INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

ESCUELA DE SALUD PÚBLICA

LABORATORIOS DE BIOLÓGICOS Y REACTIVOS DE MÉXICO S.A. de C.V.

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALÚD CON ÁREA DE CONCENTRACIÓN EN VACUNOLOGÍA.

"ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS PROTEOMAS DE LOS VENENOS DE DOS ESPECIES DE SERPIENTES DEL GÉNERO *Crotalus*"

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD CON AREA DE CONCENTRACIÓN EN VACUNOLOGIA PRESENTA:

BIOL. HOMER ALFREDO GAMBOA ROMERO

Director
Dr. Humberto Lanz Mendoza

Asesores
M. en C. Francisco Reta Mares
M. en C. Nelson Jesús Álvarez Anell

CUERNAVACA, MORELOS JULIO 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
SECRETARÍA ACADÉMICA

Dra. Laura Magaña Valladares
Secretaria Académica

Cuernavaca, Morelos, a 5 de junio de 2012.

AE/0675/2012

DRA. GABRIELA ECHANIZ AVILES
COORDINADORA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA SALUD CON ÁREA DE CONCENTRACIÓN
EN VACUNOLOGÍA
P R E S E N T E

Estimada Dra. Echaniz:

En respuesta a la solicitud de **Aprobación de Tesis y Jurado de Examen** de **Homer Alfredo Gamboa Romero,** alumno de la generación 2008-2010, con la tesis **"Análisis comparativo de los proteomas de los venenos de dos especies de serpientes del género Crotalus" ",** me permito informarle que el Colegio de Profesores de Enfermedades Infecciosas en su Sesión Ordinaria del mes de mayo del año en curso, lo aprobó.

Respecto al **Jurado de Examen**, el Colegio aceptó la propuesta presentada, quedando conformado de la siguiente manera:

Presidente: Dra. Julieta Luna Herrera
Secretario: Dr. Humberto Lanz Mendoza
1er. Sinodal: Dra. Victoria Pando Robles
2do. Sinodal: Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete
3er. Sinodal: Dra. Maria Eugenia Jiménez Corona

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

La Mtra. Cynthia Rosas Magallanes, Subd. de Tecnología e Innovación Educativa, firma la presente con fundamento en el Artículo 44 del Estatuto Orgánico del INSP, así como en el escrito SA/0114/2012 de fecha 9 de junio del año en curso, en el cual se le designó como suplente para estas actividades del 12 al 15 de junio del año en curso.

c.c.p. Mtra. Lorena Elizabeth Castillo Castillo.- Jefa del Departamento de Asuntos Escolares
c.c.p. Homer Alfredo Gamboa Romero.- Alumno MCS-VAC
c.c.p. Archivo

ALRS/LECC/MAEC/ars*

Instituto Nacional de Salud Pública
Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas
Subdirección de Prevención y Vigilancia
de Enfermedades Infecciosas
Departamento de Evaluación de Vacunas

Cuernavaca, Mor., a 20 de junio de 2012.

Asunto: Solicitud de fecha de examen de grado.

MAESTRA LORENA E. CASTILLO CASTILLO
JEFA DE ASUNTOS ESCOLARES,
INSP

Estimada M. Castillo:

Por este conducto, solicito a usted programar la fecha para el examen de grado del alumno **HOMER ALFREDO GAMBOA ROMERO** (Matrícula 2008241110) que es el primero que se gradúa del programa de Maestría en Ciencias con Área de Concentración en Vacunología.
La fecha que se solicita es el próximo 2 de julio del presente a las 12:00 hrs en la sede Cuernavaca.
Anexo el formato AE-11 con los votos aprobatorios de su jurado, el formato de no adeudo firmado, un disco con la tesis y la tesis original impresa.

ATENTAMENTE

DRA. GABRIELA ECHANIZ AVILES
JEFE DEL DEPARTAMENTO
DE EVALUACION DE VACUNAS
Y COORDINADORA DEL PROGRAMA
igechaniz@insp.mx

C.c.p.-Dra. Laura Magaña Valladares.- Secretaria Académica del INSP
C.c.p.-Dra. María de Lourdes García García.- Directora Adjunta del CISEI
C.c.p.-Dra. Lizbel León Solís.- Co-coordinadora en BIRMEX
C.c.p.-Biól. Homer Alfredo Gamboa Romero.- Alumno
C.c.p.-Archivo

Avenida Universidad 655
Colonia Santa María Ahuacatitlán
62100 Cuernavaca, Morelos, México
conm: (777) 329 3000

www.insp.mx

A G R A D E C I M I E N T O S

Al Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) y a los Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México S.A. de C.V. (BIRMEX) por las facilidades y apoyo para la realización de este proyecto.

Al Director General de Birmex Dr. Samuel Ponce de León Rosales y a la Dra. Ma. Eugenia Jiménez Corona Directora de Investigación de Birmex, les agradezco por el apoyo y facilidades para que pudiera hacer mi estancia académica en el Instituto Nacional de Salud Pública sede Cuernavaca, Morelos para poder llevar a cabo la parte experimental de esta tesis.

A mi Director de Tesis Dr. Humberto Lanz Mendoza por la oportunidad, apoyo y motivación para la realización de este trabajo.

A mis Asesores M. en C. Francisco Reta Mares y M. en C. Nelson Jesús Álvarez Anell les agradezco las enseñanzas, correcciones y sugerencias que gentilmente realizaron a este trabajo.

A la Dra. Julieta Luna Herrera, Dr. Humberto Lanz Mendoza, Dra. Victoria Pando Robles, Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete y la Dra. María Eugenia Jiménez Corona, miembros del Jurado que evaluó este trabajo, les agradezco las sugerencias y correcciones realizadas a esta tesis, ya que su interés representa una enseñanza muy importante para mi formación académica.

A mi Maestro M. en C. Ángel Tolentino Tello López por su valiosa ayuda, orientación, asesoría teórica y práctica en las técnicas de Electroforésis unidimensional y bidimensional, inmunotransferencia e inmunodetección.

A mi Maestra y Coordinadora de la Maestría en Ciencias de la Salud con Área de Concentración en Vacunología, la Dra. Gabriela Echániz Avilés por compartir sus conocimientos y darme todo su apoyo incondicional y motivación en todo momento para la realización de este trabajo.

Al Gerente de Bioterios de Birmex, MVZ. Alejandro Pérez Grovaz Robles Gil, Biol. Antelmo Arellano Bravo y T. de Lab. Víctor Manuel Alvarado Bazán por el apoyo y facilidades por la obtención de los venenos de serpientes *Crotalus basiliscus y Crotalus atrox,* utilizadas en este trabajo.

Al Dr. Mauricio Rodríguez Álvarez, por la asesoría teórica en electroforesis en doble dimensión (2-D PAGE).

A la Dra. Lizbel Esperanza León Solís, M. en C. Jacqueline Larracilla Camacho y QBP. Alfredo Uscanga Reynel, por su tiempo tan valioso que invirtieron en las sugerencias y correcciones realizadas a este trabajo.

Al Secretario General del Sindicato Único de Trabajadores de Birmex C. Juan Alcibíades López Beltrán, C. Gloria García Hernández, C. Oliva Muñoz González porque siempre estuvieron al pendiente y al tanto para brindarme su apoyo para que se llevara a cabo mi trabajo experimental.

Al Biol. Oscar Andrade Correa del Laboratorio de Investigación del INH, por el apoyo con los materiales para la electroforesis de doble dimensión, y sugerencias en cuanto a esta técnica.

A la QBP. Martha López Castellanos y QBP. Ernesto Gómez Trejo quienes me brindaron todas las facilidades y apoyo para llevar a cabo mi trabajo.

La confianza en uno mismo es el primer peldaño para ascender por la escalera del éxito.

Ralph Waldo Emerson.

En la ciencia como el arte, nunca se tienen todas las respuestas, por lo que siempre hay que estar abierto a todas las preguntas.

Wallace Stevens.

Este trabajo lo dedico a la memoria de mi mamá, María Luisa Romero Tovar quien siempre, con su amor y ejemplo me enseño a seguir adelante.

INDICE GENERAL

CONTENIDO **PÁGINA**

A. INDICE DE CONTENIDO **II**

B. INDICE DE TABLAS **III**

C. FIGURAS **IV y V**

D. ABREVIATURAS **VI**

E. RESUMEN **VII**

A. ÍNDICE DE CONTENIDO

Capítulo	Tema	Página
I	Marco Teórico	1
1.3	Planteamiento del problema	17
1.4	Justificación	18
1.5	Hipótesis	19
1.6	Objetivos	20
II	Material y Métodos	21
III	Resultados	27
IV	Discusión	41
V	Conclusiones	50
VI	Impactos y perspectivas	51
VII	Referencias bibliográficas	52
VIII	Anexos	60

B. INDICE DE TABLAS

Tablas	Tema	Página
Tabla 1	Parámetros controlados de los ejemplares de serpientes de *Crotalus utilizadas* para la obtención del veneno	21
Tabla 2	Comparación de los pesos moleculares (kDa) de las bandas resueltas de proteínas del veneno de cada especie en geles unidimensionales.	39
Tabla 3	Comparación de los pesos moleculares de puntos resueltos en geles bidimensionales.	32
Tabla 4	Comparación de pesos moleculares de bandas resueltas en geles unidimensionales y puntos en geles bidimensionales.	34
Tabla 5	Comparación de bandas de proteínas transferidas e inmunodetectadas por el faboterápico de Birmex.	35
Tabla 6	Comparación entre el número de puntos (spots) electrotransferidos e inmunodetectados de proteínas de los venenos de *Crotalus basiliscus y Crotalus atrox* en geles bidimensionales.	40
Tabla 7	Distribución Geográfica por estado de las serpientes Mexicanas del género *Crotalus*.	60
Tabla 8	Peso molecular de las proteínas del veneno de *Crotalus atrox*.	63

C. INDICE DE FIGURAS

Figura	Tema	Página
Figura 1	Faboterápico polivalente antiviperino de Birmex.	3
Figura 2	Distribución mundial de serpientes venenosas.	4
Figura 3	Cascabel en la punta de cola característico de las serpientes del género *Crotalus.*	5
Figura 4	Distribución de *Crotalus basiliscus* en la República Mexicana.	6
Figura 5	Distribución de *Crotalus atrox* en la República Mexicana.	6
Figura 6	*Crotalus basiliscus* adulto y juvenil.	8
Figura 7	Ejemplar adulto de *Crotalus atrox.*	9
Figura 8	Anatomía de una cabeza de serpiente de cascabel.	10
Figura 9	Colmillos de serpiente del género *Crotalus* mostrando el veneno.	14
Figura 10	Imagen del gel de poliacrilamida unidimensional	28
Figura 11	Imagen del perfil electroforético bidimensional (2-D PAGE) del veneno de *Crotalus basiliscus*	30
Figura 12	Imagen del perfil electroforético bidimensional (2-D PAGE) del veneno de *Crotalus atrox*.	31
Figura 13	Comparación de las imágenes del gel unidimensional con las imágenes de los geles bidimensionales maestros de las dos especies.	33
Figura 14	Imagen de la inmunodetección de bandas por el faboterápico de Birmex	36
Figura 15	Imagen 2-D de puntos de proteínas del veneno de *Crotalus basiliscus* electrotransferidas a papel de nitrocelulosa e inmunodetectadas por el faboterápico de Birmex.	38
Figura 16	Imagen 2-D de puntos de proteínas del veneno de *Crotalus atrox* electrotransferidas a papel de nitrocelulosa e inmunodetectadas por el faboterápico de Birmex.	39
Figura 17	Colocación de la serpiente *Crotalus basiliscus* en la mesa de extracción	67

Figura	Tema	Página
Figura 18	Extracción manual del veneno	67
Figura 19	Obtención del veneno en el embudo de colecta	67
Figura 20	Colectando el veneno con pipeta Pasteur	67
Figura 21	Separación de las tirillas	68
Figura 22	Colocación de las tirillas en los sarcófagos de porcelana	68
Figura 23	Separación de proteínas por Isoelectroenfoque	68
Figura 24	Montando las tirillas y llenando los pozos en el PAGE 2-D	68
Figura 25	Cámara de Electroforésis	68
Figura 26	Imágenes de Geles en 2D PAGE de los venenos de *Crotalus basiliscus* por triplicado	69
Figura 27	Imágenes de los Geles en 2D PAGE de los venenos de *Crotalus atrox* por triplicado	69
Figura 28	Imagen del Gel Maestro bidimensional del veneno de *Crotalus basiliscus*	70
Figura 29	Imagen del Gel Maestro bidimensional del veneno de *Crotalus atrox.*	71
Figura 30	Imágenes de proteínas del veneno de *Crotalus basiliscus* transferidas por la técnica de Western blot	72
Figura 31	Imágenes de proteínas del veneno de *Crotalus atrox* transferidas por la técnica de Western blot	73

D. ABREVIATURAS

CRISP	**Proteínas Secretadas Ricas en Cisteína**
kDa	**Kilodaltons**
LAO	**L- Aminoácido oxidasa**
PAGE	**Electroforesis en gel de poliacrilamida**
PLA_2	**Fosfolipasas A_2**
RPM	**Revoluciones por minuto**
SVMP	**Metaloproteinasas de veneno de serpientes**
SDS	**Duodecil sulfato de sodio**
TEMED	**N,N,N,N'- Tetrametiletilendiamino**
TRIS	**Tris (hidroximetil) aminometano**

E. RESUMEN

Introducción. La caracterización de los componentes del veneno de serpientes del género *Crotalus* es necesaria para el entendimiento de los procesos fisiopatológicos que se producen por su efecto y para evaluar la potencia neutralizante de los antivenenos utilizados, para tratar los efectos de estos envenenamientos. A causa de los pocos datos disponibles sobre la toxicidad del veneno de serpientes con importancia sanitaria en México, el **Objetivo** de este trabajo fue obtener y analizar del patrón de proteínas del veneno de *Crotalus basiliscus y Crotalus atrox*.

Metodología. Los venenos fueron analizados con las técnicas de proteómica: SDS PAGE unidimensional y bidimensional en condiciones reductoras y desnaturalizantes, según el método de Laemmli, con la finalidad de obtener geles maestros de cada especie y comparar las proteínas homólogas y heterólogas entre las dos especies. Se realizó la técnica de Western blot utilizando el Faboterápico antiviperino producido por Birmex S.A. de C.V.

Resultados en geles unidimensionales se mostraron bandas homólogas de 101, 50, 38, 29, 23, 17, 15, 14 y 10 kDa, con diferencias en la magnitud de las bandas. Las diferencias de bandas entre estas especies fueron, bandas con pesos moleculares de 67, 35, 13, 12, y 7 kDa para el veneno de *Crotalus basiliscus,* y bandas de 66, 11 y 9 kDa en el patrón de *Crotalus atrox*. Las diferencias en los geles bidimensionales de *C. atrox* se observaron puntos (spots) de peso molecular de 101 kDa y 9 kDa y en los de *C. basiliscus* se observan puntos de bajo peso molecular 11, 8 y 7 kDa. Con la técnica de Western blot se observó que las proteínas reconocidas en una dimensión por este producto biológico son: bandas de pesos moleculares de 55, 36, 35, 34, 23 y 14 kDa para *C. basiliscus* y en *C. atrox* reconoce bandas de 55, 36, 35,34, 30, 23, 15, 13 y 10 kDa. Para los Western blot de 2-D se reconocieron en *C. basiliscus* por punto isoeléctrico y peso molecular proteínas de 50, 34, 29, 23, 20, 16 y 15 kDa y en *C. atrox* 50, 38, 25, 23, 22, 17 y 16 kDa, los puntos de proteínas diferentes son de 34, 29, 20 y 15 kDa en *C. basiliscus* y de 38, 25, 22 y 17 kDa en *C. atrox.*

Conclusiones. Se logró obtener patrones proteicos maestros unidimensionales y bidimensionales de cada especie y se estableció un primer acercamiento para la identificación de las proteínas que reconoce el antiveneno de Birmex así como la estrategia para determinar las proteínas comunes y diferenciales entre las dos especies de *Crotalus.*

I. Marco Teórico

1.1.1 Historia de los antivenenos en México.

Las experiencias en la producción de sueros hiperinmunes contra venenos de ofidios, en el Instituto (Seroterápico) Butantan de São Paulo, Brasil, motivaron a Carlos de la Peña e Isauro Venzor, en la Ciudad de Durango, México a iniciar en 1926 estudios para elaborar un suero hiperinmune contra el veneno del alacrán *(Centruroides sufusus sufusus).* Con este fin inmunizaron a un caballo administrándole dosis crecientes de veneno, en un periodo de tres meses; empezando con el contenido de veneno en 0.6 de telson (glándula) hasta llegar a administrarle el contenido de veneno de 350 telsones. Posteriormente sangraron el caballo, obtuvieron el suero y determinaron su potencia neutralizante mediante titulación para usarlo en personas picadas por alacrán (Monroy, 1961).
Después de dar a conocer los resultados obtenidos a las autoridades de salud de México, estas le autorizaron producir un suero polivalente (con antivenenos para las especies más peligrosas) que pudiera estar disponible en los servicios de salud, lo que fue posible a partir de 1930.

Una vez que se reconoció el papel de las inmunoglobulinas en la inactivación de los venenos, se empezó a usar gammaglobulina hiperinmune. Aún así, había efectos adversos por las proteínas del suero heterólogo, por lo que se desarrolló la segunda generación de sueros con globulinas purificadas, obtenidas del suero de equinos inmunizados. De esta manera se redujeron significativamente los efectos secundarios. Sin embargo esta generación de sueros aún causaba manifestaciones indeseables en algunos casos. Por ello, fue necesario someter las inmunoglobulinas a un proceso de digestión enzimática y separar la fracción Fc, de tal manera que éstos contienen únicamente las fracciones variables de Fab o $F(ab´)_2$, por lo que en 1977 el Dr. Alejandro Alagón sugirió llamarlos faboterápicos (Vega, 2007).

Desde entonces los faboterápicos son los antiveneno más utilizados, entre sus bondades se encuentran mínimos efectos secundarios, puede ser usado en mujeres embarazadas, no necesita refrigeración (Chávez, 2007).

1.1.2 Tratamiento contra mordeduras de serpientes.

Las mordeduras de serpientes venenosas pueden constituir emergencias médicas, debido a que ocasionan parálisis grave de los músculos respiratorios, trastornos hemorrágicos potencialmente mortales, insuficiencia renal irreversible o grave destrucción local de los tejidos que requiera amputación o cause otras discapacidades permanentes. Los efectos suelen ser más graves en los niños que en los adultos, debido a que tienen menos masa corporal (Smalligan *et al*., 2004 y Solano *et al.*, 2010).

El único tratamiento contra el envenenamiento por mordedura de serpiente está basado en la administración de antivenenos. Las terapias validadas científicamente para confrontar el envenenamiento por mordida de serpiente están basadas en la administración parenteral de antivenenos. Como ya se mencionó antes las substancias activas como antivenenos de serpientes son las inmunoglobulinas completas, fragmentos de inmunoglobulinas $F(ab´)_2$ o fragmentos de inmunoglobulinas Fab, las cuales tienen la propiedad para unirse a las toxinas del veneno y neutralizar sus efectos tóxicos. Estas substancias activas, son purificadas del plasma de caballos inmunizados con veneno de serpiente (Kasturiratne *et al.*, 2008; Red Internacional de Centros de Referencia para el control y Tratamiento de Intoxicaciones por Animales Ponzoñosos).

Los sueros antiviperinos o antiponzoñosos figuran en la lista de la OMS de Medicamentos Esenciales y deben formar parte del complemento terapéutico de todo centro de atención primaria en lugares donde haya serpientes venenosas (World Healt Organization, 2010).

1.1.3 Producción del Faboterápico antiviperino.

El proceso básico de producción consiste en la obtención de plasma de caballos sanos hiperinmunizados con el veneno de serpientes de *Crotalus basiliscus* y el veneno de *Bothrops asper* a partir de pequeñas dosis inmunizantes (Ferreira *et al.*, 1992; Saravia *et al.*, 2002). El plasma hiperinmune obtenido contiene una gran cantidad de anticuerpos dirigidos al veneno específico, más otras proteínas propias del plasma. Estos anticuerpos específicos son tratados con un proceso que se fundamenta en el fraccionamiento de estos anticuerpos por digestión enzimática con pepsina, generando las fracciones $F(ab)_2$ las que son responsables de neutralizar la actividad tóxica de los venenos. Posteriormente se elimina por precipitación, la fracción cristalizable (Fc) responsable de las reacciones adversas o indeseables, lo cual nos permite contar con un producto eficaz y seguro (Figura 1).

En el año 2004 el registro sanitario de sueros hiperinmunes fue sustituido por el de faboterápicos, los cuales se identifican dentro del Cuadro Básico y Catálogo de Medicamentos del Sector Salud (Birmex, 2009).

Fig. 1. Faboterápico Polivalente Antiviperino Birmex, S.A de C.V. Imagen tomada de www.**birmex**.gob.mx

1.2 Introducción

1.2.1 Distribución de serpientes venenosas en el mundo.

En el Mundo existen aproximadamente 3,000 especies de serpientes, de las cuales 532 son venenosas y se clasifican de la siguiente forma: 180 elápidos, 52 hidrófidos, 180 vipéridos y 120 crotálidos (Figura 2). Las serpientes que pertenecen a la familia Viperidae, subfamilia *Crotalinae*, se encuentran distribuidas en Asia y en América. Actualmente se reconocen 208 especies de serpientes agrupadas en 28 géneros (Tay-Zavala *et al.*, 2002; Saravia *et al.*, 2002). Estas serpientes se distinguen por la presencia de una foseta con células sensibles al calor. Este órgano se encuentra localizado en una hendidura de la mandíbula superior entre los ojos y el nostrilio (aberturas nasales). Este receptor de luz infraroja es usado para rastrear la distancia y dirección de sus presas de sangre caliente (Bakken y Krochmal, 2007).

Distribución Mundial de Serpientes Venenosas

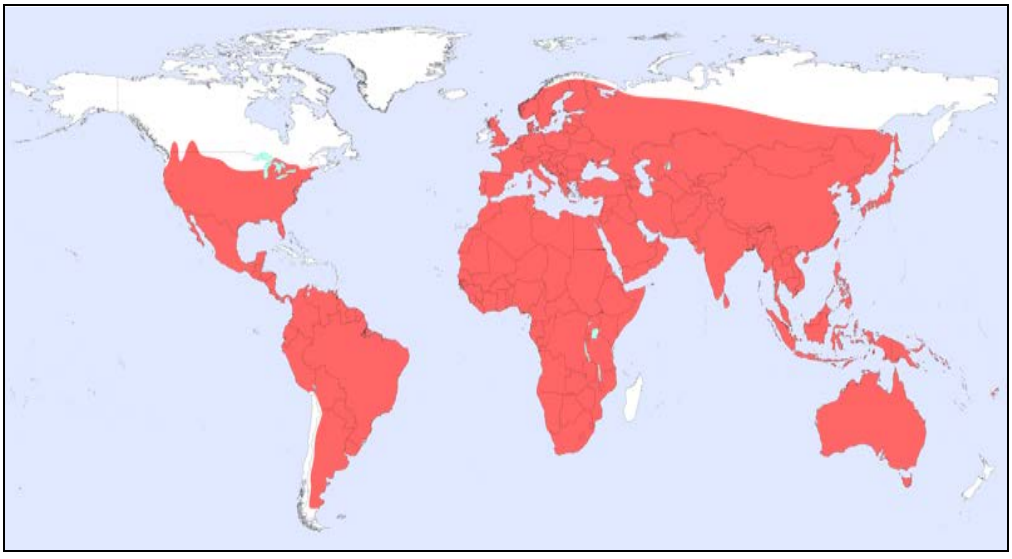


Fig. 2. Las zonas en rojo, marcan la distribución de serpientes venenosa en el mundo (WHO, 2010)

Crotalus es un género de serpientes venenosas del continente americano, se encuentran desde el sudeste de Canadá hasta el norte de Argentina. El nombre

del género proviene del griego (krotalon), que significa “castañuelas” y se refiere al cascabel en la punta de la cola (Figura 3), que hace a este grupo distintivo. Todas las especies son fácilmente reconocibles por el característico cascabel en la punta de la cola (Campbell y Lamar, 2004).

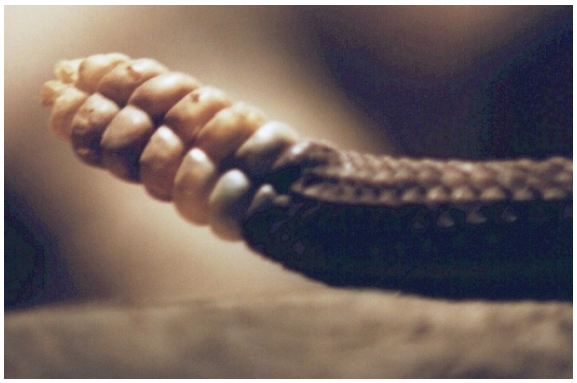


Fig 3. El cascabel en la punta de la cola característico de las serpientes del género *Crotalus*.
Imagen tomada de www.google.com.mx/image?Figuras+serpientes+de+cascabel.

1.2.2 Distribución de especies de serpientes mexicanas del género *Crotalus*

Las serpientes del género *Crotalus* son conocidas popularmente como víboras de cascabel, en el Anexo 13.1, Tabla 7 se muestran las 27 especies identificadas en la República Mexicana y su distribución por estado (Flores-Villela y Goyenechea, 2004).

Las especies de interés en este estudio tienen la siguiente distribución geográfica: *Crotalus basiliscus* se encuentra en 20 estados de la República Mexicana: Baja California Norte, Baja California Sur, Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Durango, Nayarit, Jalisco, Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Queretaro, Michoacan, Estado de México, Tlaxcala, Puebla, Colima, Guerrero, Oaxaca, Chiapas (Figura 4). Mientras que *Crotalus atrox* se encuentra en 11 estados del país: Baja California Norte, Baja California Sur, Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Durango, Nayarit, Jalisco, Zacatecas, Coahuila, Nuevo león, esta especie se encuentra también en algunos estados de Norteamérica, en el Centro y Oeste de Texas, el Sur de Nuevo México, Arizona, y por el Sur de California (Figura 5).

Las dos especies comparten su distribución geográfica en 9 estados del país.

Crotalus basiliscus

Fig. 4. Las zonas en azul indican la distribución de *Crotalus basiliscus,* en la República Mexicana

Crotalus atrox

Fig. 5. Las zonas en rojo indican la distribución de *Crotalus atrox,* en la República Mexicana. Esta especie también se localiza en el sur de los Estados Unidos de Norteamérica

1.2.3 Descripción de las serpientes de interés en este estudio.

1.2.3.1 *Crotalus basiliscus.*

*S*u nombre común es *C*ascabel del Pacífico. El termino *basiliskos* proviene del griego y significa “rey”. Son serpientes de gran tamaño, la talla promedio es entre 150 y 205 cm, es una de las especies más grandes de las serpientes de cascabel. Su Clasificación Taxonómica según Cope, 1864 es la siguiente:

Reino:	Animalia
Phylum:	Chordata
Subphylum:	Vertebrata
Clase:	Reptilia
Orden:	Squamata
Familia:	Viperidae
Subfamilia:	Crotalinae
Género:	*Crotalus*
Especie:	*basiliscus*

La coloración en adultos es amarillenta con tonalidades verdoso, mientras que los juveniles son de color café rojizo (Figura 6). La cabeza triangular se distingue fácilmente del cuerpo, tiene un par de líneas claras por delante de los ojos y hasta el ángulo de la boca. Posee manchas dorsales grandes en forma de diamante formadas por una hilera de escamas oscuras bordeadas por una hilera de escamas blancas. La parte final del cuerpo y la cola es muy oscura. El cascabel generalmente es muy largo, compuesto de una serie de hasta catorce segmentos huecos engarzados entre sí que produce un sonido característico, cuando el ejemplar se siente amenazado. Cada segmento corresponde a una muda, por lo que el animal adquiere dos o tres segmentos por año. La parte ventral de esta serpiente es blanca o de color crema, así como la parte inferior de la mandíbula. Habita en la selva baja y media caducifolia, así como en bosques de pino y encino, desde el nivel del mar hasta los 1800 metros. Es de hábitos diurnos y crepusculares, se le encuentra con mayor frecuencia en la temporada seca. Se alimenta de pequeños mamíferos, aves y lagartijas.

La madurez sexual en ambos sexos puede ocurrir desde los dos años de edad, en esta etapa las hembras llegan a medir 97 cm, pero se considera que la mayoría de los individuos en estado silvestre no alcanza la madurez sino hasta su tercer año de vida, son ovovivíparos. La cópula ocurre generalmente al final del verano, el tamaño de la camada varía entre 14 y 60 crías, dependiendo de la edad y tamaño de la madre. Llegan a vivir veinte años en promedio. Se cree que el veneno no es muy tóxico comparado con el de otras especies de serpientes pero puede llegar a ser mortal por la gran cantidad de veneno que inyecta (Klauber 1997).

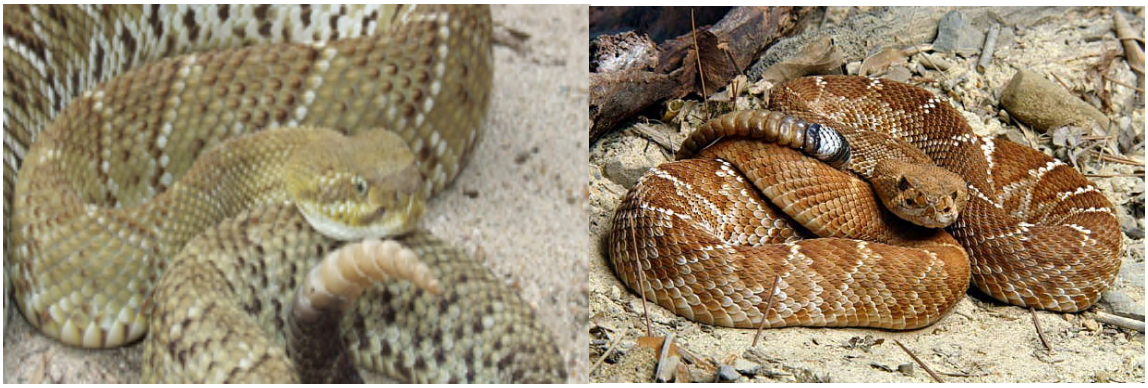


Fig. 6. *Crotalus basiliscus* Adulto foto del lado izquierdo Juvenil foto del lado derecho.
Tomadas de Red Internacional de Centros de Referencia para el control y Tratamiento de intoxicaciones por animales ponzoñosos, 2011.

1.2.3.2 *Crotalus atrox*

La serpiente de cascabel *Crotalus atrox* (Figura 7) vive en el sur de los Estados Unidos y Norte de México es una de las serpientes más peligrosas de los dos países. Es conocida por su nombre común como víbora de cascabel ya que su cuerpo termina en un cascabel formado por segmentos que se van añadiendo en cada muda. Los ejemplares jóvenes no poseen cascabel. Es un depredador altamente especializado hablando evolutivamente. Cuando son adultos tienen una longitud de más de 2 metros, lo que la convierte en uno de las serpientes más grandes del continente americano con un peso corporal promedio de 7 kg. Para llegar a la madurez sexual las serpientes jóvenes tardan de 3 o 4 años, para llevar a cabo la reproducción.

Su clasificación Taxonómica según Baird y Girard, 1853 es la siguiente:

Reino:	Animalia
Phylum:	Chordata
Subphylum:	Vertebrata
Clase:	Sauropsida
Orden:	Squamata
Familia:	Viperidae
Subfamilia:	Crotalinae
Género:	*Crotalus*
Especie:	*atrox*

Estas serpientes son ovovivíparas, vive en terrenos áridos como desiertos y praderas. Es un cazador nocturno, se alimenta de aves, lagartos y de pequeños mamíferos. Es pacífica pero cuando se siente amenazada advierte con el sonido de su cascabel y si se le provoca puede morder e inyectar veneno extremadamente tóxico que puede matar animales mucho mayores que ella y a humanos por lo que es la causa de muchas muertes al año en México y en el sur de los Estados Unidos de Norteamérica (Klauber, 1997; Cambell y Lamar, 2004).

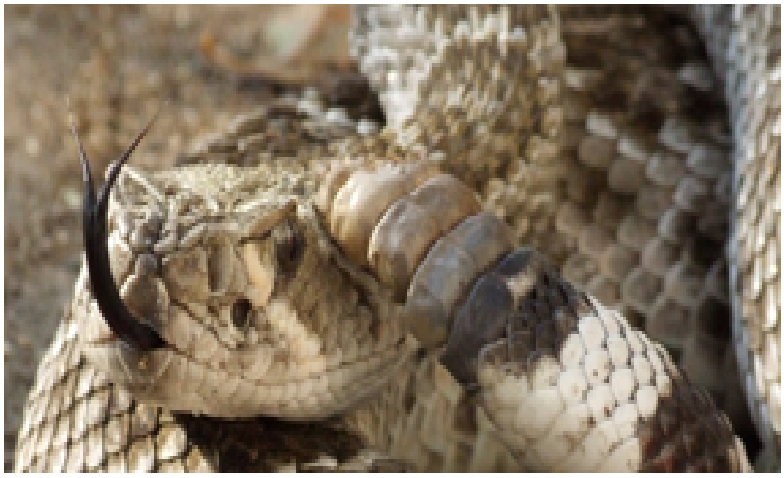


Fig. 7. Ejemplar adulto de *Crotalus atrox.*
Tomada de Red Internacional de Centros de Referencia para el control y Tratamiento de intoxicaciones por animales ponzoñosos, 2011.

1.2.4 Ubicación de la glándula de veneno de una serpiente de cascabel

Las serpientes de cascabel tienen unas glándulas productoras de veneno situadas en la cabeza, cerca de los ojos, las cuales se comunican con los canales internos de los colmillos (Figura 8). Estas vierten determinada dosis de veneno al momento de su mordedura. Al parecer es una glándula digestiva modificada y suele tener gran tamaño en relación con los colmillos. Esta es accionada por los músculos que actúan durante el proceso de la mordedura. Las serpientes de cascabel presentan colmillos de repuesto.

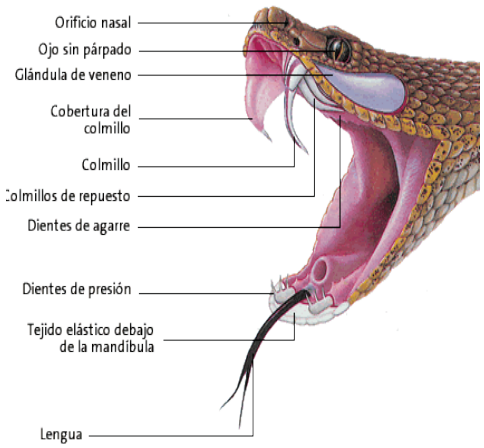


Fig. 8. Anatomía de una cabeza de Serpiente de Cascabel, en la cual se muestra la ubicación de la glándula de veneno y su conexión a los colmillos.
Tomada de: www.google.com.mx/image?q=Figuras+cabeza+de+serpiente+de+cascabel.

Entre mayor es el tamaño de las serpientes del género *Crotalus* mayor será la cantidad de veneno (Figura 9). Una serpiente puede producir de 175 a 600 mg de veneno en promedio (Klauber, 1997).

1.2.5 Composición proteíca del veneno de serpientes de la familia *Viperidae*

La Proteómica es una rama de la bioquímica que estudia, la composición proteica de cualquier muestra biológica lo que permite la identificación de las proteínas, el conocimiento de su estructura primaria, las modificaciones postraduccionales, su localización y la cuantificación de su expresión (proteómica cuantitativa) (Pando-Robles y Lanz-Mendoza, 2009).

El proteoma de venenos de serpientes revela la existencia de mezclas complejas constituidas por un número diverso de proteínas. Desde los primeros estudios bioquímicos en venenos se aislaron y caracterizaron biológicamente las proteínas y péptidos. El campo de la proteómica de venenos de serpientes ha contribuido a la investigación con el reciente desarrollo en espectrometría de masas para la identificación de proteínas, acopladas con los transcriptomas de las glándulas de veneno (Juárez *et al*., 2004; Alape-Giron *et al.*, 2008). Este desarrollo tiene la ventaja de poder deducir la composición de la proteína de los venenos y subsecuentemente su actividad patológica. Si bien no se han alcanzado las últimas metas de caracterización y cuantificación de todas las proteínas, por los trabajos realizados hasta el momento se puede afirmar que cada proteína es única en un proteoma de venenos. Las tecnologías actuales han abierto muchas posibilidades para un estudio proteómico amplio que tiene que ir más allá de una simple identificación de proteínas para varios aspectos funcionales (Juárez *et al.*, 2006; Cortelazzo *et al.*, 2010).

Las familias de proteínas presentes en los venenos de serpientes de la familia Viperidae, incluyen enzimas tales como las Metaloproteínasas dependientes de Zn^{2+}, Fosfolipasas A_2 de tipo I y tipo II, Serin-proteasas, L-amino acido oxidasa y proteínas sin actividad enzimática como Péptidos Natriuréticos, Disintegrinas, Inhibidores de proteasas tipo Kunitz, Cistatina, Lectinas específicas de galactosa, lectinas tipo C, factores de crecimiento vascular, CRISP (Proteinas Secretadas Ricas en Cisteina). Sin embargo, el perfil proteico y la abundancia relativa de los diferentes grupos de proteínas varían ampliamente de especie a especie (Li *et al.*, 1994; Bazaa *et al.*, 2005).

Es importante resaltar que hay una gran variedad de isoformas de cada familia proteica presentes en todos los venenos analizados. Ello contribuye a la complejidad en composición proteica y a la gran diversidad de los efectos biológicos de los venenos. La presencia de numerosas isoformas de una proteína evidencia la ocurrencia de duplicaciones génicas, y la gran diversidad estructural y

funcional en el seno de cada familia multigénica, indica la acción de una evolución acelerada de las toxinas (Kordis *et al.*, 2002; Ohno *et al.*, 2003).

1.2.6 Composición del veneno de serpientes del género *Crotalus.*

Se han reportado diferencias cuantitativas y cualitativas intraespecíficas, en su composición debido a la edad de las serpientes y al origen geográfico. La toxicidad del veneno decrece con la edad en estas especies (Reid y Theakston, 1978; Glen y Straight, 1982; Chippaux *et al.*, 1991). El conocimiento del perfil de las toxinas da una explicación completa de la citotoxicidad, miotoxicidad, hemotoxicidad y efectos hemorrágicos causados por el veneno (R. de Roodt *et al.*, 2004).

El veneno de *Crotalus atrox*, es un cóctel mortal, ya que es una compleja mezcla de péptidos y proteínas. Hay dos principales familias de proteínas que se encuentran presentes en el veneno de estas especies son: las Metaloproteínasas de Venenos de Serpientes (SVMP) y las Serin-Proteinasas que representan el 69.5% del total de las proteínas del veneno. También se encuentran cuatro familias de proteínas de abundancia media, como las Disintegrinas, Fosfolipasas A_2, Proteínas Secretadas Ricas en Cisteína (CRISP) y L-amino-ácido oxidasa que representan el 25.8% del total de las proteínas del veneno y tres familias de proteínas de menor abundancia, como Péptidos vaso activos, Inhibidores endógenos de SVMP, Lectina tipo C que representan el 4.7% del total de las proteínas del veneno (Calvete *et al.*, 2009).

En relación al papel de las L-amino-oxidasas en el envenenamiento, se sugiere que el papel primario es promover indirectamente la hipotensión a través de la liberación de H_2O_2, lo que activaría a la enzima guanilato ciclasa para producir guanidin monofosfato cíclico (cGMP), provocando que las células cardiacas disminuyan su contracción, paralizando a la presa.
Sakurai *et al*, 2003 presentaron resultados interesantes con la L-amino-oxidasa aislada del veneno de *Agkistrodon halys blomhoffii*, donde la enzima actúa como un anticoagulante inhibiendo selectivamente al factor IX de la cascada de

coagulación. Por otro lado se mencionan amplios efectos biológicos y farmacológicos para esta enzima, entre ellos, edema (Tan y Choy, 1994) , inhibición de la agregación plaquetaria (Li *et al*., 1994) , hemólisis (Abe *et al.*, 1998) , citotoxicidad (Souza *et al.*, 1999), inducción de apoptosis, (Torii *et al.*, 2000), hemorragia (Sakurai *et al.*, 2003),.

La familia de proteínas CRISP de sus siglas en inglés (proteínas secretadas ricas en cisteína), son proteínas ampliamente distribuidas en los venenos de serpientes de las familias *Viperidae* y *Elapidae* de diferentes continentes. Se sabe que altera la función de diversos canales de Ca^{2}+ y K+, sugiriendo que las CRISPs pueden representar una familia de toxinas que afectan a la contracción muscular (Remuzgo et al., 2000; Yamazaki *et al.*, 2003).

No es de extrañar que se hayan descrito multitud de actividades biológicas asociadas a miembros de la misma familia proteica. Así, diferentes isoformas de las Fosfolipasas A_2 provocan hemólisis, miotoxicidad, neurotoxicidad, cardiotoxicidad, edemas y actividad anticoagulante. La citotoxicidad y miotoxicidad (necrosis en el área de la mordedura de una serpiente) es debida a una isoforma que por peso molecular e identificación por espectrometría de masas corresponde a la crotalina de serpiente perteneciente a la familia de las Fosfolipasas A_2 (Ohno *et al.*, 2003; Gutiérrez y Ownby, 2003; Lomonte *et al.*, 2003; Kini, 2006).

Las Metaloproteínasas de Veneno de serpiente (SVMP) dependientes de Zn^{2+}, también denominadas hemorraginas, son las toxinas más abundantes de los venenos de serpientes de cascabel. Son endoproteasas que degradan proteínas de la matriz extracelular produciendo hemorragia local, inflamación y a menudo, necrosis (Fox y Serrano, 2005). Esta familia de proteínas inhibe la formación de fibrina y la formación del coágulo (Gutiérrez *et al.*, 2005).

Las Lectinas tipo C, presentan diversidad de estructuras cuaternarias (Hayashi, 2005) y actividades biológicas evitando la agregación de plaquetas, utilizando para ello diversos mecanismos (Clemetson y Clemetson, 2005).

Las Serin-proteinasas de venenos de serpientes interfieren con los mecanismos fisiológicos de coagulación, agregación plaquetaria, fibrinolisis y el sistema del complemento (Kini, 2006).

Fig. 9. Colmillos de serpientes del género *Crotalus* mostrando el veneno.
Imagen tomada de www.google.com.mx/image?Figuras+serpientes+de+cascabel.

1.2.7 Manifestaciones Clínicas por el envenenamiento provocado por mordeduras de serpientes del género *Crotalus*.

El veneno de las serpientes representa un rasgo adaptativo que permitió a las serpientes una transición desde una forma mecánica (constricción) a una química (veneno) como medio para matar y digerir a sus presas (Fry *et al.*, 2006). Se estima que la dosis letal en humanos es de 100 mg. Después de la mordedura de una serpiente del género *Crotalus*, el siguiente síntoma es un fuerte dolor en el sitio del envenenamiento y eventualmente se va diseminando el dolor en todas direcciones. Se presenta una hinchazón y edema, disminución en la velocidad del pulso y presión sanguínea, nauseas y vómito (Gómez y Dart, 1995).

Las moléculas farmacológicamente activas, poseen efectos biológicos, complejos debido a los distintos componentes que pueden actuar individual o sinergéticamente. Atendiendo a su acción biológica primaria pueden clasificarse en neuro-miotóxicos o hemorrágicos-citotóxicos (Juárez *et al.*, 2004). Los venenos de los vipéridos (subfamilias *Viperinae* y *Crotalinae*) poseen un conjunto de

proteínas capaces de degradar la matríz extracelular e interferir con la cascada de coagulación, el sistema hemostático y la reparación de tejidos (Fox y Serrano, 2005. Kini, 2006). Las manifestaciones clínicas del envenenamiento por vipéridos y crotálidos pueden ser locales o sistémicos (Gutiérrez *et al.*, 2005. White, 2005). Los efectos locales se presentan minutos después de la inyección del veneno e incluyen con frecuencia dolor, edema, equimosis y hemorragia local. Tales signos son seguidos en muchos casos por necrosis del área que rodea al sitio de la mordedura. Entre los efectos de tipo sistémico se incluyen alteraciones en la coagulación sanguínea y episodios hemorrágicos distantes del sitio de la mordedura. Además, muchos venenos contienen toxinas que afectan al sistema cardiovascular, habiéndose caracterizado factores de crecimiento endotelial que alteran la permeabilidad vascular (Suto *et al.*, 2005) y péptidos que inhiben a la enzima convertidora de la angiotensina I en angiotensina II, potenciando las acciones biológicas de la bradiquinina. La consecuencia es una disminución inmediata y severa de la presión sanguínea (Hayashi y Camargo, 2005).

1.2. 8 Aspectos epidemiológicos de la mordedura de serpientes en México.

Las serpientes venenosas pueden producir envenenamientos accidentales en humanos. El envenenamiento por mordedura de serpiente es un problema importante de salud pública en muchas regiones del mundo (Kastruriratne *et al.*, 2008). En México de acuerdo con la información proporcionada por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, la incidencia de mordeduras de serpientes hasta la semana número 52 del año 2011, registró un total acumulado de 3949 mordeduras de serpiente en todo el territorio nacional. Las regiones con mayor riesgo se encuentran en los estados de Chiapas, Hidalgo, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí y Veracruz. (Vigilancia Epidemiológica, 2011).

Las personas más afectadas son de zonas rurales ya que el 54% realiza actividades de campo, 22% son estudiantes, el 17% se dedican a actividades del hogar y el 7% restante realiza otras actividades.

La distribución de las mordeduras por región anatómica es de 72% para los pies y tobillos, 14% a los muslos, 13% a manos y 1% en la cabeza.

Respecto al tipo de serpiente, el 44.9% de las personas fueron mordidas por Serpientes de Cascabel (*Crotalus*), 42.8% por Nauyacas (*Bothrops*), 12.3% por coralillos (*Macruroides)* (Vigilancia Epidemiológica, 2011).

1.3. Planteamiento del problema

Crotalus atrox es una de las especies más agresivas de las serpientes de cascabel y es la que presenta el mayor número de mordeduras en México y los Estados Unidos de Norteamérica (Cambell y Lamar, 2004). Aunque se ha demostrado la eficacia clínica del faboterápico de Birmex, preparado con el veneno de *Crotalus basiliscus y Bothrops asper,* hay pocos estudios en México que demuestran el patrón proteico de las especies de *Crotalus* y el reconocimiento específico del faboterápico a las diferentes proteínas por reacción cruzada contra los venenos de las diferentes especies de serpientes, y en particular contra *Crotalus atrox*.

1.4. Justificación

Desde hace más de 30 años Birmex ha producido un suero antiviperino de origen equino, a partir de una mezcla de venenos de serpientes de los géneros *Crotalus* y *Bothrops*, el cual ha demostrado ser eficaz contra el veneno de diferentes especies de dichos géneros. Sin embargo hasta la fecha se desconoce el espectro específico del reconocimiento antigénico de este faboterápico.

Con este trabajo se pretende dar una evidencia de los componentes proteicos tanto homólogos como diferenciales del veneno de serpientes de *Crotalus basiliscus y Crotalus atrox*, mediante patrones electroforéticos. Por otro lado existe la necesidad de obtener evidencias de las reacciones cruzadas entre ambas especies.

1.5. Hipótesis

Hipótesis nula

El veneno de *Crotalus basiliscus* y *Crotalus atrox* presentan un perfil electroforético semejante.

Hipótesis alternativa

El veneno de *Crotalus basiliscus* y *Crotalus atrox* presentan un perfil electroforético diferente.

1.6. Objetivos

1.6.1 Objetivo general

Realizar el análisis del patrón de proteínas del veneno de *Crotalus basiliscus* y de *Crotalus atrox*.

1.6.2 Objetivos específicos

1.6.2.1. Determinar los perfiles proteicos de los venenos de *Crotalus basiliscus* y de *Crotalus atrox* empleando electroforesis unidimensional y bidimensional en condiciones reductoras, desnaturalizantes.

1.6.2.2. Realizar un análisis comparativo de las proteínas de los venenos de *Crotalus basiliscus* y de *Crotalus atrox,* que son reconocidas por el faboterápico que produce Birmex.

II. Material y Métodos

El veneno utilizado fue obtenido de *Crotalus basiliscus* y *Crotalus atrox,* mantenidas en cautiverio en el herpetario del Instituto Nacional de Higiene de los Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México S.A de CV (Birmex). Los ejemplares usados, cuenta con su número de identificación asignada por el personal del herpetario. Para evitar la variabilidad de los ensayos por parámetros no controlados, se determinó que las serpientes tuvieran las condiciones y la edad lo más parecido posible como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros controlados de los ejemplares de serpientes de *Crotalus* utilizadas para la obtención de veneno.

Parámetros	*Crotalus basiliscus*	*Crotalus atrox*
Número de identificación	088	022
Edad	15 años de cautiverio	15 años de cautiverio
Sexo de los ejemplares	Hembra	Hembra
Longitud total	1.80 m	1.50 m
Alimentación	1 a 2 ratas (250g)	1 a 2 ratas (250g)
Periodo de alimentación	Cada 15 días	Cada 15 días
Lugar de nacimiento	Cautiverio	Cautiverio
Lugar de Procedencia	Sinaloa	Sinaloa
Estado de Salud al momento de la extracción del veneno	Sanas	Sanas

2.7.1 Obtención de muestras de veneno.

Los venenos fueron obtenidos manualmente por el personal del herpetario, siguiendo los métodos usuales de acuerdo a los protocolos de Normas y Bioseguridad de Birmex (Anexo 13.5.1, Figuras 17, 18, 19 y 20).
Una vez obtenido el veneno de cada especie, éstos fueron centrifugados a 13,000 rpm durante 10 minutos para separar material insoluble. Posteriormente se tomó el sobrenadante y se almacenó en alícuotas de 20µl a menos 70ºC para su conservación. Este material fue trasladado para su análisis al Instituto Nacional de Salud Pública en Cuernavaca, Morelos.

2.7.2 Determinación de Proteínas.

Los venenos se diluyeron 1:100 con agua destilada y la concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry *et al.,* 1951.
Se prepararon soluciones de trabajo: Solución A (0.5 g $CUSO_4$, 1.0 g Tartrato sódico-potásico y llevar a un volumen de 100 ml con agua destilada) Solución B (20 g de Na_2CO_3, 4g de NaOH, aforar a 1 L con agua destilada) Solución C se prepara a partir de las soluciones A y B (1 ml de la Solución A y 50 ml de la solución B). Solución D (10 ml de folin más 10 ml de agua destilada).
Para determinar la concentración de proteínas de la muestra problema se llevó a cabo una curva patrón a partir de una solución patrón de albumina de suero bovino (BSA) 1mg/ml. Se numeraron del 1 al 11 tubos de ensayo de 10 ml, la concentración de BSA en cada tubo fue la siguiente 5,10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µg de BSA, para el blanco se utilizó agua destilada. De cada concentración se tomo 500 µl y se colocó en otro tubo previamente rotulado (se hizo esto por triplicado de cada concentración), enseguida se agregó 2500 µl de solución C y se agitó vigorosamente cada tubo. Se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 minutos y enseguida se agregó 250 µl de Solución D y se agitó vigorosamente, se dejaron reposar los tubos durante 30 minutos en ausencia de luz. Transcurrido este tiempo se hizo las lecturas de las absorvancias en un espectofotómetro a una longitud de 750 nm. Se obtuvieron los valores promedio

de las absorvancias y se graficó esta contra la concentración de cada tubo. La concentración de las muestras problemas (Venenos) se determinaron por la interpolación de los valores de absorvancia en la curva patrón (Anexo 13.2, Gráfica 1).

2.7.3 Preparación de los venenos para las pruebas de electroforesis.

Una vez que se determinó la concentración de proteína del veneno, de cada especie, se hicieron alícuotas de cada muestra de veneno con un contenido de proteínas totales de entre 15 y 25 µg cada una y se solubilizaron agregándoles 10 µL de amortiguador de solubilización (Tris 0.5 M pH 6.8, SDS al 10%, 2-Mercaptoetanol, Glicerol, Azul de Bromofenol), las muestras se calentaron en baño maría a ebullición durante 5 minutos.

2.7.4 Electroforesis unidimensional, desnaturalizante y reductora en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

De forma preliminar y con el fin de obtener información básica de las muestras de veneno, tal como el perfil general de cada una de ellas y su resolución en el sistema, las muestras de veneno se separaron en geles unidimensionales por el método de Laemmli (1970), usando geles separadores de poliacrilamida al 13% con geles concentradores al 3%. El corrimiento se realizó a un voltaje constante de 150 V a temperatura ambiental. Al finalizar éste, se extrajeron los geles y se enjuagaron en agua destilada durante una hora y se tiñeron con azul brillante de Coomassie.

2.7.4.1 Cálculo de los pesos moleculares de cada banda.

Se determinó el número y su localización de bandas de proteína de cada carril, para posteriormente calcular el peso molecular aproximado. Para ello se interpolaron sus movilidades relativas (Rf) en una curva previamente elaborada para los estándares, en la que se graficaron los valores Rf de cada uno de ellos en contra de sus pesos moleculares conocidos en donde:

$$Rf = \frac{\text{Distancia (cm) entre la parte superior del gel y la banda}}{\text{Distancia (cm) de la parte superior del gel al frente de azul de bromofenol.}}$$

2.7.5 Electroforesis bidimensional (2-D PAGE).

Para obtener más información sobre los venenos de serpiente, se utilizó la electroforesis bidimensional (Anexo 13.5.2, Figuras 21, 22, 23, 24, 25) que consiste en la separación de las proteínas por su carga o punto isoeléctrico (pI) por la técnica de Isoelectroenfoque y posteriormente se llevó a cabo la separación por su tamaño o peso molecular en SDS-PAGE (O´Fárrel, 1975; Anderson y Anderson, 1998; Berth et al., 2007).

2.7.5.1 Primera dimensión: Isoelectroenfoque.

Para la preparación de la muestra biológica se tomaron 11 µl del veneno de *Crotalus basiliscus* diluido 1:10 y se mezclaron con 239 µl de Amortiguador de Rehidratación (Urea, 1.2 g; CHAPS, 50 mg; IpG, 12.5 µl; DTT 15.4 mg; Agua destilada, 2.5 ml; Azul de bromofenol; 6 µl), llevándolo a un volumen final de 250 µl. Este volumen se colocó a lo largo de un sarcófago de porcelana de 13 cm. Se realizó lo mismo para el veneno de *Crotalus atrox.*

Se utilizaron tiras IPG de 13 cm de largo con un rango de pH de 3 a 10 lineal. Las tiras se colocaron con la parte del gel hacia el amortiguador de rehidratación, previamente puesto en el sarcófago. Se cubrió con aceite mineral y se coloco la tapa de del sarcófago, enseguida fueron colocados en un equipo IpGphor durante 20 horas. El isoelectroenfoque (IEF) se llevó a cabo en un equipo IPGphor usando voltaje lineal en condiciones 3877 V, 49 µA con un total de 5766 V/h.

2.7.5.2 Segunda dimensión.

Las tiras IPGs fueron equilibradas en una solución de equilibrio (Urea 72.1g, SDS 4g, Glicerol 69 ml, Tris 10 ml (pH 8) adicionada con DTT (100 mg).

Posteriormente, las tiras se colocaron en la misma solución de equilibrio adicionada con el agente alquilante iodoacetamida (250 mg) bajo agitación suave. Las tiras de IPG se colocaron luego en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE con un gradiente al 15%, sellándola con agarosa al 0.5%. El corrimiento electroforético se realizó en regulador de corrida Tris-Glicina (Glicina 192 mM, SDS 1% y Tris-HCl a un pH de 8.3) a un voltaje de 150 V, hasta que la línea del colorante alcanzara el borde inferior del gel. Finalmente los geles fueron teñidos con solución de azul brillante de Coomassie, seguido por un enjuague con agua desionizada.

Se elaboraron por triplicado (Anexo 13.6.1) los geles con la misma cantidad de proteínas, a fin de determinar la variabilidad de los ensayos. Con los tres geles se integró un *gel maestro* (Anexo 13.6.2 y Anexo 13.6.3) que contiene las proteínas que estuvieron presentes en dos de los tres ensayos.

2.7.6 Electrotransferencia e Inmunodetección (Wester blot)

Una vez que se obtuvieron los perfiles electroforéticos de proteínas unidimensionales y los perfiles maestros bidimensionales del veneno se analizaron para conocer las proteínas homólogas y heterólogas de los perfiles electroforéticos de cada especie, y se decidió realizar una electrotransferencia e inmunodetección por el método descrito originalmente por Towbin *et al* (1979), para conocer que proteínas son reconocidas por el Faboterápico de Birmex.

Se prepararon geles de poliacrilamida al 13% y 15% para hacer geles unidimensionales y bidimensionales en condiciones reductoras desnaturalizantes como se mencionó anteriormente. Después del corrimiento electroforético, se transfirieron las proteínas ya resueltas, a membranas de nitrocelulosa de 0.45 µm de poro, utilizando regulador de transferencia, (Tris 3.03g, Glicina 11g, Metanol 200 ml), en una cámara de transferencia, a la que se aplicó una corriente constante de 300 Volts y 60 Ampers, durante 3 horas.

La membrana se bloqueó con una solución que contenía 3 g de albumina sérica bovina, 4.84g de tris, 36 g de cloruro de sodio diluidos en 1L de TBS (Tris-HCl

0.01M y NaCl 0.15 M) por 12 horas. Para la detección inmunológica de las proteínas la membrana, se lavó con amortiguador TBS y se incubó con el primer anticuerpo (Suero equino diluido 1:2000 en TBS). Enseguida se hicieron 4 lavados con 50 ml de Tween 20 para posteriormente colocar el segundo anticuerpo, IgG de conejo conjugado de peroxidasa contra anti-IgG equino) (Diluido 1:2000 en TBS). Después de la incubación con el segundo anticuerpo, las tiras de nitrocelulosa se lavaron 2 veces durante 15 minutos cada uno en TBS Tween 20. Para demostrar la formación de complejos inmunes, se reveló con una solución de peroxidasa, 4-cloro-1-naftol (30 mg de Cloro-Naftol, 50µl de peroxidasa, 10 ml de metanol y 50 ml de TBS) hasta la aparición de las bandas, en la transferencia de las proteínas de los geles unidimensionales y las manchas (spots) de las proteínas transferidas de los geles bidimensionales.

Se correlacionaron las proteínas de los geles con las transferidas al papel de nitrocelulosa y se determinaron los pesos moleculares de las proteínas reconocidas como antígenos por los anticuerpos presentes en el faboterápico. Las proteínas fueron identificadas por punto isoeléctrico y peso molecular utilizando reportes previos de estas y otras especies de serpientes (Días da Silva *et al.*, 1989; Fox y Serrano, 2005; Clemetson y Clemetson, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2005; Hayashi y Camargo, 2005; Kini, 2006; Duque-Osorio *et al.*, 2007; Galán *et al.*, 2008; Fox y Solange, 2008; Fox y Serrano, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2009; Calvete *et al.*, 2009; Baldo *et al.*, 2010; Cortelazzo *et al.*, 2010; Segura *et al.*, 2010).

III. Resultados

3.8.1 Cantidad de veneno extraído y Determinación de la cantidad de proteína de los venenos

De *Crotalus basiliscus* se obtuvo un volumen de 1.2 ml y de *Crotalus atrox* 0.7 ml de veneno, respectivamente; la concentración de proteína del veneno de *C. basiliscus* fue de 173 mg/ml y para *C. atrox* fue de 218 mg/ml.

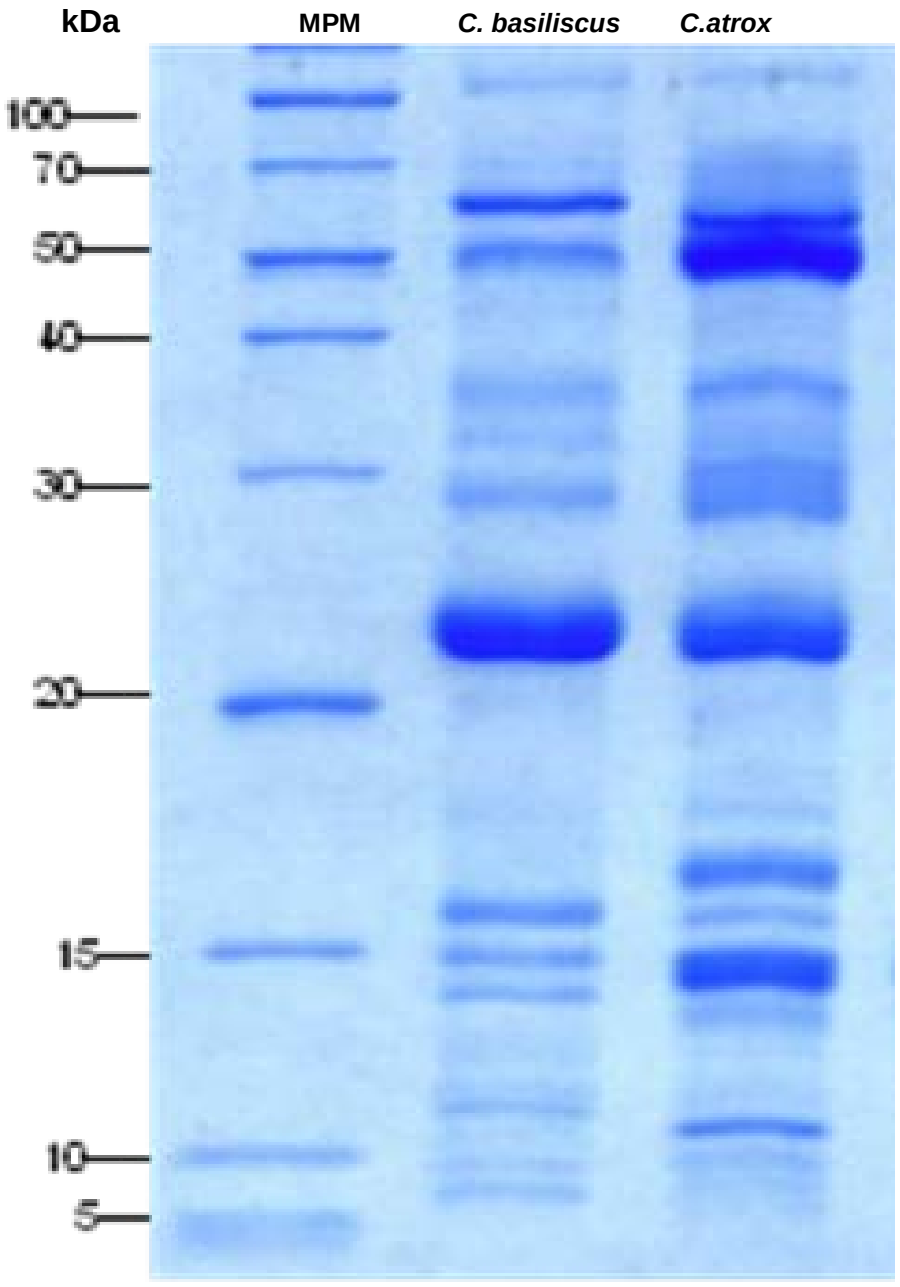
3.8.3 Electroforesis unidimensional desnaturalizante y reductora en gel de poliacrilamida al 13% (SDS-PAGE).

Con el fin de obtener información básica de las muestras de veneno de cada especie se obtuvo el perfil de bandas resueltas en geles unidimensionales de poliacrilamida en condiciones reductoras y desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 13% por el método de Laemmli (1970) (Figura 10). Con este perfil se determinaron los pesos moleculares de cada banda de las dos especies.

El perfil electroforético de *Crotalus basiliscus* presentó los siguientes pesos moleculares: 101, 67, 50, 38, 35, 29, 23, 17, 15, 14, 13, 12, 10 y 7 kDa (Figura 10 y Tabla 2). *Crotalus atrox* presentó los siguientes pesos moleculares: 101, 66, 50, 38, 29, 23, 18, 17, 15, 14, 11, 10, 9 kDa (Figura 10 y Tabla 2).

Se compararon las bandas resueltas de las dos especies encontrándose que las bandas homólogas fueron las de 101, 50, 38, 29, 23, 17, 15, 14 y 10 kDa. Aunque en el perfil del veneno de las 2 especies presenta similitud en las bandas anteriormente descritas se pudo observar que hay diferencia entre el ancho de las bandas (Figura 10).

En cuanto al perfil de las bandas heterólogas y las que únicamente están presentes en *Crotalus basiliscus* fueron de: 67, 35, 13, 12 y 7 kDa y las bandas que solo están presentes en *Crotalus atrox* fueron las de: 66, 11 y 9 kDa (Figura 10, Tabla 2).



MPM Marcador de peso molecular

Fig.10. Imagen de las bandas resueltas de proteínas de los venenos de *Crotalus basiliscus y Crotalus atrox* en Gel unidimensional de poliacrilamida al 13% en condiciones reductoras y desnaturalizantes por el Método de Laemmli (1970).

Tabla 2. Comparación de los pesos moleculares (kDa) de las bandas de proteínas del veneno de cada especie en geles unidimensionales.

Crotalus basiliscus kDa	*Crotalus atrox* kDa
101	101
67	----
---	66
50	50
38	38
35	---
---	---
29	29
23	23
---	18
17	17
15	15
14	14
13	---
12	---
---	11
10	10
---	9
7	---

Nota: Las zonas sombreadas son las bandas de peso molecular que no están presentes en cada especie.

3.8.4 Electroforesis bidimensional (2-D)

Los resultados de la composición proteica del veneno de *Crotalus basiliscus* en los geles bidimensionales se muestran en la Figura 11 y la tabla 3 y los resultados de la composición proteica del veneno de *Crotalus atrox* en los geles bidimensionales se muestran en la Figura 12 y la tabla 3.

3.8.5 Comparación del gel unidimensional y geles bidimensionales

Los resultados de la comparación de los geles unidimensionales y bidimensionales se muestran en la Figura 13 y la tabla 4.

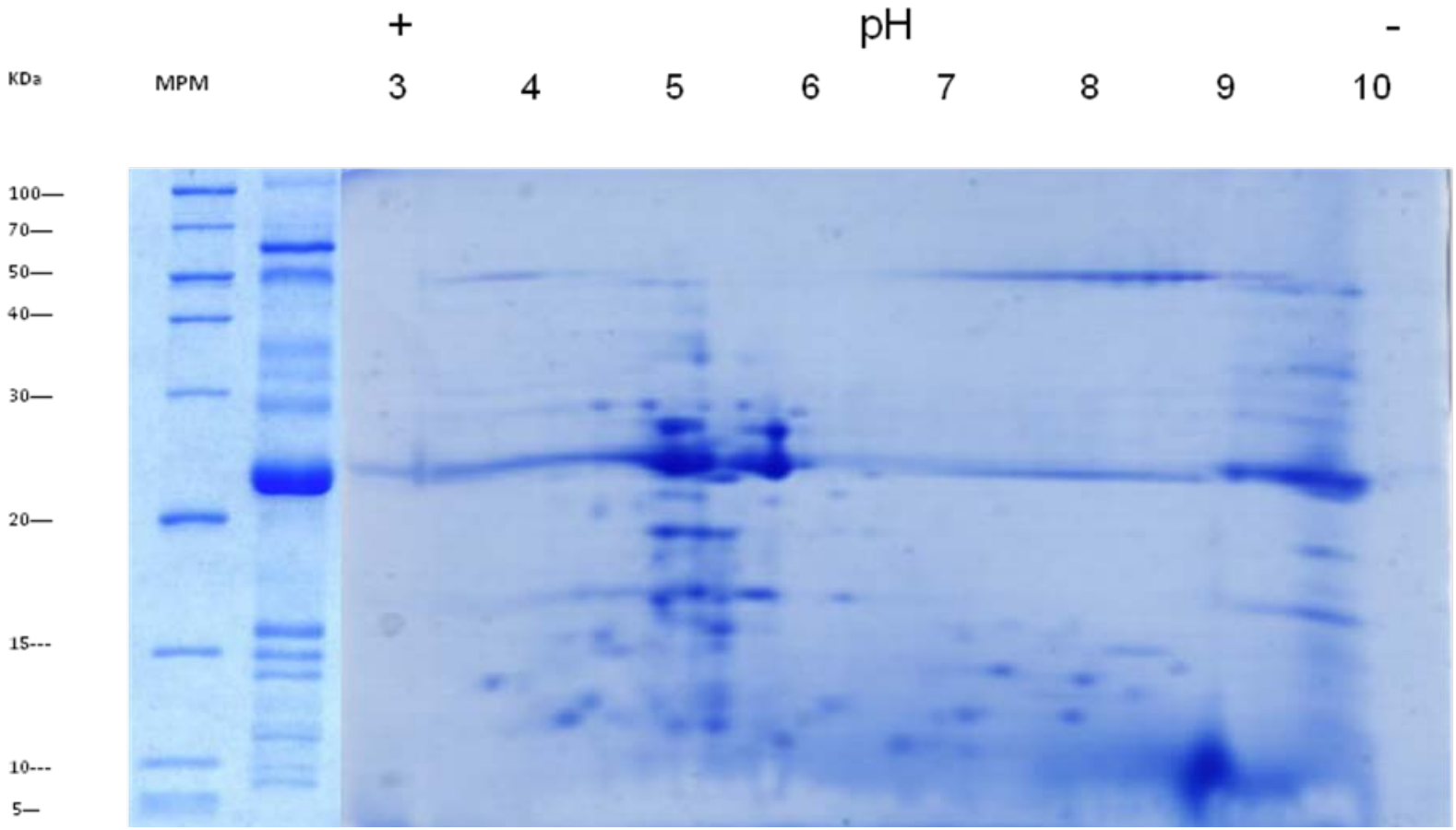


Fig. 11. Imagen del perfil electroforético bidimensional (2-D PAGE) del veneno de *Crotalus basiliscus*

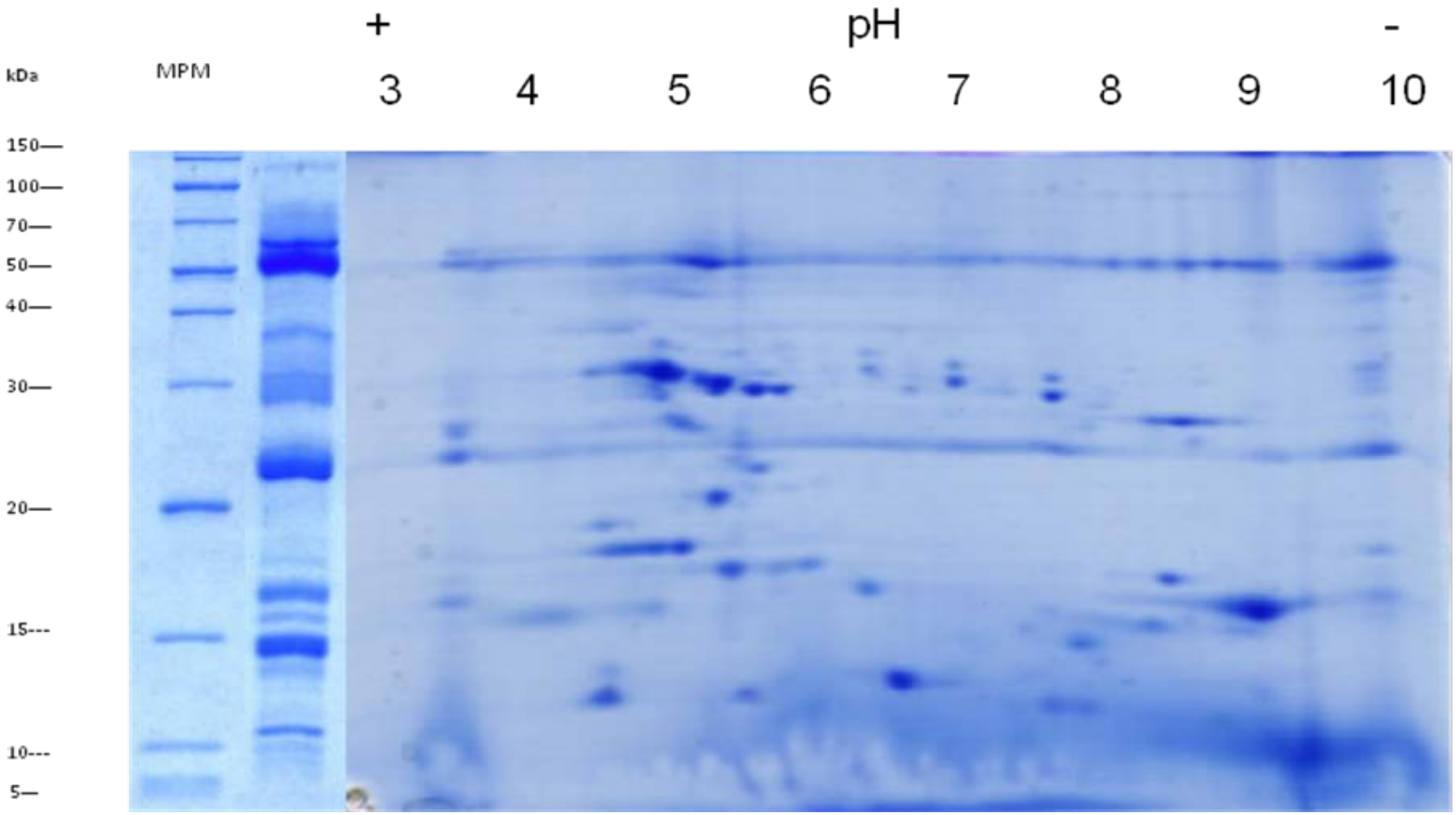


Fig. 12. Imagen del perfil electroforético bidimensional (2-D PAGE) del veneno de *Crotalus atrox*.

Tabla 3. Comparación de los pesos moleculares de puntos (spots) resueltos en geles bidimensionales.

	Crotalus basiliscus	*Crotalus atrox*
Peso Molecular (kDa) e Interpretación*	Número de puntos (spots) por peso molecular y punto isoeléctrico (pI)	Número de puntos (spots) por peso molecular y punto isoeléctrico (pI)
101 PIII-SVMP		6 puntos 4(8-9) 2(9-10)pI
50 PIII-SVMP	4 puntos (8-9)pI	7 puntos 1(5-6) 3(8-9) 3(9-10)pI
38 PIII-SVMP	1 punto (5-6)pI	1 punto (4-5)pI
35	1 punto (5-6)pI	2 puntos 1(5) 1(6-7)pI
29 SERINA PROTEINASA	4 puntos 2(4-5) 2(5-6)pI	3 puntos 1(5-6) 2(7-8)Pi
27 SERINA PROTEINASA	2 puntos 1(5) 1(5-6)pI	3 puntos 2(5-6) 1(7-8)pI
23	2puntos 1(5) 1(5-6)	3 puntos 1(3-4) 1(5) 1(8-9)pI
20	1 punto (6-7)pI	1 punto (5-6)pI
19	2 puntos (5-6)pI	1 punto (5-6)pI
17	3 puntos (5-6)pI	1 punto(4-5)pI
16 LECTINA TIPO-C	---	3 puntos 2(4-5) 1(5-6)pI
15 PI-SVMP	3 puntos (5-6)pI	1 punto(5-6)pI
14 PLA_2	1 punto (5-6)pI	1 punto (8-9)pI
13	2puntos 1(4-5) 1(5-6)pI	1 punto (6-7)pI
12	2 puntos 1(4-5) 1(5-6)pI	2 puntos 1(3-4) 1(9-10)pI
11	2 puntos 1(3-4) 1(8-9)pI	-----
10	2 puntos 1(4-5) 1(8-5)pI	1 punto (8-9)pI
9	---	2 puntos 1(4-5) 1(6-7)pI
8	1 punto (8-9)pI	---
7	3 puntos 1(4-5)pI 1(5-6) 1(7-8)pI	---
5	2 puntos 1(4-5) 1 (5-6)pI	2 puntos 1(4-5) 1(5-6)pI

Punto isoeléctrico (pI). *Por la literatura consultada se infiere que los pesos moleculares podrían corresponder a las proteínas mencionadas en la tabla (Calvete, 2009)

Imágenes de los Geles Maestros Unidimensional y Bidimensionales.

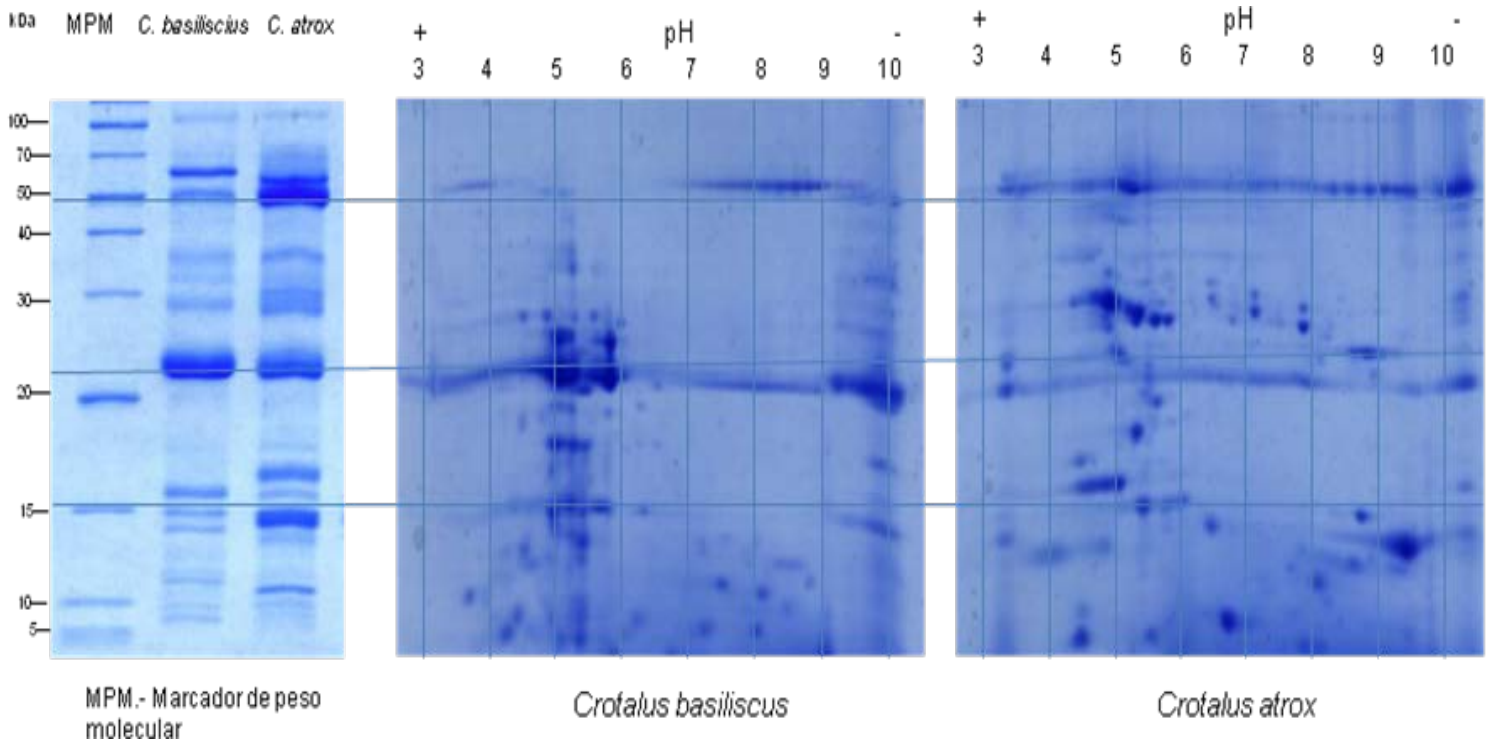


Fig. 13. Se compararon las imágenes del gel unidimensional con las imágenes de los geles bidimensionales maestros de las dos especies, con el fin de determinar las proteínas comunes, y las que presentan cambios en abundancia entre las especies.

Tabla 4. Comparación de pesos moleculares (kDa) de bandas resueltas en geles unidimensionales y puntos (spots) en geles bidimensionales.

Crotalus basiliscus		*Crotalus atrox*	
Geles unidimensionales Peso Molecular (kDa) de las bandas resueltas.	Geles bidimensionales Número de puntos (spots) peso molecular y pl	Geles unidimensionales Peso Molecular (kDa) de las bandas resueltas.	Geles bidimensionales Número de puntos (spots) peso molecular y pl
101	0	101	6 puntos 4(8-9) 2(9-10)pl
50	4 puntos (8-9)pl	50	7 puntos 1(5-6) 3(8-9) 3(9-10)pl
38	1 punto (5-6)pl	38	1 punto (4-5)pl
35	1 punto (5-6)pl	35	2 puntos 1(5) 1(6-7)pl
29	4 puntos 2(4-5) 2(5-6)pl	29	3 puntos 1(5-6) 2(7-8)pl
27	2 puntos 1(5) 1(5-6)pl	27	3 puntos 2(5-6) 1(7-8)pl
23	2puntos 1(5) 1(5-6)	23	3 puntos 1(3-4) 1(5) 1(8-9)pl
20	1 punto (6-7)pl	20	1 punto (5-6)pl
19	2 puntos (5-6)pl	19	1 punto (5-6)pl
17	3 puntos (5-6)pl	17	1 punto(4-5)pl
---	---	16	3 puntos 2(4-5) 1(5-6)pl
15	3 puntos (5-6)pl	15	1 punto(5-6)pl
14	1 punto (5-6)pl	14	1 punto (8-9)pl
13	2puntos 1(4-5) 1(5-6)pl	13	1 punto (6-7)pl
12	2 puntos 1(4-5) 1(5-6)pl	12	2 puntos 1(3-4) 1(9-10)pl
11	2 puntos 1(3-4) 1(8-9)pl	----	-----
10	2 puntos 1(4-5) 1(8-5)pl	10	1 punto (8-9)pl
---	---	9	2 puntos 1(4-5) 1(6-7)pl
8	1 punto (8-9)pl	---	---
7	3 puntos 1(4-5)pl 1(5-6) 1(7-8)pl	---	---
5	2 puntos 1(4-5) 1 (5-6)pl	5	2 puntos 1(4-5) 1(5-6)pl

Punto isoeléctrico (pl), los números en rojo son pesos moleculares de bandas no resueltas en geles unidimensionales. Renglones pintadas de amarillo son bandas y puntos semejantes en las 2 especies.

3.8.5 Electrotransferencia e inmunodetección de proteínas de los venenos de *Crotalus basiliscus* y *Crotalus atrox* en geles Unidimensionales.

Una vez que se analizaron los perfiles electroforéticos de proteínas unidimensionales de cada veneno se decidió realizar una electrotransferencia a papel de nitrocelulosa y llevar a cabo una inmunodetección de las proteínas de los venenos con el faboterápico antiviperino de Birmex, con el método descrito originalmente por Towbin *et al.,* (1979). Obteniendo lo siguiente:

El faboterápico antiviperino de Birmex, reconoció seis de las bandas proteicas, para el veneno de *Crotalus basiliscus* las cuales correspondieron a masas moleculares de 55, 36, 35, 34, 23 y 14 kDa (Figura 14 y tabla 5).

Por otro lado el número de bandas inmunodetectadas por el faboterápico de Birmex, para el veneno de *Crotalus atrox* fueron nueve, mismas que se ubicaron en las masas moleculares de 55, 36, 35, 34,30, 23, 15, 13 y 10 kDa (Figura 14 y tabla 5).

Tabla 5.- Comparación de bandas de proteínas transferidas e inmunodetecta das por el faboterápico de Birmex.

Crotalus basiliscus kDa	*Crotalus atrox* kDa
55	55
36	36
35	35
34	34
	30
23	23
---	15
14	---
---	13
---	10

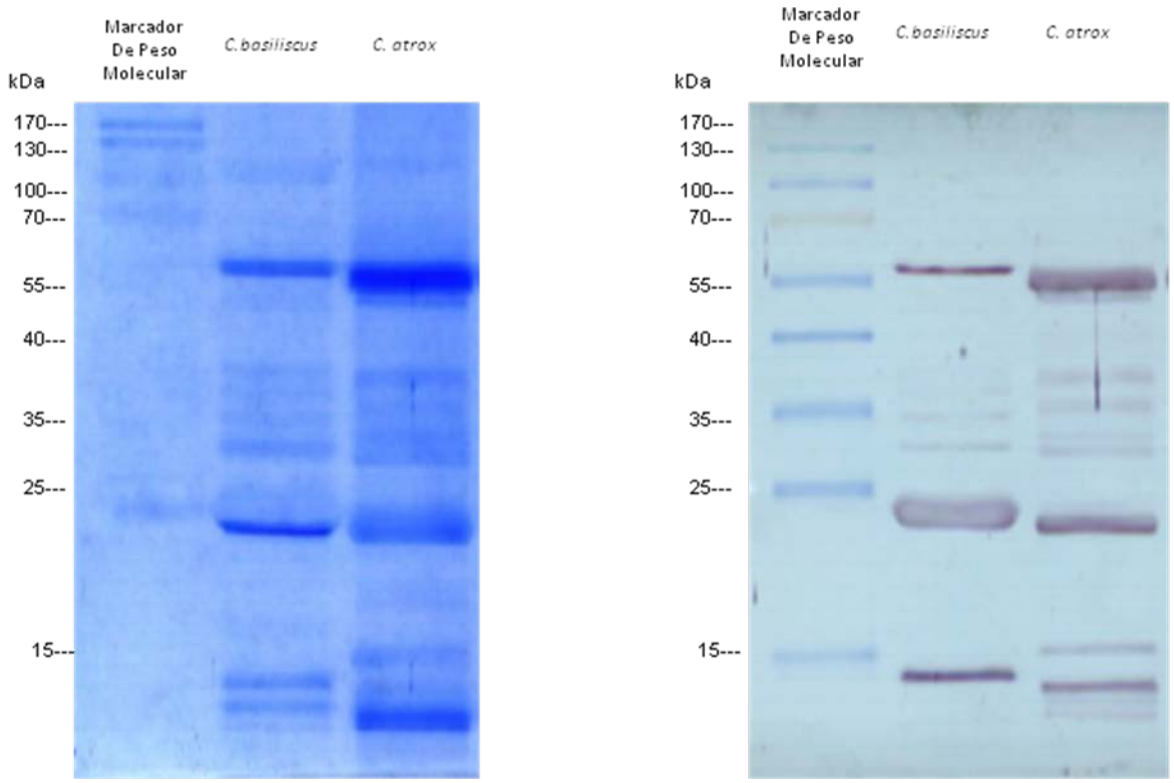


Fig. 14. Imágenes del perfil electroforético de las proteínas de las muestras de veneno de 2 especies del género *Crotalus* separadas en gel de poliacrilamida desnaturalizante y reductora al 15% según Laemmli (Fig. izquierda) y transferida a nitrocelulosa e inmunodetectada con el faboterápico de Birmex (Fig. derecha).

3.8.6 Electrotransferencia e inmunodetección de proteínas de los venenos de *Crotalus basiliscus y Crotalus atrox* de geles bidimensionales.

Al analizar los perfiles electroforéticos bidimensionales de proteínas de cada veneno se decidió realizar una electrotransferencia de las proteínas de los venenos a papel de nitrocelulosa y llevar a cabo una inmunodetección de las proteínas con el suero antiviperino de Birmex. Se utilizó el método descrito originalmente por Towbin *et al*., (1979) y se obtuvieron los siguientes resultados:

El suero antiviperino de Birmex reconoció 10 proteínas del veneno de *Crotalus basiliscus,* las cuales se distribuyeron como se menciona a continuación: diez puntos con un peso molecular de 50 kDa, un punto con un peso molecular de 34 kDa, tres puntos con un peso molecular de 29 kDa, tres puntos de 23 kDa de peso molecular, un punto con un peso molecular de 20 kDa, dos puntos con un peso molecular de 16 kDa y un punto con peso molecular de 15 kDa (Figura 15 y Tabla 6).

Por otro lado para el veneno de *Crotalus atrox* se detectaron: cinco puntos con un peso molecular de 50 kDa, un punto con un peso molecular de 38 kDa, un punto con un peso molecular de 25 kDa, un punto de 23 kDa de peso molecular, dos punto con un peso molecular de 22 kDa, un punto con un peso molecular de 17 kDa y un punto con peso molecular de 16 kDa (Fig. 16 y Tabla 6).

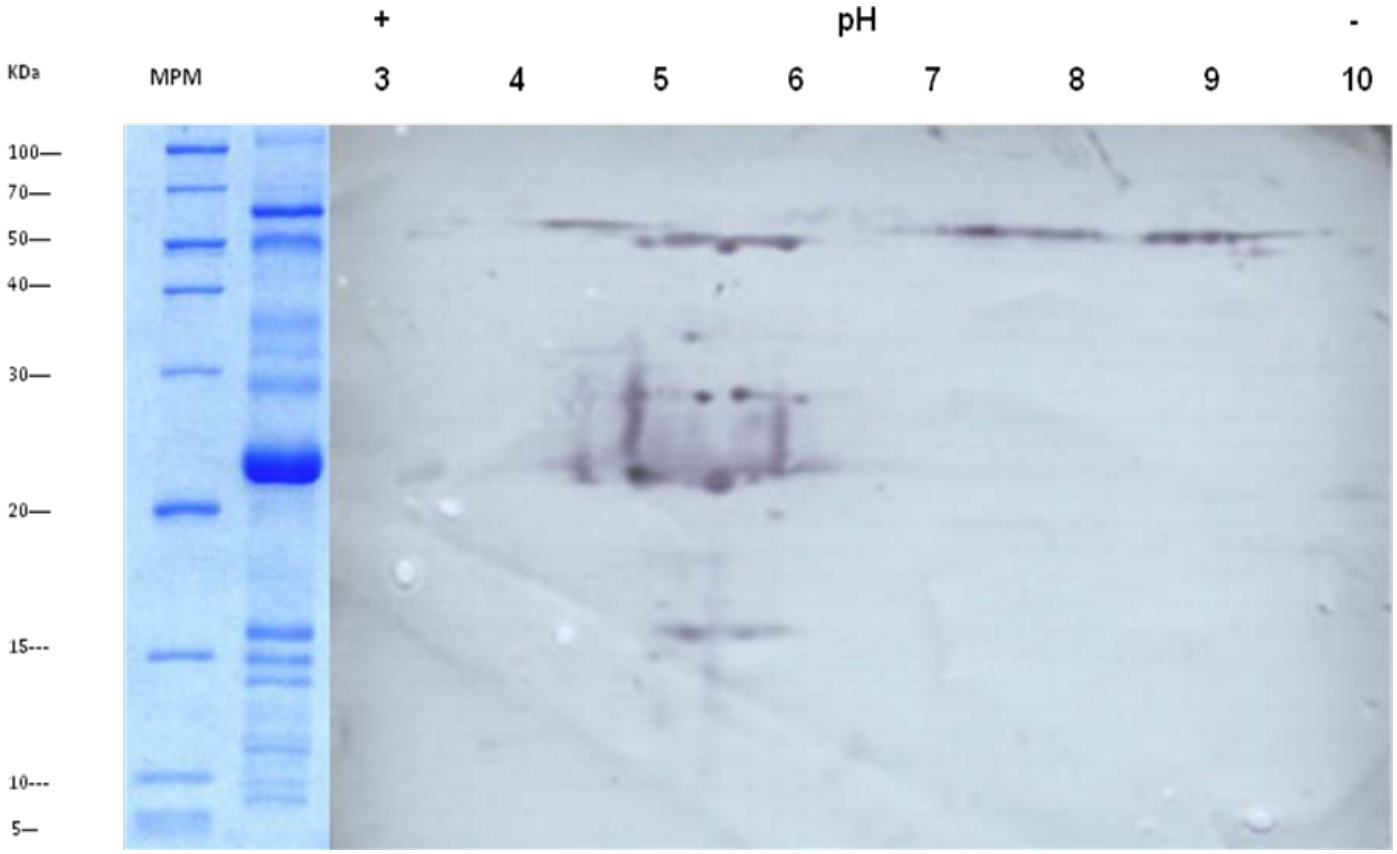


Fig. 15. Imagen 2-D de puntos de proteínas del veneno de *Crotalus basiliscus* electrotransferidas a papel de nitrocelulosa e inmunodetectadas por el faboterápico de Birmex.

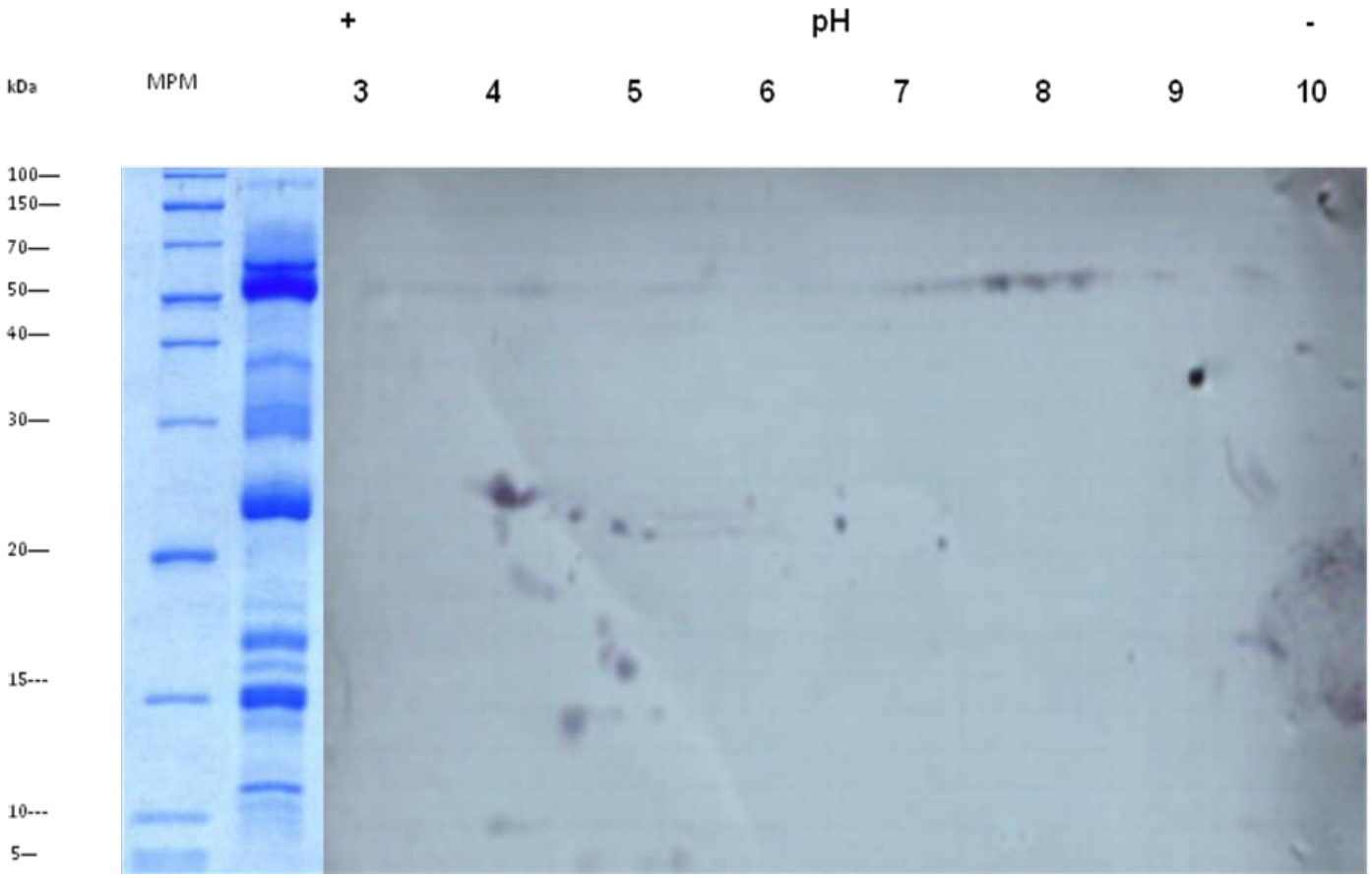


Fig. 16. Imagen 2-D de puntos de proteínas del veneno de *Crotalus atrox* electrotransferidas a papel de nitrocelulosa e inmunodetectadas por el faboterápico de Birmex.

Tabla. 6 Comparación entre el número de puntos (spots) electrotransferidos e inmunodetectados de proteínas de los venenos de *Crotalus basiliscus y Crotalus atrox* en geles bidimensionales.

Peso molecular kDa	*Número de puntos (spots) Crotalus basiliscus*	*Número de puntos (spots) Crotalus atrox*
101	---	---
70	---	---
67	---	---
66	---	---
50	10	5
40	---	---
38	---	1
36	---	---
35	---	---
34	1	---
30	---	---
29	3	---
27	---	---
26	---	---
25	---	1
23	3	1
22	---	2
20	1	---
19	---	---
18	---	---
17	---	1
16	2	1
15	1	---
14	---	---
13	---	---
12	---	---
11	---	---
10	---	---
9	---	---

IV. Discusión

Debido a su composición, los venenos de serpiente han sido objeto de numerosos estudios, los cuales tienen como objetivos:

1) Aislar una o más sustancias activas del veneno, que en bajas concentraciones puedan presentar efectos farmacológicos de interés para el desarrollo de medicamentos.
2) Tener una mejor comprensión de la función de las sustancias aisladas del veneno de serpientes en el proceso del envenenamiento.
3) Verificar si existe algún principio activo, sintético o natural que pueda inhibir la acción del veneno y de algunas proteínas aisladas del mismo.

Calvete *et al.*, 2009, identificaron proteínas del veneno de *Crotalus atrox* por sus pesos moleculares y por espectrometría de masas, encontrando proteínas en un rango de 6 a 110 kDa.

En los geles unidimensionales se encontró un rango de proteínas que va de 7 a 101 kDa, en *Crotalus basiliscus* y de 9 a 101 kDa en *Crotalus atrox*. Los pesos específicos entre las dos especies fueron muy similares (Tabla 2) aunque presentaron diferencias en la cantidad o concentración de las bandas (ancho de las bandas).

Se encontraron tres bandas resueltas muy notorias y que estuvieron presentes en las dos especies de serpientes con pesos moleculares de 50, 23 y 15 kDa, y a pesar de que fueron del mismo peso molecular se observaron claramente (Figura 10 y Figura 13) las diferencias en el patrón proteico entre las dos especies de *Crotalus*.

Aunque no se realizó la identificación de las proteínas por espectrometría de masas, de acuerdo a Calvete *et al.,* (2009) podrían ser proteínas diferentes con un

peso molecular muy cercano, como es el caso de la Fosfolipasa A_2 con un peso molecular de 14.5 kDa y algunas metaloproteinasas como la Atrolisina con un peso molecular de 15 kDa. Calvete *et al.,* (2009) argumentan que hay proteínas que presentan el mismo peso molecular de la misma familia de las proteinasas y sin embargo son dos proteínas diferentes como es el caso de la Atrolisina B y la Atrolisina D con un peso molecular de 25 kDa. Otra proteína que llama la atención es la Catrocolastatina de la familia de las metaloproteínasas tipo PIII tienen diferente peso molecular que varía en un rango de 53 a 56 kDa siendo la misma proteína.

Hasta el momento en la literatura consultada no hay reportes que mencionen estudios de identificación de proteínas por debajo de los 10 kDa, por lo tanto no se han determinado o son desconocidas.

En los resultados de los geles unidimensionales se muestran proteínas de 101, 50 y 15 kDa, las cuales según la literatura consultada podrían tratarse de metaloproteínasas. Las metaloproteinasas también denominadas hemorraginas, son las proteínas más abundantes del veneno de serpientes de cascabel (Fox y Serrano, 2005). Son endoproteasas de diferentes pesos moleculares 110, 56, 55, 54,53, 42, 26, 25 y 15 kDa (Calvete *et al.*, 2009), que degradan proteínas de la matriz extracelular (colágeno, fibronectina, laminina), produciendo hemorragia local, inflamación, necrosis (Fox y Serrano 2005), también inhiben la formación de fibrina y la formación de la coagulación (Gutiérrez *et al.*, 2005).
Por la literatura consultada (Galan *et al.*, 2008) se esperaba encontrar en geles unidimensionales bandas de proteína con un peso molecular igual al de la serin-proteasa que son enzimas hidrolazas que degradan proteínas y que contienen un aminoácido serina en su sitio activo, esto tal vez debido a que esta proteína se perdió por la edad de las serpientes.

Las bandas de proteínas resueltas con un peso molecular de 16 kDa podrían tratarse de Lectina tipo C (Calvete *et al.*, 2009). Son toxinas que no presentan

actividad enzimática, presentan diversidad de estructuras cuaternarias (Hayashi y Camargo, 2005) y actividad biológica pro-o-anti agregante de plaquetas (Clemetson y Clemetson, 2005).

Es importante resaltar el hecho de que los geles bidimensionales ayudaron a resolver mejor las proteínas sobre las zonas donde podría haber muchas proteínas distintas y que a lo mejor las más abundantes enmascaran a algunas que puedan ser relevantes.

Recientemente se han aislado y caracterizado parcialmente varias metaloproteínasas hemorrágicas del veneno de *Bothrops asper*, la principal serpiente venenosa en México y la región de Centroamérica. Aunque el mecanismo de acción de estas toxinas no está totalmente dilucidado, los estudios efectuados permiten proponer la hipótesis que las metaloproteinasas dependientes del zinc, hidrolizan algunas proteínas que componen la lámina basal que rodea las células endoteliales de los vasos capilares y de las vénulas. Como consecuencia de esta hidrólisis las células endoteliales se ven afectadas hasta el punto en que su integridad se interrumpe y se producen rupturas (Gutiérrez *et al.*, 2009).

En este estudio por peso molecular y punto isoeléctrico (pI) en *Crotalus atrox* se pudieron determinar seis puntos (spots) de proteínas que en base a la literatura consultada podrían ser metaloproteínasas de tipo P-III-SVMP con un peso molecular de 101 kDa, cuatro en un rango de pI de 8-9 y 2 en rango de pI de 9-10.

Las metaloproteinasas hemorrágicas se clasifican, desde el punto de vista estructural, en cuatro grupos, en base a los dominios que posee. (Fox y Serrano, 2009).
Las de la clase P-I presentan únicamente el dominio metaloproteínasas, caracterizado por una secuencia HEXXHXXGXXH responsable de la unión del zinc. Las metaloproteinasas de las otras clases presentan además el dominio

catalítico, dominios tipo disintegrina de clase P-II, y las de dominio clase P-III rico en cisteína. El dominio que presenta Lectina es de clase PIV. Los estudios con la jararagina, y otras metaloproteinasas han demostrado que la presencia de estos dominios, especialmente el tipo disintegrinas, le confieren a estas metaloproteinasas la capacidad de reconocer receptores de la familia de las integrinas en las membranas de las plaquetas y de otros tipos celulares, afectando el proceso de agregación plaquetaria y la adhesión de otras células del sustrato de matriz extracelular (Fox y Solange, 2008; Baldo *et al.*, 2010).

Los estudios de patología experimental efectuados con diversas metaloproteinasas en América Latina han demostrado que estas enzimas no sólo son responsables de hemorragia, sino que también inducen mionecrosis, edema, dermonecrosis, activación de complemento, fibrinólisis y degradación de la matriz extracelular, por lo que desempeñan un rol muy relevante en la patogénesis de diversos efectos asociados con estos envenenamientos (Gutiérrez *et al.*, 2009; Cortelazzo *et al.*, 2010).

En ambas especies se encuentran puntos resueltos con pesos moleculares y pI de 50 kDa. Cuatro puntos en un rango de pI de 8-9 en *Crotalus basiliscus* y siete puntos en un rango de pI de 8-10 en *Crotalus atrox* por lo que creemos que con los resultados de otros autores podrían ser metaloproteínasas del tipo P-III-SVMP (Baldo *et al*., 2010).

Otra metaloproteinasa que también podrían estar presente en ambas especies es la de tipo P-I-SVMP (Atrolisina B) con un peso molecular de 15 kDa y un rango de pI de 5-6.

Podemos observar que las puntos de proteínas del veneno que no están presentes en *Crotalus basiliscus* pero si está en *Crotalus atrox*, son las de 101kDa que según la literatura consultada podrían ser metaloproteinasas tipo P-III, las de 16kDa podrían ser Lectina tipo C, y de 9 kDa las cuales son desconocidas por qué no se encontró referencia alguna.

Los puntos con pesos moleculares y pI que se resolvieron en los geles de 2-D que si están presentes en el veneno de *Crotalus basiliscus* y no se encuentran patrones parecidos en *Crotalus atrox* son puntos de bajo peso molecular: 11, 8 y 7 kDa. Estas proteínas son desconocidas hasta el momento pues no se han reportado en la bibliografía (Calvete *et al.*, 2009).

La electroforesis en doble dimensión nos ayuda a obtener mayor información que en la electroforesis unidimensional ya que al resolver las proteínas con una mejor resolución por su punto isoeléctrico y masa molecular nos permite ver diferencias más marcadas entre las dos especies, como fue el caso de los puntos (spots) presentes en las dos especies, y que se resuelven con un peso molecular de 27 kDa, cabe hacer notar que estas no fueron observables en el gel unidimensional, sin embargo y de acuerdo a los reportes de la literatura (Calvete *et al.*, 2009) y tomando como referencia el peso molecular, se podría inferir que se trata de una proteína de la familia de las Serin-Proteasa; estas son un componente del veneno de las serpientes de cascabel que interfieren con los mecanismos fisiológicos de coagulación, agregación plaquetaria, fibrinólisis y el sistema del complemento (Kini, 2006).

Por otro lado, puntos de proteínas que se resolvieron en los geles de 2-D PAGE y que comparten las 2 especies con un peso molecular de 14 kDa y pI entre 5-9 y por estas características se sugiere que se trata de Fosfolipasas A_2 de acuerdo a lo reportado por Duque-Osorio *et al.*, 2007. La necrosis de tejido muscular o mionecrosis es uno de los efectos más conspicuos en el envenenamiento por serpientes. En caso de no ser neutralizado por los antivenenos este efecto redunda en una pérdida importante de tejido muscular, lo cual se asocia con una deficiente regeneración muscular y con secuelas permanentes en la víctima. Diversos grupos de Costa Rica y Brasil han desarrollado investigaciones dirigidas a la comprensión de del tipo de toxinas responsables de este efecto y su mecanismo de acción. Todas estas miotoxinas son proteínas con estructura de

fosfolipasa A_2 de la clase II, que afectan las células musculares rápidamente después de su inyección (Duque-Osorio *et al.*, 2007).

Los estudios de las secuencias de estas miotoxinas han permitido dividirlas en dos subtipos: aquellas que presentan aspartato en el residuo 49 y las que presentan lisina en dicha posición. Esta diferencia tiene implicaciones drásticas en la catálisis, ya que el aspartato en el residuo 49 juega un papel central en la capacidad de estas proteínas de unir el ion calcio. La sustitución de aspartato por lisina tiene como consecuencia una incapacidad de la molécula para ligar calcio y por lo tanto la pérdida de la actividad enzimática. La primera lisina 49 aislada y secuenciada fue la miotoxina II de *B. asper* (Saravia, 2002; Alape-Giron, 2008), a parte de la miotoxicidad, también las Fosfolipasas A_2 presentan efectos de hemolisis, neurotoxicidad, cardiotoxicidad, edemas y actividad anti-procoagulante (Duque-Osorio, 2007).

Otras proteínas que no se pudieron detectar en geles unidimensionales pero que si fue posible resolverlas en geles 2-D PAGE fueron los puntos de peso molecular de 27 kDa, De acuerdo a los datos informados en la literatura, por su peso molecular y punto isoeléctrico podrían ser proteínas Serin-proteasas (Catroxase-2) (Calvete, 2009). Las Serin-proteasas de venenos de serpientes interfieren con los mecanismos fisiológicos de coagulación, agregación plaquetaria, fibrinólisis y el sistema del complemento. Este grupo de enzimas incluye activadores de la proteína C y de los factores V, X, XI (Kini, 2006).

Por los resultados obtenidos se cree que un componente del veneno de serpientes que no está presente en ninguna de las dos especies es la L-amino-oxidasa ya que no se presentaron proteínas con peso molecular de 58.8 kDa. Como ya se menciono este trabajo está hecho con el veneno de serpientes adultas, podría suponerse que estas proteínas que en la literatura se mencionaban como parte de los componentes del veneno de *Crotalus atrox* tal vez en la madurez desaparecen.

O tal vez en otras especies esta proteína tiene una función especial y en las especies del género *Crotalus* no son tan importantes.

Para las serpientes del género *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper* la neutralización cruzada ha sido demostrada por fabricantes de antivenenos hechos en Latinoamérica (Días da Silva *et al.*, 1989; Ferreira *et al.*, 1992; Segura *et al.*, 2010).

El faboterápico antiviperino que produce Birmex es polivalente, lo que indica que tiene un amplio espectro de protección. Lo que confiere inmunidad pasiva a personas mordidas por serpientes de los géneros *Crotalus, Bothrops, Agkistrodon* y *Sistrurus,* estos dos últimos por inmunidad cruzada.

Los resultados obtenidos con el ensayo de Western blot, ponen de manifiesto que el faboterápico antiviperino de Birmex reconoce al veneno homólogo (veneno de *Crotalus basiliscus*) específicamente seis bandas proteicas de los siguientes pesos moleculares: 55 kDa que se cree pueden ser metaloproteínasas P-III SVMP, 36 kDa, 35 kDa y 34 kDa desconocidas por no estar reportadas en la literatura, 23 kDa que podrían ser metaloproteínasas PI-SVPM y 14 kDa que podrían ser Fosfolipasas A_2.

Hay un reconocimiento mayor por el número de bandas detectadas del veneno heterólogo (*Crotalus atrox*) por el Faboterápico antiviperino de Birmex reconociendo nueve bandas de proteínas de los siguientes pesos moleculares y que según la literatura se infiere que podrían ser, la de 55 kDa metaloproteinasas P-III SVPM, de 36 kDa, 35 kDa, 34 kDa desconocidos hasta el momento, 30 kDa que podrían ser Serin-proteasa (Catroxobin) 23 kDa y 15 kDa que se sugiere podrían ser metaloproteínasas, de 13 kDa que podrían ser PLA_2 y de 10 kDa que hasta el momento son desconocidos (Figura 14 y Tabla 5).

En una investigación paralela y complementaria a este trabajo, se calcularon las DL_{50} (Dosis letal) del veneno de *Crotalus basiliscus* arrojando como resultado una DL_{50} de 50.97 mg/Kg y el valor de la DL50 para *Crotalus atrox* es mayor ya que tiene una DL_{50} de 122.56 mg/Kg y si analizamos lo anteriormente dicho de que hay un mayor reconocimiento de bandas de proteína por el faboterápico en *Crotalus atrox* esto nos indica que hay más cantidad de proteínas letales en esta especie que en *Crotalus basiliscus.*

Al conocer que hay mas proteínas letales en *Crotalus atrox* que en *Crotalus basiliscus* y al tener el conocimiento de que el faboterápico de Birmex está fabricado con el veneno de *Bothrops asper* y *Crotalus basiliscus* nos hace pensar que hay de manera evidente que existe reacción cruzada para el reconocimiento de los mayores componentes de la especie heteróloga por eso hay un mayor número de reconocimiento de las bandas en el veneno de *Crotalus atrox*. Es probable que anticuerpos contra las proteínas de *B. asper* puedan puedan cruzar con proteínas de *Crotalus. atrox*.

Las proteínas del veneno de *Crotalus basiliscus* transferidas de geles en doble dimensión e inmunodetectadas por el faboterápico antiviperino de Birmex demuestra que reconoce algunas proteínas del veneno homólogo: diez puntos (spots) de 50 kDa, un punto de 34 kDa, tres puntos de 29 kDa, tres puntos de 23 kDa y 15 kDa, un punto de 20 kDa, dos puntos de 16 kDa**.** Por lo tanto por los pesos moleculares y por la literatura consultada se infiere que el Faboterápico puede reconocer Metaloproteínasas, Serin-proteasas, Lectina tipo C, del veneno de *C. basiliscus.*

Por reacción cruzada, las proteínas del veneno de *Crotalus atrox* transferidas de geles en doble dimensión e inmunodetectadas por el faboterápico antiviperino de Birmex, muestran que reconoce las proteínas del veneno heterólogo como son: cinco puntos (spots) de 50 kDa, un punto de 38 y 22 kDa, un punto de 25 y 23 kDa, un punto de 17 kDa y un punto de 15 kDa. Por lo tanto por el peso molecular

y por la literatura consultada el Faboterápico puede reconocer Metaloproteínasas, Lectina tipo C, del veneno de *C. atrox.* Estos resultados sugieren diferencias fisiológicas importantes y probables antígenos blanco para mejorar el antiveneno.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran al igual que otros mencionados en la literatura que cada especie de *Crotalus* produce un veneno propio y aunque presentan semejanzas entre algunas proteínas, como se ha observado hay diferencias en proteínas específicas por lo cual los antídotos universales pudieran no poseer la eficacia máxima que sería deseable. Lo anterior permite dar un primer acercamiento para establecer la capacidad de identificación por parte del faboterápico de Birmex de las proteínas comunes y diferenciales entre las dos especies de *Crotalus.*

V. Conclusiones

- Se observaron diferencias en el patrón electroforético entre los perfiles de *Crotalus basiliscus* y *Crotalus atrox* por lo tanto, los componentes proteicos del veneno de las especies antes mencionadas presentan un patrón electroforético diferente.

- Las proteínas que son diferentes por peso molecular y punto isoeléctrico, entre las dos especies son: 67, 35, 13,12 y 7 kDa en *C. basiliscus* y *C. atrox* 66, 11 y 9 kDa.

- Las principales proteínas del veneno homólogas identificadas por peso molecular y punto isoeléctrico presentes en los patrones electroforéticos fueron 101, 50, 38, 29, 23, 17, 15, 14 y 10 kDa.

- El patrón inmunoproteico unidimensional y bidimensional es distinto entre las dos especies.

- Hay más reconocimiento de bandas y puntos (spots) de proteínas de veneno por el Faboterápico de Birmex en *Crotalus atrox* que en *Crotalus basiliscus.*

VI. Impactos y perspectivas

Se requiere complementar este trabajo con estudios de identificación de las proteínas diferenciales identificadas por el faboterápico de Birmex, por inmunodetección empleando espectrometría de masas. Lo aquí obtenido permitirá identificar cuáles son las proteínas antigénicas necesarias para la protección.

Se requiere hacer más estudios de reconocimento del faboterápico con venenos de otras especies de serpientes mexicanas para comprobar que hay protección cruzada. Esto aportará importante información a la línea de investigación para el mejoramiento de la producción de faboterápicos de Birmex para la fabricación de faboterápicos dirigidos de manera específica contra los componentes más tóxicos del veneno de serpientes mexicanas.

VII. Referencias bibliográficas

1. Abe Y, Shimoyama Y, Munakata H, It J, Nagata N y Ohtsuki K. 1998. Characterization of an apoptosis-inducing factor in Habu snake venom as a glycyrrhizin (GL)-binding protein potently inhibited by GL in vitro. Biol Pharm 21: 924-927.

2. Alagón CA. 2008. Anticuerpos terapéuticos: El caso de los antivenenos. "http://www.smb.org.mx/XXVICONGRESO/text/Resumen-Invitados/"

3. Alape-Giron A, Sanz L, Escolano J, Flores-Díaz M, Madrigal M, Mahmood S, Calvete JJ. 2008. Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations. Journal of Proteome Research. 7: 3556-3571.

4. Anderson NL, Anderson NG. 1998. «Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words». Electrophoresis 11: 1853–1861.

5. Bandow J, Baker JD, Berth M, Painter C. 2008. Improved image analysis workflow for 2-D gels enables large-scale 2-D gel-based proteomics studies COPD biomarker discovery study. Proteomics. 12: 577-585

6. Baldo C, Jamora C, Yamanouye N, Zorn TM, Moura-Da Silva. 2010. Mecchanism of Vascular Damage by Hemorrhagic Snake Venom Metalloproteinases: Tissue Distribution and In situ Hydrolysis. PLOS Negleted Tropícal Diseases 4: 1-10.

7. Bazaa A, Marrakchi N, Ayeb M, Sanz L, Calvete JJ. 2005. Snake venomics: comparative analysis of the venom proteomes of the Tunisian snakes Cerastes cerastes, Cerastes vipera and Macrovipera lebetina. Proteomics 5:4223-4235.

8. Bakken G, Krochmal A. 2007. The imaging properties and sensitivity of the facial pit of pitvipers as determined by optical and heat-transfer analysis. J. Exp. Biol. 210: 2801-2810.

9. Berth M, Moser FM, Kolbe M. 2007. The state of the art in the analysis of two-dimensional gel eletcrophoresis images. Appl Microbiol Biotechnol. 76. 6:1223–1243.

10. Birmex. 2009. Laboratorios de Biologicos y Reactivos de México S.A. de C.V. http://www.birmex.gob.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=68

11. Blackstock WP, Weir MP. 1999. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. Trends Biotechnol. 17. 3: 121–127.

12. Calvete JJ, Fasoli E, Sanz L. 2009. Exploring the Venom Proteome of the Werstern Diamondback Rattlesnake, *Crotalus atrox*, via Snake Venomics and Combinatorial Peptide Ligand Library Approaches. Journal of Proteome. 8: 3055-3067.

13. Campbell JA, Lamar W. 2004 The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere: Comstock Publishing Associates: Ithaca, NY. 425

14. Clemetson JM, Clemetson KJ. 2005. Snake venom C-type lectins interacting with platelet receptors. Structurefunction relationships and effects on haemostasis. Toxicon 45:1089-98.

15. Chávez H. 2007. Los faboterápicos mexicanos en el paciente intoxicado por veneno de alacrán. http:/www.venonemia.org/memorias/juev/chavez%20Haro%20SI-pdf/

16. Chippaux J, Williams V, White J. 1991. Snake venom variability: methods of study, results ad interpretation. Toxicon, 29, 1279-1303.

17. Cortelazzo A, Guerranti R, Bini L. 2010. Effect of snake venom proteases on human fibrinogen chains. Blood Transfus. 120-125.

18. Cuadro Básico de Medicamentos del Sector Salud. 2010. http://www.csg.salud.gob.mx/descargas/pdfs/cuadro_basico/medicamentos/medicamentos_ed2010.pdf

19. Dias da Silva, W., Guidolin R., Raw, I. 1989. Cross- reactivity of horse monovalent antivenoms to venom of ten botrops species. Mem. Inst. Butantan 51: 153-168.

20. Duque-Osorio JF, Sánchez A, Fierro L. Garzón S. 2007. Venenos de serpientes y moléculas antiveneno. Rev Acad. Colomb. Cienc. 31 (118): 109-137.

21. Ferreira M, Moura–Da Silva A, Mota I. 1992. Neutralization of different activities of venoms from nine species of Bothrops snake by *Bothrops jararaca* antivenom. Toxicon 30: 1591-1602.

22. Flores- Villela O, Goyenechea I. 2004. Patrones de distribución de anfibios y reptiles en México. En: Morrone JJ y Llorente-Bousquets J (Eds). Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía. CONABIO/UNAM, México, 289-296.

23. Fox JW, Serrano SM. 2005. Snake toxins and hemostasis. Toxicon 45:951-1181

24. Fox JW, Solange MT. 2008. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. Proteomics. 8: 909-920.

25. Fox JW, Serrano S. 2009. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. J Proteomics. 72: 200-2009.

26. Fry BG, Vidal N, Norman JA, Vonk FJ, Scheib H, Ramjan SF, KuruppuS, Fung K, Hedges SB, Richardson MK, Hodgson WC, Ignjatovic V, Summerhayes R, Kochva E. 2006**.** Early evolution of the venom system in lizards and snakes. Nature. 439:584-588.

27. Galán JA, Sánchez E, Rodríguez-Acosta A, Soto JG. 2008. Inhibition of Lung Tumor Colonization and Cell Migration with the Disintegrin Crotatroxin 2 Isolated from the Venom of *Crotalus.* Toxicon 1; 51(7): 1186-1196.

28. Glen JL, Straight R. 1982. The rattlesnakes and their venom yield and lethal toxicity. In Rattlesnakes Venoms; Tu, A. T., Ed.; Marcel Dekker: New York 113-119

29. Gómez HF, Dart RC. 1995 Clinical Toxicology of snakebite in North America. In Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons. Eds; CRC Press: Boca Raton, FL: 619-644.

30. Gutiérrez JM, Ownby CL. 2003. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A_2 insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. Toxicon 42: 915-931.

31. Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Diaz C. 2005. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. Toxicon 45:997-1011

32. Gutiérrez JM, Lomonte B, León G, Alape-Giron A, Flores Díaz M, Sanz L, Angulo Y, Calvete JJ. 2009. Snake venomics and antivenomics: Proteomic tolos in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. Journal of Proteomics: 165-182.

33. Hanash SM, Pitteri SJ, Faca VM. 2008. Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. Nature. Apr 3:452(7187):571-579.

34. Hayashi MA, Camargo AC. 2005. Bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of Bothrops jararaca contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. Toxicon 45:1163-1170.

35. Hongbao Ma, Kuan-Jiunn Shieh. 2006. Western Blotting Method. The Journal of American Science. 4: 23-27.

36. James P. 1997. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. Quarterly reviews of biophysics 30 (4): 279–331.

37. Juárez P, Sanz L, Calvete JJ. 2004. Snake venomics: characterization of protein families in Sistrurus barbouri venom by cysteine mapping, N-terminal sequencing, and tandem mass spectrometry analysis. Proteomics 4:327-338

38. Juárez P, Wagstaff SC, Oliver J, Sanz L, Harrison RA, Calvete JJ. 2006. Molecular Cloning of Disintegrin-like Transcript BA-5A from a Bitis arietans Venom Gland cDNA Library: A Putative Intermediate in the Evolution of the Long-Chain Disintegrin Bitistatin. J Mol Evol. 63:142-152

39. Juárez P, Wagstaff SC, Sanz L, Harrison RA, Calvete JJ. 2006. Molecular Cloning of Echis ocellatus Disintegrins Reveals Non-Venom-Secreted Proteins and a Pathway for the Evolution of Ocellatusin. J Mol Evol. 63:183-193.

40. Kasturiratne A, Wickremasinghe AR, Da Silva N, Gunawardena, NK,Pathmeswaran A, Premaratna R, Savioli L, Lalloo DG, de Silva HJ. 2008. The global burden of snake bite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. 5:111-218.

41. Kini RM. 2006. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. Biochem J. 397: 377-387.

42. Klauber LM. 1997. Rattlesnakes: Their Habitats, Life Histories and influence on Mankind. 2nd ed. University of California Press: Bekerley

43. Kurien BT, Scofield RH. 2006. Western blotting. Methods 38 (4): 283-293.

44. Laemmlie UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (Lond) 227: 680-685.

45. Li S, Wang J, Zhang X, Ren Y, Wang N, Zhao K. 2004. Proteomic characterization of two snake venoms: Naja naja atra and Agkistrodon halys. Biochem 119-127

46. Li ZY, Yu TF, Lian E. 1994. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophaqus hannah*) Venom and its effects on human platelet aggregation. Toxicon 32(11): 1349-1358.

47. Lomonte B, Angulo Y, Calderón L. 2003. An overview of lysine -49 phospholipase A_2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. Toxicon. 42: 885-901.

48. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin fenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

49. Manual de Métodos de Laboratorio. 2007. Determinación de actividades tóxicas de venenos de serpientes y su neutralización por antivenenos. Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología. Instituto Clodomiro Picado. M: 27.

50. Monroy VJ. 1961. Historia de la preparación del suero antialacrán en México. Rev Mex Cien Med Biol; 2: 21-27.

51. O'Farrell PH. 1975. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. J.Biol Chem. Vol. 250: 4007-4021.

52. Ohno M, Chijiwa T, Oda-Ueda N, Ogawa T, Hattori S. 2003. Molecular evolution of myotoxic phospholipases A2 from snake venom. Toxicon 42:841-854.

53. Pando-Robles, Lanz-Mendoza. 2009. La importancia de la proteómica en salud pública.Salud Pública Mex.; 51 supl 3:S386-S394.

54. R. de Roodt A, Estévez-Ramírez J, Paniagua-Solís, JF. 2004. Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México. Gac. Med. Mex. Vol. 141 No. 1.

55. Red Internacional de Centros de Referencia para el Control y Tratamiento de Intoxicaciones por Animales Ponzoñosos. 2010. www.redtox.org/rt3/servlet/CtrlInteriorSub&c=185&ig=10&titulo=Crotalus

56. Reid H A, Theakston R. 1978. Changes in coagulation effects by venoms of *Crotalus atrox* as snake age. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27: 1053-1057.

57. Remuzgo C, Alvarez MP, Lazo F, Yarleque A. 2000. Caracterización parcial del veneno de la serpiente Cascabel Peruana *Crotalus durissus terrificus* Rev Peru Biol. Vol. 7 No. 1

58. Renart J, Reiser J, Stark GR. 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. Proc Natl Acad Sci U S A. 76 (7): 3116–3120.

59. Sanz L, Gibbs HL, Mackessy SP, Calvete JJ. 2006. Venom proteomes of closely-related Sistrurus rattlesnakes with divergent diets. J Proteome Res 5:2098-2112.

60. Saravia P, Rojas E, Arce V, Guevara C, López JC. 2002. Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus:* Pathophysiological and therapeutic implications. Rev. Biol.Trop. 50(1): 337-346.

61. Saravia P, Rojas E, Escalante T, Arce V, Chavez E. 2000. The venom of *Botrops asper* from Guatemal: toxic activities and neutralization by antivenoms. Toxicon 39: 401-405.

62. Sakurai Y, Takatsuka H, Yoshioka A, Matsui T, Suzuki M, Titan K, Fujimura Y. 2003. Inhibition of human platelet aggregation by L- amino acid oxidase purified from *Naja naja kaouthia* venom. Toxicon; 39(12): 1827-1833.

63. Segura A, Castillo MC, Nuñez V, Yarlequé A, Goncalvez L, Villalta M, Bonilla C, Herrera M. 2010. Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-revelant Bothrops snake venom, Toxicon 56: 980-989.

64. Serrano SM, Shannon JD, Wang D, Camargo AC, Fox JW. 2005. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by twodimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. Proteomics 5: 501-510.

65. Smalligan R, Cole J, Brito N D, Laing G, Mertz B L, Manock S. 2004. Crotaline snake bite in the Ecuadorian Amazon: randomized double blind comparative trial of three South American polyspecific antivenoms. Papers BMJ Volume 329.

66. Solano G, Segura A, Herrera M, Gómez A, Villalta M, Gutiérrez JM, León G. 2010. Study of the design and analytical properties of the lethality neutralization assay used to estímate antivenom potency against *Bothrops asper* snake venom. Biologicals 38: 577-585.

67. Souza DH, Eugenio LM, Fletcher JE, Jiang MS, Garrat RC. 1999. Isolation and structural characterization of a cytotoxic L- amino acid oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom: preliminary crystallographic data. Arch Biochem Biophys, 368: 285-290.

68. Suto K, Yamazaki Y, Morita T, Mizuno H. 2005. Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms: insight into selective VEGF binding to kinase insert domain-containing receptor but not to fms-like tyrosine kinase-J Biol Chem 280:2126-2131.

69. Swenson S, Markland FS, Jr. 2005. Snake venom fibrinogenolytic enzymes. Toxicon 45:1021-1039.

70. Tan NH, Choy SK. 1994. The edema inducing activity of *Ophiophagus hannah* (King cobra) venom L- amino acid oxidase. Toxicon; 32(5): 539.

71. Tay-Zavala J, Díaz-Sanchez JG, Sánchez-Vega JT, Ruiz-Sánchez D, Castillo L. 2002. Serpientes y reptiles de importancia médica en México. Rev Fac Med UNAM, 45: 212-219.

72. Torii S, Yamane T, Mashima T, Haga N, Yamamoto K. 2000. Molecular cloning and functional análisis of apotoxin I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity. Biochemistry 39: 3197-3205.

73. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci (USA). 76: 4350-4354.

74. Vega L. 2007. Rev. Mexicana de Pediatría, Vol. 74, Num. 2 Mar-Abr: 59-60.

75. Vigilancia Epidemiologica. 2011. Semana 52. Casos por mordeduras de serpientes. http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2011/sem52/pdf/cua12

76. Weiss W, Görg A. 2009. High-resolution two-dimensional electrophoresis. Methods Mol Biol. PubMed PMID: 19544015. 564:13-32.

77. White JM. 2005. Snake venoms and coagulopathy. Toxicon 45:951-967

78. World Health Organization. 2010. WHO Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenom Inmunoglobulins, Geneva. http://apps.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms/database/.

79. Yamazaki Y, Hyodo F, Morita T. 2003. Wide distribution of cysteinerich secretory proteins in snake venoms: isolation and cloning of novel snake venom cysteine-rich secretory proteins. Arch Biochem Biophys 412:133.

VIII. Anexos

Anexo 13.1

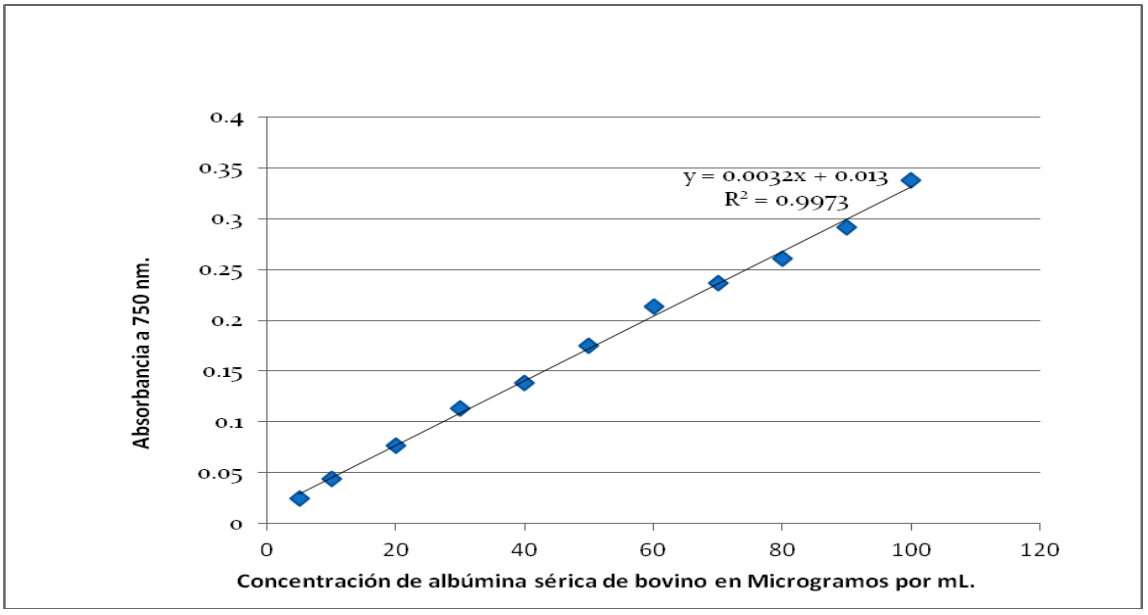
Tabla 7 Distribución Geográfica por estado de las serpientes Mexicanas del género *Crotalus* (Flores y Goyenechea, 2004).

Especie (Referencia)	Distribución por estado
C. aquilus (Klauber,1952)	Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Durango Zacatecas, San Luis Potosí.
***C. atrox* (Baird & Girard, 1853)**	**Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Durango, Zacatecas, Baja California Norte, Baja California Sur, Sinaloa, Sonora, Nayarit, Jalisco.**
***C. basiliscus* (Cope, 1864)**	**Baja California Norte, Baja California Sur, Sonora, Chihuahua, Sinaloa, Durango, Nayarit, Jalisco, Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, Michoacán, Edo. de México, Tlaxcala, Puebla, Colima, Guerrero, Oaxaca, Chiapas.**
C. catalinensis (Cliff,1954)	Baja California Norte, Baja California Sur, Sonora y Sinaloa.
C. cerastes (Hallowell,1854)	Baja California Norte, Baja California Sur, Sonora y Sinaloa.
C. durissus (Linnaeus, 1758) ahora *C. simus* (Campbell,2004)	Nayarit, Jalisco, Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, Michoacán, Edo. de México, Tlaxcala, Puebla, Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Tabasco, Veracruz, Sinaloa, Colima, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Tamaulipas, Nuevo León.
C. enyo (Cope, 1861)	Baja California Norte, Baja California Sur, Sonora y Sinaloa.
C. exsul (Garman, 1883)	Baja California Norte, Baja California Sur, Sonora y Sinaloa.

C. godmani (Günther, 1863)	Chiapas.
C. intermedius (Troschel, 1865)	Nayarit, Jalisco, Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, Michoacán, Edo. de México, Tlaxcala, Puebla, Guerrero, Oaxaca.
C. lannomi (Tanner, 1966)	Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas.
C. lepidus (Kennicott, 1861)	Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Durango, Zacatecas, Sonora, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, San Luis Potosí.
C. mitchelli (Cope, 1861)	Baja California Norte, Baja California Sur, Sonora y Sinaloa.
C. molossus (Baird & Girard, 1853)	Nayarit, Jalisco, Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, Michoacán, Edo. de México, Tlaxcala, Puebla, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Durango, Baja California Norte, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Guerrero, Oaxaca,Nayarit.
C. polystictus (Cope, 1865)	Nayarit, Jalisco, Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, Michoacán, Edo. de México, Tlaxcala, Puebla, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Guerrero, Oaxaca, Chiapas.
C. pricei (Van Denburgh, 1895)	Sonora, Chihuahua, Sinaloa, Durango, Nayarit, Jalisco, Zacatecas.
C. pusillus (Klauber, 1952)	Nayarit, Jalisco, Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, Michoacán, Edo. de México, Tlaxcala, Puebla.
C. ruber (Cope, 1892)	Baja California Norte, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa.
C. scutulatus (Kennicot, 1861)	Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Baja california Norte, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Nayarit, Jalisco.
C. stejnegeri (Dunn, 1919)	Sonora, Chihuahua, Sinaloa, Durango, Nayarit, Jalisco, Zacatecas.
C.tzotzilorum	Chiapas.
C. tigris (Kennicott, 1859)	Baja California Norte, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Chihuahua, Durango, Nayarit, Jalisco, Zacatecas.

C. tortugensis (Van Denburg & Slevin, 1921)	Baja California Norte, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa.
C. transversus (Taylor, 1944)	Nayarit, Jalisco, Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, Michoacán, Edo. de México, Tlaxcala, Puebla.
C. triseriatus (Wanler, 1830)	Nayarit, Jalisco, Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, Michoacán, Edo. de México, Tlaxcala, Puebla, Nuevo León, San Luis Potosí, Sinaloa, Colima, Guerrero, Oaxaca, Chiapas.
C. viridis (Rafinesque, 1818)	Baja California Norte, Baja California Sur, Sonora y Sinaloa, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Durango, Zacatecas.
C. willardi (Meek, 1905)	Sonora, Chihuahua, Sinaloa, Durango, Nayarit, Jalisco, Zacatecas.

Anexo 13.2 Curva de calibración de albumina sérica



Gráfica 1. Curva de calibración de albumina sérica para la determinación de la concentración de proteínas del veneno de las serpientes de cascabel *Crotalus basiliscus* y *Crotalus atrox*.

Anexo 13.3

Tabla 8. Peso Molecular de las proteínas del veneno de *Crotalus atrox*. (Calvete, 2009)

Masa Molecular	Familia de Proteína/proteína
110 kDa	PIII-SVMP VAP-I
56.8 kDa	Oxidasa L-amino- acido
53 – 56 kDa	PIII-SVMP Catrocolastatina
42 kDa	PIII-SVMP Atrolysina A
27.6	Serin-proteasa Catroxobin
27 kDa	Serin-proteasa Catroxase 2
26 kDa	PI-SVMP Atrolysina C
25 kDa	PI-SVMP Atrolysina B/ Atrolysina D
16 kDa	Lectina tipo-C
15 kDa	PI-SVMP Atrolysina B
14.5 kDa	PLA2
6 kDa	Desconocido

Anexo 13.4

Reactivos químicos

• **Tris**, nombre abreviado del **tris (hidroximetil) aminometano** ($C_4H_{11}NO_3$; Mr = 121,14). Se utiliza a menudo como tampón porque es una sustancia inocua para la mayor parte de las proteínas. Su pKa es 8,3 a 20 °C, lo que lo convierte en un tampón idóneo para el intervalo de pH entre 7 y 9.

• **Glicina**, o **ácido aminoacético** ($C_2H_5NO_2$; Mr = 75,07). Se ha utilizado como fuente de iones de arrastre (o lentos) porque su pKa es 9,69 y la movilidad del glicinato es tal que se puede situar en un valor inferior a la de la proteína más lenta conocida con carga negativa neta para el intervalo de pH de trabajo. El mínimo de este intervalo está situado aproximadamente en 8,0.SDS-PAGE 7

• **Acrilamida** (C_3H_5NO; Mr = 71,08). Es un sólido pulverulento, blanco y cristalino. Cuando se encuentra en disolución acuosa experimenta autopolimerización de forma espontánea y lenta; el resultado es que las moléculas de acrilamida se unen cabeza con cola. En presencia de un sistema generador de radicales libres, los monómeros de acrilamida se activan, quedando ellos mismos en estado de radical libre, y reaccionan rápidamente para formar polímeros de cadena larga. Este tipo de reacción se conoce como polimerización vinílica. Sin embargo, el polímero en disolución no forma un gel, sino que se encuentra en estado viscoso, debido a que las cadenas pueden deslizar unas sobre otras. La formación del gel requiere que varias cadenas queden trabadas (lo que se consigue con la bisacrilamida). La acrilamida es una neurotoxina, por lo que debe ser manejada con precaución. También es esencial almacenarla en un lugar refrigerado, seco y oscuro para reducir la autopolimerización y la hidrólisis.

• **Bisacrilamida**, o N,N'-metilenbisacrilamida ($C_7H_{10}N_2O_2$; Mr = 154,17). La bisacrilamida es el agente de reticulación más frecuente para los geles de poliacrilamida. Su estructura está compuesta por dos moléculas de poliacrilamida enlazadas por sus grupos amino, no reactivos de cara a la polimerización. Por ello, la bisacrilamida polimeriza conjuntamente con la acrilamida pero establece puentes entre las cadenas lineales de poliacrilamida, y así evita el deslizamiento de éstas y conduce a la formación del gel.

• **Dodecilsulfato sódico (SDS)** (C12H25NaO4S; Mr = 288,38). Se trata del agente disociador más habitual para desnaturalizar proteínas nativas en sus polipéptidos individuales. Cuando se calienta brevemente una mezcla de proteínas a 100 °C en presencia de SDS, el detergente recubre el polipéptido alrededor de su eje central, manteniéndolo desplegado. En este proceso, las cargas intrínsecas del polipéptido son despreciables en comparación por las aportadas por el SDS. De este modo los polipéptidos se transforman después del tratamiento en estructuras con forma de bastón que poseen una densidad de carga uniforme en toda su longitud. La movilidad de estas proteínas es una función aproximadamente lineal del logaritmo de su masa molecular.

• **Persulfato amónico (APS)** (N2H8S2O8; Mr = 228,2). El APS genera radicales libres y es por ello un iniciador de la reacción de polimerización que finalmente forma el gel.

• **TEMED**, acrónimo de **N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina** (C6H16N2; Mr = 116,21). Se trata de otro iniciador (propagador). La tasa de polimerización y las propiedades del gel resultante dependen de la concentración de APS y TEMED. Aumentando su contenido se disminuye la longitud media de la cadena de polímero y se incrementa la turbidez del gel, al tiempo que disminuye su elasticidad. Por contra, disminuyendo la cantidad de iniciadores se obtiene el efecto inverso. Se debe, por tanto, utilizar la menor concentración posible de catalizadores que permita la polimerización en un tiempo óptimo. Se utiliza APS y TEMED en concentraciones equimolares del orden de 1 a 10 mM.

Reactivos para el procesamiento y la visualización

Se utilizan los siguientes reactivos para el procesamiento del gel y las muestras de proteínas que se visualizan en el:

• **Azul de bromofenol** (BPB, de *bromophenol blue*) (3',3",5',5"-tetrabromofenolsulfoftaleína) (C19H10Br4O5S; Mr = 669,99). Se trata del colorante utilizado más frecuentemente como marcador de avance en electroforesis. Las proteínas y los ácidos nucleicos son mayormente incoloros. Cuando están sometidos a electroforesis es importante detener el avance antes de

que sobrepasen el extremo del gel. El azul de bromofenol es el colorante trazador más empleado porque es viable en pH neutro y alcalino, es una molécula pequeña, es ionizable y posee carga negativa a pH superior a 4,6, de modo que migra al ánodo. Al ser una molécula pequeña se adelanta a la mayor parte de las proteínas y ácidos nucleicos. Cuando el experimentador observa que el colorante alcanza el extremo anódico del gel, debe desconectar la corriente y dar por terminada la separación. Se puede unir débilmente a las proteínas, dotándolas de color azul.

• **Glicerol** (C3H8O3; Mr = 92,09). Debido a su densidad, contribuye a que la muestra quede depositada en los pocillos sin dispersarse.

• **Coomassie Blue** (C45H44N3NaO7S2; Mr = 825,97). El CBB (de *Coomassie Brilliant Blue*, azul brillante de Coomassie) es el colorante para proteínas más popular. Es de tipo aniónico, y se une a proteínas de modo inespecífico. Su estructura es predominantemente no polar, por lo que habitualmente se usa (al 0,025%) en SDS-PAGE 8 disolución con metanol (40%) y acético (7%). Las proteínas del gel se fijan gracias al ácido acético y al mismo tiempo se tiñen. El colorante en exceso que se incorpora en el gel se puede eliminar destiñendo con una disolución de composición idéntica excepto por el colorante. Las proteínas se detectan como bandas azules contra un fondo claro. Puesto que el SDS también es aniónico, puede interferir con el proceso de tinción. Por tanto, se recomienda un gran volumen de disolución de tinción, aproximadamente diez veces el volumen del gel.

• **Butanol** (C4H10O; Mr = 74,12). Se utiliza butanol saturado con agua como disolución de recubrimiento en el gel de resolución.

• **2-Mercaptoetanol** (HS-CH2CH2OH; Mr = 78,13). El 2-mercaptoetanol es un agente reductor que se utiliza para romper los enlaces disulfuro y asegurarse de que la proteína está completamente desnaturalizada antes de ser cargada en el gel, y de ese modo garantizar que corre de manera uniforme.

Anexo 13.5.1 Extracción del veneno

Fig. 17. Colocación de la serpiente *Crotalus basiliscus* en la mesa de extracción

Fig. 18. Extracción manual del veneno

Fig. 19. Obtención del veneno en el embudo de colecta

Fig. 20. Colectando el veneno con pipeta Pasteur

Anexo 13.5.2 Electroforesis 2-D PAGE

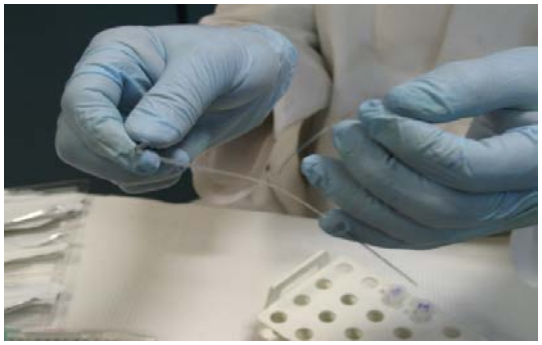


Fig. 21. Separación de las tirillas

Fig. 22.Colocación de las tirillas en los sarcófagos de porcelana

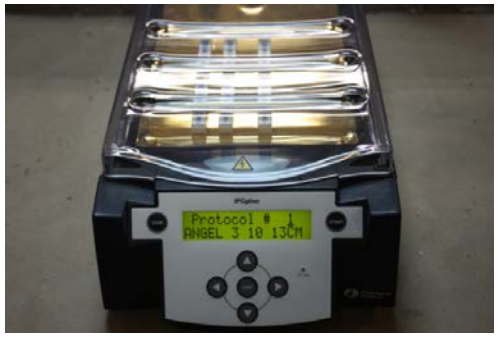


Fig. 23. Separación de proteínas por Isoelectroenfoque

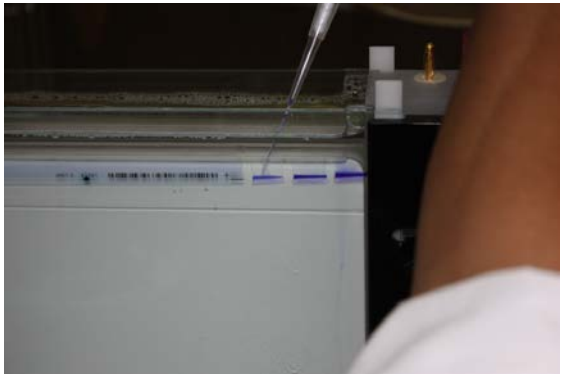


Fig. 24. Montando las tirillas y llenando los pozos en el PAGE 2-D

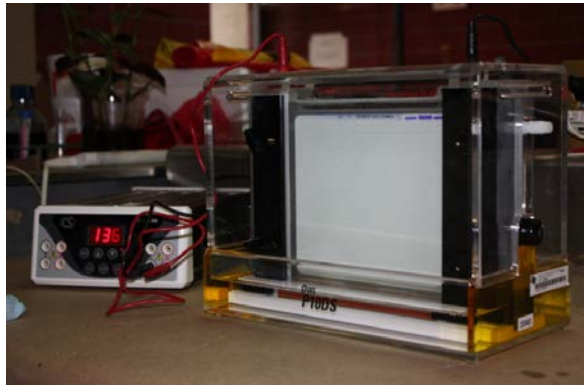


Fig. 25. Cámara de Electroforésis

Anexo 13.6.1 Imágenes por triplicado de Geles en 2D PAGE

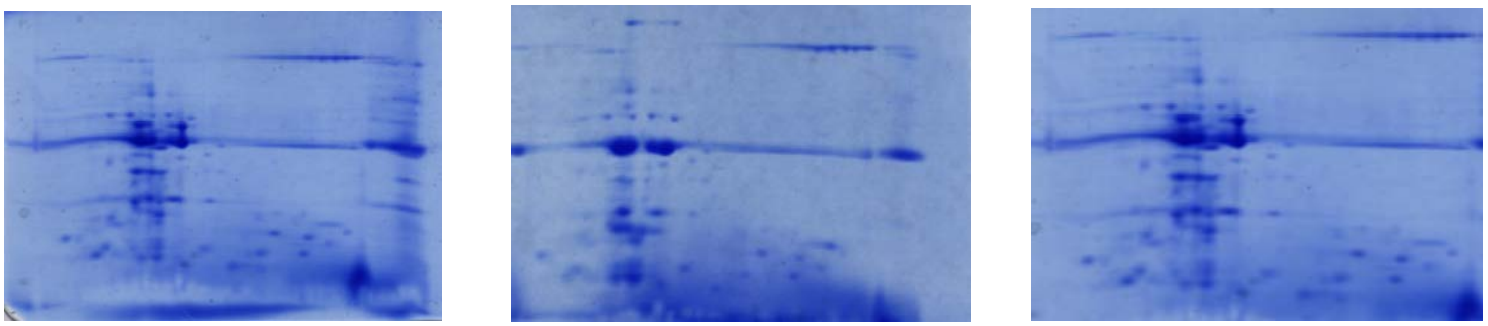


Fig. 26. Imágenes de Geles en 2D PAGE de los venenos de *Crotalus basiliscus* por triplicado

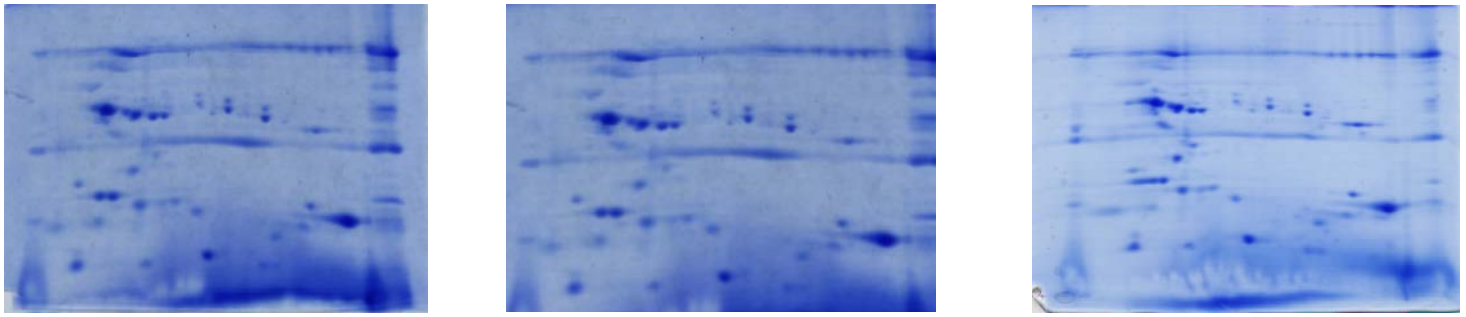


Fig. 27. Imágenes de los Geles en 2D PAGE de los venenos de *Crotalus atrox* por triplicado

Anexo 13.6.2 Imagen del Gel Maestro de *Crotalus basiliscus*.

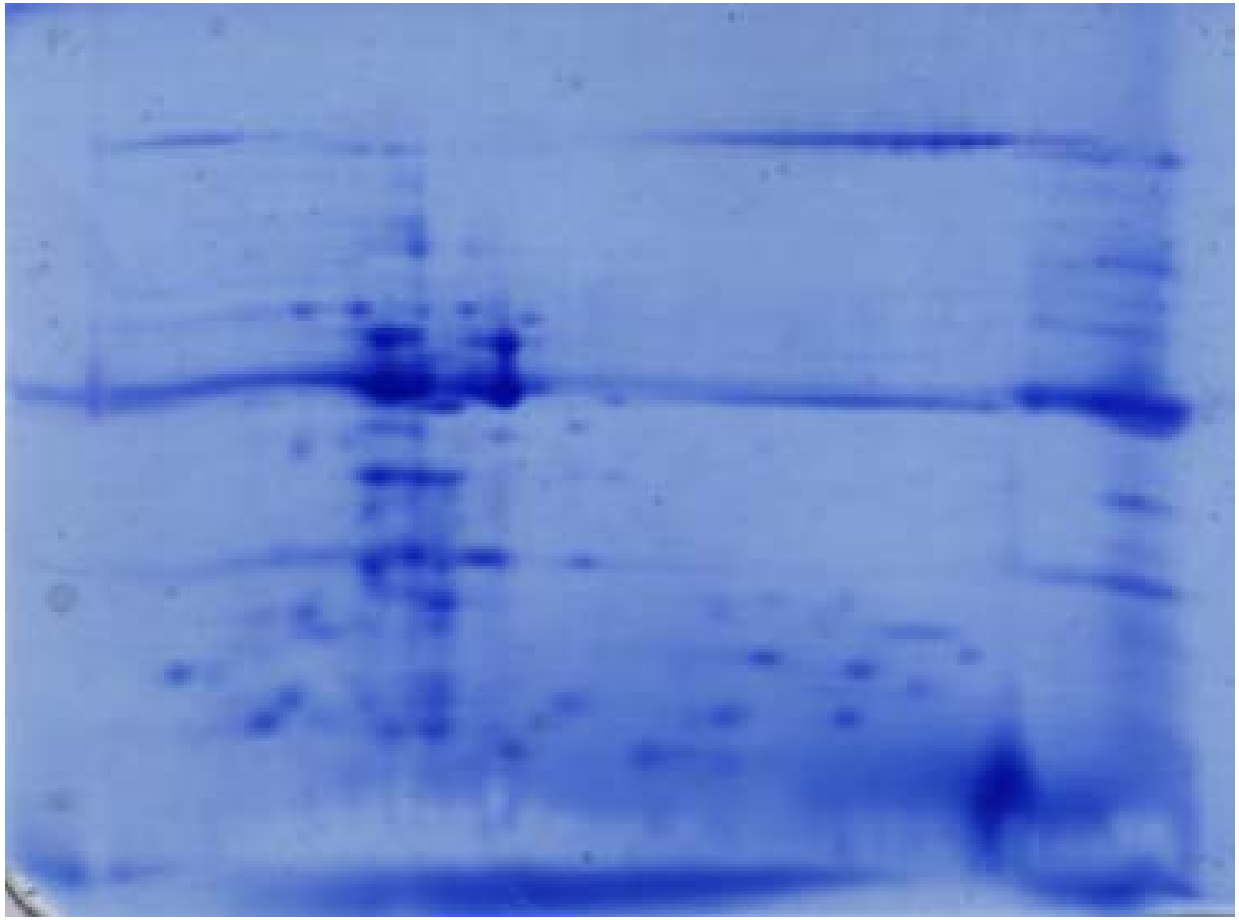


Fig. 28. Imagen del Gel Maestro donde se muestran las proteínas del veneno de *Crotalus basiliscus* separadas en doble dimensión.

Anexo 13.6.3 Imagen del Gel Maestro de *Crotalus atrox*.

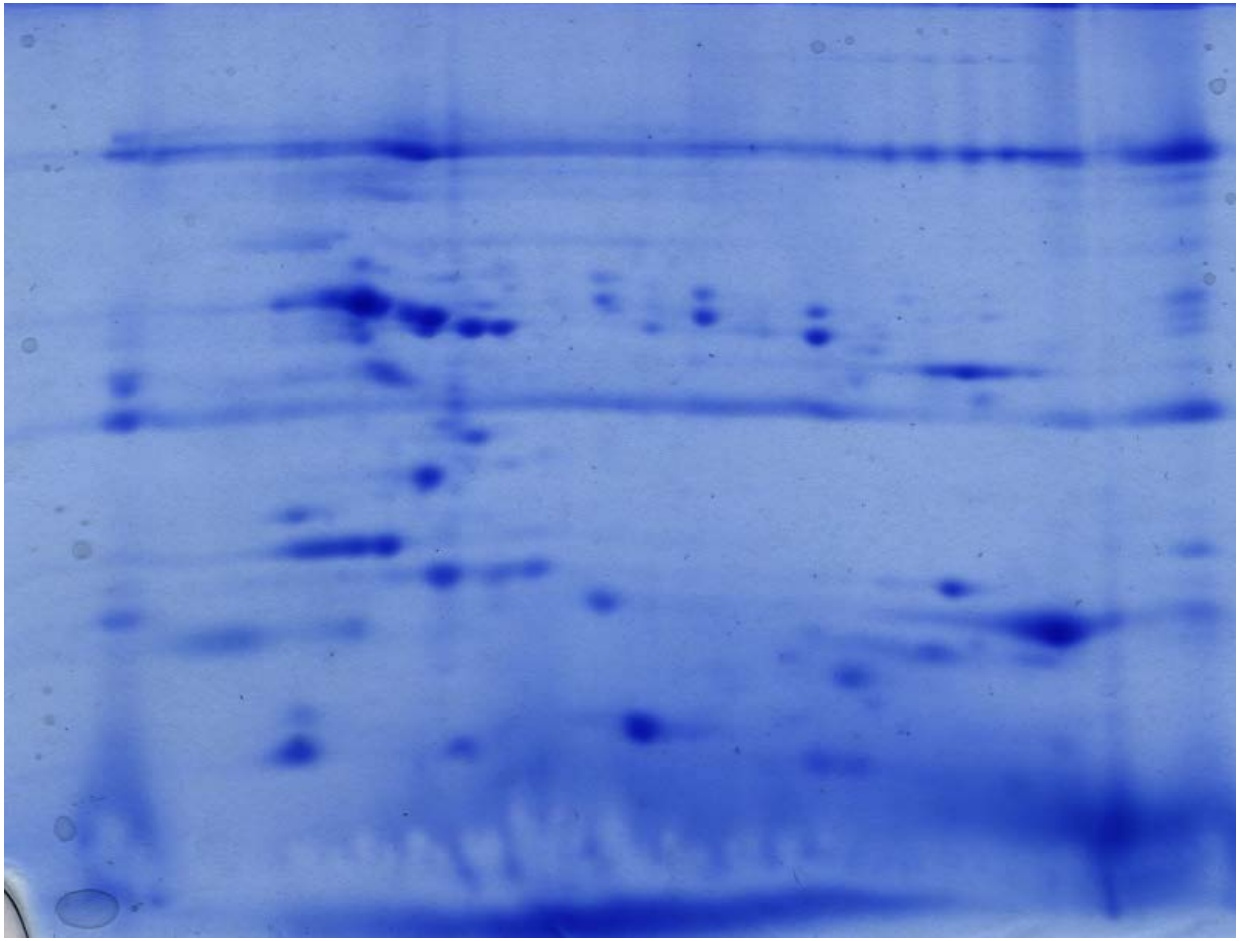


Fig 29. Imagen del Gel Maestro donde se muestran las proteínas del veneno de *Crotalus atrox* separadas en doble dimensión.

Anexo 13.6.4 Imágenes de proteínas del veneno de *Crotalus basiliscus* transferidas por la técnica de Western blot

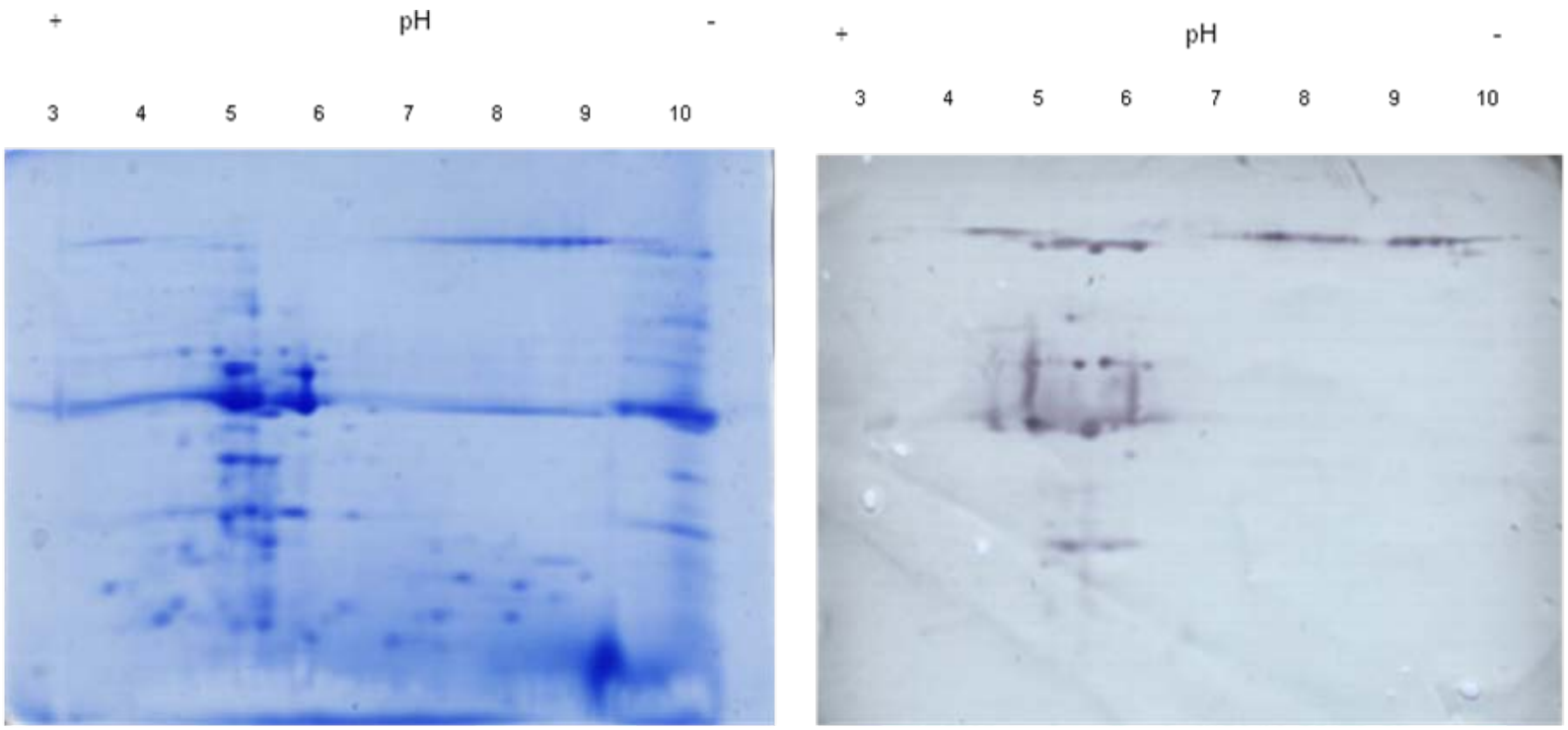


Fig. 30. Imágenes del perfil electroforético de las proteínas del veneno de *Crotalus basiliscus* separadas en gel de poliacrilamida desnaturalizante y reductor al 15% según Laemmli y transferida a nitrocelulosa e inmunodetectada con el faboterápico producido por Birmex.

Anexo 13.6.5 Imágenes de proteínas del veneno de *Crotalus atrox* transferidas por la técnica de Western blot

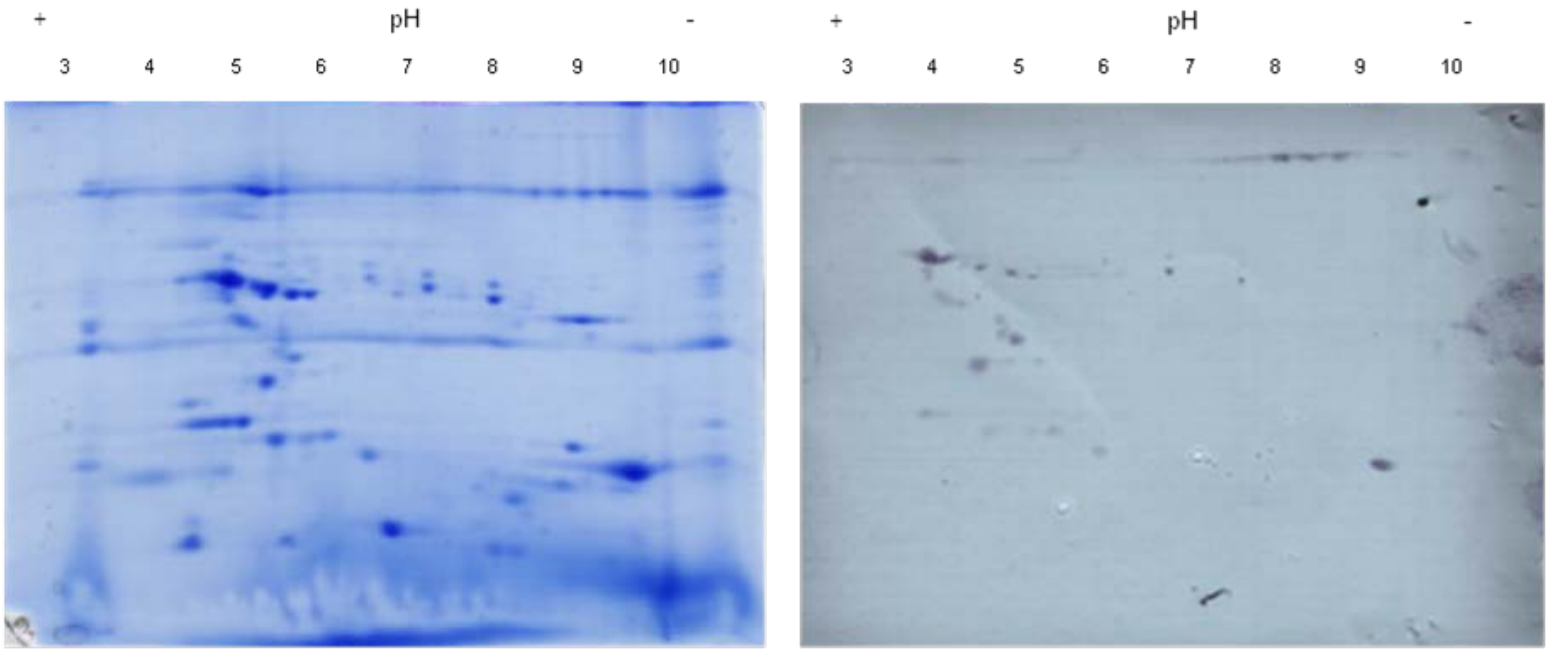


Fig. 31. Imágenes del perfil electroforético de las proteínas de una muestra de veneno de *Crotalus atrox* separadas en gel de poliacrilamida desnaturalizante y reductor al 15% según Laemmli y transferida a nitrocelulosa e inmunodetectada con el faboterápico producido por Birmex.