



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
BÁSICAS Y APLICADOS**

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

Caracterización bioquímica y biológica del veneno de la serpiente de coral *Micrurus distans*

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN CIENCIAS CON ÁREA TERMINAL EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

P R E S E N T A:

JIMENA CRIS CAMPOS ARCE

DIRECTORA DE TESIS
Dra. MELISA BENARD VALLE

Morelos, Agosto de 2022

ÍNDICE

I.	RESUMEN	
II.	INTRODUCCIÓN	
	II.1 Serpientes de coral.....	5
	II.2 <i>Micrurus distans</i>	7
	II.3 Epidemiología.....	9
	II.4 Cuadro clínico y tratamiento.....	10
	II.5 Los venenos de las serpientes.....	12
	II.6 Antecedentes.....	16
	II.7 Justificación.....	18
III.	OBJETIVOS	
	III.1 Objetivo general.....	18
	III.2 Objetivos particulares.....	18
IV.	HIPÓTESIS	
V.	METODOLOGÍA	
	V.1 Venenos.....	19
	V.2 Absorbancia a 280nm y BCA.....	20
	V.3 Electroforesis desnaturante (SDS).....	21
	V.4 Actividad fosfolipasa.....	21
	V.5 Variación individual en HPLC.....	22
	V.6 Actividad anticoagulante.....	23
	V.7 Actividad proteasa.....	23
	V.8 Dosis letal media.....	23
	V.9 Letalidad de fracciones.....	24
VI.	RESULTADOS	
	VI.1 Absorbancia a 280nm y BCA.....	24
	VI.2 Electroforesis en gel de acrilamida de venenos completos (SDS).....	25
	VI.3 Actividad fosfolipasa de venenos completos.....	25
	VI.4 Variación individual en HPLC de venenos completos y de la “Mezcla de venenos”.....	26
	VI.5 Generación de la “mezcla de venenos”.....	28
	VI.6 Actividad fosfolipasa de fracciones en placas de agarosa - yema de huevo al 10%.....	32
	VI.7 Actividad anticoagulante.....	32
	VI.8 Actividad proteasa.....	34
	VI.9 Letalidad de fracciones y DL ₅₀	34
	VI.10 Resumen de resultados.....	35
VII.	DISCUSIÓN	
	VII.1 Venenos completos y variación individual.....	38
	VII. 2 Letalidad de fracciones, proporción y masas.....	42
VIII.	CONCLUSIONES	
IX.	PERSPECTIVAS	
X.	ANEXO DE FIGURAS	
XI.	BIBLIOGRAFÍA	
XII.	ANEXOS	

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Melisa Benard Valle, con todo mi cariño y admiración. Gracias por todas las enseñanzas, el apoyo incondicional y la paciencia.

Al Dr. Alejandro Alagón, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo y mostrarme este apasionante campo de investigación.

A los integrantes de mi comité sinodal: Dra. Angélica Santana, Dr. Rodrigo Said Razo, Dra. Melisa Benard, Dr. Raúl Arredondo y Dr. Edgar E. Neri. Gracias por sus invaluable comentarios, sugerencias y aportes que hicieron posible éste trabajo.

A Alejandro Olvera y Felipe Olvera por su apoyo técnico y asesorías. A todos los integrantes del laboratorio del Dr. Alagón y del Dr. Corzo en el IBt, en particular a Edgar Neri por todas las asesorías y a Manuel Yáñez y Gibrán Barrera por el apoyo académico y la paciencia. A todos y cada uno de ellos por su maravillosa amistad.

A Ricardo Mondragón Cortés por el apoyo técnico en el laboratorio a lo largo de la realización del trabajo.

A todos mis compañeros de la Facultad de Ciencias, específicamente del Centro de Investigación en Dinámica Celular de la UAEM por todos los buenos recuerdos. En especial a Sara Lucía Anaya y Erick Vázquez por su amistad incondicional y maravillosa compañía.

Personalmente, a mi madre Vianey, por todos estos años de educación, inspiración y cariño. A mi hermana Jade por toda la amistad y apoyo emocional, y a mi hermano Lucio, por todo su amor y motivación. A todos ellos por acompañarme, alentarme y apoyarme en todas las cosas que hago. A mi abuela Lidia, por la enorme huella que dejó en mi corazón y que me motivó a salir adelante.

Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México, por la beca de docencia.

Por el apoyo económico, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Proyecto FORDECyT 303045, "Venenos y antivenenos".

I. RESUMEN

El objetivo principal de este estudio fue caracterizar el veneno de la serpiente de coral *Micrurus distans* de forma bioquímica y biológica enfocándonos en la identificación de componentes tóxicos para mamíferos. Con este propósito, se evaluó la presencia de variación entre los venenos de individuos de la misma especie, se caracterizó la actividad enzimática y biológica del veneno completo y sus fracciones y se identificaron y caracterizaron los componentes con toxicidad para ratones.

Debido a la escasa información con la que se cuenta sobre las serpientes de coral mexicanas y sus venenos, uno de los propósitos principales de este estudio fue aportar información sobre el veneno de la serpiente de coral del occidente mexicano *Micrurus distans*. Esta especie, debido a reportes de mordeduras, un reporte de mortalidad y dada su amplia distribución geográfica en la república, puede considerarse como especie de importancia médica en México.

Para realizar el estudio nosotros hicimos la caracterización de los venenos completos de los diferentes individuos de la misma especie a través de técnicas de cuantificación a 280 nm, BCA, RT-HPLC y SDS-PAGE. Posteriormente realizamos una “mezcla de venenos” con los venenos de los individuos en proporciones iguales y realizamos un fraccionamiento por RT-HPLC para identificar las fracciones de interés, a las cuales realizamos técnicas de SDS-PAGE, Actividad fosfolipasa en yema de huevo al 10%, Actividad anticoagulante y Dosis letal media.

En los resultados obtenidos pudimos observar que el veneno de la serpiente de coral *M. distans* está compuesto mayormente por fosfolipasas (52.84%), fosfolipasas con posible actividad neurotóxica (19.27%), moléculas pertenecientes a la familia de tres dedos (14.62%), una de ellas identificada como 3FTx (1.68%) y otras con posible actividad letal (1.23%), así como algunas moléculas pertenecientes a CTLs (1.87%) y otros componente de mayor peso molecular no identificados (30.68%). Se identificaron 4 fracciones letales que representan el 23.6% del veneno total. También pudimos determinar que la dosis letal media para ratones C18 (18-21 g) es de entre 40-60 µg/ratón, siendo esta poco potente en comparación con otras serpientes de coral mexicanas.

II. INTRODUCCIÓN.

Las serpientes son un grupo de reptiles pertenecientes al orden Squamata y suborden Serpentes, que se caracterizan por tener un cuerpo alargado, flexible, cilíndrico y con ausencia de patas. Se encuentran cubiertas de escamas y al igual que el resto de los reptiles son exotermos, por lo que necesitan regular su temperatura corporal externamente.

Existen aproximadamente 3,879 especies de serpientes en el planeta (Uetz, 2021) distribuidas en todas las regiones, a excepción de algunas zonas tales como Antártida, Islandia, Irlanda, Groenlandia y Nueva Zelanda, entre otras.

De estas 3,879 especies aproximadas se sabe que aproximadamente el 15% de ellas corresponde a serpientes venenosas (Meyers & Tadi., 2021), entre ellas se encuentran especies cuyo veneno podría ser letal. Estas serpientes se encuentran clasificadas dentro de la superfamilia Caenophidia, en este grupo se encuentran las familias Viperidae, Colubridae, Atractaspidae y Elapidae (Keogh J. S., 1998).

Las serpientes venenosas, además de presentar las características antes mencionadas, cuentan con un par de dientes inoculadores de veneno, los cuales pueden variar, siendo puntiagudos, rectos o curvos, dependiendo de la especie; estos colmillos suelen ser huecos y sirven como inoculadores de veneno, el cual inyectan mediante su mordida.

En México se han registrado aproximadamente 439 especies de serpientes, entre ellas el 20% se considera de importancia médica (Uetz, 2021).

La familia Elapidae, que es la de mayor relevancia para este trabajo, suma aproximadamente 384 especies en aproximadamente 62 géneros (Zug, Vitt, & Caldwell, 2001). Todas las especies conocidas son venenosas y se caracterizan principalmente por la presencia de dos dientes inoculadores acanalados delanteros y perpetuamente erectos (dentición proteroglifa) (Keogh J. S., 1998) (Figura 1). También se encuentran cubiertas por escamas lisas y tienen el cuello poco diferenciado de la cabeza (Castro, et al., 2020).



Figura 1: Dentición proteroglifa. (Bauchot, Bon, & David, 2005).

Los elápidos se encuentran distribuidos, de acuerdo a algunos autores, en 2 subfamilias: Hydrophiinae y Elapinae (McDowell, 1987). La primera subfamilia, Hydrophiinae está compuesta mayormente por serpientes marinas, aunque también hay especies terrestres y se encuentran

localizadas en las costas y alrededores del océano Índico y Pacífico. La segunda subfamilia, Elapinae, que se encuentra distribuida geográficamente en zonas de climas cálidos y tropicales, está conformada por aproximadamente 384 especies, entre las cuales se encuentran especies de cobras (*Naja*, *Ophiophagus*) y mambas (*Dendroaspis*), así como especies de coralillos o serpientes de coral (*Leptomicrurus*, *Micruroides* y *Micrurus*).

En América, la subfamilia Elapinae está representada por las serpientes de coral o coralillos, un grupo de más de 120 especies y subespecies divididas en 3 géneros: *Micruroides*, con una especie; *Leptomicrurus*, con tres y *Micrurus* con más de 70 especies (Tanaka G. D., Furtado, Portaro, Sant'Anna, & Tambourgi, 2010). En México, se distribuyen dos géneros de coralillos: *Micruroides*, cada una con una sola especie, y *Micrurus* con 15 especies descritas (Uetz, 2021).

II.1 SERPIENTES DE CORAL.

Las serpientes de coral o coralillos se caracterizan por ser delgadas y de tamaño pequeño o mediano es decir, entre 60 y 80 cm, aunque se han registrado ejemplares que rebasan los 150 cm (Roze, 1996). Cuentan con un patrón de coloración generalmente anillado donde predominan los colores: amarillo, rojo y negro. A pesar de que una gran cantidad de especies presentan este patrón, existen también muchas excepciones.

Estas serpientes no suelen ocasionar accidentes en humanos, a menos que se encuentren ante una amenaza, pues son de temperamento tranquilo y pasan la mayor parte del tiempo bajo la hojarasca, escondiéndose o buscando lagartijas, anfibios o serpientes más pequeñas, las cuales conforman su dieta (Castro, et al., 2020).

Los coralillos causan aproximadamente el 4% de los accidentes ofídicos en América (Roodt, et al., 2005) mientras que en México se estima que este porcentaje es menor al 2%. Sin embargo, todos los casos de mordeduras a causa de este grupo pueden ser letales debido al riesgo de presentar parálisis respiratoria, por lo que deben considerarse como emergencias médicas (Castro, et al., 2020).

Cuentan con glándulas productoras de veneno ubicadas debajo del ojo (Figura 2). Estas glándulas están compuestas por 2 partes: la glándula principal, que es la productora de veneno y, la glándula accesoria cuya función aún no está totalmente clara. Las glándulas están unidas mediante un conducto que fluye desde la glándula accesoria a los colmillos, lo cual le permite morder e inyectar este veneno a sus presas (Kardong, 1982).

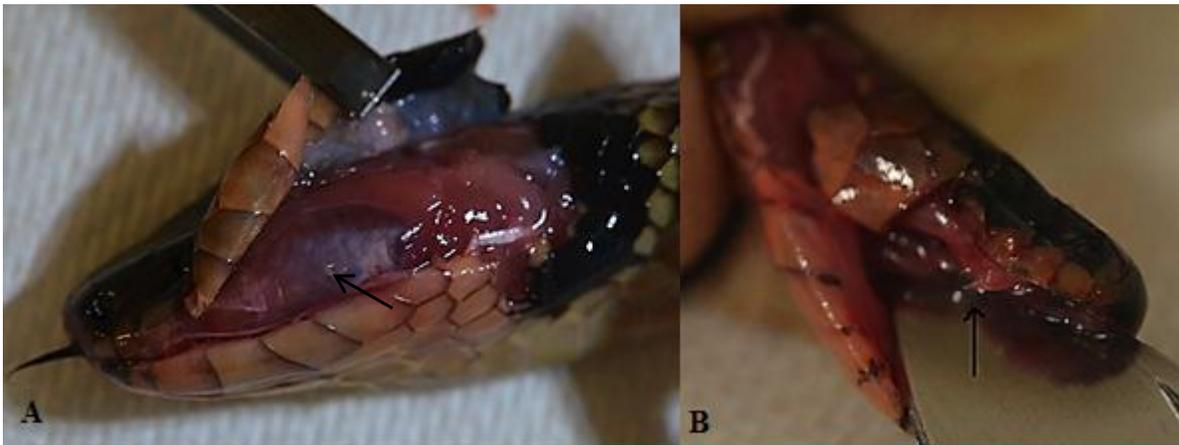


Figura 2: A: Glándula productora de veneno de una serpiente de coral (*M. laticollaris*). B: Diente inoculador de veneno de una serpiente de coral. Fotografía: Edgar Neri C.

Se encuentran distribuidas en las zonas de climas cálidos y tropicales, también en selva baja y mediana caducifolia, así como en matorrales espinosos, desde el nivel del mar hasta una altura de aproximadamente 1,300 m (Figura 3). En México se les puede encontrar en casi toda la República, a excepción de Guanajuato, Zacatecas, Coahuila, Durango, Chihuahua, Baja California Norte, Baja California Sur, Aguascalientes, Querétaro y San Luis Potosí (Ochoa & Villela, 2006), (Figura 4).



Figura 3: Regiones faunísticas y ecosistemas principales de México, (INEGI, 2016).

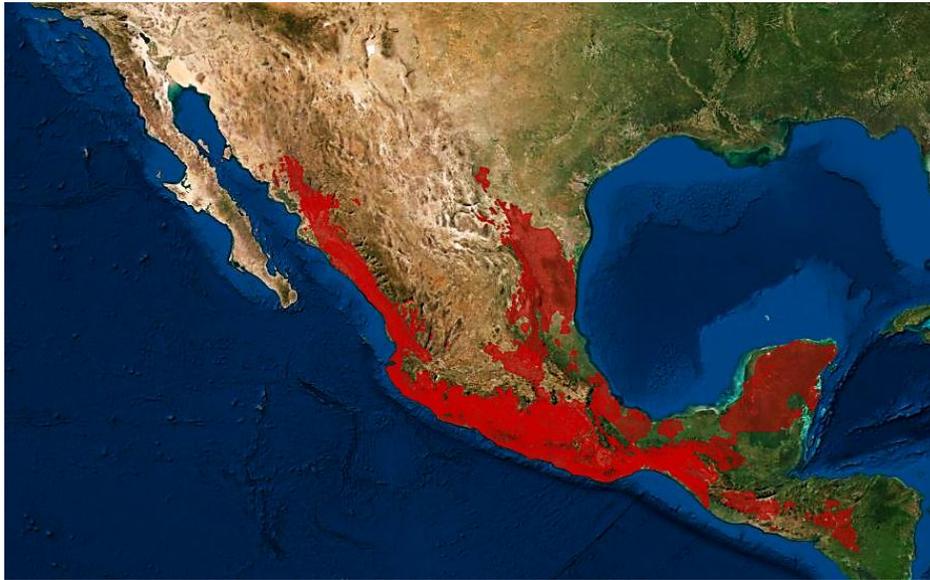


Figura 4: Distribución de serpientes del género *Micrurus* en la República mexicana. (CONABIO, 2006).

II.2 *Micrurus distans*.

La serpiente de coral del oeste Mexicano (*Micrurus distans*) es la especie en la cual se enfoca este estudio. Se encuentra distribuida en los estados de Sonora, Sinaloa, Jalisco, Nayarit, Colima, Michoacán, Guerrero y Oaxaca entre otras (Bautista, Elizalde, Salinas, Islas, & Wilson, 2019), (Figura 5), principalmente en ecosistemas compuestos por selva baja, selva mediana y alta, bosque templado y matorrales áridos y semiáridos (Figura 3).

Presenta 4 subespecies: *M. distans distans* (Kennicott, 1960) las cuales se pueden encontrar distribuidas en las zonas del sudoeste de Chihuahua, sur de Sonora y noroeste de Nayarit; *M. distans michoacanus* (Kennicott, 1960) en Michoacán y Guerrero; *M. distans oliveri* (Roze, 1967) en Colima y Jalisco, y *M. distans zweifeli* (Roze, 1967) en Nayarit, Jalisco y Aguascalientes (Rodríguez & Díaz, 1996).

Estas serpientes miden entre 50 y 70 cm de longitud total, cuentan con el patrón de coloración característico de entre 6 a 20 anillos rojos, negros y amarillos dispuestos de manera monadal (rojo-amarillo-negro-amarillo-rojo...) (Figura 6). Son serpientes de hábitos semifosoriales y crepusculares, son ovíparas, cuentan con una dentadura proteroglifa y se alimentan principalmente de lagartijas y serpientes de menor tamaño (Neri, Benard, & Alagón, 2014).

Se trata de una serpiente endémica de México (CONABIO, 2021) que debido a su amplia distribución en la República Mexicana, puede ser considerada como una especie de importancia médica (Bolaños, Cerdas, & Abalos, 1978).



Figura 5: Distribución potencial de Micrurus distans (serpiente coralillo del occidente mexicano), (Bautista, et al., 2019).



Figura 6: Micrurus distans. Fotografía: FONATUR, Sinaloa.

A pesar de la amplia distribución que existe de esta especie en nuestro país, la composición de su veneno nunca ha sido estudiada a detalle.

II.3 EPIDEMIOLOGÍA.

El accidente ofídico se define como una lesión cutánea causada por la mordedura de la serpiente, seguida de la inoculación de sustancias tóxicas, en este caso el veneno, que lesionan los tejidos, causando así cuadros fisiopatológicos de diferentes gravedades (CENETEC, 2020).

En el mundo se estima que por lo menos ocurren 421,000 envenenamientos por mordedura de serpiente al año, de los cuales 20,000 terminan en muerte. Estas cifras pueden incluso llegar hasta 1, 841,000 envenenamientos con 94,000 muertes anuales (Figura 7). Las zonas más afectadas por casos de envenenamiento corresponden a: India (81,000); Sri Lanka (33,000), Vietnam (30,000), Brasil (30,000) y Nepal (20,000) (Kasturiratne, et al., 2008), mientras que México cuenta con aproximadamente 4,000 casos por año (Chippaux, 2017).

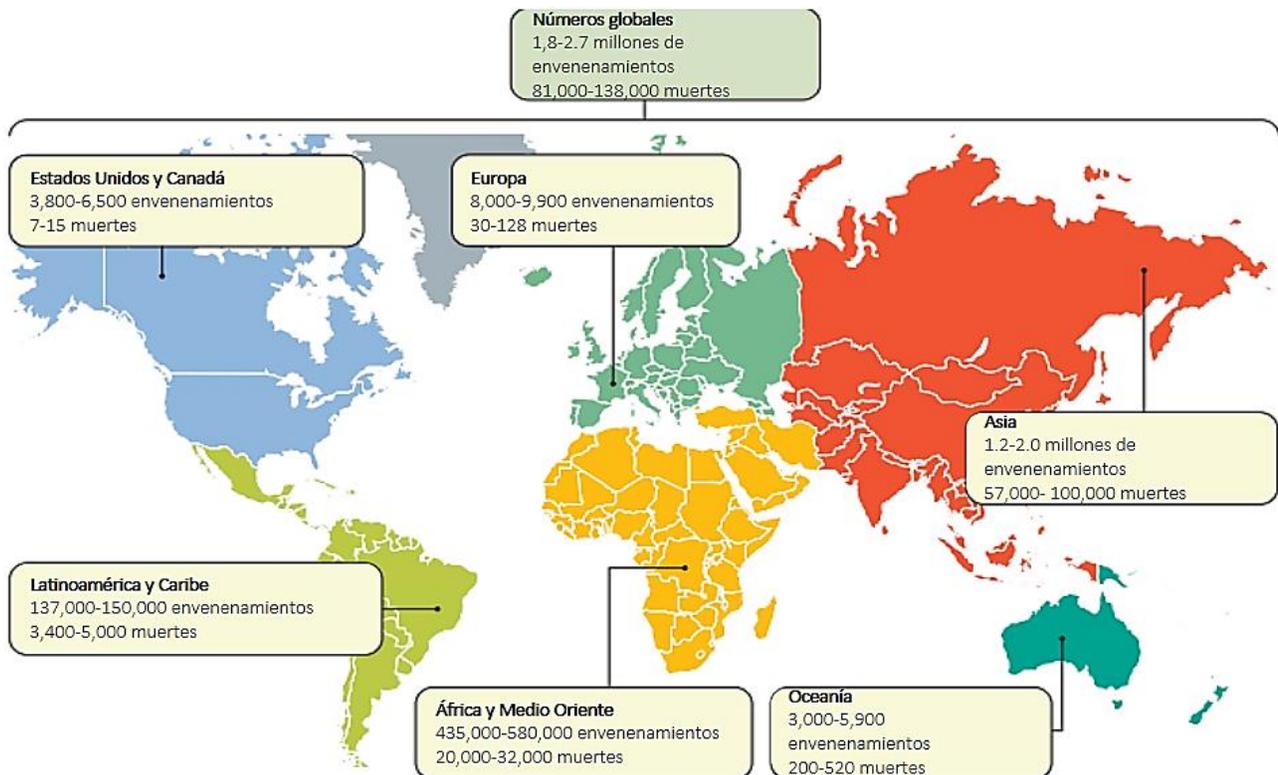


Figura 7: Distribución geográfica del número estimado de envenenamientos y muertes por mordedura de serpiente (Gutierrez, et al., 2017).

De acuerdo al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) el cual pertenece a la Secretaría de Salud, en el periodo de 2003 a 2019 se registraron un promedio de 3,893 casos de envenenamiento por serpiente, sin embargo estos datos son sólo un aproximado debido a que muchos de ellos suceden en zonas rurales y son atendidos mediante otras técnicas de medicina alternativa, como chamanes o curanderos, entre otros, por lo que no son registrados. También cabe mencionar que la SINAVE solo recaba información del 49.9%

de las unidades prestadoras de servicios médicos registrados en el Catálogo de Clave Única de Establecimientos de Salud (CLUES) que pertenece a la Secretaría de Salud, por lo que incluso los casos que se tienen registrados, representan solo una parte de los casos totales en la República Mexicana (Castro, et al., 2020).

Entre los datos recabados por la SINAVE se determinó que la incidencia de casos de mordedura de serpiente suceden mayormente en el género masculino con un 63.3%, mientras que el género femenino presenta 33.7%. Aunque no hay estudios que expliquen la diferencia en estos porcentajes, se puede suponer que está dado debido a que la mayoría de los casos por mordedura suceden en zonas rurales, donde las actividades de mayor riesgo, tales como agricultura y ganadería son desempeñadas en su mayoría por el género masculino. También se ha observado, a partir de datos del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), que la mayor parte de estos casos de envenenamiento son causados por ejemplares pertenecientes a la familia Viperidae (Castro, et al., 2020); (INEGI, 2016).

En México, hasta 1995 se reportaron 27,500 accidentes anuales con 136 defunciones. Mientras que en el periodo de 2003 a 2006 se registraron 14,858 casos y un promedio anual de 3,714.5 incidentes (Rivera, et al., 2009). Del total de casos por envenenamiento por serpientes, los relacionados con las serpientes de coral representan el 4% a nivel mundial y el 2% para México aunque esta cifra podría ser menor, no obstante, del total de casos por envenenamiento por coralillos, aproximadamente el 40% son letales sin antiveneno debido al efecto neurotóxico de su veneno (Zavala, et al., 2002).

II.4 CUADRO CLÍNICO Y TRATAMIENTO

Cuando un paciente se reporta con mordedura de serpiente de coral o una exposición de la membrana mucosa a su veneno, es importante determinar cuándo ocurrió la mordedura debido a que los efectos neurotóxicos y la insuficiencia respiratoria pueden demorarse hasta 13 horas (Corbett & Clark, 2017).

Los síntomas que se presentan en primera instancia incluyen dolor ligero o moderado en el sitio de la mordedura, aunque puede no tener marcas de punción, náuseas, vómito y dolor abdominal (Hessel & McAninch, 2020).

La neurotoxicidad generalmente se presenta con déficits motores progresivos, entre ellos déficits de los nervios craneales, como ptosis, disartria y disfagia, así como debilidad y parálisis descendiente en los músculos de manera progresiva. (Figura 8).

Es importante considerar que los pacientes pueden presentar parálisis de los músculos respiratorios con insuficiencia pulmonar. Esta es la complicación que incrementa las probabilidades de mortalidad causada por el veneno de las serpientes de coral (Hessel & McAninch, 2020).

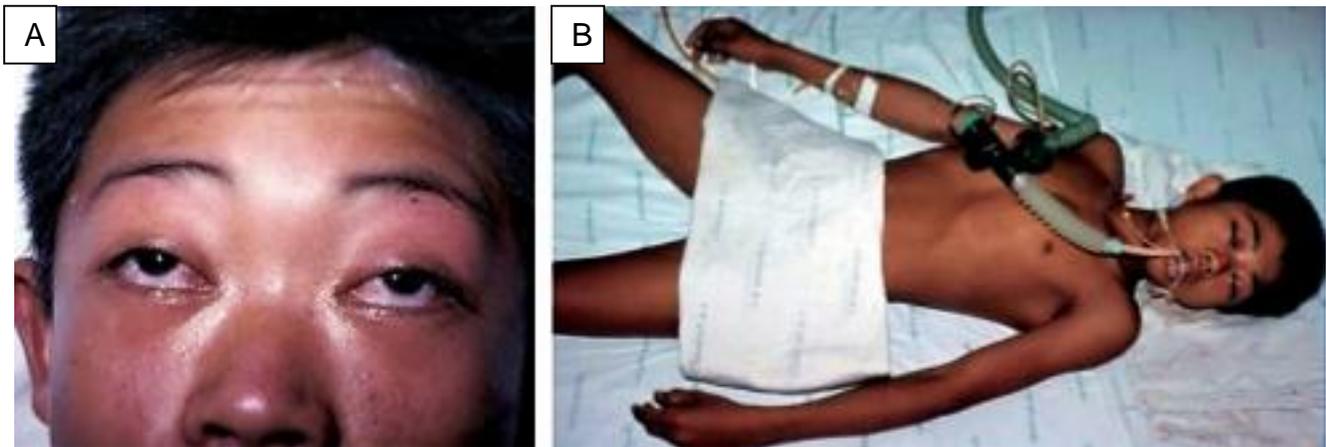


Figura 8. Accidente ofídico por serpiente de coral. Figura A: cuadro de déficit en los nervios craneales. Figura B: complicación por insuficiencia pulmonar, (Warrell, 2010).

Actualmente, el tratamiento de las mordeduras de serpientes de coral se lleva a cabo mediante el uso de antivenenos específicos.

Los antivenenos se desarrollan mediante la inoculación de veneno de la especie de serpiente de interés en animales de talla grande como caballos u ovejas, primero en pequeñas dosis, aumentándose progresivamente. Como respuesta a las aplicaciones periódicas el sistema inmune del animal utilizado genera anticuerpos contra las toxinas del veneno. Posteriormente se realiza la obtención de la sangre, la cual es almacenada en bolsas estériles con anticoagulante. Por medio de eritrosedimentación se obtiene el plasma sanguíneo, el cual es fraccionado para la obtención de los anticuerpos, los cuales son posteriormente purificados para obtener el producto final. (García & Velasco, 2020).

Los antivenenos pueden desempeñar funciones polivalentes, es decir, que pueden contrarrestar el efecto del envenenamiento por diferentes especies de *Micrurus* debido a la similitud que existe entre los venenos, esto conocido como reacción cruzada (Bolaños, Cerdas, & Abalos, 1978); (Sánchez, et al., 2003).

Actualmente existen un par de antivenenos comerciales de serpiente coral: el antiveneno “Antivenin” anti-*M. fulvius* (E.U.A.) y “Coralmyn” anti *Micrurus nigrocinctus*. (México). También existen algunos sueros experimentales que han mostrado eficiencia, como anti-*M. nigrocinctus* y *M. alleni* (Costa Rica), anti-*M. mipartitus* (Costa Rica) y anti-*M. frontalis* y *M. corallinus*, aunque estos siguen siendo estudiados (Brasil y Argentina) (Bolaños, et al., 1978).

Como se había mencionado anteriormente, en México contamos con solo un antiveneno antiofídico específico para serpientes de coral: Coralmyn[®], producido por laboratorios Silanes. Es un antiveneno anticoral polivalente obtenido por medio de la inmunización de caballos con el veneno de la serpiente *M. nigrocinctus*. Está compuesto por fragmentos de inmunoglobulinas F(ab')₂ purificados.

Hasta ahora este antiveneno ha mostrado su utilidad en casos clínicos, sin embargo, hay especies en las que la eficacia es mayor que en otras (Roodt, et al., 2004). Esto representa un

problema porque, en la mayoría de los casos, las especies causantes de las mordeduras no pueden ser identificadas.

II.5 LOS VENENOS.

Los venenos de las serpientes están compuestos en su mayoría por una mezcla de polipéptidos pertenecientes a más de 20 familias proteicas y que incluyen toxinas, enzimas y péptidos pequeños. Su inoculación mediante mordedura puede producir cuadros de envenenamientos diversos y extremadamente complejos. La gravedad de estas patologías depende de factores propios del veneno, la mordedura, la presa, y las lesiones producidas, que en caso de no tratarse a tiempo pueden ser letales (Nogués, et al., 2008).

En los coralillos, la principal característica del veneno es la neurotoxicidad, también se han encontrado reportes en modelos experimentales de algunos venenos de *Micrurus* que pueden ocasionar miotoxicidad, citotoxicidad y lesiones locales. Estudios en venenos de otros elápidos han demostrado que también pueden tener actividad cardiotoxica, hemolítica, hemorrágica y edematogénica, entre otras (Kochva, 1987).

Entre los componentes principales de los venenos de coralillos, los que se han relacionado con la acción neurotóxica son: las fosfolipasas A₂ (PLA₂) con actividad β-neurotóxica y las α-neurotoxinas de la familia de tres dedos (3FTx). Se ha demostrado que los miembros de estos grupos actúan sobre la placa neuromuscular impidiendo la liberación presináptica del neurotransmisor acetilcolina, como en el caso de algunas fosfolipasas (β-neurotoxinas), o bloqueando su unión al receptor postsináptico de acetilcolina (α-neurotoxinas). Ambos tipos de proteínas causan parálisis flácida del músculo esquelético (Kini, 2003); (Nirthanan & Gwee, 2004). Además, ambas familias proteicas tienen miembros con actividades farmacológicas muy diversas, que incluyen miotoxicidad en el caso de PLA₂ (Kini, 2003); (Montecucco, et al., 2008) y cardiotoxicidad en el caso de toxinas de tres dedos, entre muchas otras (Kini & Doley, 2010).

Estas familias proteicas están presentes en todos los venenos de las especies de *Micrurus* estudiadas, sin embargo, se encuentran en diferentes proporciones y se han identificado componentes diferentes presentes en cada veneno. Vital Brazil (1978), utilizando como modelo los venenos de las especies *M. fulvius*, *M. frontalis*, *M. lemniscatus* y *M. corallinus*, propuso un modelo para describir las diferentes actividades que presentan los venenos en los organismos afectados. En ese trabajo, se propuso dividir los venenos en 4 grupos: venenos que actúan solo con actividad postsináptica, venenos que sólo actúan con actividad presináptica, venenos que presentan neurotoxicidad postsináptica y presináptica, y venenos que presentan neurotoxicidad postsináptica e inducen despolarización de la membrana muscular (Brazil & Fontana, 1987).

Enseguida, se describen las principales familias proteicas encontradas en los venenos de las serpientes del género *Micrurus*.

1. Fosfolipasas A₂ (PLA₂):

Las fosfolipasas de tipo A₂ son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace éster en la posición *sn*₂ de los glicerofosfolípidos para liberar lisofosfolípidos y ácidos grasos de cadena

libre, alterando así la membrana celular en la que se encuentran (el tipo celular puede variar y con ello las patologías) (Figura 9). Al catalizar esta reacción, participan en diferentes procesos biológicos de importancia tales como la homeostasis de las membranas celulares, digestión de lípidos, transducción de señales y la producción de mediadores de lípidos como eicosanoides y derivados de lisofosfolípidos que exhiben diversas y potentes acciones biológicas (Valentin & Lambeau, 2000).

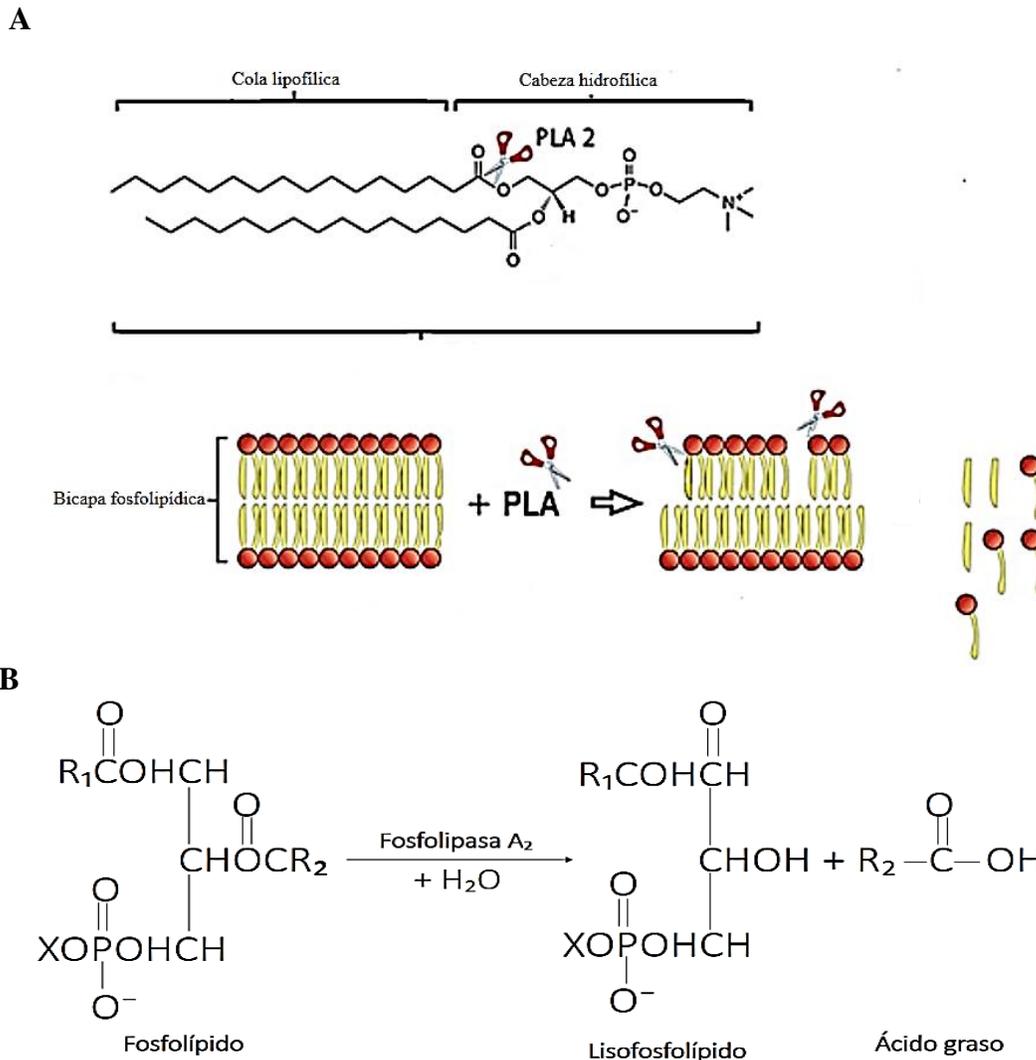


Figura 9. **A:** Mecanismo de acción de PLA₂ en membrana celular. (Fei, et al., 2018). **B:** Hidrólisis del enlace sn2 de un fosfolípido, catalizada por una PLA₂ (Kini, Phospholipase A2: structure, function and mechanism, 1997).

La actividad de las enzimas PLA₂ se encontró por primera vez en el jugo pancreático y en el veneno de las serpientes. Debido a la abundancia de estas enzimas en los venenos de las serpientes y la facilidad que implica su purificación, las PLA₂ presentes en los venenos han sido las más estudiadas. Se sabe actualmente, que hay una gran diversidad de enzimas PLA₂ presentes en los venenos de las serpientes, con formas catalíticas activas e inactivas. También

muestran funciones digestivas importantes, entre ellas una gran variedad de actividades tóxicas y farmacológicas, incluyendo la neurotoxicidad (Valentin & Lambeau, 2000).

Las PLA₂, presentes en venenos animales, se clasifican en tres grupos:

- Grupo I: se encuentran en Elápidos e Hidrófidos.
- Grupo II: están presentes en Vipéridos.
- Grupo III: se encuentran en veneno de abejas e invertebrados como medusas, abejorros, escorpiones y algunos lagartos (*Heloderma*).

La diferencia entre los grupos I, II y III reside en su estructura. Las PLA₂ de los grupos I y II están particularmente bien conservadas en sus estructuras primarias y terciarias, sus cadenas polipeptídicas principales son casi superponibles y comparten seis enlaces disulfuro. El grupo I se distingue por la presencia de una secuencia de propéptidos y el llamado motivo "pancreatic loop", una extensión en el extremo C-terminal, llamado así debido a que también se encuentra en las PLA₂ del jugo pancreático humano. Las PLA₂ de veneno del grupo III contienen solo diez cisteínas y se encuentran compuestas por una o dos subunidades. Están poco relacionadas con las enzimas del grupo I y II, y la comparación de sus estructuras primarias indica una homología en su secuencia solo en el bucle Ca²⁺ y en las regiones del sitio activo, aunque existen algunas excepciones (Valentin & Lambeau, 2000).

A pesar de algunas características comunes, como la estructura primaria conservada, las PLA₂ pueden mostrar diferentes efectos farmacológicos, como la miotoxicidad (incluso sin la actividad catalítica) y la neurotoxicidad, que contribuyen a los síntomas de envenenamiento.

Como se había mencionado anteriormente, las PLA₂ con actividad β-neurotóxica producen un bloqueo persistente de la liberación de acetilcolina de las terminales nerviosas de la placa neuromuscular. De acuerdo con Caccin, P. y colaboradores (2006), la parálisis inducida por estas enzimas se lleva a cabo en tres fases: Una fase inicial de inhibición débil de la liberación de acetilcolina, seguida por una segunda fase prolongada de liberación facilitada que se fusiona en una tercera fase de disminución progresiva de la neurotransmisión, hasta llegar a una parálisis total. Cabe mencionar que por medio de microscopía electrónica se han logrado observar en la tercera fase terminales axónicos hinchados y agrandados con disminución de las vesículas sinápticas que podrían ser evidencias de lisis (Caccin, et al., 2006).

Actualmente este tipo de enzimas se encuentra presente en todos los ejemplares de *Micrurus* estudiados, tales como *M. nigrocinctus nigrocinctus*, *M. alleni yatesi*, *M. multifasciatus*, *M. fulvius*, *M. frontalis*, *M. lemniscatus* y *M. corallinus*, entre otros. Por otra parte, también se han llegado a encontrar especies donde son poco abundantes y no letales, como en la serpiente de coral brasileña *Micrurus surinamensis*, cuyo veneno está constituido principalmente por 3FTx (Olamendi-Portugal T, 2008); (Oliveira, et al., 2017).

2. α-Neurotoxinas:

Las toxinas de la familia de tres dedos se caracterizan por poseer una estructura distintiva formada por tres bucles que emergen de un núcleo hidrófobo globular pequeño que está reticulado por cuatro puentes disulfuro; los tres bucles se asemejan a tres dedos extendidos de la mano (Nirthanan & Gwee, 2004), lo que explica su nombre.

Dentro de la familia de las toxinas de tres dedos se encuentran las α -neurotoxinas, que son toxinas no enzimáticas que actúan en el receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), bloqueándolo.

Se ha logrado identificar α -neurotoxinas en abundancia dentro de los venenos de elápidos y actualmente se han purificado y secuenciado cerca de 50 de estos polipéptidos neurotóxicos. Todos ellos presentan similitud estructural entre sí: son moléculas básicas y, en función de su masa molecular, son clasificadas en tres grandes grupos: toxinas de cadena corta (grupo I: 60 a 62 aminoácidos y 4 puentes disulfuro), toxinas de cadena larga (grupo II: 71 a 74 aminoácidos y 5 puentes disulfuro) y no convencionales (grupo III: Pueden variar en su longitud y en sus enlaces disulfuro con respecto al grupo I y II) (Figura 10). Estas toxinas presentan diferencias en cuanto a su estabilidad frente a liofilización, modificaciones químicas, entre otras (Nirthanan & Gwee, 2004); (Girón, et al., 1999).

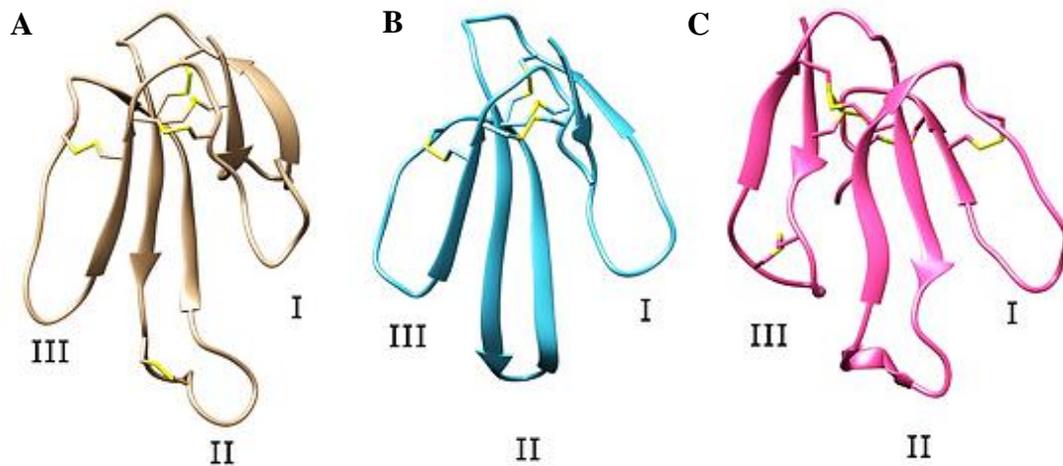


Figura 10. Estructura terciaria de toxinas de cadena larga (A), de cadena corta (B), y no convencionales (C) pertenecientes al grupo de las α -neurotoxinas de la familia de 3FTx. (Guselvin & Meiler, 2020).

Las α -neurotoxinas de cadena corta y larga que se han encontrado en venenos de elápidos interfieren con la transmisión colinérgica en la unión neuromuscular del músculo esquelético al unirse con alta afinidad y selectividad a los nAChR postsinápticos para producir un bloqueo de la transmisión neuromuscular (Figura 11). Algunos ejemplos de tales toxinas incluyen: α -bungarotoxina (*Bungarus multicinctus*) y erabutoxina-b (*Laticauda semifasciata*) (Nirthanan & Gwee, 2004).

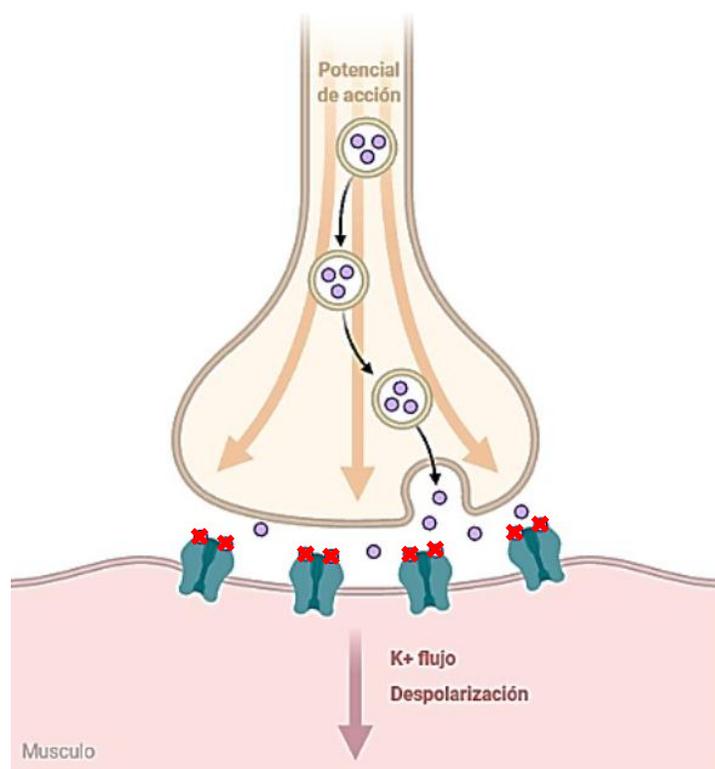


Figura 11. Receptores nicotínicos de acetilcolina en el botón presináptico del músculo esquelético (bloqueo por acción de α -neurotoxinas). (BioRender, 2021).

Como se había mencionado anteriormente, la secuencia primaria de las toxinas puede llegar a variar entre ellas, estas variaciones pueden ocasionar diferencias relevantes en su reconocimiento y neutralización por los antivenenos existentes, por lo que es muy importante su estudio.

II.6 ANTECEDENTES.

Benard Valle y colaboradores (2013; 2020) llevaron a cabo caracterizaciones bioquímicas de los venenos de dos especies de coralillos: *Micrurus tener* (2013) y *Micrurus browni* (2020), con el fin de determinar las principales familias proteicas presentes en los venenos, así como su proporción y su papel en la letalidad y sus interacciones.

En los resultados obtenidos para *Micrurus tener*, se pudo observar una mayor proporción de toxinas de la familia de 3 dedos en el veneno completo (46%) que de fosfolipasas de tipo A₂ (20%), sin embargo se encontró que aunque la proporción de 3FTx era mayor, la letalidad estaba estrechamente relacionada con fosfolipasas A₂ neurotóxicas, las cuales corresponden a un 14% del veneno completo. También, se observó una actividad fosfolipasa de 113.2 U/mg y una dosis letal media (DL₅₀) de 22.8 μ g/ratón (Valle et al., 2013).

En los resultados obtenidos para *Micrurus browni*, por otra parte, se pudo observar que el veneno está conformado principalmente por fosfolipasas de tipo A₂ (38.1%), seguido de toxinas de la familia de 3 dedos (26.4%), en el caso de este veneno, la letalidad estaba dada principalmente por fosfolipasas A₂ neurotóxicas (9.5% del veneno completo), aunque también

se vio reflejada actividad letal por parte de una α -neurotoxina (4.9% del veneno completo). También se pudo observar una actividad fosfolipasa de 284.6 U/mg y una dosis letal media (DL₅₀) de 3.23 μ g/ratón (Valle, et al., 2020).

También, en otro estudio, Carbajal Saucedo y colaboradores (2013) realizaron un análisis de las propiedades toxicológicas y características inmunoquímicas del veneno de la serpiente de coral *Micrurus laticollaris* donde se logró obtener una caracterización del veneno completo, así como la identificación, aislamiento y clonación de una α -neurotoxina encontrada y denominada MlatA1. En los resultados obtenidos se encontró que el veneno de *M. laticollaris* al igual que las serpientes de coral antes mencionadas, cuenta con una mayor proporción de PLA₂ que de 3FTx, sin embargo en este caso particular, la toxicidad de esta especie parece estar más relacionada a la fracción 2.1, subfracción 2, denominada “MlatA1” y que presenta características de 3FTx (6673.0 unidades de masa molecular) con altos niveles de neurotoxicidad (DL₅₀ de 1.27 μ g/ratón).

Comparando los resultados obtenidos, se puede observar que existe una variación en cuanto a la composición de los venenos, a pesar de ser serpientes de coral Mexicanas. Es interesante observar que aunque existe una diferencia entre la proporción de PLA₂ y 3FTx, en *Micrurus browni* y *Micrurus tener*, la letalidad en estas dos especies está dada principalmente por PLA₂ neurotóxicas, mientras que en *Micrurus laticollaris*, a pesar de también presentar un perfil más abundante en PLA₂, la letalidad está determinada principalmente por una 3FTx.

Estos son los únicos estudios detallados hasta el momento que describen el veneno de especies de *Micrurus* mexicanas, por lo que es importante continuar con su investigación, también ayudan a complementar la información de las serpientes de coral Mexicanas, especialmente sobre la composición y función de su veneno, así como de los componentes relacionados con su letalidad, lo cual es de importancia ya que los estudios son escasos.

Por otra parte, Dart R. (1992) y colaboradores llevaron a cabo un estudio donde se planteaba realizar la neutralización del efecto de la mordedura de serpiente por la especie *Micrurus distans* utilizando un antiveneno efectivo para *Micrurus fulvius*. Para este estudio, se tomaron muestras de veneno de un ejemplar de *M. distans* de 122 cm de largo, que había sido colectado en el sur de Sonora. Con la muestra tomada del veneno de este ejemplar se procedió a realizar un ensayo de inmunodifusión y un ensayo de identificación de la eficacia del antiveneno “Antivenin®”. En los resultados se pudo observar, para el ensayo de inmunodifusión, la formación de bandas marcadas, sobre todo en bajas concentraciones de veneno de *M. distans*, lo que indica un reconocimiento del antiveneno. También se encontró que la LD₅₀ para *M. distans* correspondía a 0.71 μ g/g de peso corporal. Estos resultados, sugirieron que el antiveneno “Antivenin” podría ser útil en el tratamiento del envenenamiento por *M. distans* (Dart, et al., 1992).

A pesar de esto y aunque se sugiere que este antiveneno podría ser eficaz contra el efecto del veneno de *M. distans*, las características bioquímicas y biológicas de su veneno aún siguen siendo desconocidas. Aun cuando los casos de mordedura por *M. distans* son raros, los que se han llegado a reportar notifican intervención de centros toxicológicos de la frontera mexicana y estadounidense, donde se han tratado cuadros clínicos de esta naturaleza, así como una defunción a causa de ésta especie (Dart, et al., 1992).

II.7 JUSTIFICACIÓN.

La serpiente de coral *Micrurus distans* puede considerarse una especie de importancia médica en México debido a que existen reportes de envenenamiento y cuenta con una amplia distribución geográfica. A pesar de ello, no existen estudios sobre la caracterización de su veneno ni la capacidad neutralizante de los antivenenos actuales contra éste, por lo que la información obtenida en el presente trabajo puede ser de utilidad para el futuro mejoramiento de antivenenos comerciales. Cabe mencionar que las propiedades y características de los venenos de las serpientes de coral en su mayoría siguen siendo desconocidas ya que las investigaciones relacionadas con la caracterización de los venenos para el desarrollo y mejoramiento de los antivenenos son escasas, esto debido a la difícil mantención de los individuos de esta especie en cautiverio por sus características físicas, hábitos alimenticios y de comportamiento, además de su baja producción de veneno.

El estudio de esta especie además complementará la información existente sobre la diversidad de especies de serpientes venenosas en México, pues aportará datos importantes para el estudio de su evolución, historia de vida y nicho ecológico.

III. OBJETIVOS.

III.1 GENERALES.

Caracterizar el veneno de la serpiente de coral *M. distans* de forma bioquímica y biológica enfocándose en la identificación de componentes tóxicos para ratones.

III.2 PARTICULARES.

- Evaluar la presencia de variación entre los venenos de individuos de la especie *M. distans*.
- Caracterizar la actividad enzimática y biológica del veneno completo.
- Fraccionar el veneno de la serpiente de coral *M. distans* mediante HPLC de fase reversa.
- Caracterizar las fracciones obtenidas.
- Identificar y caracterizar componentes con toxicidad para ratones.

IV. HIPÓTESIS

El veneno de *M. distans* está compuesto principalmente de fosfolipasas A₂ y toxinas de tres dedos con actividad neurotóxica.

V. METODOLOGÍA.

Se partió de 8 muestras de venenos de distintos ejemplares de la especie *Micrurus distans*, la mayoría correspondientes a la misma zona geográfica. Como parte de la determinación de variación entre los venenos individuales, se realizaron ensayos de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones desnaturalizantes y cromatografía líquida de alta definición, en fase reversa (RT-HPLC), así como un ensayo titulométrico de actividad fosfolipasa en yema de huevo al 10%.

Para la segunda parte del proyecto, se seleccionaron 3 ejemplares de los 8 mencionados anteriormente, los cuales fueron utilizados para realizar una mezcla de venenos (4 mg totales de cada veneno), una vez realizada, se procedió a llevar a cabo la determinación de la dosis letal media (DL₅₀), posteriormente se fraccionó por medio de RT-HPLC, a la mezcla de veneno completa se le realizaron también ensayos de actividad fosfolipasa en yema de huevo al 10% y actividad proteasa en azocaseína.

Para la tercera parte, se realizó la caracterización de las fracciones obtenidas, realizando un ensayo de SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras. Posteriormente, se determinaron las fracciones letales del veneno por medio de ensayos de letalidad en 1 ratón por fracción (xx µg/ratón) y una vez obtenidas, se realizaron determinaciones de masas moleculares a las fracciones más abundantes del veneno, así como a las letales, por medio de espectrometría de masas con ionización por electrospray (ESI-MS). También se realizaron ensayos de actividad fosfolipasa en placas de agarosa con yema de huevo al 10% y secuenciación del N-terminal como complemento del estudio (Figura 12).

A los venenos individuales y a las fracciones se les realizó un ensayo de actividad procoagulante/anticoagulante con el motivo de complementar los resultados obtenidos.

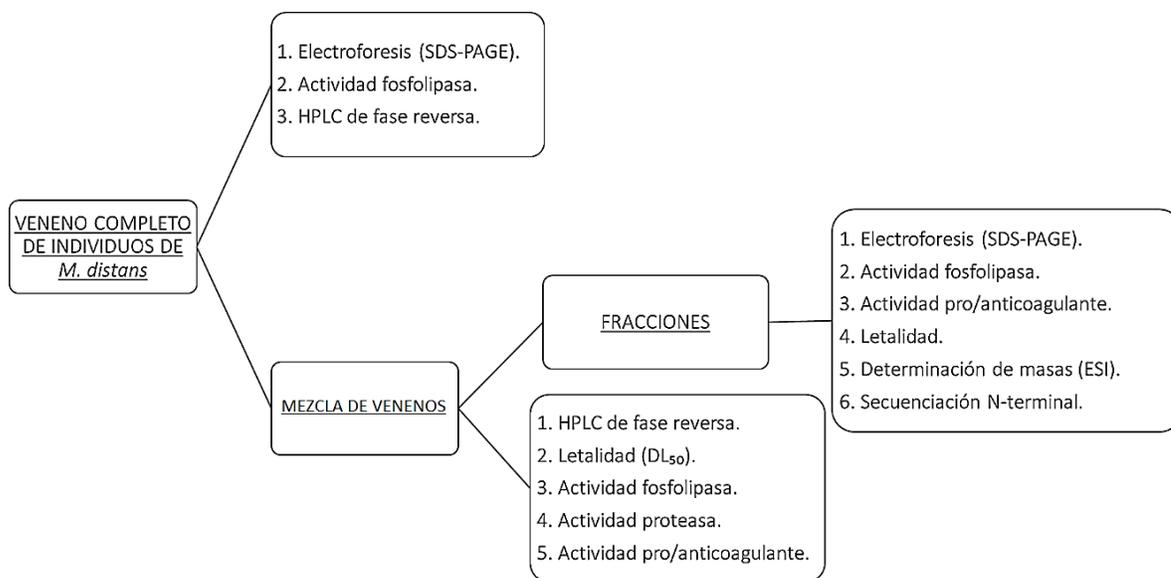


Figura 12. Cuadro metodológico.

V.1 VENENOS.

Se obtuvieron muestras de veneno de ejemplares de la especie *M. distans* anteriormente colectadas y almacenadas en el banco de venenos del laboratorio del Dr. Alejandro Alagón (Tabla 1). La extracción del veneno se realizó de forma manual, la recuperación del veneno se realizó utilizando agua destilada y se colocó en un tubo nuevo. Posteriormente fue centrifugado 3 min a 13,400 g para remover detritos celulares y el sobrenadante fue congelado con nitrógeno líquido y liofilizado. Los venenos liofilizados fueron almacenados a 4 °C hasta su uso.

Antes de utilizarse, todas las muestras fueron pesadas para obtener alrededor de 2.0 mg de veneno, como se muestra en la tabla 1:

Tabla 1. Procedencia de los venenos utilizados.

ESPECIE	CÓDIGO	FECHA DE EXTRACCIÓN	LOCALIDAD	PESO (mg)
<i>Micrurus distans</i>	HK156	16/06/18	Estación de Biología Chamela, Jalisco.	2.1
<i>Micrurus distans</i>	HK155	16/06/18	Estación de Biología Chamela, Jalisco.	2.2
<i>Micrurus distans</i>	Mdis3	27/08/03	Estación de Biología Chamela, Jalisco.	2.2
<i>Micrurus distans</i>	HK136	09/10/04	Estación de Biología Chamela, Jalisco.	2
<i>Micrurus distans</i>	HK137	09/10/04	Estación de Biología Chamela, Jalisco.	2.1
<i>Micrurus distans</i>	G0515	desconocido	Coahuayana, Michoacán.	2
<i>Micrurus distans</i>	HK151	09/08/10	Estación de Biología Chamela, Jalisco.	0.6
<i>Micrurus distans</i>	HK154	11/08/10	Estación de Biología Chamela, Jalisco.	2

Las muestras seleccionadas se resuspendieron en 1ml de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM y KH₂PO₄ 2 mM, pH 7.4), posteriormente se colocaron en centrifugación durante 2 minutos a 14,000 xg para eliminar posibles contaminantes. Una vez centrifugadas se tomó el sobrenadante y se colocó en tubos nuevos, obteniendo así las fracciones de interés a una concentración aproximada de 2 mg/ml, tomando en cuenta las cantidades anteriormente pesadas.

Para la elaboración de la mezcla de venenos, se seleccionaron a los individuos HK156, HK155 y Mdis3, debido a que las muestras de veneno se encontraban en mayor proporción y en mejor estado de conservación. De ellos se tomaron 4 mg (cuantificado por BCA) de veneno y fueron resuspendidos en 1 ml de PBS, posteriormente centrifugados 3 minutos a 13,400 rpm para quitar contaminantes y colocados en tubos nuevos, una vez obtenidos los productos finales, fueron liofilizados y mezclados en proporciones iguales.

V.2 Cuantificación de proteínas (Absorbancia a 280 nm y ácido bicinonínico).

La espectrofotometría UV es una técnica que mide la interacción de moléculas con la radiación electromagnética, la energía de la luz es utilizada para promover electrones de un estado de excitación a otro, en este proceso la energía de la luz es absorbida y dependiendo de las características de las moléculas contenidas en la muestra, esto sucede a diferentes longitudes de onda. En este caso particular, la absorción utilizada corresponde a 280 nm ya que se basa en la propiedad de las proteínas de tener un máximo de absorción a 280 nm, debido al contenido de los aminoácidos aromáticos triptófano y tirosina (Sosa & Sánchez, 2004).

Las proteínas poseen coeficientes de extinción molar a 280 nm (E_{280} que pueden variar de acuerdo a su composición aminoacídica entre 0,4-1,5). En el caso de muestras complejas de proteínas, puede considerarse que una unidad de absorbancia corresponde aproximadamente a una concentración (C) de 1 mg/ml de proteínas.

De acuerdo a la ley de Lambert-Beer, la totalidad de la luz que pasa a través de una muestra puede disminuir debido a 3 fenómenos: la concentración (C), la distancia (l) y el coeficiente de extinción de la muestra (ϵ):

$$C = \frac{A}{(\epsilon * l)}$$

El método del ácido bicinconínico (BCA) genera una reacción colorimétrica detectable a 562 nm. Este método consiste en combinar la reducción del Cu^{2+} a Cu^{1+} en medio alcalino, con la captación selectiva del Cu^{1+} utilizando el ácido bicinconínico. El producto de la reacción muestra un color morado formado por el complejo de BCA con un ion Cu^{1+} . La estructura, el número de enlaces peptídicos y la presencia de aminoácidos tales como: cisteína, triptófano y tirosina, son los responsables de dar inicio a la reacción. La concentración de proteínas se determina a partir de una curva de calibración construida con una proteína de referencia de concentración conocida. (Véase protocolo en Anexo IX.I).

V.3 SDS-PAGE.

La electroforesis desnaturizante es una técnica que permite la separación de una mezcla proteica según su masa molecular aparente, inicialmente descrito por Ulrich Laemmli (1970). Esta técnica se lleva a cabo utilizando un campo eléctrico que provoca la movilidad de las proteínas de acuerdo a su carga en un gel formado de un polímero de acrilamida-bisacrilamida. La separación de proteínas tiene lugar debido a la fricción que éstas tienen con la estructura del gel, dependiendo de la concentración de acrilamida (Romero, et al., 2019).

Se cargaron 15 μg de cada veneno individual y 3 μg de las fracciones en geles de poliacrilamida-SDS al 15%, para fines comparativos se utilizaron 15 μg de la mezcla de los venenos. Las muestras se corrieron en condiciones reductoras (en presencia de persulfato de amonio al 10%), bajo las cuales se rompen los puentes disulfuro presentes en las proteínas; y para en condiciones no reductoras. La estimación del peso molecular se llevó a cabo utilizando 15 μg de marcador molecular para proteínas preteñidas de intervalo amplio (6 – 175 KDa), posteriormente los geles fueron teñidos utilizando azul de coomassie. (Véase protocolo en Anexo IX.II).

V.4 ACTIVIDAD FOSFOLIPASA MEDIANTE ENSAYO TITULOMÉTRICO Y SOBRE PLACAS DE AGAROSA – YEMA DE HUEVO 10%.

Para medir la actividad fosfolipasa presente en los venenos, se realizó un ensayo titulométrico en yema de huevo al 10%, el cual se basa en observar la capacidad del veneno para reducir el pH en la solución. Esto sucede debido a que la hidrólisis del enlace *sn*-2 de los fosfolípidos, catalizada por las fosfolipasas A_2 , genera la liberación de un ácido graso, el cual por la liberación de un protón acidifica el medio en el que se encuentra, que en este caso corresponde a pH 8.0. La adición de NaOH permite compensar la cantidad de protones disueltos en el medio por la reacción con OH^- , formando así moléculas de agua y estabilizando el pH de la solución hasta que la cantidad de OH^- es rebasada por la cantidad de protones.

La cantidad de NaOH añadida capaz de mantener el pH alrededor de 8.0 está en función de la cantidad de protones liberados al medio, por lo que actúa como una medida indirecta de la actividad enzimática. La actividad enzimática (U) se define como μmoles de NaOH consumidas por minuto y es expresada en unidades específicas (U/mg). (Véase protocolo en Anexo IX.III).

Por otra parte, para analizar la actividad fosfolipasa de las fracciones de la mezcla de venenos, se realizó un ensayo de actividad fosfolipasa en placas de agarosa, el cual cumple

con el mismo fundamento mencionado anteriormente. Se lleva a cabo utilizando solución de yema de huevo al 10%, la cual se adiciona de CaCl₂ (20 mM), Tritón X-100 (100 µl), rodamina 6G (0.1%) como colorante y agarosa (0.01%). La acidificación del medio por acción de la actividad enzimática de las fosfolipasas genera un cambio de color debido al colorante Rodamina, en forma de halo, dependiendo de la actividad, el halo tendrá un menor o mayor tamaño. Se adicionó 1 µg de cada fracción por pozo y se dejó incubando 24 horas a 37°C. Por medio del software ImageJ® se realizó la determinación del diámetro de los halos y se compararon los resultados obtenidos.

V.5 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN EN FASE REVERSA (RP-HPLC).

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica utilizada para separar a los componentes de una mezcla basándose en los diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias. En particular el RP-HPLC consiste en una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar. La fase estacionaria generalmente se encuentra compuesta de sílica con cadenas de hidrocarburos de longitud variable, mientras que la fase móvil es la portadora de la muestra de interés.

La muestra en solución es inyectada a la fase móvil y los componentes de la solución son separados de acuerdo a las interacciones no-covalentes de los compuestos con la columna. Las interacciones químicas determinan la separación de las moléculas contenidas en la muestra, así como también la fuerza de adsorción y las interacciones entre el compuesto polar y la fase estacionaria polar.

Se utilizó una columna analítica C₁₈ (Marca Pursuit®, modelo xRs-C18, tamaño de partícula 5 µm, dimensiones: 250 x 4.6 mm). Se cargaron 2 mg de cada veneno en 200 µl de 5% acetonitrilo y 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA). El flujo fue de 1 ml/min. Solución A (dH₂O + 0.1% TFA), solución B (Acetonitrilo + 0.1% TFA).

El gradiente utilizado se muestra en la tabla 2:

Tabla 2. Gradiente utilizado (RP-HPLC).

Gradiente	
Tiempo (min)	% B
0-5	0
5	0
15	15
75	45
87	70
97	100
107	100

Las fracciones fueron monitoreadas a 214 nm y colectadas a mano.

V.6 ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE

Algunos venenos de serpientes contienen enzimas que actúan sobre proteínas de la cascada de coagulación, como metaloproteinasas activadoras del factor X y serinoproteasas. También se han llegado a encontrar componentes de los venenos que inducen a la degradación de la fibrina, evitando la formación del fibrinógeno, entre otros (Sánchez, et al., 2015).

La actividad anticoagulante se determinó de la siguiente manera:

Se extrajo sangre de tres donantes humanos diferentes (20 ml/donante) en citrato de sodio al 3.2% en una proporción 1:9 con la sangre. La sangre fue centrifugada a 2000 rpm durante 5 minutos para la obtención del plasma. Se colocaron 200 μ l de plasma en tubos de vidrio, se incubaron a 37°C durante 3 minutos, posteriormente se les agregaron 15 μ g de veneno a cada uno y se volvieron a incubar durante 10 minutos a 37°C, finalmente se les agregó calcio (50 μ l) y se observó el tiempo en el que se formó el coágulo. Como agente coagulante se utilizaron 15 μ g de la mezcla de venenos y como control negativo 15 μ l de PBS 1X. (Véase protocolo en Anexo IX.V).

V.7 ACTIVIDAD PROTEASA

La actividad proteasa de los venenos se evaluó utilizando una modificación del método descrito por Chen et al. (2004) y Yang et al. (2015) y modificado por Gutiérrez et al. (2008). Se colocó azocaseína disuelta en una solución estándar hasta una concentración final de 10 mg/ml. Posteriormente se colocaron 20 μ g de veneno disuelto en 20 μ L de NaCl 150 mM, se agregaron a 100 μ L de la solución de azocaseína y se incubó durante 30 min a 37 ° C. Después de la incubación, la reacción se detuvo añadiendo 200 μ l de ácido tricloroacético al 5%. Después, las muestras se centrifugaron a 16,800 g durante 5 min; 150 μ L del sobrenadante de cada muestra se añadió a 150 μ L de NaOH 500 mM en una placa de 96 pozos. Finalmente, se determinó la absorbancia de la muestra a 570 nm.

Las unidades de actividad enzimática (U) se definen como el cambio de 0.2 en la absorbancia de la muestra por minuto. (Véase protocolo en Anexo IX.VI)

V.8 DOSIS LETAL MEDIA (DL₅₀)

Se le denomina dosis letal media (DL₅₀) a la dosis de una sustancia que produce la mortalidad en el 50% de la población de individuos envenenados experimentalmente. Los valores de DL₅₀ se utilizan como un indicador de la toxicidad aguda presente en una sustancia, estos valores suelen expresarse en μ g de sustancia tóxica por g de peso animal, de esta manera es posible realizar los cálculos correspondientes para poder extrapolarse a otros organismos.

Se tomaron grupos de 3 ratones CD1 (18-22 g) por dosis de veneno (mezcla de venenos) colocando 100, 60, 50, 40, 30 y 25 μ g/ratón vía intravenosa y se sometieron a observación durante 48 h. La DL₅₀ fue estimada por medio del método de regresión no lineal, ajustando los datos a una curva dosis-respuesta de forma sigmoideal.

Se graficaron los resultados obtenidos utilizando el Software GraphPad Prism 4® donde la abscisa corresponde al logaritmo de la dosis del veneno y la ordenada al porcentaje de muertes. (Véase protocolo en Anexo IX.IV).

V.9 LETALIDAD DE FRACCIONES

Las fracciones más abundantes de la mezcla de venenos fueron probadas inyectando de manera intravenosa diferentes cantidades (20 y 40 µg/ratón) a 1 ratón de la cepa CD1 (18-22 g), para determinar si existe actividad letal y cuál es el rango (µg/g) en el que ésta se presenta.

VI. RESULTADOS.

VI.1 ESPECTROFOTOMETRÍA UV (280 nm) y BCA.

Se realizaron tres metodologías para la cuantificación de proteínas en el veneno: el peso seco del veneno (antes de ser resuspendido), el método de absorbancia a 280 nm y el método del ácido bicinconínico. Las muestras de cada individuo fueron resuspendidas en 1 ml de PBS. En la tabla 3 se muestran los valores obtenidos:

Tabla 3. Cuantificación por tres métodos: Peso seco, absorbancia a 280 nm y BCA. Venenos individuales de 8 ejemplares de la especie *M. distans*.

MUESTRA	PESO SECO (mg/ml)	A ₂₈₀ (DO)	BCA (mg/ml)
HK156	2.1	1.816	2.339
HK155	2.2	2.047	2.227
Mdis3	2.2	1.812	2.494
HK136	2	1.35	0.848
HK137	2.1	1.12	1.17
Mdis4	2	1.89	2.063
HK151	0.6	1.44	1.451
HK154	2	1.97	1.867
Mezcla de venenos	ND	4.802	4.926

Como se puede observar en la tabla, en los resultados del peso seco hay diferencias entre las cantidades de veneno pesadas, esto debido a que algunos de los venenos se encontraban en porciones pequeñas por lo que no fue posible llegar a la cantidad esperada (2 mg). Por otra parte, se pueden observar diferencias entre el método de absorbancia a 280 nm como en el de ácido bicinconínico (BCA), de manera notoria en los individuos HK156, Mdis3 y HK136. Cabe mencionar que la mezcla de venenos, por ser una mezcla de las muestras HK156, HK155 y Mdis3 no cuenta con una cuantificación en peso seco (mg/ml). Para todos los experimentos realizados posteriormente se tomó en cuenta la cuantificación obtenida por el método de BCA.

VI. 2 SDS-PAGE DE VENENOS COMPLETOS.

Se realizaron SDS-PAGE al 15%, uno reductor y otro no reductor, donde se colocaron en orden del 1 al 8 las muestras de los venenos completos de los diferentes individuos para ver un aproximado del peso molecular de los componentes de cada veneno. Los resultados se muestran en la figura 13:

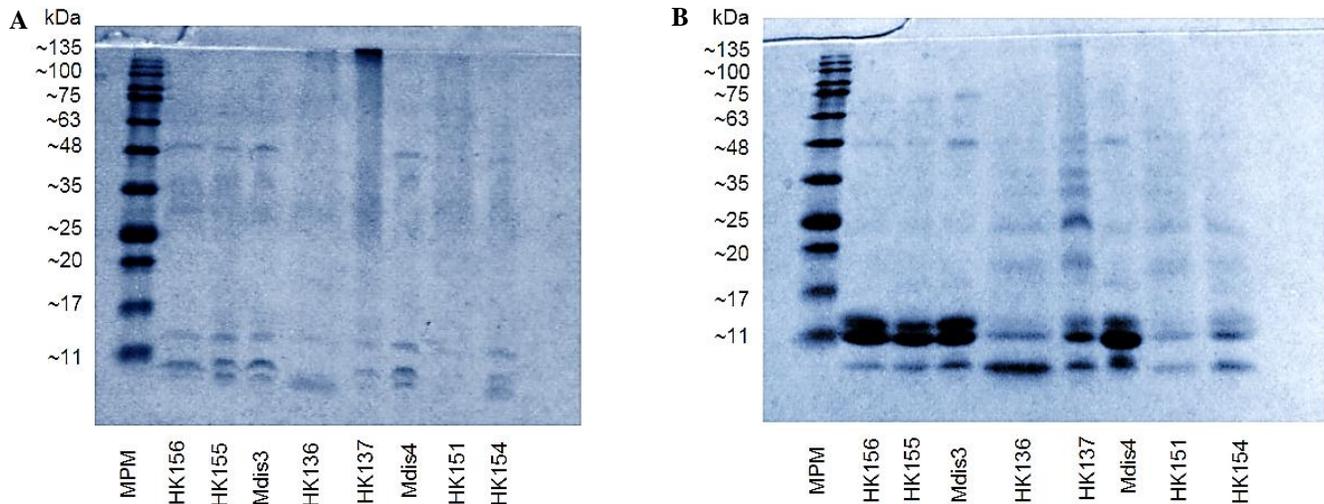


Figura 13. SDS-PAGE 15%. 10 μ g de veneno por carril. **MPM:** Marcador de masa molecular. **kDa:** kilo Daltones **A:** en condiciones reductoras (2ME); **B:** en condiciones no reductoras.

Todos los individuos presentan al menos 5 bandas de diferente peso molecular y concentración, puede observarse que la mayoría de los individuos presenta bandas de entre 13-15 kDa, en diferentes proporciones. También hay presencia de bandas de menor peso molecular (5 a 11 kDa) en todos los individuos y algunas bandas de alto peso molecular (45-83 kDa), a excepción de algunos individuos tales como HK151 y HK154.

VI. 3 ACTIVIDAD FOSFOLIPASA PLA₂ EN VENENOS COMPLETOS.

Se realizaron ensayos titulométricos para medir la actividad fosfolipasa presente en los venenos completos de los diferentes individuos, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4:

Tabla 4. Ensayo titulométrico de Actividad fosfolipasa de venenos completos (3 repeticiones).

MUESTRA	U/mg	DE
HK156	222	92.7
HK155	68	8.5
Mdis3	102	37.2
HK136	24	1
HK137	63	3.05
Mdis4	110	15.5
HK151	50	11.01
HK154	120	30

U/mg: μ mol NaOH/min; **DE:** Desviación estándar.

Actividad fosfolipasa

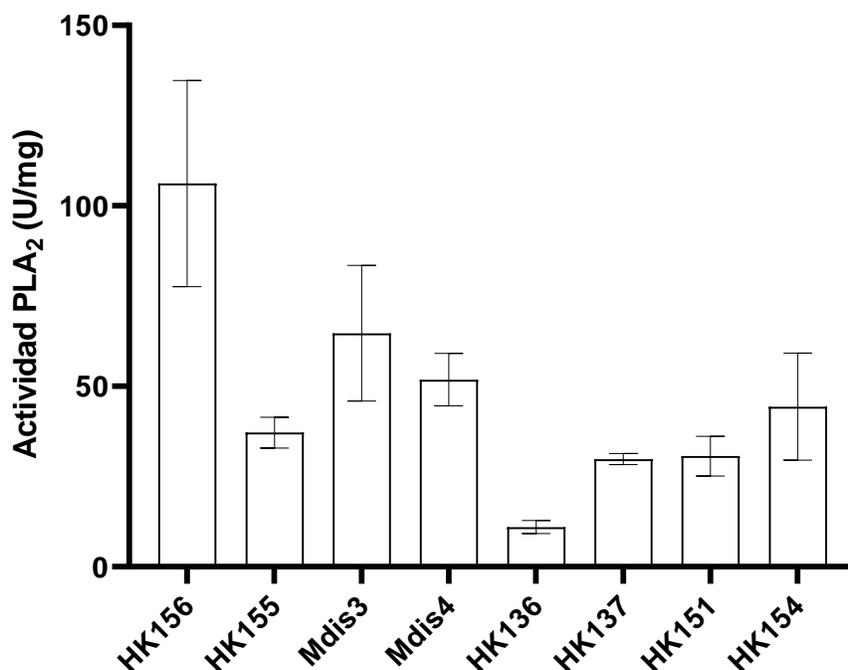


Figura 14. Ensayo titulométrico de actividad fosfolipasa en venenos completos. U/mg: Unidades de actividad enzimática por miligramo.

En estos ensayos pudimos observar (Tabla 4, Figura 14) que existe variación individual en la actividad fosfolipasa de los diferentes ejemplares. Los individuos que cuentan con actividades similares pueden dividirse en 2 grupos: HK156, Mdis3, Mdis4 y HK154; y por otro lado HK155, HK137 y H151, siendo HK136 la muestra con menor actividad.

VI.4 VARIACIÓN INDIVIDUAL DE VENENOS COMPLETOS Y MEZCLA EN HPLC.

Se realizaron pruebas de HPLC de fase reversa a los venenos seleccionados para formar parte de la mezcla. Estos corresponden a las muestras HK156, HK155 y Mdis3, debido a que en los resultados anteriores se pueden observar similitudes en sus componentes y a que eran los ejemplares cuyo veneno se encontraba en mayores cantidades y mejores condiciones físicas. También se analizó el veneno del individuo Mdis4, proveniente de Coahuayana, Michoacán, con el fin de obtener información preliminar sobre el veneno de un individuo de otra localidad.

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 15 a 18:

a. Individuo HK156.

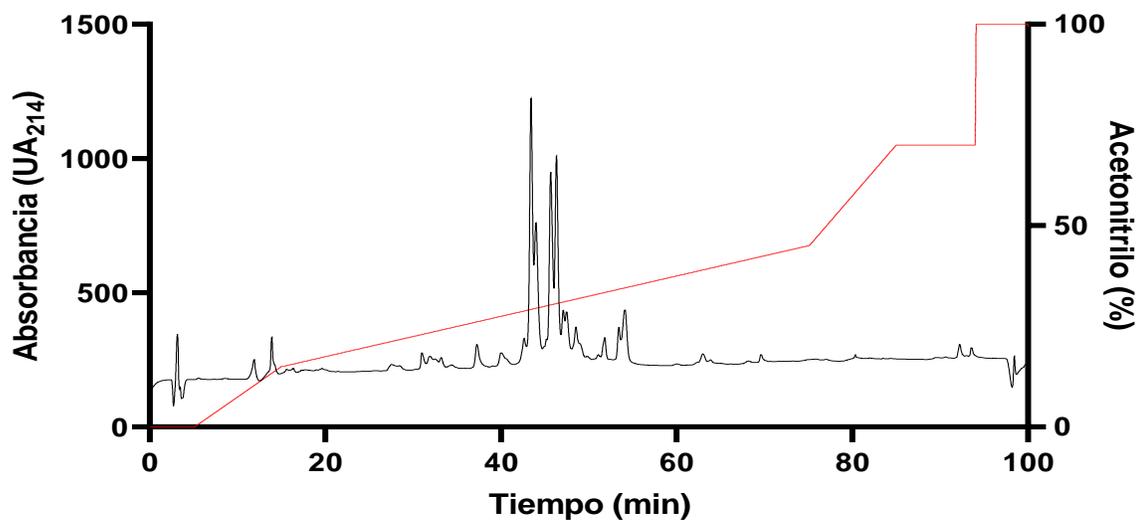


Figura 15. Cromatograma a 214 nm, individuo HK156. RP-HPLC columna C-18. 250 µg de veneno.

b. Individuo HK155.

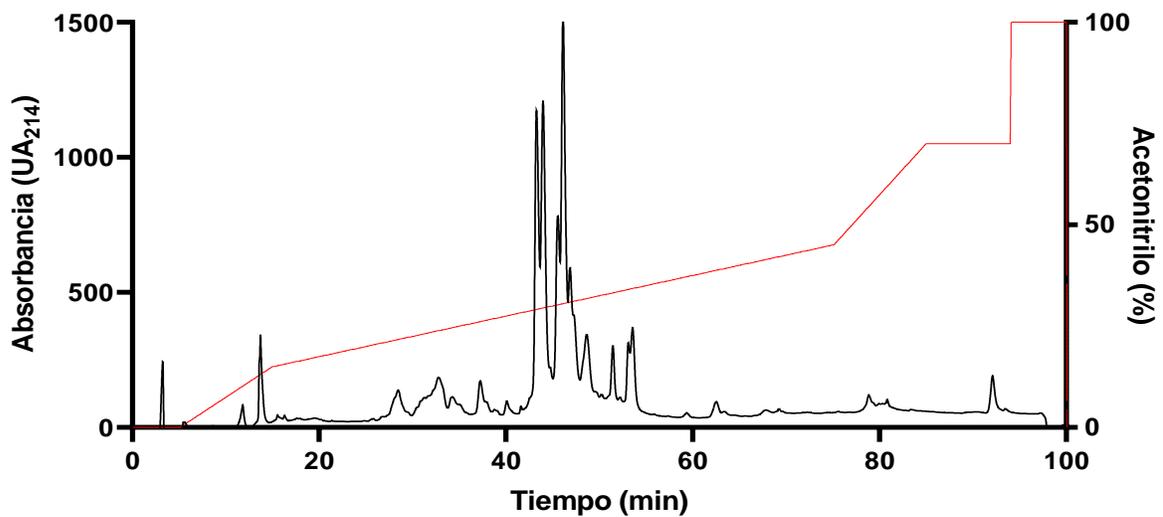


Figura 16. Cromatograma a 214 nm, Individuo HK155. RP-HPLC, columna C-18. 250 µg de veneno.

c. Individuo Mdis3.

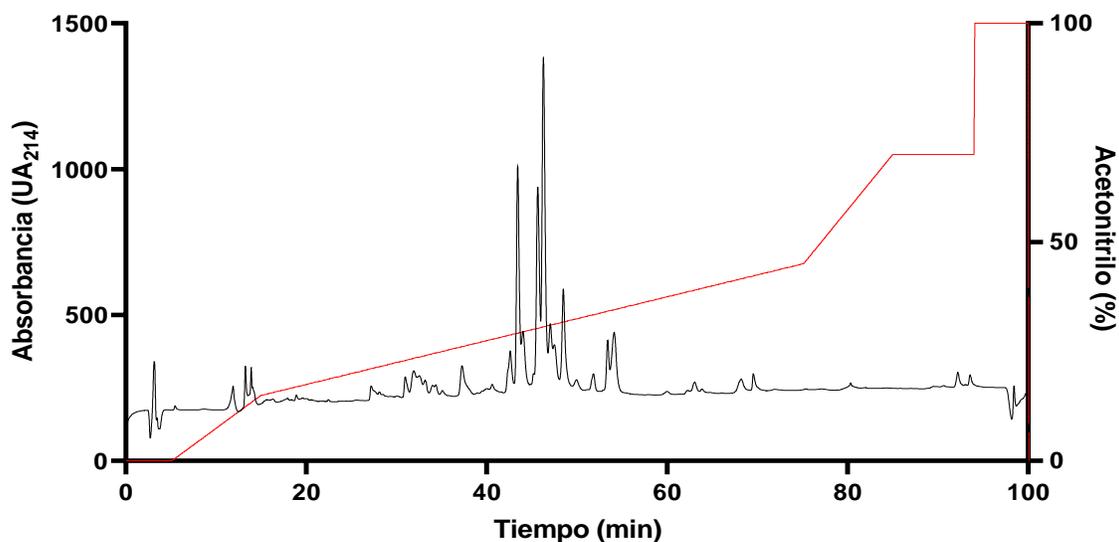


Figura 17. Cromatograma a 214 nm, individuo Mdis3. RP-HPLC, columna C-18. 250 µg de veneno.

d. Individuo Mdis4.

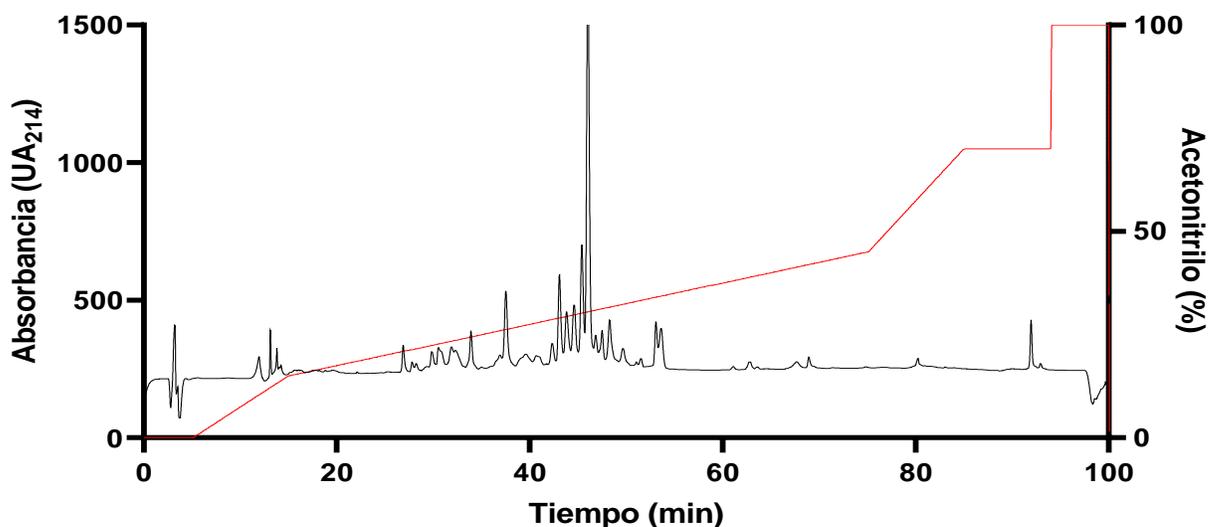


Figura 18. Cromatograma a 214 nm, individuo Mdis4. RP-HPLC, columna C-18. 250 µg de veneno.

VI.5 GENERACIÓN DE LA MEZCLA DE VENENOS

Una vez obtenidos los perfiles cromatográficos de los venenos individuales seleccionados (HK156, HK155 y Mdis3), se realizó una sola mezcla conformada por las 3 muestras en cantidades idénticas. Se utilizaron 4 mg de cada veneno en un volumen total de 1 ml de PBS 1X, tomando en cuenta los valores obtenidos de la cuantificación por el método del ácido bicinónico (BCA). Las muestras obtenidas fueron centrifugadas 3 minutos a 13,400 rpm para eliminar contaminantes, posteriormente, el sobrenadante fue colocado en tubos nuevos, finalmente los venenos fueron combinados, congelados a -90 °C y liofilizados

Posteriormente se realizó un HPLC de la mezcla de venenos obtenida para seleccionar las fracciones de interés.

Los perfiles de los 3 venenos seleccionados fueron sobrelapados con el software GraphPad Prism4® para observar sus diferencias, se muestra a continuación (Figuras 19 y 20):

a.

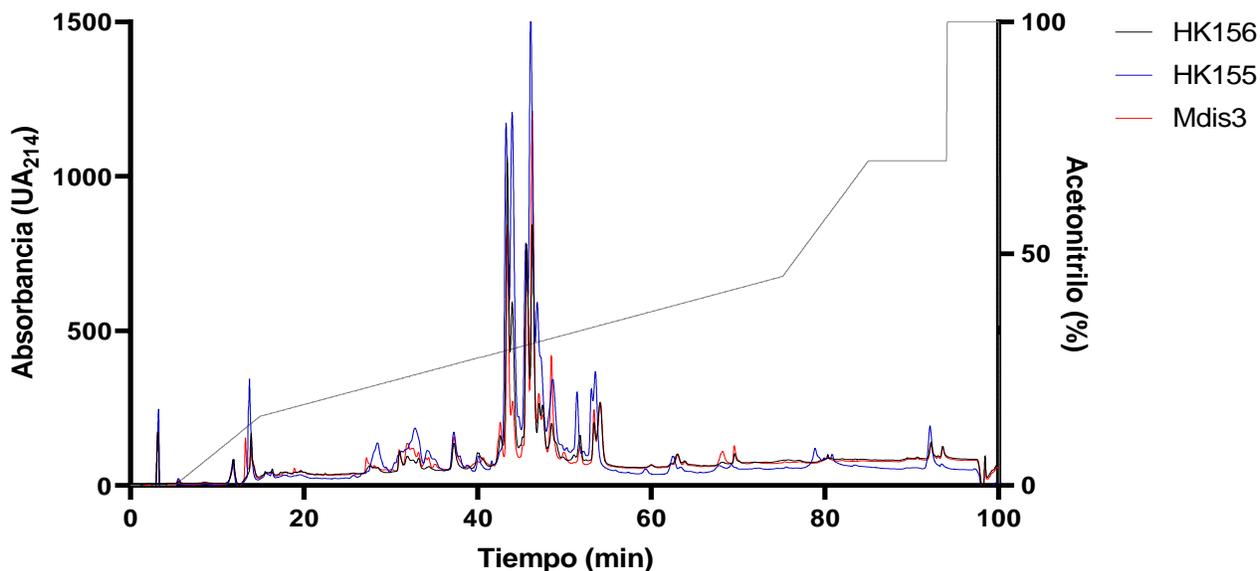


Figura 19. Comparación de perfiles de RP-HPLC de venenos individuales. Columna C18. 250 μ g de veneno por individuo. Absorbancia a 214 nm. "Mezcla de venenos".

El perfil cromatográfico obtenido para la mezcla de venenos se muestra a continuación:

b.

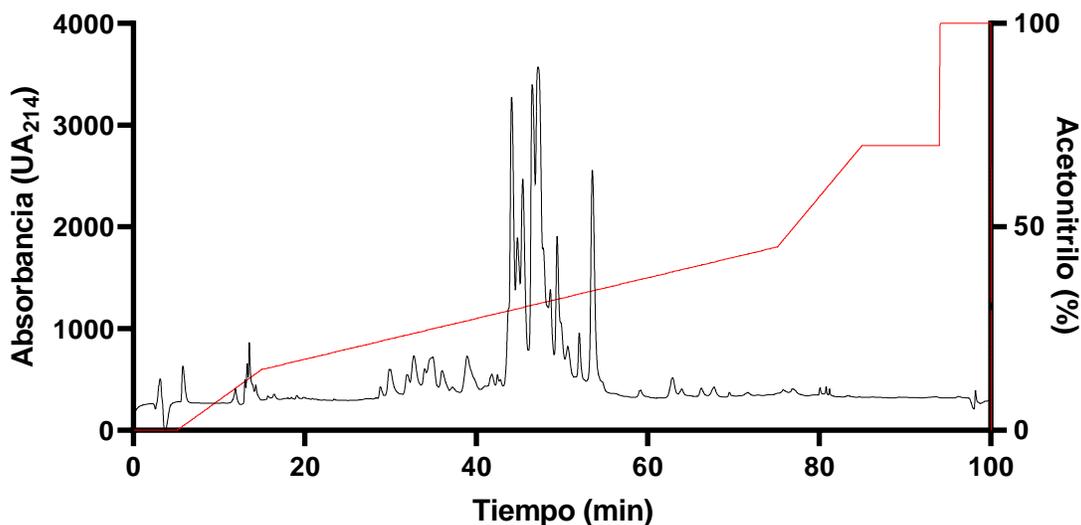


Figura 20. Cromatograma a 214 nm, mezcla de venenos. RP-HPLC, Columna C18. 1.5 mg de veneno (mezcla).

En los resultados podemos observar que todos los perfiles presentaron picos de menor abundancia entre los 10-43 min, y picos de mayor abundancia entre los 43-54 min. También pueden observarse unos picos pequeños en los tiempos 62-76.

Existen además en la abundancia de varios de los picos entre los individuos estudiados, sin embargo, no se observaron diferencias mayores entre ninguno de los perfiles.

También se pueden observar diferencias en los perfiles de los 3 individuos utilizados para la mezcla de venenos con el individuo Mdis4, el cual presenta una mayor cantidad de picos en los tiempos 43-54, esto mostrando una pequeña variación individual en el perfil del veneno, sin embargo, los perfiles de todos los venenos comparados son muy similares.

En el perfil cromatográfico de la mezcla de venenos, tal como en la Figura 18, se pueden observar los picos conservados de los venenos de los diferentes individuos, el perfil es muy parecido al propuesto por medio del sobrelapamiento (Figura 19).

VI.6 SELECCIÓN DE FRACCIONES DE LA MEZCLA DE VENENOS Y SDS-PAGE DE FRACCIONES.

De la mezcla de venenos se seleccionaron un total de 23 fracciones, con base en su abundancia (seleccionamos las fracciones que representaban más del 70% del total del veneno). En la figura 21 se muestra el perfil cromatográfico a 214 nm de la mezcla de venenos con las fracciones seleccionadas:

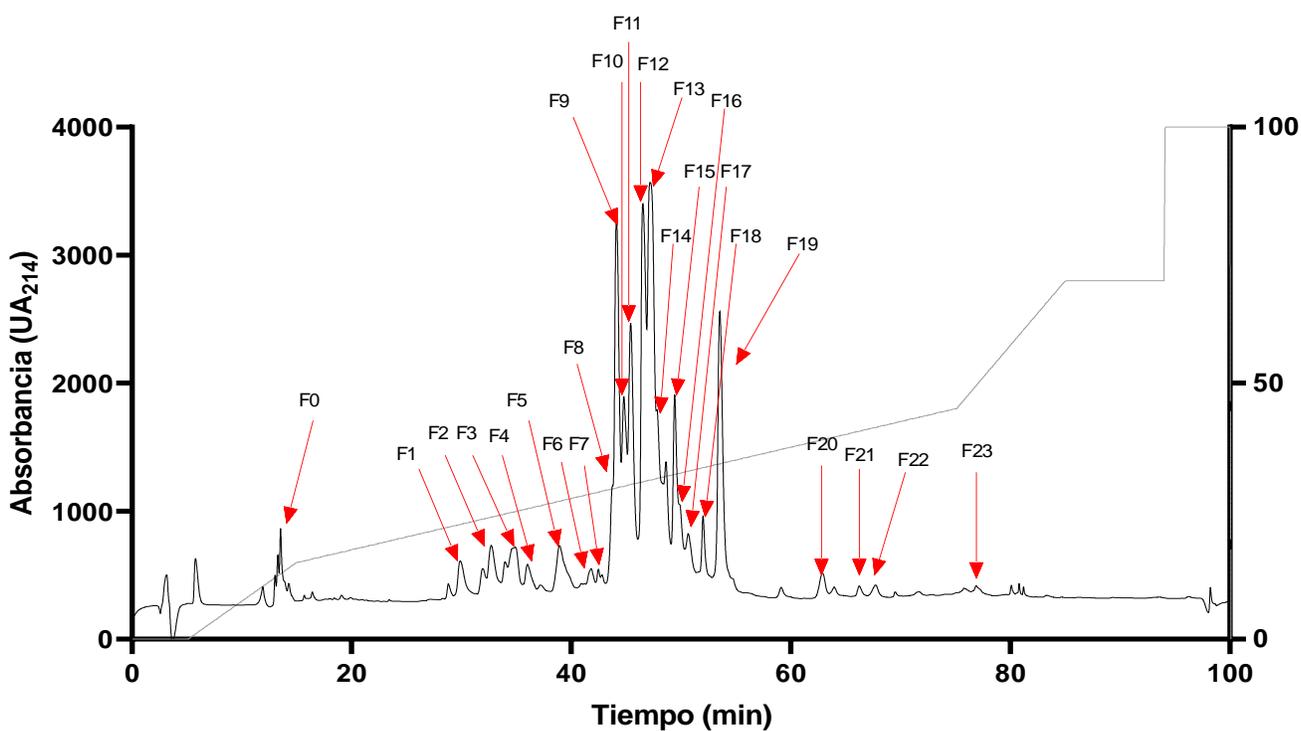


Figura 21. Cromatograma de la mezcla de venenos a 214 nm, flechas señalando fracciones seleccionadas. RT-HPLC, columna C18. 1.5 mg de muestra.

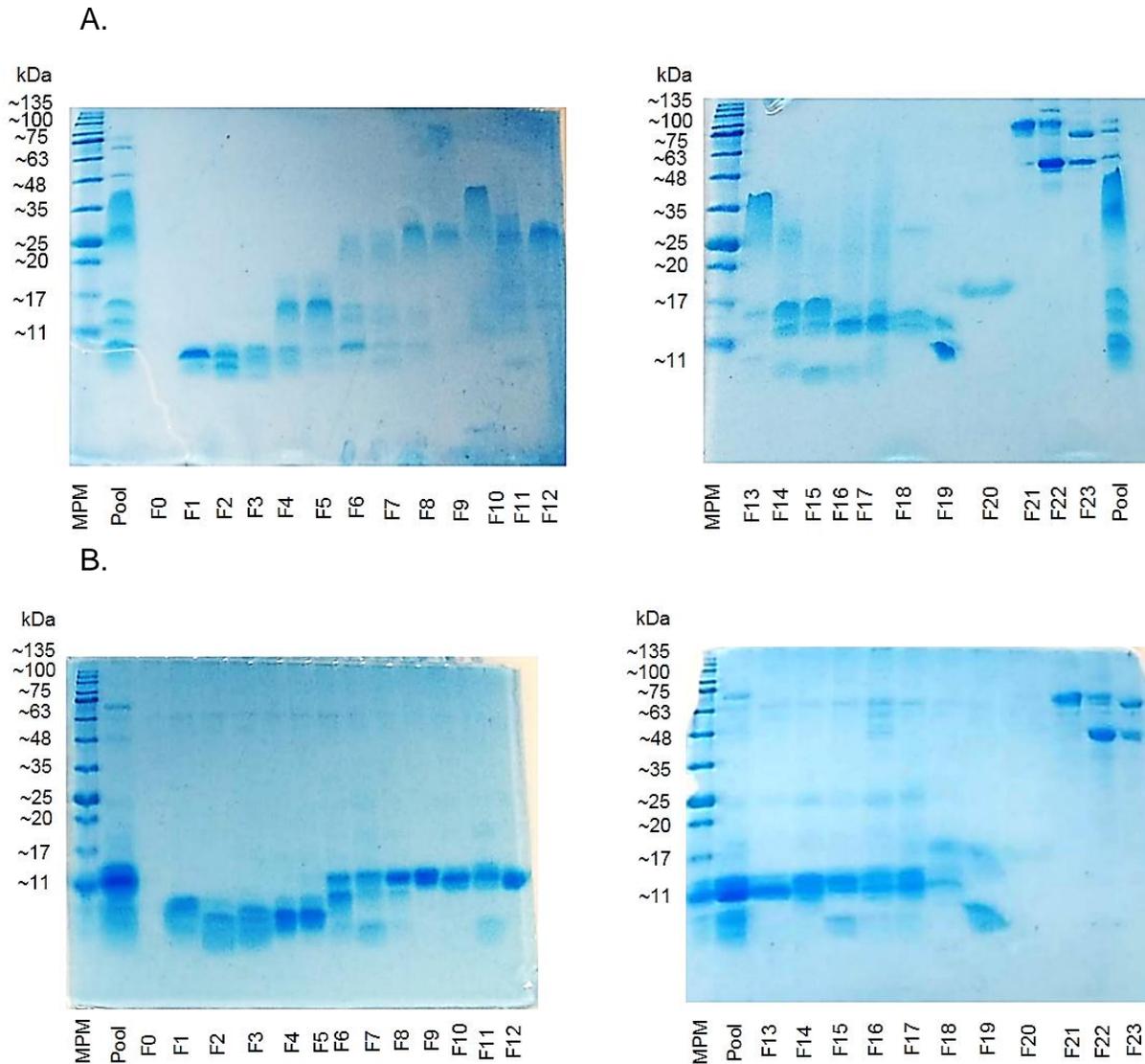


Figura 22. Geles SDS-PAGE 15%. **A:** Geles en condiciones reductoras; **B:** Geles en condiciones no reductoras. Mezcla de venenos como control positivo, 15 μ g; Fracciones 3 μ g por carril. **MPM:** marcador de peso molecular. **kDa:** kiloDaltones

Se puede observar que las primeras fracciones son abundantes en bandas de bajo peso molecular (5-10 kDa), las fracciones del medio tanto en bandas de 7-10 kDa, como en bandas de 11-15 kDa, en diferentes proporciones, y las últimas fracciones mostrando solo bandas de alto peso molecular (75-135 kDa). Se puede observar que la fracción 0 muestra casi ausencia de bandas, por lo que consideramos que es de contenido no proteico, también se puede observar que la fracción 20 cuenta solo con una banda tenue de aproximadamente 17 kDa.

Existen diferencias que se pueden apreciar a simple vista entre los geles en condiciones reductoras y no reductoras. Las fracciones 4 y 5 muestran bandas marcadas de aproximadamente 15 kDa en el gel reductor, mientras que en el no reductor no se observan dichas bandas. También en muchos casos, las bandas que se ven a 14 kDa, en los geles reductores tienen pesos moleculares aparentes más grandes que en los geles no reductores.

VI.7 ACTIVIDAD FOSFOLIPASA DE FRACCIONES EN PLACAS DE AGAROSA – YEMA DE HUEVO AL 10%.

Posterior a los geles, se realizaron ensayos para determinar la presencia de actividad fosfolipasa en las fracciones de interés. Debido a la gran cantidad de fracciones obtenidas se optó por realizar un ensayo en placas de agarosa – yema de huevo 10%, en vez del ensayo titulométrico. Los resultados obtenidos en forma de halos dentro de las placas fueron procesados con el software ImageJ® para determinar el área de los halos formados en aquellas fracciones con actividad (expresados en cm²). Estos datos fueron promediados en las 3 repeticiones de cada fracción, exceptuando las fracciones que no mostraron actividad desde el principio, en las que sólo se realizó una repetición (Figura 23).

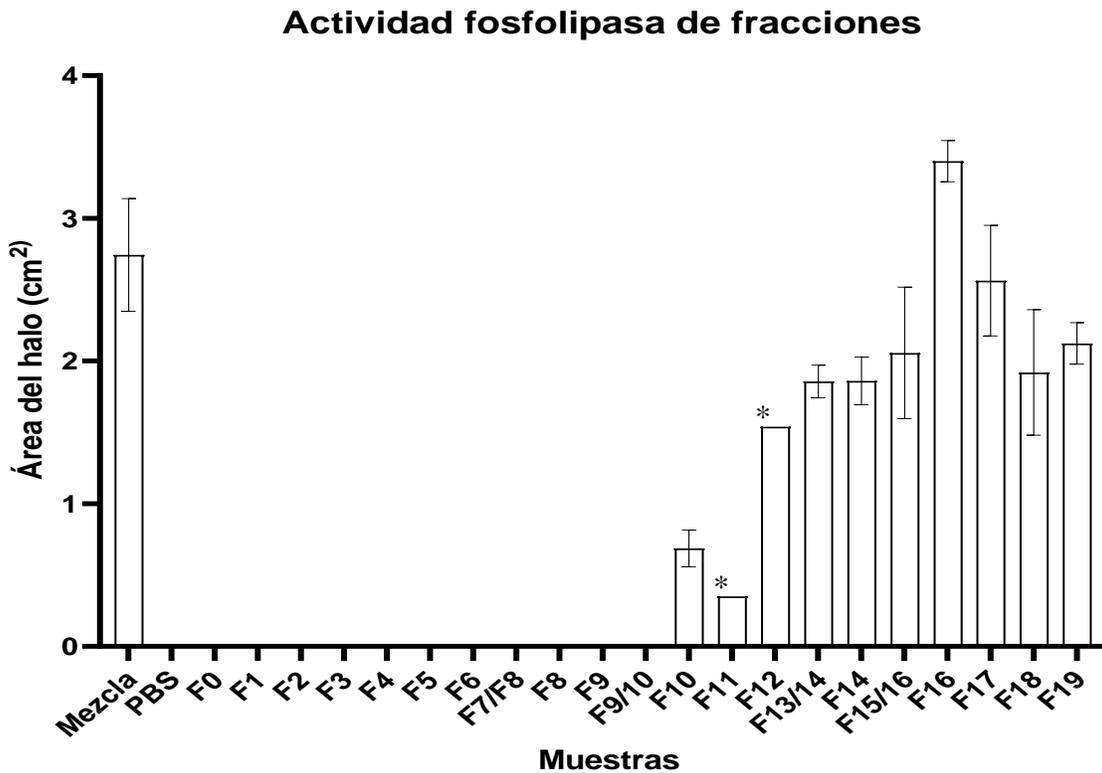


Figura 23. Gráfica de actividad fosfolipasa de fracciones en placas de agarosa. (* Fracciones con menos de 3 repeticiones).

En la Figura 23, podemos observar una variación importante entre la actividad fosfolipasa de las fracciones, siendo las primeras fracciones (0-9) las que no presentaron actividad y la F16 la de mayor actividad.

VI.8 ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE.

Se realizaron ensayos de actividad anticoagulante a los venenos individuales y a las fracciones de interés, los resultados se muestran en la figura 24 y 25:

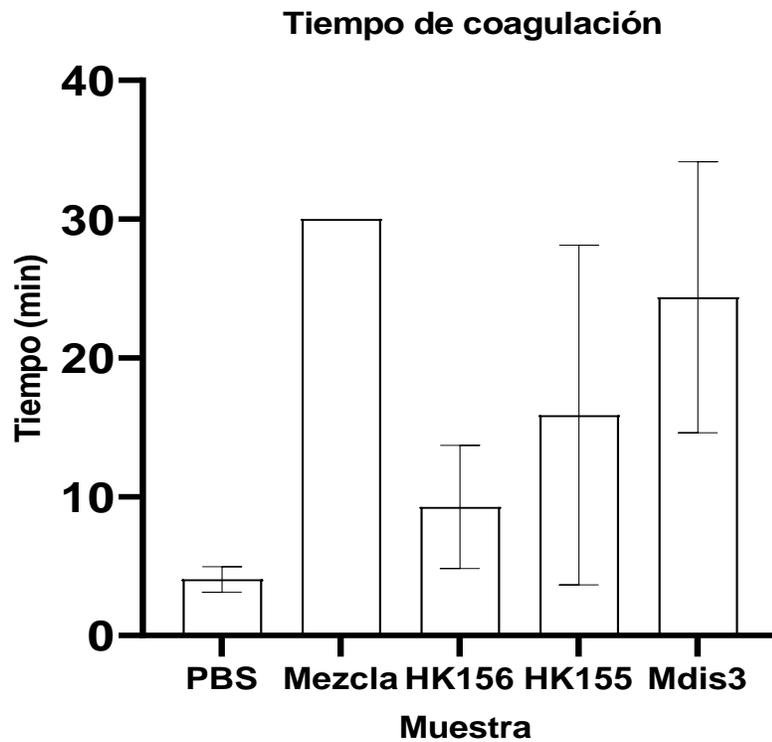


Figura 24. Tiempo de coagulación de venenos individuales. 15 μ g de veneno. Mezcla de venenos como control comparativo, PBS como control negativo. Barras de error muestran desviación estándar de 3 repeticiones. Máximo tiempo de observación: 35 minutos.

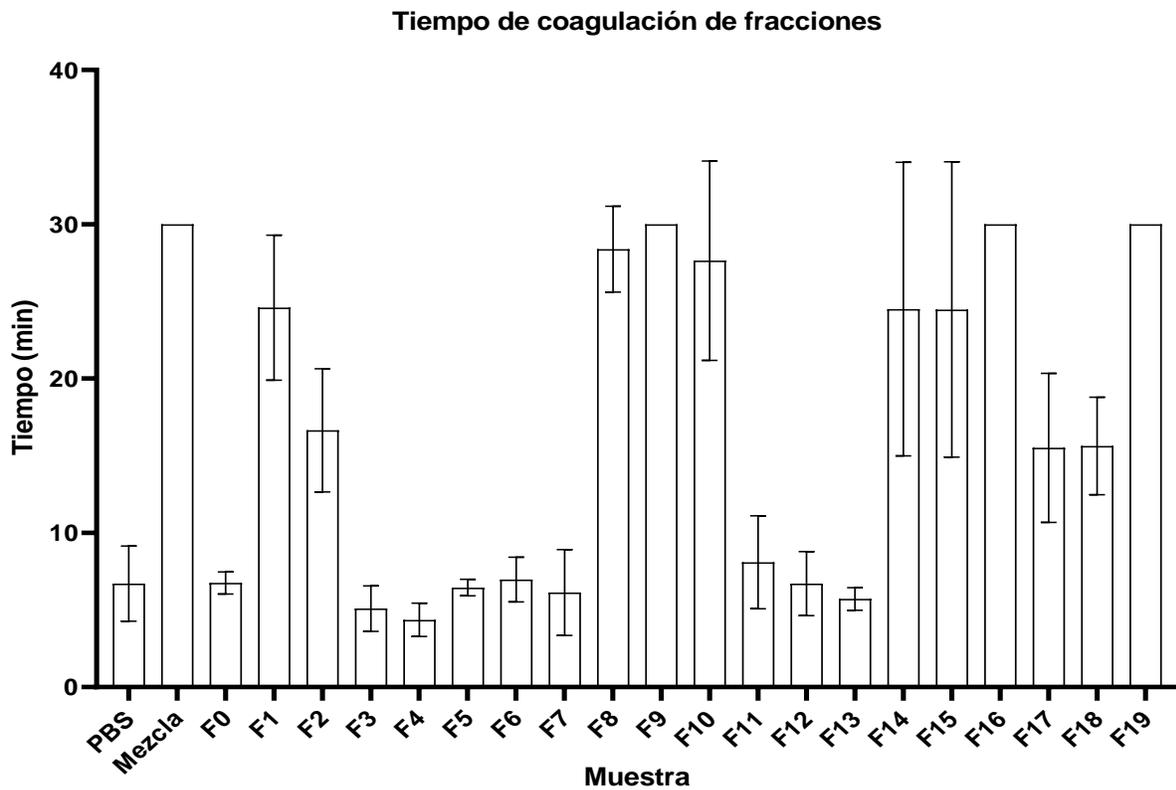


Figura 25. Tiempo de coagulación de fracciones. 15 μ g por fracción. Las barras de error representan desviación estándar de 3 repeticiones. Máximo tiempo de observación: 35 minutos.

VI.9 ACTIVIDAD PROTEASA.

En el ensayo de actividad proteasa los resultados obtenidos mostraron ausencia de actividad en el veneno completo de los individuos HK156, HK155 y Mdis3 así como de la mezcla de venenos, utilizando una dosis máxima de la mezcla de venenos de 50 µg y realizando el ensayo por triplicado.

VI.10 DL₅₀ DE LA MEZCLA DE VENENOS Y LETALIDAD DE FRACCIONES.

Para determinar la dosis letal media (DL₅₀) de la mezcla de venenos se tomaron diferentes cantidades (100, 60, 50, 40, 35 y 25 µg/ratón) y fueron inoculados en grupos de 3 ratones CD1 (18-22 g). Analizando los datos en GraphPad Prism® nos dio un valor de 38.5 µg/ratón (véase tabla 8 y gráfica en anexo de figuras).

Posteriormente se probaron las fracciones de mayor abundancia para determinar su letalidad en ratones, éstas fueron probadas en distintas cantidades dependiendo de la disponibilidad de la muestra. Las fracciones que no mostraron letalidad desde un principio (Dosis máxima: 100 µg/ratón) fueron descartadas y se tomaron en cuenta solo aquellas que mostraron actividad, estas se dosificaron para determinar la dosis letal de la fracción.

Como complemento para el estudio, a las fracciones de interés se les realizó una determinación de masas por medio de Espectrometría de masas con Ionización por Electro spray (ESI-MS), utilizando 2 µg de cada una de las fracciones.

En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 9. Masa y letalidad de fracciones en orden de abundancia.
NL: no letal, (dosis máxima inyectada).

Muestra	Masa 1 (Da)	Masa 2 (Da)	Masa 3 (Da)	Letalidad (µg/ratón)
F0	ND	ND	ND	N/L (20)
F8	6,561	7,294.70	13,872.60	N/L (20)
F9	6,561.80	13,873	ND	N/L (20)
F9/F10	ND	ND	ND	N/L (20)
F10	ND	13,446.4	ND	N/L (20)
F11	6,552.8	13,362.7	13,364.3	N/L (20)
F12	8,210.1	13,347.3	13,362.7	N/L (20)
F13	6,797	13,345.9	13,348.1	20-40
F14	7,632.7	13,347.3	13,400	<20
F15	7,243.3	7,652.7	7,551	20-40
F15/F16	ND	ND	ND	N/L (20)
F16	ND	13,388.4	ND	<20
F17	ND	ND	ND	N/L (20)
F18	7,569.8	7,960	ND	N/L (20)
F19	7,568.4	ND	ND	N/L (20)

Como puede observarse en la tabla 9, las fracciones que mostraron letalidad desde 20 µg fueron la F14 y F16, a partir de 40 µg surgieron las fracciones letales F13 y F15, en

conjunto tenemos 4 fracciones letales. Por otra parte, para la letalidad de la mezcla de venenos, podemos concluir que la DL_{50} en ratones se encuentra alrededor de 30-40 $\mu\text{g}/\text{ratón}$, podemos suponer que el 33.3% reportado para 50 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ podría haber tenido un error durante la inyección (Tabla 8 A, anexo de figuras).

VI.11 RESUMEN DE RESULTADOS

En la tabla 11 se pueden observar los resultados generales obtenidos por medio de las técnicas desarrolladas en este estudio.

Tabla 11. Resumen de resultados.

Micrurus distans												
Muestra	Concentración (280 nm)	Volumen (µl)	Masas 1 (Da)	Masas 2 (Da)	Masas 3 (Da)	Fraciones (%)	Actividad PLA ₂ (U/mg)	Act. Pro/anticoagulante (min)	Act. Proteasa	Letalidad (µg/ratón)		
Pool	4.80	2800.00	ND	ND	ND	100.00	2.75	30.00	S/A	20-40		
F0	1.34	160.00	ND	ND	ND	14.85	0.00	6.75	S/A	N/L (40)		
F1	0.50	60.00	6365.00	6794.60	ND	1.93	0.00	24.60	ND	ND		
F2	0.98	40.00	6693.96	0.00	ND	1.94	0.00	16.65	ND	ND		
F3	1.36	20.00	7313.98	7096.80	ND	2.21	0.00	5.09	ND	ND		
F4	1.26	25.00	6410.58	ND	ND	1.80	0.00	4.36	ND	ND		
F5	0.49	40.00	7151.64	7153.50	16896.00	1.61	0.00	6.45	ND	ND		
F6	0.92	40.00	7590.80	7296.70	ND	0.22	0.00	6.98	ND	ND		
F7	0.59	20.00	ND	ND	ND	0.45	0.00	10.54	ND	ND		
F8	1.18	30.00	6561.00	7294.70	13872.60	0.34	0.00	28.39	ND	ND		
F9	0.99	220.00	6561.80	13873.00	ND	5.07	0.00	30.00	ND	N/L (40)		
F10	0.83	140.00	ND	13446.40	ND	11.93	0.00	21.23	ND	N/L (40)		
F11	1.05	20.00	6552.80	13364.36	13362.68	3.73	0.00	8.09	ND	N/L (20)		
F12	1.30	170.00	8210.10	13347.30	13362.68	6.47	0.68	6.71	ND	N/L (40)		
F13	1.41	225.00	6797.00	13348.07	13345.87	14.36	0.35	13.81	ND	20-40		
F14	0.96	50.00	7632.70	13347.37	13400.00	7.38	1.54	24.51	ND	>20		
F15	0.70	170.00	7243.32	7551.00	7652.70	2.89	1.86	24.48	ND	20-40		
F16	0.71	40.00	ND	13388.48	ND	1.68	1.86	30.00	ND	>20		
F17	0.51	20.00	ND	ND	ND	0.67	2.06	15.51	ND	N/L (20)		
F18	1.29	30.00	7960.00	7569.80	ND	2.37	3.40	20.42	ND	N/L (20)		
F19	1.48	90.00	7568.40	ND	ND	6.60	2.56	30.00	ND	N/L (40)		
F20	0.60	7.00	ND	ND	ND	2.07	1.92	ND	ND	ND		
F21	0.50	20.00	ND	ND	ND	2.26	2.12	ND	ND	ND		
F22	0.52	20.00	ND	ND	ND	0.32	ND	ND	ND	ND		
F23	0.30	20.00	41000.00	ND	ND	0.36	ND	ND	ND	ND		

ND: no determinado. S/A: Sin actividad. N/L: No letal; entre paréntesis dosis máxima empleada. Da: Daltones. Fracciones (%): porcentaje de fracción en veneno total.

Con la información de la presente tesis, fue posible realizar un pre-proteoma, es decir, un análisis preliminar de los componentes presentes en el veneno de *M. distans*. Para esto se tomaron en cuenta los datos obtenidos para la determinación de masas (ESI-MS), porcentaje de fracciones por medio de la integración del área bajo la curva del perfil de RP-HPLC de la mezcla de venenos, porcentaje de bandas por medio de ImageJ®, y una secuenciación de Edman para la obtención de la secuencia N-terminal de 3 fracciones de la mezcla de venenos: una del principio del cromatograma (fracción 4), una de la parte media (F13) y una de la parte final (F20). Cabe mencionar que estas fracciones fueron seleccionadas por la cantidad de la muestra con la que se contaba, la cual era mayor al resto de las fracciones. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 12:

Tabla 12. Abundancia relativa de familias proteicas.

Fracción	Fracción (%)	PLA ₂	PLA ₂ (N/L)	Posibles 3FTx	3FTx	3FTx letales	CTLs	No ID
F0	14.77	0	0	0	0	0	0	14.77
F1	1.38	0	0	1.38	0	0	0	0
F2	1.75	0	0	1.52	0	0	0	0.22
F3	2.36	0	0	2.04	0	0	0	0.32
F4	1.68	0	0	0	1.68	0	0	0
F5	1.61	0	0	1.41	0	0	0	0.20
F6	0.22	0	0.15	0.05	0	0	0	0.02
F7	0.45	0	0.39	0.07	0	0	0	0
F8	0.34	0	0.28	0.05	0	0	0	0
F9	2.21	0	2.21	0	0	0	0	0
F10	13.05	0	13.05	0	0	0	0	0
F11	5.47	0	4.10	1.37	0	0	0	0
F12	9.46	0	9.46	0	0	0	0	0
F13	18.26	15.42	0	0	0	0	0	2.84
F14	0.78	0.67	0	0	0	0	0	0.11
F15	3.96	2.42	0	0.00	0	1.14	0	0.40
F16	0.60	0.34	0	0.00	0	0.09	0	0.17
F17	0.67	0.42	0	0.10	0	0	0	0.15
F18	2.37	0	1.39	0	0	0	0	0.98
F19	6.60	0	2.53	3.72	0	0	0	0.36
F20	1.87	0	0	0	0	0	1.87	0
F21	2.15	0	0	0	0	0	0	2.15
F22	0.43	0	0	0	0	0	0	0.43
F23	0.40	0	0	0	0	0	0	0.40
No estudiado	7.15	0	0	0	0	0	0	7.15
TOTAL	100.00	19.27	33.57	11.71	1.68	1.23	1.87	30.68

Datos obtenidos a partir de área bajo la curva de RT-HPLC y análisis de bandas reductoras en software ImageJ®. **Tabla de porcentajes (%).** **N/L:** no letal. **No ID:** no identificado. **PLA₂:** fosfolipasas de tipo A₂. **3FTx:** toxinas de la familia de 3 dedos. **CTLs:** lectinas de tipo C.

VII. DISCUSIÓN.

VII.1 VENENOS COMPLETOS Y VARIACIÓN INDIVIDUAL.

VII.1.1 Componentes de los venenos.

Micrurus distans es una especie perteneciente a la familia de coralillos americanos cuyo veneno no había sido estudiado a profundidad y resulta relevante al ser considerada una especie de importancia médica en México (Bolaños, et al., 1978). Se conocen actualmente 4 subespecies, como se había mencionado anteriormente, las cuales han sido clasificadas dependiendo de su zona de distribución dentro de la república mexicana. Podemos suponer que, tomando como base este hecho, los individuos utilizados en este estudio (Tabla 1) provenientes de Chamela, Jalisco podrían pertenecer a la subespecie *Micrurus distans oliveri* (Roze, 1967), mientras que el individuo Mdis4 perteneciente a Coahuayana, Michoacán, podría pertenecer a *Micrurus distans michoacanensis* (Kennicott, 1960), lo cual podría servir para explicar la posible variación entre los componentes de los venenos. Desafortunadamente, no se cuenta con información suficiente para realizar las identificaciones formales de estos individuos.

A pesar de que la mayoría de los individuos utilizados para el estudio provenían de la misma zona, a excepción de uno, se encontró variación individual en los componentes proteicos y sus concentraciones. Cabe mencionar que las variaciones encontradas no fueron muy grandes en cuanto a la composición del veneno, sino que, fueron variaciones puntuales.

En los geles de poliacrilamida (Figura 13) se pudieron observar, en todos los individuos, bandas marcadas entre 7-11 kDa, 11-15 kDa, 15-20 kDa, 20-25 kDa y en los individuos HK156, HK155, Mdis3, Mdis4 y HK154 bandas marcadas pertenecientes a componentes de alta masa molecular (48-75 kDa). Estas bandas conservadas, aunque en diferentes concentraciones, dan indicio de la presencia de componentes proteicos pertenecientes a moléculas de la familia de 3 dedos (3FTx), fosfolipasas A₂ y L-aminoácido oxidasas (LAAO), metaloproteasas (MP) y lectinas de tipo C (CTL) u otras moléculas de mayor tamaño. Ya que se ha reportado que la masa molecular de estas toxinas en kDa corresponde aproximadamente a: 3FTx (6-9), fosfolipasas A₂ (13-15), CTL (27-19), MP (43-60) Y LAO (85-150), (Mackessy, 2021).

Tomando en cuenta todo lo mencionado, se seleccionaron los individuos HK156, HK155 y Mdis3 para realizar el resto de los experimentos debido a que eran los venenos que estaban en mayor cantidad y mejor estado de conservación. El individuo Mdis4 se usó como comparativo debido a que se han tenido reportes de casos de variaciones importantes entre los componentes de los venenos de serpientes pertenecientes a la misma especie dependiendo de su zona de distribución geográfica (Sanz, et al., 2019); (Lomonte, et al., 2016). Es importante señalar que al tratarse de una comparación con un solo individuo, no es posible sacar conclusiones, pero los resultados sugieren que hay que desarrollar un trabajo de variación más detallado.

En los perfiles cromatográficos, se pudieron observar componentes muy similares en cuanto a absorbancia y concentración, estos mismos coincidieron en el tiempo de elución, sobre todo en los individuos HK156 y Mdis3. Por otra parte, el individuo Mdis4 que se utilizó como comparativo, marcó un perfil muy similar pero con algunos componentes más resaltados en la zona central y algunos extras al inicio y final del cromatograma, siendo ligeramente distinto en

su composición a los venenos seleccionados para realizar la mezcla de venenos. Todos los perfiles cromatográficos coincidieron con los perfiles reportados en la literatura para los individuos del género *Micrurus*, tales como *Micrurus nigrocinctus* y *Micrurus mosquitensis*, *Micrurus diastema*, *Micrurus laticollaris* y *Micrurus distans* (Lomonte, et al., 2016); (Valle, et al., 2020); (Valle, et al., 2014); (Saucedo, et al., 2013), El veneno de *M. distans* mostró una abundancia de fosfolipasas mayor a la de toxinas de tres dedos, lo cual coincide con la propuesta de Lomonte (2016) de una dicotomía entre los componentes proteicos en los venenos (3FTx y PLA₂) de *Micrurus* dependiendo de su ubicación geográfica en el continente Americano. En el caso particular de *Micrurus distans*, sin embargo, el perfil no es idéntico al reportado en el estudio de Lomonte y colegas (2016), a pesar de que los individuos del estudio también eran provenientes de Chamela, Jalisco. Aun así, se mantiene el perfil con abundancia de PLA₂ (Figura 25B), esto se podría deber a una variación individual.

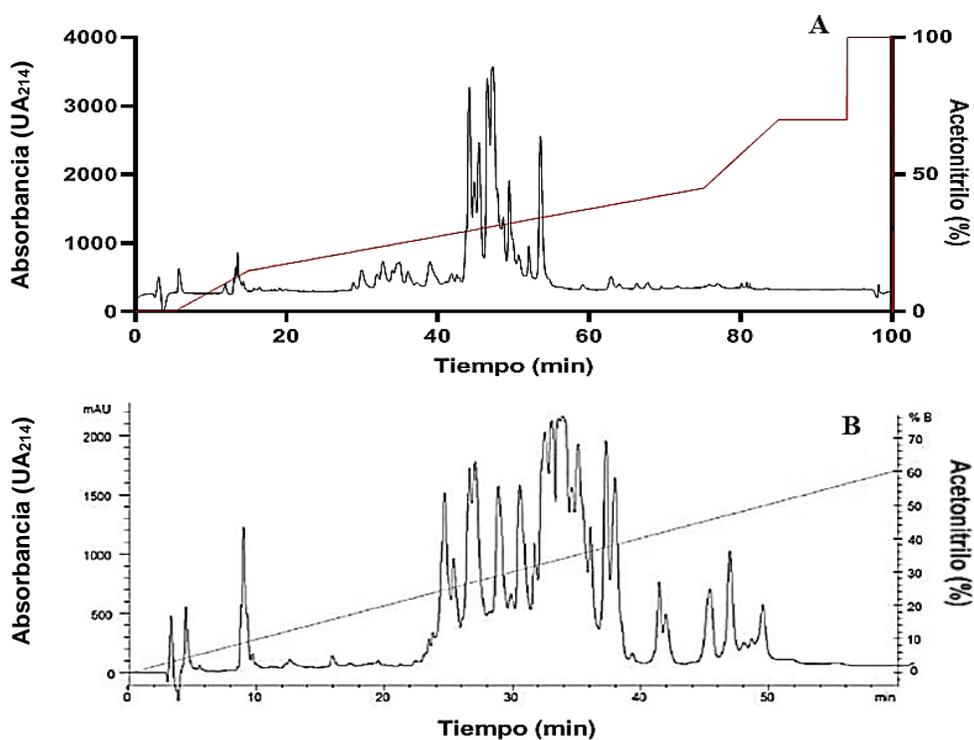


Figura 25. Comparación de perfiles cromatográficos de *Micrurus distans*. A. Cromatograma a 214 nm de mezcla de venenos, RT-HPLC, columna C18, 1.5 mg. B. Cromatograma a 214 nm de *Micrurus distans* (Lomonte et al., 2016), HPLC, columna C18, 0-60% de acetonitrilo en 60 min.

Por otra parte, en las fracciones encontradas en la mezcla de venenos, tomando en cuenta los resultados obtenidos en los geles de bisacrilamida, se realizó un estimado de los componentes proteicos que podrían estar presentes. Tal como se ha visto en otros estudios, existen componentes en el veneno que se localizan en ciertas zonas del cromatograma (a ciertos tiempos de elución), las cuales pueden variar entre los venenos y que tienen un papel importante en los efectos causantes de las diversas patologías, muchas de estas zonas corresponden a fracciones que han sido distinguidas por poseer toxinas con papeles

importantes en el envenenamiento, como MlatA1 de *Micrurus laticollaris* (Saucedo, et al., 2013), o Nigroxina de *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus* (Girón, et al., 1996). En el caso del perfil cromatográfico y de las bandas obtenidas en los geles, pudimos observar que el perfil (componentes proteicos y abundancia) es muy parecido a aquellos encontrados en otras especies de serpientes de coral, como las ya mencionadas, aunque siguen existiendo variaciones en cuanto a la proporción de estos componentes y de la ubicación exacta en el cromatograma de las fracciones determinadas como letales, a excepción de la fracción 13, que mostró un parentesco importante con una PLA₂ neurotóxica reportada en *Micrurus nigrocintus*.

También, en venenos de coralillos americanos, se han descrito venenos con abundancia de PLA₂, como *Micrurus browni* (Valle, et al., 2020), *Micrurus laticollaris* (Saucedo, et al., 2013) y *Micrurus nigrocintus* (Fernández, et al., 2011), y venenos con abundancia mayor de toxinas de tres dedos como *Micrurus altirostris* y *Micrurus corallinus* (Netto, et al., 2011). Los resultados del presente trabajo sugieren que *M. distans* pertenece al grupo de los venenos abundantes en PLA₂.

VII.1.2 Actividades biológicas de los venenos completos y su relación con los componentes.

Una vez determinados los diferentes componentes de los venenos procedimos a realizar ensayos para determinar sus actividades biológicas y la relación de éstas con los mismos componentes, sin embargo, estas actividades se evaluaron únicamente *in vitro*, por lo que los resultados podrían no mantenerse en un modelo *in vivo*.

Los venenos completos de los 8 individuos se sometieron a ensayos titulométricos de actividad fosfolipasa (véase protocolo en Anexo IX.III). En los resultados pudimos observar que las actividades reflejadas en los venenos se pueden dividir en 2 grupos tomando en cuenta la sobreposición de la desviación estándar, el primero correspondiendo a los individuos HK156, Mdis3, Mdis4 Y HK154, cuya actividad fosfolipasa fue marcada y significativa, sobre todo en el individuo HK156, cuyo veneno se sabe que cuenta con una actividad fosfolipasa elevada; mientras que el segundo grupo correspondería a los individuos HK155, HK136, HK137 Y HK151, cuya actividad fue menor, sin embargo existente. Este resultado refuerza la propuesta de Lomonte (2016) en cuanto al patrón de abundancia de fosfolipasas en los venenos de los coralillos norteamericanos.

A pesar de haber observado que esta actividad está presente en el veneno, el tipo de fosfolipasas contenidas puede variar, siendo éstas un grupo diverso, el hecho de que exista actividad fosfolipasa no confirma que la causa del envenenamiento dependa de estas mismas en cuanto a las patologías más avanzadas. Como se había mencionado anteriormente, en el caso de *Micrurus laticollaris*, por ejemplo, aunque su veneno presenta una gran abundancia de fosfolipasas, posee una α -neurotoxina de la familia de 3 dedos, que contribuye de manera importante a la letalidad total del veneno (Carbajal Saucedo et al., 2013). En el caso de *Micrurus browni*, la letalidad del veneno está dada por fosfolipasas neurotóxicas A₂ aun cuando este tanto PLA₂ como una gran diversidad de 3FTxs (Valle, et al., 2020).

A pesar de que se ha determinado que los componentes principales en los venenos del género *Micrurus* son aquellos pertenecientes a las PLA₂ y a las 3FTx, en otras caracterizaciones se han llegado a reportar componentes de diferentes familias, como se mencionaba en

resultados anteriores. Los venenos de los diferentes individuos de la especie *Micrurus distans* mostraron también una serie de bandas conservadas cuyo peso no corresponde a los pesos reportados para PLA₂ o 3FTx, siendo éstas moléculas de mayor tamaño, que pueden pertenecer a componentes como metaloproteasas (MP), L-aminooxidasas (LAO), serinoproteasas (SP), inhibidor tipo Kunitz (KUN), lectina tipo C (CTL), nucleotidasas (Nuc), proteína secretora rica en cisteína (CRISP), entre otros. Estos componentes se han reportado en venenos de otros coralillos norteamericanos como en el caso de *Micrurus fulvius* (Vergara, et al., 2014), *Micrurus tener* (Valle, et al., 2014), *Micrurus browni* (Valle, et al., 2020) y *Micrurus nigrocintus* (Fernández, et al., 2011), entre otros.

Para poder tener una idea más clara del mecanismo de acción del veneno de *Micrurus distans* y de los componentes proteicos de su veneno, específicamente en las fracciones, procedimos a realizar un ensayo de actividad fosfolipasa en placas de agarosa. En los resultados se puede observar (Tabla 5, Figura 23) que las primeras fracciones (F0-F9) no muestran actividad fosfolipasa, las fracciones 10, 11 y 12 muestran una actividad un poco mayor (alrededor de un 20%) que las primeras fracciones, sin embargo las fracciones 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19 muestran una actividad considerablemente mayor (con un incremento de más del 50% comparado con las fracciones 10 y 11); estos resultados tienen coherencia al ser comparados con los resultados obtenidos en los geles (Figura 22), precisamente por los componentes contenidos y la abundancia de fosfolipasas desde la fracción 6 en adelante.

Algunos de los venenos de serpientes de coral han llegado a reportar en ratones o *in vitro*, además de neurotoxicidad, patologías ocasionadas por posibles cardiotoxinas, hemotoxinas y miotoxinas, en algunos casos siendo bastante marcadas, como en la especie *Micrurus nigrocintus*, cuya actividad miotóxica está reportada (Suárez, et al., 2011), o en el caso de *Micrurus laticollaris*, que cuenta con actividad anticoagulante *in vitro* (Dashevsky, et al., 2021). Por estos reportes y aunque en su mayoría se sabe que este tipo de actividades biológicas no son tan representativas del género *Micrurus*, desarrollamos algunos experimentos para determinar si el veneno de la mezcla de *Micrurus distans* cuenta con alguna actividad biológica de esta índole.

En los resultados de los venenos individuales (Figura 16) pudimos observar que en los venenos completos, solo el individuo Mdis3 presentó una actividad anticoagulante de importancia, alargando los tiempos de coagulación a más de 25 minutos, mientras que los individuos HK156 y HK155 mostraron una actividad baja-moderada (Tabla 6, Figura 24).

Las fracciones 8, 9, 16 y 19 (mezcla de venenos) cuentan con una actividad anticoagulante de importancia, siendo el tiempo de coagulación mayor a 30 minutos (Control negativo 5-10 min). Esta actividad solo fue determinada *in vitro*, por lo que desconocemos actualmente si los resultados se mantendrían *in vivo*, tomando en cuenta que algunos reportes, tales como el de *Micrurus laticollaris* muestran que en algunos casos la actividad no se ve reflejada *in vivo*. Esto podría deberse a interacción con otros receptores antes de receptores en células sanguíneas (tomando en cuenta que el primer contacto podría ser con otro tipo celular en un modelo *in vivo*), o bien, falta de concentración de los componentes de importancia como para poder mostrar actividad en un organismo de mayor tamaño (Dashevsky, et al., 2021). A pesar de no tener la certeza de que la actividad anticoagulante se conserve *in vivo*, podemos concluir que el veneno de *Micrurus distans* cuenta con componentes proteicos que interfieren con la cascada de coagulación, pudiendo tener un papel de importancia en el envenenamiento,

aunque hasta ahora no se han reportado este tipo de actividades en envenenamientos por coralillo (Gutiérrez et al., 2017; Salazar et al., 2011). Es importante hacer énfasis en que las fracciones 10, 14, 15, 16, 17, 18 y 19 mostraron una actividad fosfolipasa de importancia, por lo que la actividad anticoagulante parece estar dada principalmente por fosfolipasas, aunque existen fosfolipasas que no desempeñan este tipo de actividad. Estos resultados reiteran la diversidad existente dentro de la familia de las PLA₂. También, las fracciones 1 y 2 mostraron actividad anticoagulante en menor medida y sin presentar actividad fosfolipasa. En los resultados de electroforesis (Figura 22) se pueden notar bandas debajo de los 11 kDa, por lo que podrían estar compuestas principalmente por 3FTx.

Es importante mencionar que para este ensayo se obtuvieron muestras de sangre de diferentes donantes humanos, las cuales fueron procesadas para obtener plasma sanguíneo, esta podría ser una característica causante de variaciones.

Por otra parte, realizamos un ensayo de actividad proteasa para determinar si el veneno mostraba actividad debido a las bandas encontradas que podrían pertenecer a moléculas de mayor tamaño (48-75 kDa) como serinproteasas o metaloproteasas. Este tipo de moléculas podrían estar implicadas en distintas patologías en el envenenamiento, como la inhibición de factores de la cascada de coagulación o efectos miotóxicos, entre otros (Gutiérrez, et al., 1985).

En los resultados obtenidos, se puede observar la presencia de variación independiente en la actividad anticoagulante de las fracciones, cabe mencionar que no todas las fracciones mostraron actividad, tales como las fracciones 0, 3, 4, 5, 6, 7, 11 y 12; algunas de las fracciones mostraron resultados poco concluyentes, como en las fracciones 10, 13, 14, 15, y 18, que aunque muestran presencia de actividad anticoagulante, en alguna de las repeticiones del experimento mostraron una diferencia en su actividad, esto podría ser explicado, como se mencionaba anteriormente, debido a las variaciones que pueden existir en la conformación del plasma sanguíneo de diferentes donantes o bien, a contaminación presente en la muestra.

En el caso de actividad proteasa, pudimos observar en los resultados ausencia de actividad sobre azocaseína, tanto en los venenos completos como en la mezcla de venenos, lo cual es interesante ya que a pesar de contar con moléculas que pudiesen pertenecer a estas familias, al menos *in vitro*, no parecen tener actividad enzimática detectable. Hay que tomar en cuenta que algunos de los componentes de los venenos pueden llegar a actuar en conjunto, por lo que no se puede descartar la relevancia de estas moléculas en la toxicidad o para alguna otra función, como podría ser la digestión de la presa.

VII.2 LETALIDAD DE FRACCIONES, PROPORCIÓN Y MASAS.

En los resultados obtenidos para letalidad de fracciones se pudieron observar 2 fracciones letales a baja concentración (20 µg/ratón), las cuales corresponden a las fracciones 14 y 16; y 2 fracciones letales a mayor concentración (40 µg/ratón) siendo estas la 13 y 15. Se distinguen en estos resultados que las fracciones letales se encuentran todas consecutivamente, en el perfil cromatográfico del veneno. Comparando tales fracciones con los resultados obtenidos en los geles de poliacrilamida, y en los ensayos de actividades biológicas (fosfolipasa, anticoagulante y proteasa), podemos determinar que las fracciones letales parecen estar conformadas en su mayoría por moléculas pertenecientes a PLA₂. Algunas de ellas muestran también presencia, en menor cantidad, de moléculas que podrían pertenecer a 3FTx

y también moléculas de mayor tamaño, en menor proporción. La actividad fosfolipasa se puede ver reflejada en las fracciones letales, así como también la actividad anticoagulante, a excepción de la fracción 13, cuyos resultados no fueron muy concluyentes. Cabe mencionar, que durante la determinación de letalidad de fracciones, se pudo observar en los ratones la sintomatología característica de neurotoxicidad, como pérdida de la función motriz a lo largo del tiempo, mostrando signos de parálisis flácida progresiva hasta el punto de parálisis respiratoria. De acuerdo a esto, podemos sugerir que las fracciones letales se encuentran conformadas por fosfolipasas de tipo A_2 neurotóxicas, las cuales podrían ser las causantes de esta misma letalidad.

Como complemento al análisis del veneno de *Micrurus distans*, se determinaron las secuencias amino terminal de las fracciones 4, 13 y 20, con el fin de confirmar la identidad de estos componentes (Figura 26). En los resultados obtenidos, por medio de análisis en BLAST® pudimos determinar que la fracción 4 pertenece a una toxina de la familia de 3 dedos, teniendo un alto grado de identidad con una toxina perteneciente al veneno de *Micrurus diastema*. Por otra parte, la fracción 13 mostró gran identidad con una PLA_2 neurotóxica de *Micrurus nigrocinctus* y la fracción 20 con una lectina tipo C de *Micrurus corallinus*. Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos en los geles de poliacrilamida y en los ensayos de actividades biológicas y refuerzan la teoría, de que las fracciones letales están constituidas principalmente por PLA_2 neurotóxicas. Se realizaron también ensayos de determinación de masa molecular de las fracciones (ESI-MS) donde los resultados mostraron que la fracción 13, que es una de las fracciones de mayor abundancia en el veneno (15%), al igual que la fracción 14 (8%) tienen masas moleculares consistentes con PLA_2 y 3FTx (Tabla 13), lo cual complementa la información relacionada a la importante actividad de las fosfolipasas A_2 en el veneno de *Micrurus distans* y muestra que podría existir una correlación entre la actividad de ambos tipos de moléculas en la letalidad del veneno.

Finalmente, tomando toda la información que se ha discutido anteriormente, se realizó un pre-proteoma del veneno de *Micrurus distans* (Figura 27). Estos resultados concluyen que el veneno de *Micrurus distans* es abundante en fosfolipasas de tipo A_2 , consistente con la dicotomía propuesta en el artículo de Lomonte (2012). Además podemos concluir que la letalidad del veneno se lleva a cabo por acción de fosfolipasas neurotóxicas, esto a partir de a las masas y actividades biológicas encontradas como se muestra en la tabla 13.

A

MdisF4	-----LKCYKGGTRKRSVTEPKGEKVCYTIIFLVGP-----	30
3FTx_D.J_M.diastema_AKN63197.1	MKTLILLIIVVVTIVCLDLGYTRKCYKGGTRKRSVICPKGEKVCYTIIFLVGPSYPEKVLKW	60

MdisF4	-----	30
3FTx_D.J_M.diastema_AKN63197.1	GCAASCPKVLGARISCCSRDKCNSHR	87

Per. Ident: 96.55%, E value: 1e-23

B

MdisF13	NLIDFKNMIKCTNIRHWSLFANYGCYCGY-	29
PLA2_Mnigrocinctus_AAB36279.1 *	NLIDFKNMIKCTNIRHWSFTNYGCYCGGY	30
	*****,*;*****	

Per. Ident: 92.86%, E value: 8e-29

C

MdisF20	-----WICPIDYLSRNLGYKLFDDAKCPDAEMF-----	30
M.corallinus_CTL_sp C6JUN9.1	MGHFTFISLCLMPIFLSLGAECYTCPIDWLSRNLGYKLFDDTKTWPDAEIFCRKHKPG	60
	:****;*****;*:****;*	
MdisF20	-----	30
M.corallinus_CTL_sp C6JUN9.1	CHLTSIHSEAESADLAELYDYLYKSEKQVWIGLNDPQKERINEWIDRSSTNYISWNEGEP	120
MdisF20	-----	30
M.corallinus_CTL_sp C6JUN9.1	NNSWNKEYCVHLLASQGYLKWNDTPCESLFAFICRCQF	158

Per. Ident: 82.76%, E value: 7e-19

Figura 26. Secuencias N-terminal de fracciones 4, 13 y 20 comparadas con su respectiva secuencia de mayor similitud. Analizado con BLAST y Clustal®. **A.** Fracción 4, alineada con toxina de la familia de 3 dedos D. J. de *Micurus diastema*. **B.** Fracción 13 alineada con fosfolipasa neurotóxica de *Micurus nigrocinctus* (*muestra solo primera parte de la secuencia AAB36279.1). **C.** Fracción 20, alineada con lectina tipo C de *Micurus corallinus*.

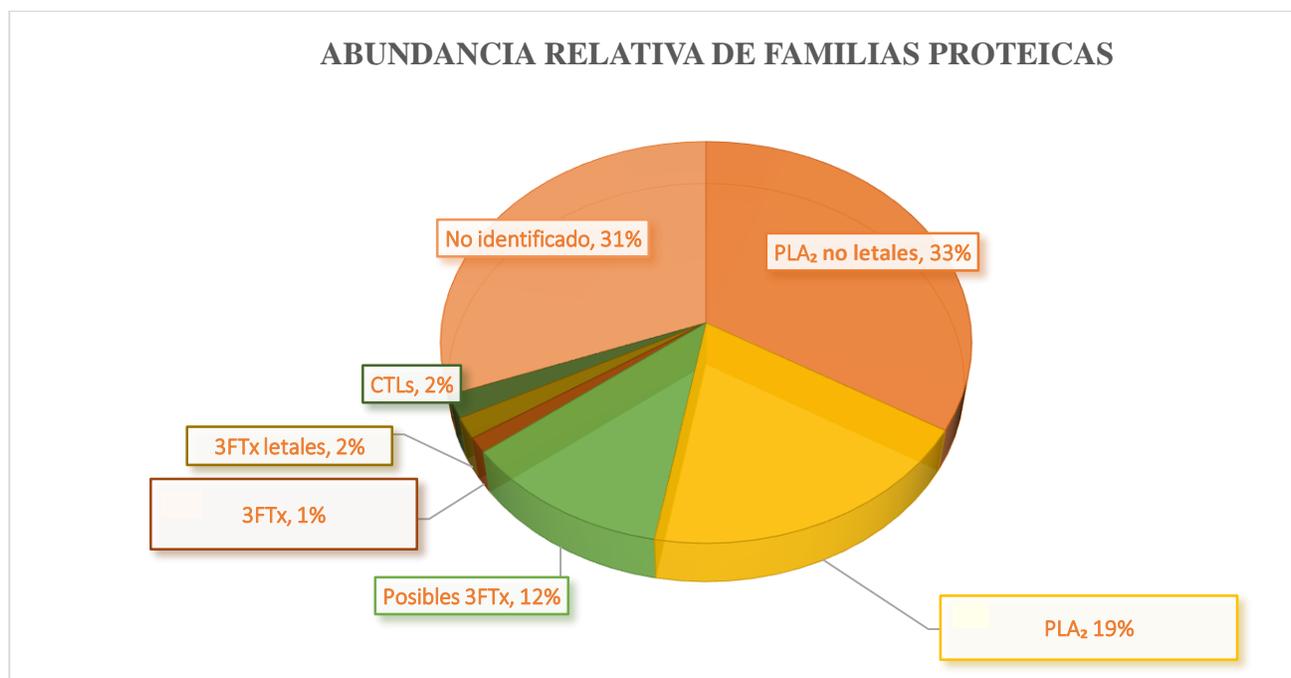


Figura 27. Gráfica de pastel, abundancia relativa de familias proteicas en la mezcla de venenos del veneno de *Micurus distans*. Porcentaje determinado por área bajo la curva de RT-HPLC y determinación de masas (ESI-MS) determinación de porcentaje de familia bandas de SDS-PAGE con ImageJ®.

Finalmente, tomando en cuenta todos los resultados obtenidos se desarrolló un gráfico de pastel donde se pueden observar que los porcentajes de las familias proteicas encontradas en el veneno de *Micrurus distans* corresponden a: Fosfolipasas de tipo A₂ (PLA₂) no letales (33.57%), PLA₂ posiblemente letales (19.27%), Posibles componentes de la familia de las toxinas de 3 dedos (3FTx, 11.71%), 3FTx posiblemente letales (1.23%), 3FTx (1.68%), lectinas de tipo C (1.87%) y contenido no identificado (30.68%), (Figura 27). Estos datos fueron recabados tomando en cuenta las secuencias encontradas, las cuales en el caso de F4 confirmaron la presencia de una toxina de la familia de 3 dedos, en el de F13 la presencia de una fosfolipasa neurotóxica que tiene un papel en la letalidad del veneno y en F20 la presencia de una lectina de tipo C.

A pesar de haber determinado que el veneno está constituido principalmente por fosfolipasas de tipo A₂, se debe considerar la posibilidad de contar con otras toxinas involucradas en la letalidad del veneno o en las patologías que éste pueda llegar a ocasionar. Sin embargo, tomando en cuenta estos aspectos y el hecho de que el antiveneno mexicano Coralmyn® está desarrollado con base en el veneno de *Micrurus nigrocintus*, cuyo veneno está constituido principalmente por fosfolipasas de tipo A₂, es muy posible que el antiveneno Coralmyn® sea capaz de neutralizar los efectos producidos por el envenenamiento de *Micrurus distans*.

VIII. CONCLUSIONES.

- Existen variaciones puntuales entre los venenos de los diferentes individuos cuyo veneno fue analizado en este estudio.
- La mezcla de venenos cuenta con 23 fracciones de interés las cuales muestran presencia de moléculas de la familia de las fosfolipasas de tipo A₂, toxinas de 3 dedos (3FTx), lectinas tipo C y moléculas de alto peso molecular.
- Se identificaron 4 fracciones letales que representan el 23.6% del veneno total.
- No se encontró presencia de actividad proteasa sobre azocaseína.
- Algunas de las fracciones mostraron actividad anticoagulante *in vitro*.
- El veneno de *Micrurus distans* presenta un perfil abundante en fosfolipasas de tipo A₂, las cuales aparentemente son las principales responsables de la letalidad.

VIX. PERSPECTIVAS.

- Realización de proteoma final de *Micrurus distans*.
- Caracterización de componentes con actividad tóxica en el veneno de *Micrurus distans*.
- Ensayos electrofisiológicos para determinar la actividad de las 3FTx's identificadas
- Análisis de la capacidad neutralizante de los antivenenos contra el veneno de *M. distans*.

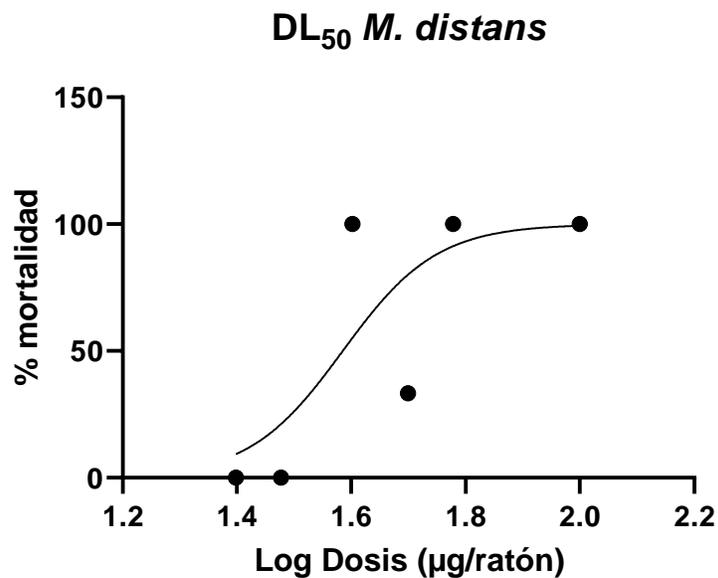
X. ANEXO DE FIGURAS:

Tabla 8. A. Determinación de DL₅₀ de mezcla de venenos (3 ratones por grupo).

DL ₅₀ Mezcla de venenos	
Dosis (µg/ratón)	Muertes (%)
100	100
60	100
50	33.3
40	100
30	0
25	0

Tabla 8. B. Tabla de datos, regresión no lineal.

Log de dosis contra respuesta (pendiente variable)	
LogEC50	1.58
Pendiente	5.29
EC50	38.46
Intervalo de confianza 95% (IC)	
LogEC50	???
Pendiente	-0.296 a ???
EC50	???



Dosis letal media (DL₅₀), mezcla de venenos de la especie *Micrurus distans*.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Bauchot, R., Bon, C., & David, P. (2005). *Serpents*. Arthemis. Recuperado el 2020
- Bautista, A. R., Elizalde, R. C., Salinas, U. H., Islas, C. B., & Wilson, L. D. (2019). An updated checklist of the herpetofauna of Querétaro, Mexico: species richness. *Zootaxa*, 4638(2), 273-290. Recuperado el 2020
- Bolaños, R., Cerdas, L., & Abalos, J. W. (1978). Venoms of coral snakes (*Micrurus* spp): report on a multivalent antivenin for the Americas. *Bulletin of the Pan American Health Organization (PAHO)*. Recuperado el 2021
- Brazil, O. V., & Fontana, D. (1987). Coral snake venoms mode of actions and pathophysiology of experimental envenomations. *Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 29, 119-126. Recuperado el 2021
- Caccin, p., Rigoni, M., Bisceglie, A., Rossetto, O., & Montecucco, C. (2006). Parálisis neuromuscular esquelética reversible inducida por diferentes lisofosfolípidos. *FEBS Letters*, 580(27), 6317-6321. doi:10.1016
- Castro, E. E., Valle, M. B., Alagón, A., Gil, G., León, J. L., & Borja, M. (2020). SERPIENTES VENENOSAS EN MÉXICO: UNA REVISIÓN AL ESTUDIO DE LOS VENENOS, LOS ANTIVENENOS Y LA EPIDEMIOLOGÍA. *Revista Latinoamericana de Herpetología*, 3(2), 5-22. Recuperado el 2021
- CENETEC. (2020). *Guías de práctica clínica*. Ciudad de México: CENETEC. Recuperado el 2020
- Chippaux, J. P. (2017). Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(6). Recuperado el 2020
- CONABIO. (2021). *Fauna Mexicana*. República Mexicana: CONABIO. Recuperado el 2020
- Corbett, B., & Clark, R. F. (May de 2017). North American Snake Envenomation. *Emergency medicine clinics of North America*, 35(2), 339-354. Recuperado el 2021
- Costa, L. G., & Giordano, G. (2003). Snake Venoms. *Elsevier*, 4, 315-316. Recuperado el 2021
- Costa, L. G., & Giordano, G. (2014). Snake Venoms. *Elsevier*, 315-316.
- Dart, R. C., O'Brien, P. C., García, R. A., Jarchow, J. C., & McNally, J. (1992). Neutralization of *Micrurus distans distans* venom by antivenin (*Micrurus fulvius*). *Journal of Wilderness Medicine*, 3(4), 377-381. Recuperado el 2020
- Dashevsky, D., Valle, M. B., Castro, E. N., Youngman, N., Zdenek, N. C., Alagón, A., & Fry, B. G. (2021). Anticoagulant *Micrurus* venoms: Targets and neutralization. *Toxicology Letters*, 337, 91-97. Recuperado el 2021
- Federal, C. d. (2016). *Diagnóstico y tratamiento de las mordeduras de serpientes venenosas*. Gobierno Federal de los Estados Unidos Mexicanos. Recuperado el 2021
- Fei, Q., Kent, D., Smith, W. M., & Lambros, M. (2018). Molecular Mechanism of Resveratrol's Lipid Membrane Protection. *Sci Rep*, 1587. Recuperado el 2020
- Fernández, J., Girón, A. A., Angulo, Y., Sanz, L., Gutiérrez, J. M., Calvete, J. J., & Lomonte, B. (2011). Venomic and antivenomic analyses of the Central American coral snake, *Micrurus nigrocinctus* (Elapidae). *Journal of proteome research*, 10(4), 1816-1827. Recuperado el 2020
- García, G. A., & Cardona, A. G. (2009). Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A2 and their receptors and binding proteins. *Repertorio de Medicina y Cirugía*, 18(4), 199-2009. Recuperado el 2020
- García, L., & Velasco, B. G. (2020). *Producción de antivenenos*. Ciudad de México: Ciencia UNAM-DGDC. Recuperado el 2021

- Girón, A. A., Persson, B. A., Cederlund, E., Díaz, M. F., Gutiérrez, J. M., Thelestam, M., & Jornvall, H. (1999). Elapid venom toxins: multiple recruitments of ancient scaffolds. *European Journal of Biochemistry*, 259(1-2), 225-234.
- Girón, A. A., Stiles, B., Schmidt, J., Cortés, M. G., Thelestam, M., Jornvall, H., & Bergman, T. (1996). Characterization of multiple nicotinic acetylcholine receptor-binding. *FEBS Letters*, 380, 29-32. Recuperado el 2020
- Guselvin, A., & Meiler, J. (2020). An Investigation of Three-Finger Toxin - nAChR Interactions through Rosetta Protein Docking. *Toxins*, 12(9), 598. Recuperado el 2021
- Gutierrez, J. M., Calvete, J. J., Habib, A. G., Harrison, R. A., Williams, D. J., & Warrell, D. A. (2017). Snakebite envenoming. *Natural Reviews Disease Primers*, 3(17063). Recuperado el 2020
- Gutiérrez, J., Calvette, J., & Habib, A. (2017). Snakebite envenoming. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(17063). Recuperado el 2021
- Gutiérrez, J., Gené, J., Rojas, G., & Cerdas, L. (1985). Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, 23(6), 887-893. Recuperado el 2020
- Hessel, M. M., & McAninch, S. A. (2020). Coral Snake Toxicity. *StatPearls*. Recuperado el 2022
- INEGI. (2016). *Regiones faunísticas y ecosistemas principales de México*. Informe de Gobierno, INEGI, Ciudad de México. Recuperado el 2020
- Jackson, K. (2014). Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles. *Phyllomedusa: Journal of Herpetology.*, 12, 147. doi:10.11606
- Kardong, K. V. (1982). The evolution of the venom apparatus in snakes from colubrids to viperids and elapids. *Memórias do Instituto Butantan*, 46, 105-118. Recuperado el 2020
- Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A. R., Silva, N. d., Gunawardena, N. K., Pathmeswaran, A., Pretmaratna, R., & Silva, H. J. (2008). The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Medicine*, 5(11). Recuperado el 2020
- Kennicott, R. (1960). *Descriptions of new species of North American serpents in the museum of the Smithsonian Institution, Washington*. Washington D.C.: Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia. Recuperado el 2020
- Keogh, J. S. (1998). Molecular phylogeny of elapid snakes and a consideration of their biogeographic history. *Biological Journal of the Linnean Society*, 63, 177-203. Recuperado el 2020
- Keogh, J. S. (1998). Molecular phylogeny of elapid snakes and a consideration of their biogeographic history. *Biological Journal of the Linnean Society*, 63, 177-203. Recuperado el 2021
- Kini, R. M. (1997). *Phospholipase A2: structure, function and mechanism*. Singapore: John Wiley and sons. Recuperado el 2020
- Kini, R. M. (2003). Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Elsevier*, 42(8), 827-840. Recuperado el 2020
- Kini, R. M., & Doley, R. (2010). Structure, function and evolution of three-finger toxins: Mini proteins with multiple targets. *Toxicon*, 56(6), 855-857. doi:10.1016
- Kochva, E. (1987). The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. *Herpetological Journal*. Recuperado el 2020
- Lomonte, B., Suárez, P. R., Fernández, J., Sasa, M., Pla, D., Vargas, N., . . . Calvete, J. J. (2016). Venoms of Micrurus coral snakes: Evolutionary trends in compositional patterns emerging from proteomic analyses. *Toxicon*. Recuperado el 2020

- Loranca, M. A., León, G. A., & Luna, M. A. (2006). Coralillos verdaderos (serpentes:elapidae) y coralillos falsos (serpentes:colubridae) de Veracruz, México. *Acta Zoológica Mexicana*. Recuperado el 2020
- Mackessy, S. P. (2021). *In Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. CRC Press. Recuperado el 2021
- McDowell, S. B. (1987). *Snakes: ecology and evolutionary biology*. (J. T. Siegel, & S. S. Novak, Edits.) McMillan.
- Meyers, S. E., & Tadi., P. (2021). Snake Toxicity. *StatPearls*.
- Montecucco, C., Gutiérrez, J. M., & Lomonte, B. (2008). Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cell. Mol. Life Sci.*, 65, 2897–2912. doi:10.1007
- Neri, E. E., Benard, M., & Alagón, A. (2014). Reptiles Venenosos en México. *Revista Latinoamericana de Herpetología*, 15(11). Recuperado el 2021
- Netto, C. C., Azevedo, I. L., Silva, D. A., Ho, P. L., Araújo, M. L., Alves, M., & Calvete, J. J. (2011). Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*. *Journal of Proteomics*, 74(9), 1795-1809. Recuperado el 2020
- Nirthanan, S., & Gwee, M. C. (2004). Three-Finger α -Neurotoxins and the Nicotinic Acetylcholine Receptor, Forty Years On. *Journal of Pharmacological Sciences*, 94(1), 1-17. doi:10.1254
- Nogués, M. P., Solís, C. R., Ruiz, M. L., & Cerezo, M. T. (2008). Estudio del veneno de serpientes: tipos y tratamientos. *Revista del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid*. Recuperado el 2020
- Ochoa, L. O., & Villela, O. F. (2006). Diversity and endemism areas based on Mexican herpetofauna. *Universidad Nacional Autónoma de México-CONABIO*. Recuperado el 2020
- Olamendi-Portugal T, B. C.-C.-H.-M.-V.-A. (2008). Proteomic analysis of the venom from the fish eating coral snake *Micrurus surinamensis*: novel toxins, their function and phylogeny. *Proteomics*.
- Oliveira, F. d., Noronha, M. d., & Lozano, J. L. (2017). Biological and molecular properties of yellow venom of the Amazonian coral snake *Micrurus surinamensis*. *Rev. Soc. Bras. Med.*, 50(3). Recuperado el 2020
- Paula, R. C., Castro, H. C., Rodríguez, C. R., Melo, P. A., & Fuly, A. L. (2009). Structural and pharmacological features of phospholipases A2 from snake venoms. *Protein and Peptide Letters*, 16(8), 899-907. Recuperado el 2021
- Rivera, A. G., Aldama, P. C., & Viveros, W. D. (2009). Epidemiología de las mordeduras por serpiente, su simbolismo. 30(3), 182. Recuperado el 2020
- Rodríguez, J. J., & Díaz, J. V. (1996). *Serpientes venenosas de Aguascalientes*. Cuadernos de Trabajo, Serie de Agricultura y Recursos Naturales, Gobierno del Estado de Aguascalientes. Aguascalientes: Cuaderno de Trabajo No.56. . Recuperado el 2020
- Romero, M. A., Ocampo, E. A., Garza, A. L., Rosa, C. H., & Borgne, S. L. (2019). *Manual de prácticas de laboratorio de Biología*. Ciudad de México: Universidad Autónoma Metropolitana. Recuperado el 2020
- Roodt, A. R., Ramírez, J. E., Solís, J. F., Litwin, S., Saucedo, A. C., Dolab, J. A., . . . Alagón, A. (2005). Toxicity of venoms from snakes of medical importance in Mexico. *Gaceta Médica de México*, 141(1). Recuperado el 2020

- Roodt, A. R., Solís, J. F., Dolab, J. A., Ramírez, J. E., Cerillo, B. R., Litwin, S., . . . Alagón, A. (2004). Effectiveness of Two Common Antivenoms for North, Central, and South American *Micrurus* Envenomations. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 42(2), 171-178. Recuperado el 2020
- Roze, J. A. (1967). A check list of the New World venomous coral snakes (Elapidae), with descriptions of new forms. *American Museum novitates*, 2287, 54-60. Recuperado el 2020
- Roze, J. A. (1996). *Coral Snakes of the Americas: Biology, Identification, and Venoms*. Krieger. Recuperado el 2020
- Sánchez, E. E., Girón, M. E., Guerrero, B., Uzcátegui, N. L., & Acosta, A. R. (2015). Biological and biochemical characterization of the Neotropical Macagua (*Bothrops colombiensis*) snake venom from Barlovento region, Miranda state, Venezuela. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 67(2). Recuperado el 2020
- Sánchez, E. E., Ramírez, M. S., Galán, J. A., López, G., Acosta, A. R., & Pérez, J. C. (2003). Cross reactivity of three antivenoms against North American snake venoms. *Elsevier*, 41(3), 315-320. Recuperado el 2021
- Sanz, L., Lima, L. N., Bernat, S. Q., Souza, V. K., Soares, A. M., Calderón, L. d., . . . Caldeira, C. A. (2019). Comparative venomomics of Brazilian coral snakes: *Micrurus frontalis*, *Micrurus spixii spixii*, and *Micrurus surinamensis*. *Toxicon*, 166, 39-45. Recuperado el 2020
- Saucedo, A. C., Vera, E. L., Valle, M. B., Smith, E. N., Zamudio, F., Roodt, A. R., & Rodríguez, A. O. (2013). Isolation, characterization, cloning and expression of an alpha-neurotoxin from the venom of the Mexican coral snake *Micrurus laticollaris* (Squamata: Elapidae). *Toxicon*, 66, 64-74. Recuperado el 2020
- Sosa, I. A., & Sánchez, J. L. (2004). *ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN*. Cuernavaca, Morelos: Instituto de Biotecnología UNAM. Recuperado el 2020
- Suárez, P. R., Núñez, V., Gutiérrez, J. M., & Lomonte, B. (2011). Proteomic and biological characterization of the venom of the redbellied coral snake, *Micrurus mipartitus* (Elapidae), from Colombia and Costa Rica. *Journal of proteomics*, 75(2), 655-667. Recuperado el 2020
- Tanaka, & Furtado, G. D. (2010). Diversity of *Micrurus* snakes species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 4(3). Recuperado el 2021
- Tanaka, G. D., Furtado, M. d., Portaro, F. C., Sant'Anna, O. A., & Tambourgi, D. V. (2010). *Diversity of Micrurus snakes species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization* (3 ed., Vol. 4). Plos Neglected Tropical Diseases. Recuperado el 2021
- Uetz, P. (2021). A Quarter Century of Reptile and Amphibian Databases. *Herpetological Review*, 52(2), 245-255. Recuperado el 2021
- Valentin, E., & Lambeau, G. (2000). Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A2 and their receptors and binding proteins. *Elsevier*, 1488, 59-70. Recuperado el 2022
- Valentin, E., & Lambeau, G. (2000). Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A2 and their receptors and binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1488(1-2), 59-70. Recuperado el 2020
- Valle, M. B., Castro, E. N., Mendoza, M. F., Lomonte, B., Olvera, A., Zamudio, F., . . . Alagón, A. (2020). Functional, proteomic and transcriptomic characterization of the venom from *Micrurus browni browni*: Identification of the first lethal multimeric neurotoxin in coral snake venom. *Journal of Proteomics*, 225(15). Recuperado el 2021

- Valle, M. B., Saucedo, A. C., Roodt, A. d., Vera, E. L., & Alagón, A. (2014). Biochemical characterization of the venom of the coral snake *Micrurus tener* and comparative biological activities in the mouse and a reptile model. *Toxicon*, 77, 6-15. Recuperado el 2020
- Vargas, A. Z. (1990). Química y farmacología del veneno de serpientes (II parte): efectos sobre el sistema nervioso y cardiovascular. *Revista de química*, 4(2), 185-201. Recuperado el 2020, de <https://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/5635>
- Vergara, I., Escalona, M. P., Paniagua, D., Cassulini, R. R., Zamudio, F., Batista, C. V., & Alagón, A. (2014). Eastern coral snake *Micrurus fulvius* venom toxicity in mice is mainly determined by neurotoxic phospholipases A2. *Journal of Proteomics*, 105, 295-306. Recuperado el 2021
- Warrell, D. (2010). Snake bite. *The Lancet*, 77-88.
- Zavala, J. T., Sánchez, J. G., Vega, J. T., Sánchez, D. R., & Castillo, L. (2002). Serpientes y reptiles de importancia médica en México. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*. Recuperado el 2021
- Zug, G. R., Vitt, L., & Caldwell, J. P. (2001). *Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles*. Academic press. Recuperado el 2020

XII. ANEXO

XII.1 PROTOCOLO DE ABSORBANCIA A 280nm.

Materiales y Equipo:

- A.** Espectrofotómetro (Thermo Scientific™).
- B.** Celda de cuarzo de 1 cm de diámetro (BECKMAN).
- C.** Amortiguador blanco y muestras (más de 300 uL de c/u).
- D.** Pipetas Pasteur.

Procedimiento:

1. Lavar celda de cuarzo con agua destilada y después con alcohol. Limpiar con pañuelo desechable.
2. Configurar espectrofotómetro a 280 nm y meter celda con un volumen mayor a 300 uL de amortiguador. El mismo en que está la muestra.
3. Meter celda con volumen de muestra mayor a 300 uL (si la lectura es mayor a 2.000 UA, preparar la muestra en dilución a considerar).
4. Repetir paso 1.

XII.2 PROTOCOLO DE ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA (SDS).

Materiales y Equipo:

- A.** Fuente de poder de electroforesis.

- B. Cubeta de electroforesis.
- C. Cristales, peines y cámara interna.
- D. Soluciones para geles.
- E. Marcadores de peso molecular.
- F. Amortiguador de muestra (+ β -mercaptoetanol).
- G. Amortiguador Tank 1X.

Preparación de soluciones:

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

Disolver 49.5 g de acrilamida y 1.32 de bis-acrilamida en un volumen final de 165 ml de agua desionizada.

Amortiguador separador (1.5 M de Tris + 0.4% de SDS):

Disolver 18.7 g de tris en 50 ml de agua desionizada y adicionar 2 ml de SDS al 20%. Ajustar el pH a 8.8 con HCl concentrado. Aforar a 100 ml.

Amortiguador concentrador (0.5 M de Tris + 0.4% SDS):

Disolver 6.06 g de tris en 50 ml de agua desionizada y adicionar 2 ml de SDS 20%. Ajustar pH a 6.8 con HCl concentrado. Aforar a 100 ml.

Amortiguador de corrida 10X (0.24 M Tris + 0.19 M glicina + 0.1% SDS):

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

Amortiguador de corrida 1X: Diluir 100 ml de amortiguador de corrida 10X en 900 ml de agua desionizada.

Amortiguador de muestra desnaturizante 5X (10% glicerol + 2.5% SDS + 50 mM Tris-HCl pH 6.8 + 5% β -mercaptoetanol+0.002% azul de bromofenol): en un tubo Falcon; de 15 ml mezclar 2.5 ml de glicerol, 3.125 ml de SDS 20%, 1.25 ml de Tris-HCl 1 M pH 6.8, 1.25 ml de β -mercaptoetanol, 0.5 ml de 1% azul de bromofenol. Aforar a 10 ml con agua desionizada.

Persulfato de amonio al 10%: Disolver 0.1 g de persulfato de amonio en 1 ml de agua desionizada.

Solución de tinción (50% metanol + 10% ácido acético + 0.2% azul de Coomassie G250): Disolver 1 g de azul de Coomassie G259 en 250 ml de metanol, 50 ml de ác. acético y aforar a 500 ml con agua desionizada.

Solución de destinción (10% metanol + 10% ác. acético): Mezclar 400 ml de agua desionizada, 50 ml de metanol y 50 ml de ác. Acético.

Preparación de geles:

Geles separadores

Reactivo	2 geles									3 geles
	4%	6%	10%	11%	12%	12-5	15%	17%	20%	17%

Amortiguador separador (ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	2.25
Sol. acrilamida (ml)	0.8	1.2	1.95	2.2	2.4	2.5	3.0	3.4	4.05	5.1
dH ₂ O (ml)	3.7	3.3	2.55	2.3	2.1	2.0	1.5	1.1	0.45	1.65
TEMED (μL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	15
PSA 10% (μL)	40	40	40	40	40	40	40	40	40	45

Gel concentrador

Reactivo	Volumen
Amortiguador concentrador (ml)	0.63 ml
dH ₂ O (ml)	1.54 ml
Sol. acrilamida (ml)	0.33 ml
TEMED (μL)	10 μL
PSA 10% (μL)	40 μL

Procedimiento:

1. Incluir el volumen necesario de muestra (μg deseados) para cargar 16 μL + 4 μL de amortiguador de corrida 5X. Hervir las muestras durante 5 min y centrifugar a 13000-14000 xg durante 1-2 min.
2. Cargar los pozos del gel en la cámara electroforética con las muestras (20 μL/pozo) y los marcadores de masa molecular (5 μL).
3. Migrar a 90 V hasta que el colorante de referencia haya atravesado el gel concentrador. Luego incrementar a 120 V y mantener hasta que el colorante de referencia se encuentre a 0.2 cm del final del gel.
4. Teñir el gel con solución de tinción y desteñir con solución de destinción.

XII.3 PROTOCOLO DE ACTIVIDAD FOSFOLIPASA PLA2 SOBRE YEMA DE HUEVO AL 10%.

1. Preparación de la solución de yema de huevo al 10%

A. solución estándar 150ml.

	[] stock	[] trabajo	Vol. a añadir
NaCl	5 M	0.1 M	3 ml
CaCl ₂	0.1 M	0.01 M	15 ml
Tritón X 100	20%	0.5%	3.75 ml

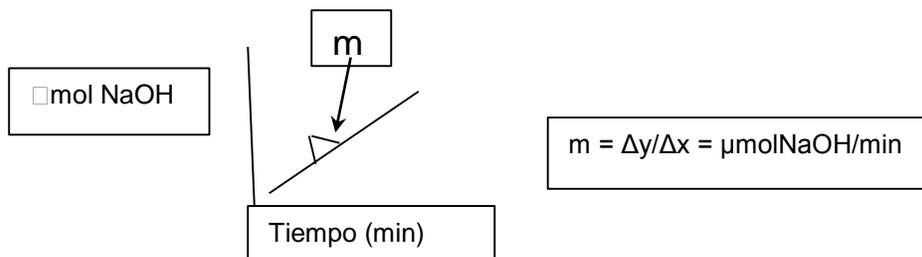
B. Pesar yema de huevo y aforar con solución estándar hasta 10% (ej. 14g – 140ml).

C. Agitar durante 10 min.

D. Centrifugar a 1500 rpm (380G) durante 5 min y recuperar el sobrenadante.

2. En 500μl de solución de yema de huevo 10% mantener una agitación constante bajo ligero burbujeo de nitrógeno.
3. Llevar la solución a un pH 8.05 con NaOH 50mM.

4. Agregar 1 μl de veneno [1mg/ml].
5. Cuando el pH llegue a 7.99 agregar un vol. de NaOH 50mM (entre 1 y 5 μl) suficiente para recuperar el pH superior a 8.0.
6. Medir el tiempo transcurrido desde la adición de NaOH hasta que el pH vuelva a bajar a 7.99.
7. Repetir hasta obtener 5 mediciones.
8. Hacer el procedimiento por triplicado.
9. Obtener la pendiente resultante de graficar la cantidad (μmol) de NaOH en función del tiempo (min).



10. La pendiente (m) representa la cantidad de NaOH consumida por minuto. La actividad del veneno se reporta en unidades que se definen como μmoles de NaOH consumidas por minuto. ($m = U$).
11. Sacar promedio de las tres pendientes y calcular la actividad específica definida como unidades por mg de veneno.

XII.4 PROTOCOLO DE DOSIS LETAL MEDIA (DL₅₀).

Protocolo:

1. Seleccionar una serie de cantidades de veneno, asegurándose de tener el 100% de supervivencia y el 100% de mortalidad, en grupos de 3 ratones por dosis de veneno. Como control se deben inyectar 3 ratones con la solución en la cual se encuentra diluido el veneno. (En teoría no debe morir un solo ratón).
2. Teniendo el rango de supervivencia y mortalidad se tomarán 5 cantidades intermedias al rango y serán inyectadas en 5 grupos, cada uno con 3 ratones.
3. Realizar la lectura del porcentaje de mortalidad a las 48 horas posteriores a la inoculación.
4. Procesar los datos en el software GraphPad Prism 4®.

La inoculación del veneno se realizó en un volumen total de 0.5ml de PBS 1x, La inyección se realizó de forma intravenosa.

Materiales y soluciones:

- A. Caja para ratones con tapa de reja.
- B. Bebederos.
- C. Comida para ratones.
- D. Jeringas de 3mL

- E. Toallas de papel.
- F. Amortiguador de fosfatos (PBS).
- G. Software GraphPad Prism 4.

Animales:

- A. Ratones ICR de 18 a 20 gr de peso, sin importar sexo.

XII.5 PROTOCOLO DE ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE.

Se extrajo sangre de un solo donante, la cual fue recibida en citrato (3.8 g/100 ml), se colocaron 0.2 ml de plasma en cada uno de los tubos y se realizó por triplicado. (1:10 v/v en proporción a la sangre).

Cada tubo fue colocado a 37° C durante 3 min y posteriormente se colocaron diferentes concentraciones de veneno en un volumen final de 100 µl, se añadió calcio y se observó el tiempo en el que se formó el coagulo; se utilizó también un control negativo (PBS sin presencia de veneno).

XII.6 PROTOCOLO DE ACTIVIDAD PROTEASA.

La actividad proteolítica de los venenos se evaluó utilizando una modificación del método descrito por Chen et al. (2004) y Yang et al. (2015) y modificado por Gutiérrez et al. (2008).

Procedimiento:

1. Disolver azocaseína en una solución estándar (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM y CaCl₂ 5 mM) hasta una concentración final de 10 mg/ml.
2. Añadir 20 µg de veneno y disolver en 20 µL de NaCl 150 mM.
3. Agregar 100 µL de la solución de azocaseína e incubar durante 30 min a 37 ° C.
4. Detener la reacción añadiendo 200 µl de ácido tricloroacético al 5%.
5. Centrifugar las muestras a 16.800 xg durante 5 min.
6. Añadir 150 µL del sobrenadante de cada muestra a 150 µL de NaOH 500 mM en una placa de 96 pocillos (NUNC).
7. Determinar la absorbancia de la muestra a 450 nm.

Nota:

- Las unidades de actividad enzimática (U) se definen como el cambio de 0.2 en la absorbancia de la muestra por minuto.
- Para verificar la linealidad de la reacción proteolítica observada, la actividad se determinó mediante diferentes tiempos de incubación (30, 60 y 90 min).
- El tiempo de incubación seleccionado fue de 30 min, porque el sustrato todavía estaba en exceso.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Control Escolar de Licenciatura



VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria Ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **CAMPOS ARCE JIMENA CRIS** con número de matrícula **20164006027** cuyo título es:

“Caracterización bioquímica y biológica del veneno de la serpiente de coral *Micrurus distans*”

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Cuernavaca, Mor a 20 de junio del 2022

Atentamente
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DRA. MARÍA ANGÉLICA SANTANA CALDERÓN
DR. RODRIGO SAID RAZO HERNÁNDEZ
M.C. MELISA BENARD VALLE
DR. JOSÉ RAÚL ARREDONDO PETER
M.B. EDGAR ENRIQUE NERI CASTRO

(PRESIDENTE).
(SECRETARIO).
(VOCAL).
(SUPLENTE).
(SUPLENTE).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

EDGAR ENRIQUE NERI CASTRO | Fecha:2022-06-20 12:25:45 | Firmante

x4EwH1nCaLREKqgAQn+B5ZS2GWq+61pYrWhP1OnWoknacn1e6M/G2GyUV5c+XJsnr8bLfqzNo6JuYoHcjcROEK47/Ww61JHDWSjS247Br02IH/HE5I5gkaut0qyfwqtVukJ+T
kazQKGsEaEX4tKmYwFTSgtjyelTFX6yZsCfd9pb78um7ojUzwQZE+8la1R0E6VWwQkSpaUu3M67U29f/sQklyuklswr+cYKirKDP3+N0qQjhiivn2FTK3o//J/BkpWzi/a+3TpmQfkMn0
M0HTITHi1L7zkU6qr+3D8cxEt2oPzYm0/4bTaSjvODEKpffy+kMiHYsR4A2S31BjA==

RODRIGO SAID RAZO HERNANDEZ | Fecha:2022-06-20 12:27:32 | Firmante

JQaD+jTH4hgHKyitqRvcMc2TW0Kqtvio90aHXuaxzpk83isP/o49tqy7LaVpiUoEKJcS29ajZpXbWG8LIN9Ys5RHv+6QYBRkf8nUvwwF2wCf+dsKufuAQwdbEB8P8JUOOSDpU3Jt+
PbhAmSGcTOu7ulC6iQUINIXE1w9LQwlyyyymkNF92Hbm8JpMNLdVNSQOjCwUxkU2RyMhWCn6vsxJCMNJ09BZEzKdNRYOg3dmp0cuQD0F4IQ6yHvXgF5gQ6p+qNWF1Ur
G86sCuo3XCxqYwh2VNOq+luhuKXaBoTpamEDRNmUDjZl1ey6s3OINWeZ23QE/4DI3AwFCQ2mVUn51g==

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2022-06-20 12:30:22 | Firmante

JoTV9JyutExR3dgal5gYSMJlan7v4OzJutLcv0eqAS8Jf2Sgb4daaRHZvElroHVVwr+z0VDi2KikVtJNluulQDwk+tWvIUAcnUH+h68Z/n2kFgvWuHP49EmGYr5IZmawObQC4Nd5Xx
INpSrPA1IRKUFwHysTMOlyFLpvgtdH5oTLp19tOKb24VkrD0r4u7nWzhd+U/jPXsFhMN43o8hSVoCEHQXpFVR0ntgQ/QCcV9F2FKG8BigwP1GRXIXinjDfvWdAwH5OR0N4hYI
5kYiExm/+8Edtly2flueaXlyje9JbS7GaTKLzW1eKoXf76J7zuRi22IBYeuEdGd83TtVg==

JOSE RAUL ARREDONDO PETER | Fecha:2022-06-20 12:33:33 | Firmante

KJUUEJ+MP5iyL+Lj1cvv2elT6VHvpx0ovYK4abGJbpX3HQEC4WlGpqZV8OTDoTetpkwzwyokUbUHKJRop1EBIqOop0x97AY8K6iurWXscU0kl2hUJvn2Biu9jDgnQd4gB34RP5/P0
W+1CxeF0wdnUAe59OKCk+i12oDfu0kbbIEQi+BrwZOVIVJ8FUPqnoyYBg6iQ86Wlgz2Ayoy5w/COhaAatDcaxwR1y9b9+tP5QsAuldmyQ97TL0W+UFCa2dWry1gO2zFlZmLly4sx
9XuUcZuQ6AvpMbbzy2XFwKyQmV8Jv1p1cDypCC3ZAHVh6F/FetgLDVHhkf5WMPcdaQ==

MELISA BENARD VALLE | Fecha:2022-06-22 18:57:48 | Firmante

qzvSlpkAVa1vuMZN7fqtA8x7C19THx/BrSFr2d6Qx5M1IrsiHfyZAnw6UXc6c4auHiz8x1o/zITrDKqPOqdpFASkmhDtp0vyFEpA7M4WBsqRLMJFoaBjfkE7PF+JxR20FtaHQW9Y
FVhHSWffHA42spck82lzUdFOrby5nao2ap5rdLz9pQ921lkhp8DBL8GdgcZqsklUJDEn6/cLizjZViiZPPcJNSZm+JyWnNrefW9FpMeqKhk90n5m7yQKDAertkyZ/U5dUclJ+SfqFdG8
CyAgR/gjM0qNitXqzGcd+9iwhvcjHEVbb2S/uo22LeJljuNEzBgpgmfNbdSvkQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



uYUL0VAKp

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/viThXygsWJ9dmxiscrzDMiff0pyAtdlQ>

