en caballo (~28%) (Alagón, comunicación personal, 21 de noviembre del 2017). Lo anterior, tiene mucha relevancia no sólo por lo ideal que puede ser el modelo de conejo para estudiar inmunogenicidad de venenos neurotóxicos, sino también por la amplia gama de ventajas que brinda este modelo para trabajo de laboratorio a comparación de un caballo.

La determinación de anticuerpos específicos hacia cada familia proteica del veneno de *C. simus*, se determinó purificando dichos anticuerpos directamente desde el suero crudo y a partir de 1.5 mg Ig anti-*C. simus* previamente purificados por afinidad. Así, es importante destacar que ambas vías de purificación mostraron diferencias, lo cual puede ser debido a que en la purificación a partir de Ig anti-*C. simus*, existió cierta magnitud de error por el hecho del probable pegado diferencial de los anticuerpos hacia los diferentes componentes del veneno acoplados a la resina de sepharosa, por lo que las proporciones calculadas con menor error fueron las realizadas a partir de suero crudo.

En cuanto a los porcentajes de anticuerpos hacia cada una de las tres familias proteicas más importantes del veneno de *C. simus* estimados por cromatografía de afinidad, se puede observar cierto grado de correlación con la detección de títulos de reconocimiento por el ensayo ELISA, sin embargo, en esta última prueba se debe de tomar en cuenta el pegado diferencial que posiblemente mostraron los distintos componentes del veneno a las placas, y con ello el valor de título fue menor cuando se sensibilizó con cada familia proteica, que cuando se sensibilizó con el veneno completo. No obstante, el hecho de que el reconocimiento hacia el veneno completo haya sido hasta 8 veces mayor que la suma del reconocimiento hacia las tres principales familias proteicas, que juntas

representan el 72.1% del veneno completo (Neri *et al.*, 2013), nos hace pensar que la cantidad de epítopes brindados por el resto del veneno fue muy grande, y que ese pequeño porcentaje pudo ser definitivo en el aumento de señal en el ensayo ELISA, porque además de acuerdo a las proporciones de Ig obtenidas por afinidad, el suero crudo contenía hasta 16% de anticuerpos hacia los otros componentes del veneno. Estos resultados confirman la importancia del uso del veneno completo para generar antivenenos antiviperinos comerciales durante todo el esquema de inmunización, aun cuando, actualmente, ya se han propuesto otro tipo de estrategias para este fin (Fusco *et al.*, 2015).

#### **11.4 Reconocimiento conformacional y lineal cruzado hacia venenos heterólogos**

La actividad inmunológica cruzada de antivenenos hacia venenos de serpientes que no son empleados en el proceso de inmunización (heterólogos), es común en serpientes relacionadas taxonómicamente debido a la gran cantidad de epítopes antigénicos conservados en los venenos de estos reptiles (Mebs y Kornalik, 1989; Harrison *et al.*, 2003, Casasola *et al.*, 2009). Así, en este estudio los anticuerpos anti-*C. simus* reconocieron a los venenos de las especies: *C. basiliscus*, *C. tzabcan*, *C. d. terrificus*, que se ha sugerido forman parte del complejo evolutivo *durissus* en el cual también se incluye a *C. simus* (Wüster *et al.*, 2005). En contraste, estos anticuerpos también reconocieron a *C. s. salvini*, aun perteneciendo a un clado diferente que contiene a la especie altamente neurotóxica *C. tigris* (Blair y Sánchez, 2016; Calvete *et al.*, 2012).

En el ensayo de inmunotransferencia por Western-blot de los venenos heterólogos utilizando Ig anti-*C. simus*, se puede observar que la mayoría de los componentes de los venenos fueron reconocidos. También se encontró reconocimiento cruzado hacia crotamina del veneno de *C. d. terrificus*, molécula que no presenta el veneno de *C. simus* con distribución en el estado de Veracruz, aunque se ha detectado esta miotoxina en los venenos de la misma especie con distribución en el estado de Oaxaca (Neri *et al.*, 2013). Sin embargo, dicha detección no fue evidente para la crotamina de *C. basiliscus* 19, aun cuando en el laboratorio se ha determinado que el veneno de este individuo tiene una concentración de crotamina de hasta 28.8% (Neri, comunicación personal, 8 de Julio del 2017). Lo anterior indica que posiblemente, las moléculas de crotamina de *C. basiliscus*

presentan una estructura molecular distinta, aunque actividad biológica similar a la de *C. d. terrificus*, es decir, pudiera tratarse de moléculas crotamine-like.

### 11.5 Reconocimiento conformacional y lineal cruzado hacia crotamina

Con el objetivo de confirmar el reconocimiento cruzado hacia crotamina, se realizaron inmunotransferencias con los anticuerpos anti-crotoxina previamente purificados y anticuerpos monoclonales hacia crotamina disponibles en el laboratorio. Al respecto, este ensayo ayudó a determinar que entre la sub. B de crotoxina y la crotamina, existe al menos un epítoto compartido, ya que una alineación de residuos realizada con el programa Clustal Omega<sup>®</sup>, tomando en cuenta los accesos NCBI<sup>®</sup> de AAF34911.1 y P0CG56.1, para crotamina y la sub. B de crotoxina, respectivamente, arrojó un 28.3% de identidad entre ambas toxinas. Sin embargo, esta identidad no se encuentra en una región específica, son aminoácidos “salteados”, por lo cual este porcentaje no puede ser considerado real. Además, las secuencias amino terminales de ambas toxinas son totalmente distintas, por lo que como se puede ver en la figura 26, más bien existen sitios salteados de pocos aminoácidos con características fisicoquímicas semejantes, y son éstos los que determinan dicho grado de similitud entre ambas moléculas, provocando que anticuerpos generados hacia una, también reconozcan a la otra molécula y viceversa, presentandose un ejemplo de mimetismo antigénico entre estas toxinas.

```

Crotamina      MKILYLLFAFLF-LAFLSE----PGNAYKQC-HKKGGHCFPK---EKICLPPSSDFGKM-
Crotoxina      -----HLLQFNKMIKFETRKNVAPFYAFYGCYCGWGGQGRPKDATDRCCFVHDCCYGKLA
                *: *      : * :.      * * : *      **: **      :: * :      .. :** :

Crotamina      DCRWRWKCKKG--SGK-----
Crotoxina      KCNTKWDIYRYSLKSGYITCGKGTWCEEQICECDRVAAECLRRSLSTYKNGYMFYPDSRC
                .* :.* :.      **

Crotamina      -----
Crotoxina      RGPSETC

```

Figura 26. Alineamiento de residuos de la sub. B de crotoxina y crotamina por Clustal Omega<sup>®</sup>.

Por otro lado, el reconocimiento por ELISA de los anticuerpos policlonales anti-crotoxina hacia la crotamina, demostró que el o los epítopes compartidos entre ambas moléculas también conservan una estructura conformacional. Sin embargo, interesantemente estos anticuerpos no neutralizaron la actividad característica de esta miotoxina, cuya aparición es inmediata segundos después de la inoculación a un ratón, lo que quiere decir que los anticuerpos no reconocieron la secuencia de residuos Tyr1 y Lys2, que junto con Arg31 y Trp32, están involucrados en la interacción de crotamina con los canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje 1.1-3 (Peigneur *et al.*, 2012).

La nula neutralización de la actividad de crotamina por anticuerpos anti-crotoxina, puede explicarse por la estructura molecular y origen de ambas toxinas que se ve reflejado en sus actividades biológicas totalmente distintas. Por un lado, crotamina es una miotoxina compuesta por 42 aminoácidos, tres puentes disulfuro en un plegamiento tipo  $\beta$ -defensina (Laure, 1975; Coronado *et al.*, 2013), además de que se ha sugerido que esta miotoxina tiene origen evolutivo de péptidos antimicrobianos expresados en el cerebro del ancestro común del clado toxicofera (Fry, 2005; Whittington *et al.*, 2006). Mientras que, por otro lado, la crotoxina es un compuesto heterodimérico conformado por dos subunidades en asociación no covalente: una PLA<sub>2</sub> básica de 122 aminoácidos con actividad enzimática (subunidad B) y una PLA<sub>2</sub> ácida no enzimática ausente de toxicidad llamada crotapotina (subunidad A) (Doley y Kini, 2009), ambas moléculas de crotoxina tienen naturaleza PLA<sub>2</sub> del grupo II y se ha sugerido que evolucionaron independientemente, a partir de un péptido no tóxico (Aird *et al.*, 1985).

Finalmente, ningún otro trabajo había reportado una compartición antigénica entre la sub. B de crotoxina y crotamina, lo que hace que los resultados observados en la presente investigación tengan mucha relevancia en términos bioquímicos, dado que, en la generación de un anticuerpo monoclonal hacia una, u otra de estas moléculas, dicho anticuerpo no debería reconocer este epítope compartido para su adecuada utilización en diferentes ensayos inmunoquímicos como la detención/cuantificación de crotamina o crotoxina en un veneno de vipérido que pudiera contener ambas moléculas.

## 11.6 Potencia neutralizante del suero hacia venenos

De acuerdo a estándares de la organización mundial de la salud (WHO, 2016), la estimación de la DE<sub>50</sub> por la técnica de preincubación de veneno y antiveneno es la técnica más apropiada para la evaluación preclínica de los antivenenos comerciales. Así, en el presente estudio se logró neutralizar la letalidad y neurotoxicidad de los venenos de *C. simus*, *C. basiliscus*, *C. s. salvini* e inclusive de la víbora de cascabel argentina *C. d. terrificus*. Cabe destacar el hecho de que, durante los ensayos realizados para la determinación de la DE<sub>50</sub> hacia los venenos con crotamina (*C. d. terrificus* y *C. basiliscus* 19), la acción de esta miotoxina fue evidente para todos los casos, situación que se puede explicar por lo ya mencionado anteriormente. Sin embargo, la potencia neutralizante del pool de suero hacia el veneno homólogo fue mayor a la reportada por Fusco *et al.* (2015), ya que estos autores al inmunizar conejos con el veneno de *C. d. terrificus*, determinaron una DE<sub>50</sub> de 50 mg de Ig/mg de veneno hacia este veneno, mientras que en nuestra investigación se estimó una DE<sub>50</sub> de 0.7 y 5.3 mg de Ig/mg de veneno hacia el veneno de *C. simus* y *C. d. terrificus*, respectivamente, lo cual puede explicarse porque la letalidad de estos venenos depende en gran medida de la cantidad de crotoxina, y en base a nuestras determinaciones, el pool de suero de conejos evaluado en este estudio contenía hasta 21% de anticuerpos contra esta neurotoxina.

Respecto a la neutralización de los venenos neurotóxicos evaluados, un punto que resulta importante destacar es la efectiva neutralización que presentó el suero de conejo hacia el veneno de la especie *C. s. salvini* cuyo valor de DL<sub>50</sub> fue el más bajo a comparación de los otros venenos, esto posiblemente debido por una alta concentración de crotoxina en este veneno, por tanto, se necesita mayor cantidad de anticuerpos anti-crotoxina para su neutralización. Recientemente, Dobson *et al.* (2017) reportaron que el antiveneno Antivipmyn® no neutraliza la actividad neurótoxica de este veneno en ensayos *ex vivo* al retar 50 µL de antiveneno contra 15 µg de veneno (Dobson *et al.*, 2017). Lo anterior podría ser debido a que los inmunógenos empleados para la generación de este antiveneno comercial son los venenos de *C. simus* y *B. asper*, mientras que en nuestra investigación sólo se empleó el veneno de *C. simus* en el esquema de inmunización, y

como se mencionó anteriormente, los anticuerpos generados hacia crotoxina representaron hasta 21% con respecto a los generados hacia el veneno completo.

De igual manera resulta relevante la neutralización hacia el veneno de *C. basiliscus* ya que en este estudio, el individuo 1020 contiene una concentración de crotoxina muy cercano al veneno estudiado por Segura *et al.* (2017), quienes además no reportaron la presencia de crotamina en su investigación. Sin embargo, en el laboratorio se han descrito individuos de esta especie con crotamina en sus venenos, por lo que se utilizó el veneno del individuo 19 en nuestro estudio, y fue éste más el veneno de *C. d. terrificus*, los venenos que requirieron más mg de Ig anti-*C. simus* para su neutralización. Lo anterior puede ser explicado por la elevada cantidad de crotamina presente en ambos venenos, aunque por el lado de *C. d. terrificus* también es importante señalar la gran proporción de crotoxina presente en su veneno (60%) (Calvete *et al.*, 2010). Por otra parte, el hecho de que fuera requerido menor cantidad de anticuerpos anti-*C. simus* para la neutralización del veneno de *C. basiliscus* 1020 (sin crotamina) a comparación del homólogo, nos habla del elevado parecido entre ambos venenos, coincidiendo con lo reportado por Segura *et al.* (2017). No obstante, resulta interesante el veneno de *C. s. salvini* dada su probable alta proporción de crotoxina, característica que podría ser aprovechada para generar antivenenos más eficientes contra la letalidad de crotálicos neurotóxicos, pero es necesario realizar más estudios con dicho veneno.

Sin embargo, a pesar de ser bien reconocido, el veneno del individuo de *C. tzabcan* no fue neutralizado con el volumen máximo de suero que nos permitió evaluar el ensayo (425  $\mu$ L) e inclusive retando el mismo volumen contra 2 DL<sub>50</sub>, por lo que no se descarta que con cantidades mayores de suero se pudiera neutralizar la letalidad de este veneno. Así, dado que el veneno de *C. tzabcan* fue el menos letal (DL<sub>50</sub>=155.9 $\mu$ g/ratón) comparado con los otros venenos evaluados en el presente estudio, los resultados obtenidos resultan congruentes con lo observado por Sánchez *et al.* (2003), ya que al neutralizar venenos poco letales, no es necesario hacer diluciones del veneno para encontrar la dosis que mata al 50% de la población, por lo que la cantidad de veneno inoculado en 2 ó 3DL<sub>50</sub> resulta muy alta y la cantidad de anticuerpos específicos a retar muy baja. Asimismo, nuestros resultados también coinciden con las dificultades de

neutralización por antivenenos comerciales hacia el veneno de *Atropoides mexicanum* (Antúñez *et al.*, 2010) y *A. nummifer* (García, 2016).

Cabe destacar que, aunque ha sido empleado como inmunógeno en la generación de antivenenos, ningún estudio había sido realizado para medir la actividad cruzada de antivenenos experimentales generados a partir del veneno de *C. simus* hacia el veneno de otras especies con perfil neurotóxico distribuidas en México, aún a pesar de que los antivenenos comerciales generados con este veneno ya habían sido reportados como eficaces en la neutralización de venenos de diferentes especies de vipéridos con distribución en E.E.U.U. (Sánchez *et al.*, 2003; Arce *et al.*, 2003). Por lo tanto, nuestros resultados apoyan la tendencia de utilizar el veneno de *C. simus*, procedente del estado de Veracruz, como inmunógeno con fines de producción de antivenenos para México debido a que el espectro de neutralización de los anticuerpos generados hacia los venenos más letales (neurotóxicos) es relevante.

### **11.7 Ensayo rescate tras envenenamiento experimental por *C. simus***

La evaluación de la efectividad de un antiveneno en fase de producción se ha basado en el clásico ensayo de preincubación del veneno y el antiveneno para su debida inyección en ratones y lectura de supervivencia (WHO, 2016). No obstante, dado que se ha reportado que esta técnica presenta bemoles al momento de estimar la dosis adecuada de administración a un paciente envenenado, se han sugerido los ensayos de tipo rescate como un modelo más próximo a la situación real de un envenenamiento y, con ello, la efectividad de un antiveneno aplicado en determinado tiempo (Baudou *et al.*, 2017).

De este modo, en la presente investigación se realizó un experimento de tipo rescate, utilizando el suero de conejo y un antiveneno comercial, tras diferentes minutos de un envenenamiento con 3DL<sub>50</sub> del veneno de *C. simus*, de igual manera en un modelo murino. El primer paso consistió en determinar la DE<sub>50</sub> de Antivipmyn® mediante la técnica de preincubación que fue equivalente al tiempo cero en el rescate. Los resultados demostraron que la potencia neutralizante en tiempo cero del antiveneno experimental (DE<sub>50</sub>= 7.9 µL/3DL<sub>50</sub>) y el comercial (DE<sub>50</sub>= 5 µL/3DL<sub>50</sub>) fue muy cercana, datos que coinciden con lo reportado por Rodríguez *et al.* (2006) quienes encontraron valores muy

similares de potencia neutralizante hacia el veneno completo de *C. d. terrificus* utilizando el antiveneno comercial anticrotálico de Argentina y suero de conejo inmunizado con PLA<sub>2</sub> (incluyendo crotoxina) del veneno de la misma especie.

Más adelante, nuestros hallazgos demostraron que existe una brecha de magnitud muy agravada conforme evoluciona el envenenamiento de la especie *C. simus*, debido a que la DE<sub>50</sub> del antiveneno Antivipmyn® en tiempo 0 (preincubación) fue hasta 89 veces menor a la cantidad de este antiveneno necesario para salvar al 50% de la población tras 5 minutos de la administración de 3DL<sub>50</sub> de este veneno. Cabe destacar que un patrón semejante fue observado para el rescate empleando el pool de suero de conejo.

Estos resultados sugieren que el tiempo puede resultar un factor crucial para la neutralización de venenos de vipéridos neurotóxicos, debido a que se sabe que la cantidad de crotoxina en circulación sanguínea de un individuo envenenado por *C. d. terrificus* disminuye significativamente a las 4 horas de la mordedura (Amaral *et al.*, 1997). Asimismo, se ha observado en el laboratorio, que la crotoxina llega a sus sitios diana en cuestión de segundos en un modelo de envenenamiento por *C. simus* con borregos, desapareciendo completamente del torrente sanguíneo (Neri, comunicación personal, 27 de noviembre del 2017). Por lo tanto, los datos de estos reportes correlacionan con lo observado en el presente estudio, ya que probablemente para los tiempos mayores a 5 min, la crotoxina ya se encontraba profundamente distribuida en sus tejidos diana, específicamente en los receptores pre-sinápticos de la unión neuromuscular.

Los resultados obtenidos en nuestra investigación también demuestran que un envenenamiento real por *C. simus* resultaría muy difícil de atender, situación que podría ser parecida a los otros venenos de carácter neurotóxico. No obstante, esto no sucede en venenos no neurotóxicos, ya que un estudio elaborado por Vergara-Bahena (2010), demostró que la DE<sub>50</sub> de Antivipmyn® mantiene valores muy cercanos entre el tiempo 0 (DE<sub>50</sub>=201µL/3DL<sub>50</sub>) y tras 8 min (DE<sub>50</sub>=228µL/3DL<sub>50</sub>) de un envenenamiento experimental en ratones con el veneno de *C. atrox*.

A la par con nuestra investigación, un artículo reciente ha demostrado que la potencia neutralizante hacia el veneno de *C. d. terrificus* por parte de un antiveneno anticrotálico producido por la empresa Henceforth INPB®, disminuye hasta 35 órdenes de magnitud

en experimentos de tipo rescate a los 30 min en comparación con los experimentos clásicos de preincubación (Baudou *et al.*, 2017). Sin embargo, cabe destacar que el hecho de que en nuestras manos el valor de DE<sub>50</sub> en tiempo 0 haya sido hasta 89 veces menor que el calculado en el rescate a los 5 min, fue debido a la ruta de inyección intravenosa para provocar el envenenamiento, ya que los componentes del veneno no se enfrentaron a ninguna barrera fisiológica y, directamente se encontraron en flujo sanguíneo, facilitando de esta manera, su acción sobre sus sitios diana. Por lo tanto, sería necesario realizar otros exoperimentos de rescate en los que el veneno sea inoculado por vía intramuscular o intraperitoneal.

## 12. Conclusiones

- ✓ El veneno de *C. simus* generó altos títulos de anticuerpos.
- ✓ Las familias proteicas de las metaloproteasas generaron títulos de reconocimiento por encima de las serinoproteasas y crotolina, familias proteicas donde el valor de título fue muy parecido.
- ✓ La familia proteica de las metaloproteasas mostró mayor capacidad antigénica en comparación a las otras dos familias más importantes del veneno de *C. simus*.
- ✓ Los anticuerpos policlonales de conejo anti-crotolina reconocen a la crotamina por ELISA y Western-blot, sin embargo, no neutralizan la actividad biológica.
- ✓ Los valores de título de reconocimiento hacia el veneno de *C. simus* fue mayor a los obtenidos para los venenos heterólogos.
- ✓ El veneno de *C. simus* resultó ser buen inmunógeno para generar anticuerpos neutralizantes de la actividad letal de los venenos heterólogos neurotóxicos evaluados.
- ✓ Los venenos con crotamina analizados en este estudio, requirieron mayor cantidad del antiveneno experimental para ser neutralizados.
- ✓ La letalidad del veneno no neurotóxico de *C. tzabcan* no fue neutralizada por el suero de conejos.

- ✓ El experimento de rescate con el suero de conejos y un antiveneno comercial comprobó la dificultad de neutralizar la alta toxicidad del veneno de *C. simus* cuando éste es administrado intravenosamente.
- ✓ Los conejos son buenos productores de anticuerpos contra el veneno de vipéridos con componentes neurotóxicos.

### 13. Perspectivas

- Realizar un estudio similar con el veneno de *B. asper*.
- Realizar el estudio de la evolución de títulos, implementando el veneno de crías de *C. simus* en el esquema de inmunización y comparar con adultos.
- Determinar el o los epítotope (s) compartido (s) entre crotoxina y crotamina.
- Determinar la proporción de anticuerpos en antivenenos comerciales hacia las principales familias proteicas de *C. simus* y *B. asper*.
- Realizar más experimentos tipo rescate contra la letalidad de otros vipéridos neurotóxicos de México y comparar diferentes vías de administración del veneno y antiveneno.

## 14. Literatura citada

Arbuckle, K. (2015). Evolutionary context of venom in animals. *Evolution of Venomous Animals and Their Toxins*, 1-23.

Aird, S. D., Kaiser, I. I., Lewis, R. V., & Kruggel, W. G. (1985). Rattlesnake presynaptic neurotoxins: primary structure and evolutionary origin of the acidic subunit. *Biochemistry*, 24(25), 7054-7058.

Amaral, C. F., Campolina, D., Dias, M. B., Bueno, C. M., Chávez-Olortegui, C., Penaforte, C. L., Diniz, C. R. & Rezende, N. A. (1997). Time factor in the detection of circulating whole venom and crotoxin and efficacy of antivenom therapy in patients envenomed by *Crotalus durissus*. *Toxicon*, 35(5), 699-704.

Antúñez J., Fernández J., Lomonte B., Angulo Y., Sanz L., Pérez A., Calvete J., & Gutiérrez J. (2010). Antivenomics of *Atropoides mexicanus* and *Atropoides picadoi* snake venoms: Relationships to the neutralization of toxic and enzymatic activities. *Journal of Venom Research*. *Journal of Venom Research*, 1: 8 – 17.

Arce, V., Rojas, E., Ownby, C. L., Rojas, G., & Gutiérrez, J. M. (2003). Preclinical assessment of the ability of polyvalent (Crotalinae) and anticoral (Elapidae) antivenoms produced in Costa Rica to neutralize the venoms of North American snakes. *Toxicon*, 41(7), 851-860.

Arroyo, C., Solano, S., Segura, Á., Herrera, M., Estrada, R., Villalta, M., Vargas, M., María, G. J., & León, G. (2017). Cross-reactivity and cross-immunomodulation between venoms of the snakes *Bothrops asper*, *Crotalus simus* and *Lachesis stenophrys*, and its effect in the production of polyspecific antivenom for Central America. *Toxicon*, 138, 43-48.

Baudou, F. G., Litwin, S., Lanari, L. C., Laskowicz, R. D., Damin, C. F., Chippaux, J. P., & de Roodt, A. R. (2017). Antivenom against *Crotalus durissus terrificus* venom: Immunochemical reactivity and experimental neutralizing capacity. *Toxicon*, 140, 11-17.

Beghini, D. G., Hernandez-Oliveira, S., Rodrigues-Simioni, L., Novello, J. C., Hyslop, S., Marangoni, S. (2004). Anti-sera raised in rabbits against crotoxin and phospholipase A 2 from *Crotalus durissus cascavella* venom neutralize the neurotoxicity of the venom and crotoxin. *Toxicon*, 44(2), 141-148.

Bénard-Valle, M., Neri-Castro, E.E., Fry, B.G., Boyer, L., Cochran, C., Alam, M., Jackson, N. W., Paniagua, D., Olvera-Rodríguez, F., Koludarov, I., Sunagar, K. & Alagón, A.. Antivenom research and development. En: Fry, B. G. (2015). *Venomous reptiles and their toxins: evolution, pathophysiology, and biodiscovery*. Oxford University.

Blair, C., & Sánchez-Ramírez, S. (2016). Diversity-dependent cladogenesis throughout western Mexico: evolutionary biogeography of rattlesnakes (Viperidae: Crotalinae: Crotalus and Sistrurus). *Molecular phylogenetics and evolution*, 97, 145-154.

Braud, S., Bon, C., Wisner, A. (2000). Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie*, 82(9), 851-859.

Caldwell J.P., Vitt L. J. Herpetology. An introduction of Amphibians and Reptiles fourth edition. ELSEVIER. USA. 2014.

Calmette, A. (1895). Contribution a l'étude des venins. *Ann InstPasteur*, 9:225–251.

Calvete, J. J. (2013). The continuing saga of snake venom disintegrins. *Toxicon*, 62, 40-49.

Calvete, J. J., Pérez, A., Lomonte, B., Sánchez, E. E., & Sanz, L. (2012). Snake venomomics of *Crotalus tigris*: the minimalist toxin arsenal of the deadliest nearctic rattlesnake venom. Evolutionary clues for generating a pan-specific antivenom against crotalid type II venoms. *Journal of proteome research*, 11(2), 1382-1390.

Calvete, J. J., Sanz, L., Cid, P., De La Torre, P., Flores-Díaz, M., Dos Santos, M. C., Borges, A., Bremo, A., Angulo, Y., Lomonte, B., Alape-Girón, A. & María Guitiérrez, J. (2010). Snake venomomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive paedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. *Journal of proteome research*, 9(1), 528-544.

Calvete, J.J., Borges, A., Segura, A., Flores-Díaz, M., Alape-Girón, A., Gutiérrez, J.M., Diez, N., De Sousa, L., Kiriakos, D., Sánchez, E., Faks, J.G., Escolano, J., Sanz, L. (2009). Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: contributing to its taxonomy and snakebite management. *J. Proteomics* 72, 227–240.

Campbell J. A., Lamar W. W. (1989). The Venomous Reptiles of Latin America. Comstock, Ithaca and London.

Campbell J. A., Lamar W. W. (2004). The venomous Reptiles of the Western Hemisphere. Vol. 2. Cornell University Press. China.

Casasola, A., Ramos-Cerrillo, B., de Roodt, A. R., Saucedo, A. C., Chippaux, J. P., Alagón, A., y Stock, R. P. (2009). Paraspecific neutralization of the venom of African species of cobra by an equine antiserum against *Naja melanoleuca*: a comparative study. *Toxicon*, 53(6), 602-608.

Chang, C.C., Lee, J.D. (1977). Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venoms, is a presynaptic toxin acting like b-Bungarotoxin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 296, 159–168.

Chippaux, J. P. (1998). Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bulletin of the World Health Organization*, 76(5), 515.

Chippaux, J. P. (2017). Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(6).

Clissa, P. B., do Nascimento, N., & Rogero, J. R. (1999). Toxicity and immunogenicity of *Crotalus durissus terrificus* venom treated with different doses of gamma rays. *Toxicon*, 37(8), 1131-1141.

Coronado, M. A., Gabdulkhakov, A., Georgieva, D., Sankaran, B., Murakami, M. T., Arni, R. K., & Betzel, C. (2013). Structure of the polypeptide crotamine from the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 69(10), 1958-1964.

de Roodt, A. R. Estudio inmunológico del veneno de serpientes de importancia sanitaria de la Argentina. (2002). Tesis de Doctorado. Universidad de Buenos aires. Argentina. 320 p.

de Roodt, A. R., Estévez-Ramírez, J., Paniagua-Solís, J. F., Litwin, S., Carvajal-Saucedo, A., Dolab, J. A., Robles-Ortiz L.E., & Alagón, A. (2005). Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México. *Gaceta médica de México*, 141(1), 13-21.

Dobson, J., Yang, D. C., Op den Brouw, B., Cochran, C., Huynh, T., Kurrupu, S., Sánchez, E. E., Massey, D. J., Baumann, K., Jackson, T. N. W., Nouwens, A., Josh, P., Neri-Castro, E., Alagón, A., Hodgson, W.C., & Fry, B.G. (2017). Rattling the border wall: Pathophysiological implications of functional and proteomic venom variation between Mexican and US subspecies of the desert rattlesnake *Crotalus scutulatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*.

Doley, R., & Kini, R. M. (2009). Protein complexes in snake venom. *Cellular and molecular life sciences*, 66(17), 2851-2871.

Du, X. Y. & Clemetson, K. J. (2002). Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon*, 40(6), 659-665

Durban, J., Sanz, L., Trevisan-Silva, D., Neri-Castro, E., Alagón, A., & Calvete, J. J. (2017). Integrated Venomics and Venom Gland Transcriptome Analysis of Juvenile and Adult Mexican Rattlesnakes *Crotalus simus*, *C. tzabcan*, and *C. culminatus* Revealed miRNA-modulated Ontogenetic Shifts. *Journal of Proteome Research*, 16(9), 3370-3390.

Escalante, T., Rucavado, A., Fox, J. W., & Gutiérrez, J. M. (2011). Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *Journal of proteomics*, 74(9), 1781-1794.

Faure, G., Xu, H., & Saul, F. A. (2011). Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric  $\beta$ -neurotoxin. *Journal of molecular biology*, 412(2), 176-191.

Flores-Villela, O., & García-Vázquez, U. O. (2014). Biodiversidad de reptiles en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85, 467-475.

Fox, J. W., & Serrano, S. M. (2005). Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*, 45(8), 969-985.

Fry, B. G. (2005). From genome to “venome”: molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome research*, 15(3), 403-420.

Fusco, L. S., Rodríguez, J. P., Teibler, P., Maruñak, S., Acosta, O., & Leiva, L. (2015). New immunization protocol to produce crotalic antivenom combining *Crotalus durissus terrificus* venom and its PLA 2. *Biologicals*, 43(1), 62-70

García-Orozco B. Caracterización y determinación de la variación ontogénica del veneno de *Atropoides nummifer*. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 2016. 86 p.

González-Rivera, A., Chico-Aldama, P., Domínguez-Viveros, W., Iracheta Gerez, M. L., López Alquicira, M., Cuellar Ramírez, A., & Zamora, V. (2009). Epidemiología de las mordeduras por serpiente. Su simbolismo. *Rev Acta Pediatr Mex*, 30(3).

Gutiérrez, J. M., Rucavado, A., Escalante, T., & Díaz, C. (2005). Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*, 45(8), 997-1011.

Harrison, R. A., Wüster, W., & Theakston, R. D. G. (2003). The conserved structure of snake venom toxins confers extensive immunological cross-reactivity to toxin-specific antibody. *Toxicon*, 41(4), 441-449.

Heinrikson, R. L., Krueger, E. T., & Keim, P. S. (1977). Amino acid sequence of phospholipase A2-alpha from the venom of *Crotalus adamanteus*. A new classification of phospholipases A2 based upon structural determinants. *Journal of Biological Chemistry*, 252(14), 4913-4921.

Hernández, C. G. S., & Bravo, A. A. (2009). Mordeduras por serpiente venenosa: panorama epidemiológico en México. *salud pública de México*, 51(2), 95-96.

Hernández, M. F. A. Cuantificación de veneno completo y crotoxina del cascabel neotropical (*C. simus*) en sangre de borregos envenenados experimentalmente. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de ciencias biológicas. Universidad Autónoma del estado de Morelos. México. 2017. 64 p.

Kaiser, I. I., Middlebrook, J. L., Crumrine, M. H., & Stevenson, W. W. (1986). Cross-reactivity and neutralization by rabbit antisera raised against crotoxin, its subunits and two related toxins. *Toxicon*, 24(7), 669-678.

Kerkis, I., Hayashi, M. A., Prieto da Silva, A. R., Pereira, A., De Sá Júnior, P. L., Zaharenko, A. J., Ráptis, B. G., kerkis, A. & Yamane, T. (2014). State of the art in the studies on crotamine, a cell penetrating peptide from South American rattlesnake. *BioMed research international*, 2014.

Kini, R. M. (2005). Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis*, 34(4-5), 200-204.

Kindt T.J., Goldsby R.A., & Osborne B.A. *Inmunología de Kuby*. Sexta edición. Mc Graw Hill. México. 2007. 697 pp.

Kini, R. M., & Evans, H. J. (1989). A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. *Toxicon*, 27(6), 613-635.

Lambrecht, B. N., Kool, M., Willart, M. A., & Hammad, H. (2009). Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Current opinion in immunology*, 21(1), 23-29

Laure, C.J. (1975). Die primarstruktur des crotaminins HoppeSeyler's Z. *Physiol. Chem.* 356, 213–215.

León, G., Sánchez, L., Hernández, A., Villalta, M., Herrera, M., Segura, Á., Estrada, R. & Maria Gutierrez, J. (2011). Immune response towards snake venoms. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)*, 10(5), 381-398.

Lomonte B., Fernández J., Sanz L., Angulo Y., Sasa M., Gutiérrez J. M., & Calvete J. J. (2014). Venomous snakes of Costa Rica: Biological and medical implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of snake venomomics. *Journal of Proteomics*. 105, 323 – 339.

Lomonte, B., Rangel, J. (2012). Snake venom Lys49 myotoxins: from phospholipases A 2 to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicon*, 60(4), 520-530.

Mebs, D. & Kornalik, F. (1989) Studies on the cross reactivity of snake venom antisera. *Mem. Inst. Butantan*. 51:127-132.

Mittermeier, R., & Goettsch, C. (1992). La importancia de la diversidad biológica de México. *México ante los Retos de la Biodiversidad*. Ed. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, 63-73.

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

Oguiura, N., Collares, M. A., Furtado, M. F. D., Ferrarezzi, H., & Suzuki, H. (2009). Intraspecific variation of the crotamine and crotasin genes in *Crotalus durissus* rattlesnakes. *Gene*, 446(1), 35-40.

Oshima-Franco, Y., Hyslop, S., Prado-Franceschi, J., Cruz-Höfling, M. A., & Rodrigues-Simioni, L. (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(10), 1341-1357.

Parmley, D., & Holman, J. A. (2007). Earliest fossil record of a pigmy rattlesnake (Viperidae: Sistrurus Garman). *Journal of Herpetology*, 41(1): 141-144.

Mage, R. G. Immunology of lagomorphs. En: Pastoret, P. P., Griebel, P., Bazin, H., & Govaerts, A. (Eds.). (1998). *Handbook of vertebrate immunology*. Academic Press. Oxford.

Peigneur, S., Orts, D. J., da Silva, A. R. P., Oguiura, N., Boni-Mitake, M., de Oliveira, E. B., Zharenko, A. J., de Freitas, J. C., & Tytgat, J. (2012). Crotoxin pharmacology revisited: novel insights based on the inhibition of KV channels. *Molecular pharmacology*, 82(1), 90-96.

Pérez, G. H., López, L. M. A. y Hobart, M. S. Serpientes de la región de los Tuxtlas, Veracruz, México Guía de identificación ilustrada. 2007. Universidad Nacional Autónoma de México. p. 189.

Quijada-Mascareñas y Wüster, W. (2006). *Crotalus durissus* complex: from Yucatan to Patagonia: the natural history of the Neotropical rattlesnake. *Reptilia (GB)* (49): 66-73

Ramos, O. H. P., & Selistre-de-Araujo, H. S. (2006). Snake venom metalloproteases structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 142(3), 328-346.

Rivas, E., Neri-Castro, E., Bénard-Valle, M., Hernández-Dávila, A. I., Zamudio, F., & Alagón, A. (2017). General characterization of the venoms from two species of rattlesnakes and an intergrade population (*C. lepidus* x *aquilus*) from Aguascalientes and Zacatecas, Mexico. *Toxicon*, 138, 191-195

Rodríguez, J. P., De Marzi, M., Maruñak, S., Machioldi, E. L., Leiva, L. C., & Acosta, O. (2006). Rabbit IgG antibodies against phospholipase A2 from *Crotalus durissus terrificus* neutralize the lethal activity of the venom. *Medicina-Buenos Aires*, 66(6), 512.

Sánchez, E. E., Galán, J. A., Perez, J. C., Rodríguez-Acosta, A., Chase, P. B., & Pérez, J. C. (2003). The efficacy of two antivenoms against the venom of North American snakes. *Toxicon*, 41(3), 357-365.

Segura, A., Herrera, M., Mares, F. R., Jaime, C., Sánchez, A., Vargas, M., Villalta, M., Gómez, A., Gutiérrez, J.M., & León, G. (2017). Proteomic, toxicological and immunogenic characterization of Mexican west-coast rattlesnake (*Crotalus basiliscus*) venom and its immunological relatedness with the venom of Central American rattlesnake (*Crotalus simus*). *Journal of Proteomics*, 158, 62-72.

Serrano, S. M. (2013). The long road of research on snake venom serine proteinases. *Toxicon*, 62, 19-26.

Sewall, H. (1887). Experiments on the preventive inoculation of rattlesnake venom. *The Journal of physiology*, 8(3-4), 203-210.

Sunagar, K., Tsai, H., Lomonte, B., Jackson, N.W. & Fry, B. G. Group II Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. En: Fry, B. G. (2015). *Venomous reptiles and their toxins: evolution, pathophysiology, and biodiscovery*. Oxford University.

Uetz P., Goll, J., & Hošek J. (2017). The TIGR Reptile Database. Disponible en: <http://www.reptile-database.org>. Consultado el 15 de octubre del 2017.

Valdés, M. T. A. Alteraciones fisiológicas causadas por el envenenamiento por la serpiente de cascabel neotropical *Crotalus simus* en un modelo murino. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de ciencias. Universidad Autónoma del estado de México. México. 2013. 75 p.

Vergara-Bahena, I. Influencia de la vía de administración en la capacidad neutralizante in vivo de dos antivenenos. Tesis de grado Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biotecnología. 2010. México. 73 pp.

Whittington, C. M., Papenfuss, A. T., Bansal, P., Torres, A. M., Wong, E. S., Deakin, J. E., Graves, T., Alsop, A., Schatzkamer, K., Kremitzki, C., Ponting, C. P., Temple-Smith, P., Warren, W. C., Kuchel, P.W., & Belov, K. (2008). Defensins and the convergent evolution of platypus and reptile venom genes. *Genome research*, 18(6), 986-994.

Wild, D. (2013). Immunoassay for beginners. *The immunoassay handbook, 4th ed. Elsevier*, 7-10.

World Health Organization, 2016. Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. [http://www.who.int/biologicals/ECBS\\_2016\\_BS2300\\_WHO\\_Guidelines\\_antivenom\\_clean1.pdf/](http://www.who.int/biologicals/ECBS_2016_BS2300_WHO_Guidelines_antivenom_clean1.pdf/). (Consultado el 8 de septiembre 2017).

Wüster, W., Ferguson, J. E., Quijada M., J. A., Pook, C. E., Da Graca Salomao, M., & Thorpe, R. S. (2005). Tracing an invasion: landbridges, refugia, and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). *Molecular Ecology*, 14(4), 1095-1108.

## 15. Anexos

### **Solución stock PBS 10x (NaCl 1.4 M, KCl 30 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 17 mM. pH.7.2)**

Disolver 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 14.4 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 2.4 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7.2 con NaOH (10 N) y se afora a 1 L con agua destilada. Para preparar solución PBS1x de trabajo se mezclan 100 mL del stock 10x con 900 mL de agua destilada.

### **Anexo I. Cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinconínico (BCA)**

#### Materiales:

- Reactivo A: carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinconínico, y tartrato de sodio en 0.01M de hidróxido de sodio.
- Reactivo B: 4% de sulfato cúprico
- Albumina sérica bovina (BSA): solución stock a 2 mg/mL en 0.9% NaCl y 0.05% de azida de sodio.
- Lector de ELISA con filtro de 570 nm con software Magellan®
- Micro placas de 96 pozos marca Falcon®

#### Preparación de estándares (ST):

1.- Rotular 5 tubos de 2 mL con la siguiente enumeración (la cual equivale a la concentración en µg/mL de BSA):

- (1) 320 µg/mL
- (2) 160 µg/mL
- (3) 80 µg/mL
- (4) 40 µg/mL
- (5) 20 µg/mL

2.- Colocar 1 mL de PBS pH 7.2 del tubo 2 al 5

3.- A partir de una solución stock de BSA (2 mg/mL), en el tubo 1 colocar:

\*320 µL del stock de BSA

\*1680 µL de PBS 1X

4.- Realizar Diluciones seriadas 1:2 partiendo del tubo 1 al tubo 5, esto es, transfiriendo 1 mL a cada tubo, mezclar pipeteando de 5 a 7 veces en cada ocasión.

### Preparación de la muestra problema (MP).

1.-Decidir la dilución en que debe prepararse la solución problema para que se encuentre dentro del rango de la curva estándar (20 a 320 µg/mL), en un volumen suficiente para hacer duplicados. Considerando 25 µL por pozo.

### Preparación de la mezcla de reacción (MR).

1.-Determinar el volumen total de muestras, se debe tomar en cuenta el si éstas van en duplicado, el número de blancos y la suma de todos (muestra + estándares + blancos) se debe multiplicar por 200 µL, el resultado será el volumen total de la mezcla de reacción requerido.

2.- Preparar MR mezclando 50 partes del reactivo A con una parte del reactivo B del kit de Pierce®

### Procedimiento para microplacas marca Falcon.

1.- Añadir 200 µL de MR a cada pozo

2.- Transferir 25 µL de cada muestra estándar (BSA) y de muestras problema en diferentes pozos, incluir el buffer blanco en el cual están diluidas las muestras y los estándares. Mezclar dando ligeros golpes a la placa (nota: nunca sostener la placa por la parte de abajo).

3.- Cubrir la placa con una tapa e incubar a 37°C por dos horas.

4.- Leer la absorbancia en el lector de ELISA con un filtro de 570 nm utilizando el método de BCA que se encuentra en el programa Magellan®

## **Anexo II. Protocolo para electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

### Soluciones:

-Solución de acrilamida (30% de acrilamida + 0.8% bis-acrilamida).

Disolver 49.5 g de acrilamida y 1.32 g de bis-acrilamida en un volumen final de 165 mL de agua desionizada y filtrar la solución en una membrana hidrofílica.

-Amortiguador inferior (1.5 M de tris + 0.4% de SDS).

Disolver 18.7 g de Tris en 50 mL de agua desionizada y adicionar 2 mL de SDS al 20%. Ajustar el pH a 8.8 con HCl concentrado y aforar a 100 mL. Se debe filtrar la solución en una membrana hidrofílica.

-Amortiguador superior (0.5 M de tris + 0.4% SDS).

Disolver 6.06 g de Tris en 50 mL de agua desionizada y adicionar 2 mL de SDS 20%. Ajustar el pH a 6.8 con HCl concentrado y aforar a 100 mL. Se debe filtrar la solución en una membrana hidrofílica.

-Amortiguador de corrida 10x (0.25 M tris + 0.19 M glicina + 0.1 % SDS).

Disolver 15.2 g de Tris y 72.1 g de glicina en 300 mL de agua desionizada y adicionar 25 mL de SDS 20%. Ajustar el pH a 8.6 con 10 M NaOH. Aforar a 500 mL.

-Amortiguador de Corrida desnaturalizante 5X. (10% glicerol + 2.5% SDS + 50 mM tris-HCl, pH 6.8 + 5% 2 β-mercaptoetanol + 0.002% azul de bromofenol).

En un tubo marca Falcon de 15 mL, mezclar los siguientes volúmenes: 2.5 mL de glicerol, 3.125 mL de SDS al 20%, 1.25 mL de 1M tris-HCl pH 6.8, 1.25 mL de 2- β-mercaptoetanol, 0.5 mL de 1% azul de bromofenol y aforar a 10 mL con agua desionizada.

-Persulfato de amonio al 10%.

Disolver 0.1 g de persulfato de amonio en 1 mL de agua desionizada.

-Solución de tinción (25% isopropanol + 10% ácido acético + 0.2% de azul de Coomasie R-250).

Disolver 1 g de azul de Coomasie R-250 en 125 mL de isopropanol, 50 mL de ácido acético y aforar a 500 mL con agua desionizada.

-Solución para desteñir (10% metanol + 10% ácido acético).

Mezclar 400 mL de agua desionizada, 50 mL de metanol y 50 mL de ácido acético.

Geles separadores de diferentes concentraciones

Reactivos	4%	6%	10%	11%	12%	12.5%	15%	17%	20%
Lower Buffer (mL)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Sol. Acrilamida (mL)	0.8	1.2	1.95	2.2	2.4	2.5	3	3.4	4.05
Agua destilada (mL)	3.7	3.3	2.55	2.3	2.1	2	1.5	1.1	0.45
TEMED (μL)	20	20	20	20	20	20	20	20	20
10% PSA (μL)	40	40	40	40	40	40	40	40	40

Gel concentrador 4%

Reactivos	Volumen
Upper Buffer	0.63 mL
Agua destilada	1.54 mL
Sol. Acrilamida	0.33 mL
TEMED (μL)	15
10% PSA (μL)	30

### **Anexo III. Soluciones para ensayo ELISA**

-Buffer de sensibilizado (100 mM de NaHCO<sub>3</sub> pH 9.5)

Pesar 4.2 g de NaHCO<sub>3</sub> y disolver en 450 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 9.5 con NaOH 5N en agitación constante. Aforar a 500 mL y almacenar a 4°C.

-Buffer de bloqueo (50 mM Tris-HCl pH 8, 5mg/mL gelatina, 0.02% de Tween 20)

Preparar 100 mL de Tris HCl 50mM (5 mL de Tris-HCl 1M, 95 mL de agua destilada). Pesar 0.5 g de gelatina y disolver en los 100 mL de Tris HCl 50 mM antes preparados, para disolver es necesario calentar y agitar vigorosamente. Enfriar a temperatura ambiente y agregar 200 µL de tween 20. Almacenar a 4°C o congelar para evitar contaminación.

-Buffer vehículo (50 mM de Tris-HCl pH 8, 0.5 M de NaCl, 1 mg/mL de gelatina, 0.05% de tween 20)

Tomar 25 mL de Tris-HCl 1M, pesar 14.5 g de NaCl, aforar a 500 mL con agua destilada, pesar 500 mg de gelatina y disolver, para disolver es necesario dar pulsos de calor y agitar vigorosamente. Enfriar a temperatura ambiente y agregar 250 µL de tween 20. Almacenar a 4°C.

-Buffer de lavado 10x (0.5 M de Tris-HCl pH 8, 1.5 M de NaCl)

Pesar 87.7 g de NaCl y disolver en 0.5 L de Tris-HCl 1 M pH 8, aforar a 1 L con agua destilada.

-Buffer de lavado 1x (50 mM de Tris-HCl pH 8, 150 mM de NaCl, 0.05% de Tween 20)

Tomar 100 mL de Buffer de lavado 10x y diluir en 900 mL de agua destilada, agregar 500 µL de tween 20. Almacenar a 4°C.

-Solución stock ABTS (ABTS 50 mg/mL)

Pesar 50 mg de ABTS y disolver en 1 mL de agua destilada. Almacenar a 4°C.

-Buffer para ABTS (70 mM de Citrato-Fosfato, pH 4.2)

Pesar 3.8 g de ácido cítrico anhídrido y disolver en 200 mL de agua destilada (solución A). Pesar 10.7 g de NaHPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y disolver en 200 mL de agua destilada (solución B). Para preparar 0.5 L de buffer de ABTS se deben mezclar 147 mL de la solución A con 103 mL de la solución B, se debe asegurar que el pH de la solución sea 4.2, después se afora a 0.5 L con agua destilada. Para almacenar se debe congelar a -20°C.

-Solución de revelado (Buffer para ABTS+ABTS y 0.02% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Por cada placa de ELISA, se deben mezclar 10 mL del buffer para ABTS con 75µL del stock ABTS y 2 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### **Anexo IV. Soluciones de purificación de Ig por ácido caprílico.**

-Ácido acético 3N

Tomar 1.72 mL AcOH glacial y aforar a 10 mL de agua destilada.

#### **Anexo V. Soluciones para preparación de columna de afinidad**

-Buffer de suspensión de resina (1mM HCl)

Tomar 3 µL de ácido clorhídrico concentrado y aforar a 100 mL con agua destilada.

- Buffer de pegado a resina (NaHCO<sub>3</sub> 100 mM + NaCl 150 mM)

Disolver 0.84 g de NaHCO<sub>3</sub> con 0.876 g de NaCl en 50 mL de agua destilada y aforar a 100 mL.

#### **Anexo VI. Soluciones para cromatografía de afinidad**

-Buffer de lavado (Tris 100 mM pH 8 + 0.5 M NaCl)

Pesar 12.11 g de Tris y mezclar en 500 mL de agua destilada, ajustar el pH a 8 con HCl concentrado y añadir 29.22 g de NaCl para aforar la solución a 1 L con agua destilada.

-Buffer amortiguador (Tris 1 M pH 8)

Pesar 121.1 g de Tris y mezclar en 1 L de agua destilada, ajustar el pH a 8 con HCl concentrado.

-Buffer de elusión (100 mM ácido acético)

Tomar 28.6 mL de AcOH glacial y aforar a 1 L de agua destilada.

#### **Anexo VII. Soluciones para Western-blot**

-Buffer de transferencia (39 mM glicina, 48 mM Tris-Base, 0.037% SDS, 20% metanol)

Pesar 1.45 g de glicina, 2.9 g de Tris-Base, 0.185 g de SDS y disolver en 400 mL de agua destilada para agregar 100 mL de metanol.

-Solución TBST (10 mM de Tris HCl pH 7.5, 150 mM de NaCl, 0.05% de Tween 20)

Pesar 1.21 g de Tris y disolver en 0.5 L de agua ajustando el pH a 7.5 con HCl, mezclar la solución con 8.8 gramos de NaCl, agregar 500µL de Tween 20 y aforar a 1 L con agua destilada.

Article

## Biological and Proteolytic Variation in the Venom of *Crotalus scutulatus scutulatus* from Mexico

Miguel Borja <sup>1,2</sup> , Edgar Neri-Castro <sup>3</sup> , Gamaliel Castañeda-Gaytán <sup>1</sup>, Jason L. Strickland <sup>4</sup> , Christopher L. Parkinson <sup>5</sup> , Juan Castañeda-Gaytán <sup>1</sup>, Roberto Ponce-López <sup>3</sup>, Bruno Lomonte <sup>6</sup> , Alejandro Olvera-Rodríguez <sup>3</sup>, Alejandro Alagón <sup>3</sup> and Rebeca Pérez-Morales <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez del Estado de Durango,

Av. Universidad s/n. Fracc. Filadelfia, C.P. 35010 Gómez Palacio, Dgo., Mexico;

alessandro\_53@hotmail.com (M.B.); gamaliel.cg@gmail.com (G.C.-G.); jjcg00@gmail.com (J.C.-G.)

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango,

Av. Artículo 123 s/n. Fracc. Filadelfia, Apartado Postal No. 51, C.P. 35010 Gómez Palacio, Dgo., Mexico

<sup>3</sup> Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Chamilpa, C.P. 62210 Cuernavaca, Mor., Mexico; neri@ibt.unam.mx (E.N.-C.);

joserobertoponcelopez21@gmail.com (R.P.-L.); aolvera@ibt.unam.mx (A.O.-R.); alagon@ibt.unam.mx (A.A.)

<sup>4</sup> Department of Biology, University of Central Florida, 4000 Central Florida Blvd., Orlando, FL 32816, USA; Jason.Strickland@ucf.edu

<sup>5</sup> Department of Biological Sciences and Department of Forestry and Environmental Conservation, Clemson University, 190 Collings St., Clemson, SC 29634, USA; viper@clemson.edu

<sup>6</sup> Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José 11501, Costa Rica; bruno.lomonte@ucr.ac.cr

\* Correspondence: rebecapms@ujed.mx; Tel.: +52-871-7158810

Received: 20 November 2017; Accepted: 4 January 2018; Published: 8 January 2018

**Abstract:** Rattlesnake venoms may be classified according to the presence/absence and relative abundance of the neurotoxic phospholipases A<sub>2</sub>s (PLA<sub>2</sub>s), such as Mojave toxin, and snake venom metalloproteinases (SVMPs). In Mexico, studies to determine venom variation in Mojave Rattlesnakes (*Crotalus scutulatus scutulatus*) are limited and little is known about the biological and proteolytic activities in this species. Tissue (34) and venom (29) samples were obtained from *C. s. scutulatus* from different locations within their distribution in Mexico. Mojave toxin detection was carried out at the genomic (by PCR) and protein (by ELISA) levels for all tissue and venom samples. Biological activity was tested on representative venoms by measuring LD<sub>50</sub> and hemorrhagic activity. To determine the approximate amount of SVMPs, 15 venoms were separated by RP-HPLC and variation in protein profile and proteolytic activity was evaluated by SDS-PAGE (*n* = 28) and Hide Powder Azure proteolytic analysis (*n* = 27). Three types of venom were identified in Mexico which is comparable to the intraspecific venom diversity observed in the Sonoran Desert of Arizona, USA: Venom Type A (~Type II), with Mojave toxin, highly toxic, lacking hemorrhagic activity, and with scarce proteolytic activity; Type B (~Type I), without Mojave toxin, less toxic than Type A, highly hemorrhagic and proteolytic; and Type A + B, containing Mojave toxin, as toxic as venom Type A, variable in hemorrhagic activity and with intermediate proteolytic activity. We also detected a positive correlation between SVMP abundance and hemorrhagic and proteolytic activities. Although more sampling is necessary, our results suggest that venoms containing Mojave toxin and venom lacking this toxin are distributed in the northwest and southeast portions of the distribution in Mexico, respectively, while an intergradation in the middle of both zones is present.

**Keywords:** Mojave Rattlesnakes; Mojave toxin; PLA<sub>2</sub>s; SVMPs; venom phenotypes; hemorrhagic activity