



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**“Caracterización intraespecífica del veneno de *Crotalus basiliscus* (Cope, 1864) y su neutralización con un antiveneno mexicano”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

PRESENTA:  
Andrea Colis Torres

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte  
[Centro de Investigación en Biotecnología, UAEM](#)  
Dr. Baltazar Becerril Luján  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Ciudad de México. Septiembre, 2021



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.





# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**“Caracterización intraespecífica del veneno de *Crotalus basiliscus* (Cope, 1864) y su neutralización con un antiveneno mexicano”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

PRESENTA:  
Andrea Colis Torres

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte  
[Centro de Investigación en Biotecnología, UAEM](#)

Dr. Baltazar Becerril Luján  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

COMITÉ TUTOR INVITADO  
M. en C. Edgar Enrique Neri Castro  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Ciudad de México. Septiembre, 2021

**El presente trabajo de grado (maestría) fue realizado en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano, que pertenece al departamento de Biología Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México; bajo la tutoría del Dr. Alejandro Alagón Cano y la co-tutoría del M. en C. Edgar Neri Castro.**

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

- 1. DGAPA-PAPIIT IN211621. “Caracterización del veneno de tres serpientes de importancia médica en México: investigación básica y mejoramiento de antivenenos”.**
- 2. CONACYT 264255. “Automatización de llenado de bolsas de agua para ratas y ratones del bioterio del Instituto de Biotecnología-UNAM”.**
- 3. FORDECYT 303045. “Venenos y Antivenenos”.**
- 4. CONACYT. Beca por estudios de posgrado (CV: 925606).**

## **Agradecimientos**

En primera instancia quiero agradecer al Dr. Alejandro Alagón Cano por todo el apoyo, calidez y confianza depositada en el momento que llegué al laboratorio.

Al M. en C. Edgar Neri Castro, por la supervisión de avances del proyecto, la asesoría, el apoyo, las aportaciones académicas y la amistad brindadas desde el comienzo.

Al M. en C. Alejandro Olvera Rodríguez, por las aportaciones académicas brindadas y por la amistad a lo largo de estos años.

A la Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte, por formar parte de mi comité tutorial y por los comentarios y sugerencias realizadas para la formación del proyecto.

Al Dr. Baltazar Becerril Luján, por formar parte de mi comité tutorial y por los comentarios y sugerencias realizadas para la formación del proyecto.

A los investigadores que formaron parte de mi jurado de evaluación de examen profesional y por sus valiosas aportaciones para mejorar la presente tesis: Dra. Yvonne Rosenstein, Dr. Takuya Nishigaki, Dra. Lidia Riaño, Dr. Fernando Esquivel y Dr. José Estuardo López.

A todos los integrantes de HERP.MX por donar la gran mayoría de los venenos de *Crotalus basiliscus* que formaron parte de este proyecto.

Al Dr. Jason Strickland, por el aporte dado en cuanto al análisis transcriptómico y por los comentarios, sugerencias y aportaciones académicas que nos permitieron mejorar el presente trabajo.

Al Dr. Juan Miguel Borja Jiménez por los conocimientos compartidos y por la ayuda en la parte estadística del proyecto, así como las sugerencias, comentarios y aportaciones académicas.

A la Dra. Melissa Benard por los conocimientos compartidos, el apoyo y el asesoramiento en varios experimentos, y sobre todo gracias por la amistad.

Al Biól. Felipe Olvera Rodríguez por el apoyo, la asesoría, las enseñanzas y la amistad brindada durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Gerardo Corzo Burguete por la convivencia en el laboratorio con él y su grupo de trabajo y por las enseñanzas brindadas.

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

Al auxiliar de laboratorio Ricardo Mondragón Cortés por las asesorías técnicas brindadas a lo largo del proyecto.

A la Sra. Manuela Ávila por el gran papel que cumple en el laboratorio a diario y por la calidez.

A la Secretaria del laboratorio Angelica Linares Labastida por su apoyo desinteresado, amable y cálido.

Al bioterio de Instituto de Biotecnología a cargo de la Dra. Elizabeth Mata por el apoyo en la correcta manipulación de animales y por los animales utilizados durante el proyecto.

A la Unidad de Secuenciación masiva del IBT por su amable atención, asesoría y el excelente servicio brindado.

A mis amigos de Fes Iztacala que siempre están al pendiente de mí: Alby, Gloria, César, Noé, Luis, Ventura, Irving, Josué, Ernesto, Mauro, Brandon, Tao, Fernando del Moral, Dany Esparza, Jimmy “chunds”, Vicky, Hada, Elena, Lalito, Melissa, Ariadna, Larissa y Cristian.

A la Dra. Mara Eugenia Garín y toda su familia por apoyarme desde la licenciatura y hasta la fecha, la recuerdo con mucho cariño.

A mis amigos de la Maestría por recorrer juntos este camino.

A mis amigos del laboratorio por las experiencias, risas, lágrimas, anécdotas y consejos: Mike, Astrid, Alid, Edgar, Melissa, Marco, Andrei, Manuel, Gibran, Robert, Cristian, Esaú, Jesús “Chuy”, Vanessa, Julia, Sam, Marcos, Belém, Fernando, Tania, Mitzi, Erika y el Doc Iván.

A Conacyt por la beca de posgrado otorgada durante mis estudios de Maestría que me permitieron continuar (CV: 925606).

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo recibido para asistir a un congreso nacional y un congreso internacional durante la Maestría.

A la UNAM por las enseñanzas y los valores aprendidos desde que comencé este camino como estudiante en Fes Iztacala.

A mi papá, a mi hermano, a mi cuñada, a mis sobrinos, a mis primos y a mis tíos a quienes dedico esta tesis y a quienes agradezco su presencia en mi vida, sus enseñanzas y consejos que me han convertido en la persona que soy.

A mi abuelita con mucho cariño y respeto.

Y por último, a mi madre porque aunque físicamente no estás, te tengo presente en todas las decisiones, enseñanzas y vivencias de mi vida. Te amo, y te dedico este y todos los éxitos de mi vida.

# 1 ÍNDICE

<b>I</b>	<b>RESUMEN</b> .....	<b>- 13 -</b>
<b>II</b>	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>- 14 -</b>
<b>III</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>- 15 -</b>
III.1	COMPOSICIÓN DEL VENENO DE VÍBORAS .....	- 15 -
III.2	VARIACIÓN EN LOS VENENOS .....	- 24 -
III.3	ACCIDENTE OFÍDICO .....	- 26 -
III.4	ANTIVENENOS .....	- 27 -
III.5	<i>CROTALUS BASILISCUS</i> .....	- 28 -
<b>IV</b>	<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>- 30 -</b>
IV.1	<i>VARIACIÓN DEL VENENO DE ESPECIES SUDAMERICANAS</i> .....	- 30 -
IV.2	<i>VARIACIÓN DEL VENENO DE ESPECIES EN EE. UU.</i> .....	- 30 -
IV.3	<i>VARIACIÓN DEL VENENO DE ESPECIES MEXICANAS</i> .....	- 31 -
<b>V</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>- 36 -</b>
<b>VI</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>- 36 -</b>
<b>VII</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>- 36 -</b>
<b>VIII</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>- 36 -</b>
<b>IX</b>	<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>- 37 -</b>
IX.1	CUANTIFICACIÓN PROTEICA DE VENENOS .....	- 37 -
IX.2	GELES DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE .....	- 37 -
IX.3	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN EN FASE REVERSA HPLC-FR Y ANÁLISIS DE MASAS .....	- 38 -
IX.4	DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA ( $DL_{50}$ ) .....	- 38 -
IX.5	ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SOBRE AZOCASEÍNA .....	- 39 -
IX.6	NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SOBRE AZOCASEÍNA .....	- 39 -
IX.7	ACTIVIDAD HEMORRÁGICA .....	- 40 -
IX.8	ACTIVIDAD FOSFOLIPASA ( $PLA_{2S}$ ) SOBRE YEMA DE HUEVO .....	- 40 -
IX.9	DETECCIÓN DE CROTOXINA MEDIANTE ELISA .....	- 41 -
IX.10	ACTIVIDAD FIBRINOGENOLÍTICA .....	- 41 -
IX.11	POTENCIA NEUTRALIZANTE ( $DE_{50}$ ) <i>IN VIVO</i> .....	- 42 -
IX.12	WESTERN BLOT: RECONOCIMIENTO DE LOS COMPONENTES DEL VENENO .....	- 42 -
IX.13	ANTIVENÓMICA (2ª GENERACIÓN) .....	- 43 -
IX.14	AMPLIFICACIÓN DE GENES DE CROTOXINA Y MARCADOR MITOCONDRIAL (ND4) .....	- 44 -
IX.15	TRANSCRIPTÓMICA .....	- 45 -
<b>X</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>- 48 -</b>
X.1	VENENOS .....	- 48 -
X.2	PERFIL ELECTROFORÉTICO: SDS-PAGE .....	- 50 -
X.3	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN EN FASE REVERSA HPLC-FR Y ANÁLISIS DE MASAS .....	- 50 -
X.4	LETALIDAD ( $DL_{50}$ ) .....	- 60 -
X.5	ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SOBRE AZOCASEÍNA .....	- 62 -
X.6	NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA .....	- 66 -
X.7	ACTIVIDAD HEMORRÁGICA .....	- 66 -
X.8	ACTIVIDAD FOSFOLIPASA SOBRE YEMA DE HUEVO .....	- 67 -
X.9	DETECCIÓN DE HOMÓLOGOS DE CROTOXINA MEDIANTE ELISA .....	- 68 -
X.10	ACTIVIDAD FIBRINOGENOLÍTICA .....	- 69 -
X.11	POTENCIA NEUTRALIZANTE ( $DE_{50}$ ) .....	- 71 -

X.12	RECONOCIMIENTO DE LOS COMPONENTES DEL VENENO POR WESTERN BLOT .....	- 73 -
X.13	ANTIVENÓMICA DE 2ª GENERACIÓN .....	- 74 -
X.14	AMPLIFICACIÓN DE MARCADOR MITOCONDRIAL (ND4) PARA EVALUAR RELACIONES FILOGENÉTICAS .....	- 76 -
X.15	TRANSCRIPTÓMICA .....	- 77 -
<b>XI</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>- 82 -</b>
XI.1	ACTIVIDADES BIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS .....	- 83 -
XI.2	ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO .....	- 86 -
XI.3	VARIACIÓN ONTOGÉNICA Y GEOGRÁFICA .....	- 87 -
XI.4	NEUTRALIZACIÓN CON ANTIVENENO BIRMEX .....	- 88 -
<b>XII</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>- 89 -</b>
<b>XIII</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>- 91 -</b>
<b>XIV</b>	<b>ANEXO</b> .....	<b>- 108 -</b>

## 2 Índice de Figuras y Tablas

FIGURA 1. ESQUEMA DE CLASIFICACIÓN DE SVMPS. ....	- 17 -
FIGURA 2. ESTRUCTURA GENERAL DE LAS SERINOPROTEASAS DE SERPIENTES (SVSPS). ....	- 19 -
FIGURA 3. ESTRUCTURA GENERAL DE UNA PLA <sub>2</sub> . ....	- 21 -
FIGURA 4. ESTRUCTURA DE CROTAMINA DEL VENENO DE <i>C. DURISSUS TERRIFICUS</i> . ....	- 23 -
FIGURA 5. MAPA DE DISTRIBUCIÓN DE LA CASCABEL DEL PACÍFICO ( <i>CROTALUS BASILISCUS</i> ). ....	- 29 -
FIGURA 6. ANÁLISIS PROTEÓMICO Y ACTIVIDADES BIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DEL VENENO DE <i>C. BASILISCUS</i> . ....	- 35 -
FIGURA 7. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LOS 27 VENENOS DE <i>C. BASILISCUS</i> ANALIZADOS. ....	- 48 -
TABLA 1    VENENOS DE <i>CROTALUS BASILISCUS</i> EVALUADOS ....	- 49 -
FIGURA 8. PERFILES ELECTROFORÉTICOS DE LOS VENENOS DE <i>C. BASILISCUS</i> EN SDS-PAGE. ....	- 50 -
FIGURA 9. VARIACIÓN INTRAESPECÍFICA EN LOS VENENOS DE <i>C. BASILISCUS</i> . PERFILES CROMATOGRÁFICOS POR HPLC-FR. ....	- 54 -
FIGURA 10. VARIACIÓN ONTOGÉNICA DE JUVENIL Y ADULTO DE MICHOACÁN. ....	- 59 -
FIGURA 11. CROMATOGRAMA POR HPLC-FR DEL VENENO 20 (V20). ....	- 60 -
FIGURA 12. LETALIDAD (DL <sub>50</sub> ) DE LOS VENENOS DE <i>C. BASILISCUS</i> . ....	- 61 -
FIGURA 13. CORRELACIÓN ENTRE LA LETALIDAD (DL <sub>50</sub> ) Y EL % DE CROTOXINA. ....	- 62 -
FIGURA 14. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SOBRE AZOCASEÍNA. ....	- 63 -
TABLA 2    ACTIVIDADES BIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE LOS 27 VENENOS DE <i>C. BASILISCUS</i> . ....	- 64 -
TABLA 3    NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA POR LOS TRES LOTES DE ANTIVENENO BIRMEX ....	- 66 -
FIGURA 15. LESIÓN HEMORRÁGICA FORMADA POR INYECCIÓN S.C. DE VENENOS DE <i>C. BASILISCUS</i> . ...	- 67 -
FIGURA 16. ACTIVIDAD FOSFOLIPASA SOBRE YEMA DE HUEVO. ....	- 68 -
FIGURA 17. ACTIVIDAD FIBRINOGENOLÍTICA EN GELES DE ACRILAMIDA EN DISTINTOS INTERVALOS DE TIEMPO. ....	- 70 -
FIGURA 18. ACTIVIDAD FIBRINOGENOLÍTICA EN GELES DE ACRILAMIDA. ....	- 70 -
FIGURA 19. ACTIVIDAD FIBRINOGENOLÍTICA CON EDTA EN GELES DE ACRILAMIDA ....	- 71 -
TABLA 4    DOSIS EFECTIVA MEDIA (DE <sub>50</sub> ) DE TRES LOTES DE ANTIVENENO BIRMEX. ....	- 72 -
FIGURA 20. DOSIS LETALES MEDIAS NEUTRALIZADAS POR VIAL. ....	- 72 -
FIGURA 21. WESTERN BLOT. ....	- 73 -
FIGURA 22. ANTIVENÓMICA 2ª GENERACIÓN. ....	- 75 -
FIGURA 23. PRODUCTOS DE PCR EN GEL DE AGAROSA. ....	- 76 -
TABLA 5    RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE ALINEAMIENTO Y PORCENTAJE DE IDENTIDAD DE LOS PRODUCTOS DE PCR DEL MARCADOR MITOCONDRIAL SUBUNIDAD 4 DE LA NADH DESHIDROGENASA (ND4) CON SECUENCIAS PUBLICADAS EN NCBI. - 77 -	- 77 -
FIGURA 24. VENENO EXTRAÍDO DEL COLMILLO DERECHO (CD) E IZQUIERDO (CI) DEL EJEMPLAR V18 (CROTOXINA NEGATIVO) DE <i>C. BASILISCUS</i> EN GEL DE ACRILAMIDA 15 %. ....	- 78 -
FIGURA 25. PRODUCTOS DE PCR EN GEL DE AGAROSA. AMBOS GELES CORRESPONDEN A V18 (CROTOXINA NEGATIVO). ....	- 79 -

**FIGURA 26. TRANSCRIPTOMAS DE VENENO Y GLÁNDULA DE VENENO DEL INDIVIDUO V18 (CROTOXINA NEGATIVO). ..... - 81 -**

## LISTA DE ABREVIATURAS

**A<sub>280nm</sub>** = Absorbancia a 280 nanómetros

**BCA** = Ácido bicinconínico

**DE<sub>50</sub>** = Dosis Efectiva Media

**DL<sub>50</sub>** = Dosis Letal Media

**DMH** = Dosis Mínima Hemorrágica

**EDTA** = Ácido etilenaminotetraacético

**PMSF** = Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

**DFP** = Diisopropilfluorofosfato

**I.V.** = Vía Intravenosa

**kDa** = Kilodaltones

**MPM** = Marcador de peso molecular

**ND4** = Subunidad 4 NADH deshidrogenasa

**PMSF** = Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

**SDS-PAGE** = Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico

**SVMPs** = Metaloproteasas de veneno de serpientes

**SVSPs** = Serinoproteasas de veneno de serpientes

**PLA<sub>2s</sub>** = Fosfolipasas A<sub>2</sub> de veneno de serpientes

**Myo** = Miotoxina/Crotamina

**CTX B** = Crotoxina subunidad básica

**CTX A** = Crotoxina subunidad ácida

**MTX B** = Subunidad básica de Mojave toxina

**LAAOs**= L-aminoacido oxidasas de veneno de serpientes

**BPPs**= Péptidos potenciadores de bradicinina

**CTL**= Lectinas tipo C

## I Resumen

La variación intraespecífica ha sido documentada ampliamente en trabajos de todo el mundo. No obstante, hasta años recientes pocos estudios del tema se han realizado en México sobre las serpientes mexicanas. Los estudios de caracterización biológica y bioquímica proveen información valiosa que puede ser utilizada para predecir los cuadros clínicos, sirve para evaluar la eficiencia de los antivenenos y en algunos caso aporta información que es utilizada para la mejora de las mezclas inmunogénicas en la producción de antivenenos. En el presente trabajo, se evalúa la variación intraespecífica (geográfica y ontogenética) del veneno de *Crotalus basiliscus*, una especie de cascabel endémica del país que es de importancia al ser usada junto con *Bothrops asper* para la realización de la mezcla inmunogénica por una de las empresas dedicada a la producción de antivenenos (Birmex). Los resultados probaron que existe variación en las actividades biológicas y bioquímicas evaluadas entre adultos y juveniles indicando una clara variación ontogenética. Los venenos de juveniles fueron más letales y tuvieron mayor porcentaje de crotoxina y crotanina, mientras que los adultos fueron más proteolíticos y hemorrágicos con mayor porcentaje de metaloproteasas (SVMPs). Además, se registró por primera vez que hay individuos en Zacatecas, Sinaloa y Michoacán que no presentan crotoxina (PLA<sub>2</sub> neurotóxica), mientras que el resto de los individuos si la presentaba. Finalmente, se evaluó la eficiencia de tres lotes de antiveneno de Birmex y se observó que los tres eran capaces de neutralizar la letalidad de 4 venenos representativos pero no fueron capaces de inhibir el efecto crotamina. Basados en los resultados, se recomienda incluir venenos que contengan cantidades suficientes de crotamina en la producción de antivenenos para mejorar la neutralización y poder darle homogeneidad a la mezcla inmunogénica.

## II Abstract

Intraspecific variation in snake venoms has been widely documented worldwide. However, there are few studies on this subject in Mexico. Venom characterization studies provide important data used to predict clinical syndromes, to evaluate the efficacy of antivenoms and, in some cases, to improve immunogenic mixtures in the production of antivenoms. In the present work, we evaluated the intraspecific venom variation of *Crotalus basiliscus*, an endemic rattlesnake of medical importance and whose venom is used in the immunization of horses to produce one of the Mexican antivenoms (Birmex). Our results demonstrate that there is variation in biological and biochemical activities among adult venoms and that there is an ontogenetic change from juvenile to adult venoms. Juvenile venoms were more lethal and had higher percentages of crotamine and crotoxin, while adult venoms had higher percentages of snake venom metalloproteases (SVMPs). Additionally, we documented crotoxin-like PLA<sub>2</sub> variation in which specimens from Zacatecas, Sinaloa and Michoacán (except 1) lacked the neurotoxin, while the rest of the venoms had it. Finally, we evaluated the efficacy of three lots of Birmex antivenom and all three were able to neutralize the lethality of four representative venoms but were not able to neutralize crotamine. We also observed significant differences in the LD<sub>50</sub> values neutralized per vial among the different lots. Based on these results, we recommend including venoms containing crotamine in the production of antivenom for a better immunogenic mixture and to improve the homogeneity of lots.

### III INTRODUCCIÓN

Las especies de serpientes que producen veneno se clasifican en la superfamilia Caenophidia, la cual incluye a las familias Colubridae (actualmente con cambios importantes que generaron nuevas familias, pero no serán incluidas en el presente trabajo), Atractaspididae, Elapidae y Viperidae. Las serpientes de importancia médica por los accidentes que ocasionan pertenecen a las familias Viperidae y Elapidae. La familia Colubridae contiene algunas especies denominadas semivenenosas, pero éstas con raras excepciones, no son consideradas de importancia médica (Neri-Castro et al., 2020a). La familia Viperidae engloba a tres subfamilias: Viperinae, Azemiopinae y Crotalinae. En México, sólo se encuentran distribuidas especies de la subfamilia Crotalinae, la cual está integrada por los géneros de cascabel (*Crotalus* y *Sistrurus*), las nauyacac (*Bothrops*, *Brotiechis*), los vipéridos de montaña (*Cerrophidium*), las manos de metate (*Metlapilcoatlus*), las víboras de las nubes (*Mixcoatlus*), los Toritos (*Ophryacus*), las chatillas (*Porthidium*) y los cantiles (*Agkistrodon*) (Zúñiga Carrasco y Caro Lozano, 2013). Evolutivamente, los géneros *Crotalus* y *Sistrurus* divergieron de un ancestro común con el género *Agkistrodon* y se segregaron en un clado monofilético que probablemente tiene sus orígenes hace ~20 millones de años en la Sierra Madre Occidental en la porción norte del Altiplano Mexicano (Castoe et al., 2009).

El género *Crotalus* se encuentra disperso desde los límites de Montana, Idaho y Washington con Canadá hasta la parte sur de Argentina en Sudamérica, con 53 especies reportadas (<http://www.reptile-database.org/>), siendo más diversas en el norte.

En México el género está altamente representado por 45 especies (43 *Crotalus* y 2 *Sistrurus*) (Carbajal-Márquez et al., 2020), siendo endémicas 28 de éstas (<http://www.reptile-database.org/>). La Sierra Madre Occidental, el noroeste del Altiplano Mexicano y la mitad norte de la Sierra Madre Oriental son regiones con una alta riqueza de especies (más de 4 especies por km<sup>2</sup>); así como la Península de Baja California incluyendo las islas donde se han reportado numerosos endemismos (Paredes-García et al., 2011).

#### III.1 Composición del veneno de víboras

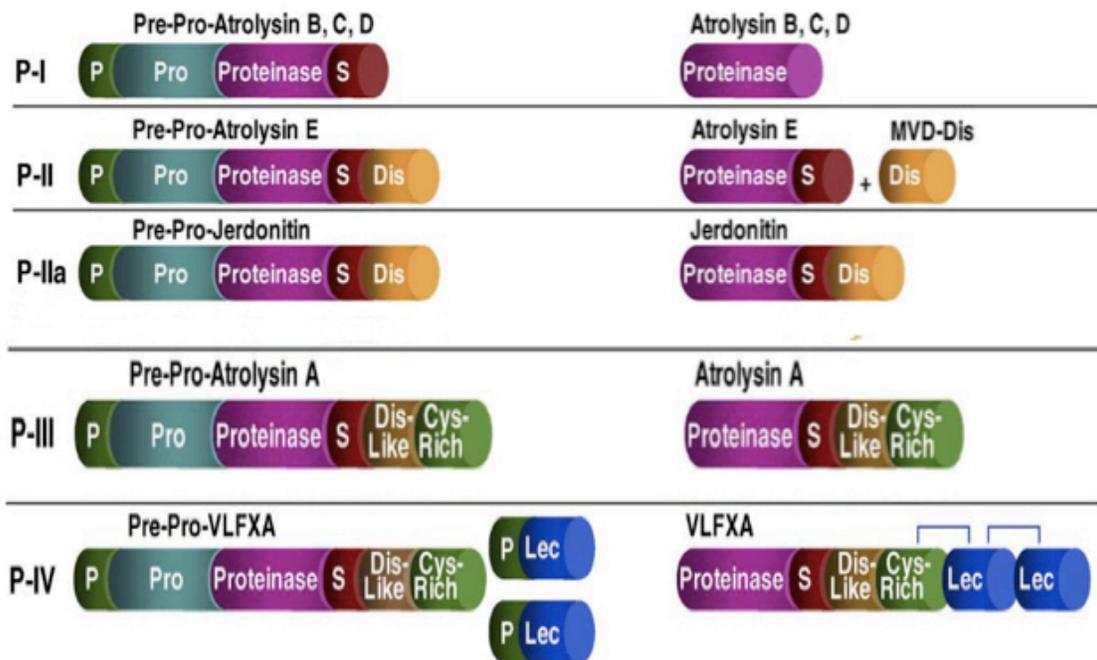
El veneno es una mezcla compleja de lípidos, nucleótidos, enzimas, proteínas no enzimáticas y péptidos (Neri-Castro and Ponce-López, 2018). Se ha planteado que estos compuestos tóxicos son el resultado de procesos evolutivos convergentes o divergentes, derivados de procesos de reclutamiento, duplicación y neo funcionalización de genes

involucrados en procesos fisiológicos (Takeda, 2016). El veneno de la mayoría de los vipéridos está constituido por familias de proteínas como metaloproteasas de venenos de serpientes (SVMPs, por sus siglas en inglés), serinoproteasas de venenos de serpientes (SVSPs, por sus siglas en inglés), fosfolipasas de venenos de serpientes (PLA<sub>2</sub>s, por sus siglas en inglés) dentro de éstas se encuentran las neurotoxinas (crotoxin-like) y en el caso del veneno de cascabeles podemos encontrar a la crotamina una proteína que genera parálisis rígida en los modelos de ratón (Lima et al., 2018; Tasoulis and Isbister, 2017).

#### III.1.1.1 Metaloproteasas del veneno de serpientes (SVMPs)

El intensivo análisis proteómico de los venenos ha mostrado que generalmente, las SVMPs constituyen más del 30% de las proteínas presentes en el veneno de vipéridos (Calvete et al., 2007; Fox y Serrano, 2008) denotando su importancia y el papel crucial que juegan como parte del veneno. Las metaloproteasas son una gran familia de enzimas que han sido reportadas en una variedad de organismos incluyendo mamíferos, reptiles e invertebrados (Fox y Serrano, 2005). Todas las SVMPs comparten pre-dominios (a nivel de transcritos), pro-dominios (alrededor de 200 residuos de aminoácidos) y dominios proteasa. Las metaloproteasas se clasifican en cuatro grupos, P-I a P-IV, dependiendo de los dominios extras que los componen (Fox y Bjarnason, 1995; Takeda, 2016) (Figura 1).

El grupo P-I comprende enzimas que presentan un dominio metaloproteasa (dominio M) necesitan como cofactor al zinc y poseen una secuencia consenso del sitio de unión a zinc (HEXXHXXGXXH) donde X es cualquier aa. Las SVMPs aquí agrupadas comparten el 20% de identidad y en algunos casos puede ser del 50 %, difiriendo en el número de residuos de cisteína lo que genera patrones alternos de puentes disulfuro (Fox and Serrano, 2005). El grupo P-II incluye enzimas que además de tener dominio M cuentan con dominio desintegrina (dominio D); en algunos casos el dominio D es liberado mediante corte proteolítico dando origen a desintegrinas activas (Calvete et al., 2005; Shimokawa et al., 1996). SVMPs pertenecientes al grupo P-III presentan los dominios M y D, y adicionalmente dominios ricos en cisteína (dominio C) en una cadena polipeptídica algunos glicosilados y con la capacidad de experimentar autólisis/proteólisis durante su secreción o en la mezcla de veneno para producir un producto de dos dominios (DC; dominio desintegrina y dominio rico en cisteína). Finalmente, el grupo P-IV son heterodímeros con una subunidad correspondiente a una cadena P-III no procesada (dominios MDC) y dos subunidades con dominio lectina conectados al dominio P-III por puentes disulfuro (Fox and Serrano, 2005) (Figura 1).



**Figura 1. Esquema de clasificación de SVMPs.** Ejemplos de SVMPs purificadas de venenos de vipéridos: P-I Atrolysin B, C y D de *Crotalus atrox*, P-II Atrolysin E de *C. atrox* cuyo dominio desintegrina es liberado mediante corte proteolítico y Jerdonitin de *Trimeresurus jerdonii* cuyo dominio D permanece unido. P-III Atrolysin A de *C. atrox* con los tres dominios. P-IV VLFXA (VL activador del factor F-X, por sus siglas en inglés) de *Vipera lebetina* que presenta una estructura P-III con dos dominios lectina tipo-C en su estructura cuaternaria interconectada a la cadena principal con puentes disulfuro (tomado y modificado de Serrano & Fox, 2005).

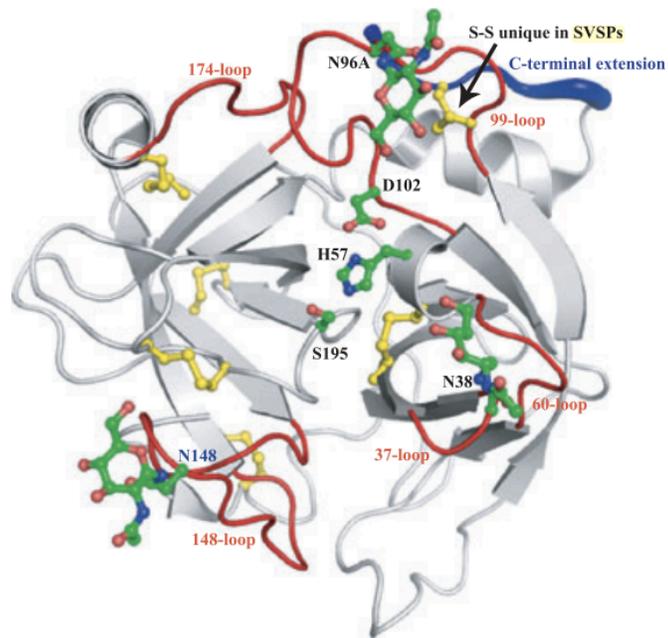
Ciertas SVMPs se adhieren de manera selectiva a proteínas clave de la cascada de coagulación y la agregación plaquetaria. Todas las SVMPs del veneno de serpientes con actividad procoagulante activan zimógenos de la cascada de coagulación y agilizan la formación de coágulos. Hasta la fecha solo se ha reportado que las SVMPs activan dos factores, factor X y protrombina (Kini y Koh, 2016). Aunado a eso, las SVMPs tienen propiedades fibrinogenolíticas degradando la cadena  $\alpha$  (de manera preferencial) y la cadena  $\beta$  en la porción C-terminal lo cual genera fibrinógeno truncado que es incapaz de formar un coágulo de fibrina estable (Kini y Koh, 2016; Swenson y Markland, 2005). De igual manera, la capacidad de las SVMPs de inhibir la agregación plaquetaria mediante la unión y/o la proteólisis de glicoproteínas y receptores de integrina (GPIb, GPVI y  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 11\beta 3$ ) en la membrana de las plaquetas y mediante la hidrólisis del factor von Willebrand

(Kamiguti, 2005; Kini y Koh, 2016; Markland, 1998; Matsui y Hamako, 2005; Swenson y Markland, 2005).

En la mayoría de los casos descritos el dominio Metaloproteasa (M) juega un papel crucial en las actividades farmacológicas de estas proteínas a través de su actividad proteolítica dependiente de  $Zn^{2+}$  lo que lleva a la destrucción del receptor o la liberación de nuevos ligandos. Sin embargo, las funciones no enzimáticas de las SVMPS llevadas a cabo por los dominios desintegrina y ricos en cisteína (D y C), así como subunidades no enzimáticas (snaclecs; proteínas C-tipo lectina de serpientes) juegan papeles cruciales uniéndose de manera selectiva a proteínas clave (Kini y Koh, 2016). Por ejemplo, los dominios D son capaces de adherirse a receptores de integrina y de esta manera producir una doble función; dirigiendo a la toxina a una superficie específica de la célula bloqueando la unión de sus ligandos normales (Fox y Serrano, 2005). Por otro lado, algunos trabajos han demostrado las actividades funcionales de los dominios C, siendo estos inhibidores de la agregación plaquetaria estimulada por colágeno al interactuar con el receptor  $\alpha 2\beta 1$  (Jia et al., 2000).

#### III.1.2 Serinoproteasas del veneno de serpientes (SVSPs)

Las serinoproteasas se llaman así debido a que tienen un mecanismo catalítico común que involucra un residuo de serina (Ser195) que juega un papel importante en la formación de un complejo transitorio, que se estabiliza con la presencia de los residuos de histidina y ácido aspártico formando la tríada catalítica (tres residuos: Ser195, His57 y Asp102) (Figura 2) (Barret y Rawlings, 1995; Kang et al., 2011). Cortan las cadenas polipeptídicas en la región C-terminal de residuos de aminoácidos cargados positivamente. Por lo tanto, estas enzimas son inactivadas por reactivos como el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y diisopropilfluorofosfato (DFP) que modifican el residuo de serina de forma irreversible (Serrano y Maroun, 2005). Las serinoproteasas de venenos de serpientes contienen 12 residuos de cisteína, diez de los cuales forman cinco puentes disulfuro; los dos residuos de cisteína restantes forman un puente disulfuro en la extensión C-terminal que está bastante conservado. La mayoría de las SVSPs son glicoproteínas con un número variable de *N*- y *O*-glicosilaciones, en geles SDS-PAGE aparecen en rangos de peso molecular de 26 a 67 kDa (Serrano, 2013; Serrano y Maroun, 2005). A pesar de que tiene entre un 50-80 % grado de identidad en sus secuencias de aminoácidos, la especificidad al sustrato difiere considerablemente (Serrano, 2013; Serrano y Maroun, 2005).



**Figura 2. Estructura general de las serinoproteasas de serpientes (SVSPs).** Representación de una SVSPs; se observa la extensión de C-terminal en color azul que contiene el puente disulfuro adicional. Se incluyen las cadenas laterales de los aminoácidos que conforman la tríada catalítica His57, Asp102 y Ser195; también están presentes los aminoácidos con sitios putativos de N-glicosilaciones (N96A, N38 y N148). Se observan en amarillo los puentes disulfuro (seis en total) (tomado de Kang et al., 2011).

De manera general, las SVSPs afectan la cascada de coagulación mediante la activación de componentes sanguíneos, generando fibrinogenólisis, agregación plaquetaria o mediante eventos de proteólisis (Serrano y Maroun, 2005). Entre los componentes sanguíneos que se conoce que pueden ser activados por SVSPs están los factores V, X y plasminógeno de la cascada de coagulación, así como la proteína C y la protrombina (Kini, 2006; Serrano y Maroun, 2005). Las SVSPs con capacidad para degradar el fibrinógeno pertenecen a un grupo denominado serinoproteasas de tipo trombina (SVSPs-TL). Estas enzimas con pesos moleculares entre 26-33 kDa liberan fibrinopéptidos, así como la trombina, cortando los enlaces Arg-Gly de las cadenas alfa y beta del fibrinógeno, no obstante, a diferencia de la trombina que es capaz de cortar ambas cadenas, la mayoría de las SVSPs-TL corta una de las dos cadenas liberando fibrinopéptidos A (FPA) o fibrinopéptidos B (FPB) distintos a los generados de manera endógena; lo anterior aunado al hecho de que las SVSPs no activan el factor XIII de coagulación (importante para la estabilidad y el entrecruzamiento de los monómeros de fibrina) genera coágulos que se

disuelven rápidamente (Markland, 1998; Serrano y Maroun, 2005; Stocker et al., 1982). Hasta la fecha la mayoría de las serinoproteasas aisladas de venenos son de clase A. Un grupo interesante de SVSPs-TL parece producir síntomas neurológicos aparte de las modificaciones hemodinámicas ya antes mencionadas. Estas enzimas producen el “efecto giroxina” en ratones, episodios temporales caracterizados por opistótonos y rotaciones alrededor del eje central del animal. La giroxina aislada del veneno de *C. durissus terrificus* fue la primer enzima en la que se reportó el efecto, posteriormente se identificó en la crotalasa aislada de *C. adamanteus*, así como un homólogo en el veneno de *Lachesis Muta* (LM-TL) (Alexander et al., 1988; da Silva et al., 1989; Markland, 1998).

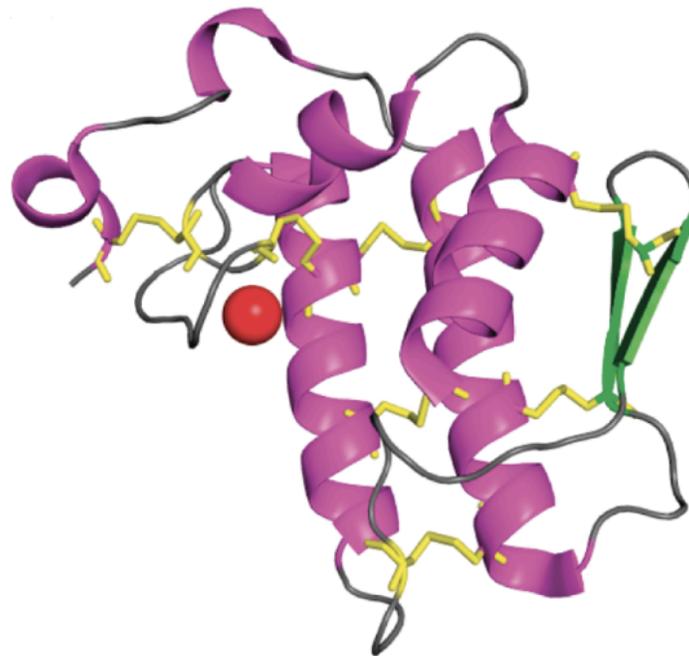
### III.1.3 Fosfolipasas del veneno de serpientes (PLA<sub>2</sub>s)

Las PLA<sub>2</sub>s representan una superfamilia de enzimas lipolíticas que catalizan la hidrólisis del enlace éster en la posición *sn*-2 de los glicerofosfolípidos lo que resulta en la liberación de productos como ácidos grasos (araquidonato) y lisofosfolípidos (Dennis et al., 2011).

Cuando estas enzimas se encuentran en un medio acuoso, su sitio activo que contiene Ca<sup>2+</sup> se sumerge en un canal revestido con aminoácidos hidrofóbicos. La enzima se une con mayor afinidad a las bicapas compuestas de fosfolípidos cargados negativamente. La unión induce un cambio en la conformación de la PLA<sub>2</sub> lo que permite que se abra un canal hidrofóbico. A medida que una molécula fosfolipídica se difunde desde la bicapa hacia el canal, el Ca<sup>2+</sup> adherido a la enzima se une al fosfato de la cabeza del fosfolípido, posicionando así el enlace éster junto al sitio catalítico para ser cortado (Burke y Dennis, 2009).

En la más reciente recopilación y revisión de proteomas de venenos de serpientes se observó que las fosfolipasas están presentes en el 95% de los venenos de elápidos y vipéridos de importancia médica estudiados (Tasoulis y Isbister, 2017). Las cuales se dividen en dos grupos: en el grupo I se encuentran todas las PLAs de veneno de elápidos (Elapinae e Hydrophiinae), mientras que en el grupo II se encuentran las PLAs de venenos de Vipéridos (Viperinae y Crotalinae). A pesar de que presentan un variado porcentaje de identidad 40-99 % tienen una estructura tridimensional similar y despliegan una variedad de actividades farmacológicas. Esta variación se atribuye a la duplicación genética y a la evolución acelerada, así como a procesos de selección positiva que predominan sobre los residuos expuestos en la superficie molecular de estas enzimas (Kini y Chan, 1999).

Las PLAs son pequeñas proteínas (~14 -18 kDa) con 115-133 residuos de aminoácidos, presentan una diada catalítica de His/Asp en su sitio activo que requiere de  $\text{Ca}^{2+}$  para ejercer su actividad; es por eso que agentes quelantes como EDTA inhiben la actividad enzimática (Sajevic et al., 2011). Tienen 14 residuos de cisteína conservados que forman entre cinco y ocho puentes disulfuro dándole estabilidad a la estructura terciaria. Estructuralmente las fosfolipasas de veneno de serpientes ( $\text{PLA}_2\text{s}$ ) se componen de tres hélices  $\alpha$  y dos láminas  $\beta$  antiparalelas, unidas por puentes disulfuro. Y un asa de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  como estructura conservada (Dennis et al., 2011).



**Figura 3. Estructura general de una  $\text{PLA}_2$ .** Las hélices  $\alpha$  están representadas en magenta, las láminas  $\beta$  en verde, el ion de  $\text{Ca}^{2+}$  está representado como una esfera roja y los 8 puentes disulfuro se muestran en amarillo (PDB entry: 1PSH) (tomado de Dennis et al., 2011).

Estas  $\text{PLA}_2\text{s}$  presentan una gran variedad de efectos farmacológicos como neurotoxicidad (a nivel pre sináptico), miotoxicidad (local y sistémica), cardiotoxicidad, efectos anticoagulantes, actividad hemolítica, inflamación (Kini, 2003; Kini y Evans, 1987). La capacidad para inducir efectos farmacológicos de una fosfolipasa en particular depende de su habilidad para penetrar las membranas de fosfolípidos y de la susceptibilidad de un tejido o célula. Esto último se refiere a la presencia de “sitios blanco” (lípidos de membrana) en la superficie de las células y/o tejidos que son reconocidos por “sitios farmacológicos” en la superficie de las  $\text{PLA}_2\text{s}$ . Además, los fosfolípidos que se encuentran en la cercanía del sitio

blanco podrían estar contribuyendo a la especificidad. Una vez que la PLA<sub>2</sub> se unió a su proteína blanco los efectos pueden deberse a mecanismos dependientes (hidrólisis de fosfolípidos) o ser independientes de su actividad enzimática (interferencia con el ligando) (Kini y Evans, 1989).

En la mayoría de los casos, las PLA<sub>2</sub> ejercen efectos farmacológicos por sí solas al encontrarse como monómeros; sin embargo, otras PLA<sub>2</sub> son capaces de formar agregados o complejos en donde al menos una de las subunidades es catalíticamente activa. Estos complejos pueden estar unido covalentemente como en el caso de  $\beta$ -bungarotoxina, mientras que en otros casos las interacciones son no covalentes, por ejemplo: crotoxina, mojave toxina y taipoxina. En los complejos no covalentes, una subunidad es una PLA<sub>2</sub> y la otra subunidad es una molécula tipo PLA<sub>2</sub> con o sin actividad catalítica que actúa como chaperona incrementando la especificidad de unión de la PLA<sub>2</sub> a su blanco (Kini, 2003; Mackessy et al., 2009).

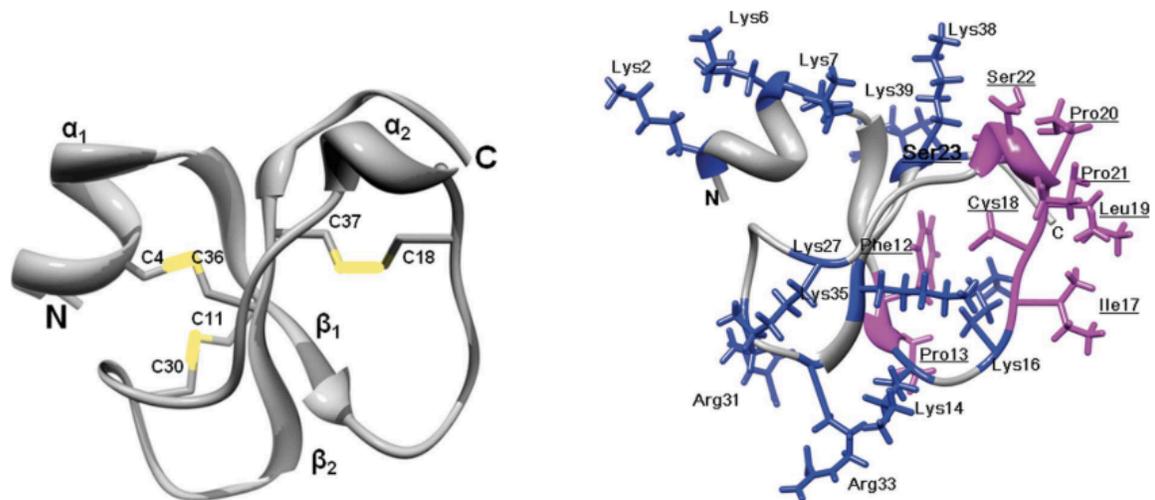
El complejo crotoxina es un heterodímero compuesto por una subunidad ácida no enzimática llamada crotapotina (CA) y una subunidad básica (CB) (P.M 14,350 Da, pl 8.2 y 122 aa) que exhibe actividad fosfolipasa y que fueron aisladas del veneno de *C. d. terrificus* (Aird et al., 1985). Este complejo ha sido identificado en especies como *C. d. durissus*, *C. d. terrificus* y *C. d. ruruima* representando el 50 % del total del veneno (Calvete et al., 2010). Posteriormente fue reportada en los venenos de otras especies de cascabel como *Crotalus tigris*, *C. scutulatus* y *C. tzabcan* (Borja et al., 2018a; Calvete et al., 2012; Castro et al., 2013; Neri-Castro et al., 2019). La principal actividad de la crotoxina es a nivel presináptico. Se plantea que el modo de acción de la toxina consiste en la degradación de la neurona motora impidiendo la liberación de acetilcolina provocando como consecuencia un bloqueo neuromuscular (Kini, 2003; Sampaio et al., 2010). La CA se genera a partir de un precursor tipo fosfolipasa (pro-CA) que sufre un proceso proteolítico para formar tres polipéptidos que se unen con siete enlaces disulfuro. Aunque la CB presenta una débil actividad neurotóxica por si sola, se sabe que el complejo nativo, es decir la subunidad básica asociada a la subunidad ácida, es más potente que la CB sola. El incremento de la toxicidad se debe a la presencia de la CA (crotapotina) que actúa como chaperona bloqueando la unión no específica y dirigiendo a la subunidad básica al sitio blanco (membranas sinápticas) donde el complejo se disocia. Para el caso del veneno de *Crotalus durissus terrificus* se han identificado al menos cuatro isoformas del complejo, cuya configuración afecta

directamente a la actividad enzimática y la potencia letal del veneno (Bon, 1982; Faure et al., 1994; Faure y Bon, 1988; Habermann y Breithaupt, 1978).

#### III.1.4 Crotamina

La crotamina es una novedad evolutiva del clado *Crotalus*. Esta proteína ha sido catalogada como  $\beta$ -defensina y como miotoxina (Nicastro et al., 2003; Tasima et al., 2020). Las  $\beta$ -defensinas son un grupo diverso de péptidos pequeños y catiónicos debido a que contienen residuos de arginina y lisina. La carga neta positiva de estas moléculas les facilita la interacción electrostática con las superficies celulares cargadas negativamente (Kerkis et al., 2010). Las  $\beta$ -defensinas se caracterizan por tener de 18 a 45 aminoácidos, incluyendo un patrón de cisteínas conservado (Yount y Yeaman, 2004).

La crotamina es una proteína de cadena simple de 42 aminoácidos (PM 4880 Da,  $pI > 9.5$ ) rica en residuos básicos (9 Lys, 2 Arg y 2 His), la cual presenta un patrón de seis cisteínas que interactúan formando tres puentes disulfuro (Fadel et al., 2005; Kerkis et al., 2010; Nicastro et al., 2003). La estructura secundaria de la molécula presenta una región N-terminal corta con conformación  $\alpha$ -hélice (1-7 residuos) seguido de una conformación de dos-tres hojas  $\beta$ -antiparalelas acomodadas en una topología tipo  $\alpha\beta_1\beta_2\beta_3$  (Figura 4) (Coronado et al., 2013; Fadel et al., 2005).



**Figura 4. Estructura de crotamina del veneno de *C. durissus terrificus*.** Los residuos de cisteína que forman los puentes disulfuro (amarillo) así como las regiones N y C terminal están indicadas. Los residuos altamente hidrofóbicos de color rosa están localizados en un lado de la molécula y del lado opuesto los residuos con carga positiva en azul (tomado de Coronado et al., 2013).

Las serpientes presentan de 3-53 % de crotamina en sus venenos dependiendo de la especie. Por ejemplo para *C. molossus nigrescens* se han registrado valores de 3-52.7 %, en *C. tzabcan* y *C. culminatus* incluso se registraron diferencias entre cría y adulto (37.9 % y 18.5 %; 11.1 % y 6 %, respectivamente) (Borja et al., 2018c; Durban et al., 2017; Oguiura et al., 2009). La variación de crotamina en los venenos está relacionada al número de copias de genes (de 1 a 32 copias por genoma haploide) y a su expresión (Oguiura et al., 2009). Esto quiere decir que a mayor número de copias de genes hay un incremento en la concentración de crotamina. Por otra parte, desde los años 50 se identificaron polimorfismos crotamina positivo y crotamina negativo (presencia/ausencia) en individuos de *C. d. terrificus* subespecie sudamericana años después este polimorfismo fue detectado en especies mexicanas (Borja et al., 2018c; Schenberg, 1959; Tasima et al., 2020). El gen de crotamina (*Crt-p1*) de 1.8 kb está organizado en tres exones y dos intrones. El exón 1 incluye la región 5'-UTR y codifica para los primeros 19 aminoácidos del péptido señal. El exón 2 codifica para 42 aa, tres pertenecientes al péptido señal y 39 a la proteína madura, mientras que el exón 3 codifica para los restantes 3 aa de la proteína madura. Un gen parálogo de crotamina llamado crotasina (*Cts-p2*) se encuentra en el veneno de cascabeles crotamina positivo y negativo. Este gen es 0.7 kb más largo que el gen de crotamina debido a que el intrón I es más largo (Rádis-Baptista et al., 1999). Crotasina se transcribe en tejidos de cascabeles principalmente en páncreas y es poco detectable en las glándulas del veneno (Oguiura et al., 2005). El mecanismo de acción de crotamina se basa en la inhibición de los canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje K<sub>v</sub>1.1, K<sub>v</sub>1.2 y K<sub>v</sub>1.3 (Peigneur et al., 2012; Rizzi et al., 2007; Yount et al., 2009). A su vez, se ha observado que al ser una molécula anfipática es capaz de penetrar las células mediante endocitosis dependiente de clatrina y de translocarse al núcleo uniéndose a los centriolos durante la división celular (Kerkis et al., 2014, 2010).

### III.2 Variación en los venenos

El veneno representa un atributo trófico adaptativo que permitió a las serpientes la transición de un medio mecánico (constricción) a un medio químico para someter y digerir a las presas ayudando a la degradación de los tejidos en el tracto digestivo de las serpientes (Gibbs et al., 2011; Kini and Koh, 2016). Después de un envenenamiento los mecanismos hemostáticos del sistema del individuo envenenado se ven afectados rápidamente, y en el caso de una presa natural, el envenenamiento resulta en la rápida incapacitación para huir

y en algunos casos el inicio de los procesos digestivos que degradan los tejidos de la presa (Mackessy, 2008).

Al ser un atributo trófico, el veneno presenta plasticidad fenotípica (Chippaux et al., 1991). La variabilidad está presente de manera intra e inter específica. La composición del veneno y la continuación de esa composición depende de la capacidad del veneno en procurar presas. Variaciones pequeñas son toleradas mientras que aquellas que afectan la supervivencia del individuo probablemente se perderán (Chippaux et al., 1991).

Como la mayoría de los vipéridos el veneno de las serpientes de cascabel presenta un número mayor de componentes de alto peso molecular (~14-140 kDa) que aquellos componentes de bajo molecular (<14 kDa) siendo el caso contrario en venenos de elápidos. Muchos de los componentes son compartidos entre la mayoría de las especies de cascabel lo cual refleja la historia evolutiva compartida, pero la presencia relativa de ciertos componentes varía, como en el caso de los homólogos de crotoxina que se expresan en ciertos linajes o en poblaciones particulares de una sola especie y en otros no (Borja et al., 2018a; Mackessy, 2008). Lo anterior llevó a clasificar a las serpientes de cascabel en dos grupos tipo I y tipo II (Mackessy, 2010). Los venenos de tipo I se caracterizan por tener altos niveles de SVMPs, baja toxicidad ( $DL_{50} > 1\mu\text{g/g}$ ) y alta actividad enzimática mientras que los venenos de tipo II presentan bajos niveles de SVMPs, alta toxicidad ( $DL_{50} < 1\mu\text{g/g}$ ) y baja o nula actividad enzimática.

Algunas teorías han tratado de explicar la variación en los venenos. Una de ellas indica que esta variación se encuentra mediada por polimorfismos genéticos, por la presencia o ausencia en algunos linajes de los genes que codifican para PLA<sub>2</sub>s y SVMPs (Dagda et al., 2013). Un ejemplo de esta propuesta es que si el individuo no es neurotóxico, como en el caso de *C. atrox* es porque no presenta los genes que codifican para la subunidad ácida y básica de crotoxina (Dowell et al., 2016). Otra teoría propone que en ciertas regiones genómicas la accesibilidad a la cromatina y los niveles de metilación estarían dictando la producción de ciertos fenotipos (Margres et al., 2021). Finalmente, la teoría que propone que la presencia de miRNAs complementarios a RNAs que codifican para proteínas presentes en el veneno estarían modulando la expresión de distintas proporciones de las toxinas (Durban et al., 2017, 2013).

Un punto a considerar es que la presencia, ausencia y abundancia relativa de los componentes proteicos y las múltiples isoformas de un veneno estarían afectando a nivel clínico la diversidad de signos y síntomas (Casewell et al., 2020; Moura-Da-silva et al.,

2020), por lo que los estudios de variación intraespecífica son relevantes para predecir los cuadros clínicos, alertando de esta manera a los médicos sobre la posible variación en los síntomas aún dentro de la misma especie (Neri-Castro et al., 2020a). Uno de los estudios que muestra de manera contundente las diferencias clínicas como consecuencia de la variación intraespecífica de los venenos se realizó con *C. scutulatus scutulatus* en donde se delimitaron dos manifestaciones clínicas (neurotóxicas vs hemotóxicas) (Massey et al., 2012).

### III.3 Accidente ofídico

Los accidentes ofídicos se encuentran clasificados por la organización mundial de la salud (WHO, por sus siglas en inglés) como enfermedades tropicales mal atendidas producto de la inyección de una secreción tóxica (veneno) por parte de una serpiente venenosa en cualquier región anatómica de un humano (Gutiérrez et al., 2017). Dependiendo de la longitud de los colmillos inyectores de veneno, la mordedura llega a ser intramuscular o subcutánea. Una vez que el veneno se encuentra dentro del compartimento, las toxinas ejercen efectos locales en tejidos circundantes (pueden ocasionar mionecrosis, dermonecrosis, edema, hemorragia y ampollas) lo que usualmente resulta en secuelas permanentes mientras que otros componentes se distribuyen a través del sistema linfático o vascular permitiendo su difusión en distintos órganos ocasionando daño sistémico (parálisis respiratoria, rabdomiólisis, trombosis, hemorragia, coagulopatía, shock cardiovascular e insuficiencia renal aguda) (Calvete et al., 2014; Gutiérrez et al., 2017).

Los accidentes ofídicos ocurren mayoritariamente en zonas rurales y esto se debe a varios factores: ambientales, socioeconómicos, sanitarios y demográficos, como la proximidad de las poblaciones humanas a los ambientes naturales donde las serpientes habitan. A su vez, se ha documentado que especies del género *Bothrops* y *Crotalus* son atraídas hacia las áreas antropogénicas donde pueden encontrar alimento (Chippaux, 2017; Yañez-Arenas et al., 2014).

La incidencia promedio de accidentes ofídicos anuales en el continente Americano es de aproximadamente 57,500 mordeduras de serpiente, resultando en casi 370 muertes (Chippaux, 2017). Más del 95 % de los casos de envenenamiento registrados en Latinoamérica son causados por especies de la familia Viperidae, subfamilia Crotalinae (Gutiérrez, 2014). En México, el promedio anual de accidentes ofídicos es de 4,000 con un crecimiento en los casos reportados desde 2003 a 2015. Cabe mencionar que a partir de

2003 los ataques por animales venenosos fueron publicados en la red. El índice de mortalidad es mayor en la zona sur del país con nueve incidentes en promedio por 100,000 habitantes que en la zona norte con dos incidentes en promedio por 100,000 habitantes, observándose un incremento de estos accidentes en la temporada de verano (Chippaux, 2017).

La WHO en el 2016 creó un listado colocando a algunas especies del género *Crotalus* (*C. oreganus*, *C. ruber*, *C. totonacus*, *C. tzabcan*, *C. viridis* y *C. basiliscus*) dentro de la categoría 2 (importancia médica secundaria), definiendo a estas serpientes como altamente venenosas con la capacidad de inducir morbilidad, discapacidad y muerte pero que carecen de datos epidemiológicos exactos y/o se encuentran implicadas con baja frecuencia en los accidentes (WHO, 2016).

#### III.4 Antivenenos

La administración por vía parenteral (intradérmico, subcutáneo e inclusive intramuscular) de antivenenos derivados de animales es hasta el momento la única terapia para tratar los accidentes ofídicos. Los antivenenos se conforman de inmunoglobulinas completas IgG (150 kDa), o de fragmentos de inmunoglobulinas Fab (50 kDa) o F(ab')<sub>2</sub> (100 kDa), obtenidos mediante digestión enzimática con papaína y pepsina, respectivamente. Éstas moléculas son purificadas del plasma de animales domésticos de grandes dimensiones, usualmente caballos, que han sido inmunizados con el veneno de una sola especie (antiveneno mono-específico) o de varias especies (antiveneno poli-específico) (Gutiérrez et al., 2007; WHO, 2016). Al ser purificados del plasma de animales que están expuestos a múltiples patógenos, la mezcla contiene solamente de un 10-40 % de anticuerpos específicos hacia el veneno (Segura et al., 2013).

La mayoría de los antivenenos comerciales son fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. El uso de diferentes fragmentos de antiveneno se debe a diversos factores que están asociados al tamaño de las moléculas y que son de importancia para la eficacia en la neutralización de un antiveneno como, por ejemplo, los niveles de interacción y de distribución en los compartimentos extravasculares y los tiempos de eliminación. Las IgG y los F(ab')<sub>2</sub> se eliminan por mecanismos no renales en períodos prolongados de tiempo ( $t_{1/2\beta}$  18-150 h), mientras que los Fab son eliminados vía renal de manera más rápida ( $t_{1/2\beta}$  4.3-18 h) (Gutiérrez et al., 2003; Lalloo and Theakston, 2003; Laustsen et al., 2018; Seifert and Boyer, 2001).

Se han propuesto cinco mecanismos de neutralización propuestos: 1) Inhibición competitiva directa del antiveneno hacia el sitio de interacción de la toxina (Charpentier et al., 1990), 2) Bloqueo del sitio catalítico en el caso de toxinas con actividad enzimática, 3) Inhibición alostérica en donde la unión del antiveneno desencadena un cambio conformacional en la toxina inactivándola (Engmark et al., 2017), 4) Inhibición de la disociación de complejos de toxinas, lo que impide que lleven a cabo su acción tóxica (Lafaye et al., 1997) y 5) Formación de complejos toxina-anticuerpo que facilitan su eliminación mediante fagocitosis (Laustsen et al., 2018).

La ocurrencia de variación ontogenética, geográfica e individual en los venenos resalta la necesidad de considerar ciertos factores cuando se produce un antiveneno (Calvete et al., 2014). En primer lugar, es importante considerar que el antiveneno que se va a producir tenga como objetivo la o las especies que causen la mayoría de los accidentes en una región determinada. En segundo lugar, los productores deben de conocer las diferencias cualitativas y cuantitativas de la composición de los venenos teniendo en cuenta que estos aspectos van a incidir en la patología del envenenamiento debido a que los síntomas que se presentan en los pacientes varían. Y finalmente, considerar que los venenos utilizados para inmunizar deben de representar toda la distribución de la especie esto debido a que la mayoría de los productores mantiene un espacio dedicado al mantenimiento, reproducción en cautiverio y a la ordeña de los mismos especímenes (Fry et al., 2003).

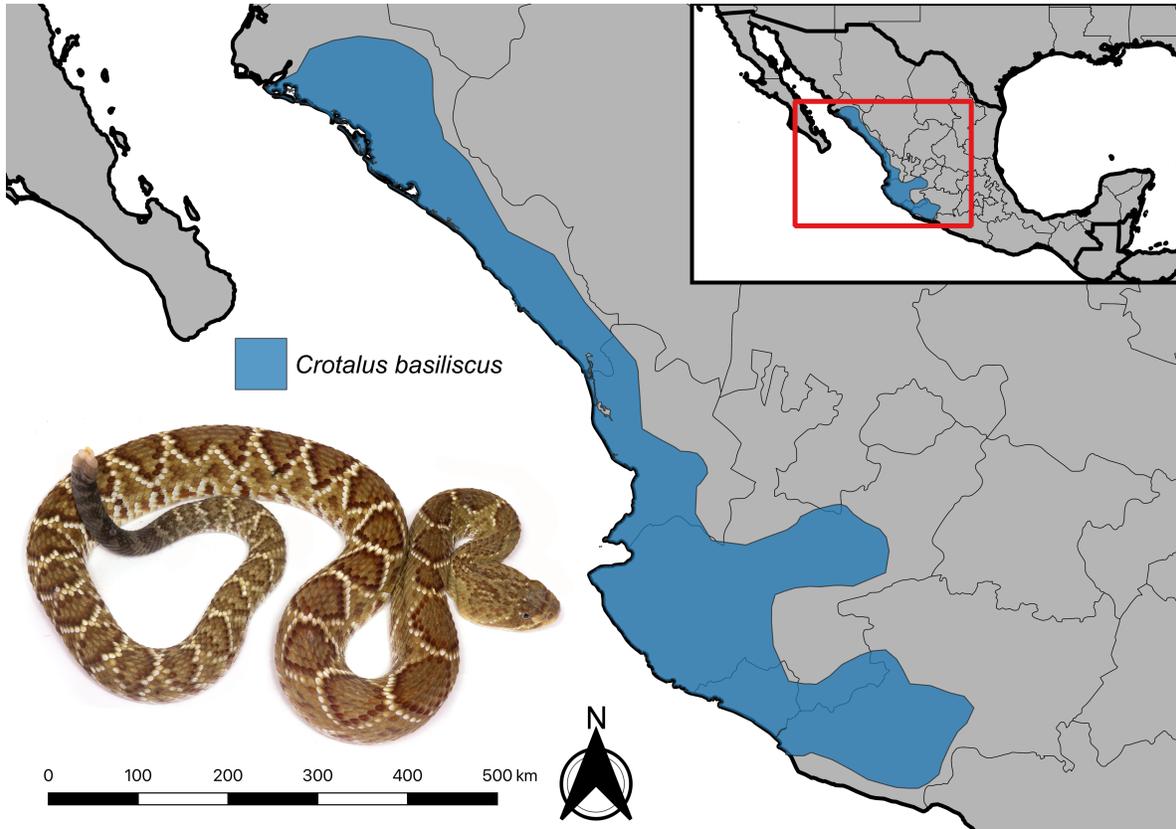
Los beneficios de usar una correcta mezcla inmunogénica que promueva una fuerte respuesta inmune en el caballo ya han sido descritos para el caso de crotamina y crotoxina de *C. durissus terrificus* en el cual se reportó un completo reconocimiento, aunque no la neutralización de los componentes (Teixeira-Araújo et al., 2017).

Actualmente en México, dos laboratorios producen antivenenos  $F(ab')_2$  polivalentes. Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México S.A. (Birmex) que utiliza una mezcla de venenos de *C. basiliscus* y *B. asper* (Segura et al., 2017) e Instituto Bioclon, Laboratorios Silanes que produce antiveneno polivalente: Antivipmyn® utilizando el veneno de *B. asper* y *C. simus* (De Roodt et al., 2014).

### III.5 *Crotalus basiliscus*

La especie *C. basiliscus* es una de las serpientes de cascabel más grande (1.5 a 2.0 m de longitud hocico-cola). Esta especie se encuentra desde el nivel del mar hasta altitudes cercanas a los 2000 m, en selvas bajas caducifolias, vegetación xerófila y bosques de

coníferas (Cope, 1864). Los estados del país en los que se distribuye abarcan desde la costa del Pacífico a partir de Río del Fuerte en la parte sur de Sonora a través de Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima y la parte noreste de Michoacán, incluyendo el Río Tepalcatepec hasta la desembocadura del Río Balsas (Lemos-Espinal et al., 2020; McCranie, 1981).



**Figura 5. Mapa de distribución de la Cascabel del Pacífico (*Crotalus basiliscus*).** Imagen por Dr. Jason Strickland.

De su comportamiento solo se ha reportado que habita en madrigueras de otros vertebrados como mamíferos, siendo una especie más activa durante los meses de verano en época de lluvias (Loc-Barragán et al., 2016). Además, no hay registros que indiquen una posible variación en la dieta de la especie. El veneno de la especie induce letalidad, hemorragia y necrosis en modelos animales (De Roodt et al., 2005; Sánchez et al., 2020; Segura et al., 2017). En cuanto a componentes individuales del veneno, se han aislado varias SVMPs hemorrágicas y fibrinolíticas (Datta et al., 1995; Retzios y Markland, 1992; Svoboda et al., 1995). Más adelante se darán detalles sobre la composición de su veneno.

## IV ANTECEDENTES

Se han llevado a cabo diversos estudios sobre la variabilidad geográfica y ontogénica de las serpientes de cascabel distribuidas en EE.UU., México, Centro y Sudamérica.

### IV.1 Variación del veneno de especies sudamericanas

Entre los primeros trabajos publicados en los años 30 que reportan diferencias entre los venenos de la misma especie está el de Vellard, con el veneno de *C. durissus terrificus* y reportándose que algunas poblaciones distribuidas en el sur de América (Argentina, Paraguay y sureste de Brasil) tienen veneno altamente neurotóxico, mientras que las poblaciones del norte (Brasil y Venezuela) tienen veneno mayoritariamente hemotóxico (Vellard, 1939).

Siendo parte del complejo de *Crotalus durissus*, las diferencias de veneno de la subespecie *C. d. cumanensis* de siete localidades de Venezuela fueron evaluadas. Se encontró que el veneno de la región de Margarita fue el más tóxico ( $DL_{50}$  0.18 mg/kg) mientras que Lagunetica y Carrizales (ambos con  $DL_{50}$  0.86 mg/kg) fueron los menos tóxicos, a su vez las regiones de Lagunetica y Carrizales obtuvieron la mayor actividad fibrinolítica. Para la actividad hemorrágica la región de Lagunetica obtuvo la mayor actividad (DMH 4.1  $\mu$ g). Los perfiles por exclusión molecular mostraron que las regiones de Anzoátegui, Carrizales y Lagunetica contienen una mayor porción de componentes de alto peso molecular (Aguilar et al., 2007).

### IV.2 Variación del veneno de especies en EE. UU.

En 1980, se documentó la existencia de variación geográfica en el veneno de otra especie de cascabel: *C. scutulatus scutulatus*. El estudio se llevó a cabo en Arizona, EUA encontrando que la zona norte de Tucson presenta venenos con baja toxicidad ( $DL_{50}$  2-6 mg/kg) debido a la ausencia de la toxina Mojave y altamente hemorrágicos y proteolíticos (a este tipo de veneno se le denomina "tipo B"), y para la región sureste de Arizona venenos con alta toxicidad ( $DL_{50}$  0.2-0.4 mg/kg) y baja actividad hemorrágica y proteolítica (veneno denominado "tipo A") (Hardy, 1983; Schield et al., 2018).

La subespecie *C. pricei pricei* que tiene una dieta especializada en lagartijas del género *Sceloporus* a lo largo de su vida. Los especímenes de tres localidades de EE. UU. y una de México fueron evaluados, se encontró una limitada variación de sus venenos asociada a

las regiones geográficas. No obstante, la localidad de Durango, México obtuvo valores más altos en sus actividades enzimáticas SVSPs y fosfodiesterasa en comparación con las localidades de EE. UU. Los perfiles cromatográficos de las localidades de EE. UU. fueron muy similares caso contrario al comparar con los venenos de Durango que mostraron la presencia de dos isoformas de PLA<sub>2</sub> en tiempos de retención entre 44-48 minutos. Los ensayos de letalidad se llevaron a cabo con un organismo modelo *Hemidactylus frenatus* (gecko común) y con la presa natural de estas serpientes, la lagartija *Sceloporus jarrovi* que ocurre en simpatria con las poblaciones de *C. p. pricei*. Los resultados mostraron que la presa natural de estas serpientes (*S. jarrovi*) es menos sensible al veneno con DL<sub>50</sub> 6.9 µg/g contrario a lo obtenido para el organismo modelo con una DL<sub>50</sub> de 0.8 µg/g. Los autores señalan que *S. jarrovi* no está específicamente adaptada a resistir el veneno de *C. p. pricei* (Grabowsky and Mackessy, 2019).

#### IV.3 Variación del veneno de especies mexicanas

En 2013, se realizó un estudio de la variación inter- e intra-específica del veneno de especímenes del complejo *simus* (en ese momento consideradas tres subespecies, que actualmente son especies independientes): *C. simus simus*, *C. simus culminatus* y *C. simus tzabcan*, encontrando diferencias en la expresión de crotoxina siendo *C. simus simus* quien presentó una mayor expresión seguido de *C. s. tzabcan*, mientras *C. simus culminatus* presentó baja o nula expresión. La presencia o ausencia de crotoxina se relacionó con la letalidad de los venenos siendo *C. s. simus* el más tóxico de las tres subespecies (DL<sub>50</sub> 0.1-0.3 mg/kg). En la actividad hemorrágica los venenos de *C. s. culminatus* y *tzabcan* fueron más hemorrágicos con valores de DMH similares (8.0-24 µg). *C. s. culminatus* presentó en su veneno la miotoxina crotamina y en pruebas *in vivo* ocasionó parálisis rígida en ratones, es así que los autores concluyeron que, en términos de letalidad el veneno de *C. s. simus* es de tipo II, mientras que el veneno *C. s. culminatus* es de Tipo I y *C. s. tzabcan* es un intermedio teniendo individuos con letalidad alta y baja (Castro et al., 2013). Continuando con los estudios enfocados al complejo *simus*, Flores-Martínez como parte de su tesis licenciatura encontró el gen de crotoxina en poblaciones de *C. tzabcan* (ahora especie), encontrando que hay polimorfismos en crotoxina sin un patrón aparente de distribución, es decir, que dentro de una misma localidad hay ejemplares crotoxina positivos y negativos.

Para *C. simus* también se ha descrito variación ontogénica. El veneno de crías es más tóxico que el de adultos (DL<sub>50</sub> cría 0.084 mg/kg; adulto 0.16 mg/kg), aunque ambos venenos

siguen siendo bastante potentes. Respecto a la degradación del fibrinógeno, las crías son capaces de degradar solamente a la cadena  $\alpha$ , mientras que los adultos degradan ambas cadenas. El veneno de crías no fue hemorrágico caso contrario para lo adultos que generaron lesiones hemorrágicas de 7-10 mm. La composición proteica de crías y adultos también mostró algunos cambios principalmente en la cantidad, el veneno de crías tiene una mayor proporción de subunidad ácida y básica de crotoxina y baja proporción de SVMPs (Neri-Castro and Ponce-López, 2018).

Otro trabajo fue realizado con el complejo *lepidus*, el cual se compone de cuatro especies *C. l. lepidus*, *C. l. klauberi*, *C. l. morulus*, *C. l. maculosus*. Solamente fueron evaluados los venenos de las primeras tres subespecies señaladas. Se encontraron diferencias en la proporción de componentes de los tres venenos, SVMPs (P-III) en mayor abundancia para *C. l. morulus* y también PLA<sub>2</sub>s y lectinas fueron identificadas. Los venenos de *C. l. lepidus* y *C. l. klauberi* fueron más hemorrágicos (DMH 0.15 y 0.23  $\mu$ g, respectivamente), miotóxicos y letales (DL<sub>50</sub> 1.6 mg/kg y 1.5 mg/kg, respectivamente) que el veneno de *C. l. morulus* (DL<sub>50</sub> 5.9 mg/kg; DMH 5.4  $\mu$ g). Este último veneno tuvo una mayor actividad proteolítica sobre azocaseína (90 U/mg). La actividad fibrinogenolítica y la actividad PLA<sub>2</sub> fueron similares para todos los venenos. No se confirmó la presencia de homólogos para crotoxina en los venenos. Se concluyó que *C. l. morulus* de Nuevo León corresponde a un veneno tipo I, mientras que *C. l. klauberi* de Chihuahua, Aguascalientes y Zacatecas y *C. l. lepidus* de Nuevo León corresponden a una categoría intermedia de un veneno tipo I y II (Martínez-Romero et al., 2013). Por otra parte, se llevó a cabo una caracterización general de dos especies *C. l. klauberi*, *C. aquilus* y un híbrido *C. lepidus x aquilus* de las regiones de Aguascalientes y Zacatecas encontrando que el veneno de *C. l. klauberi* fue más letal (DL<sub>50</sub> 0.6 mg/kg) y esto se asoció con la presencia de un homólogo de crotoxina que mediante análisis por ELISA se determinó correspondía a un 10.8 % del contenido del veneno. Los venenos menos tóxicos correspondieron a de *C. aquilus* y *C. lepidus x aquilus* (DL<sub>50</sub> 8.5 mg/kg y 5.8 mg/kg, respectivamente) y no presentaron crotoxina. Es así que los autores concluyen que los venenos de *C. aquilus* y los híbridos corresponden a veneno tipo I, mientras que *C. l. klauberi* de Aguascalientes corresponde a una categoría intermedia como se describió para otras poblaciones (Rivas et al., 2017).

Se realizó un estudio del veneno de las poblaciones de *C. scutulatus scutulatus* en México, específicamente en Comarca Lagunera una zona del desierto de Chihuahua estableciendo que el veneno de las especies que ahí habitan es de tipo B presentando baja toxicidad (DL<sub>50</sub>

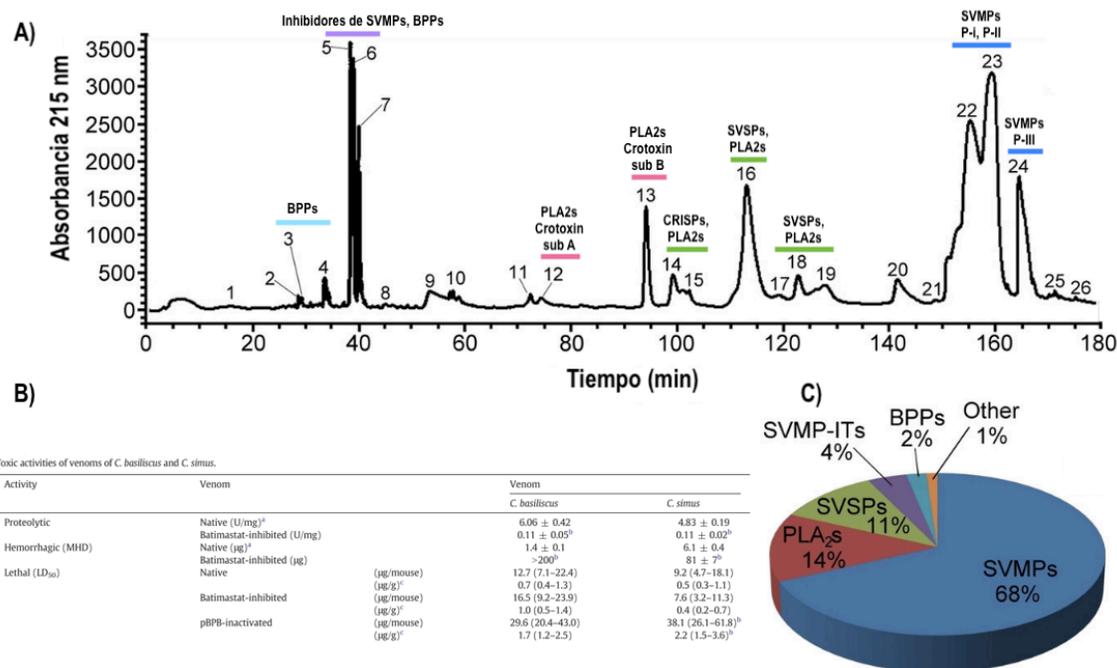
0.71-2.50 mg/kg) y con alta actividad hemorrágica formando halos hemorrágicos de 2.8-3.3 cm. De igual manera se evaluó la presencia del gen de crotoxina (subunidad ácida y básica) concluyendo que aquellos individuos de Tipo B no amplificaron para el gen de crotoxina (Borja et al., 2014). Cuatro años después, los mismos investigadores retoman el tema ampliando la distribución de la especie y encontrando tres tipos de venenos para las poblaciones de *C. s. scutulatus* en México: venenos de tipo A en la región de Aguascalientes positivos para Mojave toxina (12-38 % en veneno), altamente tóxicos ( $DL_{50}$  0.09-0.15 mg/kg) y con bajas actividad hemorrágica (halo = 0 mm) y proteolítica (2.6-5.8 U/mg); venenos de tipo A+B con distribución en Zacatecas, Jalisco y Nuevo León positivos para Mojave toxina (17-29 % en veneno), con toxicidades parecidas a las de los venenos tipo A ( $DL_{50}$  0.13-0.2 mg/kg) pero también con actividad hemorrágica (halos > 10 mm) y proteolítica (21.8-40 U/mg); y por último, venenos de tipo B, con distribución en la región noreste (Coahuila, Chihuahua, Zacatecas y Durango) negativos para Mojave toxina, baja toxicidad ( $DL_{50}$  0.3-1.1 mg/kg) y altamente hemorrágicos (halo > 20mm) y proteolíticos (31.9-46.5 U/mg). Se evaluaron muestras de DNA de serpientes con los tres tipos de venenos y solamente los venenos de tipo B no amplificaron para Mojave toxina (Borja et al., 2018a).

En estudios con el veneno de *C. molossus nigrescens* en ocho estados de México, en los que se registró además la longitud total de los individuos (TBL: Total body length), este parámetro se relacionó con las actividades biológicas y bioquímicas de los venenos. Como resultados se encontró que los individuos con TBL < 70 cm presentan menor actividad proteolítica sobre azocaseína (0.31 U/mg) y HPA (2.2 U/mg), que son capaces de hidrolizar solamente la cadena  $\alpha$  del fibrinógeno y que tienen una mayor proporción de crotamina (30-53 %) y de SVSPs (20-38 %) en sus venenos. Por otro lado, los individuos con TBL > 70 cm presentaron mayor porcentaje de SVMPS (~60 %) y fueron más proteolíticos (Azocaseína 8.4 U/mg, HPA 203.8 U/mg). Como parte del estudio se evaluó la capacidad de dos antivenenos mexicanos (Antivipmyn y Birmex) de neutralizar a los venenos de *C. m. nigrescens* concluyendo que los antivenenos reconocieron con mayor eficacia los componentes de alto peso molecular y que en los ensayos de neutralización no fueron capaces de neutralizar el efecto crotamina (parálisis rígida) ocasionado por los venenos de juveniles (Borja et al., 2018c).

Se evaluó la variación ontogenética en una población de *C. polystictus* del Estado de México encontrando diferencias entre neonatos y adultos. Los adultos presentaban una mayor

cantidad de SVMPs P-I y P-III así como desintegrinas debido a lo anterior los adultos presentaron una mayor actividad azocaseinolítica que los neonatos. La actividad fosfolipasa fue mayor en neonatos contribuyendo a su alta toxicidad ( $DL_{50}$  4.5 mg/kg) a comparación de los adultos ( $DL_{50}$  5.5 mg/kg); no se encontró presencia de homólogos de crotoxina. Los autores concluyen que el veneno de adultos de *C. polystictus* corresponde a un veneno tipo I (Mackessy et al., 2018).

Respecto a *C. basiliscus*, en fechas recientes se realizó un análisis proteómico, toxicológico e inmunogénico de un pool de veneno de 15 especímenes adultos mantenidos en cautiverio en Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México S.A. de C.V. (Birmex) y su relación inmunológica con el veneno de *C. simus*; para esto los investigadores utilizaron antivenenos producidos contra el veneno de *C. basiliscus* y *B. asper* (anti-Cb/Ba), un antiveneno contra *C. simus*, *B. asper* y *Lachesis stenophrys* (anti-Cs/Ba/Lm) y un antiveneno contra los venenos de *C. d. terrificus* y *C. d. collilineatus* (anti-Cdt/Cdc). Referente al análisis proteómico, los investigadores encontraron que el veneno de *C. basiliscus* se compone mayoritariamente de SVMPs (68 %),  $PLA_2$ s (14 %) del cual el 0.4 % corresponde a crotoxina y SVSPs (11 %), contrastando con *C. simus* que posee valores de 72, 8 y 5 %, respectivamente. Entre los componentes minoritarios encontrados en el veneno de *C. basiliscus* se mencionan péptidos potenciadores de bradicinina (BPPs, por sus siglas en inglés), proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISPs, por sus siglas en inglés) y L-aminoácido oxidasas (LAAOs, por sus siglas en inglés); no se menciona la presencia de desintegrinas ni de crotamina (Figura 6).



**Figura 6. Análisis proteómico y actividades biológicas y bioquímicas del veneno de *C. basiliscus*.** A) HPLC-MS/MS del “pool” de veneno de adultos de *C. basiliscus* indicando los componentes detectados por espectrometría de masas, B) gráfico de la abundancia relativa de las familias proteicas encontradas en el análisis proteómico y, C) tabla de la letalidad, actividad proteolítica y DMH (tomado y modificado de Segura *et al.*, 2017).

*C. basiliscus* presentó una letalidad alta DL<sub>50</sub> 0.7 (0.4-1.3) mg/kg y fue altamente proteolítico (6.06 ± 0.42 U/mg). Para los ensayos de neutralización dos antivenenos fueron utilizados: anti Cb/Ba y anti-Cdt/Cdc. Anti-Cb/Ba contiene como inmunógenos veneno de *C. basiliscus* y veneno de *B. asper* con la finalidad de evaluar neutralización hacia el veneno homólogo mientras que, anti-Cdt/Cdc contiene como inmunógenos veneno de *C. durissus terrificus* y *C. d. collilineatus*, venenos que se componen mayoritariamente de crotoxina y crotamina. El antiveneno anti Cb/Ba fue efectivo para neutralizar la letalidad del veneno de *C. basiliscus* DE<sub>50</sub> 159 (120-204) µL de antiveneno/mg de veneno. A su vez, este mismo antiveneno fue capaz de neutralizar el veneno de *C. simus* de Costa Rica lo que indica reactividad cruzada. Por otra parte, el antiveneno anti-Cdt/Cdc fue capaz de neutralizar 4DL<sub>50</sub> del veneno de *C. basiliscus* y de *C. simus* (76 µL de antiveneno/ mg de veneno), lo que estaría implicando que a pesar de que estos venenos tienen cantidades considerables de SVMPs y SVSPs, lo que les da la letalidad es la actividad neurotóxica de crotoxina (Segura *et al.*, 2017).

Edgar Neri en el grupo del Dr. Alagón ha realizado perfiles cromatográficos de distintos especímenes de *C. basiliscus* del estado de Nayarit, Jalisco y Colima en los que ha

observado que existe variación importante principalmente en la presencia de crotoxina, crotamina y SVMs (comunicación personal).

## V JUSTIFICACIÓN

A lo largo de los años se han realizado trabajos describiendo la variación intraespecífica de algunas especies del género *Crotalus*. Sin embargo, a pesar de que *C. basiliscus* es una especie que se utiliza como inmunógeno para la producción de uno de los dos antivenenos comerciales de México (BIRMEX) no se ha investigado la posible variación del veneno de acuerdo con su distribución geográfica que abarca la región noroeste y occidente del pacífico o su posible variación ontogénica. De igual manera, no se han realizado estudios sistemáticos de la neutralización del antiveneno (BIRMEX) hacia venenos de distintas regiones geográficas de *C. basiliscus*.

## VI HIPÓTESIS

El veneno de *C. basiliscus* presentará variación ontogénica y geográfica que será reflejada en las actividades bioquímicas y biológicas, así como diferencias en el reconocimiento y neutralización de distintos lotes de antiveneno (BIRMEX).

## VII OBJETIVO GENERAL

- Determinar la variación intraespecífica del veneno de *C. basiliscus* a lo largo de su distribución.

## VIII OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar las actividades biológicas y bioquímicas de los venenos de juveniles y adultos de varios estados.
- Determinar las familias proteicas relevantes del veneno de *C. basiliscus*.
- Evaluar la potencia neutralizante de distintos lotes de faboterápico antiviperino (BIRMEX) hacia los venenos que resulten distintos en su actividad letal y proteolítica.

## IX METODOLOGÍA

### IX.1 Cuantificación proteica de venenos

Los venenos y antivenenos utilizados en este proyecto provienen del banco de venenos del laboratorio del Dr. Alejandro Alagón (Herpetario Cantil). Algunas muestras son de especímenes que permanecen en cautiverio en el Herpetario Cantil, IBt, UNAM mientras que otros fueron capturados en campo con el permiso de colecta SGPA/DGVS/04788/17 expedido por SEMARNAT. Otros ejemplares pertenecen a otros herpetarios que permitieron la extracción de veneno. Cabe destacar que ninguno de los venenos utilizados pertenecía a individuos mantenidos en cautiverio por más de seis meses. Se obtuvieron en total 27 muestras de veneno de *C. basiliscus* (10 juveniles y 17 adultos) de los estados de Colima, Jalisco, Nayarit, Michoacán, Sinaloa y Zacatecas. Las muestras de veneno liofilizadas se pesaron y se resuspendieron en 1 mL de solución 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> 1.7mM, pH 7.2), después se cuantificó el contenido de proteína por medio de dos técnicas:

1. Medición de absorbancia a 280 nm ( $A_{280}$ ).
2. Ácido bicinconínico (BCA) con el kit de Pierce®.

Los stocks de veneno cuantificados se almacenaron a -70 °C hasta su uso en los experimentos.

Para los ensayos de neutralización se utilizaron tres lotes diferentes de “Faboterápico antiviperino polivalente” producido por la compañía Birmex: Lote FV044A (**B1**), FV030A (**B2**) y FV043A (**B3**) con fechas de caducidad de Oct-20, Dic-16 y Sep-20, respectivamente. Están compuestos por fragmentos F(ab')<sub>2</sub> purificados a partir de plasma de caballos, digeridos con pepsina y liofilizados. Los inmunógenos utilizados son veneno de *C. basiliscus* y *B. asper*. La concentración proteica de los lotes de antiveneno fue determinada por absorbancia a 280 nm tomando en cuenta el coeficiente de extinción ( $\epsilon$ ) 1.4. La concentración proteica de los lotes fue de: 28.1 mg/mL, 30.1 mg/mL, 22.2 mg/mL, respectivamente.

### IX.2 Geles de poliacrilamida SDS-PAGE

Con la finalidad de identificar los componentes proteicos del veneno se realizaron geles de poliacrilamida al 15 % en condiciones reductoras y no reductoras. 15  $\mu$ g de cada veneno fueron resuspendidos en buffer de carga (con y sin  $\beta$ -mercaptoetanol, de forma

independiente). Después, las muestras se cargaron en los carriles del gel, en una cámara de electroforesis usando un voltaje constante, 30 min a 70 V y después a 120 V se logró la separación de los componentes. Al finalizar la corrida, los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie 0.2 % G-250 o R-250, 10 % ácido acético, 10 % isopropanol y posteriormente se colocaron en solución de destinción. Se usaron marcadores de peso molecular (AccuRuler RGB PLUS prestained protein ladder, MAESTROGEN) como referencia.

### IX.3 Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa HPLC-FR y análisis de masas

La separación de los componentes de los venenos de *C. basiliscus* se llevó a cabo en una columna analítica C18 (XChroma™ HPLC Column 5 µm, 120 Å, 4.6 x 250 mm). Un miligramo de cada veneno fue disuelto en 1 mL de agua con 0.1 % de ácido trifluoroacético (TFA). Las muestras fueron cargadas en una velocidad de elución de 1 mL/min con un gradiente establecido de solución A (agua con 0.1 % TFA) y solución B (acetonitrilo 99.9% (CH<sub>3</sub>CN PM= 41.05, BDH6602-4L, BDH Chemicals) con 0.1 % TFA): 5 % B por 5 minutos, seguido de 5-25 % B por 10 minutos, 25-45 % B por 60 minutos, 45-70 % por 10 minutos y a partir de 105 minutos 100 % B. La corrida fue monitoreada a 214 nm y 280 nm.

Los picos/fracciones (señales cromatográficas) de los venenos de un ejemplar adulto y un juvenil de Michoacán fueron colectados, secados al vacío en un concentrador centrífugo Savant™ y, posteriormente cada fracción fue corrida en geles reductores al 15 % para identificar los posibles componentes encontrados dentro de cada fracción. Se eligió al veneno V20 juvenil de Nayarit como representante para ubicar en los cromatogramas dos componentes: crotamina y crotoxina (subunidad ácida y básica). Se corrieron 3 mg/mL del V20, se colectaron las fracciones, cada fracción se corrió en un gel reductor 15 % y aquellas fracciones que por el peso molecular pudieran ser crotoxina y crotamina se mandaron con el Dr. Fernando Zamudio en el laboratorio del Dr. Lourival D. Possani para analizar por espectrometría de masas con ionización en electrospray (ESI-MS). Una vez obtenidas las masas, las fracciones que correspondían a las masas esperadas de crotoxina y crotamina se inyectaron en ratones para observar actividad *in vivo*.

### IX.4 Determinación de la Dosis letal media (DL<sub>50</sub>)

La potencia letal de los venenos se determinó por vía intravenosa (vena lateral de la cola) en grupos de tres ratones sexo indistinto con peso de 18-20 g cepa CD-1 siguiendo la metodología descrita por Theakston y Reid (1983) con algunas modificaciones. La dosis

letal media ( $DL_{50}$  i.v.) se define como la cantidad de veneno expresada en microgramos ( $\mu\text{g}$ ) necesaria para matar al 50 % de una población de animales experimentales en un periodo de tiempo determinado. Después de 24 horas se registró el número de muertos por dosis. El porcentaje de mortalidad en cada grupo experimental se graficó en función del logaritmo de la dosis y los resultados se analizaron con el programa estadístico Graph Pad Prism Ver 6.0.

#### IX.5 Actividad Proteolítica sobre azocaseína

Para determinar la actividad proteolítica de los venenos de *C. basiliscus* se utilizó como sustrato azocaseína. Se preparó una solución de azocaseína a una concentración de 10 mg/mL en buffer de azocaseína (Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.15 M y  $\text{CaCl}_2$  5 mM, pH 8.0). Se mezclaron 100  $\mu\text{L}$  de azocaseína (10 mg/mL) con 20  $\mu\text{g}$  de cada veneno, los experimentos se hicieron por triplicado. Cada muestra se dejó incubar por 30 minutos a 37 °C. Pasado el tiempo se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético al 5 % a cada tubo para precipitar las proteínas y se centrifugaron por 5 minutos a 15,680 g. 150  $\mu\text{L}$  de sobrenadante fueron tomados y colocados en placas de ELISA añadiendo 150  $\mu\text{L}$ /pozo de NaOH 0.5 M. La absorbancia se leyó a 492 nm. Los resultados son expresados como U/mg  $\pm$  SD en donde una unidad (U) se define como el cambio de 0.2 en la absorbancia a 492 nm por minuto.

#### IX.6 Neutralización de la actividad proteolítica sobre azocaseína

Los resultados obtenidos en la prueba de actividad proteolítica nos llevaron a evaluar la capacidad de neutralización del antiveneno Birmex. Se analizaron tres lotes de antiveneno, a los cuales denominamos **B1** (Lote FV044A, Caducidad: Oct-20), **B2** (Lote FV030A, Caducidad: Dic-16) y **B3** (Lote FV043A, Caducidad: Sep-20). Estos fueron evaluados contra los venenos que tuvieron alta actividad proteolítica y de los cuales se tenía material suficiente para realizar los experimentos. Los venenos seleccionados fueron **V2** (adulto, Jalisco), **V3** (adulto, Jalisco), **V9** (adulto, Colima) y **V12** (adulto, Michoacán). El método utilizado fue como el descrito en la sección anterior (IX.5), añadiendo un paso de pre-incubación de 20  $\mu\text{g}$  de cada veneno con distintas cantidades de antiveneno (1500, 750, 375, 187.5, 93.7 y 46.9  $\mu\text{g}$ ) a 37 °C por 30 minutos previo a la adición del sustrato. La dosis efectiva media ( $EC_{50}$ ) se define como la cantidad ( $\mu\text{g}$ ) de antiveneno necesaria para neutralizar la actividad proteolítica de 20  $\mu\text{g}$  de veneno. El porcentaje de neutralización de la actividad proteolítica en cada grupo experimental se graficó en función del logaritmo de

la dosis y los resultados se analizaron con el programa estadístico Graph Pad Prism Ver 6.0.

#### IX.7 Actividad Hemorrágica

Para reducir el uso de animales, una sola cantidad de veneno (25 µg) fue inyectada subcutáneamente en el lomo de grupos de cinco ratones cepa CD-1 de sexo indistinto, con peso entre 22-30 g. Tres horas después de la inyección, los animales fueron sacrificados con cámara de CO<sub>2</sub> después de lo cual se removió la piel y se midió el área hemorrágica usando hojas milimétricas.

El diámetro se determinó con la siguiente ecuación:

$$Diámetro = 2 \times \left( \sqrt{\frac{\text{área hemorrágica}}{\pi}} \right)$$

Donde el área hemorrágica se expresa en mm<sup>2</sup> y  $\pi = 3.1416$ . El diámetro fue asignado a un nivel: Nivel 0 para aquellos venenos que provocaron una lesión hemorrágica < 5 mm, Nivel 1 lesión hemorrágica ≥ 5 mm y Nivel 2 lesión hemorrágica ≥ 10 mm. Es decir, que aquellos venenos con nivel 0 no son hemorrágicos, mientras que los que obtuvieron una lesión nivel 2 son muy hemorrágicos.

#### IX.8 Actividad fosfolipasa (PLA<sub>2s</sub>) sobre yema de huevo

La actividad fosfolipasa fue determinada con el método titulométrico de yema de huevo (Tan and Tan, 1988), en el cual se utiliza una solución de yema de huevo 10 % (0.1M NaCl, 0.01M CaCl<sub>2</sub>, 0.5% Triton X100) a la cual se le ajusta el pH a un valor entre 8.03 y 8.05, con NaOH 0.05M. Una vez ajustado el pH, 3 o 5 µl de las muestras de veneno (1 mg/mL) se añadieron a 500 µL de solución de yema de huevo 10 % y se buscó mantener el valor de pH por encima de 8 adicionando volúmenes constantes de NaOH 0.05M cronometrando el tiempo necesario entre la adición de NaOH y la siguiente. Se realizaron cinco mediciones para cada muestra y por triplicado. Con los resultados obtenidos presentamos la actividad fosfolipasa como U/mg. De esta manera, una unidad enzimática se define como µmoles de NaOH consumidos por minuto (µmol NaOH/min). La actividad específica se expresa como Unidades/mg de veneno (U/mg). Las µmoles de NaOH añadidas son proporcionales a la

cantidad de ácidos grasos liberados por la acción del veneno, los cuales acidifican la solución.

#### IX.9 Detección de crotoxina mediante ELISA

Placas de ELISA de 96 pozos (Nunc MaxiSorp®) fueron sensibilizadas con anticuerpo monoclonal 4F6 contra la subunidad básica de crotoxina (Neri-Castro et al., 2019) en una concentración final de 2 µg/mL en buffer de sensibilización (100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.5) por 1 hora a 37 °C. Después, las placas se lavaron con solución de lavado (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20); este proceso se repitió después de cada paso. Las placas se bloquearon con buffer de bloqueo (50mM Tris-HCl, pH 8, 0.5 % gelatina, 0.2 % Tween 20) por 2 horas a 37 °C. Una curva estándar de la subunidad básica de crotoxina fue preparada en una concentración de 5 µg/mL a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas (1:3). Además de la curva, se añadieron a la placa las muestras de los 27 venenos en una concentración de 20 µg/mL realizando diluciones seriadas (1:3) incubándolos por 1 hora a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 100 µL por pozo de anticuerpo policlonal de conejo anti-crotoxina (3 µg/mL) incubando por 1 hora a 37 °C (Neri-Castro et al., 2019; Ponce-López et al., 2020). Una vez finalizado el tiempo de incubación, se añadió anticuerpo comercial cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa (HRP), Merk® en una dilución 1:5000 por 1 hora a 37 °C. Finalmente, las placas fueron reveladas añadiendo 100 µL por pozo de ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)). La absorbancia se leyó a 405 nm usando un espectrofotómetro (TECAN®). Para determinar la concentración de homólogos de crotoxina en las muestras de veneno, los valores de absorbancia contenidos fueron interpolados en la curva estándar usando el programa estadístico Graph Pad Prism Ver 6.0.

#### IX.10 Actividad fibrinogenolítica

La actividad fibrinogenolítica se determinó utilizando fibrinógeno de humano (Sigma®). 10 µg de cada veneno fueron incubados con 50 µg de fibrinógeno humano disuelto en solución de PBS por 40 minutos en un volumen final de 50 µL. Se tomaron 5 µL de la mezcla de reacción y se cargaron en un gel de 12.5 % SDS-PAGE, con un voltaje de corrida de 80 V y, posteriormente a 120 V. Los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 y se colocaron en solución de destinción. Una vez desteñidos los geles, lo que se observó fue

el control de fibrinógeno con sus tres cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  y con pesos moleculares de 63.5 kDa, 56 kDa y 47 kDa y, en los demás carriles la degradación fibrinogenolítica causada por la adición de los venenos de *C. basiliscus*. La inhibición de esta actividad se llevó a cabo como se describió, pero incubando los venenos con el agente quelante EDTA o con PMSF antes de añadir el fibrinógeno, esto para observar el papel de las SVMPs y las SVSPs en la degradación del fibrinógeno.

#### IX.11 Potencia neutralizante ( $DE_{50}$ ) *in vivo*

Se midió la potencia neutralizante de tres distintos lotes de antiveneno de Birmex® (**B1**, **B2** y **B3**) contra venenos con valores de toxicidad diferentes (**V3**, **V6**, **V9** y **V10**) mediante la determinación de la dosis efectiva media ( $DE_{50}$ ), la cual se define como el volumen de antiveneno necesario para salvar a la mitad de una población experimental de ratones. Los venenos (**V3**, **V9** y **V10**) fueron seleccionados por sus valores de letalidad diferentes ( $DL_{50}$  de 60.4  $\mu\text{g}/\text{ratón}$ , 20.1  $\mu\text{g}/\text{ratón}$  y 2.6  $\mu\text{g}/\text{ratón}$ , respectivamente); mientras que el **V6** fue escogido por su alta cantidad de crotamina (32.5 %). Los ratones fueron inoculados con 3  $DL_{50}$  de veneno pre-incubado con distintas dosis de antiveneno en un volumen total de 0.5 mL por ratón. Para cada ensayo se utilizaron tres ratones de la cepa CD-1 con un peso entre 18-20 sexo indistinto. El porcentaje de sobrevivencia se registró a las 24 horas después de la inoculación. El análisis de los datos se realizó mediante una regresión no lineal graficando el porcentaje de sobrevivencia en función del logaritmo del volumen de antiveneno utilizado con el programa estadístico Graph Pad Prism Ver 6.0. Los resultados se expresan como  $\mu\text{LAV}/3DL_{50}$  es decir  $\mu\text{L}$  de antiveneno necesarios para neutralizar 3 dosis letales medias,  $\text{mgAV}/\text{mgV}$  (miligramos de antiveneno que neutralizan 1 mg de veneno) y  $DL_{50}/\text{vial}$  (dosis letales medias neutralizadas por vial).

#### IX.12 Western Blot: reconocimiento de los componentes del veneno

Para analizar la diferencia en el reconocimiento de la estructura primaria de los componentes los tres lotes de antiveneno fueron evaluados contra 12 venenos de *C. basiliscus*. Así, 5  $\mu\text{g}$  de cada veneno fueron analizados en geles de poliacrilamida al 15 % de en condiciones reductoras. Al finalizar la corrida, los geles fueron usados para transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Trans-blot 0.45  $\mu\text{m}$  Bio Rad®). Después de la transferencia, la membrana fue bloqueada con TBST (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150

mM NaCl, 0.05 % Tween 20) + 5 % leche descremada por una hora, después de lo cual se adicionaron 100 µg de anticuerpo primario (Lotes de Birmex: **B1**, **B2** y **B3**) en un total de 10 mL de TBST, como anticuerpo secundario se utilizó IgG cabra anti-caballo comercial no conjugado (5 mg/mL, Rockland®, CAT: 608-1104) en dilución 1:1000 en un volumen final de 10 mL de TBST, posteriormente se agregó un tercer anticuerpo IgG conejo anti-cabra comercial conjugado a fosfatasa Merk® (Lote: 2448043) en dilución 1:1000 en un volumen final de 10 mL de TBST y se reveló con 1 mL por membrana de buffer BCIP®/NBT AP (Lote: B5655-25TAB) parando la reacción con agua destilada. Paralelamente, como control se evaluaron las mismas muestras en un gel de poliacrilamida al 15 % bajo las mismas condiciones el cual fue teñido con azul de Coomassie R-250.

#### IX.13 Antivenómica (2ª generación)

Para determinar el inmunoreconocimiento del antiveneno hacia los componentes del veneno de *C. basiliscus* se siguió el protocolo descrito por (Calvete et al., 2016; Pla et al., 2012) comparando el lote **B3** y **B2** contra el veneno 9 de *C. basiliscus*. La antivenómica de segunda generación consiste en la inmovilización sobre perlas de sepharosa activada con CNBr; para luego usar estas columnas con perlas-antiveneno para capturar aquellos componentes del veneno que estaban siendo reconocidos por el antiveneno inmovilizado. En la antivenómica de segunda generación solamente se utiliza una cantidad fija de veneno, en nuestro caso se decidió incubar con 600 µg de veneno.

Para elaborar las columnas, los antivenenos fueron reconstituidos en 5 mL de agua destilada y luego dializados (buffer de acoplamiento 0.2M NaHCO<sub>3</sub>, 0.5M NaCl, pH 8.3-8.5). 0.5 g de CNBr-activated sepharose™ se reconstituyeron con 3 mL de 0.1 mM HCl por una hora seguido de lavados con 10 volúmenes de 1 mM HCl y dos volúmenes de buffer de acoplamiento para ajustar el pH de la columna a 7.0-8.0. Se determinó la concentración de los antivenenos por A<sub>280</sub> tomando en cuenta el coeficiente de extinción (1.44). Una vez cuantificados, 96.17 mg de antiveneno se agregaron a 1.5 mL de resina reconstituida y se dejó O/N a 4 °C en agitación. Se realizaron lavados a la columna y se cuantificó el antiveneno no acoplado por A<sub>280</sub>, para estimar así la cantidad de antiveneno acoplado efectivamente.

Después, se colocaron 250 µL de resina conteniendo 7.6 mg/columna de antiveneno en cinco columnas de afinidad para poder utilizarlas en varios ensayos con distintos antivenenos. Estas columnas fueron lavadas con 3 volúmenes de PBS 1X (buffer de

trabajo) y se incubaron por una hora a temperatura ambiente con 600 µg de V9 en un volumen total de 250 µL en agitación constante. Para verificar cualquier pegado inespecífico como control se utilizó una columna de 500 µL de resina acoplada con ~8 mg de IgGs de caballo preinmunes. Una vez concluida una hora de incubación, las columnas control y de antiveneno se lavaron 4 veces con 300 µL de PBS 1X recolectando la fracción no retenida, después utilizando buffer de elución (0.1 M ácido acético, pH 2.4 neutralizado con buffer de neutralización 1 M Tris-HCl, pH 9.0) se recolectó la fracción retenida. El veneno crudo, la fracción retenida y no retenida fueron analizadas mediante HPLC-FR usando una columna analítica C18 (XChroma™ HPLC Column 5 µm, 120 Å, 4.6 x 250 mm). Finalmente obtuvimos los porcentajes de fracción no retenida (% NR) usando la siguiente fórmula:

$$NR = 100 - \left( \left[ \frac{R}{R + NR} \right] \times 100 \right)$$

Donde R corresponde al área de la misma muestra inyectada de veneno que fue reconocida por la columna de afinidad. La inclusión de R en la fórmula compensa por posibles pérdidas durante el manejo de la muestra y en el análisis cromatográfico.

#### IX.14 Amplificación de genes de crotoxina y marcador mitocondrial (ND4)

El DNA genómico fue extraído de la muda (capa externa de la piel que cambia en el proceso de crecimiento) del individuo 18 crotoxina negativo y del individuo 15 crotoxina positivo, ambos provenientes de Coahuayana, Michoacán utilizando el kit DNeasy® Blood and Tissue (QIAGEN, Valencia, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los oligos usados para la amplificación de la subunidad básica de crotoxina fueron: Forward: 5'-ACCTGCTGCAATTCAACAAGA-3'; Reverse: 5'-CGAGAGTCCGGGTAAAACAT-3' (Zancolli et al., 2016). Los oligos usados para la amplificación del marcador mitocondrial subunidad 4 deshidrogenasas NADH fueron: Forward: 5'-CACCTATGACTACCAAAGCTCATGTAGAAGC-3'; Reverse: 5'-CATTACTTTTACTTGGATTTGCACCA-3' (Arevalo et al., 1994). Las reacciones de PCR contenían 1-2 µL de DNA genómico, 2 µL (10 mM) de cada par de primers (Forward y Reverse), 5 µL de Buffer PCR 10x, 4 µL de dNTPs (25 mM), 0.5 µL de Taq polimerasa, y agua destilada estéril libre de nucleasas hasta obtener un volumen final de 50 µL. Las condiciones de PCR para ambos genes fueron de 94 °C por 5 minutos para favorecer la desnaturalización, seguido de 30 ciclos con las siguientes condiciones: desnaturalización 94 °C por 30 segundos, alineamiento por 1 minuto y extensión a 72 °C por 1 minuto 30 segundos seguido de una extensión final a 72 °C por 5 minutos. La temperatura de

alineamiento para la subunidad básica MTXB (Mojave toxin subunidad básica) fue de 55 °C, mientras que para la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa (ND4) fue de 46 °C. Los amplicones generados fueron observados mediante un gel de agarosa 1 %. Las bandas que observamos en el gel de agarosa se cortaron y se purificaron con el kit High Pure PCR purification de Roche®, después se mandaron a la unidad de síntesis y secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología, UNAM para obtener las secuencias y hacer los alineamientos.

## IX.15 Transcriptómica

### IX.15.1 Biopsia de glándula del veneno

Se realizó la biopsia de glándula de un organismo (**V18**) que se mantiene en el herpetario. Para realizar la biopsia de la glándula derecha del individuo 18 se contó con la asistencia del M.V.Z Óscar Aguayo. Para obtener una buena cantidad de RNA mensajero, cuatro días antes de la cirugía se realizó la ordeña de veneno. El individuo con peso de 1.3 kg fue inmovilizado manualmente. Después se le aplicó una dosis de 2 mg/kg de Diazepam en la región de la musculatura dorsolateral de tal manera que estuviera relajado. Una vez que el animal estuvo lo suficientemente tranquilo, se aplicó una inyección de 30 mg/kg de Ketamina. Cuando el individuo dejó de producir movimientos de reflejo y/o respuesta a estímulos se consideró que estaba bien anestesiado. El médico procedió a retirar con un escalpelo la piel de la parte interior de la boca por debajo de las escamas supralabiales de la glándula derecha. Después parte de la glándula de veneno con tejido de músculo que lo recubría fue extraído e inmediatamente colocado en una solución de TRIzol (1 mL) manteniéndose en hielo seco hasta su posterior manipulación.

### IX.15.2 Extracción de RNA total y síntesis de cDNA a partir de veneno crudo y glándula de veneno

El RNA total fue purificado a partir de veneno fresco inmediatamente después de la ordeña del ejemplar días antes de la cirugía y por otra parte la biopsia de glándula de veneno de *C. basiliscus* (V18). A ambas muestras se les añadió TRIzol siguiendo el protocolo establecido que de homogeneizar la muestra con TRIzol, a partir de ahí se agregaron 200 µL de cloroformo por mL de TRIzol dejando reposar por 10 minutos a temperatura ambiente, los tubos se centrifugaron a 26,499 g por 10 minutos a 4 °C, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio al cual se le agregó el mismo volumen de isopropanol por 10 minutos a 4 °C

para precipitar el RNA. Se decantó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 µL de etanol al 75 % seguido de una centrifugación de 10 minutos a 4 °C, repitiendo el lavado con etanol otra vez. El tubo se dejó secar alrededor de 15 minutos a 37 °C boca abajo destapado sobre una toalla de papel para dejar evaporar el etanol. El RNA se disolvió en 30 µL de agua DEPC y el producto se analizó en un gel de agarosa 1 %.

#### IX.15.3 Síntesis de cDNA

Como control para asegurar que nuestro material de RNA total presentara RNAm proveniente de las células epiteliales que recubren la glándula del veneno, se tomaron 3 µL de RNA total y la síntesis de cDNA se llevó a cabo por el método de 3'-RACE usando el protocolo del fabricante. Se utilizó un adapter primer oligo(dT) provisto por el kit para iniciar la retrotranscripción del cDNA y poder seleccionar aquellos RNAm poliadenilados.

Posteriormente, a partir de cDNA se amplificaron transcritos de crotamina con los siguientes oligos: Péptido señal Forward: 5'-TGAAGATCCTTTATCTGCTGCTC-3', Proteína madura Forward: 5'-TATAAACGGTGTCTNAAGAAAGG-3', Reverse: 5'-AAGCTTTTAGATGGAGATGGCATTATTTACAC-3' mismos que ya habían sido utilizados previamente para amplificar crotamina de cDNA de glándula de *C. molossus nigrescens*.

#### IX.15.4 Transcriptómica

La síntesis y secuenciación de la biblioteca de RNAseq fue realizada por la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UUSMB, IBt-UNAM). La preparación de la biblioteca se realizó usando el Kit TruSeq Stranded mRNA Library Prep siguiendo el manual del fabricante. La secuenciación de las bibliotecas de RNAseq se realizó usando la plataforma de Illumina Nextseq 500, lo que genera extremos pareados de 75 pb. La calidad de las lecturas obtenida por la secuenciación se analizó usando FastQC (Andrews, 2010). El análisis transcriptómico fue realizado por el Dr. Jason Strickland, investigador de la Universidad de Alabama del Sur, basado en métodos previamente publicados (Strickland et al., 2018). Los datos crudos de las lecturas se analizaron y se cortaron los adaptadores utilizando el software TrimGalore! V.0.5.0 y se fusionaron utilizando PEAR v 0.9.6 (Zhang et al., 2014). Para el ensamblado *de novo* se utilizaron tanto TRINITY v 2.6.6 como Extender (Grabherr et al., 2011; Rokyta et al., 2012). La anotación se llevó a cabo con UniProt/SwissProt utilizando BlastX v 2.2.31+ con un *e-value* mínimo de  $10^{-4}$ . Los transcritos duplicados fueron removidos con Geneious Prime v 2020.2.1 (Biomatters Ltd.) y las secuencias quiméricas se removieron con ChimeraKiller v 0.7.3 (disponible en

<https://github.com/masonaj157/ChimeraKiller>). Los transcritos del veneno y la glándula del veneno se combinaron y se formó un cluster en 98 % (-c .98) usando Cd-hit-est v 4.8.1 (Li y Godzik, 2006) para limitar la variación alélica y generar un transcriptoma consenso final para el individuo **V18**.

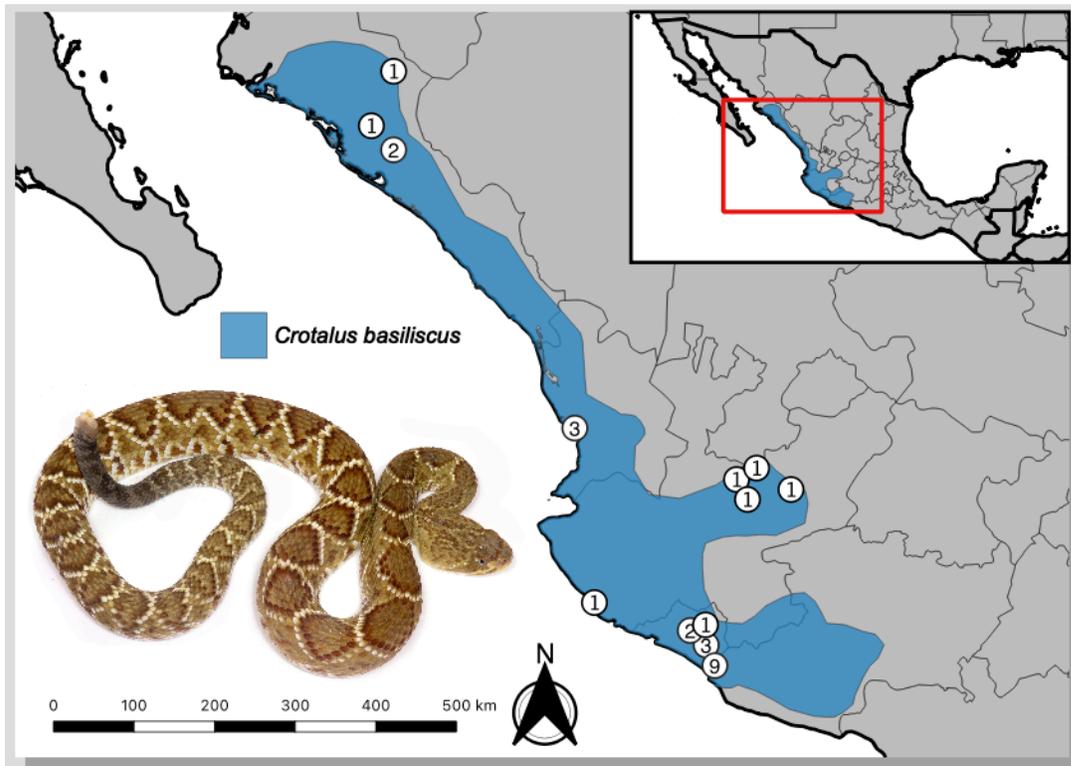
Para determinar la expresión relativa de cada familia de proteínas, se mapearon las lecturas de transcritos contra el transcriptoma consenso usando Bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012) con RSEM v 1.3.2 (Li y Dewey, 2011). Los resultados fueron importados como transcritos por millón (TPM) en Rstudio v 1.3.1093 usando R v 4.0.2; y se graficó el número de lecturas de cada transcrito así como la proporción de cada familia de toxinas.

Para asegurarnos de que crotoxina no estaba presente en el individuo, se mapearon las lecturas pareadas del veneno y de la glándula del veneno con una secuencia conocida de la subunidad básica de *C. basiliscus* (Genbank Accession KU666923) (Modahl and Mackessy, 2016).

## X RESULTADOS

### X.1 Venenos

Veintisiete venenos de *Crotalus basiliscus* provenientes de cinco estados de la República Mexicana fueron evaluados (Tabla 1). En el mapa (Figura 7) se indican ocho muestras de veneno para Colima (Localidad: 2 en Coquimatlán, 1 en Colima centro, 3 en Ixtlahuacán y 2 en Coahuayana), siete muestras para Michoacán (Localidad: todas de Coahuayana), cuatro muestras para Jalisco (Localidad: 1 en Tepatitlán de Morelos, 1 en Zapopan, 1 en La Huerta y 1 en Jalisco centro), cuatro para Sinaloa (Localidad: todas de Culiacán), tres para Nayarit (Localidad: todas de San Blas) y 1 para Zacatecas (Figura 7). 9 juveniles y 18 adultos conforman el grupo de venenos evaluados.



**Figura 7. Distribución geográfica de los 27 venenos de *C. basiliscus* analizados.** Los números indican la cantidad de muestras en determinada localidad. Elaborado por el Dr. Jason Strickland.

**Tabla 1** Venenos de *Crotalus basiliscus* evaluados

ID	Estado	Localidad
V1	Jalisco	Tepatitlán de Morelos
V2	Jalisco	Zapopan
V3	Jalisco	La Huerta
V4	Colima	Ixtlahuacán
V5	Colima	Ixtlahuacán
V6	Colima	Ixtlahuacán
V7	Colima	Coquimatlán
V8	Colima	Coquimatlán
V9	Colima	Colima
V10	Nayarit	San Blas
V11	Michoacan	Coahuayana
V12	Michoacan	Coahuayana
V13	Jalisco	Jalisco
V14	Nochistlán de Mejía	Zacatecas
V15	Michoacan	Coahuayana
V16	Michoacan	Coahuayana
V17	Michoacan	Coahuayana
V18	Michoacan	Coahuayana
V19	Michoacan	Coahuayana
V20	Nayarit	San Blas
V21	Nayarit	San Blas
V22	Colima	Coahuayana
V23	Colima	Coahuayana
V24	Sinaloa	Culiacán
V25	Sinaloa	Culiacán
V26	Sinaloa	Culiacán
V27	Sinaloa	Culiacán

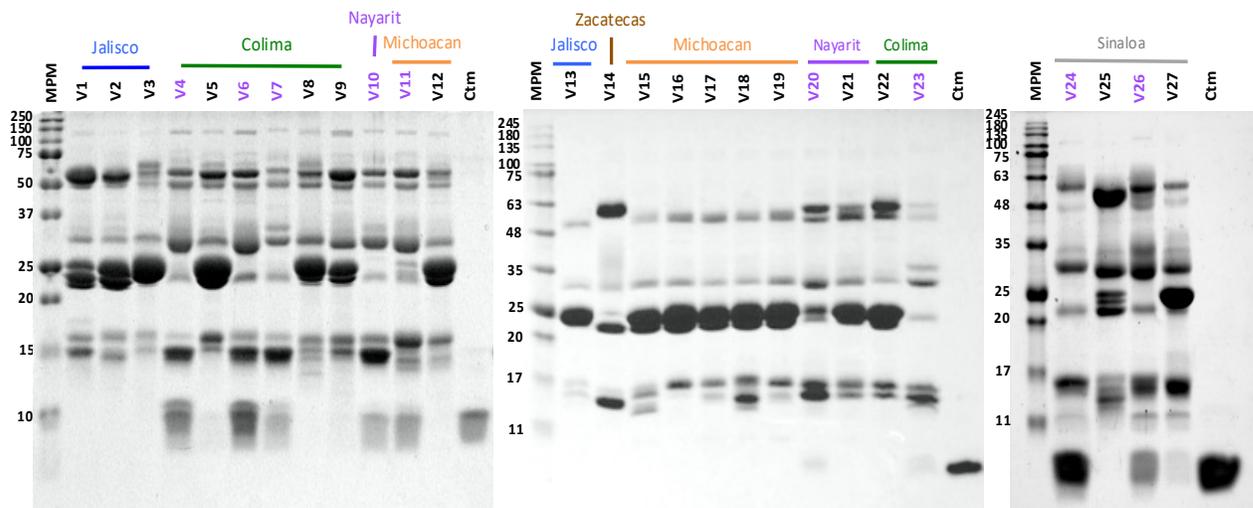
\*= Juvenil

ID= nombre de identificación de los venenos, así se encuentran registrados en el banco de venenos del laboratorio del Dr. Alagón.

## X.2 Perfil Electroforético: SDS-PAGE

Como paso inicial para la caracterización de los venenos, se realizaron los perfiles electroforéticos de los 27 venenos, observándose bandas que corresponden a proteínas de alto, mediano y bajo peso molecular. Por trabajos previos (Segura et al., 2017) éstas bandas podrían ser SVMPs, las cuales corren entre los pesos 37-50 kDa y 20-25 kDa (SVMPs P-III y SVMPs P-I), SVSPs que corren entre los 25-37 kDa, y PLA<sub>2</sub>s que corren alrededor de los 15 kDa.

De manera general se detectaron diferencias en la abundancia de bandas (~55 kDa) y en la presencia/ausencia de bandas proteicas entre los 25 y 37 kDa entre los venenos (Figura 8). Los perfiles de adultos mostraron tres bandas proteicas abundantes, una cercana a 55 kDa y dos entre 20-25 kDa, mientras que en los perfiles de ejemplares juveniles éstas se encuentran en menor proporción, en la zona donde corren las PLA<sub>2</sub>s (cerca de los 14 kDa) se observó una banda definida y abundante, de igual manera por debajo de los 10 kDa vió una banda abundante.

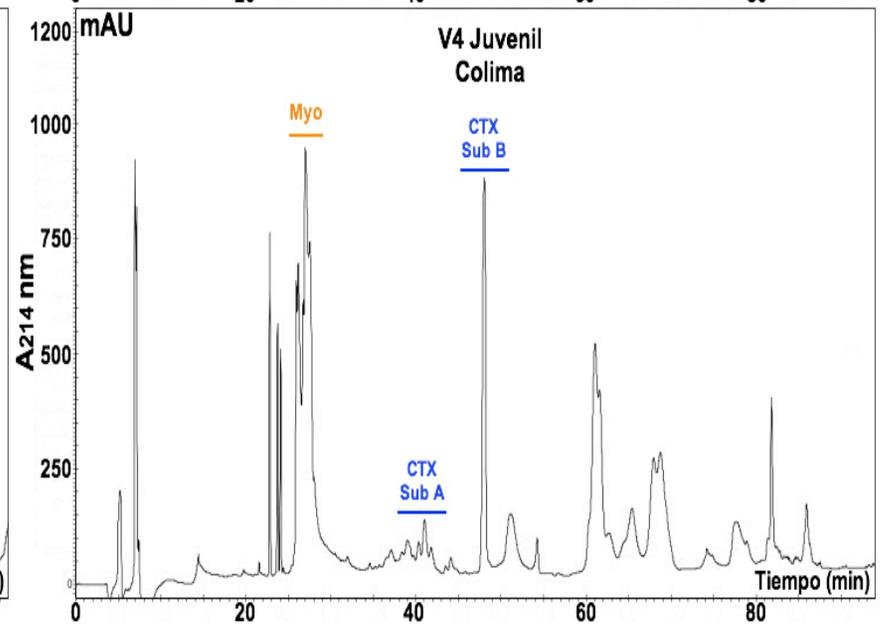
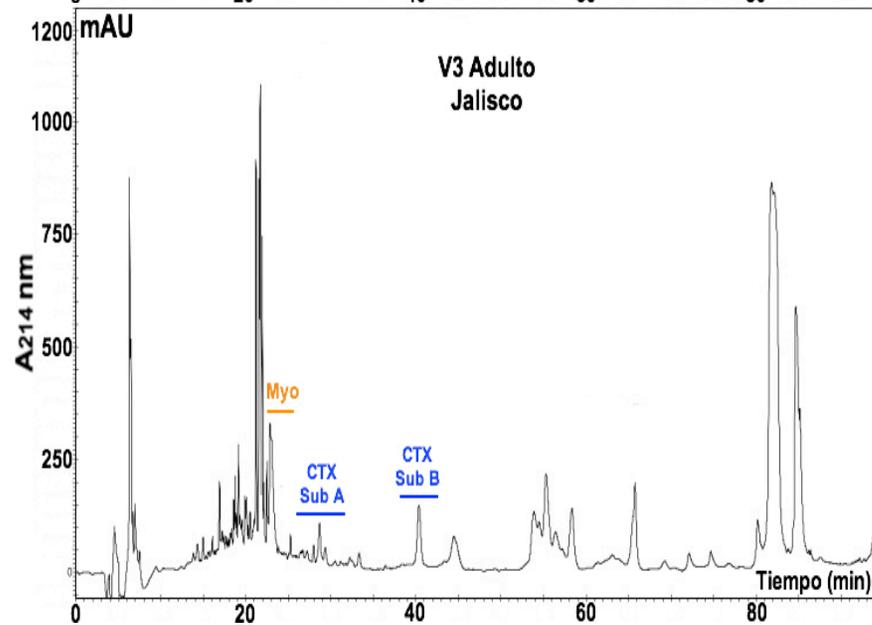
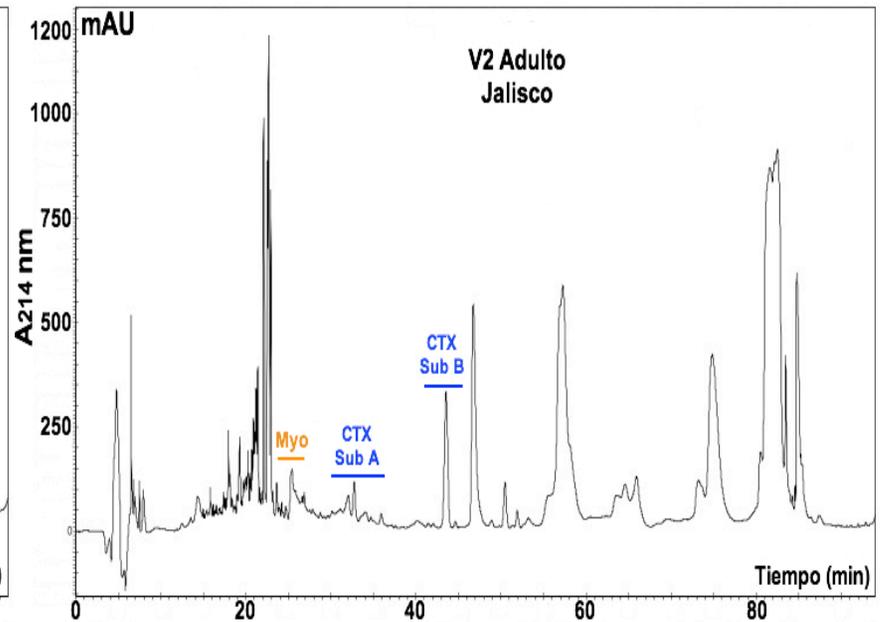
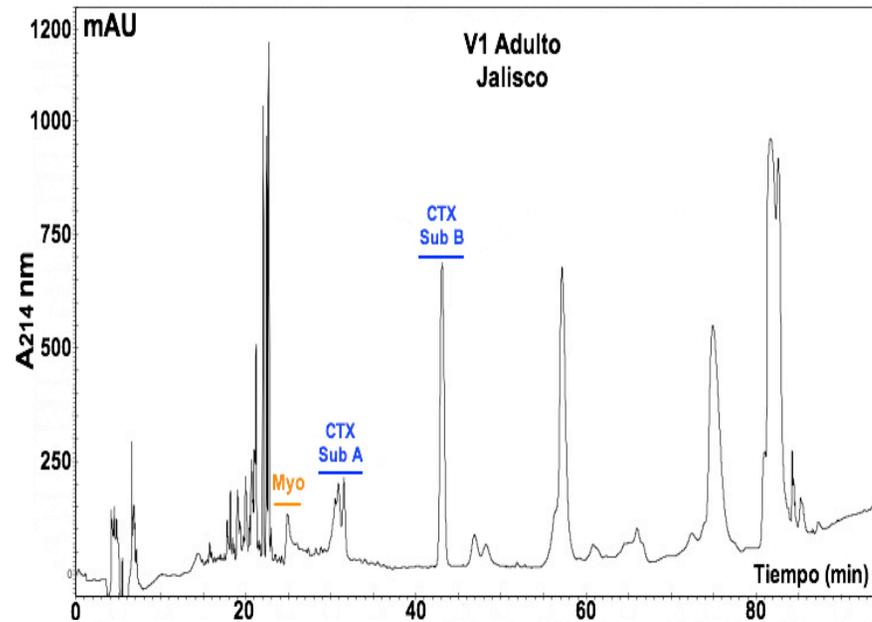


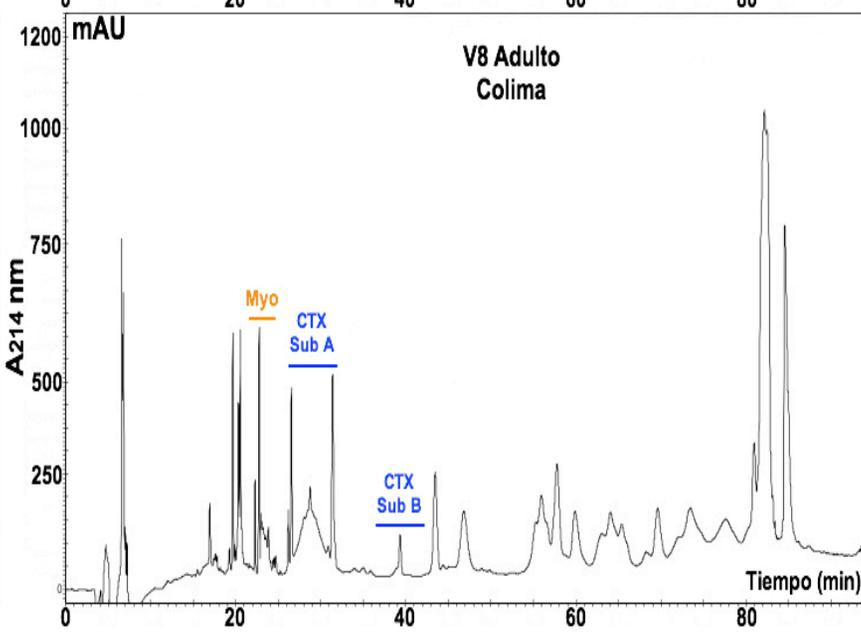
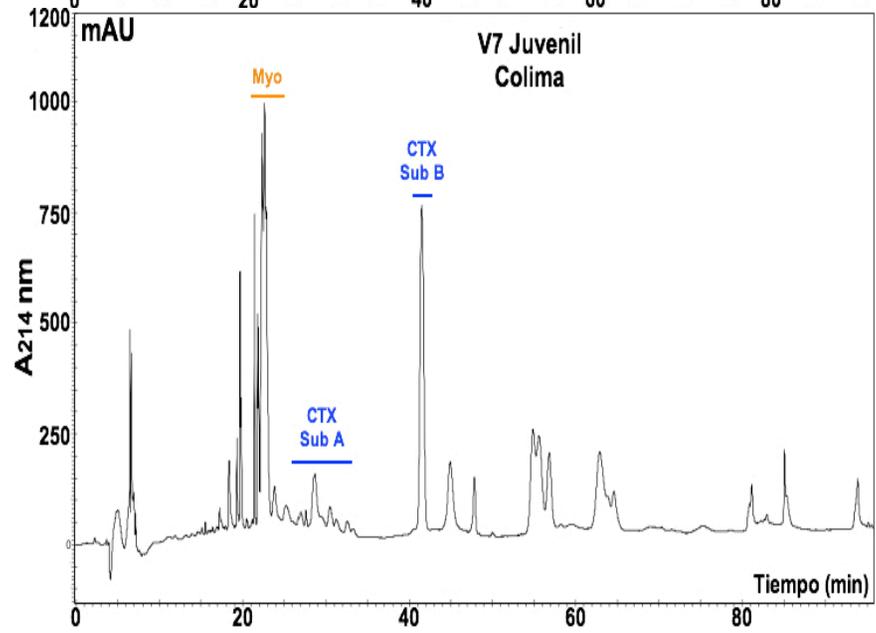
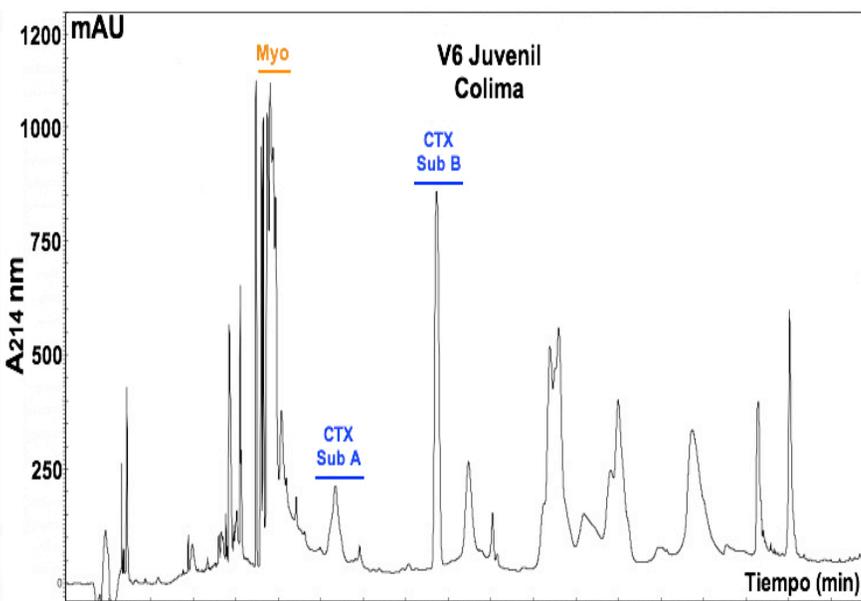
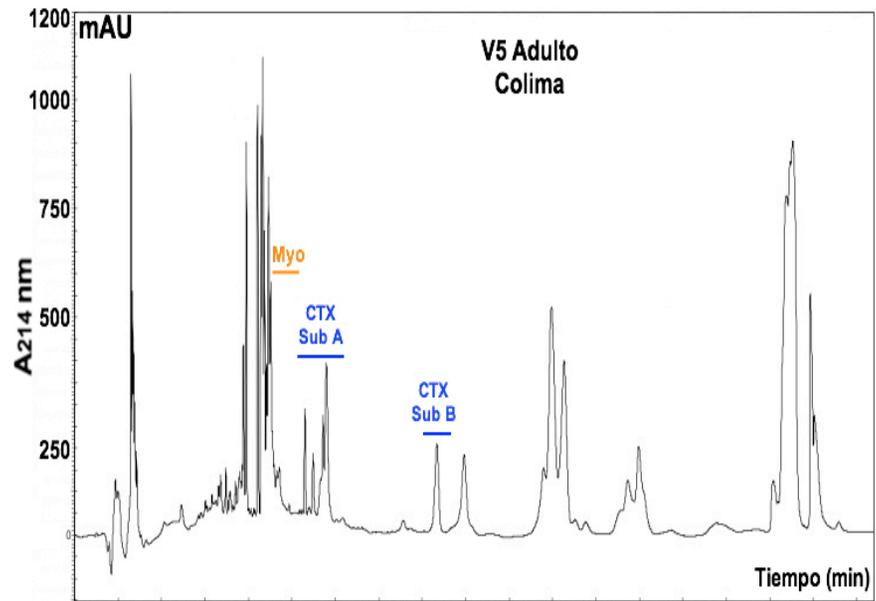
**Figura 8. Perfiles electroforéticos de los venenos de *C. basiliscus* en SDS-PAGE.** Las localidades de las muestras están resaltadas con colores en la parte superior. MPM (Marcador de peso molecular; dos marcadores diferentes fueron usados); Venenos (V1-V27); Control: crotamina (Ctm) purificada del veneno de *C. d. terrificus*. Los venenos de juveniles están resaltados con color morado. Se utilizaron dos marcas distintas de marcadores.

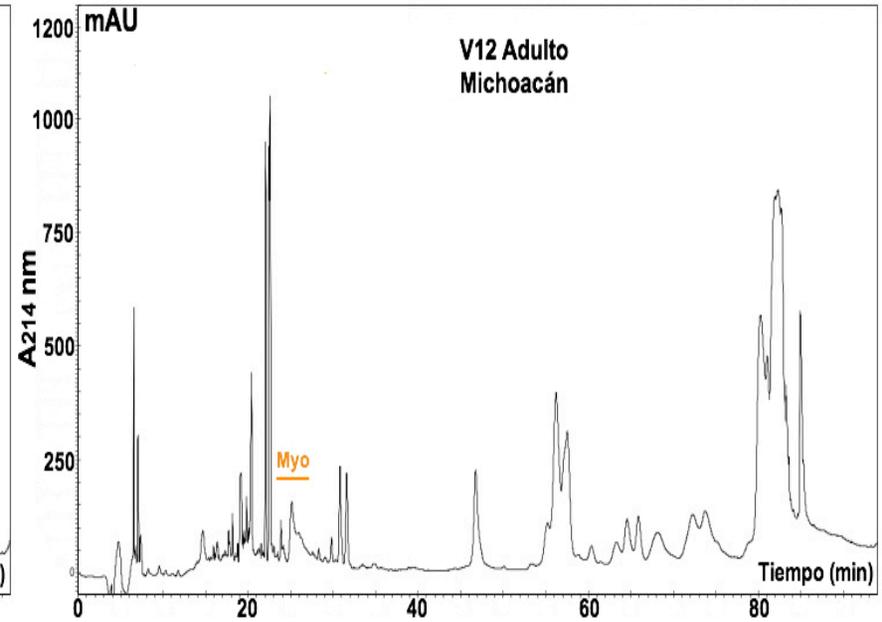
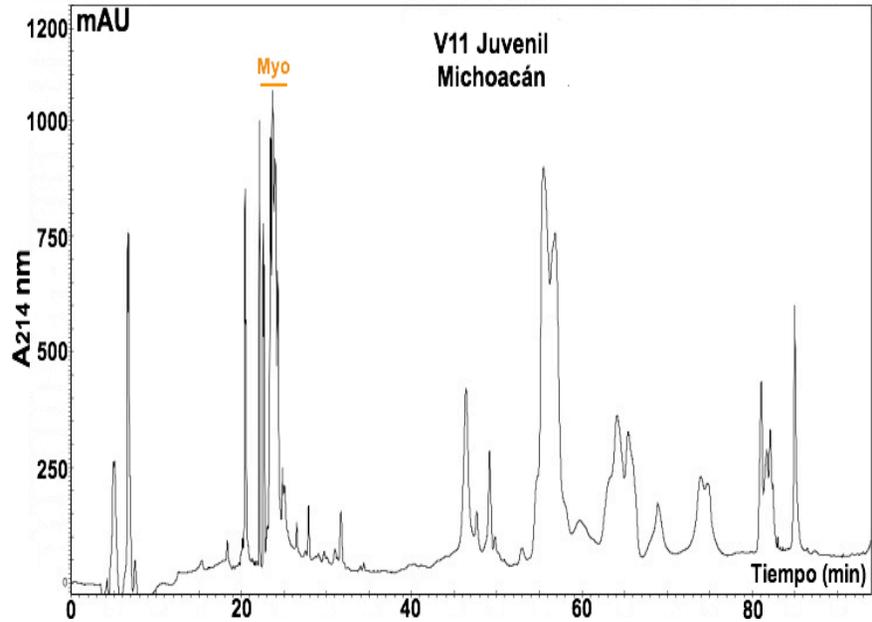
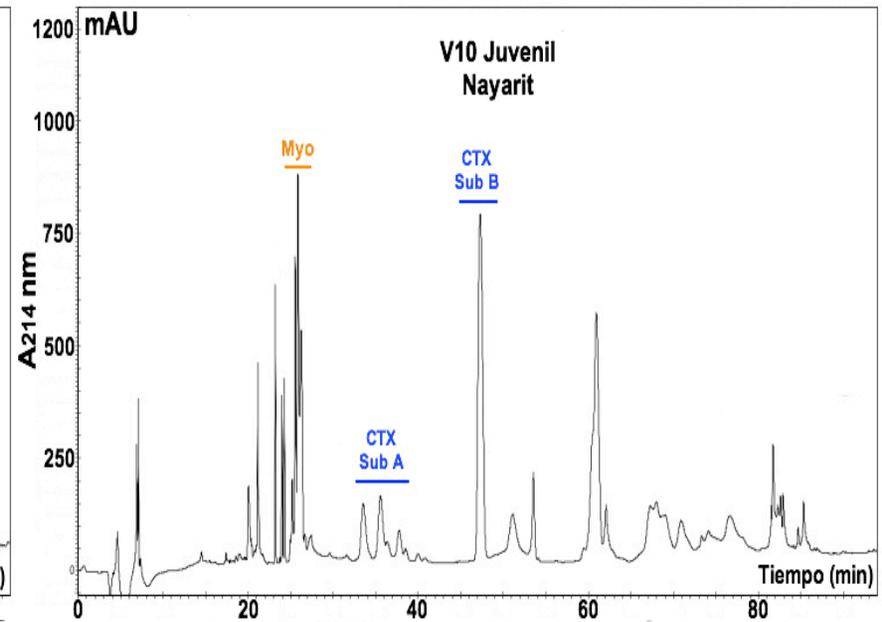
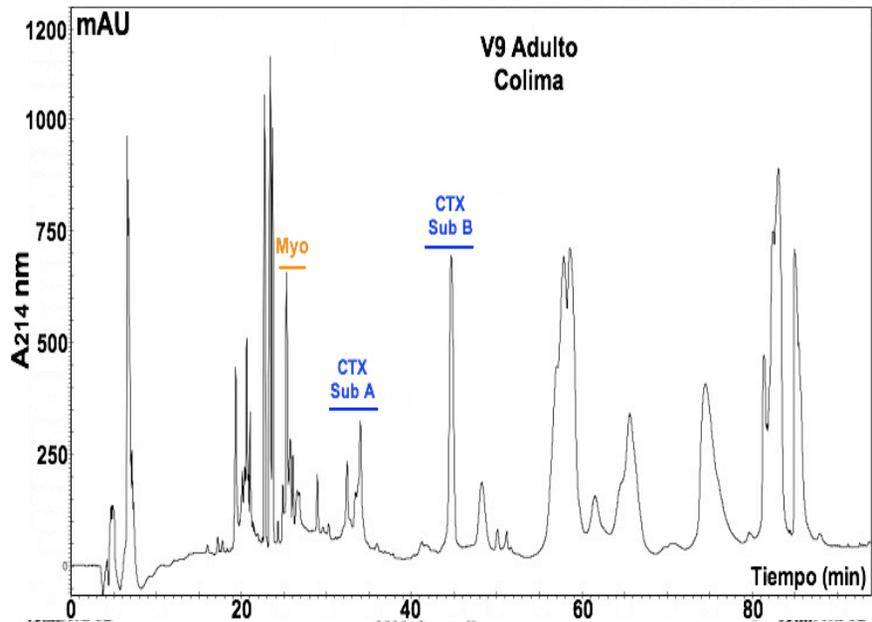
## X.3 Cromatografía Líquida de alta resolución en fase reversa HPLC-FR y análisis de masas

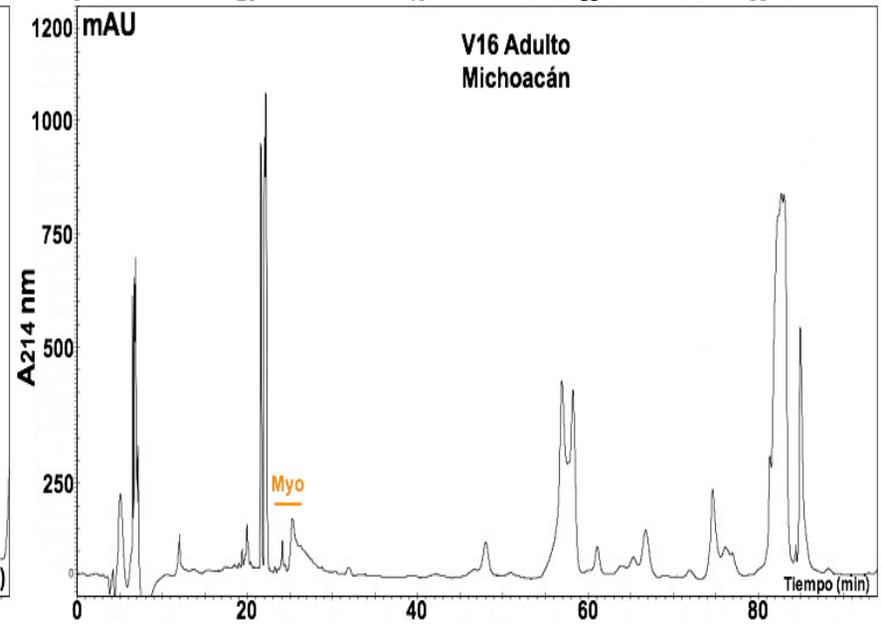
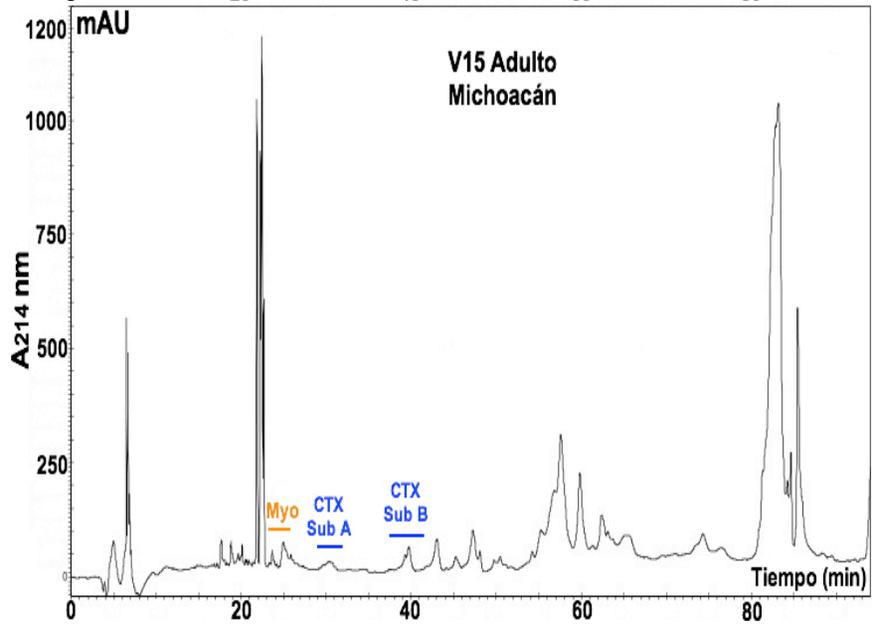
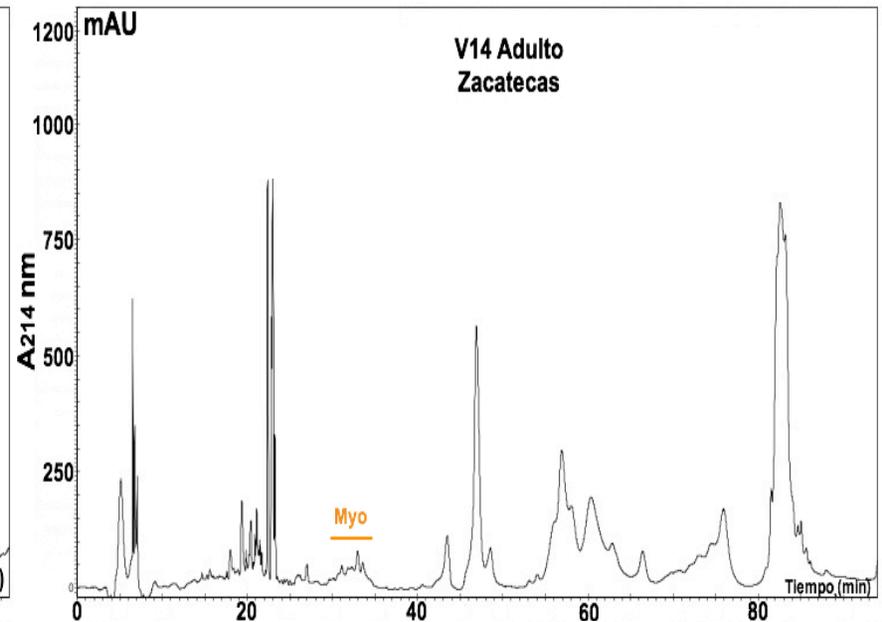
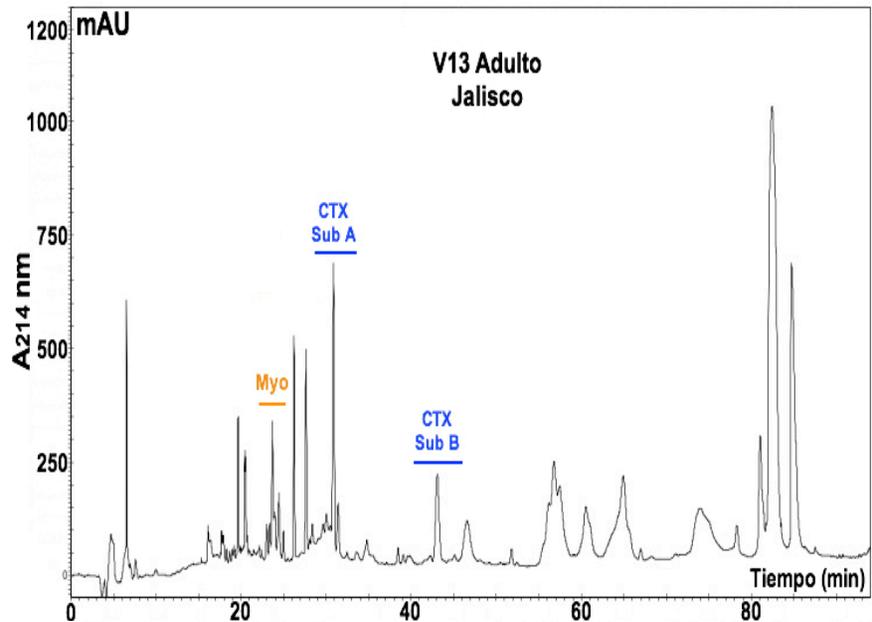
Veintiséis venenos fueron fraccionados por HPLC-FR (Figura 9). Los perfiles de adultos de Jalisco, Nayarit y Colima son similares en términos de número de picos con regiones

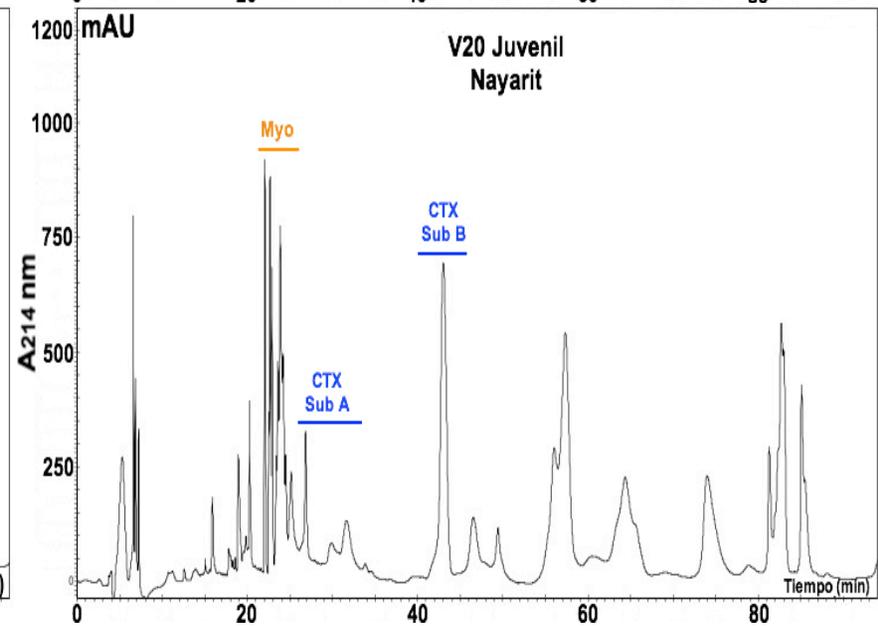
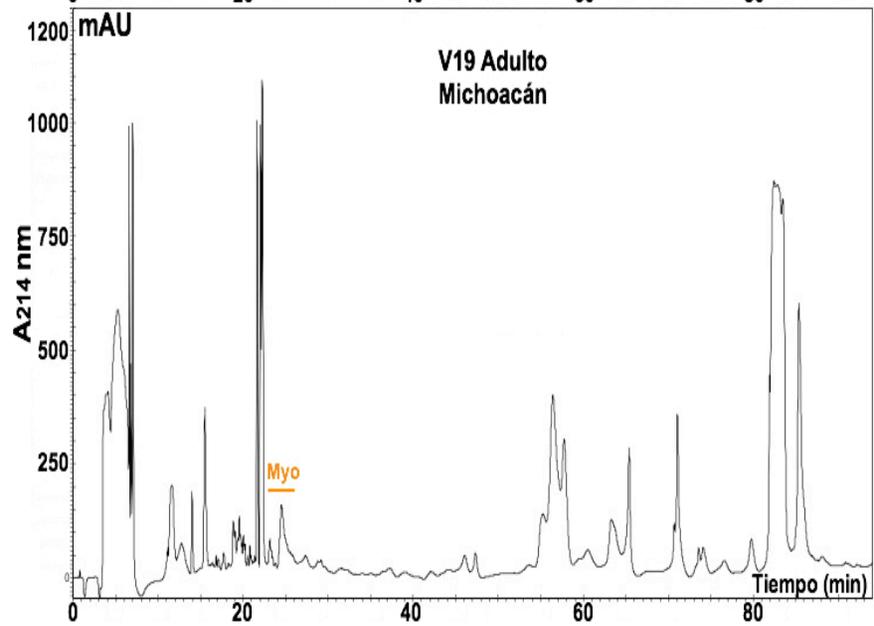
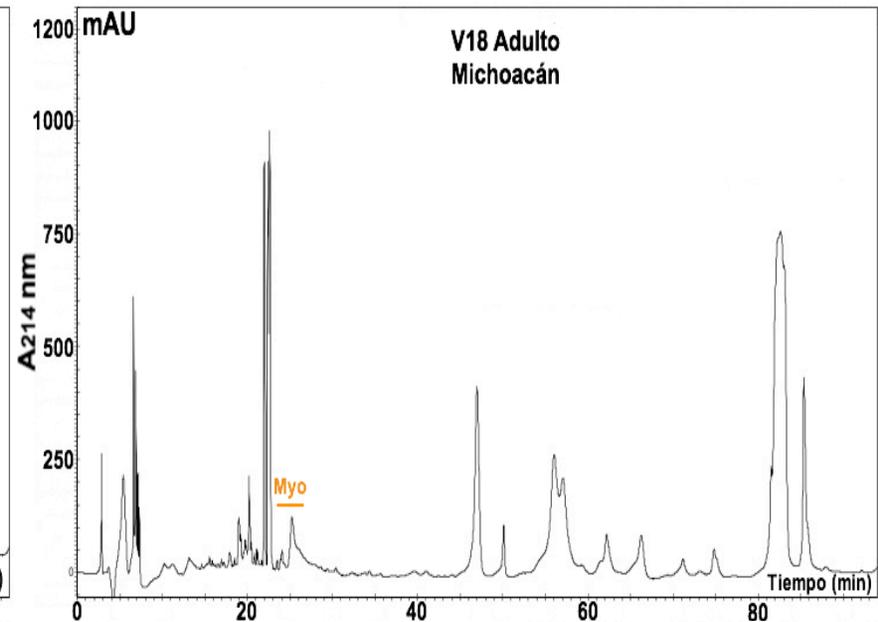
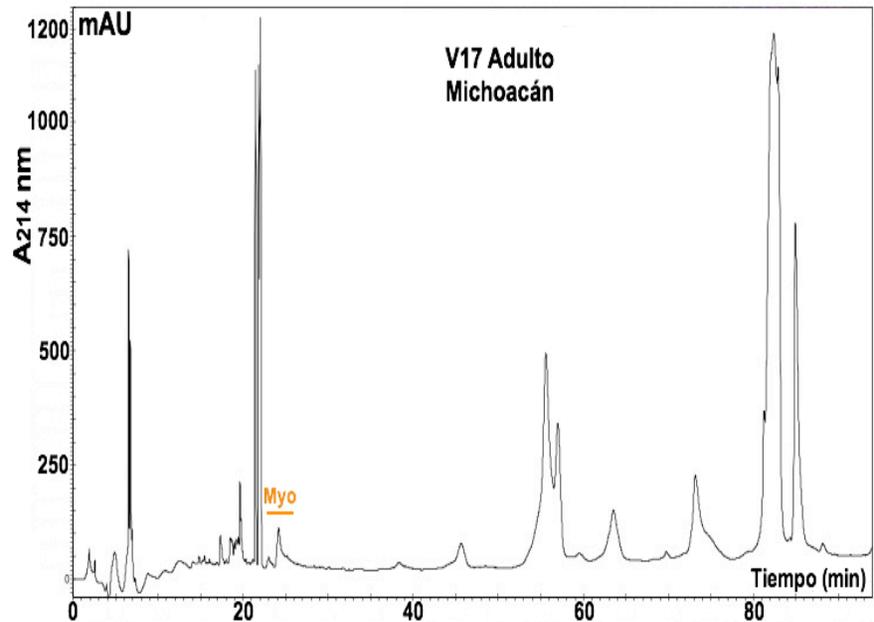
altamente parecidas 60-80 min y regiones picos variables entre los 15-35 min. Sin embargo, las mayores diferencias se observaron con respecto a la abundancia. Los especímenes de Zacatecas, Michoacán y Sinaloa son diferentes de los demás adultos en los picos con tiempos de retención entre 20-40 minutos. Por otra parte, los venenos de juveniles difieren de los de adultos; las principales diferencias están en una abundancia de picos entre los 22-24 minutos, 42 minutos (este último pico ausente en los juveniles de Michoacán y Sinaloa) y en los picos entre los 60-70 minutos (Figura 10). La disminución en los componentes a partir de los 80 minutos es característica de los venenos de juveniles. Los componentes entre los 24-25 minutos (picos 6, 9 y 11) fueron identificados como crotamina (Myo) y posiblemente sus isoformas con peso molecular de 4197.09, 4395.44, 4506.8, 4065.58 y 4177.7 Da por espectrometría de masas (ESI-MS); además del peso molecular, la parálisis rígida inducida en ratones ayudó a la identificación. Se observa que tanto juveniles como adultos presentan crotamina (pico 7) en sus venenos solo que esta va disminuyendo a medida que el individuo crece (Figura 10). Otro de los componentes que eluye a los 42 minutos (pico 15) fue identificado como la subunidad básica de crotoxina (CTX sub B) y al menos una isoforma por su peso molecular de 14184.04 y 14295.7 Da y por provocar signos de neurotoxicidad en los ratones inyectados (Figura 11). Cabe señalar que tanto juveniles y adultos de *C. basiliscus* presentaron homólogos del complejo crotoxina menos los venenos de Michoacán y Sinaloa en donde se encuentra ausente (con excepción del veneno 15).

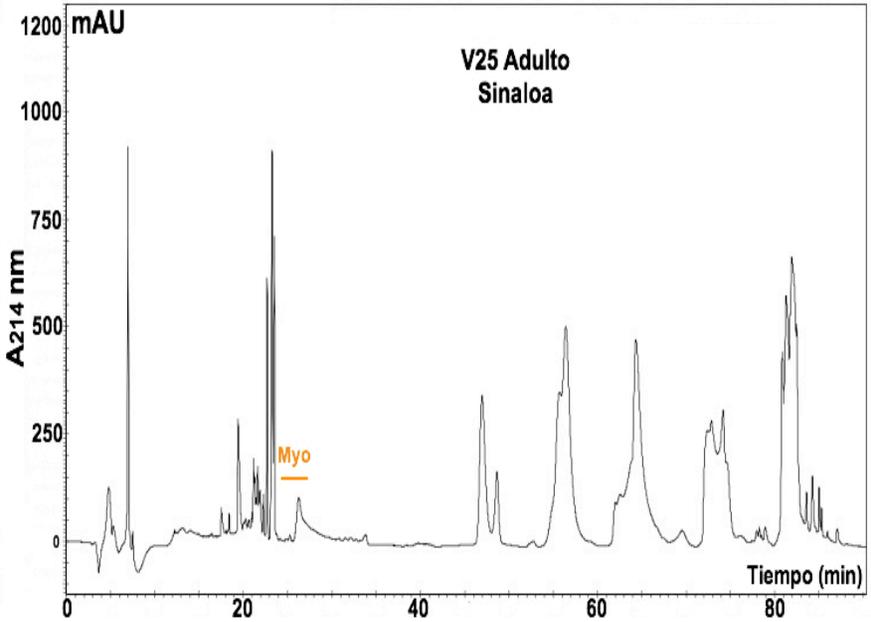
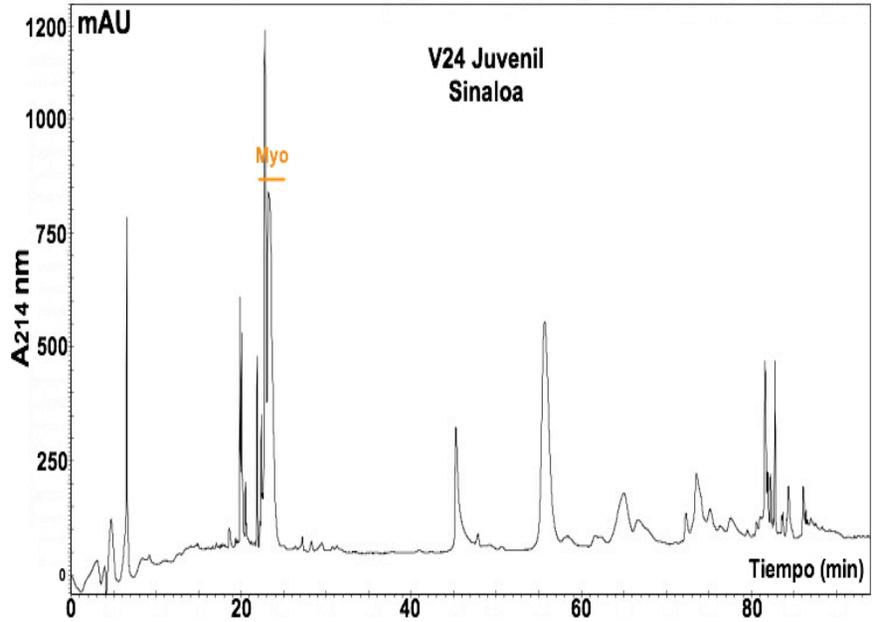
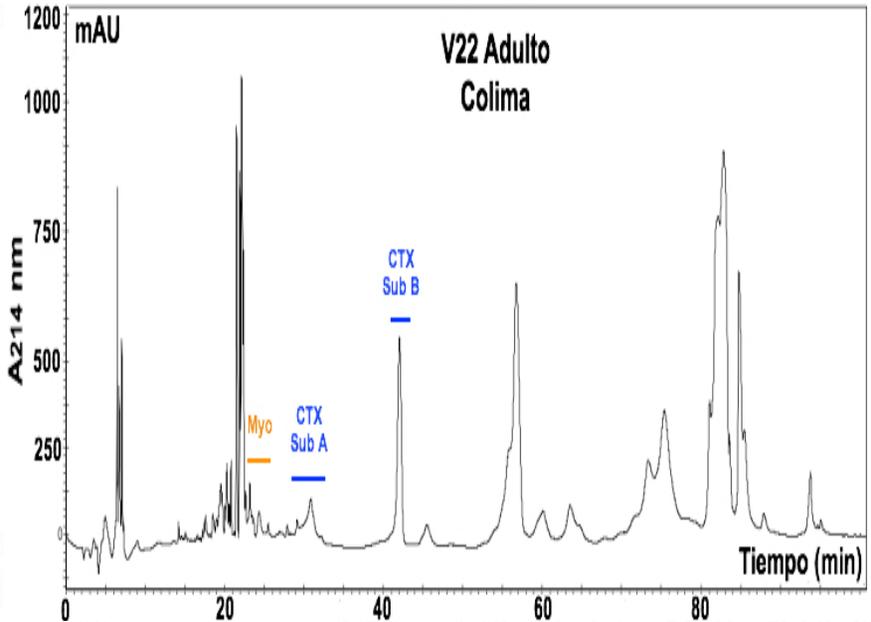
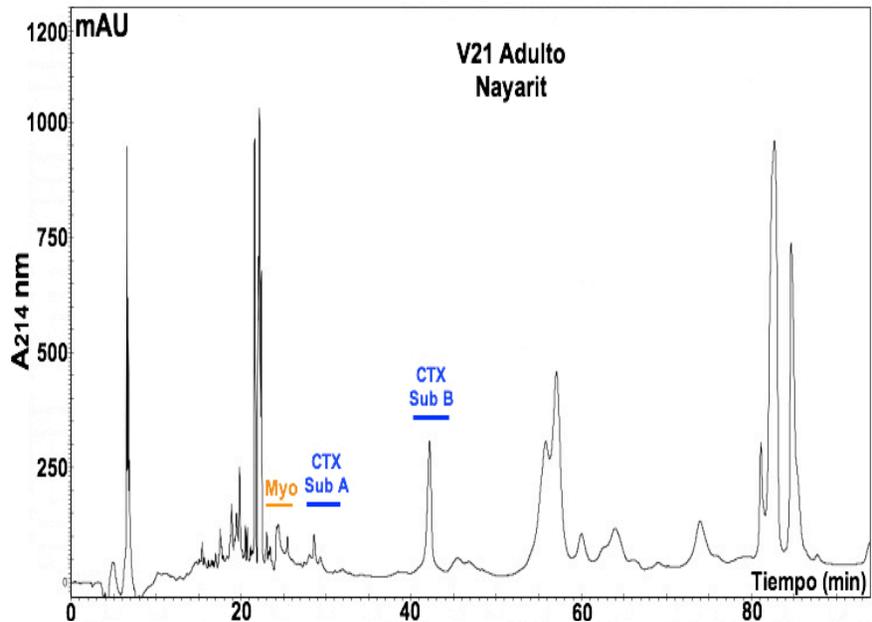


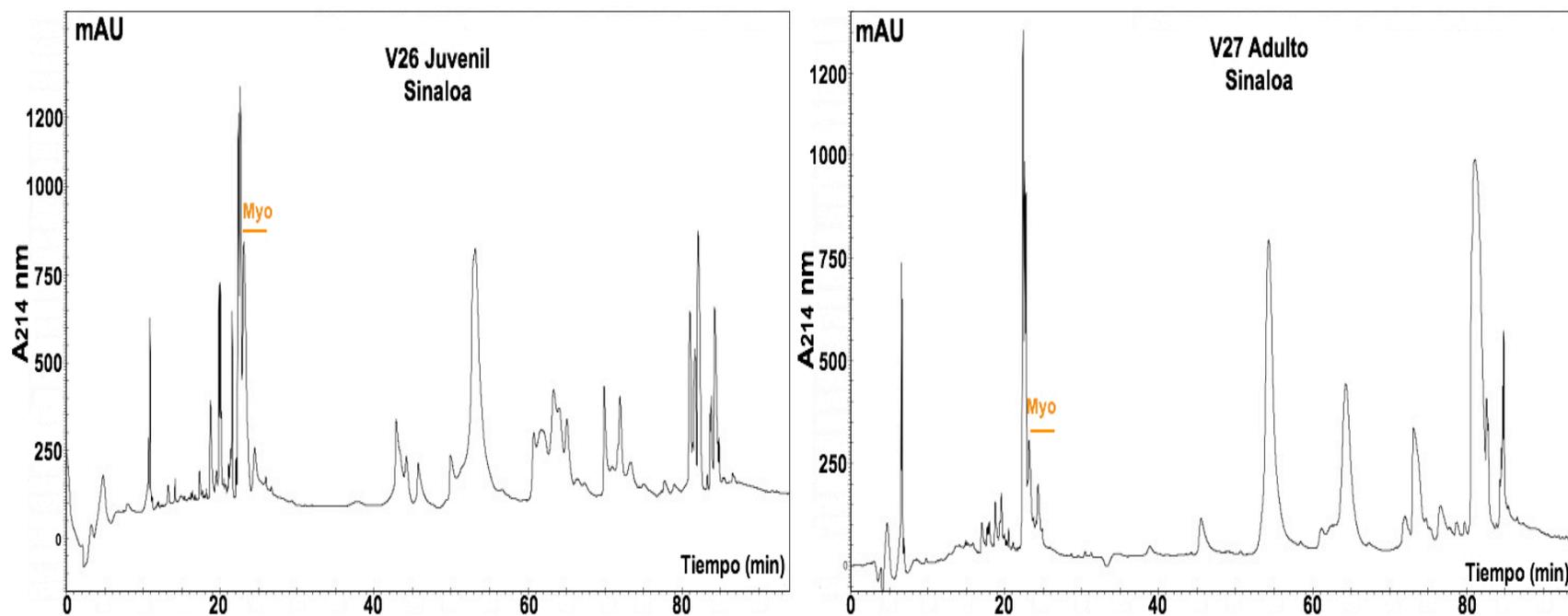




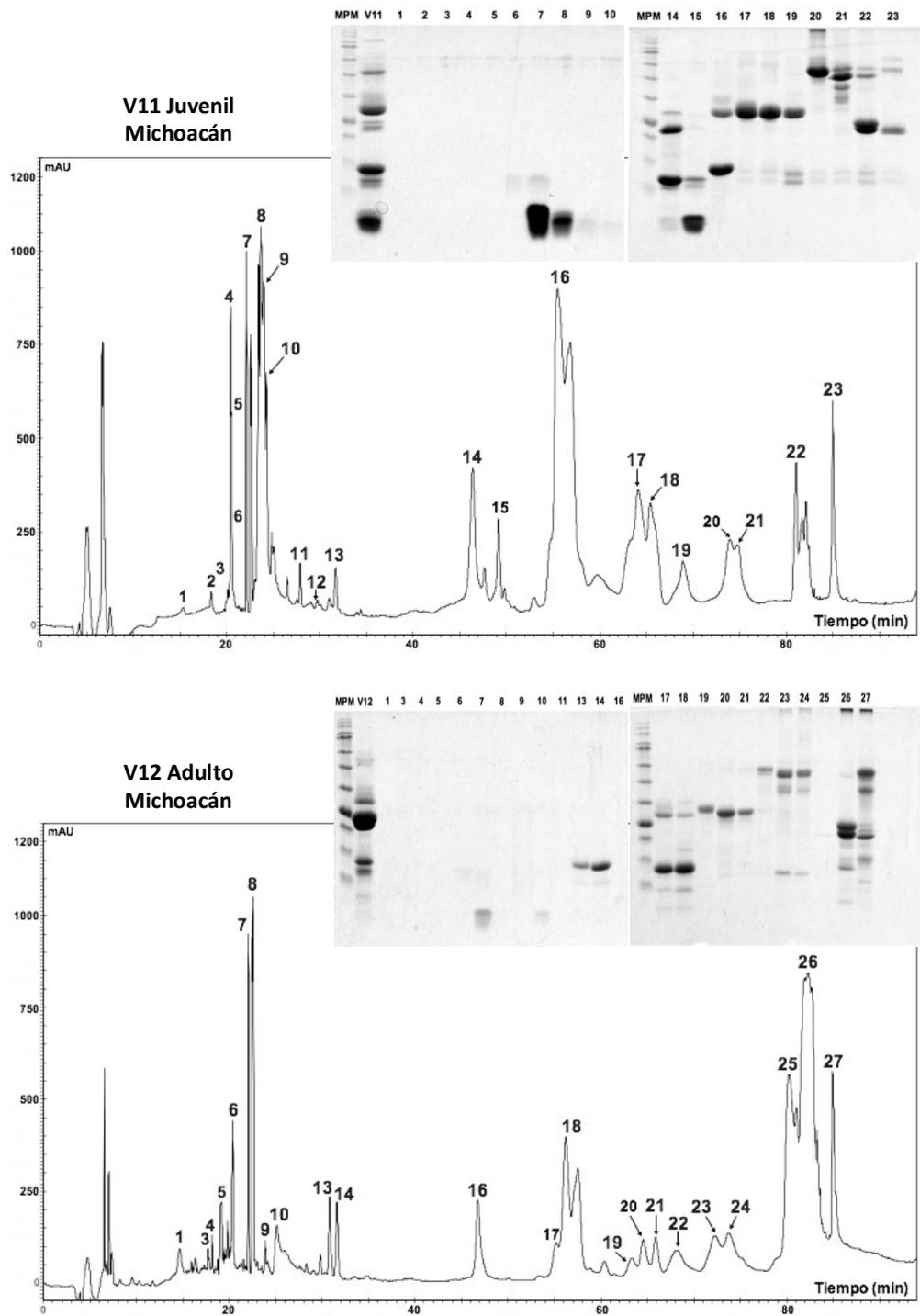




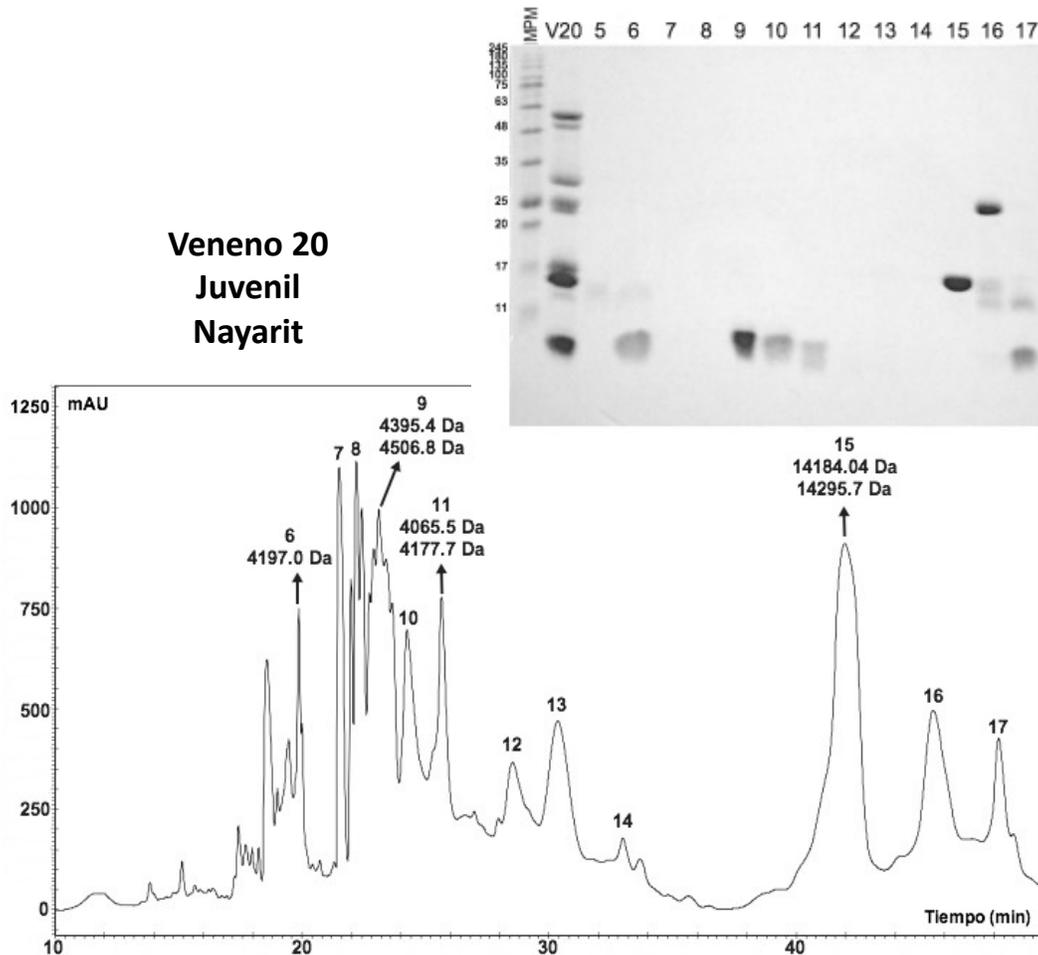




**Figura 9. Variación intraespecífica en los venenos de *C. basiliscus*.** Perfiles cromatográficos por HPLC-FR. El tiempo de retención se encuentra en el eje de X y la absorbancia a 214 nm se encuentra en el eje de Y. El gradiente de acetonitrilo (B) va desde 5 % B 5 min; 5-25 % B 10 min; 25-45 % 60 min; 45-70 % 10 min; 70-100 % 20 min. Un miligramo de cada veneno fue cargado.



**Figura 10. Variación ontogénica de juvenil y adulto de Michoacán.** Los venenos seleccionados provienen de Coahuayana, Michoacán. Se realizó la comparación por SDS-PAGE 15 % de las fracciones colectadas, mostrando las diferencias en abundancia de componentes como crotamina pico 7-8 y de SVMPs pico 22 y 23 (juvenil) y 25,26 y 27 (adulto).



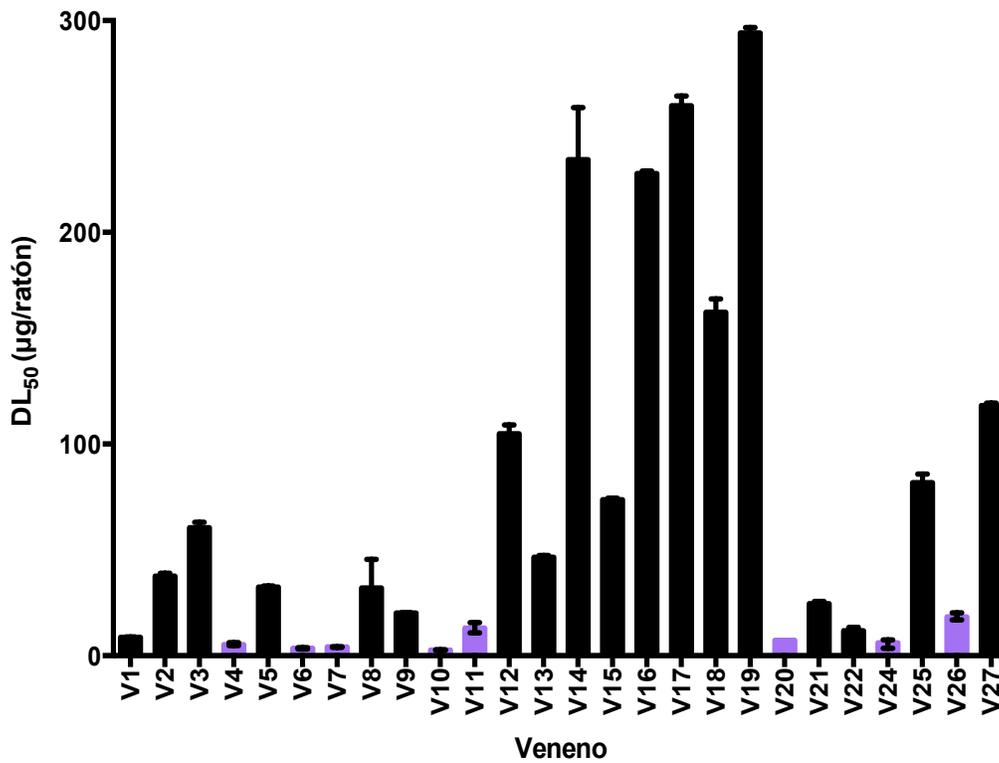
**Figura 11. Cromatograma por HPLC-FR del veneno 20 (V20).** Se corrieron 3 mg/mL de veneno de juvenil V20 de la localidad de San Blas, Nayarit, representante de los demás venenos de *C. basiliscus*. Los picos que corresponden a crotamina (pico 6, 9 y 11) y crotoxina (pico 15) fueron detectados mediante espectrometría de masas (ESI-MS) y ensayos *in vivo* en ratón.

#### X.4 Letalidad ( $DL_{50}$ )

La letalidad fue expresada como  $DL_{50}$ . Los venenos de *C. basiliscus* presentaron un amplio rango, que va desde 0.14  $\mu\text{g/g}$  (I.C. 0.13 a 0.15) hasta 15.5  $\mu\text{g/g}$  (I.C. 15.3 a 15.6) (Tabla 2; Figura 12). Los venenos de juveniles fueron más letales (0.14-0.7  $\mu\text{g/g}$ ) que los venenos de adultos (0.45-15.5  $\mu\text{g/g}$ ) ( $p < 0.001$ ). En general los venenos de la región de Michoacán fueron los menos letales. Existe una relación positiva ( $r^2=0.89$ ;  $p < 0.05$ ) entre los valores de  $DL_{50}$  y el porcentaje de homólogos de crotoxina (Figura 13). Durante los experimentos se observó que los venenos de juveniles producían parálisis rígida en los ratones inyectados. Adultos y juveniles provocaron parálisis flácida con excepción de los individuos V11, V12,

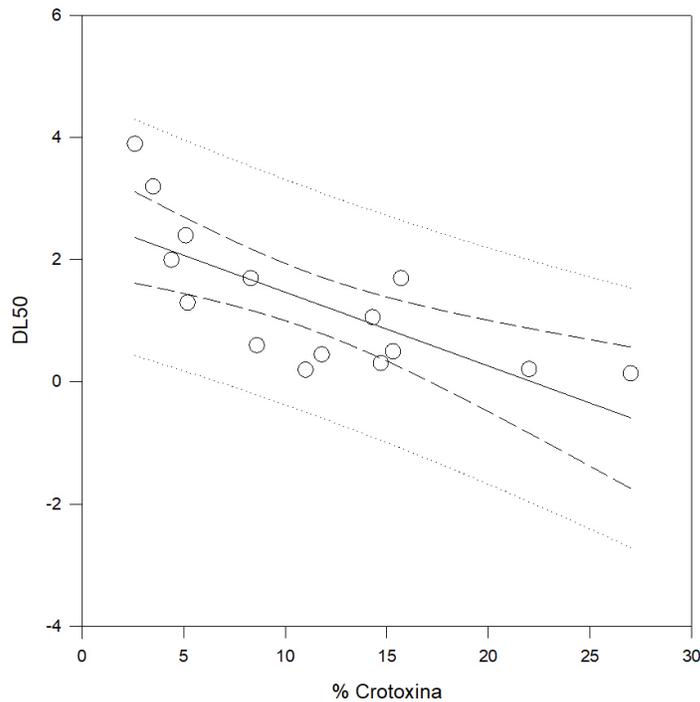
V16-V19 de Michoacán, V14 de Zacatecas y V24-V27 de Sinaloa, en los cuales no se observaron síntomas de neurotoxicidad.

### Letalidad (DL<sub>50</sub>)



**Figura 12. Letalidad (DL<sub>50</sub>) de los venenos de *C. basiliscus*.** Los datos de DL<sub>50</sub> (µg/ratón) se muestran con los respectivos intervalos de confianza. Las barras negras corresponden a las muestras de adultos y las moradas a juveniles.

### Regression, Conf. & Pred.

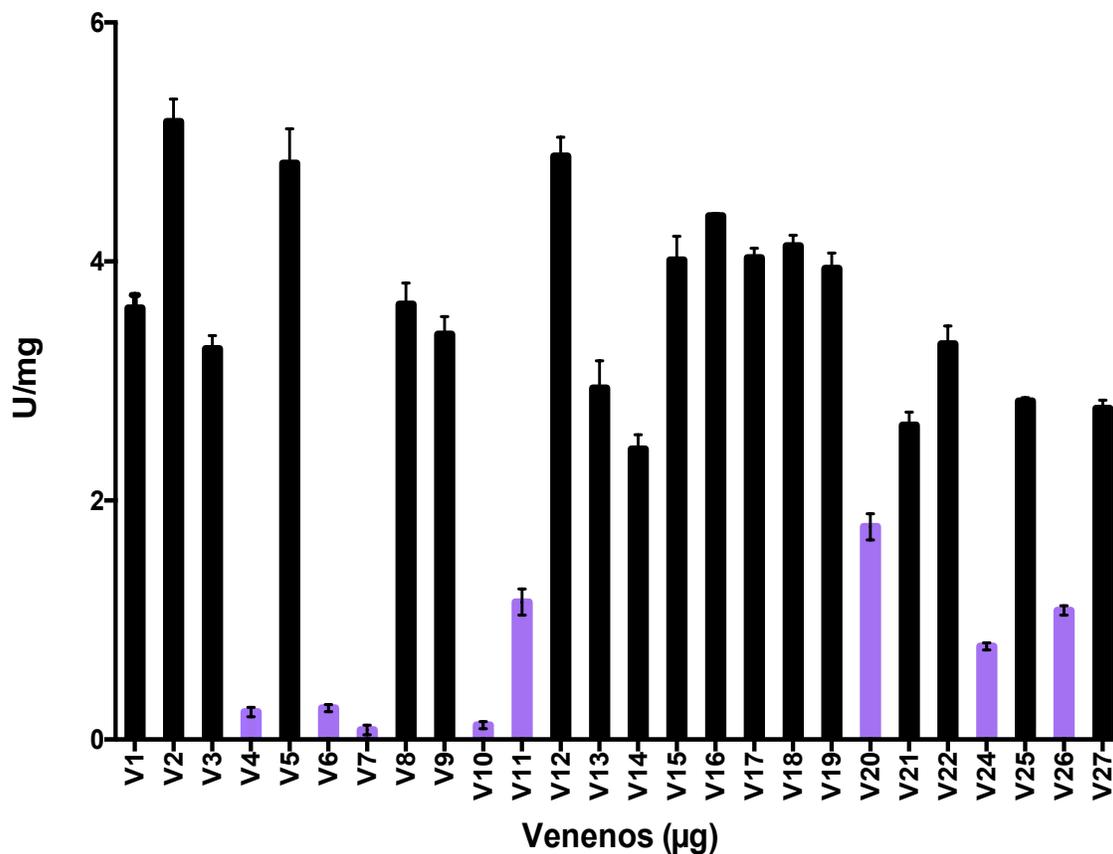


**Figura 13. Correlación entre la letalidad (DL<sub>50</sub>) y el % de crotoxina.** El porcentaje de crotoxina fue obtenido con el área bajo la curva del cromatograma de HPLC-FR. Las líneas punteadas internas corresponden a los intervalos de confianza. Las líneas punteadas externas corresponden a los intervalos de predicción.

#### X.5 Actividad proteolítica sobre azocaseína

La actividad proteolítica evaluada presentó diferencias significativas entre juveniles y adultos ( $p < 0.001$ ). Los venenos fueron capaces de hidrolizar la azocaseína con valores de actividad bastante amplios, los cuales van de 0.081 U/mg (V7) hasta 5.2 U/mg (V2) (Tabla 2; Figura 14). En general, los adultos fueron más proteolíticos con valores de 3.27-5.2 U/mg que las juveniles entre 0.08-1.15 U/mg. Los individuos de Michoacán presentaron los valores de hidrólisis de azocaseína más altos. Cabe destacar que para todos los venenos esta actividad fue completamente inhibida cuando se añadió el agente quelante EDTA lo que nos indica que la actividad sobre este sustrato en específico está mediada por SVMPs.

## Actividad proteolítica sobre azocaseína



**Figura 14. Actividad proteolítica sobre azocaseína.** En el eje de las Y se muestran los datos de proteólisis como U/mg  $\pm$  DS y en el eje de las X los venenos crudos evaluados (V1-V27). Las barras negras corresponden a las muestras de adultos y las moradas a juveniles.

**Tabla 2** Actividades biológicas y bioquímicas de los 27 venenos de *C. basiliscus*

ID	Letalidad DL <sub>50</sub>		Actividad proteolítica	Actividad PLA <sub>2s</sub>	Actividad hemorrágica	Fibrinogenólisis	Homólogo Crotoxina	Homólogo Crotoxina	Crotamina
	(µg/ratón)	(µg/g)	(U/mg)	(U/mg)	Nivel	Actividad	Elisa	HPLC (%)	HPLC (%)
V1	8.6 (8.3 a 8.9)	0.45 (0.44 a 0.47)	3.61 ± 0.11	16.44 ± 1.29	1	α, β	+	11.8	1.3
V2	37.5 (36.13 a 38.93)	1.97 (1.89 a 2.05)	5.17 ± 0.19	60.86 ± 9.45	1	ND	+	4.4	1.7
V3	60.4 (57.8 a 63)	3.2 (3.04 a 3.3)	3.27 ± 0.11	3.42 ± 0.46	1	α, β	+	3.5	0.8
V4*	5.9 (5.6 a 6.2)	0.31 (0.3 a 0.33)	0.22 ± 0.038	18.13 ± 0.68	0	α, β**	+	14.7	31.6
V5	32.4 (31.9 a 32.8)	1.7 (1.68 a 1.73)	4.82 ± 0.29	4.82 ± 1.05	2	α, β	+	8.3	15.4
V6*	3.4 (3.41 a 3.7)	0.2 (0.16 a 0.19)	0.26 ± 0.03	57.04 ± 2.20	0	ND	+	11	32.5
V7*	4.05 (3.9 a 4.2)	0.21 (0.2 a 0.22)	0.080 ± 0.038	19.00 ± 1.00	0	ND	+	22	29.9
V8	32.2 (22.8 a 45.5)	1.7 (1.2 a 2.4)	3.64 ± 0.18	16.65 ± 0.66	1	ND	+	15.7	4.5
V9	20.1 (20.0 a 20.2)	1.06 (1.06 a 1.07)	3.38 ± 0.15	27.76 ± 5.52	1	ND	+	14.3	5.6
V10*	2.6 (2.51 a 2.7)	0.14 (0.13 a 0.15)	0.12 ± 0.027	41.08 ± 3.05	0	ND	+	27	5.8
V11*	13.1 (10.9 a 15.7)	0.7 (0.6 a 0.8)	1.15 ± 0.11	133.96 ± 16.50	1	α, β**	-	0	21.3
V12	104.8 (100.8 a 108.9)	5.5 (5.3 a 5.7)	4.88 ± 0.16	22.67 ± 1.78	1	ND	-	0	3.1
V13	46.5 (45.7 a 47.2)	2.4 (2.4 a 2.5)	2.93 ± 0.23	6.35 ± 0.67	1	ND	+	5.1	5.1
V14	234.3 (212.1 a 258.9)	12.3 (11.2 a 13.6)	2.43 ± 0.12	11.09 ± 0.97	1	α, β	-	0	5.9
V15	73.7 (72.9 a 74.4)	3.9 (3.84 a 3.92)	4.01 ± 0.20	4.26 ± 1.20	1	ND	+	2.6	0.4
V16	227.7 (226.6 a 228.9)	12 (11.9 a 12.1)	4.38 ± 0.02	0.89	1	ND	-	0	4.3

V17	259.8 (255.3 a 264.4)	13.6 (13.4 a 13.9)	4.03 ± 0.08	0.67	1	ND	-	0	0.3
V18	162.2 (156.1 a 168.5)	8.5 (8.2 a 8.9)	4.13 ± 0.09	24.62 ± 1.47	1	ND	-	0	2.9
V19	294.1 (291.4 a 296.7)	15.5 (15.3 a 15.6)	3.94 ± 0.13	0.82	1	$\alpha, \beta$	-	0	3.9
V20*	7.25	0.5	1.78 ± 0.11	31.85 ± 1.35	1	$\alpha, \beta$	+	15.3	13.1
V21	24.6 (23.6 a 25.6)	1.3 (1.24 a 1.35)	2.63 ± 0.11	3.43 ± 0.34	1	$\alpha, \beta$	+	5.2	2.5
V22	11.8 (10.56 a 13.38)	0.6 (0.55 a 0.7)	3.31 ± 0.15	3.64 ± 0.21	1	ND	+	8.6	3.5
V23*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND
V24*	6.1 (3.5 a 7.5)	0.3 (0.2 a 0.42)	0.78 ± 0.03	29.76 ± 0.99	ND	$\alpha, \beta^{**}$	-	0	34.1
V25	81.7 (78.4 a 85.8)	4.5 (4.4 a 4.8)	2.83 ± 0.03	44.81 ± 2.77	ND	ND	-	0	1.8
V26*	18.3 (16.9 a 20.3)	1.0 (0.9 a 1.13)	1.08 ± 0.04	24.59 ± 2.21	ND	ND	-	0	19.7
V27	118.1 (116.8 a 119.3)	6.6 (6.5 a 6.6)	2.77 ± 0.07	8.36 ± 0.57	ND	$\alpha, \beta$	-	0	15.8

\*Juvenil, \*\*Degradación parcial

ID: número de identificación del individuo.

DL<sub>50</sub>: cantidad (µg) capaz de generar la muerte al 50 % de la población experimental, entre paréntesis se encuentran los intervalos de confianza.

Actividad proteolítica es el cambio en 0.2 en la absorbancia.

Actividad PLA<sub>2</sub> (U/mg): una unidad enzimática corresponde a los µmoles de NaOH consumidos por minuto (µmol NaOH/min). La actividad específica se expresa como unidades/mg de veneno.

Actividad hemorrágica expresada como nivel de hemorragia. Nivel 0=lesión <5mm, Nivel 1= ≥5mm, Nivel 2= ≥10mm.

Homólogo de crotovina: +=presencia, -=ausencia.

Los % de crotamina y crotovina se determinaron tomando en cuenta el área bajo la curva de los cromatogramas obtenidos por HPLC-FR.

## X.6 Neutralización de la actividad proteolítica

Los tres lotes de antiveneno fueron capaces de neutralizar la actividad proteolítica de los 4 venenos seleccionados, lote B1 necesitó una mayor cantidad de antiveneno para neutralizar la actividad (Tabla 3).

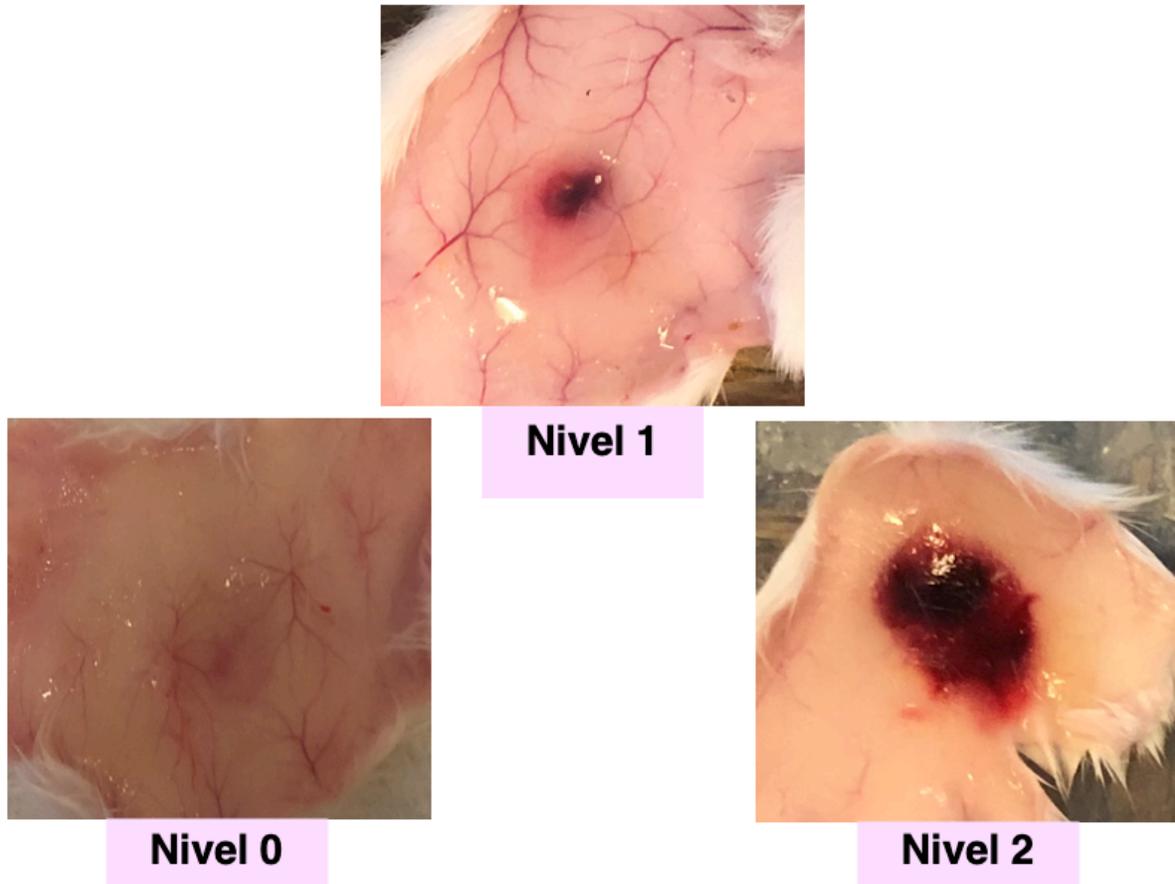
**Tabla 3** Neutralización de la actividad proteolítica por los tres lotes de antiveneno Birmex

	EC <sub>50</sub>		
	B1	B2	B3
<b>Veneno</b>			
V2	630.5 (514.6 a 772.5)	502.1 (424.1 a 594.5)	438.2 (358.5 a 535.7)
V3	588.7 (473.8 a 731.6)	278..9 (225.5 a 345)	266 (185.1 a 382.2)
V9	184.7 (152.7 a 223.4)	302.2 (286.3 a 318.9)	146 (129.7 a 164.3)
V12	716.4 (599.5 a 856.1)	454.6 (361.6 a 571.7)	453.8 (366.7 a 561.6)

EC<sub>50</sub>: µg de antiveneno capaces de neutralizar 20 µg de veneno. Los intervalos de confianza del 95 % se indican en paréntesis. n=3. Los venenos 3, 12, 2 y 9 (20 µg) fueron preincubados a 37°C por 30 minutos con diferentes cantidades de antiveneno de Birmex (**B1**, **B2** y **B3**).

## X.7 Actividad Hemorrágica

En esta actividad biológica se observó que existe variación entre juveniles y adultos en los venenos de *C. basiliscus*. Los venenos de adultos presentaron niveles de hemorragia de 1 y 2 indicando que estos venenos son capaces de producir una lesión hemorrágica. Las juveniles no provocaron lesión hemorrágica (Tabla 2; Figura 15). Solo dos venenos de juveniles ( V11 y V20) provocaron lesiones hemorrágicas de nivel 1.

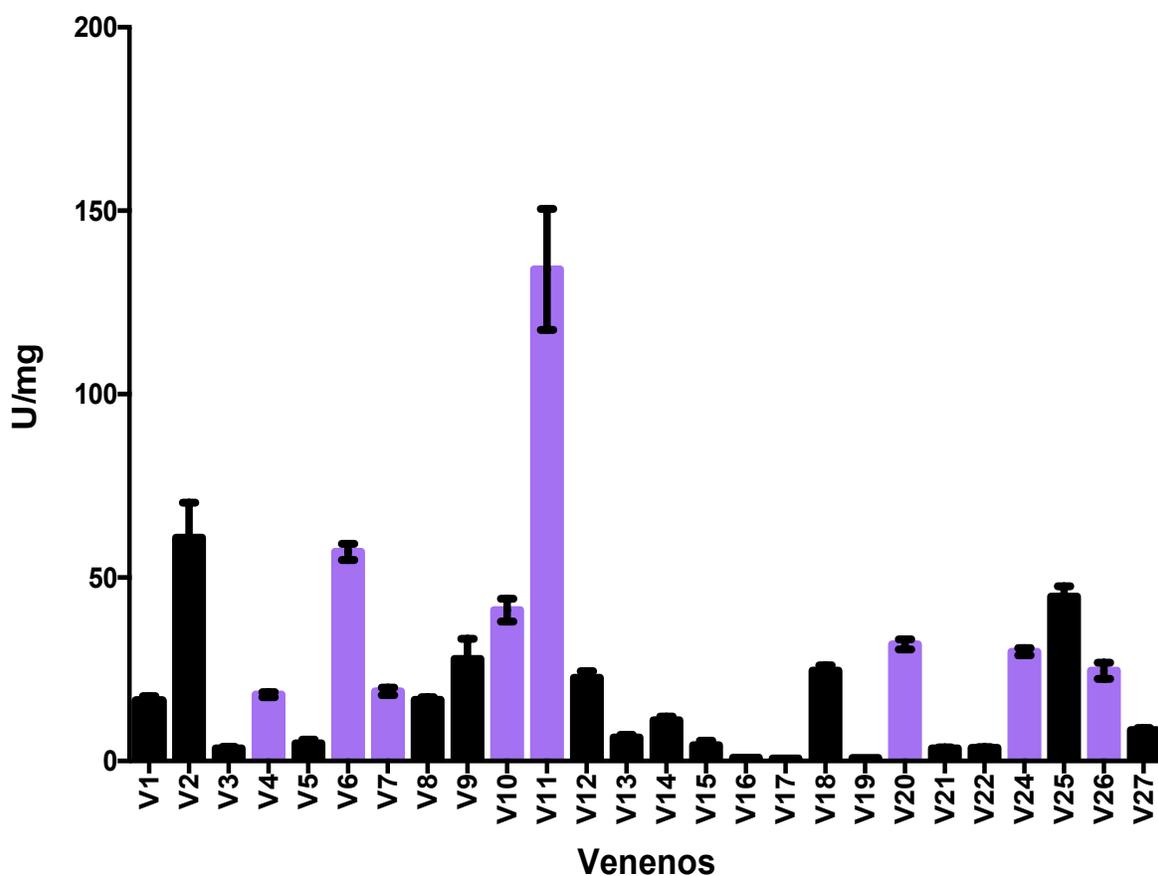


**Figura 15. Lesión hemorrágica formada por inyección s.c. de venenos de *C. basiliscus*.** La hemorragia se evaluó por niveles considerando los valores de diámetro obtenidos: Nivel 0 diámetro < 5 mm, Nivel 1 diámetro  $\geq$  5 mm y Nivel 2 diámetro  $\geq$  10 mm.

#### X.8 Actividad fosfolipasa sobre yema de huevo

En cuanto a la actividad fosfolipasa sobre yema de huevo los valores de los 26 venenos fueron variables entre sí. Los venenos mostraron actividades entre 0.7 a 134 U/mg. El veneno de juvenil (V11) de Coahuayana, Michoacán mostró el valor más alto de actividad con 134 U/mg (Tabla 2; Figura 16). A pesar de que la actividad fosfolipasa mostró una variación a nivel individual, cabe destacar que aunque no se encontró correlación, los venenos de juveniles en general fueron los que obtuvieron valores más altos de actividad fosfolipasa que los adultos.

## Actividad PLA<sub>2</sub>s (ensayo titulométrico)



**Figura 16. Actividad fosfolipasa sobre yema de huevo.** En el eje de las Y se observa la actividad específica expresada como U/mg de veneno  $\pm$  DS. Una unidad enzimática (U) corresponde a los  $\mu$ moles de NaOH consumidos por minuto ( $\mu$ mol NaOH/min). Las barras negras corresponden a las muestras de adultos y las moradas a juveniles.

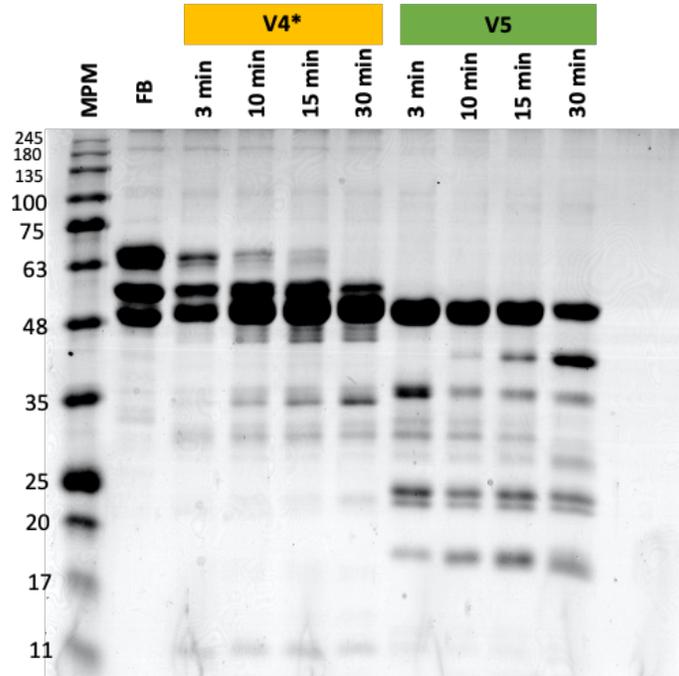
### X.9 Detección de homólogos de crotoxina mediante ELISA

De los 27 venenos evaluados, dieciséis individuos fueron positivos para homólogos de crotoxina. El ensayo sirvió para corroborar la ausencia de homólogos de crotoxina en las poblaciones de Zacatecas, Michoacán y Sinaloa inclusive en los venenos de juvenil. El veneno 15 de Michoacán fue positivo para crotoxina (Tabla 2).

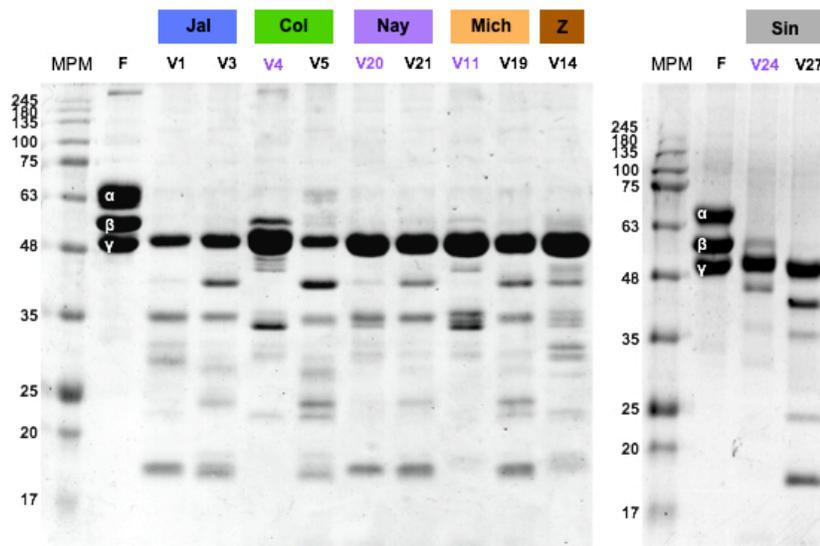
## X.10 Actividad fibrinogenolítica

La capacidad para degradar el fibrinógeno humano fue analizada en 11 venenos (un juvenil y un adulto de cada localidad) (Figura 18). Todos los venenos fueron capaces de degradar alguna de las dos cadenas del fibrinógeno humano. Se evaluó la degradación del fibrinógeno por parte de un juvenil y un adulto a distintos tiempos (3, 10, 15 y 30 minutos). Observando que, los venenos de adultos degradan completamente ambas cadenas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) a los 3 minutos del ensayo, mientras que en los juveniles la cadena  $\alpha$  es la primera en degradarse a partir de los 3 minutos y continúa degradándose hasta que a los 30 minutos ya no queda cadena visible y la cadena  $\beta$  se encuentra todavía presente aunque en poca cantidad a los 30 minutos del ensayo (Figura 17). Tomando como base estos resultados, se propuso prolongar el tiempo de incubación hasta 40 minutos observándose que los fragmentos generados como producto de la degradación de fibrinógeno son diferentes entre juveniles y adultos. La degradación por venenos de juveniles genera fragmentos ~35, 30 y 11 kDa; por otro lado los adultos generan una mayor cantidad de fragmentos ~45, 35, 30, 25 y 18 kDa (Figura 18).

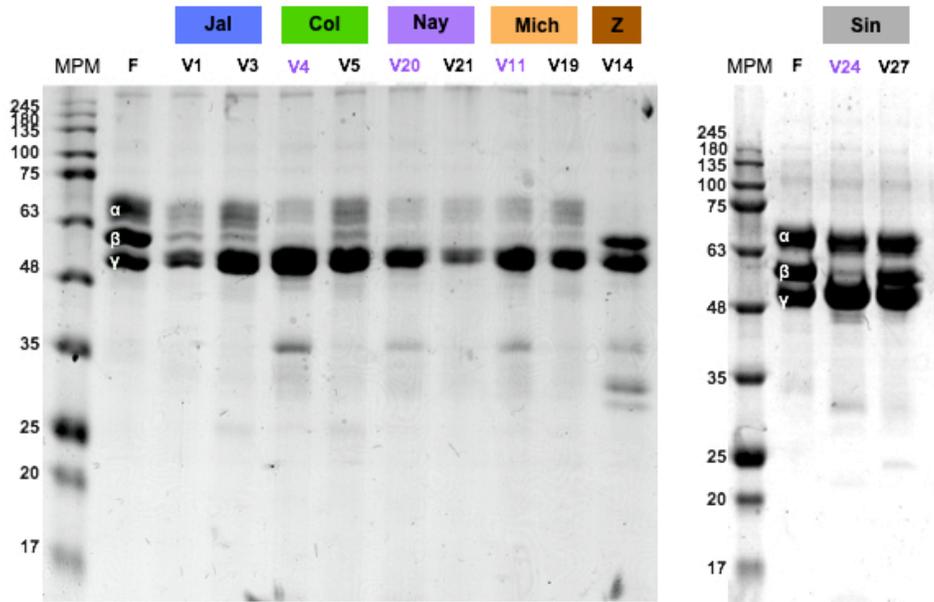
Debido a que tanto las SVMPs como las SVSPs tienen actividad fibrinogenolítica; se preincubo con 5 mM del agente quelante EDTA (inhibe a las SVMPs quelando el ion de zinc). Los resultados mostraron que la actividad de degradación de fibrinógeno *in vitro* está dada tanto por las SVMPs como por las SVSPs. Los fragmentos generados al añadir EDTA fueron diferentes entre juveniles y adultos, mientras los adultos no muestran fragmentos de degradación más que una banda apenas visible ~25 kDa, los juveniles generaron un fragmento visible ~35 kDa. Algo interesante es que en el caso del individuo de Zacatecas se siguió observando degradación con tres fragmentos entre los 25-35 kDa (Figura 19).



**Figura 17. Actividad fibrinogenolítica en geles de acrilamida en distintos intervalos de tiempo.** 50  $\mu\text{g}$  de fibrinógeno humano con 10  $\mu\text{g}$  de un veneno de juvenil (V4) y un veneno adulto (V5) a los 3, 10, 15 y 30 minutos de incubado a 37 °C. Geles 12.5 % de acrilamida.



**Figura 18. Actividad fibrinogenolítica en geles de acrilamida.** 50  $\mu\text{g}$  de fibrinógeno humano fueron incubados con 10  $\mu\text{g}$  de cada veneno por 40 minutos a 37 °C. Los juveniles están resaltados en color morado.



**Figura 19.** Actividad fibrinogenolítica con EDTA en geles de acrilamida. 50 µg de fibrinógeno humano fueron incubados con 10 µg de cada veneno por 40 minutos a 37 °C. Los juveniles están resaltados en color morado.

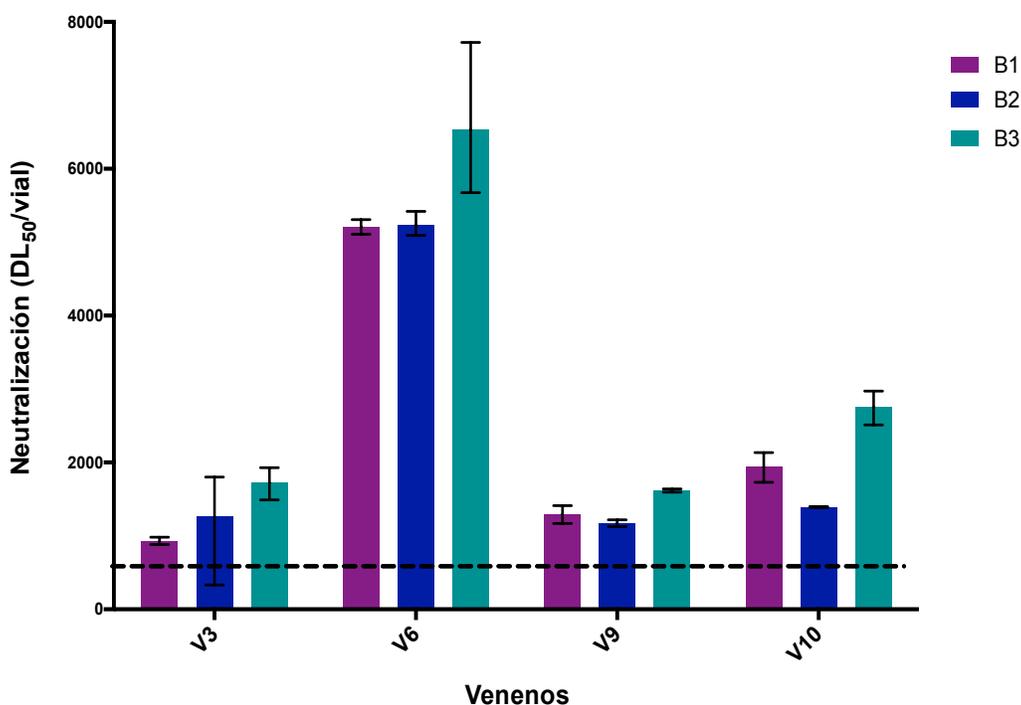
#### X.11 Potencia neutralizante (DE<sub>50</sub>)

Los tres lotes de antiveneno Birmex fueron capaces de neutralizar la letalidad de los venenos V3, V6, V9 y V10, incluso más DL<sub>50</sub> por vial que las que marca la Regulación oficial mexicana (> 790 DL<sub>50</sub>). Sin embargo hay diferencias importantes encontradas entre los lotes. Analizando los resultados en términos de masa, es decir, mg de antiveneno necesarios para neutralizar 1 mg de veneno. El V3 fue el que mejor se neutralizó seguido del V9 y el que requirió más miligramos de antiveneno fue el V10 (Tabla 4; Figura 20).

**Tabla 4** Dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>) de tres lotes de antiveneno Birmex

		Lotes de Antiveneno Birmex					
		B1		B2		B3	
	3DL <sub>50</sub> (μg)	μL AV/ 3DL <sub>50</sub>	mg AV/ mg V	μL AV/ 3DL <sub>50</sub>	mg AV/ mg V	μL AV/ 3DL <sub>50</sub>	mg AV/ mg V
V3	181.2	32.21 (30.53 a 33.99)	5.18	23.71 (13.65 a 41.19)	3.94	17.39 (15.33 a 19.72)	2.11
V6	10.2	5.8 (5.7 a 5.9)	13.10	5.7 (5.5 a 5.9)	13.80	4.6 (3.9 a 5.3)	9.10
V9	60.3	23.21 (21.13 a 25.49)	10.35	25.50 (24.54 a 26.50)	12.68	18.50 (18.22 a 18.78)	6.85
V10	7.89	15.49 (13.96 a 17.19)	52.9	21.51 (21.43 a 21.59)	82.05	10.90 (10.03 a 11.85)	30.95

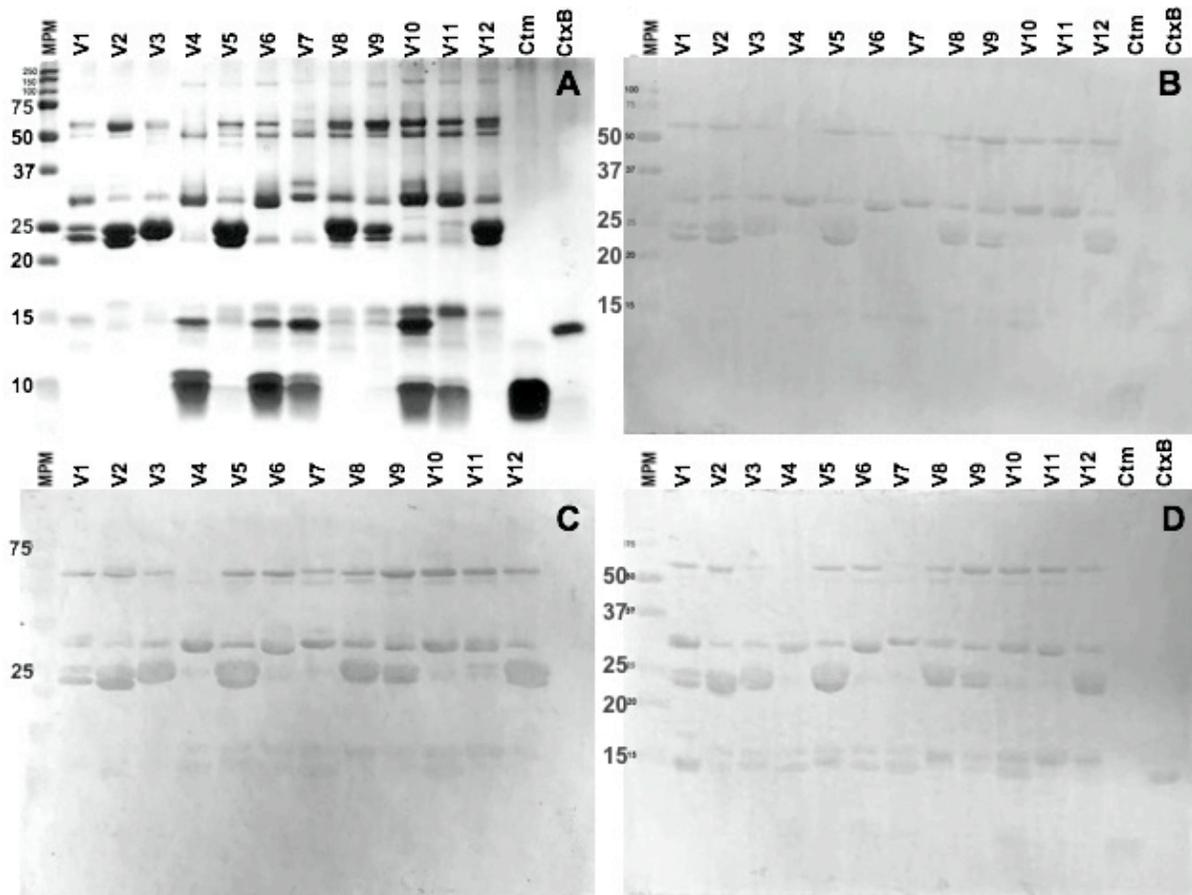
Los resultados se presentan de dos formas: μL de antiveneno capaces de neutralizar 3DL<sub>50</sub> y mg de antivenenos capaces de neutralizar un mg de veneno.



**Figura 20. Dosis letales medias neutralizadas por vial.** Tres lotes de Birmex fueron evaluados (B1, B2 y B3) contra tres venenos de letalidades distintas. V10 = Alta toxicidad, V9 = Toxicidad media, V3 = Baja toxicidad y V6 = 32.6 % crotamina. La línea punteada indica el valor mínimo de DL<sub>50</sub> que debe neutralizar un vial de antiveneno.

## X.12 Reconocimiento de los componentes del veneno por Western Blot

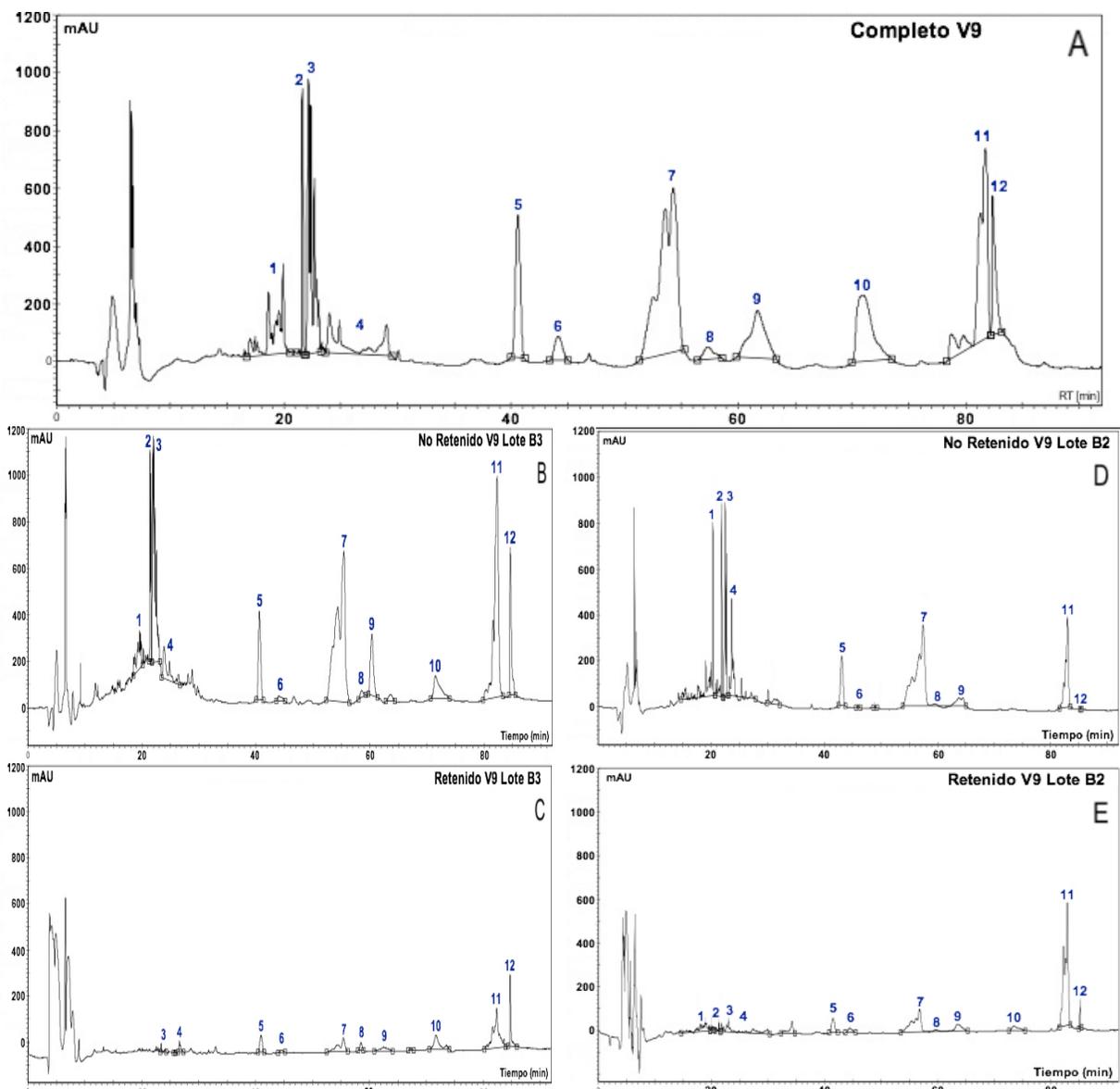
Se pudo observar que los tres lotes de antiveneno tenían la capacidad de reconocer la estructura primaria de varios componentes del veneno de 12 individuos de *C. basiliscus*. Los componentes ~50-75 kDa son dos bandas de las cuales solo una es bien reconocida, las proteínas entre los 20-37 kDa fueron las que tuvieron un mejor reconocimiento; **B3** fue el antiveneno que tuvo un mejor reconocimiento de los componentes de bajo peso molecular ~15 kDa. Aunque la mayoría de los componentes fueron reconocidos, los componentes de bajo peso molecular ~10 kDa fueron pobremente reconocidos (Figura 21).



**Figura 21. Western Blot.** (A) gel de poliacrilamida 15 % con los 12 venenos (5 µg) y controles de crotoamina (Ctm) y crotoxina subunidad B (CtxB) de *C. d. terrificus*. Los venenos se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y fueron detectados con tres lotes de Birmex; Lote B1 (C), B2 (B) y B3 (D). **MPM**: Marcador de peso molecular.

### X.13 Antivenómica de 2ª generación

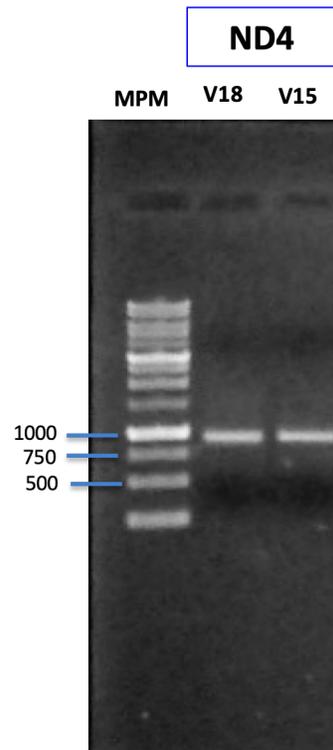
El objetivo de este experimento fue identificar los componentes que el antiveneno no puede reconocer. Es muy importante mencionar que aún cuando el antiveneno sea capaz de reconocer los componentes no necesariamente los neutralizará, pero es claro que si no hay reconocimiento no hay neutralización. Solamente dos antivenenos fueron evaluados (**B2** y **B3**) debido a que se contaba con la cantidad suficiente de viales para realizar los ensayos. Al comparar los perfiles de veneno completo con los perfiles de las fracciones retenidas observamos que aparecen todos los picos, aunque en baja proporción como es el caso de los picos con tiempos de retención entre 15-30 minutos. En este caso, solo se utilizó una cantidad de veneno (600 µg) lo cual nos hace pensar que posiblemente los anticuerpos contra el veneno son pocos, lo que generó que la columna se saturara y no siguiera pegando proteína. Por otro lado, existen diferencias en el reconocimiento de los lotes de antiveneno siendo el lote **B2** el que tuvo un mejor reconocimiento de los componentes que eluyeron a partir de los 80 minutos (Figura 22). En cuanto al porcentaje de veneno no retenido obtuvimos para el lote **B2** un % NR 66 y de 88 para el lote **B3**. En cuanto al reconocimiento de los componentes importantes y que aportan toxicidad al veneno observamos que ambos lotes de antiveneno fueron capaces de reconocer a la subunidad básica de crotoxina (pico 5).



**Figura 22. Antivenómica 2<sup>a</sup> generación.** Comparación del inmunoreconocimiento del antiveneno Birmex de dos distintos lotes (7.4 mg por columna) hacia 600 µg del veneno de un ejemplar adulto de *C. basiliscus* procedente de Colima. **A)** Veneno completo (V9) 600 µg, **B)** Birmex **B3** fracción No retenida (NR), **C)** Birmex **B3** fracción Retenida (R), **D)** Birmex **B2** fracción NR, **E)** Birmex **B2** fracción R. Los picos están enumerados para delimitar áreas. Pico 5 corresponden a la subunidad básica de crotoxina.

#### X.14 Amplificación de marcador mitocondrial (ND4) para evaluar relaciones filogenéticas

El marcador mitocondrial ND4 fue amplificado a partir del material genético de manera exitosa obteniendo amplicones de peso molecular ~1000 pb (Figura 23). Los productos de PCR fueron observados en un gel de agarosa 1.5 %, y purificados a partir de gel y mandados a secuenciar (Figura 23). Las secuencias se alinearon con otras secuencias de NCBI, como resultado obtuvimos que ambos individuos corresponden a la especie *C. basiliscus* (Tabla 5). La semejanza con otras secuencias de genes mitocondriales de especies del género *Crotalus* fue > 94 % para *C. basiliscus*; 90.2 % *C. molossus*; 90.7 % *C. viridis*.



**Figura 23. Productos de PCR en gel de agarosa.** Los individuos V18 y V15 están señalados en cada pozo. Fragmentos mitocondriales ND4 (~1000 pb). MWM= marcador de peso molecular. Gel de agarosa 1.5 %.

**Tabla 5** Resumen de los resultados de alineamiento y porcentaje de identidad de los productos de PCR del marcador mitocondrial subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa (ND4) con secuencias publicadas en NCBI.

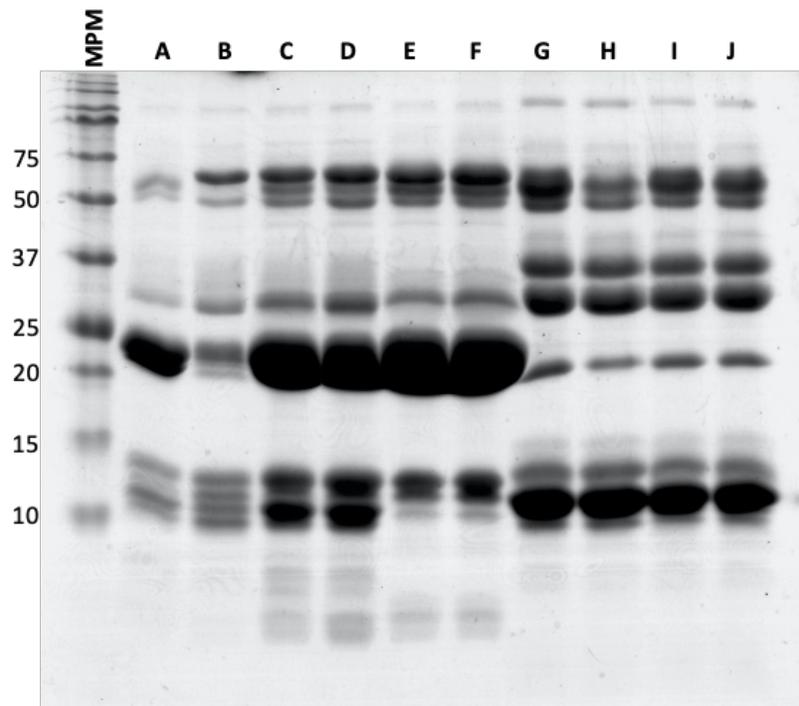
Amplicón	Proteína encontrada por BLAST	Porcentaje de identidad	Especie	Número de acceso
<b>V18 ND4</b>	822 NADH subunidad 4 deshidrogenasa	95.7 %	<i>Crotalus basiliscus</i>	AY704894.1
	ZG2CB2 NADH subunidad 4 deshidrogenasa	97.4 %	<i>Crotalus basiliscus</i>	AY704895.1
<b>V15 ND4</b>	822 NADH subunidad 4 deshidrogenasa	94.2 %	<i>Crotalus basiliscus</i>	AY704894.1
	ZG2CB2 NADH subunidad 4 deshidrogenasa	96.1 %	<i>Crotalus basiliscus</i>	AY704895.1

## X.15 Transcriptómica

### X.15.1 Biopsia de glándula de veneno

La recuperación del individuo V18 al que se le realizó la biopsia de una de las glándulas del veneno (glándula derecha) se monitoreó a lo largo de los meses con el propósito de encontrar una alternativa menos invasiva para realizar análisis transcriptómicos y así evitar el sacrificio animal. Las imágenes del proceso de recuperación se muestran en anexos (Tabla A1). La serpiente fue alimentada 20 días después de la cirugía sin presentar problema alguno. A los tres y nueve meses post-cirugía se ordeñó al individuo aislando cada colmillo obteniendo de esta manera una muestra de veneno del colmillo derecho y una del izquierdo las cuales se corrieron en un gel de poliacrilamida 15 % (Figura 24). Como se puede observar en el gel a los tres meses después de la cirugía la composición de veneno en ambas glándulas presentó diferencias, la más notoria fue la disminución en la abundancia de los componentes entre los 20-25 kDa en el colmillo derecho (glándula operada). Mientras que, a los nueve meses de realizada la cirugía

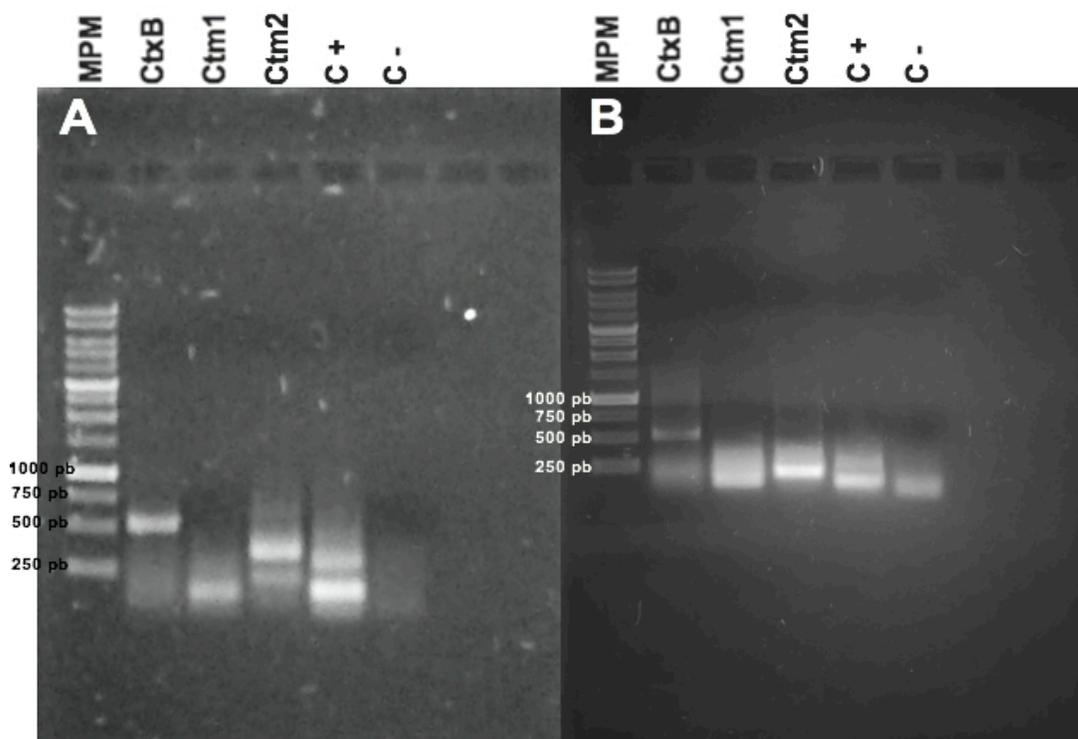
pudimos observar que la composición del veneno en ambas glándulas volvió a ser igual (Figura 24).



**Figura 24. Veneno extraído del colmillo derecho (CD) e izquierdo (CI) del ejemplar V18 (crotoxina negativo) de *C. basiliscus* en gel de acrilamida 15 %. A) Veneno CI 3 meses post-cirugía, B) Veneno CD 3 meses post-cirugía, C) Veneno CI 9 meses post-cirugía, D) Veneno CD 9 meses post-cirugía. Controles: E) y F) Veneno CI y CD de *C. basiliscus* ejemplar V13 respectivamente, G) y H) Veneno CI y CD de *C. mictlantecuhtli*, I) y J) Veneno CI y CD de *C. mictlantecuhtli* ejemplar 2.**

### X.15.2 Extracción de RNA total y síntesis de cDNA a partir de veneno crudo y glándula de veneno

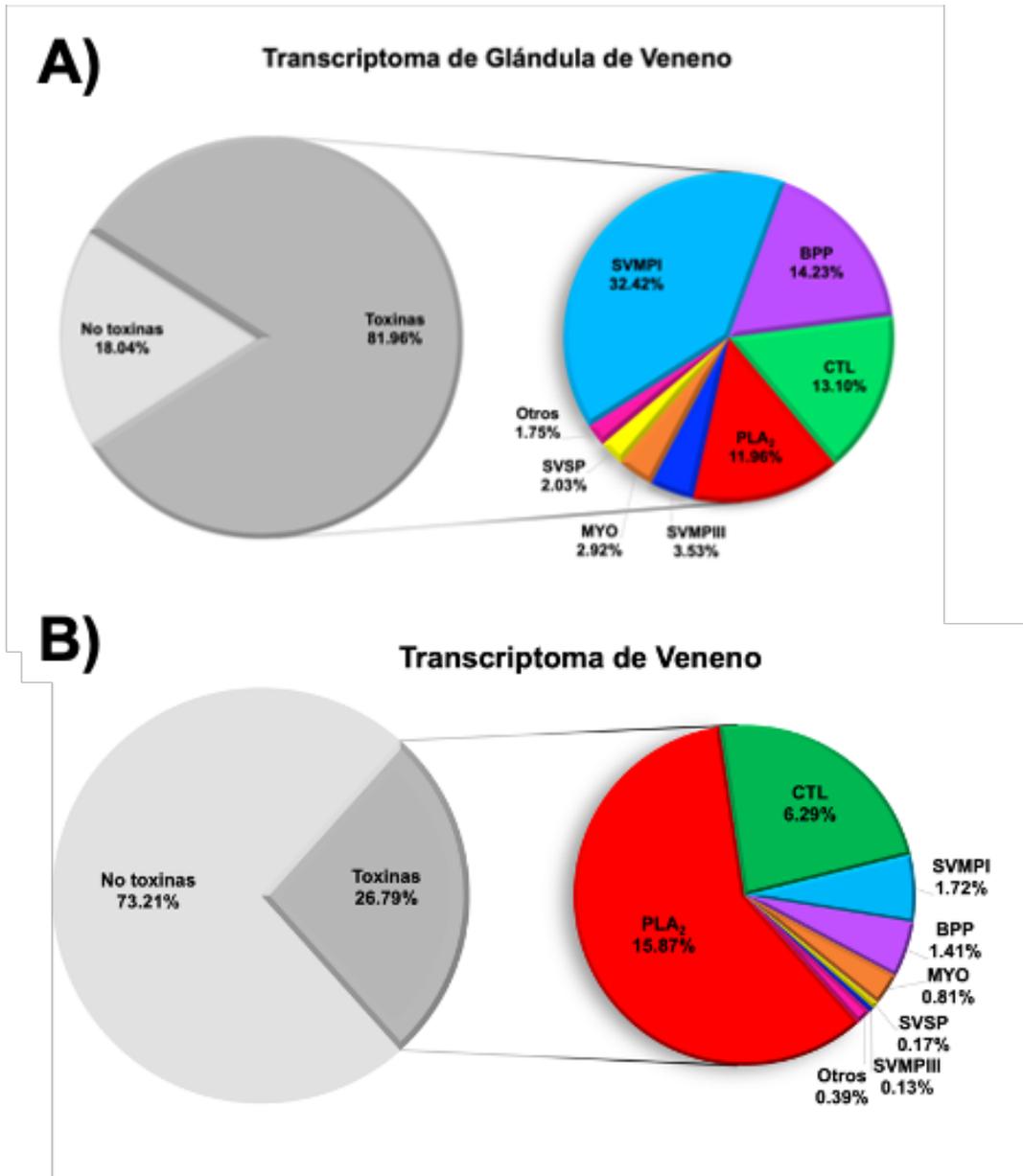
La cantidad total de RNA recuperado de ~10 mg de tejido de glándula fue de 124 µg en 30 µL mientras que el RNA total recuperado de ~1 mL de veneno crudo fue de 4.2 µg en 30 µL. Se tomaron 2 µL de RNA total de ambas muestras (veneno y glándula de veneno) para sintetizar cDNA y mediante oligos específicos amplificar el gen de crotamina para verificar la calidad del RNA extraído y confirmar que dentro del material extraído tuviéramos RNAm de toxinas. A partir de la muestra de cDNA (tanto de veneno como de glándula) se amplificó crotamina, la cual ya sabíamos se encontraba presente como proteína en el veneno. Los transcritos de ~250 pb fueron comparados con el control positivo (cDNA a partir de glándula de veneno de *C. molossus*) previamente identificado como crotamina positivo (Figura 25). Una vez comprobado que teníamos material suficiente y en buen estado, ambas muestras de RNA total fueron mandadas a la Unidad de Secuenciación Masiva del IBt para la generación de bibliotecas.



**Figura 25. Productos de PCR en gel de agarosa. Ambos gels corresponden a V18 (crotoxina negativo). A) amplicones a partir de cDNA de veneno y B) amplicones a partir de cDNA de glándula. CtxB= Crotoxina SubB, Ctm1= amplicón de crotamina (proteína madura), Ctm2= amplicón de crotamina (péptido señal). Controles C+= amplicón de crotamina a partir de cDNA de glándula de *C. molossus*. C-= PCR sin templado.**

### X.15.3 Transcriptómica

Se obtuvo el transcriptoma del espécimen V18 aislando el RNAm de dos maneras, una del veneno crudo y otra usando una biopsia de glándula de veneno. Fueron anotados 1527 transcritos únicos, 50 de los cuales fueron identificados como toxinas putativas. El resto de los transcritos fueron identificados como proteínas no toxinas. En el caso de la muestra de veneno de *C. basiliscus* encontramos 32 toxinas (con 26.8 % de las lecturas mapeando para toxinas) y para la muestra de glándula de veneno se encontraron 43 toxinas (con 81.9 % de las lecturas mapeando para toxinas). La proporción de toxinas individuales y familias de toxinas difirió entre el transcriptoma de veneno y el de glándula de veneno (Figura 26a; Figura26b). Es interesante destacar que el transcriptoma de veneno presentó una mayor cantidad de transcritos de PLA<sub>2</sub>s. (Figura 26b); mientras que en el transcriptoma de la glándula las SVMPS fue la familia de toxinas más abundante (Figura 26a). En ninguna de los dos transcriptomas se detectó la presencia de homólogos de crotoxina, aún cuando se mapearon las lecturas con una secuencia conocida de subunidad básica de *C. basiliscus* (Genbank Accession KU666923).



**Figura 26. Transcriptomas de veneno y glándula de veneno del individuo V18 (crotoxina negativo).** Cada gráfico muestra la proporción de lecturas pareadas para toxinas y no toxinas. El transcriptoma de glándula **(A)** tiene una mayor cantidad de lecturas para toxinas comparado con el transcriptoma de veneno **(B)**. SVMPI- Metaloproteasas tipo I, SVMPIII- Metaloproteasa tipo III, PLA<sub>2</sub>S- Fosfolipasas A<sub>2</sub>, BPPs- Péptidos potenciadores de bradicinina, CTL- Lectinas tipo C, MYO- Miotoxina/Crotamina y SVSP- Serinoproteasas.

## XI DISCUSIÓN

El estudio de la variación de los venenos de serpientes tiene importancia ecológica, filogenética y evolutiva. Al proveer más información para el entendimiento de la complejidad de los venenos y poder dilucidar los mecanismos moleculares y ambientales que los moldean. En la práctica clínica, comprender las variaciones inter e intra-específicas de los venenos ayudaría a los médicos a comprender las diferencias en los síntomas y signos de los pacientes, a poder predecir un cuadro clínico y las acciones a tomar, y a evaluar la eficiencia de los antivenenos (Amazonas et al., 2019).

En primera instancia, aunque existen estudios que indican que no existe variación a causa del cautiverio (Farias et al., 2018; Galizio et al., 2018). Los ejemplares de los cuales se extrajo veneno eran: o bien ejemplares recién capturados o llevaban menos de seis meses en cautiverio, tomando en cuenta que se ha detectado ligera variación en los componentes proteicos minoritarios del veneno de *B. atrox*, *B. jararaca* y *C. atrox* que llevaban entre 8 meses hasta más de tres años en cautiverio (Amazonas et al., 2019; Rex and Mackessy, 2019; Saad et al., 2012).

Así, la separación en gel de acrilamida de los venenos de *C. basiliscus* nos permitió identificar de primera instancia las diferencias existentes entre los venenos. Los ejemplares juveniles presentan una banda proteica de gran abundancia a los 10 kDa que corresponde a crotamina que fue corroborada con el peso molecular obtenido por espectrometría de masas (cinco masas identificadas: 4197.09, 4395.44, 4506.8, 4065.58 y 4177.7 Da) y mediante ensayos biológicos, al ser un péptido cargado positivamente tiene un patrón electroforético anómalo. Así mismo, el perfil electroforético de estos individuos presenta una banda abundante de 15 kDa que corresponde a PLA<sub>2</sub>s incluida crotolina (dos masas identificadas: 14184.04 y 14295.7 Da) y bandas poco abundantes entre 20-25 kDa (posibles SVMPs). Estos resultados coinciden con lo observado en los perfiles cromatográficos en donde, los ejemplares juveniles muestran abundancia de crotamina (tiempo de retención entre los 23 y 26 minutos) y de subunidad básica de crotolina (tiempo de retención 40 minutos), seguido de una baja abundancia de los picos mas hidrofóbicos que eluyen a los 80 minutos (SVMPs PII y PIII).

En el caso de los adultos, se observan dos bandas abundantes entre 20-25 kDa, con variación en la cantidad y abundancia de bandas ~15 kDa entre individuos, y específicamente en el caso de los venenos de Michoacán se presenta solo una banda arriba de 50 kDa. Estos resultados coinciden también con los perfiles cromatográficos de adultos en los cuales se observa que la abundancia de crotamina baja (23-26 minutos) al igual que para la subunidad básica de crotolina (40 minutos) mientras que, a partir de los 80 minutos la abundancia de los picos aumenta

(SVMPs). Algo importante es que los individuos adultos de Zacatecas, Sinaloa y Michoacán (excepto el V15) no presentan picos a los 40 minutos, lo cual indicó que no contienen crotoxina; por lo que fueron catalogados como individuos crotoxina negativos.

En conjunto, estos resultados concuerdan con un trabajo previo con *C. basiliscus* (sin localidad) en el que se reporta que el veneno de la especie se compone en un 68 % de SVMPs, 14 % PLA<sub>2</sub>s (incluyendo crotoxina) y 11 % SVSPs lo cual concuerda en cierto grado con los perfiles observados en este estudio (Segura et al., 2017), y con otros estudios con especies de cascabel (Borja et al., 2018b, 2014; Castro et al., 2013; Durban et al., 2017; Neri-Castro and Ponce-López, 2018; Saviola et al., 2017, 2015), que reportan variación en abundancia y diversidad de los componentes de los venenos, ya sea comparando crías y adultos, juveniles y adultos o entre individuos de la misma edad.

En cuanto a la variación de crotamina y crotoxina encontrada en *C. basiliscus* se asemeja a lo reportado para otras especies de cascabel como *C. durissus terrificus*, *C. tzabcan*, *C. mictlantecuhtli*, *C. simus* (Costa Rica), *C. scutulatus scutulatus* (Borja et al., 2018c; Calvete et al., 2010; Castro et al., 2013; Durban et al., 2017; Schenberg, 1959), y en el caso de variación ontogenética de crotamina como ocurre en *C. basiliscus* también se ha descrito para *C. m. nigrescens*, *C. culminatus*, *C. adamanteus* y *C. tzabcan* (Borja et al., 2018b; Durban et al., 2017; Margres et al., 2015).

En general, el porcentaje de crotoxina en la especie *C. basiliscus* (2.6-27 %) es menor que la reportada para algunas serpientes de cascabel como *C. simus*, *C. s. scutulatus*, *C. durissus terrificus*, *C. d. ruruima*, *C. d. durissus*, *C. simus* (Costa Rica) y *C. tigris* (Borja et al., 2018a; Calvete et al., 2012, 2010; Durban et al., 2013). Sin embargo, *Crotalus basiliscus* es una especie que se encuentra clasificada filogenéticamente dentro de un grupo taxonómico denominado complejo *molossus* (complejo conformado por *C. molossus molossus*, *C. m. nigrescens*, *C. ornatus*, *C. m. oaxacus*, *C. totonacus*, *C. basiliscus* y *C. estebanensis*), y dentro del complejo es la única hasta la fecha en la cual se ha identificado crotoxina.

#### XI.1 Actividades biológicas y bioquímicas

La letalidad es una respuesta biológica producida por la acción en conjunto de uno o varios componentes del veneno y que conduce a la muerte. Nuestros resultados indican que la letalidad de los venenos de *Crotalus basiliscus* fue diferente entre individuos juveniles y adultos, siendo la DL<sub>50</sub> de juveniles es menor (más letales) lo cual parece estar relacionado con el porcentaje de homólogos de crotoxina de aquellos individuos que fueron crotoxina positivos. Esta correlación

se ha demostrado para otras especies de cascabel (Borja et al., 2018a; Castro et al., 2013; Faure et al., 1994; Hardy, 1983; Neri-Castro et al., 2019; Neri-Castro and Ponce-López, 2018; Rivas et al., 2017). Los venenos de juveniles de Michoacán y Sinaloa (V11 y V24, respectivamente) que no tiene presente en su veneno crotoxina (crotoxina negativos), tienen una  $DL_{50}$  mayor que el resto de las juveniles esto quiere decir que son menos letales. Aunque esto podría interpretarse como que estos venenos son menos letales, resulta que son más letales que los venenos de adultos. Lo cual indica que la letalidad de estos venenos depende particularmente de la presencia de un componente (por ejemplo: crotamina) o, alternativamente de una sinergia entre varias de sus toxinas (Borja et al., 2018c; Laustsen, 2016).

Dentro de la distribución de *C. basiliscus* encontramos tres localidades (Coahuayana, Culiacán y Zacatecas) con ejemplares crotoxina negativos que no están conectadas entre sí; el número de individuos utilizados en el estudio no nos permite delimitar áreas en específico de individuos crotoxina negativos solamente observamos ciertas tendencias. A su vez, sería difícil delimitar un área debido a la presencia de individuos crotoxina positivos y negativos dentro de una misma localidad muy cercanos unos de otros, como es el caso de Coahuayana, Michoacán.

Basado en la clasificación descrita por Mackessy 2008, el veneno de las juveniles es un veneno tipo II ( $DL_{50} < 1\mu\text{g/g}$  y baja actividad proteolítica) mientras que la mayoría de los adultos son de tipo I ( $DL_{50} > 1\mu\text{g/g}$  y alta actividad proteolítica) algunos venenos de adultos presentan características intermedias ( $DL_{50} < 1\mu\text{g/g}$  y alta actividad proteolítica) (V1, V9 y V22) (Mackessy, 2008).

El fibrinógeno es una proteína plasmática que interviene en la cascada de coagulación. Contiene dos moléculas simétricas unidas por dos puentes disulfuro. Cada mitad contiene tres cadenas conocidas como  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  con pesos moleculares de 63.5 kDa, 56 kDa y 47 kDa, respectivamente. La degradación de fibrinógeno a fibrina por enzimas fibrinogenasas y la subsecuente desintegración de los coágulos translucidos y frágiles que se forman, resulta en coagulopatías y eventualmente en la incapacidad de formar trombos estables (Vivas-Ruiz et al., 2020). Las fibrinogenasas de los venenos de serpientes pueden ser  $\alpha$  o  $\beta$  fibrinogenasas dependiendo de la cadena que degradan preferencialmente (Swenson y Markland, 2005). De acuerdo con el ensayo *in vitro* de degradación de fibrinógeno, todos los venenos analizados tuvieron actividad fibrinogenolítica. Esta actividad se debe principalmente a las SVMPS y SVSPs del veneno. En un escenario *in vivo* sabemos que las SVMPS permanecen en el sitio de inyección uniéndose a los receptores celulares de colágeno y a las proteínas de matriz extracelular, contribuyendo con los daños locales tisulares y la hemorragia. Mientras que las SVSPs sufren una mayor absorción

linfática, lo que mantiene niveles constantes de SVSPs en la circulación sanguínea contribuyendo a la degradación de fibrinógeno y a la coagulopatía generada (Neri-Castro et al., 2020b).

Igual que como se observó en otras actividades, la degradación del fibrinógeno fue diferente entre juveniles y adultos. Los adultos fueron capaces de degradar ambas cadenas del fibrinógeno al mismo tiempo, mientras que los venenos de juveniles comienzan hidrolizando la cadena  $\alpha$  y solo de manera parcial la cadena  $\beta$ . Los fragmentos generados producto de la hidrolisis del fibrinógeno fueron diferentes entre juveniles y adultos: los adultos presentaron mayor cantidad de fragmentos posiblemente debido a una mayor presencia de SVMPs las cuales rompen el fibrinógeno inespecíficamente. Estos hallazgos son consistentes con estudios realizados en los años 90, en los que se identificaron y purificaron diversas fibrinogenasas de *C. basiliscus* como Basilasa una SVMPs-P-II la cual degradó ambas cadenas del fibrinógeno a la par generando fragmentos de 45, 36 y 10 kDa lo cual se asemeja en cierta medida a lo reportado en el presente estudio (Datta et al., 1995; Retzios y Markland, 1992; Svoboda et al., 1995).

En los venenos de vipéridos, las SVMPs hidrolizan componentes clave de las membrana basales de las células lo que causa debilitamiento mecánico de las vasos sanguíneos, lo cual genera daño tisular local, así como perturbaciones hemostáticas (Gutiérrez et al., 2017). En el ensayo de azocaseína para evaluar la actividad proteolítica de los venenos, se puede concluir que está mediado en su totalidad por SVMPs debido a que la pre-incubación con el agente quelante EDTA inhibió por completo la actividad. El estudio de hemorragia local realizado va de la mano con la actividad proteolítica al ser ambos causados principalmente por SVMPs (Gutiérrez et al., 2017, 2016, 2005). Los resultados que se obtuvieron referentes a estas dos actividades indican variación entre ejemplares juveniles y adultos. Los adultos son altamente proteolíticos y generan lesiones hemorrágicas  $\geq 10$  mm de diámetro a comparación de los juveniles con actividad proteolítica baja y un nivel de hemorragia de 0. Los venenos de juveniles que provocaron una ligera hemorragia (Nivel 1) fueron el V11 de Michoacán y V20 de Nayarit, en este caso tal vez las fosfolipasas miotóxicas son las responsables. Resultados similares se reportaron para *C. m. nigrescens* en donde se encontró una relación entre el tamaño de las serpientes y su actividad proteolítica sobre dos sustratos diferentes HPA y azocaseína y en la actividad hemorrágica (Borja et al., 2018c). De igual manera, los resultados concuerdan con el antecedente de *C. basiliscus*, en ese caso los autores reportan una actividad proteolítica de  $6.06 \pm 0.42$  U/mg la cual fue inhibida por BATIMASTAT (inhibidor sintético de SVMPs) a un valor de  $0.11 \pm 0.005$  (Segura et al., 2017). En consistencia con los perfiles electroforéticos y cromatográficos de los venenos, los adultos presentaron una mayor cantidad de SVMPs P-I, P-II y P-III y fueron más hemorrágicos, tuvieron mayor actividad proteolítica y fibrinogenolítica que los juveniles.

En cuanto a la actividad fosfolipasa (PLA<sub>2</sub>s) no se encontró una relación entre la edad del individuo y su actividad enzimática. En este caso la variación encontrada fue a nivel individual. Tres de los individuos (V2, V6 y V11) presentaron los valores más altos de actividad fosfolipasa con valores de 60.86, 57.04 y 133.96 U/mg, respectivamente. Se sabe que las PLA<sub>2</sub>s exhiben preferencias diversas hacia distintas clases de fosfolípidos. La yema de huevo que es el sustrato utilizado para el ensayo se compone en un 65 % de triacilgliceroles (TAG), 28.3 % de fosfolípidos y 5.2 % de colesterol y alrededor de 1 % de ésteres de colesterol; las clases de lípidos detectadas en yema de huevo son fosfatidilcolina (70 %), fosfatidiletanolamina (24 %), esfingolípidos (4 %), fosfatidilinositol y fosfatidilserina (1 %) lo que explicaría la variación individual de cada veneno (Abousalham and Verger, 2000; PRIVETT et al., 1962).

## XI.2 Análisis transcriptómico

El análisis transcriptómico se realizó para verificar la presencia del transcrito de crotoxina en los individuos que carecían de la proteína en sus venenos. A pesar de que metodológicamente el experimento fue exitoso, no se tuvo evidencia para anotar ninguna de las dos subunidades de crotoxina, y ninguna de las lecturas mapeó con una secuencia conocida de la subunidad básica de *C. basiliscus*. Es así que *C. basiliscus* es ahora listada dentro de las especies con polimorfismo para crotoxina.

Después de combinar los transcriptomas, en general encontramos 50 secuencias de toxinas, similar a lo reportado con otras especies de cascabel (Hofmann et al., 2018; Margres et al., 2021; Strickland et al., 2018). De manera interesante, con el análisis individual de cada uno de los transcriptomas encontramos grandes diferencias entre ambos. La proporción de lecturas mapeadas para toxinas fue mucho menor en el transcriptoma del veneno comparado con el de glándula. Esto sugiere que a pesar de que el microambiente generado en la glándula confiere estabilidad al RNAm como se ha descrito (Currier et al., 2012; Mackessy and Baxter, 2006) y de que una gran cantidad de secuencias han sido amplificadas a partir de extracciones de material genético a partir de veneno crudo (Chen et al., 2002; Currier et al., 2012; Modahl and Mackessy, 2016). Las proporciones de toxinas varían considerablemente debido probablemente a una degradación diferencial de los RNAm en veneno y en la glándula. A pesar del éxito en la extracción de RNA a partir de veneno del individuo 18 por el método de TRIzol, de la amplificación de transcritos de crotamina y del ensamble de transcriptoma de veneno, pareciera que si lo que

se requiere examinar es la expresión relativa de los componentes de los venenos, es preferible y necesaria la extracción de glándula.

Cabe mencionar que al realizar ordeñas periódicas del individuo V18 aislando cada colmillo observamos que la glándula venenosa fue capaz de recuperarse y producir veneno después de la cirugía. A los 3 meses post-cirugía observamos diferencias en la composición proteica de la glándula izquierda contra la glándula derecha (cirugía). Recientemente se ha reconocido la heterogeneidad de las glándulas de veneno con regiones marcadas por la proliferación de células que producen cierto tipo de toxinas, y con un patrón de expresión génica diferente entre la glándula de veneno y la glándula accesoria (Smith and Mackessy, 2020; Vonk et al., 2013). De ser así el daño de alguna región de la glándula debido a la lesión mecánica sufrida por la cirugía causó asimetría en la síntesis de veneno. Algo interesante es que esta asimetría en la síntesis del veneno no se mantuvo, a los nueve meses después de la cirugía el fenotipo del veneno se recuperó.

### XI.3 Variación ontogénica y geográfica

Las variaciones intraespecíficas en venenos de cascabeles se han descrito en especies como *C. molossus nigrescens*, *C. scutulatus scutulatus*, *C. mictlantecuhtli*, *C. culminatus*, *C. tzabcan*, *C. simus*, entre otras (Borja et al., 2018b, 2014; Castro et al., 2013; Durban et al., 2017; Neri-Castro and Ponce-López, 2018). No se conoce exactamente cuál es el factor ecológico y/o evolutivo que hace que estos cambios en composición ocurran, sin embargo, se asocia o correlaciona con la dieta, edad y/o distribución (Chippaux et al., 1991). En el caso de *Crotalus basiliscus* observamos variación tanto ontogénica como geográfica en las actividades biológicas y bioquímicas evaluadas. Recientemente, se ha propuesto que la variación ontogenética de componentes específicos (SVMPs, PLA<sub>2</sub>s, MYO, SVSPs, CTL y BPP) es gradual y no discreta, lo cual sugiere de que el cambio en la expresión de la mayoría de las proteínas de los venenos se da a lo largo del crecimiento del individuo (Schonour et al., 2020).

Hasta la fecha existen tres teorías que explican los mecanismos moleculares que generan la variación en los venenos. Una de las teorías indica que la variación está mediada por polimorfismos genéticos en donde la presencia o ausencia de genes en algunos linajes determina la composición del veneno (Dagda et al., 2013). Este podría ser el caso de los individuos de *C. basiliscus* crotoxina negativos de Michoacán, Sinaloa y Zacatecas. Para verificar esta posibilidad es necesario un análisis genómico para buscar el gen de la subunidad básica y ácida de crotoxina a partir de DNA: si el gen no está presente, eso explicaría la ausencia de la proteína en los

venenos. Las dos teorías restantes podrían ayudarnos a explicar la modulación en la expresión de los distintos componentes del veneno, estas variaciones podrían estar mediadas por la accesibilidad a la cromatina y los niveles de metilación (Margres et al., 2021) y/o por miRNAs complementarios a RNAs que codifican para proteínas presentes en el veneno (Durban et al., 2017, 2013).

#### XI.4 Neutralización con antiveneno BIRMEX

El análisis de reconocimiento de los componentes por Western Blot nos indicó que en general los tres lotes de antivenenos reconocen a los componentes de alto peso molecular aunque presentan dificultades para reconocer a los componentes de bajo peso molecular (~10 kDa) similar a lo observado para *C. m. nigrescens* (Borja et al., 2018c). El ensayo de antivenómica nos permitió determinar que los componentes hidrofílicos que aparecen en los tiempos de retención de 5-20 minutos no son bien reconocidos por el antiveneno mientras que los más hidrofóbicos donde eluyen SVMPS, SVSPs y PLA<sub>2</sub>s son mejor reconocidos por el antiveneno (Pla et al., 2012), incluso se pudo observar que la subunidad básica de crotoxina es reconocida por los antivenenos. Algo interesante es que no hubo reconocimiento hacia crotoxina lo cual concuerda con el resultado de las neutralizaciones. Se debe de tener en cuenta que en este caso se utilizó un análisis antivenómico de 2<sup>a</sup> generación en el cual se evaluó una cantidad fija de veneno por lo que no podemos concluir sobre la capacidad inmunogénica de cada componente ni cuantificar la cantidad de antiveneno que se une a cada proteína presente en el veneno. Además, existen factores a tomar en cuenta cuando se trabaja con cromatografía de afinidad como la densidad del ligando, la cantidad de veneno que se pasa por la columna y la abundancia relativa de las proteínas del veneno (Sintiprungrat et al., 2016).

Desde la primera formulación de antivenenos realizada por Calmette, la neutralización de la letalidad ha sido de suma importancia para estimar la potencia de un antiveneno (Solano et al., 2010). La letalidad de los venenos se neutralizó de manera efectiva por el antiveneno. Esta neutralización efectiva por los antivenenos de Birmex hacia su veneno homólogo ya ha sido reportada con anterioridad (Sánchez et al., 2020; Segura et al., 2017). Sin embargo, las diferencias en la neutralización por lote y entre venenos con diferentes DL<sub>50</sub> determinadas en este trabajo, reflejan una falta de homogeneidad en los inmunógenos utilizados que debe de ser tomada en cuenta en la producción de antivenenos. Otro factor que genera variabilidad en los lotes de antiveneno y que no puede ser controlado es que estas mezclas provienen de animales cuyas respuestas inmunes están sujetas a diversos factores (enfermedades, ambiente, edad), y

que estudios previos han demostrado una alta variabilidad de producción de anticuerpos específicos hacia el veneno entre caballos (10-40 % de IgGs anti veneno) (Segura et al., 2013). El hecho de que el V10 con mayor toxicidad y con 27 % de crotoxina haya necesitado una mayor cantidad de antiveneno para ser neutralizado estaría indicando que la cantidad de crotoxina en la mezcla inmunogénica no es suficiente para generar altos títulos contra esta toxina lo cual ya ha sido reportado (Sánchez et al., 2020). Además durante los experimentos se observó que la actividad crotamina (parálisis rígida en las extremidades de los animales) no fue neutralizada, posiblemente debido a dos factores o a la suma de ambos: 1) la mezcla de venenos (el inmunógeno) utilizado por Birmex no contiene o contiene muy bajo porcentaje de crotamina o 2) debido a que crotamina es un péptido de 42 aa de bajo peso molecular que por sus características es pobremente inmunogénico y como tal el sistema inmunológico no produce anticuerpos contra esta (Ponce-López et al., 2021). Aunque los tres antivenenos son capaces de neutralizar y cumplen con las especificaciones marcadas por ley existen diferencias en el número de DL<sub>50</sub> neutralizadas por vial. Esta falta de homogenización en los diferentes lotes representa un problema en la práctica clínica.

Finalmente, debido a los resultados obtenidos en este estudio recomendamos a los productores de antiveneno tomar en consideración la variación intraespecífica de las especies de serpientes utilizadas y en este caso en específico para *Crotalus basiliscus* recomendamos utilizar una mezcla de juveniles y adultos que cubran la mayor distribución geográfica posible. Por otro lado, se debe garantizar que la mezcla inmunogénica utilizada permanezca estable por el mayor tiempo posible para mantener la homogeneidad del producto. Basándonos en la composición biológica de la especie recomendamos usar una mezcla de venenos de juveniles y de adultos, en proporciones que deben ser verificadas experimentalmente.

## XII CONCLUSIONES

- Existe variación ontogénica en los venenos de *C. basiliscus*, el veneno de adultos es de Tipo I y el de juveniles es de Tipo II, igualmente entre los adultos hay venenos con tipo intermedio Tipo I + II.
- El veneno de *C. basiliscus* presenta variación geográfica: en general asociados a la proporción de componentes, no obstante, dentro de la distribución de la especie existen poblaciones que tiene venenos menos tóxicos debido a la ausencia del complejo crotoxina (Michoacán, Sinaloa y Zacatecas).

- Los venenos de *C. basiliscus* tienen fibrinogenasas con la capacidad de hidrolizar la cadena  $\alpha$  y  $\beta$  del fibrinógeno demostrando que tanto las SVMPs como SVSPs contribuyen a la actividad.
- El antiveneno de Birmex es capaz de neutralizar la actividad proteolítica y letal de los venenos de *C. basiliscus*, sin embargo, existen diferencias entre los lotes de antiveneno.
- Tomar en cuenta la variación intraespecífica de *Crotalus basiliscus* en las mezclas inmunogénicas usadas para la producción del antiveneno.

### XIII BIBLIOGRAFÍA

- Abousalham, A., Verger, R., 2000. Egg yolk lipoproteins as substrates for lipases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1485, 56–62. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00033-0](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00033-0)
- Aguilar, I., Guerrero, B., Maria Salazar, A., Girón, M.E., Pérez, J.C., Sánchez, E.E., Rodríguez-Acosta, A., 2007. Individual venom variability in the South American rattlesnake *Crotalus durissus cumanensis*. *Toxicon* 50, 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.03.012>
- Alexander, G., Grothusen, J., Zepeda, H., Schwartzman, R.J., 1988. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. *Toxicon* 26, 953–960. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90260-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90260-7)
- Amazonas, D.R., Freitas-De-Sousa, L.A., Orefice, D.P., de Sousa, L.F., Martinez, M.G., Mourão, R.H.V., Chalkidis, H.M., Camargo, P.B., Moura-Da-Silva, A.M., 2019. Evidence for snake venom plasticity in a long-term study with individual captive *Bothrops atrox*. *Toxins (Basel)*. 11. <https://doi.org/10.3390/toxins11050294>
- Arevalo, E., Davis, S.K., Sites Jr., J.W., 1994. Mitochondrial DNA sequence divergence and phylogenetic relationships among eight chromosome races of the *Sceloporus grammicus* Complex (Phrynosomatidae) in Central Mexico, *Systematic Biology*.
- Barret, A.J., Rawlings, N.D., 1995. Families and clans of Serine peptidases. *Arch. Biochem. Biophys.* 318, 247–250.
- Bon, C., 1982. Synergism of the two subunits of crotoxin. *Toxicon* 20, 105–109.
- Borja, M., Castañeda, G., Espinosa, J., Neri, E., Carbajal, A., Clement, H., García, O., Alagon, A., 2014. Mojave Rattlesnake ( *Crotalus scutulatus scutulatus* ) with Type B Venom from Mexico . *Copeia* 2014, 7–13. <https://doi.org/10.1643/ot-12-041>
- Borja, M., Neri-Castro, E., Castañeda-Gaytán, G., Strickland, J.L., Parkinson, C.L., Castañeda-Gaytán, J., Ponce-López, R., Lomonte, B., Olvera-Rodríguez, A., Alagón, A., Pérez-Morales, R., 2018a. Biological and proteolytic variation in the venom of *Crotalus scutulatus scutulatus* from Mexico. *Toxins (Basel)*. 10, 1–20. <https://doi.org/10.3390/toxins10010035>
- Borja, M., Neri-Castro, E., Pérez-Morales, R., Strickland, J.L., Ponce-López, R., Parkinson, C.L., Espinosa-Fematt, J., Jorge, S.-M., Flores-Martínez, E., Alagón, A., 2018b. Ontogenetic Change in the Venom of Mexican Black- Tailed Rattlesnakes (*Crotalus molossus nigrescens*). *Toxins (Basel)*. 10, 1–27. <https://doi.org/10.3390/toxins10120501>

- Borja, M., Neri-Castro, E., Pérez-Morales, R., Strickland, J.L., Ponce-López, R., Parkinson, C.L., Espinosa-Fematt, J., Sáenz-Mata, J., Flores-Martínez, E., Alagón, A., Castañeda-Gaytán, G., 2018c. Ontogenetic change in the venom of mexican blacktailed rattlesnakes (*Crotalus molossus nigrescens*). *Toxins (Basel)*. 10. <https://doi.org/10.3390/toxins10120501>
- Burke, J.E., Dennis, E.A., 2009. Phospholipase A 2 structure/function, mechanism, and signaling. *J. Lipid Res.* 50, 237–242. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800033-JLR200>
- Calvete, J.J., Arias, A.S., Rodríguez, Y., Quesada-Bernat, S., Sánchez, L. V., Chippaux, J.P., Pla, D., Gutiérrez, J.M., 2016. Preclinical evaluation of three polyspecific antivenoms against the venom of *Echis ocellatus*: Neutralization of toxic activities and antivenomics. *Toxicon* 119, 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.06.022>
- Calvete, J.J., Juárez, P., Sanz, L., 2007. Snake venomomics. Strategy and applications. *J. mass Spectrom.* 42, 1405–1414. <https://doi.org/10.1002/jms.1242>
- Calvete, J.J., Marcinkiewicz, C., Monleón, D., Esteve, V., Celda, B., Juárez, P., Sanz, L., 2005. Snake venom disintegrins: Evolution of structure and function. *Toxicon* 45, 1063–1074. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.024>
- 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. *J. Proteome Res.* 11, 1382–1390. <https://doi.org/10.1021/pr201021d>
- 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., Gutiérrez, J.M., 2010. Snake venomomics of the Central American Rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive pedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. *J. Proteome Res.* 9, 528–544. <https://doi.org/10.1021/pr9008749>
- Calvete, J.J., Sanz, L., Pla, D., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., 2014. Omics meets biology: Application to the design and preclinical assessment of antivenoms. *Toxins (Basel)*. 6, 3388–3405. <https://doi.org/10.3390/toxins6123388>
- Carbajal-Márquez, R.A., Cedeño-Vázquez, J.R., Martínez-Arce, A., Neri-Castro, E., Machkour-M'Rabet, S.C., 2020. Accessing cryptic diversity in Neotropical rattlesnakes (*Serpentes*:

- Viperidae: *Crotalus*) with the description of two new species. *Zootaxa* 4729, 451–481.  
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4729.4.1>
- Casewell, N.R., Jackson, T.N.W., Laustsen, A.H., Sunagar, K., 2020. Causes and Consequences of Snake Venom Variation. *Trends Pharmacol. Sci.* 41, 570–581.  
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.05.006>
- Castoe, T.A., Daza, J.M., Smith, E.N., Sasa, M.M., Kuch, U., Campbell, J.A., Chippindale, P.T., Parkinson, C.L., 2009. Comparative phylogeography of pitvipers suggests a consensus of ancient Middle American highland biogeography. *J. Biogeogr.* 36, 88–103.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2008.01991.x>
- Castro, E.N., Lomonte, B., del Carmen Gutiérrez, M., Alagón, A., Gutiérrez, J.M., 2013. Intraspecies variation in the venom of the rattlesnake *Crotalus simus* from Mexico: Different expression of crotoxin results in highly variable toxicity in the venoms of three subspecies. *J. Proteomics* 87, 103–121. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.024>
- Charpentier, I., Pillet, L., Karlsson, E., Couderc, J., Ménez, A., 1990. Recognition of the Acetylcholine Receptor Binding Site of a Long-chain Neurotoxin by Toxin-specific Monoclonal Antibodies. *J. Mol. Recognit.* 3, 74–81.
- Chen, T., Bjourson, A.J., Orr, D.F., Kwok, H.F., Rao, P., Ivanyi, C., Shaw, C., 2002. Unmasking venom gland transcriptomes in reptile venoms. *Anal. Biochem.* 311, 152–156.  
[https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00404-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00404-9)
- Chippaux, J.P., 2017. Incidence and mortality due to snakebite in the Americas, PLoS Neglected Tropical Diseases. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005662>
- Chippaux, J.P., Williams, V., White, J., 1991. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon* 29, 1279–1303. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90116-9](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90116-9)
- Cope, E.D., 1864. Contributions to the herpetology of Tropical America. *Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia* 16, 166–176.
- Coronado, M.A., Gabdulkhakov, A., Georgieva, D., Sankaran, B., Murakami, M.T., Arni, R.K., Betzel, C., 2013. Structure of the polypeptide crotoxin from the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 69, 1958–1964.  
<https://doi.org/10.1107/S0907444913018003>
- Currier, R.B., Calvete, J.J., Sanz, L., Harrison, R.A., Rowley, P.D., Wagstaff, S.C., 2012. Unusual stability of messenger RNA in snake venom reveals gene expression dynamics of

- venom replenishment. PLoS One 7, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041888>
- da Silva, N.J., Aird, S.D., Seebart, C., Kaiser, I.I., 1989. A gyroxin analog from the venom of the bushmaster (*Lachesis muta muta*). *Toxicon* 27, 763–771. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(89\)90043-3](https://doi.org/10.1016/0041-0101(89)90043-3)
- Dagda, R.K., Gasanov, S., De La Oiii, Y., Rael, E.D., Lieb, C.S., 2013. Genetic basis for variation of metalloproteinase-associated biochemical activity in venom of the mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*). *Biochem. Res. Int.* 2013, 14–16. <https://doi.org/10.1155/2013/251474>
- Datta, G., Dong, A., Witt, J., Tu T., A., 1995. Biochemical characterization of Basilase, a fibrinolytic enzyme from *Crotalus basiliscus basiliscus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 317, 365–373.
- De Roodt, A.R., Clement, H., Dolab, J.A., Litwin, S., Hajos, S.E., Boyer, L., Alagón, A., 2014. Protein content of antivenoms and relationship with their immunochemical reactivity and neutralization assays. *Clin. Toxicol.* 52, 594–603. <https://doi.org/10.3109/15563650.2014.925561>
- De Roodt, A.R., Estévez-Ramírez, J., Paniagua-Solís, J.F., Litwin, S., Carvajal-Saucedo, A., Dolab, J.A., Robles-Ortiz, L.E., Alagón, A., 2005. Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México. *Gac. Med. Mex.* 141, 13–21.
- Dennis, E.A., Cao, J., Hsu, Y.H., Magrioti, V., Kokotos, G., 2011. Phospholipase A2 enzymes: Physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem. Rev.* 111, 6130–6185. <https://doi.org/10.1021/cr200085w>
- Dowell, N.L., Giorgianni, M.W., Kassner, V.A., Selegue, J.E., Sanchez, E.E., Carroll, S.B., 2016. The Deep Origin and Recent Loss of Venom Toxin Genes in Rattlesnakes. *Curr. Biol.* 26, 2434–2445. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.07.038>
- Durban, J., Pérez, A., Sanz, L., Gómez, A., Bonilla, F., Rodríguez, S., Chacón, D., Sasa, M., Angulo, Y., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., 2013. Integrated “omics” profiling indicates that miRNAs are modulators of the ontogenetic venom composition shift in the Central American rattlesnake, *Crotalus simus simus*. *BMC Genomics* 14, 1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-234>
- Durban, J., Sanz, L., Trevisan-Silva, D., Neri-Castro, E., Alagón, A., Calvete, J.J., 2017. Integrated Venomics and Venom Gland Transcriptome Analysis of Juvenile and Adult

- Mexican Rattlesnakes *Crotalus simus*, *C. tzabcan*, and *C. culminatus* Revealed miRNA-modulated Ontogenetic Shifts. *J. Proteome Res.* 16, 3370–3390.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00414>
- Engmark, M., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Laustsen, A.H., De Masi, F., Andersen, M.R., Lund, O., 2017. Cross-recognition of a pit viper (*Crotalinae*) polyspecific antivenom explored through high-density peptide microarray epitope mapping. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, 1–23.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005768>
- Fadel, V., Bettendorff, P., Herrmann, T., De Azevedo, W.F., Oliveira, E.B., Yamane, T., Wüthrich, K., 2005. Automated NMR structure determination and disulfide bond identification of the myotoxin crotamine from *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* 46, 759–767. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.07.018>
- Farias, I.B. de, Morais-Zani, K. de, Serino-Silva, C., Sant'Anna, S.S., Rocha, M.M.T. d., Grego, K.F., Andrade-Silva, D., Serrano, S.M.T., Tanaka-Azevedo, A.M., 2018. Functional and proteomic comparison of *Bothrops jararaca* venom from captive specimens and the Brazilian Bothropic Reference Venom. *J. Proteomics* 174, 36–46.  
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.12.008>
- Faure, G., Bon, C., 1988. Crotoxin, a Phospholipase A2 Neurotoxin from the South American Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: Purification of Several Isoforms and Comparison of Their Molecular Structure and of Their Biological Activities. *Biochemistry* 27, 730–738.  
<https://doi.org/10.1021/bi00402a036>
- Faure, G., Choume, V., Bouchier, C., Camoin, L., Guillaume, J. -L, Monegier, B., Vuilhorgne, M., Bon, C., 1994. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Eur. J. Biochem.* 223, 161–164. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18978.x>
- Fox, J.W., Bjarnason, J.B., 1995. Atrolysins: Metalloproteinases from *Crotalus atrox* venom. *Methods Enzymol.* 248, 368–387. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)48024-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)48024-2)
- Fox, J.W., Serrano, S.M.T., 2008. Exploring snake venom proteomes: Multifaceted analyses for complex toxin mixtures. *Proteomics* 8, 909–920. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700777>
- Fox, J.W., Serrano, S.M.T., 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 45, 969–985. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.012>

- Fry, B.G., Winkel, K.D., Wickramaratna, J.C., Hodgson, W.C., Wüster, W., 2003. Effectiveness of snake antivenom: Species and regional venom variation and its clinical impact. *J. Toxicol. - Toxin Rev.* <https://doi.org/10.1081/TXR-120019018>
- Galizio, N. da C., Serino-Silva, C., Stuginski, D.R., Abreu, P.A.E., Sant'Anna, S.S., Grego, K.F., Tashima, A.K., Tanaka-Azevedo, A.M., Morais-Zani, K. de, 2018. Compositional and functional investigation of individual and pooled venoms from long-term captive and recently wild-caught *Bothrops jararaca* snakes. *J. Proteomics* 186, 56–70. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.07.007>
- Gibbs, H.L., Sanz, L., Chiucchi, J.E., Farrell, T.M., Calvete, J.J., 2011. Proteomic analysis of ontogenetic and diet-related changes in venom composition of juvenile and adult Dusky Pigmy rattlesnakes (*Sistrurus miliarius barbouri*). *J. Proteomics* 74, 2169–2179. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.06.013>
- Grabherr, M.G., Haas, B.J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., Di Palma, F., Birren, B.W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N., Regev, A., 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.* 29, 644–652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Grabowsky, E.R., Mackessy, S.P., 2019. Predator-prey interactions and venom composition in a high elevation lizard specialist, *Crotalus pricei* (Twin-spotted Rattlesnake). *Toxicon* 170, 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.09.011>
- Gutiérrez, J.M., 2014. Reducing the impact of snakebite envenoming in latin America and the Caribbean: Achievements and challenges ahead. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 108, 530–537. <https://doi.org/10.1093/trstmh/tru102>
- Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., Habib, A.G., Harrison, R.A., Williams, D.J., Warrell, D.A., 2017. Snakebite envenoming. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 3, 17063. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.63>
- Gutiérrez, J.M., Escalante, T., Rucavado, A., Herrera, C., 2016. Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: A journey of discovery and understanding. *Toxins (Basel)*. 8. <https://doi.org/10.3390/toxins8040093>
- Gutiérrez, J.M., Gondo Higashi, H., Hui Wen, F., Burnouf, T., 2007. Strengthening antivenom production in Central and South American public laboratories: Report of a workshop. *Toxicon* 49, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.09.005>

- Gutiérrez, J.M., León, G., Lomonte, B., 2003. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships of Immunoglobulin Therapy for Envenomation. *Clin. Pharmacokinet.* 42, 721–741.
- 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, 997–1011. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.029>
- Habermann, E., Breithaupt, H., 1978. The crotoxin complex-an example of biochemical and pharmacological protein complementation. *Toxicon* 16, 19–30. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(78\)90056-9](https://doi.org/10.1016/0041-0101(78)90056-9)
- Hardy, J.L.G.R.C.S.M.C.W.D.L., 1983. Geographical variation in *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave Rattlesnake) venom properties. *Toxicon* 21, 119–121. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(83\)90169-1](https://doi.org/10.1016/0041-0101(83)90169-1)
- Hofmann, E.P., Rautsaw, R.M., Strickland, J.L., Holding, M.L., Hogan, M.P., Mason, A.J., Rokyta, D.R., Parkinson, C.L., 2018. Comparative venom-gland transcriptomics and venom proteomics of four Sidewinder Rattlesnake (*Crotalus cerastes*) lineages reveal little differential expression despite individual variation. *Sci. Rep.* 8, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33943-5>
- Jia, L.G., Wang, X.M., Shannon, J.D., Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 2000. Inhibition of platelet aggregation by the recombinant cysteine-rich domain of the hemorrhagic snake venom metalloproteinase, atrolysin A. *Arch. Biochem. Biophys.* 373, 281–286. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1517>
- Kamiguti, A.S., 2005. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. *Toxicon* 45, 1041–1049. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.026>
- Kang, T.S., Georgieva, D., Genov, N., Murakami, M.T., Sinha, M., Kumar, R.P., Kaur, P., Kumar, S., Dey, S., Sharma, S., Vrieling, A., Betzel, C., Takeda, S., Arni, R.K., Singh, T.P., Kini, R.M., 2011. Enzymatic toxins from snake venom: Structural characterization and mechanism of catalysis. *FEBS J.* 278, 4544–4576. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08115.x>
- Kerkis, I., Hayashi, M.A.F., Prieto Da Silva, A.R.B., Pereira, A., De Sá Júnior, P.L., Zaharenko, A.J., Rádis-Baptista, G., Kerkis, A., Yamane, T., 2014. State of the art in the studies on crotamine, a cell penetrating peptide from South American rattlesnake. *Biomed Res. Int.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/675985>

- Kerkis, I., Silva, F.D.S., Pereira, A., Kerkis, A., Rádis-Baptista, G., 2010. Biological versatility of crotamine a cationic peptide from the venom of a South American rattlesnake. *Expert Opin. Investig. Drugs* 19, 1515–1525. <https://doi.org/10.1517/13543784.2010.534457>
- Kini, R.M., 2006. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 34, 200–204. <https://doi.org/10.1159/000092424>
- Kini, R.M., 2003. Excitement ahead: Structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon* 42, 827–840. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.002>
- Kini, R.M., Chan, Y.M., 1999. Accelerated evolution and molecular surface of venom phospholipase A2 enzymes. *J. Mol. Evol.* 48, 125–132. <https://doi.org/10.1007/PL00006450>
- Kini, R.M., Evans, H.J., 1989. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. *Toxicon* 27, 613–635. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(89\)90013-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(89)90013-5)
- Kini, R.M., Evans, H.J., 1987. Structure-function relationships of phospholipases. The anticoagulant region of phospholipases A2. *J. Biol. Chem.* 262, 14402–14407.
- Kini, R.M., Koh, C.Y., 2016. Metalloproteases affecting blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation from snake venoms: Definition and nomenclature of interaction sites. *Toxins (Basel)*. 8, 1–27. <https://doi.org/10.3390/toxins8100284>
- Lafaye, P., Choumet, V., Demangel, C., Bon, C., Mazie, J.C., 1997. Biologically active human anti-crotoxin scFv isolated from a semi-synthetic phage library. *Immunotechnology* 3, 117–125. [https://doi.org/10.1016/S1380-2933\(97\)00068-7](https://doi.org/10.1016/S1380-2933(97)00068-7)
- Laloo, D.G., Theakston, R.D.G., 2003. Snake antivenoms. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 41, 277–290. <https://doi.org/10.1081/CLT-120021113>
- Langmead, B., Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Laustsen, A.H., 2016. Toxin synergism in snake venoms. *Toxin Rev.* 35, 165–170. <https://doi.org/10.1080/15569543.2016.1220397>
- Laustsen, A.H., María Gutiérrez, J., Knudsen, C., Johansen, K.H., Bermúdez-Méndez, E., Cerni, F.A., Jürgensen, J.A., Ledsgaard, L., Martos-Esteban, A., Øhlenschläger, M., Pus, U., Andersen, M.R., Lomonte, B., Engmark, M., Pucca, M.B., 2018. Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development. *Toxicon*

146, 151–175. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.03.004>

Lemos-Espinal, J.A., Smith, G.R., Pierce, L.J.S., Painter, C.W., 2020. The amphibians and reptiles of Colima, Mexico, with a summary of their conservation status. *Zookeys* 927, 99–125. <https://doi.org/10.3897/zookeys.927.50064>

Li, B., Dewey, C.N., 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12, 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>

Li, W., Godzik, A., 2006. Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22, 1658–1659. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158>

Lima, S. de C., Porta, L. de C., Lima, Á. da C., Campeiro, J.D., Meurer, Y., Teixeira, N.B., Duarte, T., Oliveira, E.B., Picolo, G., Godinho, R.O., Silva, R.H., Hayashi, M.A.F., 2018. Pharmacological characterization of crotamine effects on mice hind limb paralysis employing both ex vivo and in vivo assays: Insights into the involvement of voltage-gated ion channels in the crotamine action on skeletal muscles. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006700>

Loc-Barragán, J., Carbajal-Márquez, R.A., Woolrich-Piña, G., Navarro-Orozco, R.R., 2016. *Crotalus basiliscus*. Arboreal habitat use/Litter size. *Mesoamerican Herpetol.* 3, 494–496. [https://doi.org/10.1007/978-0-8176-4968-5\\_11](https://doi.org/10.1007/978-0-8176-4968-5_11)

Mackessy, S.P., 2010. Evolutionary trends in venom composition in the Western Rattlesnakes (*Crotalus viridis sensu lato*): Toxicity vs. tenderizers. *Toxicon* 55, 1463–1474. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.02.028>

Mackessy, S.P., 2008. Venom composition in Rattlesnakes: Trends and Biological significance, in: Hayes, W.K., Beaman, K.R., Cardwell, M.D., Bush, S.P. (Eds.), *The Biology of Rattlesnakes*. Loma Linda University Press., Loma Linda, California, USA, pp. 495–510.

Mackessy, S.P., Baxter, L.M., 2006. Bioweapons synthesis and storage: The venom gland of front-fanged snakes. *Zool. Anz.* 245, 147–159. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2006.01.003>

Mackessy, S.P., Leroy, J., Mociño-Deloya, E., Setser, K., Bryson, R.W., Saviola, A.J., 2018. Venom ontogeny in the mexican lance-headed rattlesnake (*Crotalus polystictus*). *Toxins (Basel)*. 10, 1–19. <https://doi.org/10.3390/toxins10070271>

Mackessy, S.P., Quijada-Mascareñas, A., Wüster, W., Weinstein, S.A., Smith, T.L., Kardong, K.

- V., Fox, J.W., Serrano, S.M.T., Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., Phillips, D.J., Swenson, S.D., Markland, F.S., Dhananjaya, B.L., Vishwanath, B.S., D'Souza, C.J.M., Doley, R., Zhou, X., Manjunatha, K.R., et al., 2009. Handbook of venoms and toxins of reptiles, Stephen P. ed. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL.
- Margres, M.J., Rautsaw, R.M., Strickland, J.L., Mason, A.J., Schramer, T.D., Hofmann, E.P., Stiers, E., Ellsworth, S.A., Nystrom, G.S., Hogan, M.P., Bartlett, D.A., Colston, T.J., Gilbert, D.M., Rokyta, D.R., Parkinson, C.L., 2021. The Tiger Rattlesnake genome reveals a complex genotype underlying a simple venom phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118, 1–12. <https://doi.org/10.1073/pnas.2014634118>
- Margres, M.J., Wray, K.P., Seavy, M., McGivern, J.J., Sanader, D., Rokyta, D.R., 2015. Phenotypic integration in the feeding system of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *Mol. Ecol.* 24, 3405–3420. <https://doi.org/10.1111/mec.13240>
- Markland, F.S., 1998. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 36, 1749–1800. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00126-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00126-3)
- Martínez-Romero, G., Rucavado, A., Lazcano, D., Gutiérrez, J.M., Borja, M., Lomonte, B., Garza-García, Y., Zugasti-Cruz, A., 2013. Comparison of venom composition and biological activities of the subspecies *Crotalus lepidus lepidus*, *Crotalus lepidus klauberi* and *Crotalus lepidus morulus* from Mexico. *Toxicon* 71, 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.05.006>
- Massey, D.J., Calvete, J.J., Sánchez, E.E., Sanz, L., Richards, K., Curtis, R., Boesen, K., 2012. Venom variability and envenoming severity outcomes of the *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) from Southern Arizona. *J. Proteomics* 75, 2576–2587. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.02.035>
- Matsui, T., Hamako, J., 2005. Structure and function of snake venom toxins interacting with human von Willebrand factor. *Toxicon* 45, 1075–1087. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.023>
- McCranie, J.R., 1981. *Crotalus basiliscus* (Cope) Mexican west coast rattlesnake. *Cat. Am. Amphib. Reptil.*
- Modahl, C.M., Mackessy, S.P., 2016. Full-Length Venom Protein cDNA Sequences from Venom-Derived mRNA: Exploring Compositional Variation and Adaptive Multigene Evolution. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004587>

- Moura-Da-silva, A.M., Contreras-Bernal, J.C., Gimenes, S.N.C., Freitas-De-sousa, L.A., Portes-Junior, J.A., Peixoto, P. da S., Iwai, L.K., de Moura, V.M., Bisnetoid, P.F., Lacerda, M., da Silva, I.M., Ferreira, L.C. de L., de Oliveira, S.S., Wen, F.H., Sachett, J. de A.G., Monteiro, W.M., 2020. The relationship between clinics and the venom of the causative amazon pit viper (*Bothrops atrox*). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14, 1–17.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008299>
- Neri-Castro, E., Bénard-Valle, M., Gil, G., Borja, M., León, J.L. de, Alagón, A., 2020a. Venomous snakes in Mexico: A review of the study of venoms, antivenom and epidemiology. *Rev. Latinoam. Herpetol.* 3, 05–22.
- Neri-Castro, E., Bénard-Valle, M., Paniagua, D., V Boyer, L., D Possani, L., López-Casillas, F., Olvera, A., Romero, C., Zamudio, F., Alagón, A., 2020b. Neotropical Rattlesnake (*Crotalus simus*) Venom Pharmacokinetics in Lymph and Blood Using an Ovine Model. *Toxins (Basel)*. 12. <https://doi.org/10.3390/toxins12070455>
- Neri-Castro, E., Hernández-Dávila, A., Olvera-Rodríguez, A., Cardoso-Torres, H., Bénard-Valle, M., Bastiaans, E., López-Gutierrez, O., Alagón, A., 2019. Detection and quantification of a  $\beta$ -neurotoxin (crotoxin homologs) in the venom of the rattlesnakes *Crotalus simus*, *C. culminatus* and *C. tzabcan* from Mexico. *Toxicon X* 2, 3–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2019.100007>
- Neri-Castro, E., Ponce-López, R., 2018. Variación ontogénica en el veneno de *Crotalus simus* en México. *Árido-Ciencia* 3, 42–47.
- Nicastro, G., Franzoni, L., De Chiara, C., Mancin, A.C., Giglio, J.R., Spisni, A., 2003. Solution structure of crotamine, a Na<sup>+</sup> channel affecting toxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Eur. J. Biochem.* 270, 1969–1979. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03563.x>
- Oguiura, N., Boni-Mitake, M., Rádis-Baptista, G., 2005. New view on crotamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. *Toxicon* 46, 363–370.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.06.009>
- 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, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2009.05.015>
- Paredes-García, D.M., Ramírez-Bautista, A., Martínez-Morales, M.A., 2011. Distribución y

- representatividad de las especies del género *Crotalus* en las áreas naturales protegidas de México. *Rev. Mex. Biodivers.* 82, 689–700.  
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Peigneur, S., Orts, D.J.B., Prieto Da Silva, A.R., Oguiura, N., Boni-Mitake, M., De Oliveira, E.B., Zaharenko, A.J., De Freitas, J.C., Tytgat, J., 2012. Crotamine pharmacology revisited: Novel insights based on the inhibition of K<sup>v</sup> channels. *Mol. Pharmacol.* 82, 90–96.  
<https://doi.org/10.1124/mol.112.078188>
- Pla, D., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., 2012. Second generation snake antivenomics: Comparing immunoaffinity and immunodepletion protocols. *Toxicon* 60, 688–699.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.04.342>
- Ponce-López, R., Neri-Castro, E., Borja, M., Strickland, J.L., Alagón, A., 2020. Neutralizing potency and immunochemical evaluation of an anti-*Crotalus miclantecuhтли* experimental serum. *Toxicon* 187, 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.08.026>
- Ponce-López, R., Neri-Castro, E., Olvera-Rodríguez, F., Sánchez, E.E., Alagón, A., Olvera-Rodríguez, A., 2021. Neutralization of crotamine by polyclonal antibodies generated against two whole rattlesnake venoms and a novel recombinant fusion protein. *Toxicon* 197, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.04.005>
- PRIVETT, O.S., BLANK, M.L., SCHMIT, J.A., 1962. Studies on the Composition of Egg Lipid. *J. Food Sci.* 27, 463–468. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1962.tb00128.x>
- Rádis-Baptista, G., Oguiura, N., Hayashi, M.A.F., Camargo, M.E., Grego, K.F., Oliveira, E.B., Yamane, T., 1999. Nucleotide sequence of crotamine isoform precursors from a single South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Toxicon* 37, 973–984.  
[https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00226-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00226-8)
- Retzios, A.D., Markland, F.S., 1992. Purification, Characterization, and Fibrinogen Cleavage Sites of Three Fibrinolytic Enzymes from the Venom of *Crotalus basiliscus basiliscus*. *Biochemistry* 31, 4547–4557. <https://doi.org/10.1021/bi00134a003>
- Rex, C.J., Mackessy, S.P., 2019. Venom composition of adult Western Diamondback Rattlesnakes (*Crotalus atrox*) maintained under controlled diet and environmental conditions shows only minor changes. *Toxicon* 164, 51–60.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.03.027>
- Rivas, E., Neri-Castro, E., Bénard-Valle, M., Hernández-Dávila, A.I., Zamudio, F., Alagón, A.,

2017. General characterization of the venoms from two species of rattlesnakes and an intergrade population (*C. lepidus* x *aquilus*) from Aguascalientes and Zacatecas, Mexico. *Toxicon* 138, 191–195. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.09.002>
- Rizzi, C.T., Carvalho-de-Souza, J.L., Schiavon, E., Cassola, A.C., Wanke, E., Troncone, L.R.P., 2007. Crotamine inhibits preferentially fast-twitching muscles but is inactive on sodium channels. *Toxicon* 50, 553–562. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.04.026>
- Rokyta, D.R., Lemmon, A.R., Margres, M.J., Aronow, K., 2012. The venom-gland transcriptome of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *BMC Genomics* 13, 1–23. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-312>
- Saad, E., Barros, L.C., Biscola, N., Pimenta, D.C., Barraviera, S.R.C.S., Barraviera, B., Seabra, R., Jr, F., Saad, E., Barros, L.C., Biscola, N., Daniel, C., 2012. Intraspecific Variation of Biological Activities in Venoms from Wild and Captive Bothrops jararaca 7394. <https://doi.org/10.1080/15287394.2012.697839>
- Sajevic, T., Leonardi, A., Križaj, I., 2011. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon* 57, 627–645. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.01.006>
- Sampaio, S.C., Hyslop, S., Fontes, M.R.M., Prado-Franceschi, J., Zambelli, V.O., Magro, A.J., Brigatte, P., Gutierrez, V.P., Cury, Y., 2010. Crotoxin: Novel activities for a classic  $\beta$ -neurotoxin. *Toxicon* 55, 1045–1060. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.01.011>
- Sánchez, M., Solano, G., Vargas, M., Reta-Mares, F., Neri-Castro, E., Alagón, A., Sánchez, A., Villalta, M., León, G., Segura, Á., 2020. Toxicological profile of medically relevant *Crotalus* species from Mexico and their neutralization by a *Crotalus basiliscus* / *Bothrops asper* antivenom 179, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.03.006>
- Saviola, A.J., Gandara, A.J., Bryson, R.W., Mackessy, S.P., 2017. Venom phenotypes of the Rock Rattlesnake (*Crotalus lepidus*) and the Ridge-nosed Rattlesnake (*Crotalus willardi*) from México and the United States. *Toxicon* 138, 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.08.016>
- Saviola, A.J., Pla, D., Sanz, L., Castoe, T.A., Calvete, J.J., Mackessy, S.P., 2015. Comparative venomomics of the Prairie Rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) from Colorado: Identification of a novel pattern of ontogenetic changes in venom composition and assessment of the immunoreactivity of the commercial antivenom CroFab®. *J. Proteomics* 121, 28–43. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.03.015>

- Schenberg, S., 1959. Geographical pattern of crotamine distribution in the same rattlesnake subspecies. *Sci. New Ser.* 129, 1361–1363.
- Schild, D.R., Adams, R.H., Card, D.C., Corbin, A.B., Jezkova, T., Hales, N.R., Meik, J.M., Perry, B.W., Spencer, C.L., Smith, L.L., García, G.C., Bouzid, N.M., Strickland, J.L., Parkinson, C.L., Borja, M., Castañeda-Gaytán, G., Bryson, R.W., Flores-Villela, O.A., Mackessy, S.P., Castoe, T.A., 2018. Cryptic genetic diversity, population structure, and gene flow in the Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 127, 669–681. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.06.013>
- Schonour, R.B., Huff, E.M., Holding, M.L., Claunch, N.M., Ellsworth, S.A., Hogan, M.P., Wray, K., McGivern, J., Margres, M.J., Colston, T.J., Rokyta, D.R., 2020. Gradual and Discrete Ontogenetic Shifts in Rattlesnake Venom Composition and Assessment of Hormonal and Ecological Correlates. *Toxins (Basel)*. 12, 659. <https://doi.org/10.3390/toxins12100659>
- Segura, Á., Herrera, M., Reta Mares, F., Jaime, C., Sánchez, A., Vargas, M., Villalta, M., Gómez, A., Gutiérrez, J.M., León, G., 2017. Proteomic, toxicological and immunogenic characterization of Mexican west-coast rattlesnake (*Crotalus basiliscus*) venom and its immunological relatedness with the venom of Central American rattlesnake (*Crotalus simus*). *J. Proteomics* 158, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.02.015>
- Segura, Á., Herrera, M., Villalta, M., Vargas, M., Gutiérrez, J.M., León, G., 2013. Assessment of snake antivenom purity by comparing physicochemical and immunochemical methods. *Biologicals* 41, 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.11.001>
- Seifert, S.A., Boyer, L. V., 2001. Recurrence phenomena after immunoglobulin therapy for snake envenomations: Part 1. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of immunoglobulin antivenoms and related antibodies. *Ann. Emerg. Med.* 37, 189–195. <https://doi.org/10.1067/mem.2001.113135>
- Serrano, S.M.T., 2013. The long road of research on snake venom serine proteinases. *Toxicon* 62, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.003>
- Serrano, S.M.T., Maroun, R.C., 2005. Snake venom serine proteinases: Sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon* 45, 1115–1132. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.020>
- Shimokawa, K.I., Jia, L.G., Wang, X.M., Fox, J.W., 1996. Expression, activation, and processing of the recombinant snake venom metalloproteinase, Pro-atrolysin E. *Arch. Biochem.*

- Biophys. 335, 283–294. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0509>
- Sintiprungrat, K., Chaisuriya, P., Watcharatanyatip, K., Ratanabanangkoon, K., 2016. Immunoaffinity chromatography in antivenomics studies: Various parameters that can affect the results. *Toxicon* 119, 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.05.017>
- Smith, C.F., Mackessy, S.P., 2020. Asymmetrical expression of toxins between the left and right venom glands of an individual prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). *Toxicon* 186, 105–108. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.08.005>
- Solano, G., Segura, Á., Herrera, M., Gómez, A., Villalta, M., Gutiérrez, J.M., León, G., 2010. Study of the design and analytical properties of the lethality neutralization assay used to estimate antivenom potency against *Bothrops asper* snake venom. *Biologicals* 38, 577–585. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2010.05.006>
- Stocker, K., Fischer, H., Meier, J., 1982. Thrombin-like snake venom proteinases. *Toxicon* 20, 265–273.
- Strickland, J.L., Mason, A.J., Rokyta, D.R., Parkinson, C.L., 2018. Phenotypic variation in Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus*) venom is driven by four toxin families. *Toxins (Basel)*. 10, 1–23. <https://doi.org/10.3390/toxins10040135>
- Svoboda, P., Meier, J., Freyvogel, T.A., 1995. Purification and characterization of three  $\alpha$ 2-antiplasmin and  $\alpha$ 2-macroglobulin inactivating enzymes from the venom of the Mexican west coast rattlesnake (*Crotalus basiliscus*). *Toxicon* 33, 1331–1346. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(95\)00065-T](https://doi.org/10.1016/0041-0101(95)00065-T)
- Swenson, S., Markland, F.S., 2005. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. *Toxicon* 45, 1021–1039. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.027>
- Takeda, S., 2016. ADAM and ADAMTS family proteins and snake venom metalloproteinases: A structural overview. *Toxins (Basel)*. 8, 8–11. <https://doi.org/10.3390/toxins8050155>
- Tan, N.H., Tan, C.S., 1988. Acidimetric assay for phospholipase A using egg yolk suspension as substrate. *Anal. Biochem.* 170, 282–288. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90632-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90632-X)
- Tasima, L.J., Serino-Silva, C., Hatakeyama, D.M., Nishiduka, E.S., Tashima, A.K., Sant'Anna, S.S., Grego, K.F., De Moraes-Zani, K., Tanaka-Azevedo, A.M., 2020. Crotamine in *Crotalus durissus*: Distribution according to subspecies and geographic origin, in captivity or nature. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 26, 1–14. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-jvatitd-2019-0053>

- Tasoulis, T., Isbister, G.K., 2017. A review and database of snake venom proteomes. *Toxins* (Basel). 9. <https://doi.org/10.3390/toxins9090290>
- Teixeira-Araújo, R., Castanheira, P., Brazil-Más, L., Pontes, F., Leitão de Araújo, M., Machado Alves, M.L., Zingali, R.B., Correa-Netto, C., 2017. Antivenomics as a tool to improve the neutralizing capacity of the crotalic antivenom: A study with crotamine. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 23, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0118-7>
- Vellard, J., 1939. Geographical Variations in the Venom of *C. terrificus*. *Compte rendu des seances la Soc. Biol.* 130, 463-464 pp.
- Vivas-Ruiz, D.E., Sandoval, G.A., Gonzalez-Kozlova, E., Zarria-Romero, J., Lazo, F., Rodríguez, E., Magalhães, H.P.B., Chávez-Olortegui, C., Oliveira, L.S., Alvarenga, V.G., Urra, F.A., Toledo, J., Yarlequé, A., Eble, J.A., Sanchez, E.F., 2020. Fibrinogen-clotting enzyme, pictobin, from *Bothrops pictus* snake venom. Structural and functional characterization. *Int. J. Biol. Macromol.* 153, 779–795. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.055>
- Vonk, F.J., Casewell, N.R., Henkel, C. V., Heimberg, A.M., Jansen, H.J., McCleary, R.J.R., Kerkkamp, H.M.E., Vos, R.A., Guerreiro, I., Calvete, J.J., Wüster, W., Woods, A.E., Logan, J.M., Harrison, R.A., Castoe, T.A., De Koning, J., Pollock, D.D., Yandell, M., Calderon, D., Renjifo, C., Currier, R.B., Salgado, D., Pla, D., Sanz, L., Hyder, A.S., Ribeiro, J.M.C., Arntzen, J.W., Van Den Thillart, G.E.E.J.M., Boetzer, M., Pirovano, W., Dirks, R.P., Spaink, H.P., Duboule, D., McGlenn, E., Kini, R.M., Richardson, M.K., 2013. The king cobra genome reveals dynamic gene evolution and adaptation in the snake venom system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 20651–20656. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314702110>
- WHO, 2016. WHO Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. *World Heal. Organ.* 204, 1–192. <https://doi.org/10.1051/jbio/2009043>
- Yañez-Arenas, C., Peterson, A.T., Mokondoko, P., Rojas-Soto, O., Martínez-Meyer, E., 2014. The use of ecological niche modeling to infer potential risk areas of snakebite in the Mexican State of Veracruz. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100957>
- Yount, N.Y., Kupferwasser, D., Spisni, A., Dutz, S.M., Ramjan, Z.H., Sharma, S., Waring, A.J., Yeaman, M.R., 2009. Selective reciprocity in antimicrobial activity versus cytotoxicity of hBD-2 and crotamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 14972–14977. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904465106>

- Yount, N.Y., Yeaman, M.R., 2004. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 7363–7368. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401567101>
- Zancolli, G., Baker, T.G., Barlow, A., Bradley, R.K., Calvete, J.J., Carter, K.C., De Jager, K., Owens, J.B., Price, J.F., Sanz, L., Scholes-Higham, A., Shier, L., Wood, L., Wüster, C.E., Wüster, W., 2016. Is hybridization a source of adaptive venom variation in rattlesnakes? A test, using a *crotalus scutulatus* × *viridis* hybrid zone in Southwestern New Mexico. *Toxins (Basel)*. 8. <https://doi.org/10.3390/toxins8060188>
- Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., Stamatakis, A., 2014. PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics* 30, 614–620. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt593>
- Zúñiga Carrasco, I.R., Caro Lozano, J., 2013. Aspectos clínicos y epidemiológicos de la mordedura de serpientes en México. *Evid. Médica e Investig. en Salud* 6, 125–136.

#### XIV Anexo

**Tabla A1.** Registro de la técnica de extracción de glándula y proceso de recuperación.

Procedimiento		Procedimiento	
<p>Fecha de la cirugía: 21-11-2019</p> <p>El Individuo V18 fue tranquilizado primero con una dosis de Diazepam 2 mg/kg inyectados en la región dorsolateral de la musculatura. Una vez que la serpiente estuvo suficientemente tranquila una segunda inyección de Ketamina 30 mg/kg fue aplicada para así dormir por completo al animal.</p>		<p>La incisión realizada fue cerrada mediante suturas. Tres suturas fueron necesarias para cerrar por completo para cerrar la abertura. Las suturas se disolvieron después de varios días sin la necesidad de removerlos manualmente por un médico veterinario.</p>	

<p>La piel de la región interna de la boca y las escamas supralabiales fue separada realizando una incisión con un escalpelo. Todos los instrumentos quirúrgicos utilizados fueron previamente esterilizados.</p>		<p>Fecha: 24-11-2019 Registro de la recuperación, 3 días después de la cirugía. Se aplicó antiséptico en la incisión y se rehidrató al individuo con solución salina. La serpiente se encontraba todavía bajo los efectos de la anestesia.</p>	
<p>Fecha: 02-01-2020 Registro de la recuperación, 1 mes 12 días después de la cirugía. Para estas fechas el individuo ya había sido alimentado sin registrarse problemas para ingerir la presa.</p>		<p>Fecha: 02-01-2020 Registro de la recuperación, vista lateral del área de la incisión. Para esta fecha no se registra inflamación.</p>	