



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN
DE LA VARIACIÓN ONTOGÉNICA DEL
VENENO DE *Atropoides nummifer*.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

PRESENTA:

BELEM GARCÍA OSORIO

DIRECTOR DE TESIS;

M. en B. EDGAR ENRIQUE NERI CASTRO

CDMX





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

García
Osorio
Belem
(55) 51 08 73 13
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
104005158

2. Datos del tutor

M. en B.
Edgar Enrique
Neri
Castro

3. Datos de sinodal 1

Dr.
Alejandro
Alagón
Cano

4. Datos de sinodal 2

Dra.
Nancy Raquel
Mejía
Domínguez

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Rosario
Ortiz
Hernández

6. Datos del sinodal 4

MVZ
Ricardo Walter
Czaplewski
Cicero

7. Datos del trabajo escrito

Caracterización y determinación de la variación ontogénica del veneno de *Atropoides nummifer*.
86 p.
2016

*"Lo que sabemos es una gota de agua:
lo que ignoramos es el océano"*

-Isaac Newton



YETSERONACK

DEDICATORIA

Con amor, respeto y admiración a mis padres Leticia Osorio y Sergio García, por su apoyo incondicional y enseñanzas de vida. A mi hermano Sergio que siempre ha estado a mi lado alentando cada uno de mis sueños con cariño. A los nuevos miembros de la familia, mi cuñada Antonieta Viveros y sobrina Nay, siempre dispuestas a escucharme y apoyarme incondicionalmente.

Cada uno de ustedes son mi fuerza para cumplir cada meta, todos mis logros son posibles gracias a ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Alejandro Alagón Cano por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme formar parte de su grupo de trabajo, además de sus enseñanzas, consejos y apoyo tanto académico como personal.

A mi tutor y amigo Edgar Neri Castro, por creer en mi y este proyecto que juntos realizamos, sus enseñanzas, consejos, regaños y bromas hicieron de este trabajo una gran aventura.

A la M. en C. Melisa Bénard Valle por sus enseñanzas académicas, paciencia y amistad, así como el apoyo en la traducción y revisión de este proyecto desde sus inicios.

A la colección científica del Instituto de Biotecnología de la UNAM, el herpetario de la Facultad de Biología de la Universidad Veracruzana campus Xalapa a cargo del M. Antonio Heriberto Maruri García y el encargado técnico Biól. Pablo Cobos Mejía, la colección particular del Biól. Luis Alberto López Castro y la colección del Biól. Víctor Vásquez Cruz, la PIMVS "Palancoatl" del Biól. Felipe Agustín Lara Hernández con registro SEMARNAT-PIMVS-CR-IN-0013-VER/13, particularmente a la UMA Desarrollo Comunitario y Vida Silvestre Tequecholapa SEMARNAT-UMA-EX-0170-VER/12 y UMA Estación Ambiental Tequecholapa SEMARNAT-UMA-IN-CR-0165-VER/13 del Biól. Roberto Mora Gallardo y su apreciable familia, por su hospitalidad, apoyo y confianza brindada en este proyecto. Sin la colaboración y confianza de todos ustedes este trabajo no hubiera sido posible.

Agradezco el apoyo administrativo por parte de Angélica Linares Labastida, así como el apoyo técnico de los auxiliares de laboratorio Ricardo Mondragón Cortés y Daniel Gama Hernández.

A los técnicos del laboratorio del Dr. Alejandro Alagón: M. en C. Herlinda Clement Carretero, M. en C. Alejandro Olvera Rodríguez, Biol. Felipe Olvera Rodríguez y Biól. Irving Archundia. A la Dra. Hilda Vázquez López por su apoyo y comentarios.

Al Biól. Luis Román Domínguez y el Biól. Héctor Cardoso Torres, por su paciencia, enseñanzas, apoyo académico y valiosa amistad.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Mariel Valdez, Erick Rivas, Karen Sarmiento, Francia García, Nicolás Elizalde, Ulises Barrón, Miguel Mendoza, Raúl Flores, Felipe Guerrero, Yelisseth Vázquez, Sergio Barcenás y Guillermo de la Rosa, por sus

enseñanzas personales y académicas. En particular, María Fernanda Dzib, Arely Hernández, Ana Rangel y Ana Reséndiz, grandes amigas que hicieron tan comfortable mi estancia en el laboratorio.

A Guadalupe Alarcón y Haydee Rodríguez excepcionales amigas con quienes disfruto grandes momentos, por su apoyo incondicional, consejos, bromas y valiosa amistad. También, agradezco a un gran profesor y amigo Noé Pacheco Coronel, por sus enseñanzas académicas y apoyo personal brindado.

A Marco Navarrete, Andrea Hernández y Elena Díaz, que siempre han estado presentes en mi vida apoyándome con cariño en todo momento.

Al Biól. Luis Enrique Sosa Caballero, agradezco el apoyo personal, amistad y excelente trabajo en los mapas de distribución de *Atropoides nummifer*.

A un talentoso amigo, el Biól. Juan Antonio Espinosa Castro (Yetseronack) por la ilustración de *Atropoides nummifer*.

Al personal técnico del *Herpetario Reptilium* del Zoológico de Zacango, en particular al MVZ Agustín Álvarez Trillo, por su colaboración y apoyo a la investigación.

Al herpetario de la Facultad de Ciencias, U.N.A.M., como reconocimiento ante la labor de divulgación científica y el apoyo a la investigación, en particular la Biól. Mónica Salmerón Estrada que además me brindo sus valiosos comentarios.

Agradecimiento particular a la Dra. Nancy Raquel Mejía Domínguez, por su paciencia y colaboración en las pruebas estadísticas, así como los análisis de resultados.

A mis sinodales la Dra. Nancy Raquel Mejía Domínguez, Dra. Rosario Ortiz Hernández, el Dr. Alejandro Alagón Cano y el MVZ. Esp. Ricardo Walter Czaplewski Cicero, por sus comentarios y aportaciones para mejorar este trabajo.

Al apoyo económico proporcionado por los proyectos DGAPA-IN205214, CONACyT CB-2013-01 No. 221343 y CONACyT INFR-2014 No. 224494

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Clase Reptilia	1
1.2. Suborden Serpentes	2
1.3. Género <i>Atropoides</i> (Werman, 1992)	6
1.4. <i>Atropoides nummifer</i> (Rüppell, 1845)	8
1.5. Aparato venenoso en vipéridos	10
1.6. Composición del veneno en vipéridos	11
1.7. Accidente ofídico	14
2. ANTECEDENTES	16
2.1. Variación intraespecífica en venenos	16
2.2. Estudios de variación en los venenos	16
2.3. Conocimiento del veneno del género <i>Atropoides</i>	23
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. OBJETIVOS	26
5. MATERIAL Y MÉTODOS	27
5.1. Obtención de ejemplares	27
5.2. Extracción de veneno y almacenamiento	28
5.3. Preparación de muestras	28
5.4. Cuantificación de proteínas	29
5.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)	30
5.6. Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)	30
5.7. Actividad proteolítica sobre azocaseína	30
5.8. Actividad fosfolipasa A ₂	31
5.9. Actividad Procoagulante sobre Plasma Humano (DCM-PH)	31
5.10. Dosis Mínima Edematizante (DME)	31
5.11. Dosis Mínima Hemorrágica (DMH)	32

5.12.	Dosis Letal Media (DL ₅₀)	32
5.13.	Dosis Efectiva Media (DE ₅₀)	32
6.14.	Análisis estadísticos	32
6.15.	Modelos biológicos	33
6.	RESULTADOS	34
6.1.	Perfil electroforético por SDS-PAGE	34
6.2.	Perfiles cromatográficos por RP-HPLC	38
6.3.	Actividad proteolítica sobre azocaseína	43
6.4.	Actividad fosfolipasa A ₂	44
6.5.	Actividad procoagulante	45
6.6.	Actividad edematizante	46
6.7.	Actividad hemorrágica	48
6.8.	Potencia letal	49
6.9.	Potencia neutralizante por "Viper Stat"	50
7.	DISCUSIÓN	51
7.1.	Perfiles electroforéticos por SDS-PAGE	51
7.2.	Perfiles cromatográficos por RP-HPLC	52
7.3.	Actividad proteolítica	55
7.4.	Actividad fosfolipasa A ₂	56
7.5.	Actividad procoagulante	56
7.6.	Actividad edematizante	57
7.7.	Actividad hemorrágica	57
7.8.	Potencia letal	58
7.9.	Potencia neutralizante por "Viper Stat"	59
8.	CONCLUSIONES	60
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
10.	ANEXOS	70

ABREVIATURAS

A₂₈₀ nm: absorbancia a 280 nanómetros

BCA: ácido bicinconínicico

°C: grados celsius

Ca²⁺: calcio

CaCl₂: cloruro de calcio

CH₃CN: acetonitrilo

C₂H₆O: etanol

cm: centímetros

CO₂: dióxido de carbono

Cu¹⁺: ion cuproso

Cu²⁺: ion cúprico

DE₅₀: dosis efectiva media

DL₅₀: dosis letal media

DMC-PH: dosis mínima procoagulante sobre plasma humano

DME: dosis mínima edematizante

DMH: dosis mínima hemorrágica

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

g: gramo

HCl: ácido clorhídrico

hrs: horas

H₂O: agua

kDa: kilo Dalton

min: minuto

M: molar

μEq/min.mg: equivalente de NaOH consumidos por microgramos por minuto

mg: miligramo

μg: microgramo

mgAV/2DL₅₀: miligramo de antiveneno por dos dosis letales medias

mgAV/mgV: miligramo de antiveneno por miligramo de veneno

mg/g: miligramo por gramo

mg/kg: miligramos por kilogramo

μg/mL: microgramos por mililitro

mgV/mLs: miligramos de veneno por mililitros de suero

mgV/ratón: miligramo de veneno por ratón

μgV/ratón: microgramo de veneno por ratón

mM: milimolar

μm: micrómetro

mm: milímetros

mL: mililitro

$\mu\text{I}/3\text{DL}_{50}$: microlitros de antiveneno por tres dosis letales medias

$\mu\text{l}/\text{mgV}$: microlitros de antiveneno por miligramo de veneno

mL/min : mililitro por minuto **μl** : microlitro

MPM: marcador de peso molecular

m.s.n.m: metros sobre el nivel del mar

NaCl: cloruro de sodio

NaOH: hidróxido de sodio

$\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$: nanomoles por minuto por miligramo

PAGE: gel de poliacrilamida

pH: potencial de hidrogeno

RP-HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa

rpm: revoluciones por minuto

SDS: dodecil sulfato de sodio

seg: segundos

spp: especies

TEMED: tetrametiletiléndiamina

TFA: ácido trifluoroacético

U/mgV : unidades de actividad por miligramos de veneno

$\text{U}/\text{min}/\text{mgV}$: unidades de actividad por minuto por miligramos de veneno

V: volts

RESUMEN

La serpiente *Atropoides nummifer* conocida como "*Mano de metate*", es una especie endémica de México que no supera los 60 cm de largo (Campbell y Lamar, 2004). Se desconoce gran parte de su biología así como la composición de su veneno, sin embargo, en el Hospital general del estado de Veracruz se reportan envenenamientos ocasionados por el género *Atropoides*, por lo tanto, es importante caracterizar su veneno.

Se obtuvieron los perfiles electroforéticos (SDS-PAGE) del veneno de 27 individuos de la especie *A. nummifer* de distintas edades así como los perfiles de mezclas de venenos. Los grupos fueron: a) crías, veneno de 11 individuos con menos de 12 meses; b) juveniles, veneno de 3 individuos con 18 meses y c) adultos, veneno de 13 individuos con más de 24 meses. Posteriormente se realizaron los perfiles cromatográficos (RP-HPLC) del veneno por grupo y se colectaron las fracciones para obtener su perfil proteico (SDS-PAGE).

Los perfiles electroforéticos y cromatográficos mostraron diferentes patrones entre los grupos definidos para *A. nummifer*. El veneno de *Atropoides nummifer* presentó variación ontogénica, presentando diferencias significativas para la actividad proteolítica, fosfolipasa A₂, procoagulante, edematizante y potencia letal. El veneno de juveniles presentó la mayor actividad proteolítica, procoagulante, hemorrágica, edematizante y potencia letal, mientras que el veneno de adultos presentó la mayor actividad fosfolipasa A₂. Por otro lado, el veneno de crías no presentó actividad fosfolipasa A₂ ni procoagulante.

El veneno de *Atropoides nummifer* es menos letal que muchos vipéridos de América Central, sin embargo, los daños locales pueden ser de importancia medica. Nuestro estudio permite predecir el cuadro clínico durante el envenenamiento, el cual involucraría hemorragias y posibles efectos miotóxicos, aunque aún no se han documentado observaciones de esto último en casos clínicos.

ABSTRAC

Atropoides nummifer, also known as “Mano de metate”, is an endemic snake species from México whose body length is under 60 cm (Campbell and Lamar, 2004). To this day, a lot is unknown about its biology as well as the characteristics of its venom. Given that there are reported cases of envenomation caused by these snakes in the main state hospital of Veracruz, Mexico, the characterization of their venoms is relevant from the clinical point of view.

In the present work, the venom from 27 individual snakes as well as venom pools were analyzed through their electrophoretic (SDS-PAGE) profiles. The pools were generated as follows: a.) Infant, consisting of 11 individuals under 12 months old; b.) Juvenile, consisting of 3 individuals of approximately 18 months and c.) Adults, consisting of 13 individuals over 24 months old.

Chromatographic profiles were later generated for each group and the obtained fractions were subsequently analyzed by SDS-PAGE. These profiles showed significant differences between *A. nummifer* age groups. Also, significant differences between the groups were found in terms of proteolytic and PLA₂ activities as well as lethal potency, procoagulant and edema forming activity. The juvenile group presented the highest lethal potency and had higher proteolytic, procoagulant, haemorrhagic and edema forming activities while the adult venoms had higher PLA₂ activity. Finally, the infant group lacked procoagulant and PLA₂ activity.

Atropoides nummifer venom has a lower lethal potency than most Central American pitvipers; nonetheless, local damage during envenomation caused by this species can be severe. This study allows the prediction of the clinical syndrome generated during envenomation, which could involve hemorrhage as well as miotoxicity, even though this last symptom has never been documented in a clinical case.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Clase Reptilia

La clase Reptilia la comprenden organismos vertebrados que se caracteriza por presentar escamas epidérmicas fuertemente queratinizadas, que sirven como protección contra la desecación. Este grupo carece de glándulas en el tegumento (excepto *Rhabdophis tigrinus*) y tiene poca vascularización en los tejidos (O'Malley, 2007). Los músculos de la mandíbula en reptiles son especializados, debido a que están abultados en las aberturas craneales, por lo tanto, pueden ocasionar fuertes mordeduras. (Hickman et al., 2001). Todos los reptiles son organismos amniotas que se reproducen por fecundación interna, dependiendo de la especie pueden desarrollarse por dos mecanismos: los ovíparos aquellos que forman un huevo, y los vivíparos que nacen como individuos completamente formados (Mondadori, 1990; Vitt et al., 2009).

Los reptiles se dividen en cuatro ordenes (Figura 1): a) Testudines, integrado por aproximadamente 341 especies de tortugas; b) Rhynchocephalia, grupo primitivo representado por una sola especie de tuatara, con distribución restringida en Nueva Zelanda; c) Cocodrilia con 25 spp, integrado por los cocodrilos, caimanes y gaviales; d) Squamata, se divide en tres subórdenes, Sauria que incluye a las lagartijas con 6, 145 spp, Serpentes que engloba a todas las serpientes y se reportan 3, 567 spp, por último, el suborden Amphisbaenia con 193 spp, conocidas como serpientes ciegas (Miller y Harley, 2001; Flores y García, 2014, Uetz et al., 2015).

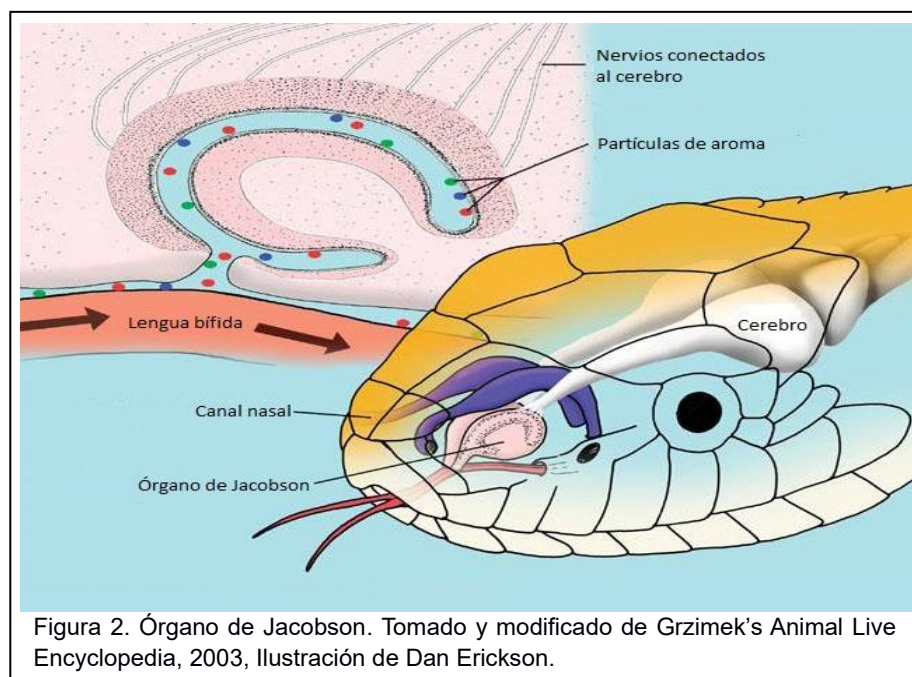


Figura 1. Representantes de la clase Reptilia: a) Testudines (*Rhinoclemmys* sp.) Foto de García B., b) Rhynchocephalia (*Sphenodon punctatus*) Foto de Marris J., tomada de Arkive, c) Cocodrilia (*Cocodrilo moreletti*) Foto de Navarro J., d) Squamata suborden Serpentes (*Crotalus simus*) Foto de García B.

La gran diversidad biológica del país, es producto de la historia geológica compleja que integra la topografía, hidrología y localización geográfica entre Norteamérica y Sudamérica, lo cual favorece las diversas condiciones ambientales y climáticas que proporcionan diferentes microambientes para las especies de flora y fauna (Flores y Gerez, 1994). Los reptiles en México son un grupo muy importante integrado por 864 spp reportadas que representan 8.7% de reptiles a nivel mundial. Además, alrededor del 57% de las especies de México son endémicas (Flores y García, 2014).

1.2. Suborden Serpentes

El suborden Serpentes se caracteriza por presentar un cuerpo alargado y cilíndrico, carecen de extremidades, esternón y cadera pélvica, algunas especies de boas y pitones presentan vestigios de esta última. Las costillas en serpientes son cortas y anchas, es decir, están libres debido a que carecen de esternón. La columna vertebral es rígida y está protegida por una serie de músculos que rodean todo el cuerpo, permitiendo un movimiento ondulatorio lateral para desplazarse en todo tipo de terreno (Hickman *et al.*, 2001). Además, las serpientes poseen un cráneo muy articulado y músculos mandibulares adaptados, ambas modificaciones permiten ingerir presas de mayor tamaño que el diámetro de su cabeza. El órgano de Jacobson o sistema vomeronasal (Figura 2), es un sistema sensorial para detectar presas y depredadores, éste se aloja en la parte central del paladar y detecta las partículas de aroma tomadas por la lengua bífida (Miller y Gutzke, 1999; Hickman, 2001).



A diferencia de la mayoría de los reptiles, las serpientes presentan una escama transparente que protege los ojos llamada membrana nictitante (O'Malley, 2007). En serpientes, el sistema auditivo no se encuentra bien desarrollado, y únicamente presenta el hueso estribo que colinda con el hueso cuadrado, el cual recibe las vibraciones externas (Vitt y Caldwell, 2009).

Actualmente, en el mundo se han descrito 3, 567 especies de serpientes de las cuales 393 especies se distribuyen en México (Uetz *et al.*, 2015; Flores y García, 2014). El suborden Serpentes para México se divide en nueve Familias: *Boidae*, *Colubridae*, *Dipsadidae*, *Elapidae*, *Leptotyphlopidae*, *Loxocemidae*, *Natricidae*, *Typhlopidae* y *Viperidae*.

En México, se distribuyen tres familias de serpientes venenosas:

- 1) Familia Colubridae, comúnmente llamadas culebras, engloba una gran cantidad de especies, de las cuales sólo una parte poseen secreciones tóxicas. Presentan variedad de tallas que pueden ir desde 430 mm en la especie *Ficimia variegatus* hasta 3000 mm en *Spilotes pullatus* (Pérez *et al.*, 2007). Todos los colúbridos tienen grandes escamas ventrales y dorsales que pueden ser suaves o rígidas (Werley *et al.*, 2000). En la mayoría de especies, poseen ojos grandes con pupilas redondas, hocico redondeado y la cabeza diferenciada del cuerpo. Los dientes son fijos y de la misma longitud con una ligera inclinación hacia la parte posterior de la mandíbula, en algunas especies presentan un par de dientes maxilares acanalados (canal estrecho) que esta conectado a una pequeña glándula "primitiva" especializada en producción de veneno llamada glándula de Duvernoy (Duque *et al.*, 2007). Sin embargo, muchas de ellas utilizan como método de caza la "constricción", envolviendo su cuerpo alrededor de la presa y provocando la muerte por interrupción del flujo sanguíneo (O'Shea, 2007; Boback *et al.*, 2015).
- 2) Familia Elapidae, está integrada por los géneros *Micruroides* y *Micrurus*, conocidas como serpientes de coral o coralillo, son serpientes de talla pequeña, delgadas y alargadas (Fernández *et al.*, 2011). La cabeza no se diferencia del cuerpo, el ojo es pequeño y tiene la pupila redonda. Los patrones de coloración varían ampliamente por lo que no existe una regla general para México que permita diferenciar los "falsos coralillos" que son colúbridos no venenosos, de los

"verdaderos". La característica más importante para reconocer a un coralillo verdadero es la ausencia de la escama loreal (Figura 3). Por otro lado, la subfamilia *Hydrophinae* se encuentra representada por una especie de serpiente marina, *Hydrophis platurus* (Sanders *et al.*, 2012) distribuida en el océano Pacífico. Esta serpiente presenta adaptaciones a la vida acuática entre las cuales podemos mencionar, el cuerpo comprimido de forma transversal en la sección terminal, la cual funciona como "aleta" para impulsarse en el agua, escamas ventrales pequeñas y lisas (Campbell y Lamar, 2004).

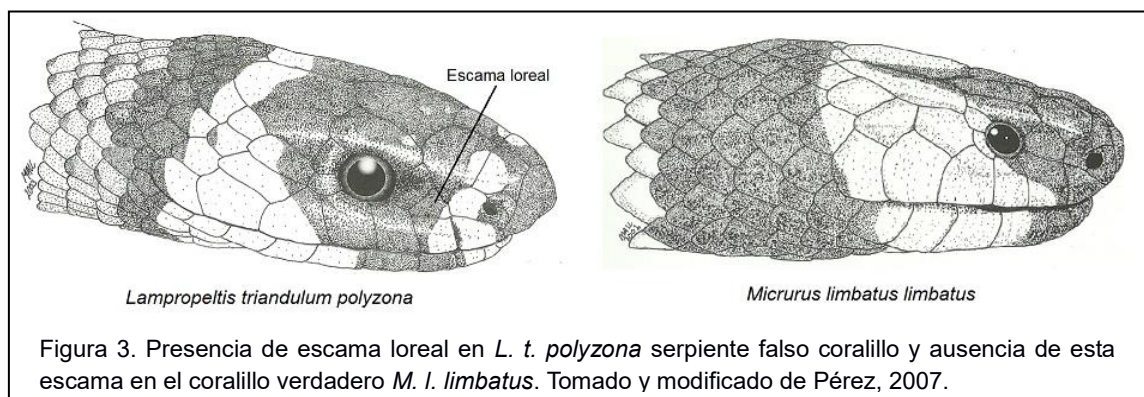


Figura 3. Presencia de escama loreal en *L. t. polyzona* serpiente falso coralillo y ausencia de esta escama en el coralillo verdadero *M. l. limbatus*. Tomado y modificado de Pérez, 2007.

En esta familia, las glándulas de veneno se localizan en la región temporal debajo de los ojos. Ambas glándulas están conectadas a un par de dientes fijos y con poca movilidad (Luna *et al.*, 2008). Los "colmillos" en serpientes coralillo presentan un tamaño aproximado de 3 mm de largo (Monje, 2007).

- 3) Familia Viperidae, conocidas como víboras, todas sus representantes son venenosas. Presentan un cuerpo robusto, cola corta, cabeza triangular perfectamente diferenciada del cuerpo y pupila vertical (Russell *et al.*, 1997; Fernández *et al.*, 2011). El hueso maxilar está asociado a un par de "colmillos" superiores que presentan un movimiento independiente y rotatorio mayor a los 180° sobre el eje antero-posterior de la cabeza (Mattison, 1996). Los vipéridos se divide en tres subfamilias Azemiopinae, Viperinae y Crotalinae. La subfamilia Crotalinae es la más amplia y esta representada por diez géneros: *Agkistrodon*, *Atropoides*, *Bothriechis*, *Bothrops*, *Cerrophidion*, *Crotalus*, *Mixcoatlus*, *Ophryacus*, *Porthidium* y *Sistrurus*. Las especies de los géneros *Crotalus* y *Bothrops* se encuentran prácticamente en todo el continente Americano, mientras que *Agkistrodon* y *Sistrurus* presentan distribución restringida a Norteamérica. Por otro

lado, los géneros *Bothriechis*, *Cerrophidion*, *Porthidium* y *Atropoides* se distribuyen principalmente en Centroamérica (Campbell y Lamar, 2004).

Tipos de dentición

Existen cuatro tipos de dentición (Figura 4):

- a) Aglifa: caracterizado por la ausencia de glándula de veneno y “colmillos”, presentan una línea de dientes curvos en hileras consecutivas desde la parte posterior a la anterior. Este tipo de dentición permite sujetar con firmeza a la presa, y está presente en la familia Boidae, Dipsadidae y en la gran mayoría de las especies de Colubridae, entre otras familias.
- b) Opistoglifa: se caracteriza por un par de dientes alargados ubicados en la parte posterior del maxilar, se encuentran conectados por un pequeño conducto a la glándula de Duvernoy. Este tipo de dentición esta presente en algunas especies del género *Trimorphodon*, *Oxybelis* y *Conophis*, entre otras.
- c) Proteroglifa: presenta un par de colmillos relativamente fijos conectados directamente con las glándulas de veneno por medio de un pequeño conducto, están asociados al hueso maxilar que se ubican en la parte anterior de la mandíbula. Tipo de dentición característica de elápidos.
- d) Solenoglifa: consta de un par de “colmillos” en la parte frontal del hueso maxilar que permite un amplio movimiento característico del grupo de los vipéridos, de manera que cuando la boca de la víbora se cierra el par de colmillos son plegados hacia el paladar superior y al abrirla se proyectan hacia afuera. Este tipo de dentición es característico de la familia Viperidae.

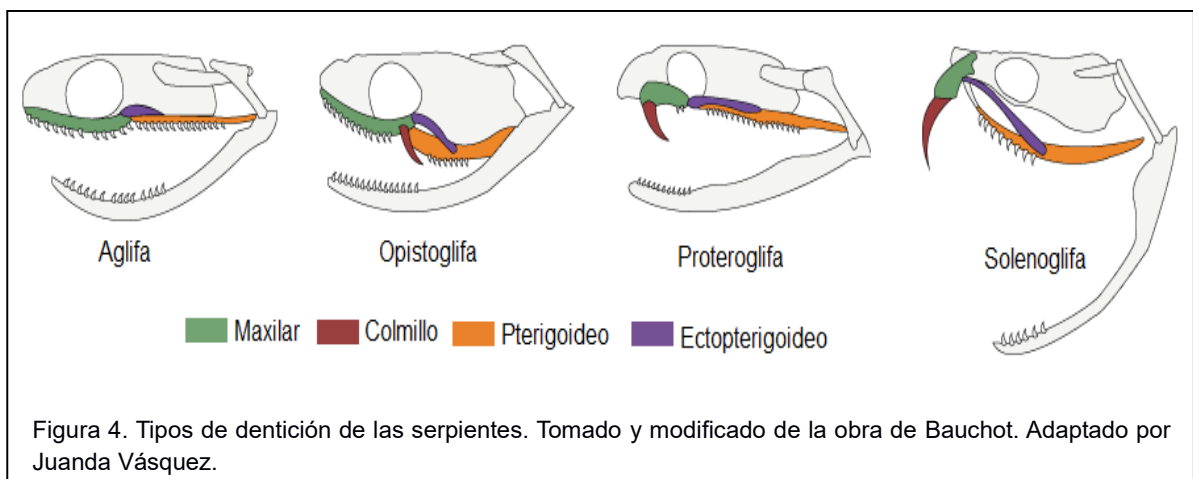


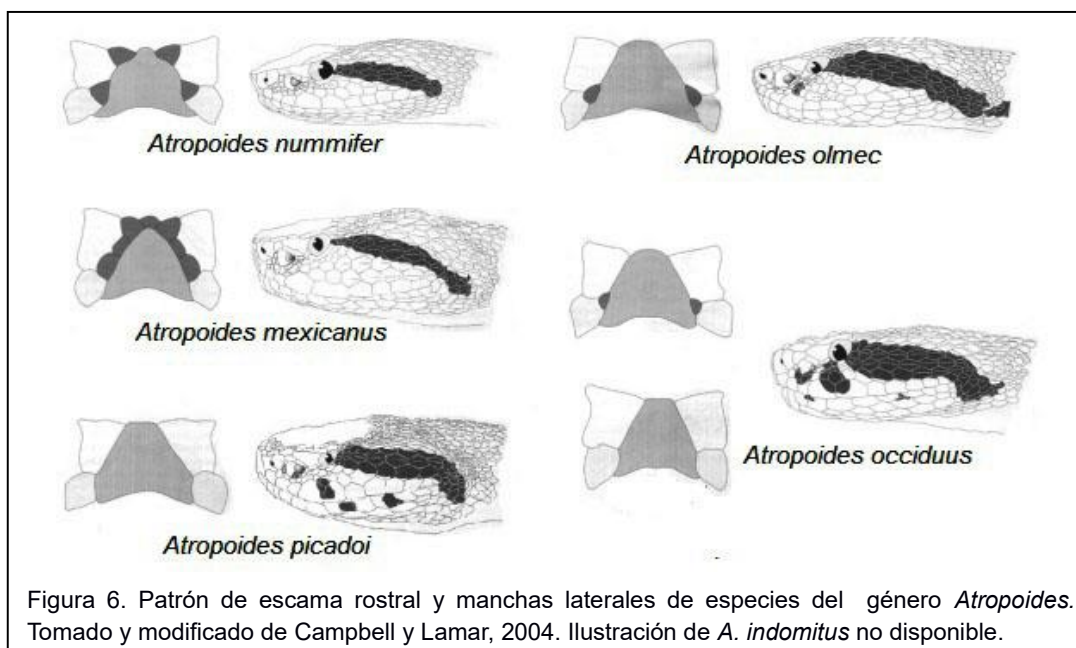
Figura 4. Tipos de dentición de las serpientes. Tomado y modificado de la obra de Bauchot. Adaptado por Juanda Vásquez.

1.3. Género *Atropoides* (Werman, 1992)

El género *Atropoides* está comprendido por seis especies: *A. nummifer*, *A. mexicanus*, *A. occidus*, *A. picadoi*, *A. olmec* y *A. indomitus*, esta última descrita por primera vez por Smith y Ferrari en el 2008. Las principales características del género son: cuerpo extremadamente robusto con manchas dorsales y laterales, cola corta, cabeza larga, hocico ancho y franjas postoculares oscuras (Figura 5).



El patrón de escamas rostrales, mancha postocular y distribución geográfica son los parámetros más importantes para la identificación entre especies (Campbell y Lamar, 2004). En general, todas las especies presentan una escama rostral de mayor tamaño, dos escamas superiores, y dos escamas inferiores de menor tamaño, la diferencia entre cada especie es la presencia o ausencia de una serie de escamas pequeñas que se encuentran en las secciones intermedias (Figura 6).



Su distribución (Figura 7) es del Noroeste de México hacia el sur de Centroamérica hasta el centro de Panamá (Campbell y Lamar, 2004). Es un género de carácter “tranquilo”, sin embargo, cuando se siente amenazadas pueden lanzar hasta la mitad de su cuerpo hacia adelante en un impulso, por lo cual ha adquirido el nombre de víboras saltadoras o “jumping viper” (López *et al.*, 2006).

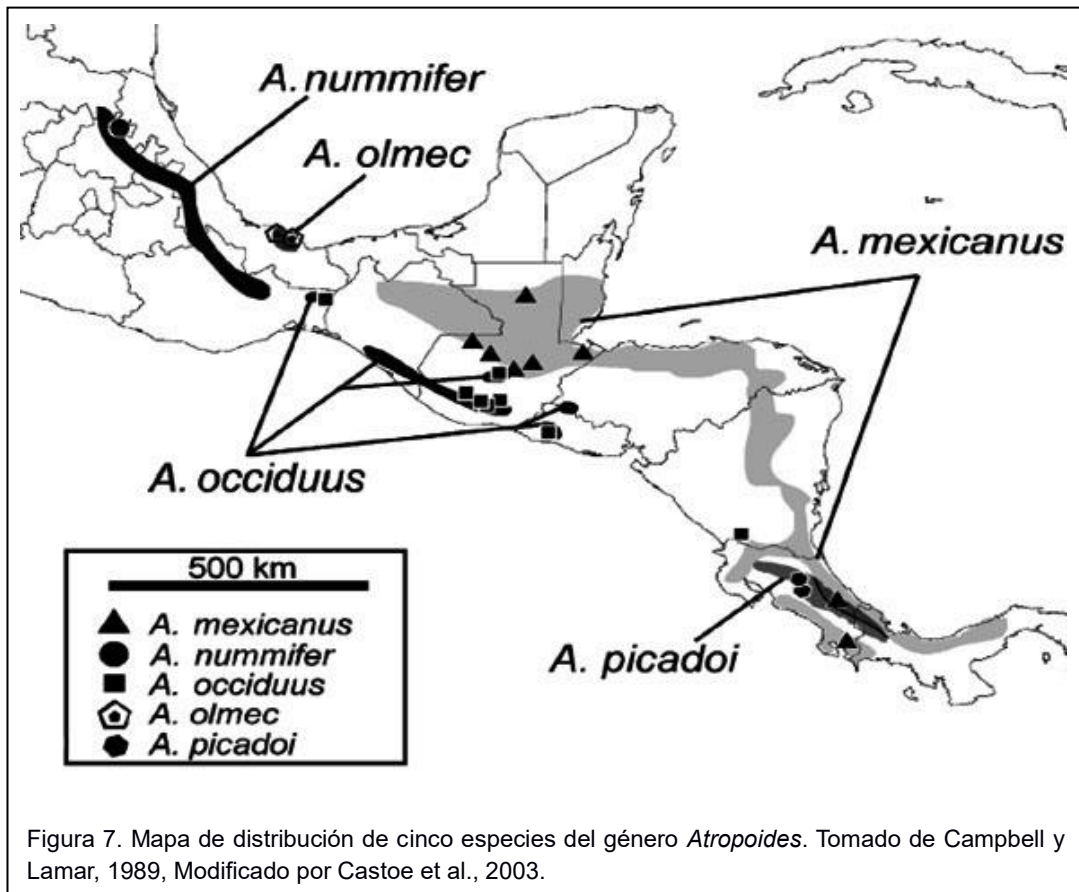


Figura 7. Mapa de distribución de cinco especies del género *Atropoides*. Tomado de Campbell y Lamar, 1989, Modificado por Castoe et al., 2003.

1.4. *Atropoides nummifer* (Rüppell, 1845)

La especie *A. nummifer* ha sufrido una serie de cambios taxonómicos. Inicialmente clasificada por Rüppell en 1845 con el nombre científico de *Atropos nummifer*, algunos de los cambios la han agrupado en los géneros *Bothriechis* (Cope, 1861), *Bothrops* (Jan y Sordelli, 1875), *Lachesis* (Boulenger, 1896), *Trimeresurus* (Dunn, 1939), *Porthidium* (Campbell y Lamar, 1989), entre otros. En la actualidad se reconoce como *Atropoides nummifer* asignado por Werman en 1992, y las subespecies *A. n. mexicanus* y *A. n. occiduus* se elevaron a nivel de especie (Campbell y Lamar, 2004; Uetz *et al.*, 2015).



Figura 8. Ilustración de *Atropoides nummifer*. Realizado por Espinosa Castro J.

Atropoides nummifer (Figura 8) conocida como mano de metate, nauyaca saltadora o tepocho (Campbell y Lamar, 2004; Ramírez *et al.*, 2004) es una serpiente terrestre de talla mediana, en adultos alcanza una longitud de 35 a 60 cm. El color del cuerpo puede variar de pardo, pardo oscuro y gris pálido, aunque algunos ejemplares en Oaxaca y Veracruz tienen una coloración más oscura (Campbell y Lamar, 2004; experiencia personal; Figura 9). La forma de la cabeza es moderadamente triangular y con una línea lateral oscura en la cabeza desde la parte posterior del ojo hacia el final de la mandíbula (Fernández *et al.*, 2011).

Se alimenta principalmente de animales pequeños tales como ranas, roedores y lagartijas (Campbell y Lamar, 2004). Su distribución incluye los estados de San Luis Potosí, Hidalgo, Veracruz, Puebla, Oaxaca y Querétaro (Campbell y Lamar, 2004; López, 2006;

Figura 10). Su hábitat son los bosques mesófilos y bosques de pino en latitudes de 670 a 1, 800 m.s.n.m. (Campbell y Lamar, 2004).

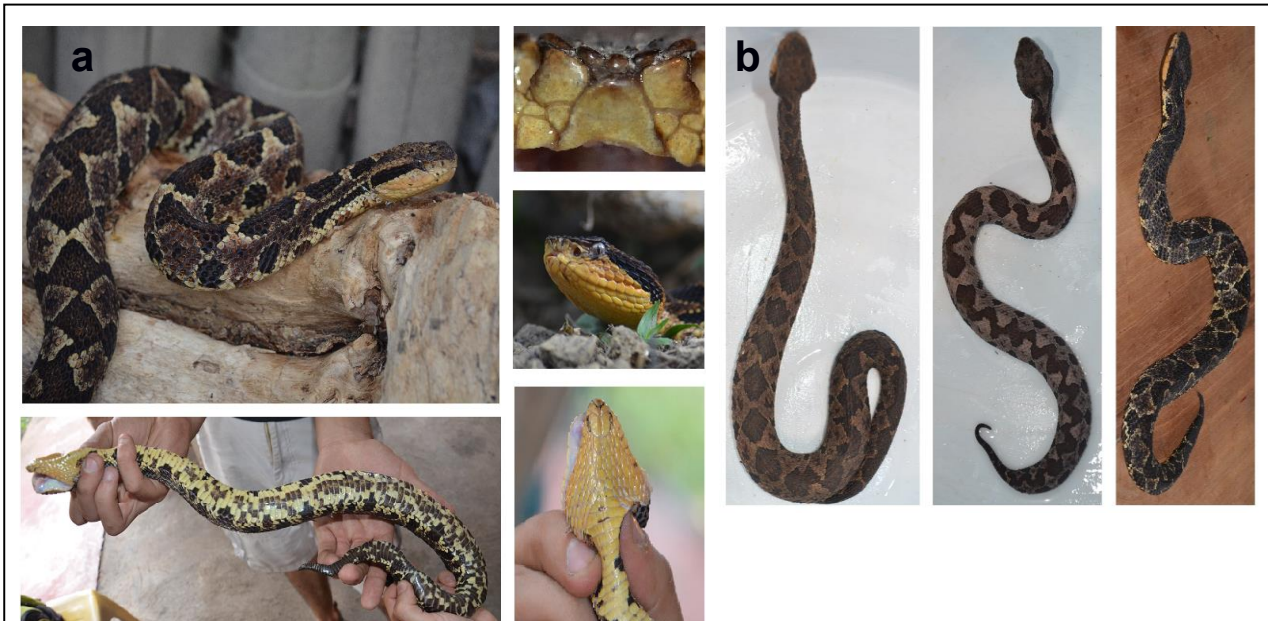


Figura 9. Fotografías de *Atropoides nummifer* de Córdoba, Veracruz: a) Patrón de escamas, b) Variación en la coloración. Tomadas por Neri Castro E. y García Osorio B., 2014.

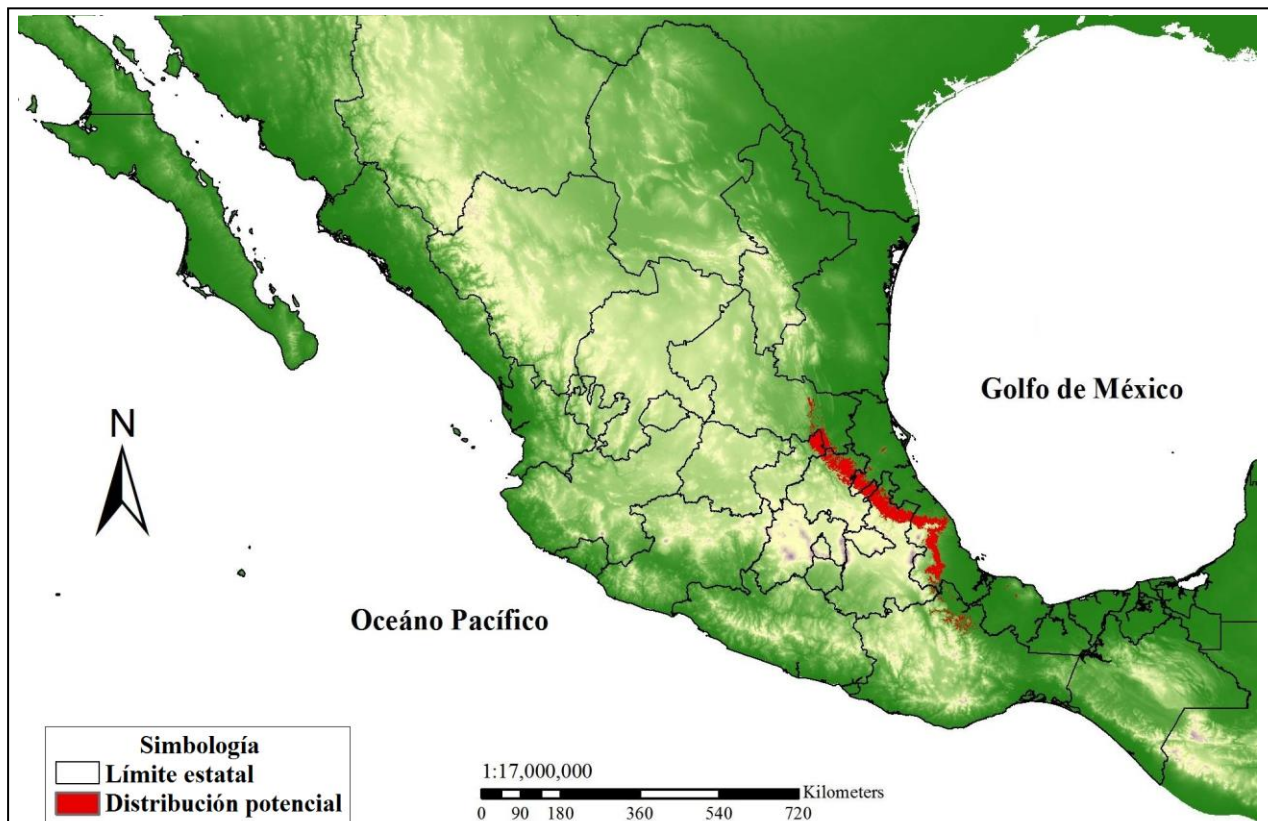


Figura 10. Mapa de distribución potencial de *Atropoides nummifer*. Realizado por Sosa Caballero L., 2016.

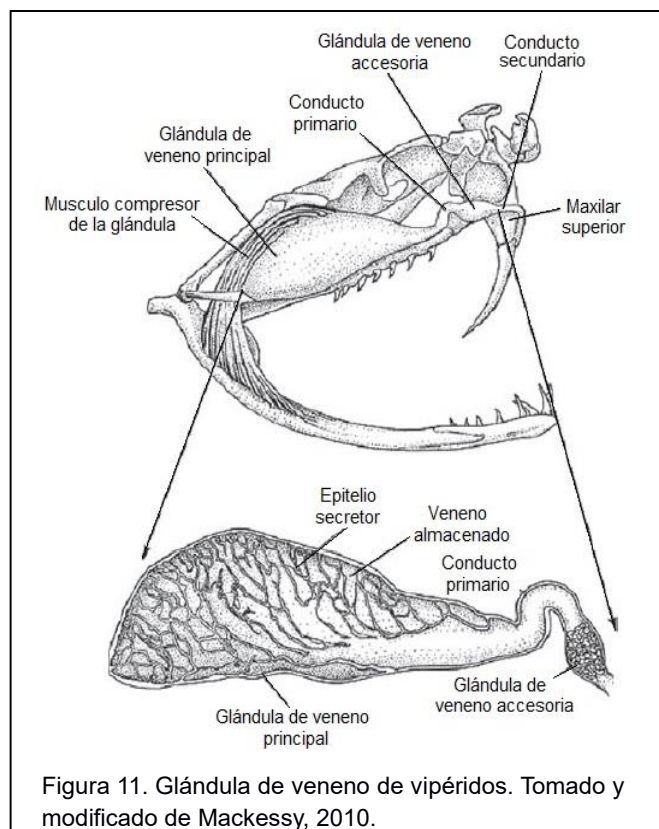
1.5. Aparato venenoso en vipéridos

Existen ciertas diferencias morfológicas en el aparato venenoso de elápidos y vipéridos, sin embargo comparten una forma similar compuesta por colmillos, glándula principal de veneno y glándula accesoria (Mackessy, 2010). Las glándulas de veneno son glándulas salivales modificadas, el tipo de secreción fue modificado filogenéticamente de una secreción mucosa a seromucosa, y posteriormente serosa (de Roodt, 2002).

El aparato venenoso de las serpientes es el conjunto de elementos anatómicos implicados en el proceso de inoculación de veneno (Kochva, 1987), en particular el aparato venenoso de vipéridos se integra por las siguientes estructuras anatómicas (Figura 11):

Estructura craneal

El cráneo de los vipéridos está articulado, lo cual le permite flexionar asimétricamente y dar cava a presas de gran tamaño; la mandíbula inferior se divide en dos secciones unidas por músculos y piel. En la mandíbula superior se encuentra el hueso maxilar donde se localiza un colmillo articulado, protegidos por una membrana carnosa que permite el plegamiento a la parte posterior de la mandíbula cuando el hocico esta cerrado, al abrir el hocico el hueso maxilar se puede girar en un arco superior a 180°, permitiendo que los “colmillos” se erecten y puedan ser dirigidos al sitio blanco (Mattison, 1996).



Glándula de veneno

En las serpientes venenosas se encuentran dos glándulas de veneno, localizadas a ambos lados de la cabeza, detrás de los ojos y sobre el maxilar superior. Las glándulas presentan células columnares con actividad secretora apical granular y secreción mucosa las cuales contribuyen a la producción de componentes del veneno, que posteriormente son almacenados en el lumen basal. Algunos componentes del veneno son estabilizados mediante pH bajo, regulado por células de las glándulas ricas en mitocondrias que acidifican la mezcla y por inhibidores endógenos que impiden la actividad enzimática del veneno almacenado (Mackessy, 2010). El veneno es transportado por un conducto de la glándula principal hacia la glándula accesoria, que a su vez esta conectada al canal interior del “colmillo” donde el veneno puede ser inoculado en los tejidos de la presa. La cantidad de veneno inoculado oscila entre 5 y 600 mg y depende de una gran cantidad de factores, entre ellos la especie, tamaño, estado de salud de la serpiente y la fuerza de los músculos compresores que ejerce sobre la glándula de veneno. (López, 2010; Neri, 2013).

1.6. Composición del veneno en vipéridos

La función principal del veneno es matar o paralizar la presa e iniciar el proceso de predigestión en los tejidos. En algunas circunstancias es utilizado como mecanismo de defensa contra los depredadores.

El veneno es una mezcla compleja de diferentes componentes, presenta una consistencia viscosa y puede ser incoloro o amarillento. Los componentes proteicos representan cerca del 95% del peso seco, el resto corresponde a componentes minoritarios que pueden ser lípidos, minerales, hidratos de carbono y ácidos nucleicos (Markland, 1998; Pérez, 2008; Ernst, 2011). Dichas moléculas son capaces de afectar la fisiología de los animales intoxicados como resultado de la mordedura.

Las distintas proteínas del veneno se encuentran clasificadas en familias, las principales familias de proteínas en vipéridos son:

Fosfolipasa tipo A₂ (PLA A₂), estructuralmente se clasifica en dos tipos: las primeras son PLA A₂ tipo 1 que se encuentran frecuentemente en la familia Elapidae, y las segundas son de tipo 2 presente en la familia Viperidae. Las PLA con actividad catalítica,

presentan un residuo de Asp (asparagina) en la posición 49 del centro catalítico que es esencial para la unión de Ca^{2+} , la función principal es iniciar el proceso digestivo en los tejidos afectados por medio de hidrólisis del enlace acil-éster en la posición 2-sn-acilglicerofosfolípidos liberando lisofosfoglicéridos y ácidos grasos (Thorpe, 1997; Duque et al., 2007). Las PLA sin actividad catalítica presentan una sustitución del aminoácido Asp (ácido aspártico) por Lys (lisina), Ser (serina) o Arg (arginina) en la posición 49 del centro catalítico, provocando la pérdida de la actividad enzimática, pero no del efecto mióxico (Angulo et al., 2000). Esta última induce isquemia y hemorragias en los tejidos afectados, resultado de la acción del veneno sobre las arterias musculares y microvasculatura (Gutiérrez y Lomonte, 1989).

Metaloproteasa de venenos de serpientes (SVMPs), son proteínas con actividad enzimática con uno o múltiples dominios, cuyo principal efecto tóxico se produce por la interrupción del sistema hemostático ocasionando hemorragias a nivel local y/o sistémico. Además, hay evidencias de que estas enzimas están involucradas en mionecrosis locales, edema y otras reacciones asociadas con la inflamación (Gutiérrez y Rucavado, 2006; Ramos y Araujo, 2006). Se conocen tres tipos de metaloproteasas en venenos de serpientes, cuya clasificación está basada en su tamaño y función general, todas presentan una secuencia conservada que se unen al zinc, sin el cual no presentan actividad enzimática. La SVMPs de clase I tienen un peso molecular de 20 a 24 kDa, esta clase puede activar la protrombina, y se sugiere que su principal función es la digestión de los tejidos de la presa, ya que estas enzimas son proteasas altamente activas, sin embargo su capacidad hemorrágica es menor que la clase III (Mackessy, 2010; Bernardoni et al., 2014). Por otro lado, la clase II presenta un peso molecular de 25 a 30 kDa, se han descrito distintas actividades entre las que destaca la inhibición de la agregación plaquetaria y degradación de lamina basal de los vasos sanguíneos (Mackessy, 2010). La clase III tiene un peso molecular de 43 a 85 kDa, su función es la hidrólisis de componentes en la matriz extracelular, inhibición de la agregación plaquetaria, como factores de coagulación, produciendo la apoptosis de células endoteliales y regulación de mediadores pro-inflamatorios, produciendo la interrupción de la hemostasis (Markland y Swenson, 2013; Bernardoni *et al.*, 2014).

Serinoproteinasa, enzimas con peso molecular de 27 a 36 kDa (Mackessy, 2010), poseen una triada catalítica en el sitio activo, integrado por serina (Ser en la posición

195), histidina (His 57) y aspartato (Asp 102). Las serinoproteasas son específicas hacia sustratos macromoleculares como la proteína C, el factor de coagulación V entre otros. Además, en muchos aspectos funcionan de manera similar a las enzimas endógenas del sistema hemostático (Matsui et al., 2000; Jin et al., 2007; Serrano, 2013; Zelanis et al., 2015). Existen dos tipos principales a partir de su actividad: tipo trombina (thrombin-like) con actividad sobre el fibrinógeno, y tipo calicreína (kallikrein-like) con actividad sobre quininógeno. Las serinoproteasas tipo trombina, pueden liberar fibrinopéptido α o β de la cadena de fibrinógeno, produciendo un coagulo de fibrina anormal muy inestable que se rompe con facilidad. Ninguna thrombin-like presenta todas las funciones de una trombina, sin embargo, algunas de ellas pueden activar con menor especificidad el factor VIII y/o el factor XIII, o producir la agregación plaquetaria (Matsui *et al.*, 2000; Roodt, 2002). Las serinoproteasas tipo calicreína liberan bradiquinina en plasma, ocasionando disminución de la presión arterial (Matsui et al., 2000).

Desintegrina, familia de polipéptidos ricos en cisteína de bajo peso molecular de 5.2 a 15 kDa, presentan una alta afinidad por el receptor de fibrinógeno GPIIb/IIIa (integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$) e inhiben los receptores específicos de integrina β_1 y β_3 , además de los receptores de fibronectina ($\alpha_5\beta_1$) (Markland, 1998). Las desintegrinas impide la agregación de plaquetas a partir del tripéptido RGD (Arg-Gly-Asp) presente en todas las desintegrinas, la secuencia RGD reconoce al receptor de integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ en la membrana de plaquetas inhibiendo su actividad (Calvete, 2005; Ramos y Selistre, 2006; Calvete, 2013; Angulo et al., 2014). Las desintegrinas se transcriben y se traducen junto con las metaloproteasas clase II, posteriormente por un proceso proteolítico, la desintegrina es liberada (Kini y Evans, 1992; Calvete, 2013).

1.7. Accidente ofídico

Los accidentes ocasionados por animales ponzoñosos han aumentado en los últimos años debido a ocupación de espacios naturales por actividades de ganadería, agricultura, ampliación de comunidades rurales y construcciones industriales que altera irremediable el hábitat de muchas especies incluyendo las serpientes, ocasionando un aumento de contacto con el hombre. El sector más vulnerable son las comunidades rurales (alrededor del 44% de casos) que presentan como principal actividad económica la agricultura. (Zavala et al., 2002; Harrison et al., 2009). Por otro lado, los estudiantes integran el 22% de casos por mordedura de serpiente, seguido de personas dedicadas a labores del hogar (17%), obreros y profesionistas (2%), el último 15% realiza otro tipo de actividades (Zavala et al., 2002; Zúñiga y Lozano, 2013).

Se considera accidente ofídico a la mordedura de cualquier serpiente, en caso de una venenosa es de importancia médica, debido a que ocasionan un cuadro clínico de envenenamiento. Se considera un problema de salud pública debido al impacto económico, frecuencia, gravedad del envenenamiento y posibles secuelas que pueden involucrar la pérdida de tejido y disfunción de extremidades, ocasionando consecuencias permanentes con implicaciones físicas, sociales y económicas (Rahman *et al.*, 2010; Gutiérrez, 2011). Este accidente ocurre con frecuencia en comunidades rurales (Gutiérrez *et al.*, 2010) donde el encuentro con las serpientes es común y desafortunadamente son zonas con escasos recursos que generalmente no cuentan con acceso a servicio médico.

Las regiones de mayor diversidad de fauna venenosa que corresponde a zonas tropicales donde los casos de envenenamiento tienden a ser más frecuentes (Harrison *et al.*, 2009, Rahman *et al.*, 2010). En el mundo se estiman 5, 400, 000 casos anuales de mordedura de serpiente, de los cuales se reportan 2, 500, 000 envenenamientos y 125, 000 muertes. Las regiones más afectados son Asia, África, Centroamérica y Sudamérica (Chippaux, 1998; Rahman *et al.*, 2010). Por otro lado, en América Latina la incidencia de mordedura de serpiente es alta, de 129, 000 reportes con una tasa de mortalidad de 2, 300 casos que representa alrededor del 1.8% del total (Harrison *et al.*, 2009). En México al igual que en otros países del tercer mundo, las cifras no son exactas pero hay distintas estimaciones, entre la que destaca el estudio de Kasturiratne y colaboradores en el 2008 quien estima en nuestro país 28,000 casos cada año. Por otro lado, el Centro Nacional

de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE) reporta 3, 000 accidentes ofídicos.

En México, los estados que reportan la mayor incidencia de mordedura de serpiente son Quintana Roo, Veracruz, Tlaxcala, Nayarit y Durango (Zavala *et al.*, 2002). El estado de Veracruz es una de las entidades con mayor población y superficie ocupada por el sector agropecuario, además cuenta con condiciones geográficas y climáticas que favorecen la distribución de serpientes. Por tal motivo es el segundo lugar con mayor incidencia de mordedura con serpientes venenosas en México. Tan sólo en el estado de Veracruz se reportaron 3, 765 casos de mordedura en el periodo que comprendió de enero del 2003 a mayo del 2012 (Yañez, 2014). En particular, los datos epidemiológicos de accidente ofídico del Hospital General No. 8 de Córdoba, Veracruz registró que de 1995 al 2005 el género *Bothrops* fue el principal responsable de los casos con 67.7%, seguido por los género *Agkistrodon* y *Atropoides* con el 8.8% (Luna, 2014).

Los datos de mordedura por *A. nummifer* al igual que otros vipéridos de México es desconocido, debido a lo problemático de la identificación y registros epidemiológicos incompletos (Rojas *et al.*, 2001). Además, entre el 60% y 80% de pacientes no son atendidos en los centros de salud (Chippaux, 2008), y en algunos casos son atendidos en la misma comunidad con medicina tradicional. Sin embargo, dichos tratamientos no son efectivos para neutralizar la acción del veneno e involucran prácticas peligrosas que pueden empeorar el cuadro clínico del paciente provocando lesiones locales, encubriendo los síntomas reales del paciente y retrasando el tiempo de traslado hacia algún centro de salud que disponga de antivenenos (Gutiérrez, 2011).

Hasta el momento, el único tratamiento efectivo contra la mordedura de serpiente es el uso de antivenenos específicos (Chippaux, 1998; Gil *et al.*, 2011), no obstante el acceso a éste recurso es restringido en particular para las comunidades rurales. La escasa disponibilidad de antivenenos, el deficiente registro epidemiológico de mordeduras y la ausencia de centros de salud en las localidades remotas (Gutiérrez, 2011) representan el principal problema para disminuir la morbilidad en comunidades rurales.

2. ANTECEDENTES

2.1. Variación intraespecífica en venenos

La variación del veneno en serpientes se ha estudiado principalmente a nivel interespecífico, a partir del análisis de la caracterización bioquímica y actividades biológicas, con el fin de conocer la composición del veneno y mejorar los tratamientos (Chippaux *et al.*, 1991; Alape *et al.*, 2008; Bernardoni *et al.*, 2014). Sin embargo, existen trabajos que demuestran variaciones intraespecíficas en algunas especies, haciendo más complejo el estudio de venenos de serpientes. Estas variaciones tienen implicaciones en las manifestaciones clínicas de los envenenamientos, así como la selección de especies utilizadas en la inmunización para la producción de antivenenos (López *et al.*, 2002; Saldarriaga *et al.*, 2003).

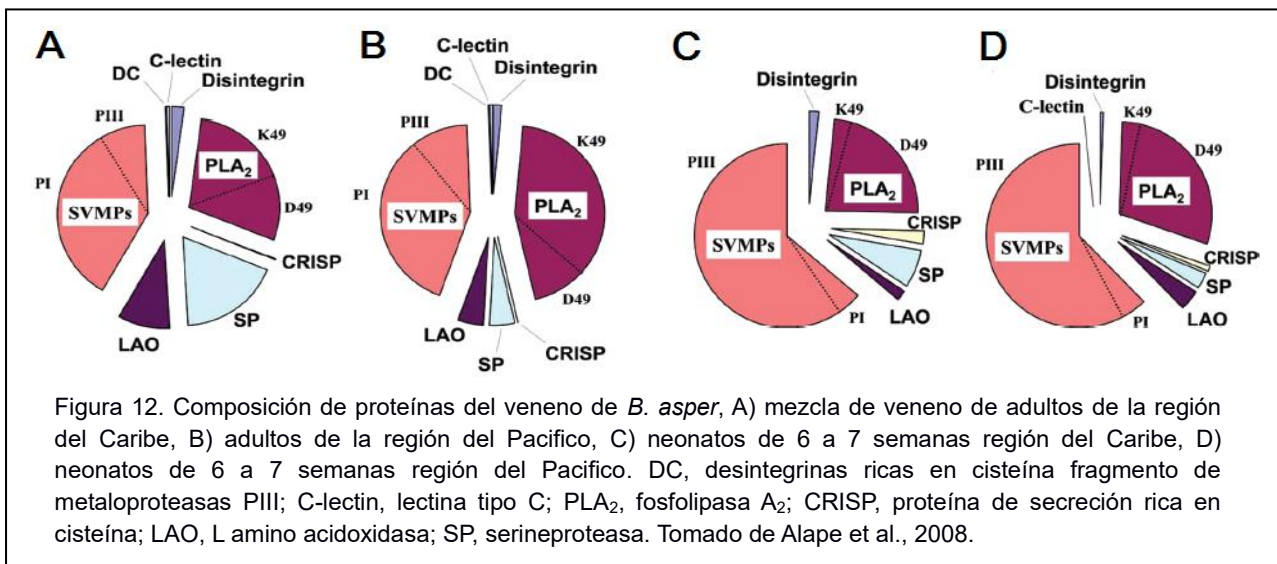
Los factores que podrían generar dicha variación intraespecífica en el veneno son: las diferencias en los hábitos alimenticios, la distribución geográfica, el polimorfismo genético, y los cambios ontogénicos (Iwanaga *et al.*, 1974; Chippaux *et al.*, 1991; Madrigal *et al.*, 2012; Durban *et al.*, 2013). Éstos podrían alterar la composición de los venenos de tres formas: 1) modificando la concentración de ciertos componentes, lo cual podría producir diferencias en las actividades tóxicas del veneno, 2) cambios estructurales de la proteínas, ocasionado por alteraciones en aminoácidos que modifican sus propiedades inmunológicas, y 3) la ausencia o presencia de ciertos componentes en el veneno de recién nacidas que no están presentes en el veneno de adultos, o viceversa (Gutiérrez *et al.*, 1980; Chippaux *et al.*, 1991). Recientemente se ha propuesto que los cambios en el veneno están regulados por mecanismos moleculares que influyen sobre el control genético de cada componente del veneno (Saldarriaga *et al.*, 2003; Zelanis *et al.*, 2012; Durban *et al.*, 2013; Wray *et al.* 2015), sin embargo, se desconocen los mecanismos exactos que regulan estas modificaciones.

2.2. Estudios de variación en los venenos

Uno de los trabajos que muestran la variación regional, se realizó con el veneno de *Crotalus scutulatus scutulatus* de Arizona. En éste se reportaron dos poblaciones que presentan un veneno completamente diferente: población "A" con un veneno principalmente neurotóxico, y población "B" con un veneno del tipo hemorrágico. Lo anterior se ve reflejado en la potencia letal, dado que la población A presenta mayor

potencia letal (2.3 $\mu\text{g}/\text{ratón}$) mientras la población “B” presenta una letalidad menor con 52.6 $\mu\text{g}/\text{ratón}$. Estos cambios suelen ser de gran importancia, debido a que los antivenenos neutralizarán de manera distinta en ambas poblaciones. Por ejemplo, para neutralizar la potencia letal del veneno de la población “A” de *C. s. scutulatus* requirió 127.4 $\mu\text{IAV}/3\text{DL}_{50}$ de antiveneno Antivipmyn, por otro lado, para la población “B” se utilizaron 26.5 $\mu\text{IAV}/3\text{DL}_{50}$ de este mismo antiveneno para neutralizar la letalidad (Glenn y Straight, 1978; Neri, 2010).

En el 2008, Alape y colaboradores, describieron variación regional y ontogenética en el veneno de *Bothrops asper* a partir de análisis proteómicos entre la población del Pacífico y del Caribe. Los resultados mostraron que el grupo de los neonatos (6 a 7 semanas) de ambas poblaciones presentaron una mayor proporción de metaloproteasas el 63% en la región del Caribe y 65.5% en el Pacífico, a diferencia de los adultos que presentaron una proporción de 41% en el Caribe y 44% en el Pacífico. La proporción de PLA_2 es menor en los neonatos (23.7% región del Caribe y 27.7% en el Pacífico) que el veneno de adultos de la población del Caribe con 28.8 % y del Pacífico con una proporción de 45.1%. Las serinoproteasas se encuentran bien representadas en ejemplares adultos del Caribe (18.2%), a diferencia del veneno de los neonatos de esta misma región (6.7%), mientras en la población del Pacífico están en baja proporción para ambos grupos en neonatos representa el 2.6% y en adultos el 4.4% (Figura 12).



Lo anterior concuerda con el estudio realizado por Gutiérrez y colaboradores en 1980, que analizaron esta variación en el veneno de *B. asper* de Costa Rica, para las regiones de Puriscal (región del Pacífico) y San Carlos (región del Caribe). Los venenos de las crías (<

1 mes) de ambas poblaciones son más proteolíticos, hemorrágicos, edematizante y letales. Por otro lado, el veneno de los adultos presentó mayor actividad hemolítica y con efecto mionecrótico, provocando un cuadro histológico de intensa necrosis. Es importante destacar el efecto mionecrótico y hemorrágico severo que ocasiona la población de San Carlos. Por otro lado, los cuatro grupos fueron neutralizados con títulos similares por un suero antiofídico polivalente (Cuadro 1).

Cuadro 1. Variación regional y ontogenética en el veneno de *Bothrops asper*

Efecto	Puriscal		San Carlos	
	Neonatos	Adultos	Neonatos	Adultos
Proteólisis (U/mg)	108 ± 4.5	66 ± 4.4	79.2 ± 5.2	54 ± 4
Hemólisis indirecta (%)	48.8 ± 1.3	96.8 ± 1.4	48.6 ± 6.1	99 ± 1
Hemorragia (µg)	0.6	2.5	0.5	1.5
Mionecrosis (magnitud y tipo)	Moderado (coagulativo)	Intenso (miolítico)	Moderado (coagulativo)	Intenso (miolítico)
Edema (%)	80 ± 8.5	62.2 ± 7.1	87.6 ± 11.4	62.7 ± 3.9
DL ₅₀ (µg/ratón)	35	65	33.5	67
DE ₅₀ (mgV/mL)	2.6	2.6	2.3	2.0

± Desviación estándar

En el veneno de la especie *Bothrops atrox*, se reportó variación ontogenética, la actividad coagulante fue la más alta (23 mg/L) en el veneno de juveniles (≤ 40 cm) y sub-adultos (entre 40 y 70 cm), comparada con la actividad del veneno en adultos (> 70 cm) de 101.5 mg/L (López *et al.*, 2002). Un año después, Saldarriaga y colaboradores observaron esta misma variación ontogenética en el veneno de *Bothrops atrox* y también de *Bothrops asper*, trabajaron determinando las actividades biológicas con cuatro grupos: ejemplares de ≤ 6 meses, 12 meses, 24 meses y 36 meses. La mayor actividad hemorrágica, procoagulante, edematizante y potencia letal se reportó de los 6 a 24 meses para ambas especies, la actividad hemolítica indirecta aumentó conforme la edad (Cuadro 2).

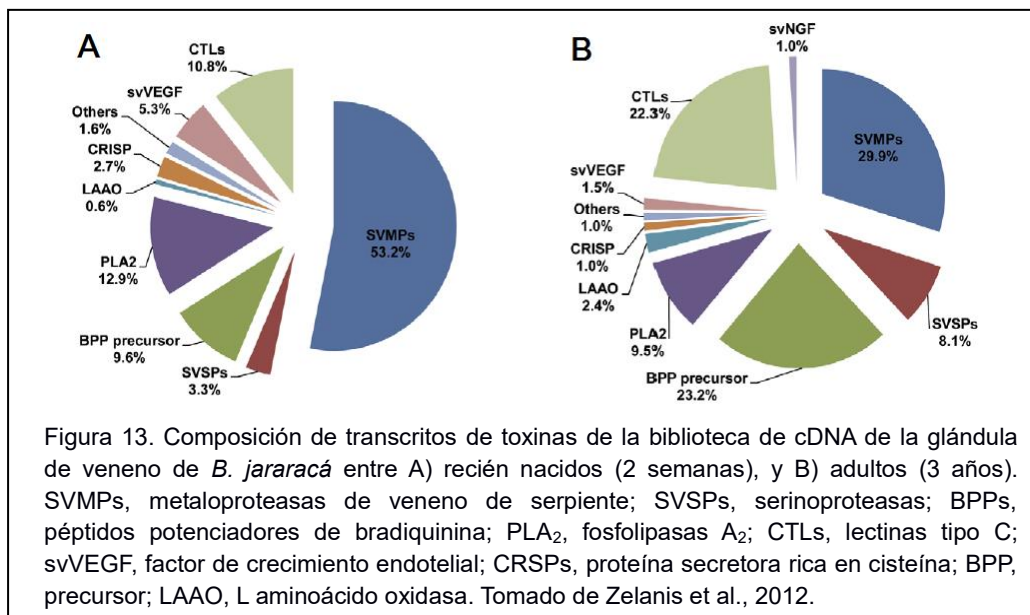
Cuadro 2. Variación ontogenética en el veneno de *Bothrops asper* y *Bothrops atrox*

Especie	Edad (meses)	Potencia letal (µg/ratón)	Hemorragia (µg/ratón)	Edema (µg/ratón)	Coagulante (µg)	Hemolítica indirecta (µg)
<i>Bothrops asper</i>	6	42.9	0.3 ± 0.004	0.9 ± 0.03	0.3	5.4 ± 0.2
	12	48.1	0.5 ± 0.06	1.0 ± 0.15	0.8 ± 0.03	5.3 ± 0.3
	24	49.4	0.8 ± 0.02	1.3 ± 0.1	1 ± 0.04	3.3 ± 0.4
	36	67.1	1.5 ± 0.1	1.8 ± 0.2	3.4 ± 0.01	1.8 ± 0.1
<i>Bothrops atrox</i>	6	51.8	0.3 ± 0.1	0.7 ± 0.04	1 ± 0.02	19.9 ± 0.15
	12	59.7	0.3 ± 0.06	0.8 ± 0.06	1.2 ± 0.02	19.3 ± 0.1
	24	65.5	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.06	1.5 ± 0.04	18.1 ± 0.21
	36	81.4	1.8 ± 0.2	2.0 ± 0.3	2.5 ± 0.1	17.3

± Desviación estándar

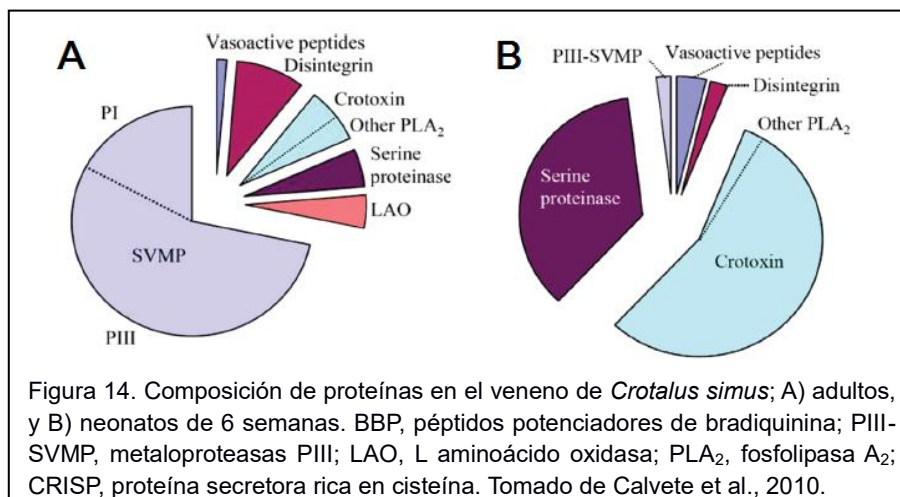
Antunes y colaboradores (2010) reportaron variación ontogenética en el veneno de *Bothrops jararaca* basado en los patrones electroforéticos (SDS-PAGE) y actividades enzimáticas. Se observó que el veneno de adultos (≥ 65 cm) presenta la mayor potencia letal con 1.6 mg/kg, actividad hemorrágica (1.3 μ g de veneno), y por otro lado una baja actividad fosfolipasa A₂ (73.1 U/mgV), requirió menor volumen de antiveneno para ser neutralizado (66.9 μ l/mgV), y además presenta una actividad proteolítica (0.54 U/min/mgV) similar al veneno de crías (0.5 U/min/mgV). El veneno de las crías presenta una mayor actividad fosfolipasa A₂ (121.9 U/mgV), baja actividad hemorrágica (2 μ g) y potencia letal (3.8 mg/kg), además requirió un mayor volumen de antiveneno (141.9 μ l/mgV) para ser neutralizado.

En el 2012, Zelanis y colaboradores observaron esta misma variación ontogenética en el veneno a partir de bibliotecas de cDNA de la glándula de recién nacidos (2 semanas) y adultos (> 3 años) de *B. jararaca* con el fin de evaluar la variación entre ellas (Figura 13).



Entre los componentes de mayor proporción de los transcritos en la glándula de veneno de recién nacidos se encuentran las metaloproteasas, que corresponde al 53.2% y las fosfolipasas A₂ con 12.9%. Por otro lado, la glándula de veneno en adultos presentó una mayor proporción de péptidos potenciadores de bradiquinina (23.2%) y lectinas tipo C (22.3%).

En el 2010 Calvete y colaboradores observaron variación ontogenética en los proteomas del veneno de la especie *Crotalus simus* de Costa Rica, encontraron que el principal componente del veneno de adultos corresponde a metaloproteasas (71%) el cual en crías corresponde al 2%. Por otro lado, en el veneno de crías los principales componentes son la crotoxina (52.7%) y serinoproteasa (36%), los cuales están en baja proporción en el veneno de adultos integrando el 4.1%, 7.6% y 5.3%, respectivamente (Figura 14).



Posteriormente en el 2013, Durban y su grupo de colaboradores, estudiaron la variación en *Crotalus s. simus* utilizando la proteómica y transcriptómica. El análisis proteómico mostró una reducción gradual de 9 a 18 meses de edad en la expresión de serinoproteasas, fosfolipasas A₂ y crotoxina. Por otro lado, se observó un incremento gradual en metaloproteasas clase I y clase II. Lo anterior fue corroborado con análisis transcripcional de la glándula de veneno, utilizando miRNA de los recién nacidos (8 semanas) y adultos (≥36 meses), lo cual concuerda con lo reportado por Calvete en el 2010.

En la especie *Crotalus atrox*, Reid y Theakston (1978) estudiaron los cambios ontogenéticos en el veneno de ejemplares de dos meses de edad involucrados en el envenenamiento de un paciente que presentó hemorragias severas después de la mordedura. Se realizó un seguimiento de los cambios ontogenéticos presentes en el efecto anticoagulante *in vitro* del veneno hasta los 13 meses de edad. En el estudio se observó que la actividad hemorrágica es mayor en los primeros 8 meses y posteriormente hay una disminución a los 10 meses, asimismo el veneno de crías presentó una mayor potencia letal (1 mg/kg) que el veneno de adultos (5 mg/kg).

En 1986 Minton y Weinstein, confirmaron la variación ontogenética y además investigaron variación geográfica en *C. atrox*. La actividad hemorrágica no mostró cambios como resultado de variación geográfica, por otro lado, el veneno de los adultos de 22 a 23 meses presentó la mayor actividad hemorrágica (1.5 µg de veneno) y menor potencia letal (12.9 mg/ kg), mientras que en crías (7 a 8 meses) fue de 2.6 mg/kg y la actividad hemorrágica de 3.1 µg de veneno, diferente a lo reportado anteriormente por Reid en 1978.

En el 2003, Mackessy y colaboradores registraron variación ontogenética en el veneno de *Crotalus oreganus concolor*, en neonatos (≤ 240 mm), juveniles (250 a 450 mm) y adultos (≥ 475 mm). Las actividades enzimáticas de proteasas como plasmina, thrombin-like y fosfodiesterasa incrementaron conforme a la talla del cuerpo, contrario a lo observado para la actividad de proteasa como calicreína que fue mayor en neonatos. Esta relación no se observó en las actividades de L-aminoácido oxidasa y fosfolipasa A₂. Por otro lado, la actividad enzimática sobre azocaseína disminuyó conforme a la talla (Cuadro 3). Los ensayos también mostraron que no había diferencias significativas en la potencia letal de adultos (0.38 µg/g) y juveniles (0.45 µg/g).

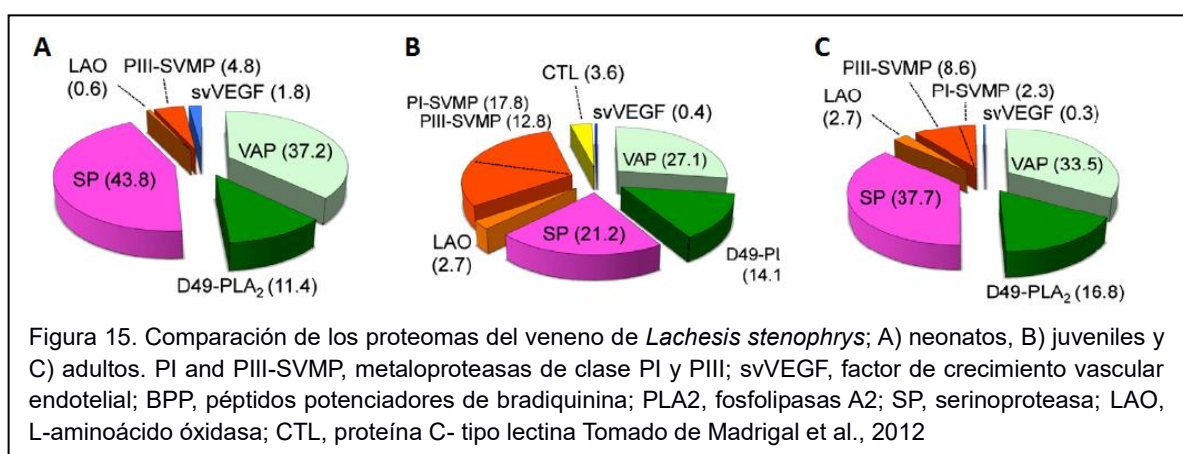
Cuadro 3. Actividades enzimáticas del veneno de *Crotalus oreganus concolor*

Actividad enzimática	Neonatos	Juveniles	Adultos
Proteasa como plasmina (nmol/min/mg)	2.7	43.4	124
Proteasa como trombina (nmol/min/mg)	210.7	390.9	621.5
Proteasa como calicreína (A ₃₄₂ nm/min/mg)	803.6	766	621.7
Fosfodiesterasa (A ₄₀₀ nm/min/mg)	0.2	0.5	0.6
Azocaseínasa (A ₃₄₂ nm/min/mg)	0.4	0.4	0.1
Metaloproteasa (% sustrato/min/mg)	1.9	0.8	0.7
L –aminoácido oxidasa (nmol/min/mg)	31.4	41.6	34.3
Fosfolipasa A ₂ (nmol/min/mg)	37.1	40.8	29.2

Estudios enfocados en variación ontogenética de la especie *Lachesis stenophrys* se elaboraron en el 2012 por Madrigal y colaboradores. En éstos, compararon los proteomas del veneno de ejemplares adultos de 5 años, juveniles de 1 a 2 años y neonatos de 25 días (Figura 15). Observaron también cambios cuantitativos en la composición de los venenos, de manera que el veneno de neonatos presentaba una mayor concentración de serinoproteasas (43.8%), péptidos vasoactivos (37.2%) y fosfolipasas A₂ (11.4%). Los juveniles tienen una mayor concentración de metaloproteasas (30.6%), péptidos vasoactivos (27.1%) serinoproteasas (21.2%), mientras que los adultos presentaban una

mayor concentración de serinoproteasas (37.7%), péptidos vasoactivos (33.5%) y fosfolipasas A₂ (16.8%).

Anteriormente Gutiérrez y colaboradores en 1990 ya habían reportado cambios ontogenéticos en el veneno de *Lachesis muta stenophrys* a través de su actividad biológica (Cuadro 4). Ellos reportaron que el veneno de adultos presenta la mayor potencia letal, actividad hemorrágica, edematizante y proteolítica. Los juveniles fueron divididos en 2 categorías dependiendo de la edad (1 y 2 años), ambos venenos presentaron la mayor actividad fosfolipasa A₂. Por último, el veneno de neonatos (15 a 20 días) presentó las más bajas actividades biológicas, excepto en el caso de la actividad coagulante sobre plasma.



Cuadro 4. Actividades biológicas del veneno de *Lachesis muta stenophrys*

Actividad	Neonatos (15 a 20 días)	Juveniles (1 año)	Juveniles (2 años)	Adultos (5 años)
Potencia letal (DL50, µg/g)	≤ 24*	9.2	11.8	6.3
Hemorragia (DMH, µg)	63 ± 4	3.4 ± 0.4	3.1 ± 0.5	2.1 ± 0.4
Edematizante (DME, µg)	78 ± 2.8	6 ± 0.6	10.3 ± 1.3	3.5 ± 0.3
Coagulante (DMC, µg)	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.5 ± 0.1
Proteolítica (U/mgV)	23.2 ± 0.8	52.5 ± 0.8	53.0 ± 0.6	125.9 ± 2.5
Fosfolipasa A ₂ (µEq/min.mg)	18 ± 0.6	30.1 ± 1.9	30.3 ± 1.4	28.4 ± 0.6

± Desviación estándar; *No se logró obtener con ≤ 24 µg

En 1983 Lomonte y colaboradores, realizaron un análisis comparativo en venenos de serpientes de la especie *Crotalus durissus durissus* de diferentes edades, encontrando diferencias en las actividades biológicas, las crías (≤ 1 mes) presentaron la mayor potencia letal (1.9 ± 0.2 µg/ratón), requirió 0.35 ± 0.07 mgV/mlS de antiveneno para ser

neutralizado. También presentó menor actividad proteolítica (6 ± 1 U/mg), y no presentó actividad hemorrágica ni edematizante. Por otro lado, el veneno en adultos presentó la mayor actividad proteolítica (19 ± 1 U/mg), edematizante (13.6 ± 3.8 µg/ratón), hemorrágica (2.2 µg), y menor potencia letal (13.6 µg/ratón), requirió mayor cantidad de antiveneno para ser neutralizado (2.62 ± 0.32 mgV/mlS).

En resumen, la variación ontogenética en el veneno ha sido demostrada para numerosas especies, en ocasiones limitadas exclusivamente a perfiles electroforéticos, por ejemplo, en las especies *Bothrops insularis* y *Crotalus basiliscus* (Zalanis *et al.*, 2008; Uscanga, 2014). Por otro lado, algunos estudios complementan estas observaciones con análisis proteómicos o a partir de las actividades biológicas. En algunos casos los ejemplares de menor edad presentan la mayor toxicidad como se demuestra en *Crotalus atrox* (Reid *et al.*, 1978; Minton y Weinstein, 1986), *Crotalus durissus durissus* (Lomonte *et al.*, 1983), *Crotalus viridis viridis* (Fierro *et al.*, 1972), *Bothrops asper* (Gutiérrez *et al.*, 1980; Saldarriaga *et al.*, 2003), *Bothrops atrox* (Saldarriaga *et al.*, 2003). En contraste, los venenos de adultos son más tóxicos en otras especies como: *Lachesis muta stenophrys* (Gutiérrez *et al.*, 1990) *Crotalus oreganus concolor* (Mackessy *et al.*, 2003) y *Bothrops jararacá* (Zalanis *et al.*, 2008; Antunes *et al.*, 2010). La función adaptativa de las variaciones ontogenéticas del veneno no está clara. Se propone que podría estar determinada por un papel biológico hacia la adquisición de alimento, por medio de componentes del veneno específicos a sitios blancos en la presa (Gutiérrez *et al.*, 1990; Mackessy *et al.*, 2003; Saldarriaga *et al.*, 2003), pero no se han realizado estudios que comprueben estas teorías.

2.3. Conocimiento del veneno del género *Atropoides*

El veneno del género *Atropoides* se ha estudiado poco comparado con otros vipéridos. Algunos de los trabajos describen que las principales actividades biológicas del veneno, en donde se reporta que producen: hemorragias, edemas y mionecrosis (Gutiérrez *et al.*, 1989; Angulo *et al.*, 2000; Rojas *et al.*, 2001; Angulo *et al.*, 2014). En el 2001 Rojas y colaboradores, compararon las actividades biológicas del veneno de dos poblaciones de *Atropoides mexicanus*: Honduras y Guatemala, encontrando variaciones significativas en el veneno de ambas poblaciones (Cuadro 5). La población de Honduras presentó mayor actividad hemorrágica, miotóxica y coagulante, mientras la población de Guatemala presentó la mayor actividad edematizante y desfibrinación.

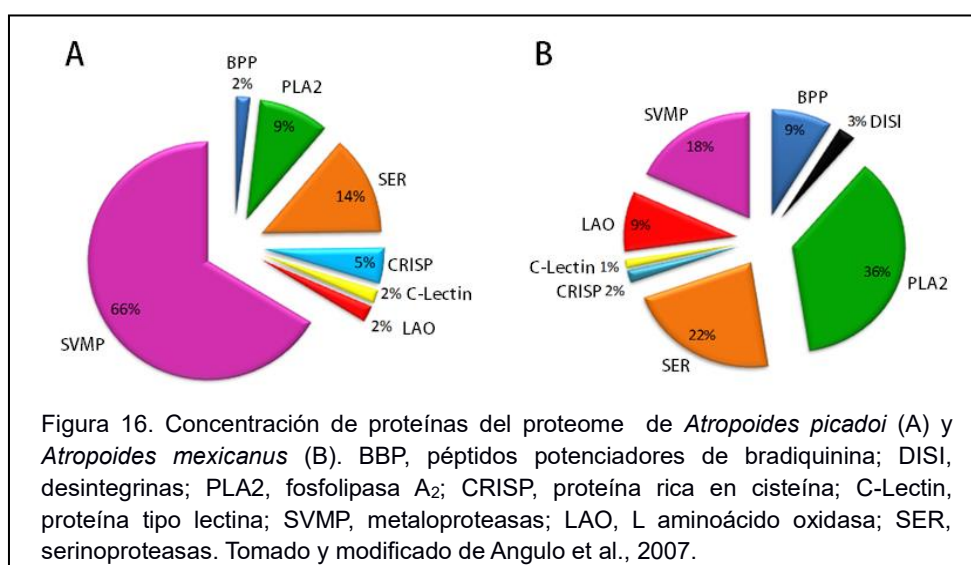
Cuadro 5. Variación regional en el veneno de *Atropoides mexicanus*.

Actividad	Guatemala	Honduras
Letalidad ($\mu\text{g}/\text{ratón}$)	158	160
Hemorrágica (μg)	57 ± 6	22 ± 1
Miotóxica (μg)	27 ± 5	13 ± 2
Coagulante (μg)	19 ± 0.3	12 ± 0.4
Edematizante (U/mg)	5 ± 0.4	12 ± 2
Fosfolipasa A ₂ ($\mu\text{Eq}/\text{mg}/\text{min}$)	36 ± 5	30 ± 6

± Desviación estándar

Un estudio anterior de la misma especie *A. mexicanus*, se realizó por Jiménez en 1964, en el cual analizó la variación ontogenética y regional del veneno, entre dos poblaciones, una del Pacífico y la otra del Atlántico a partir de perfiles de electroferogramas. En éste, observó que la variación no depende de la edad en esta especie, sino del sitio de colecta.

La variación en la composición del veneno dentro del género *Atropoides* ha sido demostrada en la especie *A. mexicanus* y *A. picadoi*. En el 2007 Angulo y colaboradores reportaron los proteomas de *A. mexicanus* y *A. picadoi* (Figura 16), observando que las proteínas más abundantes en *A. mexicanus* son las fosfolipasas A₂ (36.5%), metaloproteasas PI (18.2%) y serinoproteasas (22%), mientras que para *A. picadoi* las familias de proteínas predominantes son las metaloproteasas (66.4%), serinoproteasas (13.5%) y fosfolipasas A₂ (9.5%). Lo anterior sugiere que podrían existir diferencias en las manifestaciones clínicas de envenenamientos por ambas especies. En *A. mexicanus*, además, se han aislado desintegrinas y PLA₂ miotóxicas (Angulo *et al.*, 2000; Angulo *et al.*, 2014)



Posteriormente en el 2010 Antúnez y colaboradores realizaron la caracterización biológica en ambas especies. Los resultados mostraron que *A. picadoi* presentó la mayor potencia letal, actividad hemorrágica, mitotóxica y fosfolipasa A₂, y no presentó actividad procoagulante, mientras que, *A. mexicanus* presentó la mayor actividad proteolítica y coagulante (Cuadro 6).

Cuadro 6. Toxicidad y actividades enzimáticas del veneno de *A. nummifer* y *A. picadoi*

Actividad	<i>A. picadoi</i>	<i>A. mexicanus</i>
Letalidad (µg/ratón)	42	125
Hemorrágica (µg)	0.25	6
Miotóxica (µg)	1.3	4.2
Coagulante (µg)	0.0	15
Proteolítica (U/mg)	145	150
Fosfolipasa A ₂ (µEq/mg/min)	11.6	4.6

3. JUSTIFICACIÓN

La variación ontogenética en el veneno es un factor importante para la predicción de cuadros clínicos divergentes durante el envenenamiento causado por serpientes. Por lo tanto, es esencial realizar dicha investigación, la cual permita comprender la signología provocada por el veneno.

Por otro lado, México posee gran diversidad de herpetofauna venenosa, sin embargo, no cuenta con la caracterización de la mayor parte de los venenos, por lo que, es necesario generar información básica de éstos.

4. OBJETIVOS

General

Analizar si existe variación ontogenética en el veneno de *Atropoides nummifer*.

Particulares

Para cada estadio ontogenético:

- ☞ Analizar los patrones electroforéticos de cada individuo y de las mezclas por medio de SDS-PAGE.
- ☞ Comparar los perfiles cromatográficos por medio de RP-HPLC y colectar las fracciones para posteriormente obtener un perfil proteico (SDS-PAGE).
- ☞ Realizar la caracterización bioquímica mediante: actividad de fosfolipasa A₂ y proteolítica sobre azocaseína.
- ☞ Realizar la caracterización biológica mediante: potencia letal, actividad procoagulante en plasma humano, actividad edematizante, actividad hemorrágica y neutralización por Viper Stat.
- ☞ Comparar las actividades bioquímicas y biológicas, antes mencionadas.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Obtención de ejemplares

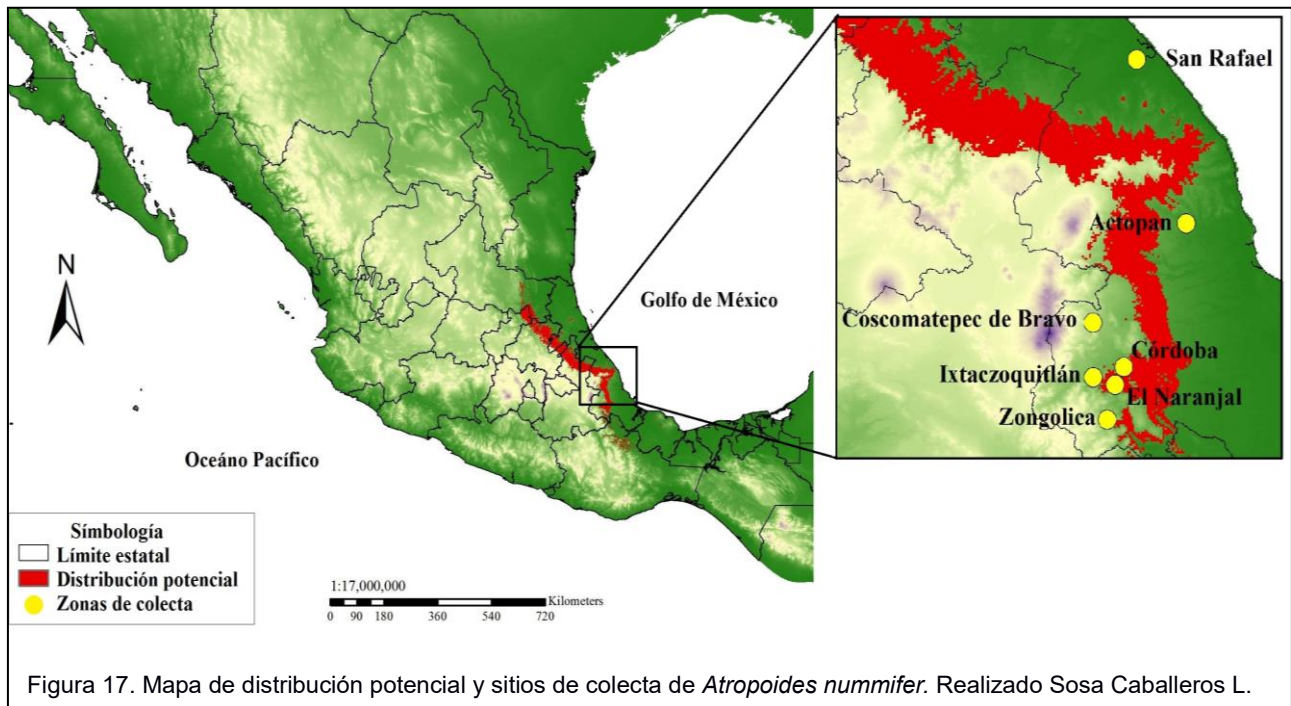
Se obtuvo el veneno de 27 individuos de distintas edades de la especie *Atropoides nummifer* del estado de Veracruz (Cuadro 7), con el apoyo de diferentes colecciones científicas: el herpetario de la Universidad Veracruzana campus Xalapa, PIMVS “Palancoatl”, UMA “El Naranjal”, diferentes colecciones particulares y el banco de venenos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Las serpientes utilizadas fueron seleccionadas con base en claves taxonómicas y mapas de distribución de Campbell y Lamar (2014). Los municipios del estado de Veracruz de los cuales se obtuvieron los individuos son los siguientes (Figura 17): Córdoba, Zongolica, Ixtaczoquitlán, San Rafael, El Naranjal, Coscomatepec de Bravo y Actopan.

Cuadro 7. Registro de ejemplares de la especie *A. nummifer* utilizados en este proyecto

Lote ¹	Sitios de colecta	Edad (mes)	Veneno ²
A2710-IBT105	Córdoba	≥ 24	ND ³
C1113-IBT	Córdoba	≥ 24	117.9 mg
G0213-ATRO1	Ixtaczoquitlán	≥ 24	103 mg
B0514-IBT002	Zongolica	7	5.1 mg
B2014-IBT001	Zongolica	7	ND ³
B2014-IBT003	Zongolica	7	ND ³
C0814-ATRO2	Córdoba	≥ 24	42.8 mg
C0814-ATRO3	Córdoba	≥ 24	32.9 mg
C0814-ATRO4	San Rafael	≥ 24	96.6 mg
C0814-ATRO5	San Rafael	≥ 24	62.7 mg
C0814-ATRO6	Córdoba	24	37.9 mg
C0814-ATRO7	San Rafael	18	23.3 mg
C0814-ATRO8	Coscomatepec de Bravo	4	7.9 mg
C0914-IBT05	Córdoba	9	7.5 mg
C0914-ATRO9	Ixtaczoquitlán	18	57.9 mg
C0914-ATRO10	Córdoba	36	58.6 mg
C0914-ATRO11	Ixtaczoquitlán	36	52.5 mg
C0914-ATRO12	Actopan / Córdoba ⁴	8	6.8 mg
C0914-ATRO13	Actopan / Córdoba ⁴	8	10.1 mg
C0914-ATRO14	Actopan / Córdoba ⁴	8	20 µl
C0914-ATRO15	Actopan / Córdoba ⁴	8	7.6 mg
C0914-ATRO16	Naranjal	18	ND ³
C0914-ATRO17	Actopan	≥ 24	ND ³
C1014-ATRO19	Zongolica	≥ 24	850 µl
C1014-ATRO20	Zongolica	≥ 24	800 µl
C1014-ATRO21	Zongolica	7	ND ³
C1014-ATRO22	Zongolica	7	ND ³

¹Lote, número asignado por el banco de venenos; ²Veneno, veneno obtenido por extracción, ³ND, no determinado; ⁴Individuos con progenitores de diferentes localidades.



5.2. Extracción de veneno y almacenamiento

La extracción de veneno se realizó en el periodo que comprende del 12 mayo del 2009 al 30 de abril del 2014, bajo protocolos de seguridad estrictos que permitieran disminuir el riesgo del personal que realiza los manejos y el estrés producido a los ejemplares.

El veneno se recuperó en acetato de amonio 20 mM a pH 4.7, y posteriormente fue centrifugado durante 3 min a 13, 000 rpm a fin de recuperar el sobrenadante y desechar cualquier residuo celular o elemento externo al veneno. Después se almacenó en nitrógeno líquido o hielo seco hasta su traslado al laboratorio, posteriormente se guardó a -70 °C. Por último fue liofilizado bajo protocolos estandarizados y almacenado a 4 °C.

Cada veneno se etiquetó con una clave única que incluye los datos de la ordeña y el número de registro de cada ejemplar. Los venenos obtenidos a lo largo del trabajo formaron parte del banco de veneno del laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

5.3. Preparación de muestras

Se prepararon muestras de veneno por individuo pesando de 3 a 4 mg de veneno, y posteriormente fueron diluidas en 1 mL de NaCl 150 mM. Por otro lado, se preparó una mezcla de trabajo de cada grupo ontogénico: crías (≤ 12 meses), juveniles (≈ 18 meses) y adultos (≥ 24 meses), los cuales fueron identificados a través de estudios preliminares de

los perfiles electroforéticos individuales (SDS-PAGE). Estas muestras de trabajo por grupo se prepararon pesando 10 mg de veneno por cada individuo, después fueron resuspendidas en diferentes volúmenes de NaCl 150 mM y se mezclaron junto con el veneno de los individuos de la misma categoría, al final fueron almacenadas a 4°C hasta su uso en los ensayos posteriores.

Como controles se utilizaron las especies *Crotalus simus simus*, *Micrurus tener* y *Bothrops asper* lote C0914, siguiendo el mismo procedimiento de preparación antes mencionado.

5.4. Cuantificación de proteínas

Los venenos fueron cuantificados por tres métodos:

1) Peso seco

La primera cuantificación elaborada fue por peso seco, tomando en cuenta que del 90 al 95% del veneno corresponde a elementos proteicos (Markland, 1998; Pérez et al., 2008; Ernst et al., 2011), se pesaron de 3 a 4 mg del veneno liofilizado por cada ejemplar y se resuspendieron en 1 ml de NaCl 150 mM.

2) Absorbancia 280 nm

La cuantificación de proteínas por absorbancia a 280 nm se realizó usando una celda de cuarzo Beckman de 1 cm en un espectrofotómetro de la marca Eppendorph Biophotometer. Las lecturas obtenidas en A_{280} están en función de la presencia de los aminoácidos aromáticos, dado que son mezclas complejas de proteínas mayormente desconocidas, la concentración se estimó como una unidad de absorbancia equivalente a 1 mg/mL.

3) Ácido bicinconínico (BCA)

Los enlaces peptídicos de las proteínas, al reaccionar con el ion cúprico (Cu^{2+}) en un medio alcalino liberan el ion cuproso (Cu^{1+}), el cual reacciona con el ácido bicinconínico produciendo una reacción colorimétrica de tono púrpura en proporción a la cantidad de proteínas en la muestra. Las concentraciones obtenidas se realizaron utilizando el kit comercial Pierce BCA Protein Assay Kit, después se leyeron con un lector de ELISA a una absorbancia de 570 nm. Esta última fue la cuantificación que se utilizó en todos los experimentos.

5.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

La técnica de SDS-PAGE es un método analítico para la separación de moléculas cargadas negativamente, a partir de las diferencias en sus pesos moleculares, que permite la migración de proteínas en un campo eléctrico. Los geles de poliacrilamida (PAGE) se forman por la polimerización química de la acrilamida y bisacrilamida formando una matriz tridimensional. El dodecil sulfato de sodio (SDS) es un detergente iónico que se une de manera específica a las proteínas, aportando una carga neta negativa permitiendo la separación en función de su peso molecular. Para poder desnaturar la proteína se utiliza un agente reductor β mercaptoetanol que provoca la ruptura de puentes disulfuro. Los geles se realizaron al 15% y 12.5% en condiciones reductoras, cargando 25 μ g de veneno por cada carril, utilizando una cámara marca BIO-RAD modelo Mini PROTEAN III. Al finalizar, los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie G-250 y posteriormente se preservaron en una solución al 20% de etanol (C_2H_6O) y agua desionizada. Los perfiles electroforéticos individuales obtenidos en estudios preliminares permitieron identificar las tres categorías ontogénicas utilizadas en los ensayos posteriores. Se obtuvieron perfiles individuales del veneno de *A. nummifer* y los perfiles por mezcla de trabajo de las categorías ontogénicas.

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

Para dicho procedimiento se utilizó una columna analítica C_{18} marca Grace Vydac 250 \times 10 mm, con tamaño de partícula 5 μ m. La columna se estabilizó en solución A (H_2O + 0.1% TFA), y eluyendo con un gradiente de solución B que va de 0 a 70% (CH_3CN + 1% TFA) a un flujo 1 ml/min. Se cargaron entre 320 y 400 μ g de mezcla de veneno por categoría ontogénica en 1 mL de NaCl 150 mM, previamente centrifugado la muestra a 12,000 rpm durante 5 minutos. Las fracciones obtenidas fueron monitoreadas a 280 nm y colectadas manualmente, se secaron y resuspendieron en 16 μ l de NaCl 150 mM, posteriormente se obtuvo el perfil electroforético SDS-PAGE de cada fracción a una concentración de 12.5% en condiciones reductoras.

5.7. Actividad proteolítica sobre azocaseína

Para dicho procedimiento se requirió incubar 20 μ l de veneno (concentración 1 mg/mL) en 100 μ l de azocaseína durante 30 min a 37°C. Posteriormente se detuvo la reacción agregando 150 μ l de ácido tricloroacético. Para finalizar, fue centrifugado durante 5

minutos a 13,000 rpm y se retiraron 150 μ l del sobrenadante de cada muestra para colocarlo en una placa de ELISA junto con 150 μ l de NaOH 0.5 M y después se realizó la lectura a 450 nm.

5.8. Actividad fosfolipasa A₂

Se realizó un ensayo titulométrico para determinar la actividad fosfolipasa A₂, para lo cual se requirió pesar yema de huevo y agregar una solución estándar (NaCl 5 M, CaCl₂ y Triton 100X) proporción 1:10, posteriormente fue homogenizada y centrifugada a 15,000 rpm durante 5 minutos. Después se recuperó el sobrenadante y se mantuvo en hielo hasta su uso, cada ensayo requirió que se tomaran 500 μ l del sobrenadante y se colocaran en agitación constante bajo un burbujeo superficial de nitrógeno (N₂) Posteriormente, se le agregó NaOH 50 mM hasta obtener un pH 8 (rango aceptado de pH 8.0 a 8.5), a esta solución después se le agregó 1 μ l de veneno concentración 1 mg/ml, y cuando el pH descendió a 7.99 se agregó nuevamente 1 μ l de NaOH 50 mM para aumentar el pH de la solución (pH \geq 8). Para este ensayo se midió el tiempo transcurrido desde que se le adicionan 1 μ l de NaOH 50 mM y el pH aumenta (\geq 8), hasta que vuelve a descender a pH a 7.99, esto último, se repitió hasta obtener 5 mediciones de tiempo por ensayo. La actividad enzimática se calculó como el consumo de NaOH por unidad de tiempo en minutos (U.mgV), las μ mol de NaOH son directamente proporcionales a la cantidad de ácidos grasos liberados debido a que éstos acidifican la solución.

5.9. Actividad Procoagulante sobre Plasma Humano (DCM-PH)

La dosis mínima procoagulante en plasma humano (DCM-PH) descrita por Theakston y Reid (1983), se define como la cantidad de veneno necesaria para formar un coágulo evidente en 60 seg. La extracción de sangre se realizó a un voluntario sano y fue recuperada con citrato de sodio en una proporción 1:10, después se centrifugó a 15, 000 rpm durante 5 min. Posteriormente, se colocaron 200 μ l del plasma en tubos de vidrio incubando de 3 a 5 minutos en baño maría a 37°C. Por último, se agregaron diferentes concentraciones de veneno en 200 μ l de plasma humano y se midió el tiempo que tarda en formarse un coagulo después de adicionarse diferentes cantidades de veneno.

5.10. Dosis Mínima Edematizante (DME)

La dosis mínima edematizante fue descrita por Chaves y colaboradores en 1995, se define como la cantidad de veneno necesaria para producir un edema del 30% en la almohadilla plantar de ratones. Para este ensayo se inocularon por vía subcutánea en la

almohadilla plantar izquierda diferentes dosis de veneno en grupos de 3 ratones con peso de 20 a 25 g. Posteriormente se realizaron mediciones del edema a los 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 120 minutos después de la inoculación del veneno.

5.11. Dosis Mínima Hemorrágica (DMH)

Para determinar la dosis mínima hemorrágica (DMH) se utilizó el método descrito por Kondo (1960) y posteriormente modificado por Theakston y Reid (1983). Ésta se define como los μg de veneno necesario para producir un halo hemorrágico de 1 cm sobre el tejido dérmico dorsal en un ratón. Para este ensayo se utilizaron grupos de 3 ratones con un peso de 20 a 25 g, en los cuales se inocularon por vía intradérmica distintas dosis de veneno en un volumen total de 100 μl por vía, y se dejó incubar *in vivo* durante 3 hrs. Posteriormente, los ratones fueron sacrificados con sobredosis inhaladas de dióxido de carbono (CO_2) y se retiró la piel. El halo hemorrágico se midió colocando un vidrio sobre la piel y marcando el área hemorrágica sobre el vidrio, después se contabiliza dicha área utilizando una hoja milimétrica.

5.12. Dosis Letal Media (DL_{50})

La dosis letal media (DL_{50}) es el procedimiento descrito por Theakston y Reid (1983), se define como la cantidad de veneno que produce el 50% de la mortalidad en una población de ratones a las 24 hrs de ser inoculado. Para este procedimiento se inocularon por vía intravenosa diferentes dosis de veneno en grupos de 5 ratones con pesos de 18 a 20 g, después se registró el porcentaje de mortalidad a las 24 hrs de ser inoculado.

5.13. Dosis Efectiva Media (DE_{50})

La dosis efectiva media (DE_{50}) es el procedimiento para determinar la potencia neutralizante del antiveneno, en este caso se utilizó Viper Stat, lote 4VT06002 de Veteria Labs. Para lo cual se incubaron distintas dosis de antiveneno con dos dosis letales medias (2DL_{50}) del veneno de *A. nummifer* durante 30 min a 37°C . Después, se inoculó por vía intravenosa en grupos de 5 ratones con pesos de 18 a 20 g y se registró el porcentaje de sobrevivencia a las 24 hrs. La DE_{50} se define como la cantidad de antiveneno capaz de salvar al 50% de una población de ratones envenenados.

6.14. Análisis estadísticos

Para comprar la actividad proteolítica y hemorrágica entre estadios ontogenéticos de *Atropoides nummifer* se realizó un análisis de varianza de una vía (ANDEVA), tomando como controles el veneno de las especies *Micrurus tener* y *Crotalus simus*, esta última se

excluyó en el análisis estadístico de la actividad hemorrágica porque sólo se tenía un dato proveniente de una investigación anterior. Para las actividades fosfolipasa A₂, edematizante y procoagulante se utilizó un modelo lineal generalizado para comparar entre estadios de desarrollo. En todos los casos la prueba *post-hoc* fue una prueba de Tukey. El análisis de la actividad procoagulante incluyó la especie *Bothrops asper* como un control adicional. Para todas estas comparaciones se utilizó el paquete estadístico R package 2016.

Los análisis de potencia letal y neutralización se analizaron mediante regresión no lineal graficando el logaritmo de la dosis inoculada y el porcentaje de mortalidad o sobrevivencia respectivamente. Al final se compararon los parámetros de la recta con una prueba de F usando el programa GraphPad Prism versión 6.

6.15. Modelos biológicos

Cepa de ratones CD-1 de la especie *Mus musculus* de sexo indistinto, proporcionados por los laboratorios Harlan y el bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se mantuvieron en fotoperiodos de 12 hrs con agua y alimento *ad libitum*.

6. RESULTADOS

6.1. Perfil electroforético por SDS-PAGE

Se realizaron los perfiles electroforéticos del veneno de 27 individuos del estado de Veracruz, de manera general, se observó que los perfiles electroforéticos de las crías (≤ 12 meses) presentan las proteínas más abundantes alrededor de los 23 y 50 kDa. Los perfiles electroforéticos de los adultos (≥ 24 meses) en general se conservan, y la mayor proporción de bandas proteicas están por debajo de 15 kDa, alrededor de los 22 kDa y las bandas de alto peso molecular no se encuentran presentes. Por otro lado, los perfiles electroforéticos de los juveniles (18 meses) presentan un perfil con características intermedias a los perfiles de crías y adultos, las bandas proteicas más representativas se encuentran en 15 y 20 kDa.

Perfiles electroforéticos de individuo con el mismo linaje

Este grupo se integra por un linaje directo de 2 ejemplares adultos (padres) (≥ 24 meses) y sus 5 crías de 7 meses nacidas en cautiverio, se obtuvieron los perfiles electroforéticos para verificar la presencia de variación ontogenética dentro de la misma línea de descendencia. En la Figura 18 se observa que todos los individuos presentan bandas alrededor de los 20 kDa. El perfil de venenos de crías (carril 2 al 6) presenta dos bandas por arriba de los 50 kDa, a excepción de la cría B0514-IBT002 que presenta una banda única en 50 kDa, las cuales están ausentes en adultos (carril 8 y 9). El perfil de los adultos, por otra parte, presentan una banda de mayor abundancia alrededor de los 13 kDa que esta en baja proporción en los perfiles de todas las crías.

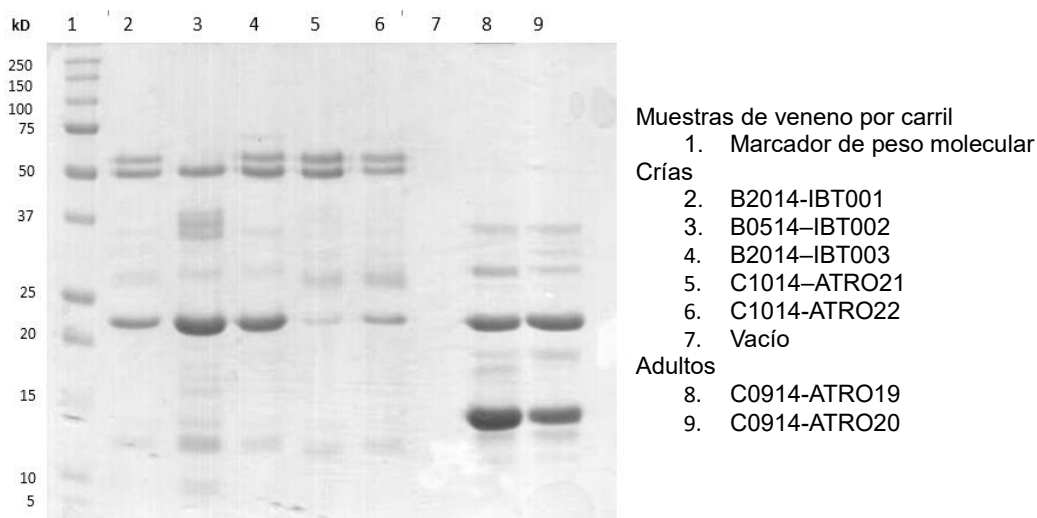


Figura 18. Perfil electroforético del veneno de crías y adultos de *Atropoides nummifer*. SDS-PAGE al 15%, en condiciones reductoras; 25 μ g de veneno por carril. Figura en blanco y negro.

Perfiles electroforéticos de “crías”

En la Figura 19 y Figura 20 se muestran los perfiles electroforéticos de 11 crías (≤ 12 meses), de manera general los perfiles entre los individuos se conservan, la banda con mayor abundancia se localizan aproximadamente a 23 kDa. Por arriba de los 50 kDa aparece un doblete o triplete proteico entre los individuos con diferentes proporciones. Las bandas de mediano peso molecular se encuentran de los 25 a 37 kDa, por otro lado, solo en algunos perfiles se observan bandas proteicas en baja proporción por debajo de los 15 kDa. Por otro lado, la cría B0514-IBT002 mostró variación en el perfil, las cuales son una triada de por debajo de 37 kDa y en 50 kDa una banda única.

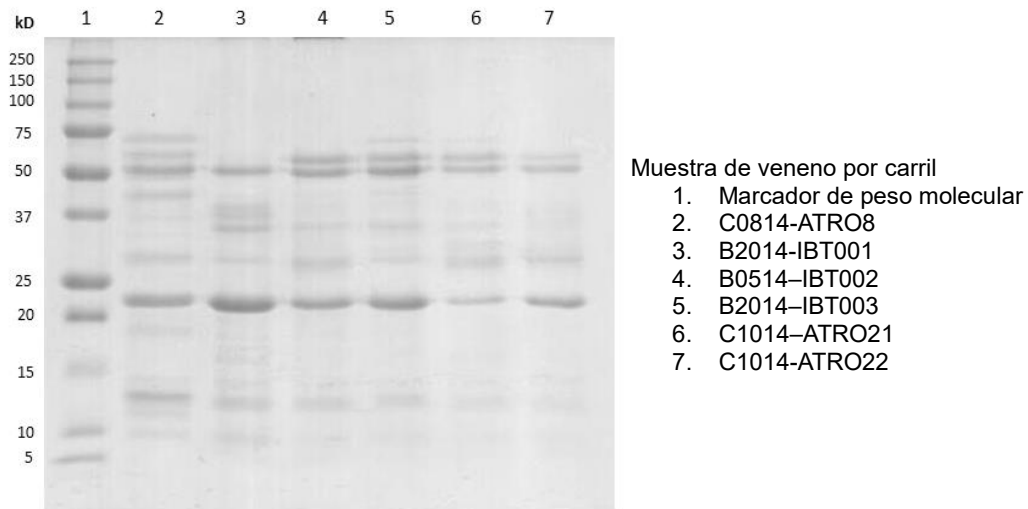


Figura 19. Perfil electroforético del veneno de crías de *Atropoides nummifer*. SDS-PAGE al 15%, en condiciones reductoras; 25 μ g de veneno por carril. Figura en blanco y negro.

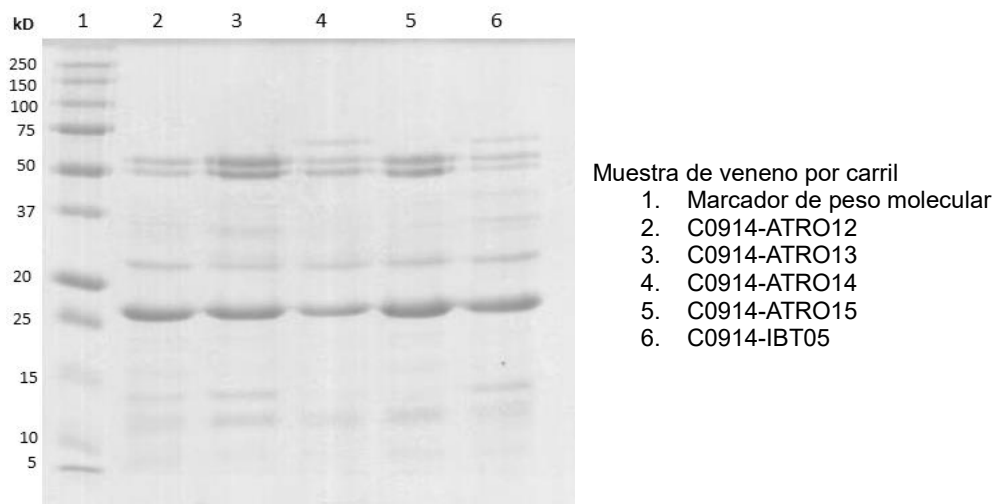


Figura 20. Perfil electroforético del veneno de crías de *Atropoides nummifer*. SDS-PAGE al 15%, en condiciones reductoras; 25 μ g de veneno por carril. Figura en blanco y negro.

Perfiles electroforéticos de “adultos”

En la Figura 21 y 22 pertenecen a 13 individuos adultos (≥ 24 meses), en términos generales, los perfiles se conservan entre los individuos, las bandas con mayor abundancia son de aproximadamente 14 kDa y alrededor de los 22 kDa. Por otra parte, arriba de los 25 kDa se observan al menos 2 bandas con diferencias en las proporciones de cada individuo y sólo para algunos individuos se observan bandas por arriba de los 50 kDa, aunque éstas se encuentran en muy baja proporción.

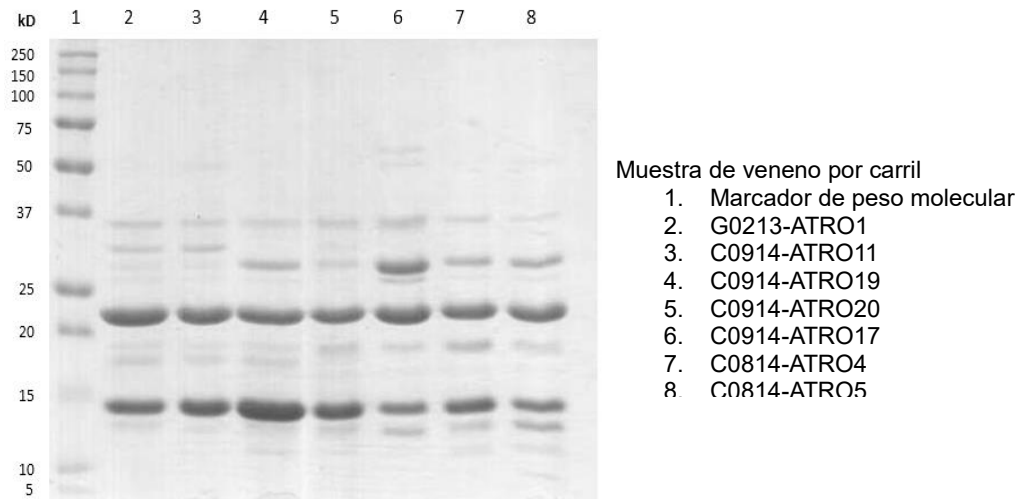


Figura 21. Perfil electroforético del veneno de adultos de *Atropoides nummifer*. SDS-PAGE al 15%, en condiciones reductoras; 25 μ g de veneno por carril. Figura en blanco y negro.

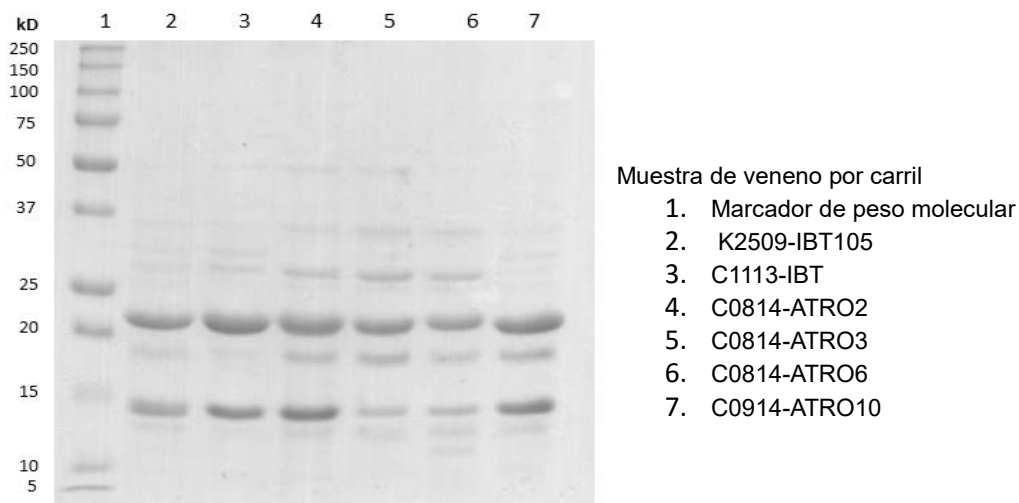


Figura 22. Perfil electroforético del veneno de adultos de *Atropoides nummifer*. SDS-PAGE al 15%, en condiciones reductoras; 25 μ g de veneno por carril. Figura en blanco y negro.

Perfiles electroforéticos de “juveniles”

En la Figura 23 se observan los perfiles electroforéticos de 3 ejemplares juveniles (18 meses), la banda de mayor abundancia en todos los individuos se encuentra por debajo de los 20 kDa, mientras que las bandas en menor proporción se sitúan de los 25 a 37 kDa y alrededor de los 17 kDa. Por otro lado, en el perfil del individuo C0914-ATRO19 presenta una banda abundante en los 15 kDa, que están en baja proporción en los individuos C0914-ATRO16, los otros dos presentan dos bandas por arriba de los 50 kDa, que están ausentes en el individuo C0914-ATRO19.

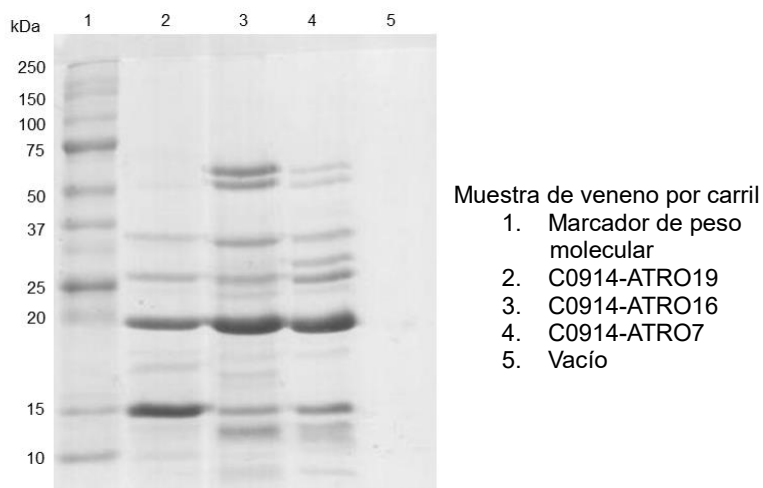


Figura 23. Perfil electroforético del veneno de juveniles de *Atropoides nummifer*. SDS-PAGE al 15%, en condiciones reductoras; 25 µg de veneno por carril. Color de la figura editado a blanco y negro.

A partir de los resultados obtenidos en los perfiles electroforéticos por cada individuo se dividieron en 3 categorías: crías, 11 individuos de ≤ 12 meses; juveniles, 3 ejemplares de ≈ 18 meses; y adultos, 13 individuos de ≥ 24 meses.

Se obtuvieron los perfiles electroforéticos de las mezclas de veneno antes mencionadas (Figura 24). En los perfiles proteicos de las tres categorías ontogénicas se observa una banda abundante por arriba de los 20 kDa, y bandas proteicas de baja proporción entre los 25 y 37 kDa. Entre los perfiles de las crías y los juveniles hay similitudes, aparece un doblete proteico por arriba de los 50 kDa que esta ausente en el perfil de adultos. Por otro lado, el perfil de juveniles y adultos también presentan similitudes, una banda abundante por debajo de los 15 kDa seguida de otra banda en menor concentración y peso molecular, ambas bandas están prácticamente ausentes en el perfil de las crías.

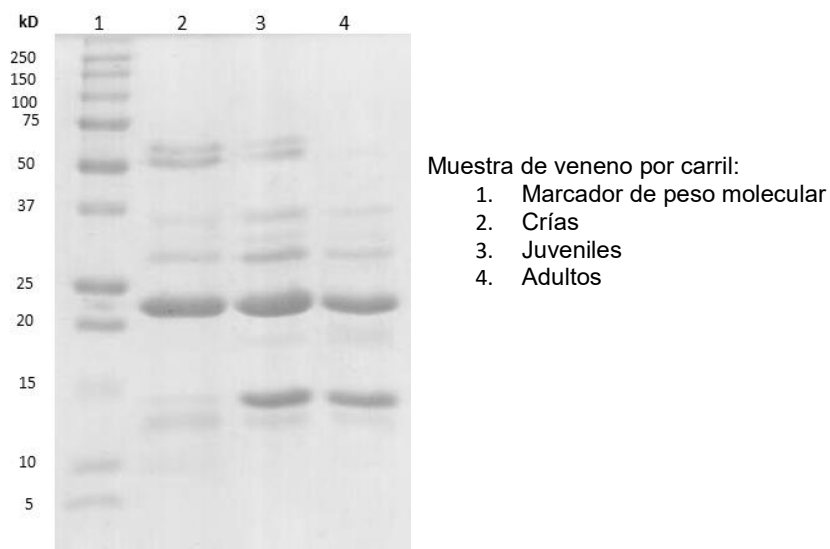


Figura 24. Perfil electroforético del veneno de las categorías: crías, juveniles y adultos de *Atropoides nummifer*. SDS-PAGE al 15%, en condiciones reductoras; 25 µg de veneno por carril. Color de la figura editado a blanco y negro.

6.2. Perfiles cromatográficos por RP-HPLC

Perfil cromatográfico de “crías”

En el perfil cromatográfico de la mezcla de veneno de 11 crías (Figura 25) se colectaron 23 fracciones en total. Las 10 primeras fracciones eluyen entre el minuto 4 y 26 con un porcentaje de alrededor de 17 de acetonitrilo, del minuto 32 al 36 eluyeron dos fracciones (~ 25% de acetonitrilo), y del minuto 62 hasta los 90 eluyeron las últimas once fracciones (entre 40 y 70% de acetonitrilo).

Por otro lado, las primeras 8 fracciones colectadas no mostraron bandas proteicas en su perfil electroforético, la F9 y F10 mostraron una banda alrededor de 14 kDa, la F17 a F23 se observa una banda aproximadamente a 23 kDa. Mientras que, la F13 y F14 presentaron una banda de 28 y 36 kDa respectivamente, en la F15 a F22 (excepto la F17) se observa de una a dos bandas entre los 50 y 75 kDa.

Perfil cromatográfico de “juveniles”

En el veneno de la mezcla de juveniles se colectaron 31 fracciones (Figura 26), la cual eluyeron 14 fracciones del minuto 2 al 36 con el 20% de acetonitrilo, del minuto 48 a 54 se colectaron 4 fracciones, con una concentración de solución B de ~ 30%, la mayoría de

fracciones eluyeron del minuto 60 hasta 78 con una concentración de acetonitrilo entre 40 a 50%, mientras que las últimas 4 fracciones eluyeron con el 70% de acetonitrilo.

De las 31 fracciones colectadas la F1 a F15 (excepto la F11) no presentó bandas proteicas. Las fracciones F11, F18, F21 a F24 y F28 a F31 se observó una banda aproximadamente de 14 kDa. En la F20 y F21 se observa una banda de 18 kDa, por otro lado, la F17 y F28 a F31 presenta una banda en 23 kDa. En las fracciones F16, F17, F19 y F23 se identifica una banda de 25 a 37 kDa, por otro lado, la F18 presenta un doblete, y de la F20 a F22 se observa un triplete. Los componentes de alto peso molecular, se observaron a partir de la F25 hasta F31, y en F29 a F31 se ve una banda 50 kDa, un doblete en F25 y F26 entre 50 a 75 kDa, y una banda alrededor de 75 kDa de la F27 a 31.

Perfil cromatográfico de “adultos”

La Figura 27 muestra el perfil cromatográfico del veneno de 13 ejemplares adultos (≥ 24 meses). Se colectaron 11 fracciones, las primeras 5 fracciones (F1 a F5) eluyeron del 14 hasta 34 minutos con un porcentaje de alrededor del 20%, las siguientes 4 (F6 a F9) eluyeron del min 54 al 70 con aproximadamente 30% de acetonitrilo, las últimas fracciones (F10 y F11) eluyeron con el 70% de acetonitrilo. En los perfiles electroforéticos de las fracciones se observó que la F1, F2 y F3 no presentan bandas proteicas, por otro lado, de la F5 a la F10 (a excepción de la F7), se observa una banda de 15 kDa y en el caso de la F8 y F10 una banda alrededor de 14 kDa. Por debajo de 20 kDa, se observa una banda bien representada en la F8, F7, F10 y F11 de los 20 a 25 kDa. Por otro lado, entre 25 a 37 kDa un triplete en la F8 y F9, mientras que F7 presenta una banda única. Sólo en la F9 y F10 se observa una banda de alto peso molecular alrededor de los 70 kDa.

Las diferencias entre los perfiles cromatográficos de las categorías ontogénicas de *A. nummifer* se muestran en la Figura 28.

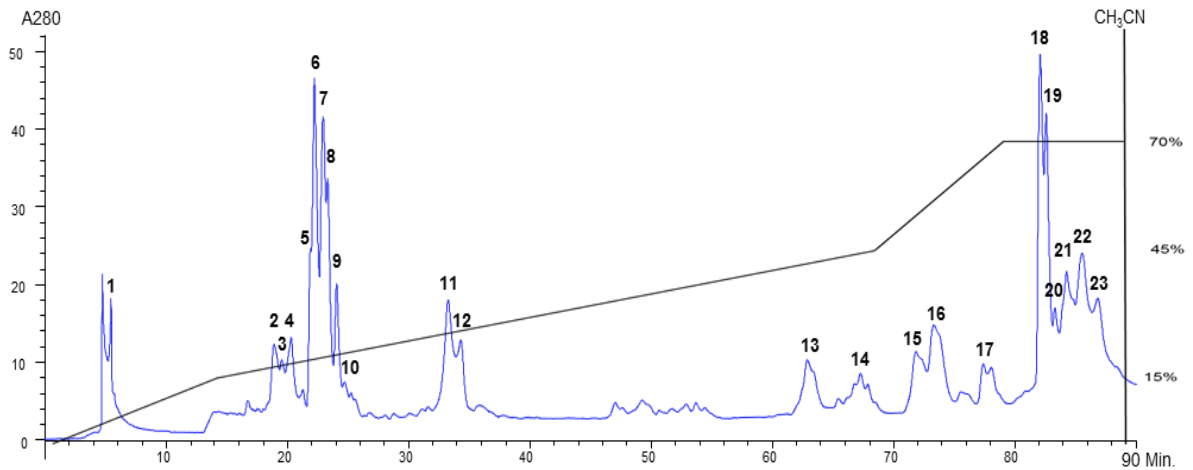
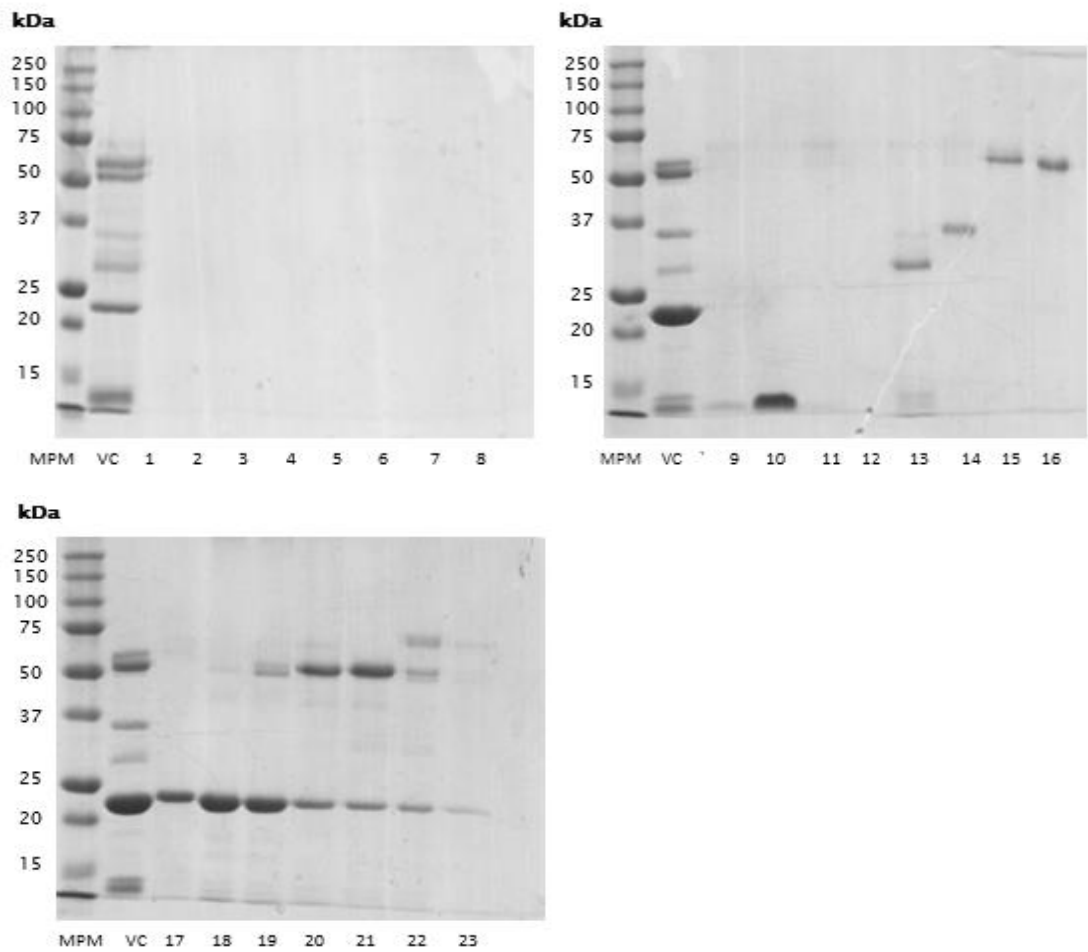


Figura 25. Cromatografía de mezcla de veneno *Atropoides nummifer* "crías", 320 µg de veneno diluido en 1 mL de NaCl 150mM. Columna analítica C₁₈, flujo 1 mL/min. Solución A (H₂O + 0.1% TFA), solución B (CH₃CN + 1% TFA). Perfiles cromatográficos de las fracciones colectadas resuspendidas en 16 µl de NaCl 150 mM para obtener el perfil electroforético SDS-PAGE al 12.5% en condiciones reductoras. VC: Veneno completo.

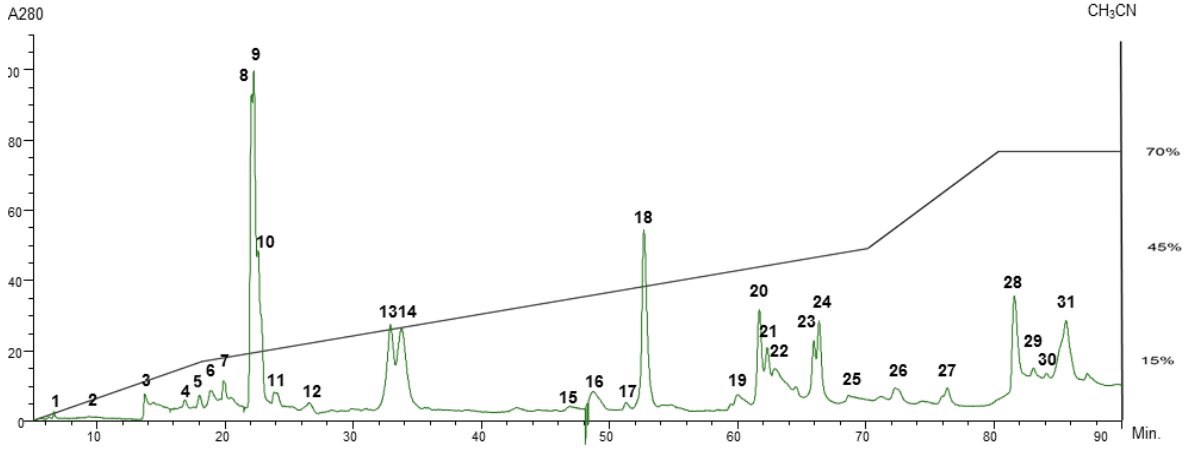
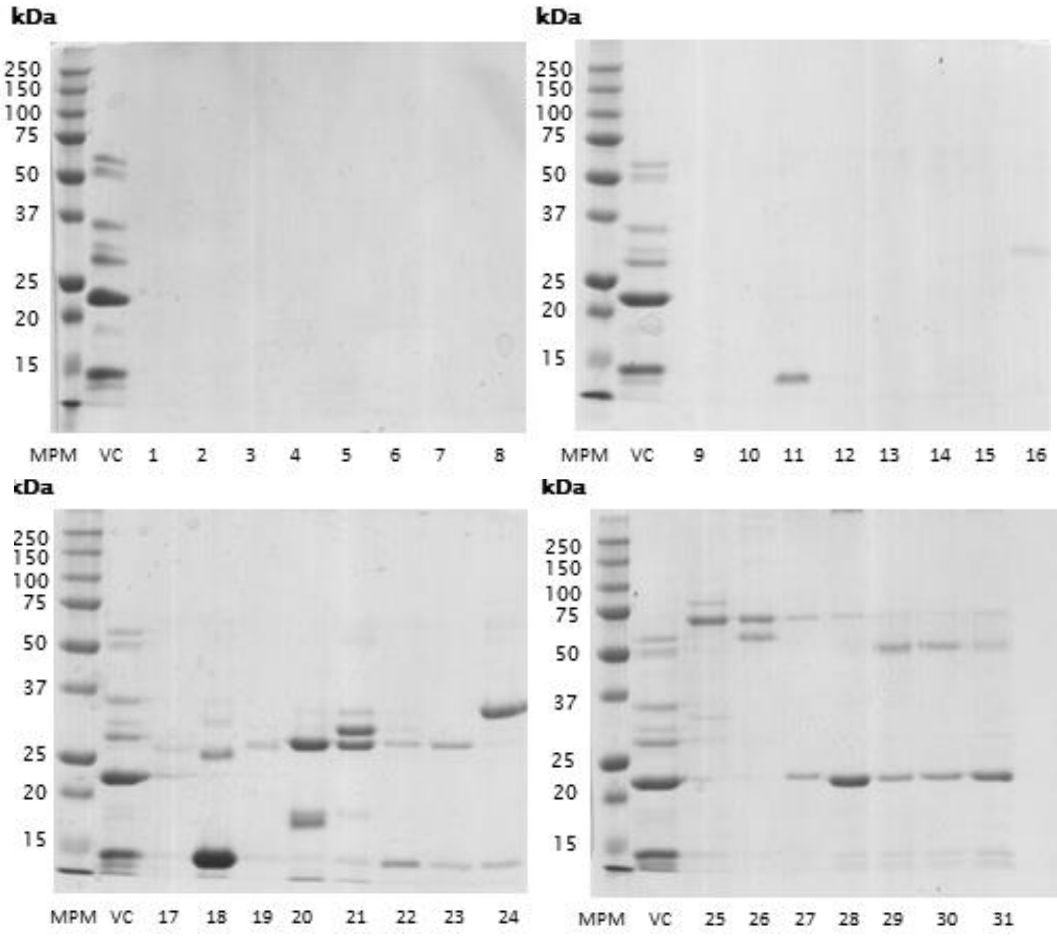
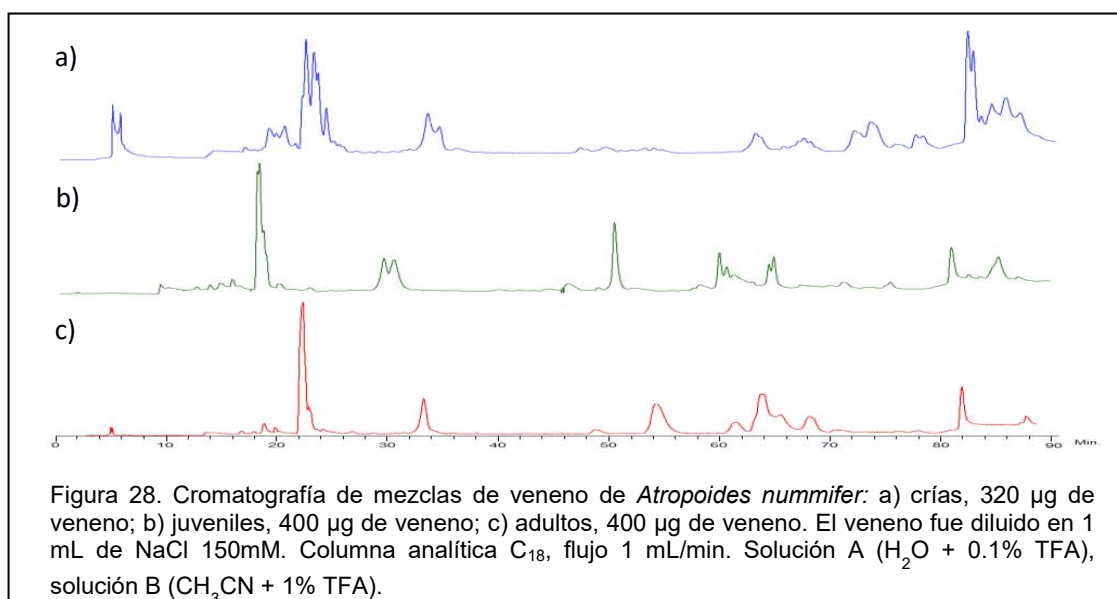
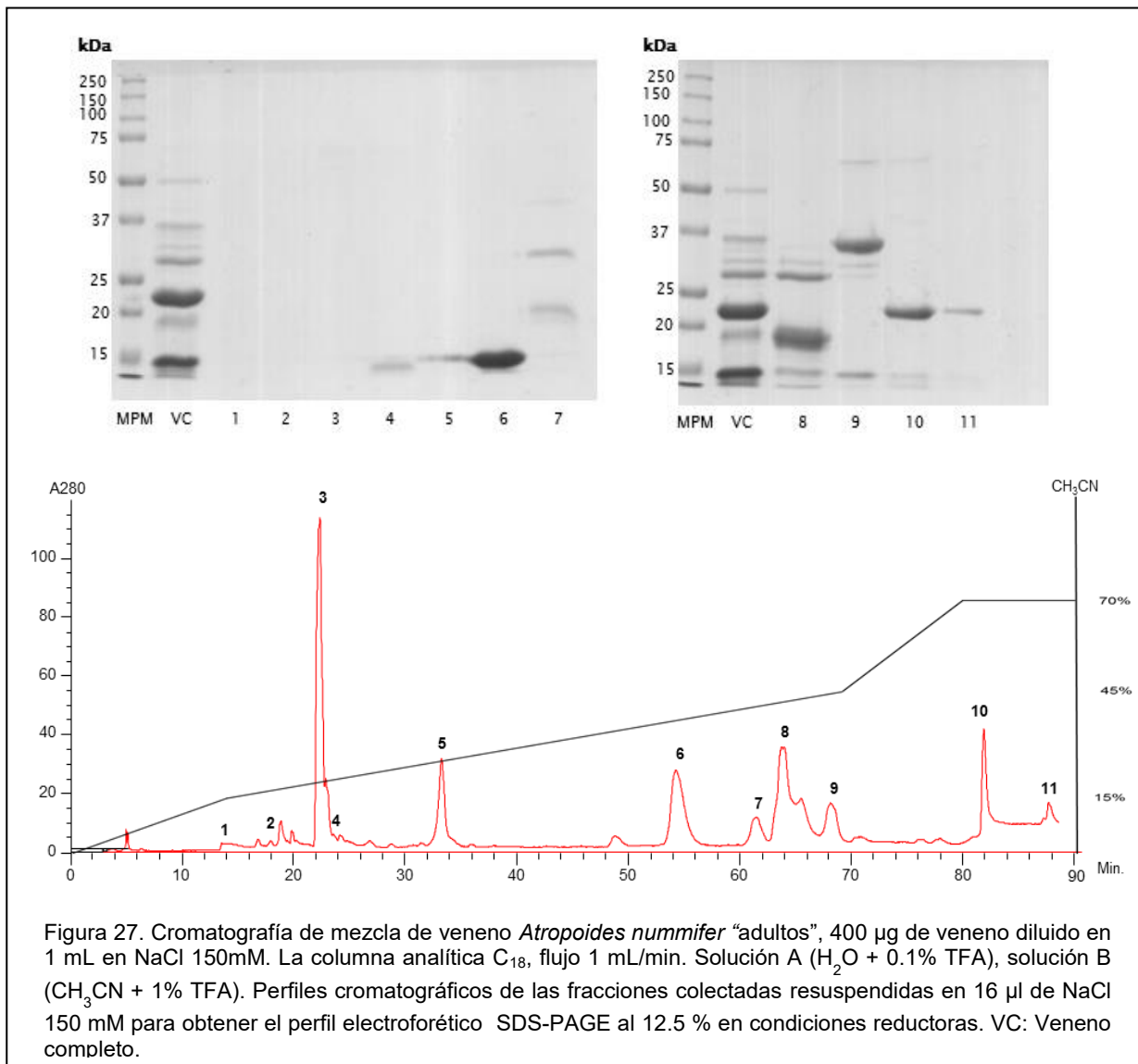


Figura 26. Cromatografía de mezcla de veneno *Atropoides nummifer* "juveniles", 400 µg de veneno diluido en 1 mL de NaCl 150mM. Columna analítica C₁₈, flujo 1 mL/min. Solución A (H₂O + 0.1% TFA), solución B (CH₃CN + 1% TFA). Perfiles cromatográficos de las fracciones colectadas resuspendidas en 16 µl de NaCl 150 mM para obtener el perfil electroforético SDS-PAGE al 12.5 % en condiciones reductoras. VC: Veneno completo.



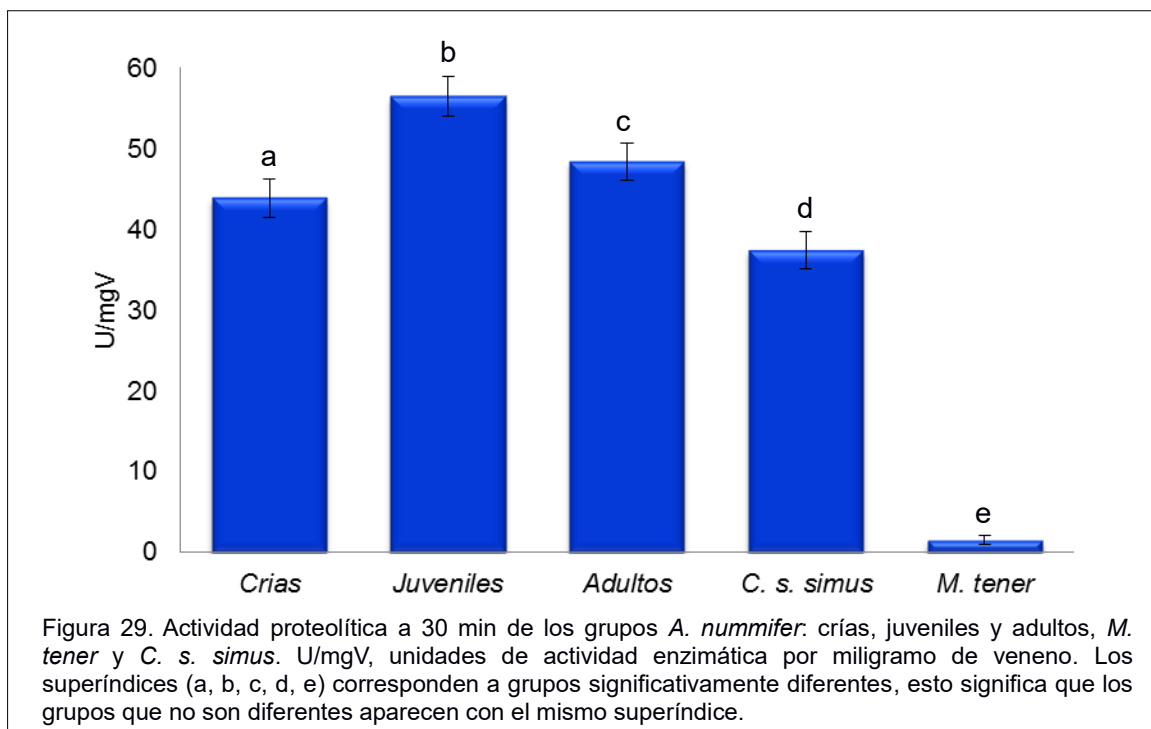
6.3. Actividad proteolítica sobre azocaseína

La actividad proteolítica se examinó para cada estadio de desarrollo de la especie *A. nummifer*, utilizando como controles el veneno de *C. s. simus* y *M. tener* (Cuadro 8). El grupo de los juveniles presentó la mayor actividad proteasa con 56.4 U/mgV, seguido por el veneno de adultos con 48.4 U/mgV, y al final las crías con 43.9 U/mgV. El veneno de *A. nummifer* presentó mayor actividad proteolítica que el veneno de *M. tener* que presentó 1.5 U/mgV y *C. s. simus* con 37.4 U/mgV (Figura 29). Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas entre los estadios de desarrollo de *A. nummifer* y los controles (F= 904.99; $P < 2.2 \times 10^{-16}$).

Cuadro 8. Actividad proteolítica para los estadios de desarrollo de *A. nummifer* y las especies usadas como controles

Especie	Grupo	U/mgV ¹ ± D.E. ²
<i>Atropoides nummifer</i>	Crías	43.9 ± 2.1
	Juveniles	56.4 ± 0.8
	Adultos	48.4 ± 1.7
<i>Crotalus s. simus</i>	Individuo	37.4 ± 2.0
<i>Micrurus tener</i>	Individuo	1.5 ± 0.6

U/mgV¹, unidades de actividad por microgramo de veneno; D.E.², desviación estándar.



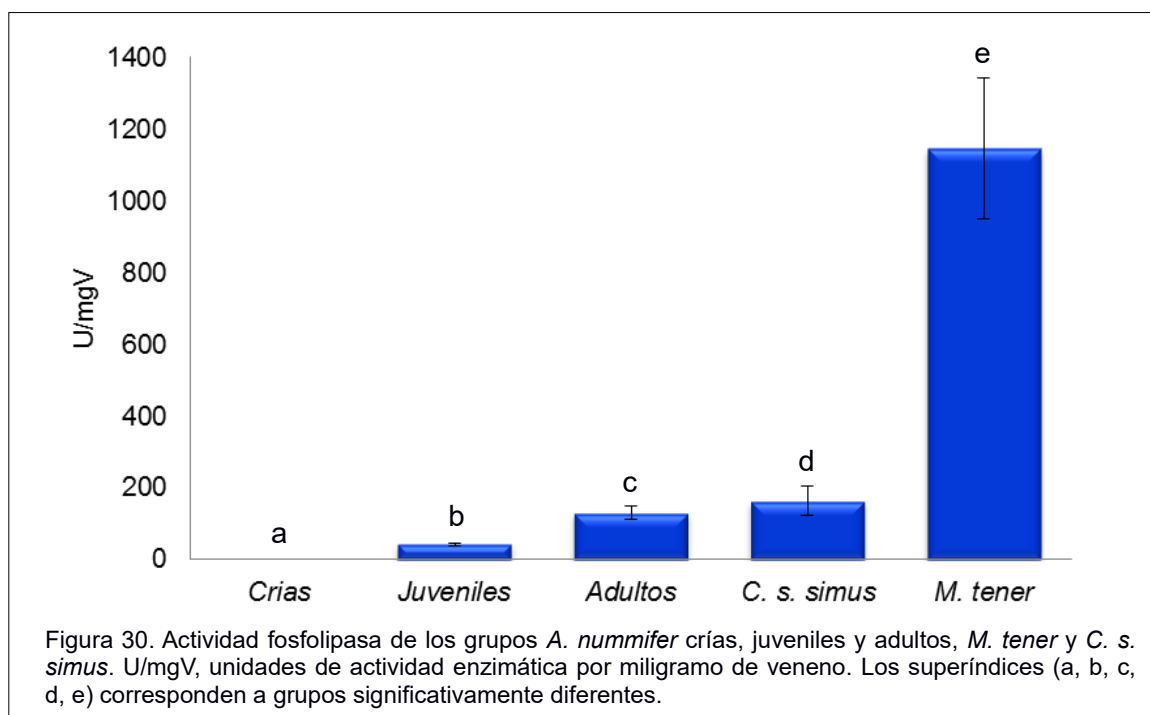
6.4. Actividad fosfolipasa A₂

En la actividad fosfolipasa se utilizaron los mismos controles, con particular importancia en el veneno de *M. tener* debido a que se conoce la importante actividad fosfolipasa (Bénard, 2011). Entre los grupos de *A. nummifer* los adultos presentaron la mayor actividad con 130.3 U/mgV, seguido por los juveniles 42.0 U/mgV, mientras que el veneno de crías no presentó actividad con cantidades iguales o menores a 10 µg (Cuadro 9). Por otro lado, el veneno de *C. simus* (163.0 U/mgV) y *M. tener* (1145.3 U/mgV) presentaron mayor actividad que el veneno de adultos de *A. nummifer*. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($X^2= 0.566$, $P = 2.2 \times 10^{-16}$, Figura 30) dentro de los grupos de *A. nummifer* y con los controles.

Cuadro 9. Actividad fosfolipasa para los estadios de desarrollo de *A. nummifer* y las especies usadas como controles

Especie	Grupo	U/mgV ¹ ± D.E. ²
	Crías	NP ³
<i>Atropoides nummifer</i>	Juveniles	42.0 ± 4.4
	Adultos	130.3 ± 17.4
<i>Crotalus s. simus</i>	Individuo	163.0 ± 39.6
<i>Micrurus tener</i>	Individuo	1145.3 ± 195.3

U/mgV¹, unidades de actividad por miligramo de veneno; D.E.², desviación estándar; NP³, no presentó actividad con ≤ 10 µg.



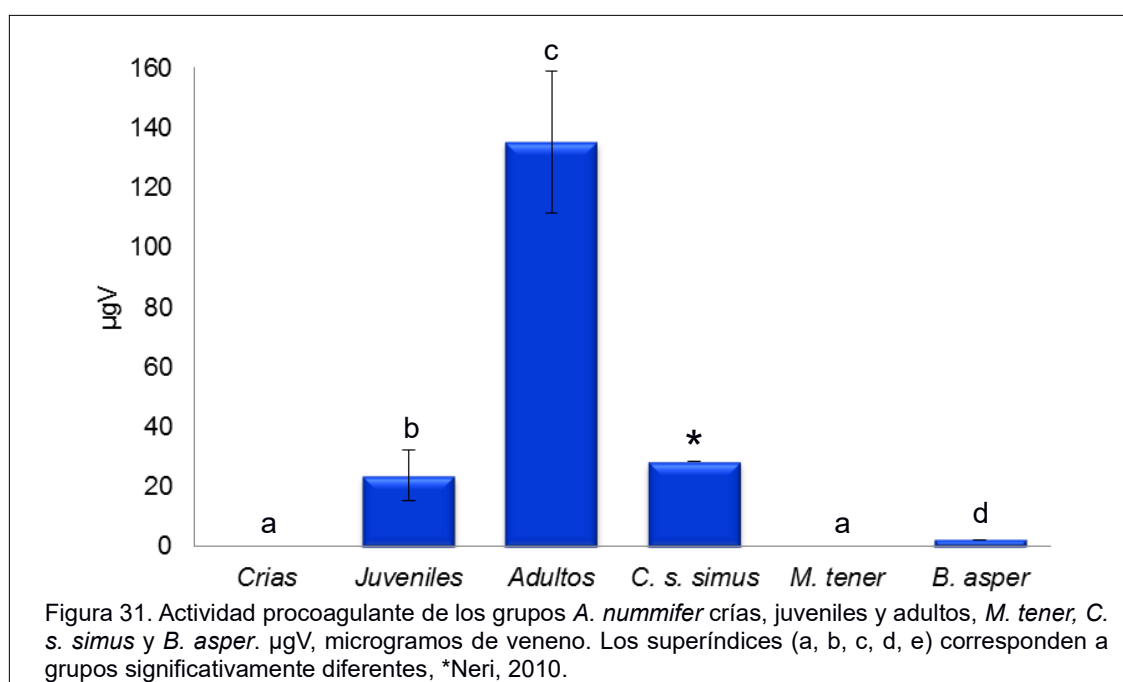
6.5. Actividad procoagulante

En la actividad procoagulante se utilizó como control adicional la especie *B. asper* debido a su elevada actividad procoagulante (Rucavado, 2006). El veneno de crías de *A. nummifer* y la especie *M. tener* no presentaron actividad con $\leq 50 \mu\text{g}$ de veneno (Cuadro 10), mientras que el veneno de los juveniles presentó la mayor actividad con $21.8 \mu\text{g}$, seguido por los adultos con $133.2 \mu\text{g}$, la diferencia entre la actividad de los grupos y los controles utilizados fue significativa ($X^2 = 0.376$, $P < 2.2$; Figura 31). El veneno de *C. s. simus* presentó menor actividad que los juveniles de *A. nummifer*, mientras que *B. asper*, presentó la mayor actividad de todas las especies analizadas con $0.2 \mu\text{g}$.

Cuadro 10. Actividad procoagulante para los estadios de desarrollo de *A. nummifer* y las especies usadas como controles

Especie	Grupo	$\mu\text{gV}^1 \pm \text{D.E.}^2$
<i>Atropoides nummifer</i>	Crías	NP ³
	Juveniles	21.8 ± 8.4
	Adultos	133.2 ± 23.9
<i>Crotalus s. simus</i>	Mezcla	26.3 ± 0.0^4
<i>Micrurus tener</i>	Individuo	NP ³
<i>Bothrops asper</i>	Individuo	0.2 ± 0.0

μgV^1 , microgramo de veneno; D.E.^2 desviación estándar; NP³, no presentó actividad con $\leq 50 \mu\text{g}$; ⁴Tomado de Neri E., 2010.



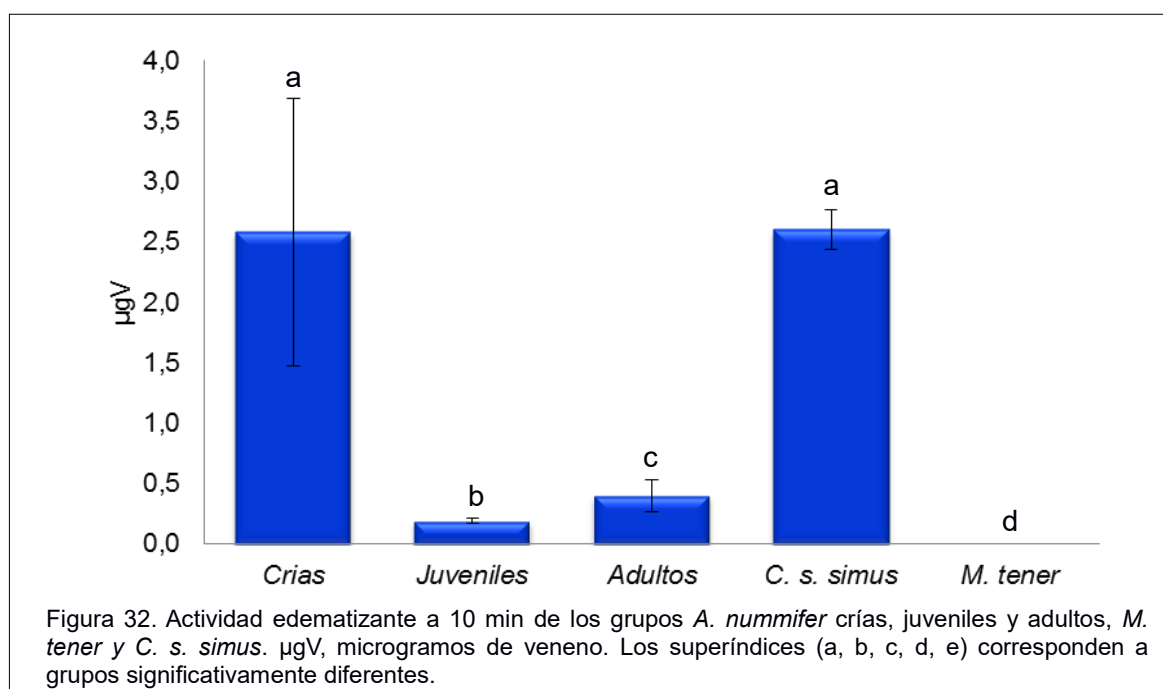
6.6. Actividad edematizante

Entre los venenos analizados de *A. nummifer*, los juveniles presentaron la mayor actividad edematizante a los 10 min con 0.2 µg, seguido por el veneno de los adultos con 0.4 µg y al final las crías con 2.6 µg (Cuadro 11). Por otro lado, el veneno de *M. tener* no presentó actividad edematizante con 10 µg, mientras que *C. s. simus* presentó una baja actividad con 2.6 µg de veneno, la variación de la actividad del veneno entre los grupos de *A. nummifer* y a su vez con ambos controles fue significativa ($X^2= 0.72$, $P < 2.2 \times 10^{-16}$; Figura 32).

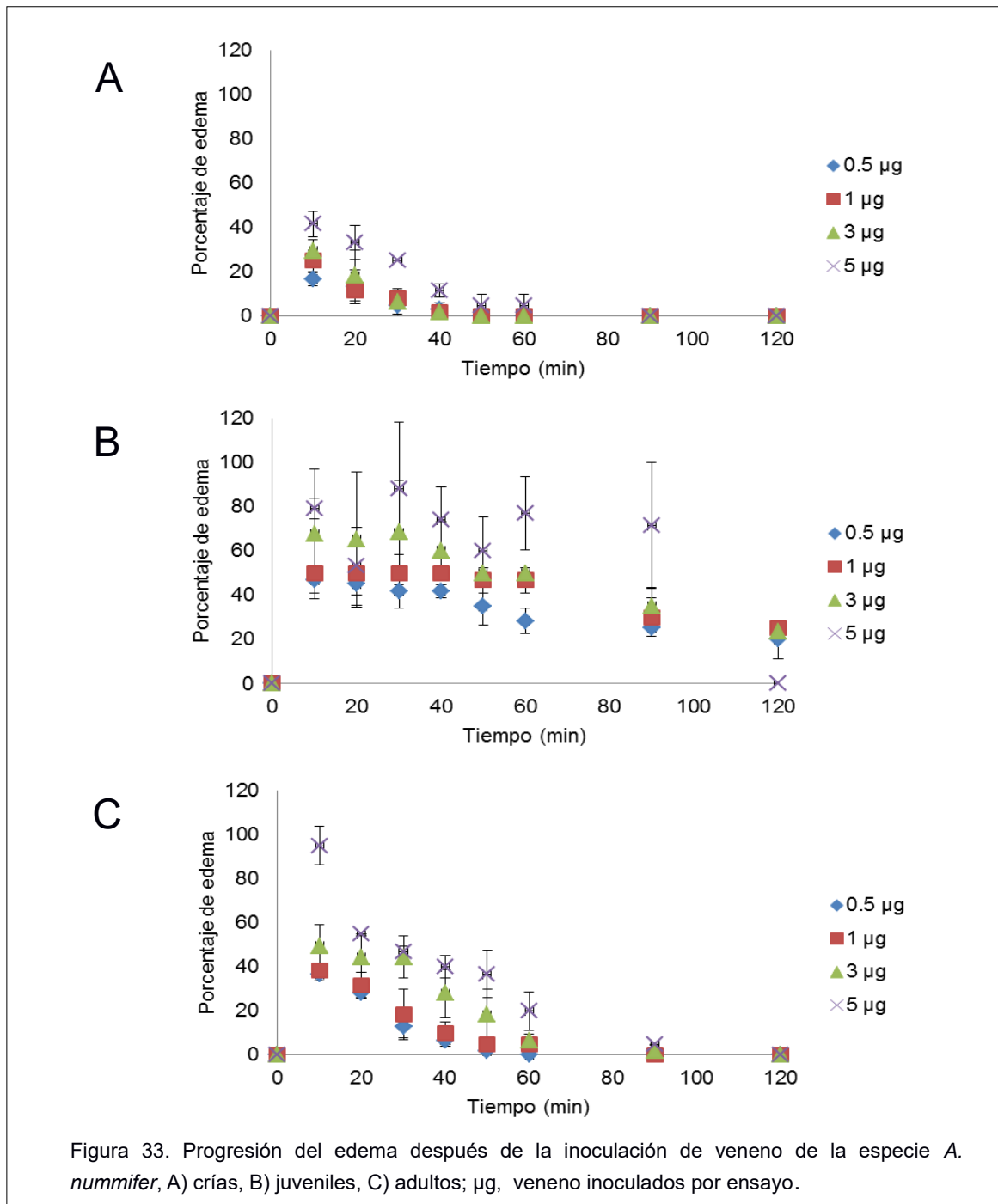
Cuadro 11. Actividad edematizante para los estadios de desarrollo de *A. nummifer* y las especies usadas como controles

Especie	Grupo	µgV ¹ ± D.E. ²
<i>Atropoides nummifer</i>	Crías	2.6 ± 1.1
	Juveniles	0.2 ± 0.0
	Adultos	0.4 ± 0.1
<i>Crotalus s. simus</i>	Individuo	2.6 ± 0.2
<i>Micrurus tener</i>	Individuo	NP ³

µgV¹, microgramo de veneno; D.E.² desviación estándar; NP³, no presentó actividad con ≤ 10 µg.



La Figura 33 se muestra el edema generado por la acción del veneno, en crías a los 10 min se observa el mayor edema en las cuatro dosis administradas, sin embargo, de los 20 a 50 minutos disminuye drásticamente hasta 0% de edema. En el veneno de juveniles, el mayor edema se mantiene oscilando entre 10 a 60 minutos, además a los 120 minutos no disminuye completamente el edema. Por otro lado, el veneno de adultos al igual que el de crías, presenta el mayor edema a los 10 minutos, con disminución total del edema a los 90 minutos.



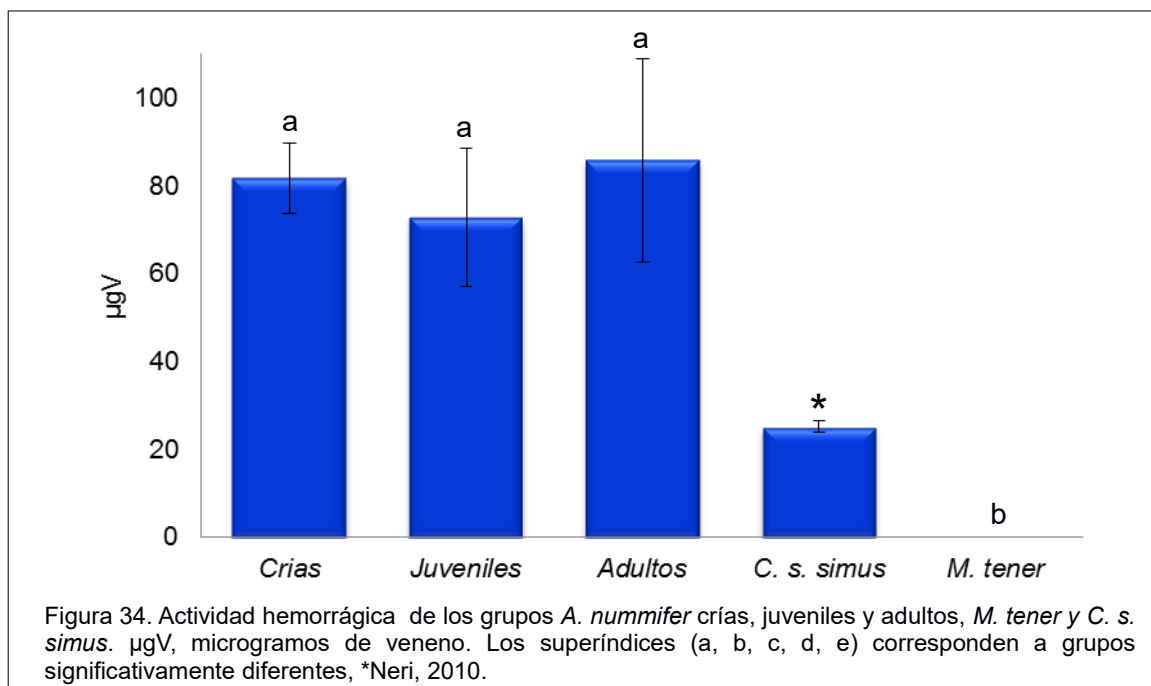
6.7. Actividad hemorrágica

Los análisis de la actividad hemorrágica mostraron que el veneno del grupo de los juveniles presentó la mayor actividad con 72.7 μg , seguido por las crías con 81.7 μg y al final los adultos con 85.8 μg (Cuadro 12); sin embargo, esta variación estadísticamente no fue significativa ($F= 0.4758$, $P = 0.643$). Los controles tuvieron una baja actividad, la especie *C. s. simus* con 25.1 μg , y *M. tener* no presentó actividad con 35 μg . Los análisis estadísticos mostraron que entre los controles y los grupos de *A. nummifer*, tampoco hay variación significativa (Figura 34).

Cuadro 12. Actividad hemorrágica para los estadios de desarrollo de *A. nummifer* y las especies usadas como controles

Especie	Grupo	$\mu\text{gV}^1 \pm \text{D.E.}^2$
<i>Atropoides nummifer</i>	Crías	81.7 \pm 7.9
	Juveniles	72.7 \pm 15.7
	Adultos	85.8 \pm 23.2
<i>Crotalus s. simus</i>	Individuo	25.1 \pm 1.3 ⁴
<i>Micrurus tener</i>	Individuo	NP ³

μgV^1 , microgramo de veneno; D.E.², desviación estándar; NP³, no presentó actividad con 35 μg ;
⁴Tomado de Neri E., 2010.



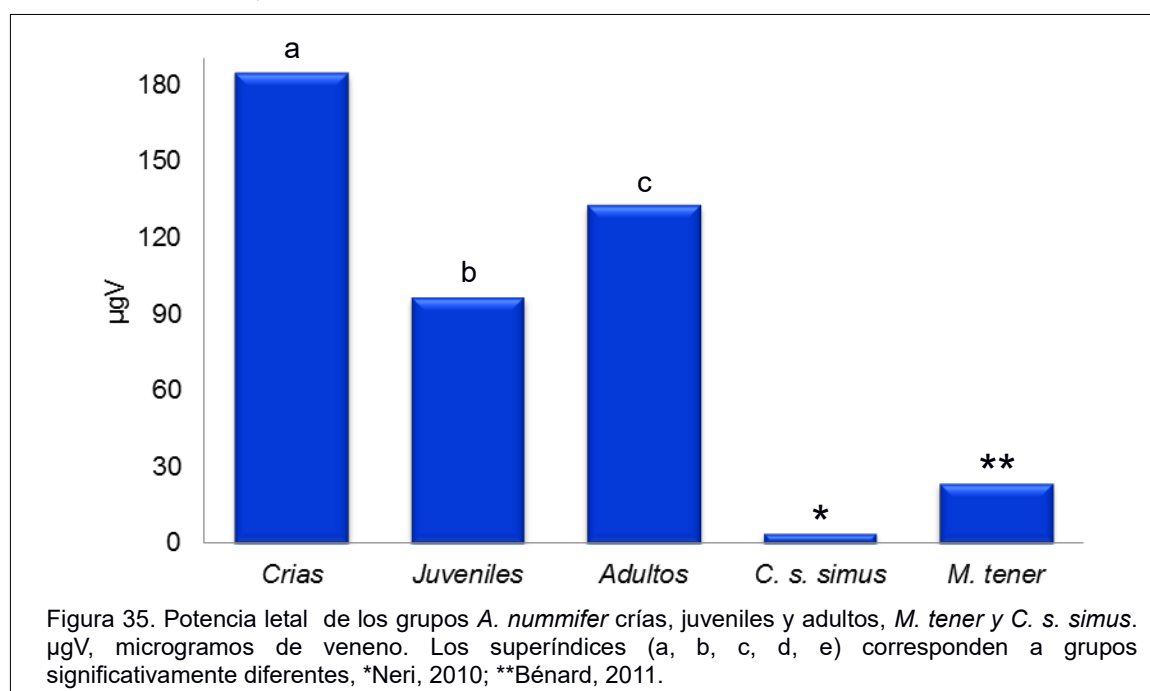
6.8. Potencia letal

La mayor potencia letal se registró para los juveniles quienes presentaron la mayor potencia letal con 96.6 μg de veneno, seguido por el veneno de los adultos con 132.6 μg , y la menor potencia letal fue del veneno de las crías con 184.4 μg de veneno, a partir del análisis estadístico se determinó que la variación es significativa entre los grupos ($F_{2,8}=160$, $P < 0.0001$; Cuadro 13). Se utilizaron como controles los resultados obtenidos para *C. s. simus* con 3.8 μg y para *M. tener* con 23.7, reportados por Neri en el 2013 y Bénard en el 2011, respectivamente. Ambos controles presentaron una mayor potencia letal que los grupos de *A. nummifer*, la especie *C. s. simus* presentó 25 veces mayor potencia letal de el grupo de los juveniles de *A. nummifer*, mientras que el veneno de *M. tener* es 4 veces más letal (Figura 35).

Cuadro 13. Actividad letal para los estadios de desarrollo de *A. nummifer* y las especies usadas como controles

Especie	Grupo	$\mu\text{gV/ ratón}^1$	I.C. ²
<i>Atropoides nummifer</i>	Crías	184.4	175.8 \pm 193.4
	Juveniles	96.6	95.85 \pm 97.33
	Adultos	132.6	129.7 \pm 135.5
<i>Crotalus s. simus</i>	Individuo	3.5 ³	3.5 \pm 4.1 ³
<i>Micrurus tener</i>	Individuo	23.7 ⁴	22.8 \pm 24.4 ⁴

$\mu\text{gV/ ratón}^1$, microgramo de veneno por ratón; I.C.², intervalo de confianza 95%; ³Tomado de Neri E., 2010; ⁴Tomado de Bénard M., 2011.



6.9. Potencia neutralizante por “Viper Stat”

Para la potencia letal solo se realizó para el veneno de los juveniles y adultos de *A. nummifer*, debido a la poca disponibilidad de veneno de las crías. Los resultados fueron expresados en volumen de antiveneno necesario para neutralizar 2 DL₅₀ por vía intravenosa. El veneno de juveniles requirió 13.7 mgAV/mgV, mientras que el veneno de los adultos tan solo utilizó 9.3 mgAV/mgV (Cuadro 14). Se observó que los venenos de los grupos de *A. nummifer* son neutralizados en un rango de 9.3 a 13.7 mg de Viper Stat por miligramo de veneno, no hay diferencias significativas en la neutralización ($F_{1, 5} = 0.7155$, $P = 0.4362$; Figura 36).

Cuadro 14. Potencia neutralizante para los estadios de desarrollo de *A. nummifer* y las especies usadas como controles

	<i>Atropoides nummifer</i>	
	Juveniles	Adultos
2 DL ₅₀ (µg)	193.2	265.2
EC ₅₀ (µAV/ 2DL ₅₀)	149.1	128,9
I.C. EC ₅₀ (µAV/ 2DL ₅₀)	116.1 ± 191.6	76.30 ± 217.7
mgAV/mgV	13.7	9.3
DL ₅₀ /vial	67.0	72.5

µg, microgramo de veneno; 2 DL₅₀, dos dosis letales media; EC₅₀ (µAV/2DL₅₀); volumen de antiveneno en microlitros de antiveneno necesario para neutralizar 2 DL₅₀; I.C. EC₅₀ (µAV/2DL₅₀), intervalo de confianza a 95 % de los microlitros de antiveneno que neutralizan 2 DL₅₀; mgAV/mgV, miligramos de antiveneno que neutraliza 1 miligramo de veneno; DL₅₀/vial; dosis letal media neutralizadas por vial.

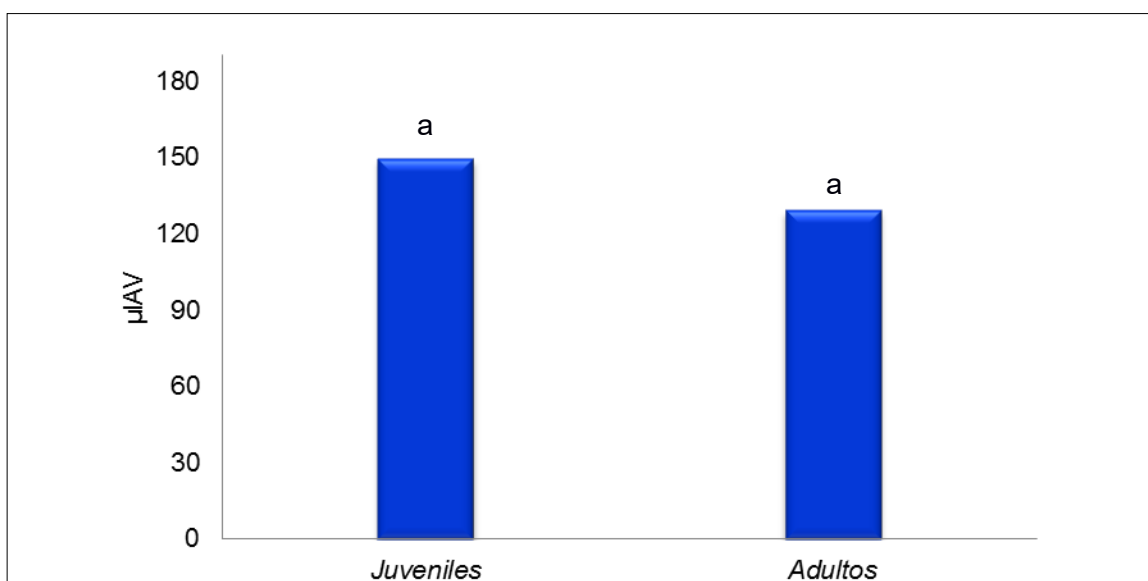


Figura 36. Neutralización del veneno de los grupos juveniles y adultos de *A. nummifer*. µgVA, microgramos de veneno. Los superíndices (a, b, c, d, e) corresponden a grupos significativamente diferentes.

7. DISCUSIÓN

7.1. Perfiles electroforéticos por SDS-PAGE

Los perfiles electroforéticos de los ejemplares de *Atropoides nummifer* presentan componentes con pesos moleculares similares a lo reportado para la familia Viperidae, y además, muestran diferencias dependiendo de la edad del ejemplar, esto también se ha observado en *Crotalus viridis viridis* (Fierro *et al.*, 1972), *Bothrops asper* (Gutiérrez, 1980; Saldarriaga *et al.*, 2003), *Crotalus atrox* (Minton *et al.*, 1986), *Crotalus oreganus* (Mackessy, 1988), *Lachesis stenophrys* (Gutiérrez *et al.*, 1990; Madriga *et al.*, 2012), *Bothrops atrox* (López *et al.*, 2002; Saldarriaga *et al.*, 2003), *Crotalus oreganus concolor* (Mackessy *et al.*, 2003), *Bothrops jararaca* (Antunes *et al.*, 2010), *Bothrops insularis* (Zelanis *et al.*, 2008) y *Crotalus basiliscus* (Uscanga, 2014).

a) Perfil de crías

El veneno de crías presentó mayor proporción de bandas de mediano peso molecular las cuales podrían tratarse de serinoproteasas, metaloproteasas clase I y/o clase II, además de proteínas de alto peso molecular, las cuales podrían ser metaloproteasas clase III (Mackessy, 2010). En contraste con el perfil de adultos, el veneno de crías no presentó moléculas de bajo peso molecular posiblemente correspondientes a fosfolipasas A₂.

Las bandas de alto peso molecular, también se reportaron en el veneno de crías de la especie *Bothrops atrox*, *B. asper* y *B. jararaca* (López *et al.*, 2002; Saldarriaga *et al.*, 2003; Antunes *et al.*, 2010), a diferencia de *C. oreganus concolor* y *Lachesis stenophrys* con mayor proporción de bandas de alto peso molecular en el veneno de adultos (Mackessy *et al.*, 2003; Madrigal *et al.*, 2012).

b) Perfil de adultos

El veneno de adultos presentó bandas principalmente de mediano peso molecular que corresponden al peso de serinoproteasas y metaloproteasas clase I y clase II. También se observaron moléculas de bajo peso molecular que podrían tratarse de fosfolipasas A₂. Por otro lado, no se observan bandas de alto peso molecular representadas en el veneno de crías y juveniles, las cuales corresponde al peso de metaloproteasas clase III (Mackessy, 2010).

c) Perfil de juveniles

El veneno de juveniles presentó bandas de bajo peso molecular que podrían tratarse de fosfolipasas A₂, mediano peso molecular que corresponde a lo reportado para serinoproteasas, metaloproteasas clase I y clase II, y además, proteínas de alto peso molecular que corresponde a metaloproteasas clase III (Mackessy, 2010).

Los perfiles proteicos de juveniles conservan características similares a los perfiles de adultos y crías. Estas características sugieren una etapa de transición ontogénica alrededor de los 18 meses, que también se ha observado en juveniles de *Bothrops atrox* (López *et al.*, 2002).

7.2. Perfiles cromatográficos por RP-HPLC

Los componentes proteicos más frecuentes en los perfiles cromatográficos de vipéridos son metaloproteasas, serinoproteasas, fosfolipasas A₂, lectinas tipo C, miotoxinas, desintegrinas, proteínas ricas en cisteína, L- aminoácido oxidasas, péptidos potenciadores de bradiquinina (Angulo *et al.*, 2007; Alape *et al.*, 2008; Neri *et al.*, 2013), la proporción de cada componente varía dependiendo de la especie.

En el género *Atropoides*, estas proporciones varían considerablemente dependiendo de la especie involucrada, para *A. mexicanus* se encontró principalmente una mayor proporción de fosfolipasas A₂ (36.5%), serinoproteasas (22%) y metaloproteasas clase I (14.8%), mientras que, *A. picadoi* presenta en su mayoría metaloproteasas clase III (56.7%), serinoproteasas (13%) y metaloproteasas clase I (9.7%), entre otros componentes de menor proporción (Angulo *et al.*, 2007). Al comparar los perfiles cromatográficos de *A. nummifer* por HPLC observamos que existen fracciones que eluyen en los mismos porcentajes de acetonitrilo y al ser analizados por SDS-PAGE coinciden en pesos moleculares, por lo que, sugerimos la presencia de metaloproteasas, serinoproteasas y fosfolipasas (Véanse Figuras 25, 26 y 27). Como se ha observado en otros venenos, la fracciones que eluyen antes de 20 min son componentes no proteicos, lo cual fue corroborado en nuestros venenos ya que no presentaron bandas proteicas en los perfiles electroforéticos (SDS-PAGE) de las fracciones colectadas en este periodo.

a) Perfil de crías

El perfil cromatográfico del veneno en crías mostró la mayoría de componentes del minuto 18 al 24 en el cual no se observaron elementos proteicos en las fracciones colectadas, y

del minuto 62 al 86 que corresponde al periodo de elución de fosfolipasas A₂, serinoproteasas y metaloproteasas (Angulo *et al.*, 2007). Los perfiles electroforéticos de las fracciones a partir del minuto 62 mostraron principalmente componentes de mediano (\approx 23 kDa) y alto peso molecular (\geq 50 kDa) que corresponde al peso molecular y tiempo de elución de metaloproteinasas (Angulo *et al.*, 2007; Mackessy, 2010). Los componentes en menor proporción presentan un bajo peso molecular aproximado de 14 kDa que podrían ser fosfolipasas A₂ (Mackessy, 2010). Sin embargo del minuto 35 hasta el 60 no se colectaron fracciones debido a que estaban en proporciones muy bajas, este periodo corresponde al tiempo de elución de fosfolipasas A₂ (Angulo *et al.*, 2007).

Los perfiles electroforéticos de las fracciones colectadas en crías, concuerda con el perfil del veneno completo donde los componentes principales son metaloproteinasas y en baja proporción fosfolipasas A₂. El proteoma de *A. picadoi* similar a los componentes mayoritarios observados en el veneno de crías de *A. nummifer*, principalmente representado por metaloproteinasas, y en baja proporción fosfolipasas A₂ (Angulo *et al.*, 2007).

b) Perfil de adultos

La mayoría de componentes en la mezcla de veneno se obtuvieron a partir del minuto 53 hasta el 86, donde las fracciones con mayor concentración se registraron en el minuto 53, 63 y 82. Las fracciones de mayor proporción eluyeron dentro de condiciones optimas para fosfolipasas A₂, serinoproteasas y metaloproteasas clase I (Angulo *et al.*, 2007; experiencia personal). En los perfiles proteicos de las fracciones colectadas se observó que presentan principalmente componentes de bajo peso molecular alrededor de 15 kDa, también se observaron componentes de mediano peso molecular entre 25 y 37 kDa, mientras que, los componentes de alto peso molecular están presentes en baja proporción y únicamente en 2 fracciones.

Lo anterior concuerda con lo observado en el perfil electroforético del veneno completo, que presenta una alta proporción de elementos de bajo peso molecular que corresponden a fosfolipasas A₂, y baja proporción de elementos de alto peso molecular como son metaloproteinasas clase III (Mackessy, 2010). La mayor proporción de fosfolipasas A₂ y serinoproteasas se registraron en los proteomas de *Atropoides mexicanus* (Angulo *et al.*, 2007).

c) Perfil de juveniles

El perfil cromatográfico de juveniles no presentó elementos proteicos en los primeros 47 minutos, a excepción de F11. Los principales componentes de las fracciones de juveniles podrían ser fosfolipasas A₂, serinoproteasas y metaloproteasas. La mayoría de fracciones aparecieron del minuto 52 hasta el 88, del minuto 48 al 68 las fracciones colectadas presentaron un peso ≈15 y 25 a 37 kDa, que en base a los pesos y tiempo de elución es muy probable que se trate de fosfolipasas y metaloproteasas tipo II o serinoproteasas respectivamente, mientras que, del minuto 69 al 88 presentó principalmente metaloproteinasas clase III de > 50 kDa (Angulo *et al.*, 2007; Mackessy, 2010). La alta proporción de metaloproteinasas, serinoproteasas y fosfolipasas A₂ en el perfil electroforético del veneno completo y las fracciones colectadas, permite observar características compartidas con el veneno de crías y adultos.

Analizando los perfiles electroforéticos del veneno por individuo de juveniles, permite observar variaciones en cuanto a la concentración de componentes, esta característica también se observó en los perfiles cromatográfico por individuo de *Crotalus s. simus* con 18 meses de edad, los cuales mostraron variación en crotoxina y metaloproteinasas, lo que sugiere que esta etapa de desarrollo para *C. s. simus* y *A. nummifer* es un punto clave de transición en cuanto a la composición del veneno (Durban *et al.*, 2013)

Actividades biológicas

Como parte del esfuerzo continuo para caracterizar los venenos de serpientes de México, este estudio evaluó la variabilidad intraespecífica en el veneno de *A. nummifer* mediante la caracterización de sus actividades biológicas. A partir de los reportes previos, se conoce que el género *Atropoides*, al igual que otros vipéridos, presenta actividad sobre el sistema hemostático a nivel local y sistémico, así como daños locales producidos por la actividad proteolítica, edematizante y mionecrótica (Gutiérrez *et al.*, 1989; Gené *et al.*, 1989; Lomonte *et al.*, 1994; Markland, 1998; Roodt *et al.*, 2005; Angulo *et al.*, 2007). En el Cuadro 15 se resumen los resultados obtenidos en las actividades biológicas para *Atropoides nummifer*.

Cuadro 15. Resumen de las actividades biológicas para los estadios de desarrollo de *A. nummifer* y las especies usadas como controles

Actividad	Crías	Juveniles	Adultos	<i>C. s. simus</i>	<i>M. tener</i>	<i>B. asper</i>
Proteolítica ² (U/mgV)	43.9 ± 2.1 ^a	56.4 ± 0.8 ^b	48.4 ± 1.7 ^c	37.4 ± 2.0 ^d	1.5 ^e	ND ¹
Fosfolipasa A ₂ (U/mgV)	0.0 ^a	42.0 ± 4.4 ^b	130.3 ± 17.4 ^c	163.0 ± 39.6 ^d	1145.3 ± 195.3 ^e	ND ¹
Procoagulante (µgV)	0.0 ^a	21.8 ± 8.4 ^b	133.2 ± 23.9 ^c	26.3 ± 0.0 ¹	0.0 ^a	0.2 ± 0 ^d
Edematizante (µgV)	2.6 ± 1.1 ^a	0.2 ± 0.0 ^b	0.4 ± 0.1 ^c	2.6 ± 0.2 ^a	0.0 ^d	ND ¹
Hemorrágica (µgV)	81.7 ± 7.9 ^a	72.7 ± 15.7 ^a	85.8 ± 23.3 ^a	25.1 ± 1.3 ¹	0.0 ^b	ND ¹
Potencia Letal (µgV)	184.4 ^a	96.6 ^b	132.6 ^c	3.5 ¹	23.7 ²	ND ¹
Neutralización (mgAV/mgV)	ID	13.7 ^a	9.3 ^a	ND ¹	ND ¹	ND ¹

± Desviación estándar; ¹Neri, 2010, ²Bénard, 2011. Los superíndices (a, b, c, d, e) corresponden a grupos significativamente diferentes.

Las variaciones observadas en los experimentos no son resultado de variación individual, debido a que se utilizaron individuos de diferentes localidades, por lo cual las diferencias son resultado exclusivamente de variación ontogénica.

7.3. Actividad proteolítica

La actividad proteolítica en el veneno es ocasionada principalmente por metaloproteasas y serinoproteasas (Rucavado, 2006, Serrano, 2013). En los perfiles electroforéticos es notable la disminución de bandas de alto peso molecular del veneno de crías a adultos las cuales podrían ser metaloproteasas clase III, sin embargo, las metaloproteasas clase I y clase II no se logran diferenciar de las serinoproteasas debido a que presentan pesos moleculares muy parecidos. Las especies *C. s. simus* y *M. tener*, presentaron una actividad mucho menor a la reportada para *A. nummifer*, sobre todo la especie *M. tener*. En *C. s. simus* se ha observado que en presencia de EDTA el veneno pierde la actividad proteolítica, por lo tanto la actividad enzimática sobre azocaseína esta dada exclusivamente por metaloproteasas (McCall *et al.*, 2000; Roodt, 2002; experiencia personal Neri E.).

La actividad proteolítica en ejemplares jóvenes observada en *A. nummifer* también se reporta para *Bothrops asper* (Gutiérrez *et al.*, 1980) y *C. oreganus concolor* (Mackessy *et*

al., 2003), contrario a otros vipéridos *Crotalus d. durissus* (Lomonte *et al.*, 1983), *Crotalus viridis helleri* (Mackessy, 1988), *Lachesis muta stenophrys* (Gutiérrez *et al.*, 1990). Mientras que, para *Bothrops jararacá* (Antunes *et al.*, 2010) la edad del ejemplar no alteró su actividad.

7.4. Actividad fosfolipasa A₂

El veneno de adultos de *A. nummifer* presentaron dos veces mayor actividad que los juveniles, lo cual concuerda con lo observado en los perfiles electroforéticos y cromatográficos de adultos con bandas en mayor proporción de ≈14 kDa que corresponde al peso de las fosfolipasas A₂. Sin embargo, este veneno presentó menor actividad que los controles *C. simus* y *M. tener*, en esta última se conoce que las fosfolipasas son el principal componente del veneno (Bénard, 2011). Por otro lado, el veneno de crías de *A. nummifer* no presentó actividad que concuerda con el perfil electroforético que presenta una banda en baja concentración alrededor de 14 kDa que probablemente se trata de una fosfolipasa sin actividad enzimática.

La mayor actividad en ejemplares adultos de *A. nummifer* diferente de lo reportado para otros vipéridos como *C. v. helleri* (Mackessy, 1988), *Lachesis muta stenophrys* (Gutiérrez *et al.*, 1990), *C. o. oreganus* (Mackessy *et al.*, 2003), *Bothrops jararaca* (Antunes *et al.*, 2010) y *C. o. helleri* donde los ejemplares jóvenes presentan la mayor actividad fosfolipasa A₂.

7.5. Actividad procoagulante

La alta actividad coagulante del veneno de *Bothrops asper* ha sido reportada anteriormente (Gené *et al.*, 1989; Saldarriaga *et al.*, 2003) en nuestro trabajo este presentó la mayor actividad coagulante. Mientras que, el veneno de *Micrurus tener* no presentó actividad y *C. simus* presentó menor actividad que los juveniles de *A. nummifer*.

El veneno de juveniles presentó mayor actividad procoagulante que el veneno de adultos, lo anterior también se reportó en *Lachesis muta stenophrys* (Gutiérrez 1990), *B. asper* (Gené *et al.*, 1989; Saldarriaga *et al.*, 2003) y *B. atrox* (Reid *et al.*, 1978; López *et al.*, 2002; Saldarriaga *et al.*, 2003), aunque a diferencia de las anteriores en *A. nummifer* las crías no presentaron actividad. Los niveles de fibrinógeno son uno de los principales parámetro para evaluar el grado de envenenamiento en muchos hospitales, sin embargo

en mordedura de crías de *A. nummifer* del estado de Veracruz no sería relevante durante el tratamiento.

Las seriproteasas son comunes en el veneno de vipéridos (Mackessy, 2010), juegan un papel importante alterando el sistema hemostático promoviendo la coagulación (Roodt, 2002), estos componentes se encontraron en los proteomas de *Atropoides mexicanus* y *A. picadoi* (Angulo *et al.*, 2007), por lo cual podrían ser responsables del efecto procoagulante en el veneno de *A. nummifer*.

El veneno de juveniles de *A. nummifer* presentó menor actividad que *A. mexicanus* (Rojas *et al.*, 2001; Antúñez *et al.*, 2010). Por otra parte, el veneno de *A. picadoi* (Antúñez *et al.*, 2010) al igual que crías de *A. nummifer* no presentaron actividad procoagulante.

7.6. Actividad edematizante

Los juveniles presentaron la mayor actividad, la cual también se ha reportado para los juveniles de *B. asper* y *B. atrox* (Saldarriaga *et al.*, 2003). El veneno de crías presentó una actividad edematizante similar a *C. simus*, lo anterior difiere de lo reportado para las crías de *C. d. durissus* que no presentan actividad (Lomonte *et al.*, 1983).

En el veneno de *A. mexicanus* se reportó actividad edematizante a los 60 minutos, contrario al periodo de tiempo en el que nosotros reportamos para *A. nummifer*. La actividad edematizante en *A. nummifer* se reportó a los 10 min debido a que en este tiempo apareció el mayor edema, además parece ser un edema transitorio que desaparece drásticamente. Sin embargo en otros vipéridos, por ejemplo en *Agkistrodon bilineatus* el edema se mantiene al menos durante 150 minutos y la mayor hinchazón se reporta a los 50 min. Por lo cual, se podría decir que los componentes que ocasionan el edema en *A. bilineatus* probablemente son diferentes de los observados en el edema de *A. nummifer*. Actualmente se desconocen los componentes edematizantes y en *A. nummifer* parece que no son de gran importancia durante el envenenamiento debido a que produce un edema transitorio.

7.7. Actividad hemorrágica

La actividad hemorrágica entre los grupos de *A. nummifer* no mostró una tendencia de cambio entre los grupos, tal como se observó para *B. asper* (Gutiérrez *et al.*, 1980; Saldarriaga *et al.*, 2003), *B. atrox* (Saldarriaga *et al.*, 2003) donde disminuye la actividad

hemorrágica de crías a adultos, o aumento de actividad reportado en *Crotalus d. durissus* (Lomonte *et al.*, 1983), *C. atrox* (Minton *et al.*, 1986) y *Lachesis m. stenophrys* (Gutiérrez *et al.*, 1990).

El perfil electroforético del veneno de crías y juveniles presentó mayor proporción de metaloproteasas clase III que el veneno de adultos, por otro lado, la actividad hemorrágica de adultos no difiere de la reportada para ejemplares más jóvenes. Sin embargo, cabe mencionar que no todas las metaloproteasas presentan actividad hemorrágica y en su lugar pueden actuar inhibiendo la agregación plaquetaria, ocasionando apoptosis celular o activando factores de la cascada de coagulación (Mackessy, 2010), esto podría ocurrir en los venenos de *A. nummifer*.

Las metaloproteinasas son las principales responsables de la actividad hemorrágica en los venenos de vipéridos (Roodt, 2002), éstas se reportaron en alta proporción en los proteomas de *Atropoides mexicanus* y *A. picadoi*, en especial las metaloproteasas clase III en esta última (Angulo *et al.*, 2007). Debido a esto, no es sorprendente la presencia en el veneno de *A. nummifer* observada en los perfiles electroforéticos del veneno completo y las fracciones colectadas (RP-HPLC).

7.8. Potencia letal

En otros vipéridos se ha reportado que los recién nacidos o juveniles presenta mayor potencia letal que el veneno de adultos, como *C. v. viridis* (Fierro *et al.*, 1972), *B. asper* (Gutiérrez *et al.*, 1980; Saldarriaga *et al.*, 2003), *B. atrox* (Saldarriaga *et al.*, 2003), *C. d. durissus* (Lomonte *et al.*, 1983), y *C. atrox* (Minton *et al.*, 1986). El veneno de *C. simus* (Neri, 2010) y *M. tener* (Bénard, 2011) presenta mayor potencia letal que *Atropoides nummifer*. Sin embargo, el veneno de juveniles de *A. nummifer* es más letal que *A. mexicanus* (Rojas *et al.*, 2008; Antúnez *et al.*, 2010) aunque alrededor de 2 veces menos que *A. picadoi* (Antúnez *et al.*, 2010).

La baja actividad enzimática y toxicidad del veneno en crías de *Atropoides nummifer* también ocurre en *Lachesis muta stenophrys* (Gutiérrez *et al.*, 1990). Una posible explicación propuesta para esta baja letalidad en crías de *L. m. stenophrys* y que también podría aplicar para *A. nummifer*, es su conducta alimenticia. Las crías de esta especie muerde y se aferra inmovilizando la presa por un procedimiento mecánico, por lo que es

posible que no requiera componentes tóxicos para este propósito particular (Mackessy, 2010).

En *Lachesis stenophrys* los cambios ontogenéticos en la composición del veneno parecen estar regulados por control genético, y no están ligados a presión ambiental por la dieta, debido a que esta especie se alimenta desde su nacimiento de vertebrados pequeños (Madrigal, 20012). A diferencia de lo que se propone para *Crotalus o. concolor* que presenta cambios en la alimentación: las crías consumen principalmente lagartijas y los adultos mamíferos pequeños (Mackessy *et al.*, 2003). Sin embargo, en *A. nummifer* no se cuentan con estudios suficientes de los hábitos alimenticios ni procedimientos experimentales sobre diferentes modelos biológicos para corroborar esta teoría.

7.9. Potencia neutralizante por “Viper Stat”

El antiveneno Viper Stat es un recurso terapéutico disponible para uso veterinario, por lo tanto, es de interés evaluar la capacidad neutralizante hacia el veneno de *A. nummifer*, sobre todo teniendo en cuenta que esta especie no está incluida en la producción de antivenenos. Inicialmente se retó al antiveneno con 3DL₅₀, sin embargo, el antiveneno no neutralizaba, posiblemente debido a la gran cantidad de proteína inoculada (alta dosis letal media). Por lo tanto, se decidió resuspender el antiveneno en la mitad de volumen (5 mL) de modo que se aumentará la concentración proteica del antiveneno. Sin embargo tampoco se logró neutralizar la dosis letal. Debido a lo anterior se decidió retar al antiveneno con 2DL₅₀ asegurando previamente que con esta cantidad de veneno se obtenía el 100% de mortalidad. De este modo se evaluó la eficacia del antiveneno en proporciones equivalentes de veneno-antiveneno.

La neutralización de la potencia letal es la prueba más importante para evaluar la eficacia del antiveneno (WHO, 2010), nuestro estudio mostró que no hay diferencia en la neutralización del veneno de *Atropoides nummifer*, sin importar la variación ontogénica.

Los venenos con potencia letal alta (poco letales) frecuentemente no son neutralizados tan eficientemente como los venenos con mayor potencia letal (Neri, 2010), debido a las grandes cantidades de veneno administradas, esto hace que las cantidades de moléculas a neutralizar sean demasiadas y por lo tanto se requieren grandes cantidades de anticuerpo que neutralicen los componentes tóxicos (experiencia del grupo del Dr. Alejandro Alagón).

8. CONCLUSIONES

Este es el primer trabajo en realizar la caracterización biológica y bioquímica del veneno de *Atropoides nummifer* y además en reportar variación ontogénica en el género *Atropoides*.

El trabajar con venenos de diferentes localidades nos permite concluir que las diferencias observadas no son producto de variaciones individuales, sino que derivan de diferentes momentos en la ontogenia de la serpiente, por lo cual el veneno de *A. nummifer* del estado de Veracruz presenta variación ontogénica.

Entre los tres estadios de desarrollo estudiados, el veneno de juveniles mostró mayor actividad proteolítica, procoagulante, hemorrágico, edematizante, potencia letal y requirió mayor cantidad de antiveneno para ser neutralizado. Por otro lado, los adultos presentaron la mayor actividad fosfolipasa A₂. El veneno de crías no presentó actividad fosfolipasa ni procoagulante.

El veneno de *Atropoides nummifer* es menos letal que otros venenos de vipéridos, sin embargo, los daños locales pueden ser de importancia médica.

Nuestro estudio permite predecir el cuadro clínico durante el envenenamiento que involucraría hemorragias y posibles efectos miotóxicos. Además de brindar pruebas sobre importancia de la variación ontogénica en los venenos.

CONSIDERACIONES FINALES

Faltaría evaluar si los venenos de la especie *A. nummifer* de otros estados de la república presentan la misma variación reportada en el estado de Veracruz.

Sería de gran importancia estudiar la variación ontogénica en venenos de serpientes de importancia médica, de modo que se puedan incluir el veneno de diferentes estadios de desarrollo, con el propósito de mejorar los antivenenos.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alape A., Sanz L., Escolano J., Flores M., Madrigal M., Sasa M., Calvete J. (2008). Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations. *Journal of proteome research*, 7: 3556 – 3571.

Angulo Y., Olamendi T., Possani L., Lomonte B. (2000). Isolation and characterization of myotoxin II from *Atropoides (Bothrops) nummifer* snake venom, a new Lys49 phospholipase A₂ homologue. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 32: 63 – 71.

Angulo Y., Escolano J., Lomonte B., Gutiérrez J., Sanz L., Calvete J. (2007). Snake Venomics of Central American Pitvipers: Clues for Rationalizing the Distinct Envenomation Profiles of *Atropoides nummifer* and *Atropoides picadoi*. *Journal of proteome*, 7: 708 – 719.

Angulo Y., Castro A., Lomonte B., Rucavado A., Fernández J., Calvete J., Gutiérrez J. (2014). Isolation and characterization of four medium –size disintegrins from the venoms of Central American viperid snakes of the genera *Atropoides*, *Bothrops*, *Cerrophidion* and *Crotalus*. *Biochimie*, 107: 376 – 384.

Antunes T., Yamashita K., Barbaro K., Saiki M., Santoro M. (2010). Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon*, 56: 1443 – 1458.

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

Bénard M. (2011). Caracterización bioquímica del veneno de la serpiente de coral *Micrurus tener*. Tesis maestría. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Bernardoni J., Suosa L., Wermeling L., Lopes A., Prezoto B., Serrano S., Zingali R., Moura A. (2014). Functional Variability of Snake Venom Metalloproteinases: Adaptive Advantages in Targeting Different Prey and Implications for Human Envenomation. *Journal.pone*, 9: 1 – 13.

- Boback S., McCann K., Wood K., McNeal P., Blankenship E., Zwemer (2015). Snake constriction rapidly induces circulatory arrest in rats. *The Journal of Experimental Biology*, 218: 2279 – 2288.
- Calvete J. (2005). Structure-function correlations of snake venom disintegrins. *Current Pharmaceutical Design*, 11: 829 – 835.
- Calvete J., Sanz L., Cid P., Torre P., Flores M., Santos M., Borges A., Breimo A., Angulo Y., Lomonte B., Alape A., Gutiérrez J. (2010). Snake venomomics of the Central American Rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* Complex Points to neurotoxicity as an Adaptive Paedomorphic Trend along *Crotalus* Dispersal in South America. *Journal of Proteome*, 9: 528 – 544.
- Calvete J. (2013). The continuing saga of snake venom disintegrins. *Toxicon*, 62: 40 – 49.
- Campbell J., Lamar W. (2004). The venomous reptiles of the western hemisphere. Comstock Publishing Associates.
- Chippaux J., Williams V., White J. (1991). Snake venom variability: Methods of Study, results and interpretation. *Toxicon*, 29: 1279 – 1303.
- Chippaux J., (1998) Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bulletin of the World Health Organization*, 76: 515 – 524.
- Chippaux J., (2008). Estimating the global burden of snakebite can help to improve management. *Journal.pmed*, 5: 1538 – 1539.
- Duque J., Sánchez A., Fierro L., Ganzón S., Castaño R. (2007). Venenos de serpientes y moléculas antiveneno. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias*, 118, 109 – 137.
- Durban J., Pérez A., Sanz L., Gómez A., Bonilla F., Rodríguez S., Chacón D., Sasa M., Angulo Y., Gutiérrez J., Calvete J. (2013). Integrated “omics” profiling indicates that miRNAs are modulators of the ontogenetic venom composition shift in the Central American rattlesnake, *Crotalus simus simus*. *BioMed Central Genomics*, 14: 1471 – 2164.

Ernst C., Ernst E. (2011). Venomous Reptiles of the United States, Canada and Northern Mexico. Vol. 1. *The Johns Hopkins University Press*.

Fernández L., Morales N., Mayer L. (2011). Serpientes venenosas del Estado de Hidalgo. Primera edición. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Fiero M., Sefert M., Weaver T., Bonilla C. (1972). Comparative study of juvenile and adult prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Toxicon*, 10: 81 – 82.

Flores O., García U. (2014). Biodiversidad de reptiles en México. *Revista Mexicana de biodiversidad*, 85: 467-475.

Flores O., Gerez P. (1994). Biodiversidad y conservación en México: vertebrados, vegetación y uso del suelo. Segunda edición. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias. CONABIO.

Gené J., Roy A., Rojas G., Gutiérrez J., Cerdas L. (1989). Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rica crotaline snake venoms and their neutralization by polyvalent antivenom. *Toxicon*, 27: 841 – 848.

Gil G., Sánchez M., Reynoso V. (2011). Tratamiento prehospitalario del accidente ofídico: revisión, actualización y problemática actual. *Gaceta Médica de México*, 147: 195 – 208.

Glenn J., Straight R. (1978). Mojave rattlesnake *Crotalus scutulatus scutulatus* venom: variation in toxicity with geographical origin. *Toxicon*, 16: 81 – 84.

Gutiérrez J., Chaves F., Bolaños R. (1980) Estudio comparativo de veneno de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*, *Revista de Biología Tropical*, 28: 341 – 351.

Gutiérrez J., Chaves F., Gené J., Lomonte B., Camacho Z., Schosinsky K. (1989). Myonecrosis induced in mice by basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (Jumping viper) from Costa Rica. *Toxicon*, 27: 735 – 645.

Gutiérrez, J., Lomonte B. (1989). Local tissue damage induced by *Bothrops snake* venoms. A Review. *Memorias Instituto Butantan*, 51: 211 – 223.

Gutiérrez J., Avila C., Camacho Z., Lomonte B. (1990). Ontogenetic changes in the venom of the snake *Lachesis muta stenophrys* (bushmaster) from Costa Rica. *Toxicon*, 28: 419 – 426.

Gutiérrez J., Rucavado A. (2000). Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 82, Société française de biochimie et biologie moléculaire. Éditions scientifiques et médicales, 841 – 850.

Gutiérrez J., Williams D., Wen H., Warrell D. (2010). Snake envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon*, 56: 1223 – 1235.

Gutiérrez J. (2011). Envenenamientos por mordedura de serpiente en América Latina y el Caribe: Una visión integradora de carácter regional. *Revisión. Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 1: 1 – 16.

Harrison R., Hargreaves A., Wagstaff S., Faragher B., Laloo D.G. (2009). Snake Envenoming: A Disease of Poverty. *Neglected Tropical Diseases*, 3: 1 – 6.

Hickman C., Roberts L., Larson A. (2001). *Integrated Principles of Zoology*. Mc Graw Hill.

Iwanaga S., Suzuki T., Yuan C. (1979). *Handbook of Experimental Pharmacology*. Continuation of *Handbuch der experimentellen Pharmakologie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Vol. 52.

Jiménez J., (1964). Intraspecific variations in composition of venom of the jumping viper, *Bothrops nummifera*. *Toxicon*, 2: 187 – 195.

Jin Y., Hui W., Zhang Y. (2007). Molecular cloning of serine proteases from elapid snake venoms. *Toxicon*, 49: 1200 – 1207.

Kasturiratne A., Wickremasinghe A., Silva N., Gunawardena N., Pathmeswaran A., Premaratna R., Savioli L., Laloo D., Silva H. (2008). The global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *Journal. pmed*, 5: 1591 – 1604.

Kini R, Evans H. (1992). Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from

snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. *Toxicon*, 30: 265 – 293.

Kochva, E. (1987). The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. *Toxicon*, 25: 65 – 106.

Lomonte B., Gené J., Gutiérrez J., Cerdas L., (1983). Estudio comparativo de los venenos de serpiente cascabel (*Crotalus durissus durissus*) de ejemplares adultos y recién nacidos. *Toxicon*, 21: 379 – 384.

López J., Valle M., Ricart C., Chávez C., Flores E., Muniz E., Buhnheim P., Morhy L. (2002). Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonia rain forest. *Toxicon* 40: 997 – 1006.

López A., Aceves D., Jiménez R. (2006). *Atropoides nummifer* (Ruppell, 1845) (Serpentes: Viperidae), nuevo registro para la ofidiofauna de Querétaro, México. *Acta Zoológica Mexicana*, 22: 133 – 134.

López M. (2010). Serpientes y arácnidos venenosos. Editorial Trillas.

Luna R., Suárez A. (2008). Reptiles venenosos de Chiapas. Reconocimiento, primeros auxilios y tratamiento médico en caso de mordedura. Fondo Mixto de fomento a la investigación científica y tecnológica CONACYT-Gobierno del Estado de Chiapas.

Luna M. (2014). Mordedura por serpientes. Panorama epidemiológico de la Zona Córdoba, Veracruz 1995-2005. Instituto Mexicano de Seguro Social, Regional Veracruz Sur, Memorias del Simposio Nacional de Animales Venenosos, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

Mackessy S. (1988). Venom ontogeny in the Pacific Rattlesnake *Crotalus viridis helleri* and *C. v. oreganus*. *American Society of Ichthyologists and Herpetologists*, 1: 92 – 101.

Mackessy S., Williams K., Ashton K. (2003). Ontogenetic variation in venom composition and diet of *Crotalus oreganus concolor*: a case of venom paedomorphosis? *American Society of Ichthyologists and Herpetologists*, 4: 769 – 782.

Mackessy S. P. (2010). Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles. CRC Press.

- Mattison C. (1996). Rattler. A natural History of Rattlesnakes. BLANDFORD.
- Madrigal M., Sanz L., Flores M., Sasa M., Núñez V., Alape A. y Calvete J. (2012). Snake venomomics across genus *Lachesis*. Ontogenetic changes in the venom composition of *Lachesis stenophrys* and comparative proteomics of the venoms of adult *Lachesis melanocephala* and *Lachesis acrochorda*. *Journal of proteomics*, 77: 280 – 297.
- Markland F. (1998). Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*, 36: 1749, 1800.
- Markland F., Swenson S. (2013). Snake venom metalloproteinases. *Toxicon* 62: 3-18.
- Matsui T., Fujimura Y., Titani K. (2000). Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477:146 – 156.
- Miller L., Gutzke W. (1999). The role of the vomeronasal organ of crotalines (Reptilia: Serpentes: Viperidae) in predator detection. *The Association for the study of Animal*, 58: 53 – 57.
- Miller S., Harley J. (2001). Zoology book The animal Kingdom. The Mcgraw Hill
- Minton S., Weinstein S. (1986). Geographic and ontogenic variation in venom of the Western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). *Toxicon*, 24: 71 – 80.
- Mondadori A. (1990). Guía de Anfibios y Reptiles. Segunda edición. Ediciones Grijalbo, S.A.
- Monje S. (2007). Determinación de la dosis letal media (DL₅₀) de cinco especies del género *Micrurus* en estado de cautiverio en Nilo-Cundinamarca (Colombia). Tesis licenciatura. Universidad de la Amazonia, Facultad de Ciencias Básicas.
- Neri E. (2010). Reconocimiento inminuquímico de venenos de vipéridos norteamericanos por Antivipmyn y CroFab. Tesis licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Neri E. (2013). Variación intraespecífica en el veneno de *Crotalus Simus* de México. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

- O'Malley B. (2007). Anatomía y fisiología clínica de animales exóticos. SERVET.
- O'Shea M. (2007). Boas and Pythons of the World. Editorial London: New Holland.
- Pérez G., López M., Smith H. (2007). Serpientes de la región de los Tuxtlas, Veracruz, México. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pérez M., Rojo C., Vicente M., Encinas M. (2008). Estudio del veneno de serpientes: tipos y tratamientos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*.
- Rahman R., Faiz M., Selim S., Rahman B., Basher A., Jones A., Este C., Hossain M., Islam Z., Ahmed H., Milton A. (2010). Annual incidence of snake bite in rural Bangladesh. *Neglected Tropical Diseases*, 4: 1 – 6.
- Ramírez A., Mendoza F., Hernández X. y Tovar H. (2004). Ficha técnica de *Atropoides nummifer*. En: Arizmendi, M.C. (compilador). Estatus y conservación de algunos anfibios y reptiles de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO), Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W043. México, D.F.
- Ramos O., Selistre H. (2006). Snake venom metalloproteases structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 142: 328 – 246.
- Reid H., Theakston R. (1978). Changes in coagulation effects by venoms of *Crotalus atrox* as snake age. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 27: 1053 – 1057.
- Rojas E., Saravia P., Angulo Y., Arce V., Lomonte B. Chávez J., Velásquez R., Thelestam M., Gutiérrez J. (2001). Venom of the crotaline snake *Atropoides nummifer* (jumping viper) from Guatemala and Honduras: comparative toxicological characterization, isolation of a myotoxic phospholipase A₂ homologue and neutralization by two antivenoms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 129: 151 – 162.
- Román L. (2015). Caracterización bioquímica e inmunoquímica de venenos de serpientes del género *Agkistrodon*. Tesis licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Ciencias Biológicas.

Roodt A. F. (2002). Estudio inmunobiológico del veneno de serpientes de importancia sanitaria de la Argentina. Tesis doctorado. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Rucavado A. (2006). Componentes del veneno de *Bothrops asper* que afectan la hemostasis y su papel en el desarrollo del síndrome hemorrágico. Tesis doctorado en Ciencias. Universidad de Costa Rica.

Russell F., Walter F., Bey T., Fernández M. (1997). Snakes and snakebite in Central America. *Toxicon*, 35: 1469 – 1522.

Saldarriaga M., Otero F., Núñez V., Toro M., Díaz A., Gutiérrez J. (2003). Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon*, 42: 405 – 411.

Sanders K., Lee M., Mupuni, Bertozzi T., Rasmussen A. (2012). Multilocus phylogeny and recent rapid radiation of the viviparous sea snakes (*Elapidae: Hydrophiinae*). Journal homepage. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1 – 17.

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

Smith E., Ferrari J. (2008). A new species of jumping pitviper of the genus *Atropoides* (Serpentes: Viperidae: *Crotalinae*) from the Sierra de Botaderos and the Sierra La Muralla, Honduras. *Zootaxa*, 1948: 57 – 68.

Thorpe R., Wüster W., Malhotra A. (1997). Venomous snakes; ecology, evolution and snakebite. OXFORD.

Uetz P., Goll, Hošek J. (2015). The TIGR Reptile Database. Available at: <http://www.reptile-database.org> Accessed August 13, 2015.

Uscanga A. (2014). Caracterización de los venenos de las serpientes de *Bothrops asper* y *Crotalus basiliscus* de diferentes edades, como una estrategia para mejorar la producción del suero antiviperino polivalente producido en Birmex. Avances preliminares presentados en el Simposio Nacional de Animales Venenosos, Facultad de Ciencias en la Universidad Nacional Autónoma de México.

Vitt, L. y Caldwell J. (2009). Herpetology, an introductory biology of amphibians and reptiles. Third edition, *ELSERVIER*.

Werley E., Dixon J., Levoy R. (2000). Texas snakes. Identification, distribution and natural history. *University of Texas Press*.

WHO (2010). Guidelines for the production control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. WHO Press, World Health Organization.
www.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms

Wray K., Margres M., Seavy M., Rokyta D. (2015). Early significant ontogenetic changes in snake venoms. *Toxicon*, 96: 74 – 81.

Yañez C. (2014). Análisis temporal y geográfico del envenenamiento por mordedura de serpiente en Veracruz, México (2013 - 2012). *Gaceta Médica de México, Salud Colectiva*, 150: 60 – 64.

Zavala J., Díaz J., Sánchez J., Ruiz D., Castillo L. (2002). Serpientes y reptiles de importancia médica en México. *Revista de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México*. Vol. 45, No. 5, pp. 213 – 219.

Zelanis A., Regina S., Domingues M., (2008). Ontogenetic changes in the venom of *Bothrops insularis* (Serpentes; Viperidae) and its biological implication. *South American Journal of Herpetology*, 3: 43 – 50.

Zelanis A., Andrade D., Rocha M., Furtado M., Serrano S., Junqueira L., Lee P. (2012). *Neglected Tropical Diseases*, 6: 1554 – 1554.

Zelanis A., Huesgen P., Oliveira A., Tashima A., Serrano S., Overall C. (2015). Snake venom serine proteinases specificity mapping by proteomic identification of cleavage sites. *Journal of Proteomics*, 113: 260 – 267.

Zúñiga I., Lozano J. (2013). Aspectos clínicos y epidemiológicos de la mordedura de serpientes en México. *Evidencia Médica e Investigación en Salud*, 6: 125 – 136.

10. ANEXOS

Absorbancia 280 nm

Material

- Blanco (NaCl 150 mM)
- Espectrofotómetro
- Celda de cuarzo (Beckman) de 1 cm de longitud.

Procedimiento

Pesar de 3 a 4 mg de veneno y diluir en 1 mL de NaCl 150 mM, se realizan diluciones de la alícuota. Después de medir la absorbancia del blanco en la cual se diluyó la muestra (NaCl 150 mM), se mide la absorbancia de las diluciones de la alícuota del veneno. Multiplicar la absorbancia obtenida en el espectrofotómetro por el factor de dilución.

Ácido Bicinconínico (BCA)

Materiales

- Kit comercial Pierce TM BCA Protein Assay Kit
- Solución A: Carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinconínico y tartrato de sodio en 0.01 M de hidróxido de sodio.
- Reactivo B: Sulfato cúprico 4%
- Albumina sérica bovina (BSA): solución stock a 2 mg/mL en 0.9 % NaCl y 0.05 % de azida de sodio
- Lector de ELISA con filtro de 570 nm
- Microplaca para ELISA de 96 pozos marca Falcon
- Muestras estándares: 1) 320 µg/mL, 2) 160 µg/mL, 3) 80 µg/mL, 4) 40 µg/mL, y 5) 20 µg/mL.
- Incubadora

Procedimiento

- a) Preparación de los estándares.

En 5 tubos eppendorf de 2 mL etiquetar con las siguientes concentraciones los tubos: 1) 320 µg/mL, 2) 160 µg/mL, 3) 80 µg/mL, 4) 40 µg/mL y 5) 20 µg/mL. Colocar 1 mL de PBS 1 X pH 7.2 del tubo 2 al tubo 5. A partir de una solución stock de BSA con una concentración de 2 mg/mL, en el tubo 1 colocar 320 µl del stock de BSA y 1680 µl de PBS 1 X. Realizar diluciones seriadas 1:2 del tubo 1 al tubo 5, transfiriendo 1 mL a cada tubo, mezclando perfectamente.

- b) Preparación de la solución problema

Elegir la dilución indicada en cada muestra a partir de las concentraciones obtenidas en A_{280} nm, procurando que la concentración se encuentren dentro del rango de la curva estándar de 20 a 320 µg/mL, considerar muestras por duplicado con 25 µl por pozo.

c) Preparación de la muestra problema

Determinar el volumen total a preparar de la solución estándar, tomando en cuenta el número total de muestras (Número de muestras problema por duplicado + 5 estándares + 2 blancos), y multiplicar por 200 µl que corresponde a la cantidad de BCA necesaria por muestra. La solución BCA se prepara en proporción [1:50], requiere mezclar 50 partes de la solución A por 1 parte de la solución B. Mezclar hasta homogenizar la solución.

Marcar la tapa de la microplaca con la muestra que se va a incubar en cada pozo. Colocar 200 µl de la solución de BCA en cada pozo y añadir 25 µl de muestra. Incubar a 37 °C por 1 hora y media. Leer la absorbancia en el lector de ELISA con un filtro de 570 nm utilizando el método de BCA que se encuentra en el programa Magellan.

Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico (SDS-PAGE)

Materiales

- Cámara de electroforesis de la marca Bio-Rad Mini-PROTEAN
- Solución de acrilamida: disolver 49.5 g de acrilamida y 1.32 g de bis-acrilamida en un volumen final de 165 mL de agua desionizada (30% acrilamida + 0.8% bis-acrilamida).
- Amortiguador inferior: disolver 18.7 g de tris en 50 mL de agua desionizada y adicionar 2 mL de SDS 20 %. Ajustar el pH a 8.8 con HCl concentrado. Aforar a 100 mL (1.5 M tris + 0.4% SDS).
- Amortiguador superior: disolver 6.06 g de tris en 50 mL de agua desionizada y adicionar 2 ml de SDS 20%. Ajustar el pH a 6.8 con HCl concentrado y aforar a 100 mL.
- Amortiguador de corrida desnaturante al 5 X: En un tubo de 15 mL, mezclar las siguientes soluciones; 2.5 mL de glicerol, 3.125 mL de SDS al 20 %, 1.25 mL de 1 M Tris-HCl pH 6.8, 1.25 mL de 2-mercaptoetanol, 0.5 mL de 1 % azul de bromofenol. Aforar a 10 mL con H₂O desionizada. (10% glicerol + 2.5% SDS + 50 mM de Tris-HCl pH 6.8 + 5% 2-mercaptoetanol + 0.002 % azul de bromofenol).
- Persulfato de amonio al 10%: disolver 0.1 g de persulfato de amonio en 1 mL de agua desionizada.
- Buffer de corrida: agregar 10 mL de Tank buffer (Tris base 0.25 M + glicina 0.19 M + SDS 0.1%), y aforar a 1000 mL.
- Solución de tinción: disolver 1 g de azul de Coomassie R-250 en 125 mL de isopropanol, 50 ml de ácido acético y aforar a 500 mL con H₂O desionizada (25% isopropanol + 10% ácido acético + 0.2% de azul de Coomassie R-250).
- Solución para desteñir: mezclar 400 mL de H₂O desionizada, 50 mL de metanol y 50 mL de ácido acético (10% metanol + 10% ácido acético).

Procedimiento

a) Preparación del gel de bisacrilamida

	Gel separador		Gel concentrador 4 %	
	15 %	12.5 %		4 %
Buffer inferior	1500 µl	1200 µl	Buffer superior	630 µl
Acrilamida	3000 µl	2500 µl	Acrilamida	330 µl
H ₂ O desionizada	1500 µl	2000 µl	H ₂ O desionizada	1540 µl
TEMED	10 µl	10 µl	TEMED	10 µl
Persulfato de amonio al 10 %	20 µl	20 µl	Persulfato de amonio al 10 %	40 µl

b) Preparación de las muestras

Cada muestra de veneno se preparo utilizando la concentración obtenida de BCA, y para este ensayo se utilizo una concentración por muestra de 25 µg de veneno + 4 µl de amortiguador de corrida desnaturalizante al 5 % + H₂O desionizada, para obtener un volumen final de 20 µl. Cada muestra de veneno se calienta en baño maría durante 5 min. Posteriormente las muestras son centrifugadas durante 30 segundos a 13,000 rpm.

a) Preparación de la cámara de electroforesis

Colocar en la cámara de electroforesis el gel de bisacrilamida, vaciar los 1000 mL de buffer de corrida en la cámara y retirar el peine. Cargar las muestras por carril iniciando por el marcador de peso molecular, y en los siguientes carriles las muestras de veneno previamente preparadas. Correr las muestras durante 15 minutos a 70 Volts hasta que pasen el gel concentrador y subir a 130 V durante 1:30 hr.

b) Tinción y almacenamiento del gel de bisacrilamida

Retirar el gel de la cámara de electroforesis y colocar en un recipiente con solución de tinción suficiente para cubrir completamente el gel. Dejar teñir durante 15 min y retirar la solución de tinción. Posteriormente se vacía la solución de distinción sobre el gel y se cambia constantemente cada 15 minutos hasta que el gel tenga una tonalidad que permita observar claramente las bandas de proteínas de cada muestra de veneno. El gel se escanea y almacena en papel celofán poroso.

Cromatografía Líquida de Alta Eficacia en Fase Reversa (RP-HPLC)

Material

- Solución A: H₂O + 0.1% TFA (ácido trifluoroacético)
- Solución B: CH₃CN (acetonitrilo)+ 1 % TFA (ácido trifluoroacético)
- Columna analítica semipreparativa C18 marca Grace Vydac 250 X 10 mm, con tamaño de partícula 5 µm

Procedimiento

Limpiar la columna con diferentes gradientes de la solución B y posteriormente la solución A. Cargar de 400 a 300 µg de veneno resuspendido en 1 mL del NaCl 150 mM previamente centrifugado a 14,000 rpm durante 5 minutos. La gradiente de solución B

utilizada fue de los primeros 15 minutos del 15 %, del minuto 15 al 70 una gradiente ascendente hasta 45 % de solución B, y del minuto 70 al 80 con una gradiente ascendente hasta el 70 % de solución B que se mantiene hasta el minuto 90 que termina la corrida. Las fracciones obtenidas fueron monitoreadas a 280 nm y colectadas manualmente.

Actividad proteolítica sobre azocaseína

Materiales

- Azocaseína marca SIGMA A2765
- Sustrato: disolver 10 mg/mL de azocaseína en Tris- HCl 50 mM, NaCl 150 mM y CaCl₂ 5 mM, pH 8.0
- Ácido tricloroacético al 5%
- NaOH 0.5 M
- Microplaca para ELISA de 96 pozos marca Falcon
- Lector de ELISA con filtro de 570 nm

Procedimiento

Se preparo una solución de azocaseína de 10 mg/mL en buffer Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.15 M y CaCl₂ 5 mM a pH 8.0. En un tubo eppendorf mezclar 100 µl de azocaseína con 20 µl de veneno con una concentración 1 mg/mL, realizar triplicados de cada muestra y utilizar el buffer de la dilución de la muestra como control negativo. Incubar por 30 min. a 37 °C. Agregar a cada tubo eppendorf 200 µl de ácido tricloroacético al 5% mezclar y centrifugar por 5 minutos a 13, 000 rpm. Tomar 150 µl del sobrenadante de cada muestra y colocarlo en una placa Falcón, junto con 150 µl de NaOH 0.5 M por pozo. Leer la absorbancia en el lector de ELISA a 450 nm. La unidad de actividad proteolítica por miligramo de veneno (U/mgV) se define como el cambio de 0.2 de Abs en un minuto.

Actividad fosfolipasa A₂

Material

- Solución estándar: Preparar una solución de NaCl 5 M y una solución de CaCl₂ 0.1 M (3 mL de NaCl + 15 mL de CaCl₂ + 0.75 mL Tritón X100).
- Yema de huevo
- Potenciómetro
- Tanque de nitrógeno (N₂)
- Agitador magnético

Procedimiento

- a) Solución con yema de huevo

Para preparar la solución de yema de huevo se debe pesar yema de huevo y aforar con la solución estándar hasta 10% (14 g – 140 mL). Agitar durante 10 minutos, centrifugar a 1,500 rpm durante 5 minutos y recuperar el sobrenadante.

b) Montaje del equipo y veneno

Prepara las muestras de veneno a una concentración de 1 µg/µl. En un tubo de 1 mL colocar el potenciómetro dentro y agregar 500 µl de la solución con yema de huevo previamente preparada, mantener en agitación constante y con un burbujeo superficial de N₂. Estabilizar el pH de la solución anterior a 8.04 (rango aceptado de pH 8.0 a 8.5), utilizando NaOH 50 mM. Después se agrega 1 µg de veneno y se empieza a medir el tiempo, la adición del veneno provocara la disminución del pH a 7.9, cuando se llegue a este pH se adiciona 1 µl de NaOH 50 mM lo cual producirá que el pH se eleve nuevamente (pH ≥ 8). Al retomar el pH de 8.0 se registra el tiempo transcurrido desde la administración del veneno, después el pH volverá a disminuir hasta pH 7.9 y nuevamente se agrega 1 µl de NaOH 50 mM, al subir el pH hasta 8.0 se registra el tiempo. Este procedimiento se realiza hasta que se obtengan 5 mediciones y repetir todo el procedimiento 3 veces.

La actividad enzimática se define como µmolas de NaOH consumidas por minuto y se reporta como unidades de actividad enzimática por miligramo de veneno (U/mgV). Las µmolas de NaOH añadidas son proporcionales a la cantidad de ácidos grasos liberados, los cuales ocasionan la acidificación de la solución.

Actividad procoagulante sobre plasma humano (DCM-PH)

Material

- Plasma humano
- Citrato de sodio (Na₃C₆H₅O₇)
- Incubadora

Procedimiento

a) Preparación del plasma humano

Extraer sangre de un donante sano y recuperarlo en citrato de sodio en proporción [1:1], y homogenizar. Retirar el sobrenadante y eliminar el paquete celular precipitado.

b) Preparación del ensayo

Preparar muestras de veneno con diferentes concentraciones. Colocar 200 µl de plasma humano en tubos de vidrio de 10 mL y colocarlos en baño maría a 37 oC de 3 a 5 minutos. En cada tubo se colocan distintas concentraciones de veneno (por triplicado) y medir el tiempo desde que se le adiciona el veneno hasta que formar un coagulo evidente.

Dosis Mínima Edematizante (DME)

Material

- Cepa ratones CD-1 *Mus musculus* de sexo indistinto de 20 a 25 g
- Caja para ratones, con tapa de reja
- Bebederos

- Comida para ratones
- Jeringas de 3 mL
- NaCl 150 mM

Procedimiento

Prepara muestras de veneno con diferentes concentraciones con un volumen total de 50 μ l por ensayo. Inoculan 50 μ l de veneno vía subcutánea en la almohadilla plantar inferior derecha (pata con veneno), mientras que en la pata inferior izquierda (pata control) se inoculan 50 μ l de NaCl 150 mM a grupos de 3 ratones. Medir la inflamación de ambas patas a los 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 y 120 minutos.

Para obtener el porcentaje de edema se utiliza la siguiente formula:

$$\% \text{ Edema} = \frac{D (\text{pata con veneno}) - 100}{D (\text{pata control})} \times 100$$

Los resultados fueron expresados en Dosis Mínima Edematizante, que se define como la cantidad de veneno que causa el 30 % del edema a los 30 minutos.

Dosis Mínima Hemorrágica (DMH)

Material

- Cepa ratones CD-1 *Mus musculus* de sexo indistinto de 20 a 25 g
- Caja para ratones, con tapa de reja
- Bebederos
- Comida para ratones
- Jeringas de 3 mL
- NaCl 150 mM
- Cámara de CO₂
- Equipo de disección
- Hojas milimétricas
- Cristal de vidrio 15 x 15 cm

Procedimiento

Preparar muestras de veneno con diferentes concentraciones a un volumen final de 100 μ l utilizando NaCl 150 mM. Inyectar por vía intradérmica 100 μ l de las muestras en la región dorsal previamente rasurada de grupos de 3 ratones por dosis. Dejar incubar in vivo durante 3 horas, posteriormente sacrificar los ratones por sobredosis de CO₂. Retirar la piel y colocar sobre el halo hemorrágico formado un cristal de vidrio. Marcar el perímetro del halo hemorrágico sobre el cristal de vidrio, y realizar conteo con el uso de la hoja milimétrica.

Para obtener el halo hemorrágico se utiliza la siguiente formula:

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

Dosis Letal Media (DL₅₀)

Material

- Cepa ratones CD-1 *Mus musculus* de sexo indistinto de 18 a 20 g
- Caja para ratones, con tapa de reja
- Bebederos
- Comida para ratones
- Jeringas de 3 mL
- NaCl 150 Mm

Procedimiento

Preparar distintas dosis de veneno a un volumen final de 500 µl utilizando NaCl 150 mM. Inyectar por vía intravenosa a grupos de 5 ratones por dosis de veneno. Después de 24 horas registrar el porcentaje de mortalidad por dosis.

Dosis Efectiva Media (DE₅₀)

Material

Cepa ratones CD-1 *Mus musculus* de sexo indistinto de 18 a 20 g

- Caja para ratones, con tapa de reja
- Bebederos
- Comida para ratones
- Jeringas de 3 mL
- NaCl 150 mM
- Antiveneno Viper Stat lote 4VT06002

Procedimiento

Resuspender el antiveneno en 5 mL de NaCl 150 mM. Preparar 2 DL₅₀, y mezclar con diferentes volúmenes de antiveneno en un volumen final de 500 µl por ratón, incubar durante 30 minutos a 37°C. Inyectar en grupos de 5 ratones y registrar el porcentaje de sobrevivencia a las 24 horas.