



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARIA DE DOCENCIA
JEFATURA DE POSGRADO

“Aislamiento y caracterización de componentes con actividad edematizante presentes en el veneno de la serpiente *Agkistrodon bilineatus*”

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN MEDICINA MOLECULAR
QUE PRESENTA
BIÓL. LUIS ROMÁN DOMÍNGUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DRA. VERA LUCÍA PETRICEVICH
CODIRECTOR DE TESIS: DR. ALEJANDRO ALAGÓN CANO

Cuernavaca, Morelos, México a 2018.

Facultad de Medicina/Instituto de Biotecnología. Cuernavaca, Morelos, México. 28 de mayo del 2018.

Miembros del jurado de examen:

Dra. Vera Lucía Petricevich

Dr. Alejandro Alagón Cano

Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama

Dra. Lidia Riaño Umbarila

Dr. Joaquín Sánchez Castillo

Dr. Carlos Peña Malacara

Agradezco por el financiamiento para la realización de este trabajo por medio de los proyectos:

- CONACyT-221343 CB 2013
- CONACyT-224494 INFRA 2014
- DGAPA PAPIIT-IN205214
- DGAPA PAPIIT-IN207218

Y de manera personal a CONACyT por la beca otorgada durante la realización de dicho trabajo. Sin ella no hubiera sido posible.

Agradecimientos

A mi directora de tesis la Dra. Vera Lucía Petricevich por todas sus enseñanzas, paciencia y amistad. Además de la siempre ayuda y apoyo otorgado.

Al Dr. Alejandro Alagón Cano por sus comentarios y observaciones, pero sobre todo por darme la confianza y permitirme realizar este trabajo en su laboratorio.

Al Instituto de Biotecnología por aceptarme como alumno externo y brindarme sus instalaciones y equipo, lo cual fue de gran ayuda para concluir dicho estudio.

A Herlinda Clement Carretero, Alejandro Olvera Rodríguez, Felipe Olvera Rodríguez, Gerardo Corzo Burguete e Hilda Vázquez López, por el apoyo técnico.

A Angélica Linares Labastida, Ricardo Mondragón Cortés y, doña Manuela por el apoyo técnico y administrativo.

A los compañeros del laboratorio, Nicolás Elizalde, Francia García, Guillermo de la Rosa, Arlene Calderón, Irving Archundia, Paniagua, Fer, Mitzi, Oscar Pérez, Óscar Aguillo, Oscar Germán, Irene Castillo, German, Iván Arenas, Raúl, Chuy, Félix, Damaris, por todos esos momentos juntos en el laboratorio, su apoyo y sobre todo su amistad

Especialmente agradezco a Mariel Valdés, Belem Osorio, Mafer Hernández, Erick Rivas, Manuel Yañez, Rober, Luis (mi tocayo), Melisa Bénard y Edgar Neri por su gran amistad, grandes enseñanzas y apoyo que siempre me otorgaron. Muy buenos momentos a su lado.

A todos los amigos de la maestría que compartimos desvelos, angustias, pero sobre todo satisfacciones. Al igual que a los maestros por la formación académica.

Al personal administrativo y directivo de la Facultad de Medicina por los trámites y buena atención.

A las personas que nos permitieron ordeñar a los individuos de *Agkistrodon* a su cargo, pues sin ellos este trabajo no se hubiese podido realizar. Fernando Gonzales (Reptiles Fergo), Manuel Varela (La Nauyaca), Javier Ortiz (Tzabcan), Mónica Sánchez (FC-UNAM), Roberto Mora y Felipe Lara

Y por último el agradecimiento más especial, a mi padre, quien siempre ha estado ahí para apoyarme incondicionalmente en todo lo que me propongo, le agradezco infinitamente por ser parte esencial en mi vida académica y personal. Sin él nada de esto hubiera sido posible y jamás hubiera podido llegar en donde estoy. Por último, le agradezco por creer siempre en mí.

ÍNDICE

Resumen	1
1. Introducción	2
1.1. Serpientes.....	2
2. Venenos de serpientes	4
2. 1. Fosfolipasas A ₂	4
2. 2. Metaloproteasas.....	5
2. 3. Serinoproteasas	6
3. <i>Agkistrodon bilineatus</i>	6
4. Inflamación	9
5. Justificación	14
6. Hipótesis	15
7. Objetivos	15
7. 1. General	15
7. 2. Específicos.....	15
8. Estrategia experimental	16
9. Materiales y métodos	17
9.1. Serpientes y venenos.....	17
9. 2. Cuantificación de proteínas del veneno	17
9. 3. Exclusión Molecular	18
9. 4. Cromatografía de intercambio iónico	18
9. 5. RP-HPLC (cromatografía líquida de alta resolución fase reversa)	19
9. 6. Actividad proteolítica sobre azocaseína.....	19
9. 7. Actividad fosfolipasa A ₂	20
9. 8. Dosis Mínima Edematizante (DME)	20
9. 9. Dosis Letal Media (DL ₅₀)	21
9. 10. Geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	21
9. 11. Cuantificación de citocinas.....	21
9. 12Cuantificación de nitritos	22
10. Resultados	23
10. 1. Rendimiento de la mezcla de venenos	23

10. 2. SDS- PAGE.....	23
10. 3. Filtración en gel.....	23
10. 4. Actividad proteolítica	25
10. 5. Actividad fosfolipasa A ₂	26
10. 6. Dosis Letal Media (DL ₅₀)	26
10. 7. Dosis Mínima Edematizante (DME)	27
10. 8. Cuantificación de óxido nítrico	29
10. 9. Cuantificación de citocinas.....	30
10. 10. Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC)	31
10. 11. Cromatografía de intercambio iónico	32
11. Discusión	36
12. Conclusiones	41
13. Perspectivas	42
14. Referencias	43

Índice de abreviaturas

µg	microgramos
pg/ml	picogramos por mililitro
µg/ratón	microgramos por ratón
µmolas	micro molas
BCA	ácido bicinconínico
DME	Dosis Mínima Edematizante
DL₅₀	Dosis Letal Media
IFN-γ	Interferón gamma
KDa	Kilo Daltones
m.s.n.m.	metros sobre el nivel del mar
mg	miligramos
ml	mililitro
NaCl	Cloruro de sodio
nm	nanómetro
PBS	Buffer de fosfatos
PLA₂	Fosfolipasa tipo 2
SDS	Dodecil sulfato sódico
TFA	Ácido trifluoroacético
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral
U/mg	Unidades de actividad enzimática por miligramo

Resumen

Uno de los grupos de serpientes de mayor importancia médica en México es la familia Viperidae. Las serpientes de esta familia son consideradas de importancia médica por generar cuadros tóxicos muy severos con un característico daño en la zona de la mordedura; como hemorragias, miotoxicidad, dolor y edema. Dentro de la familia Viperidae se encuentra *Agkistrodon bilineatus*, misma que en envenenamientos se reporta la generación de un severo cuadro de edema que puede complicarse de tal forma que se da un síndrome compartimental que deja sin irrigación a las extremidades afectadas y culmina en necrosis. Para conocer los componentes involucrados en la generación del edema se realizó un fraccionamiento del veneno completo de *A. bilineatus* y se obtuvieron 4 fracciones, las cuales se probaron y únicamente la FI y FIII presentaron actividad de este tipo. Posteriormente se les realizó la caracterización de actividades enzimáticas y la FI presentó tener actividad de proteasa en presencia de Zinc y la FIII actividad fosfolipasa. La FI y FIII presentaron una letalidad por vía intraperitoneal de 21.6 µg/ratón y 90.2 µg/ratón, respectivamente, por lo cual también son las principales en cuanto a letalidad del veneno completo (45.1 µg/ratón). Consecutivamente se realizó un refraccionamiento de éstas por medio de cromatografía de intercambio iónico y se obtuvieron cuatro fracciones de cada una. De la FI, solamente la FI-4 presentó tener actividad edematizante y hemorrágica en ratones, de igual forma únicamente la FIII-1 presentó una progresión de edema característico del observado con el veneno completo. Posteriormente se midieron niveles de citocinas de ratones expuesto a veneno completo, FI y FIII, lo cual se observó un aumento en citocinas pro-inflamatorias en períodos de 12 horas y posteriormente un aumento de citocinas anti-inflamatorias a las 24 horas. Por lo tanto, las metaloproteasas y fosfolipasas, y sólo algunas de las proteínas pertenecientes a éstas, son las involucradas en la presentación del fenotipo inflamatorio y la letalidad.

1. Introducción

1.1. Serpientes

Estos organismos pertenecen a un extenso grupo de vertebrados del orden Squamata y suborden Serpentes (Benton, 2009). Se estima que aparecieron hace aproximadamente 230 millones de años y desde entonces es el grupo de reptiles con mayor diversificación; en la actualidad existen cerca de 3800 especies (Alvarado y Suazo, 2006; The reptile database. Conabio). Algunos de los primeros registros fósiles encontrados datan aproximadamente del Cretácico medio y tardío, estos restos son superficialmente parecidos a algunas boas, pitones y serpientes marinas actuales (Lee, 2002).

Las serpientes a lo largo de la evolución han desarrollado adaptaciones morfológicas características; como es la ausencia de extremidades, un cuerpo cilíndrico y alargado, y la ausencia de esternón, además de carecer de cintura pélvica y escapular (Lee, 2002), mismas que les han permitido habitar diversos ecosistemas montañosos, boscosos, desérticos y marinos. Debido a que son exotérmicas, es decir, que necesitan de una fuente externa de calor para poder llevar a cabo sus procesos metabólicos, no pueden habitar en zonas con climas demasiado fríos, por lo que la mayor abundancia y diversidad de especies se encuentra en zonas tropicales y templadas, estando prácticamente ausentes en los polos (Campbell y Lamar, 2004). Todas las serpientes son carnívoras y tienen una amplia gama de presas, que van desde anfibios, aves, mamíferos, insectos y otros reptiles. La forma de detección de sus presas puede ser mediante foseas termorreceptoras o por un aparato olfativo llamado Órgano de Jacobson, el cual le permite, a través de la lengua, captar moléculas de olor y llevarlas hasta una cavidad donde se encuentran nervios sensibles a olor. Cerca del 80 % de las serpientes actuales no presentan secreciones venenosas, por lo cual capturan y matan a sus presas por medio de constricción, a diferencia de las serpientes venenosas, las cuales capturan, matan y pre-digieren a sus presas inyectándoles secreciones tóxicas.

En la actualidad, aproximadamente sólo el 15 % del total de especies de serpientes son consideradas de importancia médica, es decir, que tienen la capacidad de producir veneno y están involucradas en casos de mordeduras (Lee, 2002).

Todas las serpientes venenosas presentan un aparato especializado para la producción, almacenamiento e inoculación del veneno. Éste está constituido por un par de glándulas salivales modificadas compuestas de células epiteliales glandulares, donde se produce y almacena el veneno hasta su utilización. Acoplado a la glándula se encuentra un músculo llamado “músculo compresor”, el cual cubre y presiona la glándula expulsando el veneno a través de dos conductos que desembocan en los colmillos (Mackessy, 2010).

Las serpientes venenosas, en general, están clasificadas dentro de cuatro familias:

Colubridae.- Es la familia con mayor número de integrantes, en la cual se encuentran clasificadas especies “semivenenosas” y no venenosas. Los integrantes de esta familia pueden presentar dos tipos de denticiones: Aglifa; hilera de dientes sin modificaciones para la inoculación de veneno y Opistoglifa; dientes acanalados en la parte posterior de la mandíbula superior, adaptados para la secreción de veneno a partir de un órgano productor llamado Glándula de Duvernoy.

Elapidae.- Incluye serpientes exclusivamente venenosas y está básicamente representada por cobras, mambas y coralillos, entre otras. Se caracterizan por tener una dentición tipo proteroglifa, que se refiere a dientes huecos fijos modificados para la inoculación de veneno (colmillos), ubicados en la parte anterior de la mandíbula superior.

Atractaspididae.- Son serpientes poco comunes de hábitos hipogeos que presentan un tipo de dentición llamada solenoglifa; que son dientes huecos móviles conocidos como “colmillos” ubicados en la parte anterior de la mandíbula superior. Éstos pueden retraerse mientras la serpiente mantiene la boca cerrada y cuando muerden, el maxilar rota sobre el eje antero-posterior de la cabeza elevando los colmillos hacia el frente.

Viperidae.- Son serpientes de hábitos nocturnos y crepusculares. Las serpientes de esta familia que se encuentran en México son: serpientes de cascabel (*Crotalus*), nauyacac (*Bothrops*), cantiles (*Agkistrodon*), entre otras. Todas ellas presenta dentición del tipo solenoglifo (Mackessy, 2010; Lee, 2002). Consta de

tres subfamilias: Viperinae, Azemiopinae y Crotalinae. Las serpientes encontradas en el continente Americano pertenecen a ésta última. Sus integrantes presentan características distintivas, una de las principales es la presencia de un par de foseas termorreceptoras situadas en entre el ojo y la narina. Está representada por 21 géneros y 229, en la cual se encuentra clasificada la serpiente que será estudiada, *Agkistrodon bilineatus*.

2. Venenos de serpientes

Los venenos de serpientes son mezclas complejas de diferentes moléculas, en su mayoría proteicas, que tienen diversos efectos fisiopatológicos en sus presas y en accidentes en humanos (Mackessy 2010). El veneno en general, tiene tres funciones biológicas principales, las cuales son: matar o someter a su presa, pre-digestión mediante componentes enzimáticos y defensa ante posibles depredadores (Walter *et. al.*, 1999). Del total de la composición del veneno, aproximadamente un 90 % está dado por proteínas, el resto, está constituido por carbohidratos, lípidos, iones y nucleósidos (Mackessy 2010).

Los venenos de serpientes y en particular de vipéridos, son bastante complejos, llegando a tener más de 100 componentes diferentes. En general, estos componentes se pueden clasificar en familias de proteínas de acuerdo a sus características estructurales y funcionales. En *A. bilineatus* algunas de las principales familias proteicas presentes en el veneno son: fosfolipasas A₂ (PLA₂), metaloproteasas (SVMP), Serinoproteasas (SP) y péptidos vasoactivos (Lomonte *et. al.*, 2014).

2. 1. Fosfolipasas A2

Es una de las principales familias de proteínas presentes en venenos de serpientes, relacionadas con una extensa gama de funciones enzimáticas, tóxicas y fisiopatológicas. Estas proteínas desempeñan un papel biológico importante en la toxicidad de los venenos, así como en la pre-digestión de sus presas; por otra parte, se les atribuye ser causantes de la generación de sintomatología local, como ocasionar daño en músculo, tejido nervioso y generación de edema (Gutiérrez y Lomonte, 2013; De Freitas *et al.* 2009).

El sitio donde las PLA₂ con actividad enzimática llevan a cabo su actividad, es en el enlace *sn2* de los glicerofosfolípidos, hidrolizando la molécula y dando como producto lisofosfolípidos y ácidos grasos (Mackessy, 2010). Para que dicha actividad se pueda llevar a cabo, las PLA₂ deben presentar en su composición un residuo de ácido aspártico en la posición 49 (D49), el cual es crucial para la unión con Calcio, que le confiere estabilidad conformacional y por ende actividad. Por otro lado existen fosfolipasas que presentan residuos de lisina o serina en la posición 49, mismos que inhibe por completo su actividad enzimática, sin embargo, pueden ejercer miotoxicidad por medio de una acción específica en las membranas aumentando la permeabilidad celular (Gutiérrez y Ownby, 2003; Hodgson, 2012).

Las PLA₂ presentes en el veneno de *A. bilineatus* se encuentran en gran proporción (42 %) (Lomonte *et. al.* 2014), y podrían estar involucradas en los daños locales presentados en los envenamamientos, principalmente edema.

2. 2. Metaloproteasas

Son proteínas que están presentes en alta proporción en los venenos de vipéridos y están relacionadas con la generación de hemorragias locales y sistémicas, ya que hidrolizan colágeno, laminina, elastina y tejido conectivo de la luz de los vasos sanguíneos. Éstas requieren de zinc para ejercer su función enzimática y están clasificadas con respecto a la composición y estructura de sus dominios: Metaloproteasas P-I (con un dominio metaloproteasa), P-II (un dominio metaloproteasa más la adición de un dominio desintegrina) y P-III (un dominio metaloproteasa, uno desintegrina y uno más rico en cisteína). Cada una presenta diferente actividad con respecto a los dominios que la conforman (Mackessy, 2010). Estas proteasas actúan sobre los capilares y células endoteliales, favoreciendo la extravasación de líquido al espacio intersticial y favoreciendo la generación de edema. El veneno de *A. bilineatus* presenta un 24. 5 % de metaloproteasas en su composición (Lomonte *et. al.* 2014).

2. 3. Serinoproteasas

Son proteínas presentes en los venenos de vipéridos, que afectan diversas funciones fisiológicas, como coagulación sanguínea, presión arterial, agregación plaquetaria y fibrinólisis (Serrano, 2013). Dentro de las serinoproteasas existe un grupo de proteínas llamadas “Thrombin-like”, que están implicadas en coagulopatías por consumo de fibrinógeno (Zad *et. al.*, 2009). Otro grupo importante dentro de esta familia son las “Kallikrein-like”, dichas enzimas a partir de la hidrólisis de cininógeno, tienen la capacidad de producir cininas y bradiquininas, mismos que son importantes péptidos vasoactivos que intervienen como mediadores de inflamación. Por otro lado, las calicreínas se pueden generar por una vía endógena a partir de procalicreína, mediante lesiones tisulares o procesos de inflamación, que finalmente culminan con la producción de bradiquininas. Debido al daño tisular presente en los envenenamientos por *A. bilineatus*, se podrían producir calicreínas y generar péptidos vasoactivos que contribuyan al proceso de edema (Mackessy, 2010).

3. Agkistrodon bilineatus

El género *Agkistrodon* es un grupo monofilético exclusivamente encontrado en América, el cual tiene representantes presentes en México, Estados Unidos y Centroamérica. *A. bilineatus* es una de las seis especies que componen el género y ésta se encuentra ampliamente distribuida a lo largo de la costa del pacífico mexicano, que va desde Chihuahua hasta algunas localidades de Chiapas, además se extiende a algunas zonas del centro como Morelos (Porrás *et. al.*, 2013) (Figura 1).



Figura 1. Mapa de distribución de *Agkistrodon bilineatus*. Porras *et. al.*, 2013.

Algunas de las características morfológicas que la distinguen de otras serpientes mexicanas, es la presencia de un canto o elevación en la escama rostral y la presencia de un par de líneas pálidas a los lados de la cabeza, así como una línea vertical en la boca. La pupila es vertical y la cabeza suele ser grande con una larga glándula de veneno. En adultos la coloración varía en un rango que va de café oscuro hasta negro, por otra parte no se ha observado que exista dimorfismo sexual en cuanto a coloración. La longitud que pueden llegar a alcanzar se encuentra en un rango de entre 0.6 a 1.3 metros. Se distribuye en lugares con un tipo de vegetación de selva seca, selva baja caducifolia, sabanas y zonas con baja perturbación con una altitud máxima de 1500 msnm. Frecuentemente se pueden encontrar en zonas cercanas a cuerpos de agua y por consecuencia, su dieta preferencial consiste en anfibios y menos frecuentemente reptiles y mamíferos (Campbell y Lamar, 2004) (Fig. 2).



Figura 2. Características morfológicas de *Agkistrodon bilineatus*. Porras *et. al.*, 2103.

El género *Agkistrodon* es uno de los géneros que se considera de importancia médica por el número de mordeduras en el que está involucrado. En México, se estima que ocurren aproximadamente 27,000 casos de mordeduras al año por serpientes venenosas, de las cuales destaca importantemente *A. bilineatus* (Gomez y Dart, 1995). Además por la cantidad de accidentes en los que está involucrada esta especie, se le considera un problema de salud, ya que la sintomatología de los envenenamientos presenta serías complicaciones en la zona de la mordedura como hemorragias, edema, dolor, equimosis y miotoxicidad (Rojas *et. al.*, 1987; Walker y Morrison, 2011; Nikai *et. al.*, 2000). (Tabla 1)

Tabla1

Grado de envenenamiento y sintomatología según El diagnóstico y tratamiento de las mordeduras de serpientes venenosas de Consejo de Salubridad General.

Grado	Signos y síntomas
0	Huellas puntiformes sin envenenamiento, probablemente mordedura seca (15 a 20 %)
I	Envenenamiento leve: dolor, edema no mayor a 10 cm circunscrito al área de la lesión
II	Envenenamiento moderado: dolor intenso, edema mayor a 15 cm circunscrito al área de la lesión
III	Envenenamiento severo: edema en todo el miembro afectado, vómito, vértigo, fiebre, equimosis, petequias, etc.
IV	Envenenamiento grave: sangrado, por orificios de la mordedura, equimosis y petequias extensas, datos de coagulación diseminada, insuficiencia renal aguda, hipotensión y falla orgánica múltiple.

En algunos casos puede presentarse una sintomatología sistémica indirecta por la acción de las miotoxinas. Éstas lisan las células musculares en la zona de la mordedura y por consecuencia se produce gran cantidad de desechos celulares, por lo cual los riñones se saturan y no son capaces de filtrar, consecuentemente ocasionando fallo renal (Gutiérrez y Lomonte, 2013).

Así mismo, una de las complicaciones más graves en envenenamientos por estas serpientes, es la severa generación de edema en la zona de la mordedura. Dicho edema puede complicarse de tal forma que genera un síndrome compartimental, el cual deja sin flujo sanguíneo a la extremidad y ésta puede llegar a necrosarse. Algunos investigadores atribuyen la generación de edema a la activación de receptores adrenérgicos en combinación con otras proteínas presentes en los venenos de serpientes (Chaves *et. al.*, 1995), como PLA₂ (De Freitas *et. al.*, 2009).

4. Inflamación

La inflamación es una cascada de procesos bioquímicos y celulares complejos generada y orquestada por el sistema inmune en consecuencia de un daño o perturbación en la homeostasis del organismo. Estos daños pueden ser ocasionados por agentes físicos, químicos o biológicos, es decir, por daño tisular o por algún organismo patógeno; al que se le denomina antígeno. El proceso inflamatorio se desencadena por la intromisión de dichos agentes al traspasar las barreras externas del sistema inmune innato (piel y mucosas) o directamente por una herida tisular. Dependiendo de la intensidad y durabilidad de la inflamación, se pueden clasificar de dos maneras: aguda y crónica. La inflamación aguda se caracteriza por presentarse rápidamente en eventos de generación de daño espontáneo por heridas o patógenos, y es de relativamente corta duración, a diferencia de la inflamación crónica, que es de larga duración y generalmente está asociada a enfermedades crónico-degenerativas, como artritis reumatoide.

Las características básicas de la inflamación fueron descritas hace casi 2000 años por los romanos: dolor, calor, rubor y tumoración. El calor y rubor se da por la liberación de elementos vasoactivos que provocan la dilatación de los vasos sanguíneos y por lo tanto el aumento de sangre en la zona del daño. A su vez,

dicha dilatación de los vasos provoca un aumento en la permeabilidad de éstos ya que se incrementa la distancia en las uniones intercelulares de los endotelios y se da un fenómeno llamado extravasación, que es la acción de la salida de líquido al espacio intersticial (tumoración). Posteriormente se da otro fenómeno llamado diapédesis, el cual consiste en la infiltración de células fagocíticas a la zona de la lesión, éstas ejercen funciones de eliminación del patógeno y liberación de mediadores inflamatorios como citocinas y óxido nítrico, que sirven para aumentar la respuesta inflamatoria mediante el reclutamiento y activación de células efectoras.

Citocinas

Las citocinas son proteínas encargadas de la comunicación celular del sistema inmune, éstas inducen funciones de activación, proliferación, diferenciación celular, quimiotaxis y apoptosis. Las citocinas se unen a receptores específicos sobre las membranas de las células blanco, y desencadenan vías de transducción de señal y alteran la expresión génica, esta dirección hacia células blanco se da por medio de receptores de membrana específicos. Las citocinas regulan la intensidad y duración de la respuesta inmunitaria al estimular o inhibir procesos, como la secreción de otras citocinas o anticuerpos. Los principales productores de estas proteínas son las células T cooperadoras, células dendríticas y macrófagos, liberadas a partir de estas células son capaces de activar complejas redes de interacciones con respuestas fisiológicas muy importantes como la inducción de la respuesta inflamatoria. En una respuesta inmune, las citocinas raramente actúan solas, en lugar de eso una célula puede estar expuesta a múltiples citocinas las cuales pueden tener efectos combinados de sinergismo o antagonismo, dependiendo de la respuesta inmune apropiada. Aunado a esto, algunas citocinas a menudo inducen la síntesis de otras citocinas ocasionando cascadas de actividad. Las citocinas se encuentran clasificadas dentro de seis familias, las cuales tienen una gran diversidad de actividades: Interleucina-1, hematopoyetina (citocina clase I), interferón (citocina clase II), factor de necrosis tumoral, interleucina-17 y quimiocinas. Dentro de estas familias existen citocinas con efectos pro y antiinflamatorios (Tabla 2) y se secretan dependiendo de las

condiciones de la respuesta inmune. Algunas de las más comúnmente secretadas se encuentran: IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, Interferón gamma (IFN- γ), Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α) (Owen *et. al.*, 2014).

Tabla 2

Ejemplos de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias

citocinas	Función
IL-1 β	pro-inflamatoria
IFN- γ	pro-inflamatoria
TNF- α	pro-inflamatoria
IL-6	efecto dual
IL-10	anti-inflamatoria
IL-4	anti-inflamatoria

Óxido nítrico

Otro mediador importante en el proceso inflamatorio es el óxido nítrico. Éste es un radical libre que bajo condiciones atmosféricas se encuentra gaseoso y es de naturaleza inorgánica, éste se produce por la oxidación de uno de los dos nitrógenos de guanidino del aminoácido L-arginina, convertido en L-citrulina y catalizado por la enzima óxido nítrico sintasa (Marletta, 1993; Moncada *et. al.*, 1991). Aunque esta enzima está predominantemente en neuronas, las funciones del óxido nítrico en células nerviosas son comparables en importancia con las funciones en macrófagos y vasos sanguíneos. Participa en muchos procesos fisiológicos e inmunológicos; habilita a leucocitos para matar a células tumorales y bacterias, funciona como vasodilatador y neurotransmisor. El óxido nítrico es un compuesto extremadamente lábil que es convertida por el agua y oxígeno a nitritos y nitratos (Snyder y Bredt, 1992).

Se ha observado ser importante en el proceso inflamatorio ya que promueve la liberación de citocinas proinflamatorias como IFN- γ , TNF- α , y activación de células del sistema inmune como macrófagos, linfocitos T y neutrófilos (Leitao *et. al.*, 2005; Skaleric *et. al.*, 2006; Kendall *et. al.*, 2001).

Venenos y respuesta inmune

Algunas investigaciones describen la participación de las citocinas y óxido nítrico en la generación de una respuesta inflamatoria en envenenamientos por escorpiones, arañas y serpientes (Petricevich *et. al.*, 2000; Tambourgi *et. al.*, 1994). En particular la presencia de veneno de serpientes en el organismo, pone en marcha un complejo proceso inflamatorio, asociado con la liberación y/o síntesis de numerosos mediadores, los cuales interactúan de manera compleja, afectando múltiples procesos celulares y tisulares, redundando en edema, infiltrado celular, dolor y adquisición de fenotipo pro-inflamatorio (Gutiérrez, 2002). Por otro lado, el incremento de óxido nítrico en el organismo provoca hipotensión por su acción vasodilatadora, pudiendo estar involucrada en cuadros de sintomatología sistémica (Radi *et. al.*, 1991; Hogg *et. al.*, 1992). Aunado a esto, se ha postulado que la generación de edema por mordeduras de serpientes, entre otras cosas, es causada por eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos) derivados del ácido araquidónico, en función de la miotoxicidad y ácidos grasos liberados por ésta, dichas moléculas cumplen diversas funciones como mediadores del sistema nervioso, respuesta inmune y eventos de inflamación.

Concordando con lo anterior, el desarrollo de edema por mordeduras de serpientes del género *Bothrops*, le es atribuido a hemorraginas, proteasas que activan procesos en la cascada de coagulación, fosfolipasas A₂, péptidos vasoactivos, por la activación de células inmunes y daño generado, lo que deriva en el incremento de citocinas y óxido nítrico (Gutiérrez *et. al.*, 1989; Brunton *et. al.*, 1996).

En 1998, Barros y colaboradores realizaron experimentos con veneno de la serpiente *Bothrops atrox*, de los cuales consistieron en inocular a ratones el veneno de ésta por vía intraperitoneal y observar la dinámica de citocinas. Las citocinas IL-6, IL-10 e IFN- γ , tuvieron un incremento máximo a las 4 horas posterior a la inyección. El incremento de TNF comenzó después de 4 horas posterior a la inoculación y disminuyó a partir de las 6 horas, a su vez los niveles de nitritos comenzaron a incrementar a partir de las 2 horas. Lo que indica que el veneno realiza un proceso de activación de diversas células y mediadores pro y

antiinflamatorios del sistema inmune. De igual manera es el caso del veneno de la serpiente *B. jararaca*, que también provoca un incremento de citocinas como IL-10 e IFN- γ (Petricevich *et. al.*, 2000).

Por otro lado, en envenenamientos causados por el género *Crotalus*, de igual forma se observa que una de las principales complicaciones es la generación de un severo cuadro de edema en la zona de la mordedura. Se han realizado estudios *in vitro* con el veneno de *Crotalus durissus terrificus* en modelo murino, para cuantificar el nivel de mediadores inflamatorios posterior a la inoculación del veneno. Se observó un incremento en la producción de mediadores, como IL-6, TNF, después de 24 y 48 horas, respectivamente, además de una elevación máxima en los niveles de IFN- γ y óxido nítrico a las 96 horas. Por otro lado, los niveles de IL-10 no fueron alterados con ninguna de las diferentes cantidades de veneno (Hernández *et. al.*, 2005).

Aunado a esto, Román y colaboradores (2015), realizaron ensayos de actividad edematizante con el veneno de *Agkistrodon bilineatus*, observaron que con dosis de 0.26 μ g de veneno se da un incremento progresivo en la generación de edema, alcanzando un pico máximo aproximadamente a los 50 minutos, disminuyendo gradualmente hasta aproximadamente 4 horas. Siendo esta especie una de las que causa más edema dentro del género *Agkistrodon*. En modelos experimental y clínico, el veneno tiene el potencial de generar un severo cuadro de edema.

Las familias proteicas presentes en los venenos de vipéridos a las que principalmente se les atribuye la actividad edematizante son las fosfolipasas A₂ (PLA₂), metaloproteasas (SVMP) y serinoproteasas (SP) (Gutiérrez y Lomonte, 2013; De Freitas *et al.* 2009; Mackessy, 2010). Dichas familias proteicas están presentes en alto porcentaje en el veneno de *A. bilineatus*, conformándolo en un 83 %. Teniendo las metaloproteasas un 24.5 %, las PLA₂ un 42 % y las serinoproteasas un 16.5 % (Lomonte *et. al.*, 2014).

5. Justificación

En mordeduras de *Agkistrodon bilineatus* en humanos se ha observado una severa generación de edema en la zona de la mordedura, siendo uno de las principales complicaciones en dichos envenenamientos. Éste puede agravarse hasta darse un síndrome compartimental y comprometer las extremidades afectadas. El presente trabajo proporcionará información acerca de los componentes del veneno involucrados en la generación de edema, así como un acercamiento de su mecanismo de acción.

6. Hipótesis

El veneno completo de *Agkistrodon bilineatus* y sólo algunas de sus fracciones tendrán actividad edematizante, de igual manera, la inyección de éstas por vía intraperitoneal a ratones, estimulará el aumento de mediadores proinflamatorios, como citocinas y óxido nítrico.

7. Objetivos

7. 1. General

Aislar y caracterizar los componentes con actividad edematizante del veneno de *Agkistrodon bilineatus*.

7. 2. Específicos

- Obtener la Dosis Letal Media (DL₅₀) y la actividad edematizante (DME) del veneno completo en ratones.
- Fraccionar el veneno con base a su peso molecular y carga.
- Detectar fracciones edematizantes en ratones y medir la DME de las fracciones positivas
- Caracterizar la actividad proteolítica y fosfolipasa del veneno completo y fracciones
- Cuantificar mediadores de inflamación: TNF- α , IL-6, IL-10, IFN- γ y óxido nítrico, del suero de ratones expuestos a veneno completo y fracciones.

8. Estrategia experimental

La estrategia experimental se detalla en la Figura 3

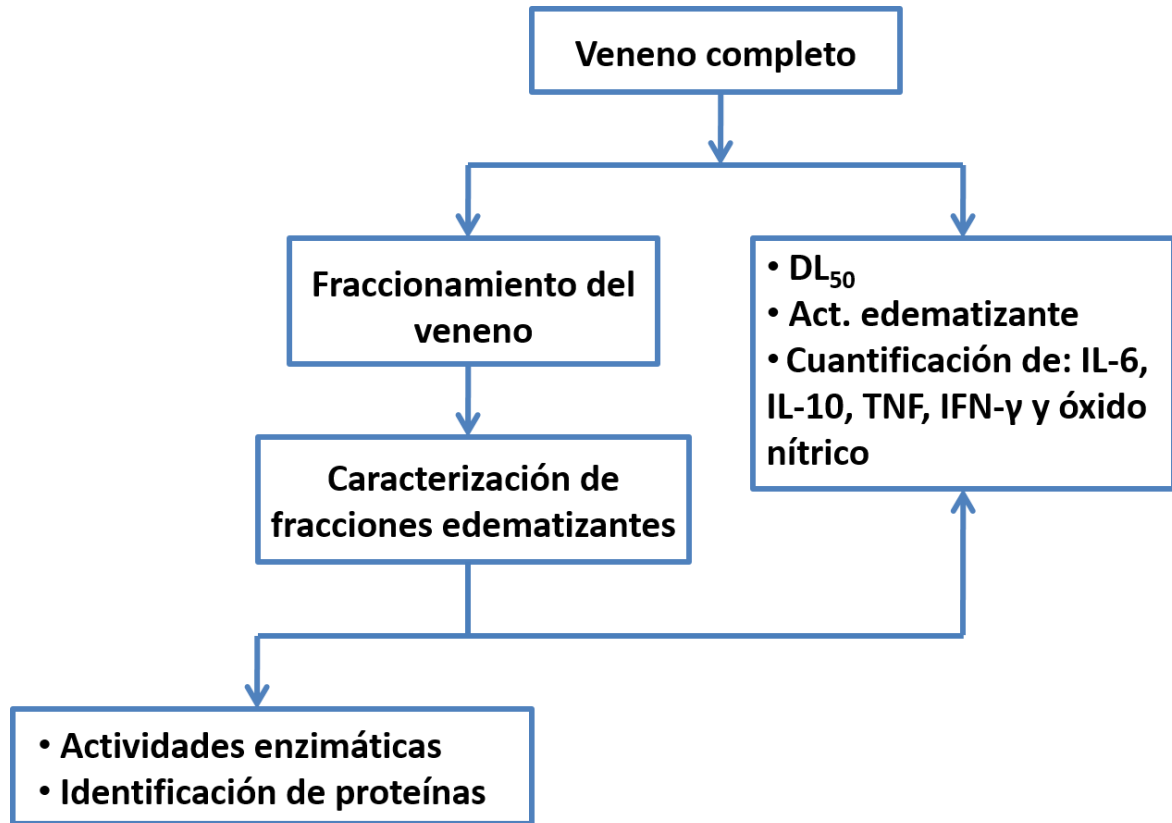


Figura 3. Estrategia experimental para la realización del presente trabajo.

9. Materiales y métodos

9.1. Serpientes y venenos

Se utilizó una mezcla de veneno de seis lotes de *A. bilineatus* provenientes de diferentes localidades y herpetarios, las cuales se detallan en la tabla 3. El lote B2016, es una mezcla de veneno de seis individuos adultos provenientes del estado de Morelos. Los venenos se mezclaron y resuspendieron en PBS para su homogenización y posterior liofilización.

El veneno se obtuvo manualmente mediante técnicas de ordeña estandarizadas en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano (IBt-UNAM). Posterior a la ordeña, el veneno fue recuperado con acetato de amonio 20 mM pH 4.7 y centrifugado a 13,000 rpm durante 3 minutos. En seguida se recuperó el sobrenadante, el cual se homogenizó y se mantuvo a -70°C para su posterior liofilización. El veneno liofilizado se almacenó a 5°C .

Tabla 3

Identidad y procedencia de los individuos utilizados para la mezcla de veneno.

Clave	Especie	Herpetario	Estado
HK036	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	IBt-UNAM	Colima
HK103	<i>A. bilineatus</i>	IBt-UNAM	Nayarit
B14-Ab05	<i>A. bilineatus</i>	FC-UNAM	Guerrero
B09-Ab09	<i>A. bilineatus</i>	FC-UNAM	Chiapas
B05-Ab08	<i>A. bilineatus</i>	FC-UNAM	Chiapas
B2016	<i>A. bilineatus</i>	“Iguana Negra”	Morelos

9. 2. Cuantificación de proteínas del veneno

1) Peso seco: en una balanza analítica se pesa la cantidad de veneno liofilizado deseado, y es resuspendido en solución buffer hasta alcanzar la concentración deseada.

2) Absorbancia a 280 nm: se basa en cuantificar la cantidad de proteína presente en la muestra haciendo pasar un haz de luz por una celda (1 cm) con una longitud de onda de 280 nm a través de ella. El valor corresponde a la absorción de luz de los aminoácidos aromáticos presentes en las proteínas (tirosina, triptófano y fenilalanina). El valor de la lectura de la absorbancia es igual a la concentración de la muestra (mg/ml) si se asume un coeficiente de extinción molar de 1.

3) Ácido bicinconínico (BCA): Se da una reacción de oxido-reducción por la interacción del enlace peptídico con Cu^{+2} (ión cúprico) en un medio alcalino, produciendo Cu^{1+} (ión cuproso). Éste es detectado con un reactivo altamente selectivo denominado ácido bicinconínico y produce una reacción colorimétrica, que en su forma de sal de sodio soluble en agua, es específico para el ión Cu^{1+} . Se ha reportado que la reacción del ión cúprico se da mediante cisteína, triptófano y tirosina, que son los principales responsables de la formación del color púrpura, formado por la interacción de dos moléculas de BCA con el ión Cu^{1+} (Wiechelman *et. al.*, 1988).

9. 3. Exclusión Molecular

Exclusión molecular o filtración en gel es una técnica que permite la separación de moléculas presentes en una misma muestra con base a su tamaño molecular por medio de una fase móvil (PBS) y una estacionaria (resina). La fase estacionaria está constituida por dextrán, un polímero altamente hidratable en el cual se forma una capa de hidratación. Las moléculas de alto peso molecular, por su tamaño, no interactúan con dicha capa formada en el dextrán, por lo tanto, fluyen entre los espacios de la resina y eluyen primero. En cambio, las moléculas de bajo peso molecular son capaces de penetrar e interactuar con dicha capa de hidratación y se ven retrasadas en el tiempo de elución. Para el fraccionamiento se hizo pasar por una columna de vidrio (0.9 cm x 1.97 m; 125 ml de volumen) Sephadex G-75 entre 60 y 100 mg del veneno de *Agkistrodon bilineatus* disuelto en PBS. Las fracciones fueron colectadas mediante un colector de muestras BIO RAD modelo 2128. Posteriormente las fracciones fueron dializadas contra acetato de amonio 20 mM pH 4.7 y liofilizadas.

9. 4. Cromatografía de intercambio iónico

La separación se basa en la interacción reversible de moléculas cargadas con una resina con grupos funcionales de carga opuesta.

La primera etapa de la técnica es un equilibrio en el cual el intercambiador iónico se encuentra en una condición apropiada de pH y fuerza iónica, que permitirá la unión de las moléculas de la muestra. Posteriormente, se da el acoplamiento

reversible de la muestra con la resina cargada y las moléculas que no se unen a ésta aluyen de una forma rápida en una fase de lavado. Consecutivamente se lleva a cabo el desacople de la muestra con la resina aumentando la fuerza iónica con un gradiente del buffer de elución (NaCl) y desfavoreciendo la formación del enlace iónico con la resina.

Finalmente las muestras se separarán en función a un gradiente de la molaridad del buffer de elución y consecuentemente aumento de la fuerza iónica. Así la muestra tendrá mayor interacción iónica con el buffer y se desacoplará de la resina. Las moléculas mayormente cargadas necesitarán más sales para eluir. Posteriormente, las fracciones se dializan contra acetato de amonio 20 mM pH 4.7 y se liofilizan.

9. 5. RP-HPLC (cromatografía líquida de alta resolución fase reversa)

El sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución en fase reversa (RP-HPLC), se basa en el fraccionamiento de los componentes del veneno con base a su índice de hidrofobicidad en una columna C18 (fase estacionaria) y una fase móvil que permite la elución de la muestra con un flujo constante de presión proporcionado por una bomba. Los componentes con un índice bajo de hidrofobicidad eluyen primero y los más hidrofóbicos posteriormente. Como fase móvil se utilizan gradientes de Buffer A: H₂O +0.1 % de TFA y Buffer B: CH₃CN + 0.1 % de TFA, con un método de corrida de 0 % a 70 % de H₃CN en 97 min, con flujo de 1 ml/min.

9. 6. Actividad proteolítica sobre azocaseína

Para determinar la actividad proteasa de los venenos se utilizó como sustrato azocaseína. Se mezcla 100 µl de azocaseína (a una concentración de 10 mg/ml) con determinada cantidad de veneno y se incuba por 30 min a 37°C. Las proteasas degradan a la caseína y liberan un grupo Azo (grupo funcional formado por dos anillos aromáticos) acoplados a ésta. Posteriormente, se detiene la reacción adicionando C₂HCl₃O₂ al 30 %. La muestra se centrifuga a 8000 rpm y se toman 150 µl del sobrenadante para ponerlos en placas de 96 pozos y realizarse la reacción colorimétrica adicionando 150 µl de NaOH 0.5 M. Posteriormente se

realiza la lectura a una longitud de onda de 450 nm. Finalmente los datos fueron expresados en unidades específicas (U/mg), en donde una unidad (U) se define como el cambio de 0.2 en la absorbancia a 450 nm por minuto, como describe Wang *et. al.* 2004, modificado por Gutiérrez *et. al.* 2008.

9. 7. Actividad fosfolipasa A₂

Es un experimento que mide la actividad enzimática de tipo fosfolipasa A₂ por medio de un ensayo colorimétrico utilizando como sustrato 4-nitro-3-octanoiloxo-ácido benzoico (NOBA) a una concentración de 1 mg/ml en 0.01 M Tris-HCl+0.1 M NaCl+0.01 M CaCl₂ pH 8.0. Se adicionaron a cada pozo 200 µl de buffer, posteriormente 25 µl de sustrato y 25 µl de muestra a la concentración deseada para obtener un volumen de reacción de 250 µl. Se realizaron lecturas cada 3 minutos durante 30 minutos y se graficaron los datos en una regresión lineal. Los resultados fueron expresados como nmolas de producto por minuto por miligramo de muestra (U/mg).

9. 8. Dosis Mínima Edematizante (DME)

Se determinó inyectando dosis diferentes de veneno, por vía subcutánea, en la almohadilla plantar trasera derecha de ratones. Se midió el diámetro de las almohadillas utilizando un Vernier, cada 10 minutos durante una hora y posteriormente cada 30 minutos. Se determinó el diámetro (D) de la almohadilla inyectada con veneno, con relación a la almohadilla izquierda (inyectada con PBS). El porcentaje de edema (E%) se determinó conforme la siguiente ecuación:

$$\%E = \left[\frac{D \text{ (pata envenenada)}}{D \text{ (pata control)}} \right] \times 100 - 100$$

Los resultados fueron expresados como Dosis Mínima Edematizante (DME), que se define como la cantidad de veneno que causa el 30% de edema en un determinado tiempo. (Yamakawa *et. al.* 1976, modificado por Gutiérrez *et. al.*, 1986).

9. 9. Dosis Letal Media (DL₅₀)

Se expresa como Dosis Letal Media (DL₅₀), la cual se define como la cantidad de veneno (µg) necesaria para matar al 50% de una población de animales experimentales. La potencia letal del veneno se determinó inyectando por vía intraperitoneal (i.p.) diferentes dosis de veneno a grupos de ratones en un volumen final de 0.5 mL. Después de 24 horas se registrará porcentaje de mortalidad por dosis (Theakson y Reid, 1983). El análisis de datos se realizó con una regresión no lineal, para la cual el porcentaje de mortalidad del grupo es graficado en función del logaritmo de la dosis inoculada.

9. 10. Geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Es un método por el cual se separan las proteínas sometiéndolas en un campo eléctrico en una matriz de acrilamida/bisacrilamida, conforme a su peso molecular, previamente tratadas con dodecil sulfato sódico (SDS). La caracterización de las fracciones se realizará utilizando un gel separador a 15% y gel concentrador al 4%, en los cuales se cargará 25 µg de cada muestra por carril disueltos en buffer PBS, en condiciones reductoras (adicionando β-mercaptoetanol para romper puentes disulfuro) y no reductoras (condiciones nativas). El voltaje con el cual se iniciará la corrida será de 80 volts dentro del gel concentrador, y posteriormente 120 volts dentro del gel separador, durante aproximadamente una hora y media dentro de una cámara con "tank buffer" (0.25 M tris + 0.19 M glicina + 0.1% de SDS) al 10%. Los geles se teñirán en solución de Azul brillante Coomassie G-250 (25% de isopropanol + 10% ácido acético + 0.2% de azul de Coomassie G-250) y se desteñirán con solución descolorante (10% metanol + 10% ácido acético).

9. 11. Cuantificación de citocinas

La cantidad de citocinas presentes en los sueros de ratones expuestos al veneno y/o a las diferentes fracciones se analizó mediante la prueba de ELISA descrita por Schumacher *et. al.* 1988. En resumen: a las placas de ELISA se les añadieron 100 µl (1 µg/mL) de anticuerpos monoclonales de captura anti-IL-6, anti-IL-10 o anti-IFN-γ en buffer carbonato de sodio 0.1 M, pH 8.2 e incubadas durante 6

horas a temperatura ambiente. Los pozos se lavaron con PBS/tween-20 al 0.1% y se bloqueará con 100 µL de suero fetal bovino en PBS al 10% por dos horas a temperatura ambiente. Después del lavado, se adicionaron 50 µl de sueros tratados en los pozos por duplicado y se incubaron durante 18 horas a 4°C. Posteriormente se hizo un lavado y se incubó con 100µl (2µg/ml) de anticuerpos monoclonales de detección biotinilados anti-IL-6, anti-IL-10 o anti-IFN-γ como segundo anticuerpo durante 45 min a temperatura ambiente. Después del último lavado, la reacción fue revelada por la adición de ortofenilendiamina a cada pozo. La densidad óptica fue medida en un lector de microplaca con un filtro de longitud de onda de a 405 nm. La cantidad de citocinas contenidas en cada muestra fue medida conforme a una curva estándar establecida con la citocina recombinante correspondiente, expresada en ng/ml

9. 12Cuantificación de nitritos

Los niveles de nitritos en suero de ratón es un indicador de la producción de Óxido Nítrico (NO) y fueron cuantificado conforme está descrito (Schmidt *et. al.*, 1989). En resumen: 25 µL de cada muestra de suero de ratón expuestos al veneno y/o a las diferentes fracciones se colocaron en una placa de fondo plano Después se agregaron 80 µl de reactivo Griess (0.1% diclorhidrato de naftilendiamina, 1% sulfanilamida, 3% de H₃PO₄) a cada pozo. Se incubó durante 20 minutos y hace lavados con agua corriente. Posteriormente se deja secar durante 24 horas y se añadieron 200 µl de alcohol al 20 %. La densidad óptica se mide a 540 nm en un microplaca. Las concentraciones de NO₂⁻ se determinaron usando una curva estándar de NaNO₃ en un rango de 1.25 a 270 nM, expresadas como umol/ml.

10. Resultados

10. 1. Rendimiento de la mezcla de venenos

Se mezclaron 130 mg de cada veneno y se resuspendieron en acetato de amonio 20 mM pH 4.7. Posteriormente se homogenizaron y liofilizaron. Se obtuvieron cerca de 800 mg para la realización del proyecto.

10. 2. SDS- PAGE

Los perfiles electroforéticos de los individuos que conforman la mezcla de venenos presentaron similitud entre sí. En todos se observan tres bandas de alto (40-70 kDa), en muy baja proporción una de mediano (25 kDa) y dos de bajo peso molecular (14-15 kDa). (Figura 4).

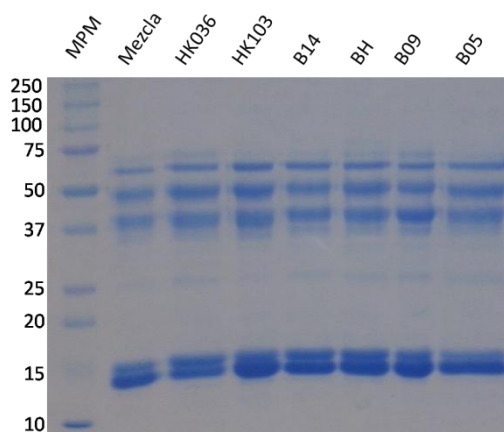


Figura 4. Gel de poliacrilamida al 12.5 % de los venenos que conforman la mezcla, en condiciones reductoras; 25 µg por carril.

10. 3. Filtración en gel

En una columna de vidrio (0.9 cm³ x 1.97 m) Sephadex G-75 con PBS 1X como buffer de elución se corrió: azul de dextrán (3.8 mg), ovoalbúmina (4.1 mg), lisozima (4 mg) y NaCl (58.4 mg) como marcadores de peso molecular. El azul de dextrán fue el primero en eluir, a los 37.8 mL, posteriormente ovoalbúmina a los 45.9 mL, lisozima a los 68.4 mL y por último NaCl a los 100.8 mL. El volumen muerto fue de 37.5 mL. (Figura 5).

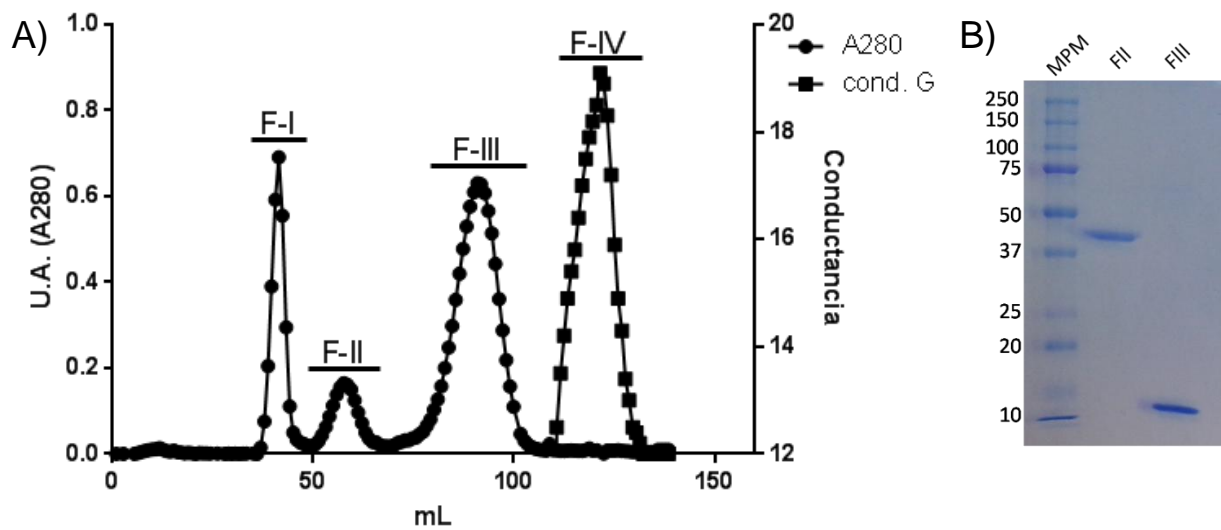
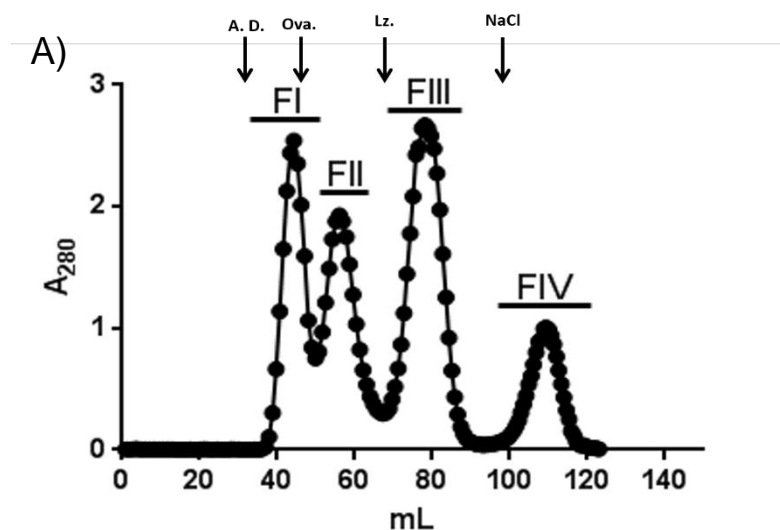


Figura 5. A) Cromatograma de filtración en gel de marcadores de peso molecular. FI; azul de dextrán, FII; ovoalbúmina, FIII; lisozima y FIV; NaCl. Columna Sephadex g75. **B) Gel de poliacrilamida al 12.5 % de las fracciones 2 y 3 en condiciones reductoras; 10 µg por carril.**

Posteriormente se corrieron en las mismas condiciones 80.5 mg de veneno de *Agkistrodon bilineatus* resuspendido en 2 mL de PBS y se pudo observar la elución de cuatro fracciones. La primera fracción eluyó a los 37.5 mL, posteriormente la fracción dos a los 50.5 mL, la fracción tres a los 66 mL y por último la fracción cuatro a los 87 mL. Figura 6A. La fracción uno (FI) presenta componentes de peso molecular de entre 45 y 70 kDa en condiciones reductoras y entre 60 y 100 kDa en condiciones no reductoras, la fracción dos (FII) se observó componentes en un peso alrededor de 37 kDa en ambas condiciones, la fracción tres (FIII) alrededor de los 15 kDa en condiciones reductoras y 15 y 30 kDa en no reductoras, la fracción cuatro (FIV) no pareció ser de naturaleza proteica. Figura 6B y C.



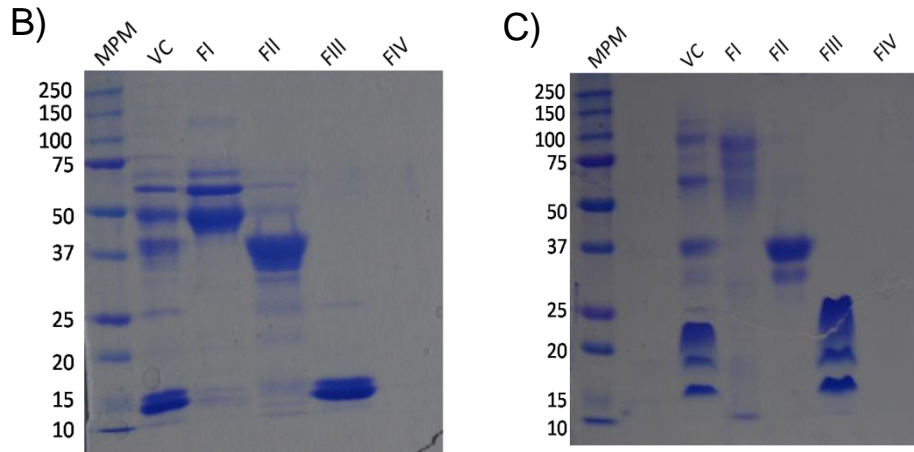


Figura 6. A) Cromatograma de filtración en gel del veneno de *Agkistrodon bilineatus*. Columna Sephadex G-75 **B) Gel de poliacrilamida al 12.5 % de las fracciones obtenidas en condiciones reductoras C) y no reductoras; 25 µg por carril.**

10. 4. Actividad proteolítica

Se realizó la actividad proteolítica sobre Azocaseína del veneno completo y las fracciones obtenidas de la cromatografía en filtración en gel. El veneno completo, la FI y la FII mostraron tener actividad proteolítica sobre azocaseína. La fracción tres (FIII) no mostró tener actividad de este tipo. (Figura 7).

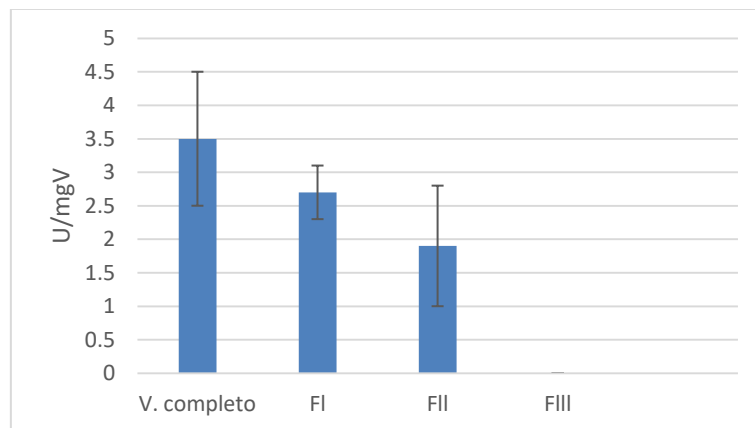


Figura 7. Actividad proteolítica del veneno completo y las fracciones de filtración en gel. D. E. Desviación estándar. N=6. 10 µg leído a 30 minutos a 450 nm.

Por otra parte se probó el veneno completo y las fracciones con EDTA, un agente quelante, el cual tiene como función arrestar iones que funcionan como cofactores, importantes para la actividad enzimática de ciertas proteínas como las

metaloproteasas, en este caso de las metaloproteasas. Los resultados mostraron que la actividad proteolítica del veneno completo no sólo corresponde exclusivamente a las metaloproteasas, ya que la fracción II, la que correspondería a las serinoproteasas también presentaron tener actividad. (Figura 8).

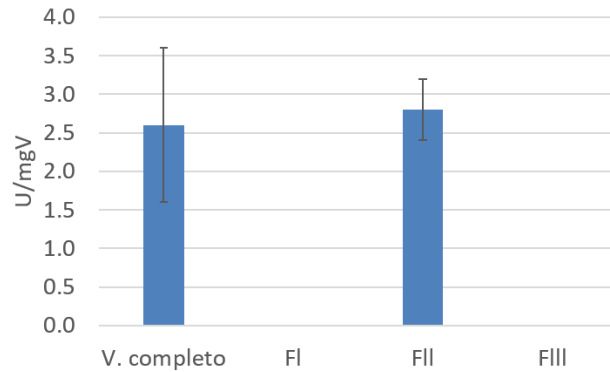


Figura 8. Actividad proteolítica del veneno completo y las fracciones de filtración en gel. D. E. Desviación estándar. N=6. 10 µg leído a 30 minutos. Incubado con 8 mM de EDTA.

10. 5. Actividad fosfolipasa A₂

Para evaluar la actividad fosfolipasa A₂ del veneno completo y la FIII se realizó un ensayo sobre sustrato NOBA. Tanto el veneno completo como la FIII presentaron actividad fosfolipasa A₂ con 40.6 U/mgV y 232.3 U/mgV, respectivamente. (Figura 9).

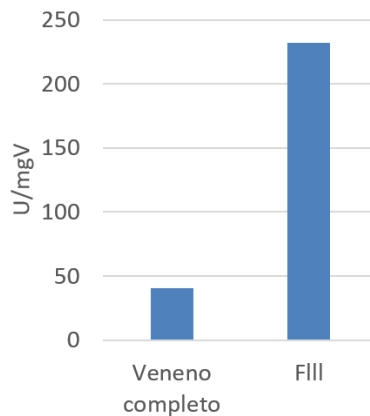


Figura 9. Actividad fosfolipasa A₂ del veneno completo y la fracción 3 de filtración en gel

10. 6. Dosis Letal Media (DL₅₀)

Se determinó la letalidad del veneno completo en la cepa CD1 y la cepa BALB/c; en esta última por vía intravenosa e intraperitoneal. Posterior al fraccionamiento

por filtración en gel se determinó la letalidad de la FI y la FIII por vía intraperitoneal. La letalidad del veneno completo en ambas cepas y vías de administración osciló entre 30.7 y 45.1 µg/ratón, para la FI fue de 21.6 µg/ratón, mientras que para la FIII la DL₅₀ se encuentra por arriba de los 100 µg. (Tabla 4).

Tabla 4

Letalidad del veneno completo y fracciones de filtración en gel. *DL₅₀.- Dosis de veneno necesaria para matar al 50 % de una población experimental. **Intervalo de confianza del 95 %.

Muestra	Cepa	Vía de admin.	DL ₅₀ (µg/ratón)*	I. C.**
V. completo	CD1	intravenosa	30.7	30.6 a 30.8
V. completo	BALB/c	intravenosa	37.6	35.5 a 39.7
V. completo	BALB/c	intraperitoneal	45.1	39 a 51.2
FI	BALB/c	intraperitoneal	21.6	13.4 a 29.8
FII	BALB/c	intraperitoneal	>150	-
FIII	BALB/c	intraperitoneal	90.2	82.2 a 98.4
FIV	BALB/c	intraperitoneal	>150	-

10.7. Dosis Mínima Edematizante (DME)

Se determinó la DME del veneno completo y la detección de las fracciones edematizantes provenientes de la cromatografía de filtración en gel en ratones de la cepa BALB/c a los 60 minutos. Se observó que la DME del veneno completo fue de 0.13 µg/ratón (tabla 5A; figura 10A), mientras que para las fracciones al inocular 0.5 µg/ratón de cada una, se observó que la FI y la FIII fueron las que presentaron actividad de este tipo. (Tabla 5B. Figura 10B).

Tabla 5

A) Dosis y porcentaje de edema del veneno completo a los 60 minutos. **B)** Porcentaje de edema para cada fracción con una dosis de 0.5 µg/ratón a los 60 minutos

A)

Dosis (µg/ratón)	% de edema	D. E.
1	70.8	3.7
0.5	49.1	5.8
0.25	41.3	5.5
0.125	26.4	5.9

B)

Fracción	% edema	D. E.
L	51.3	7.1
II	0	0
III	36.6	4.6
Lv	9.5	8.9

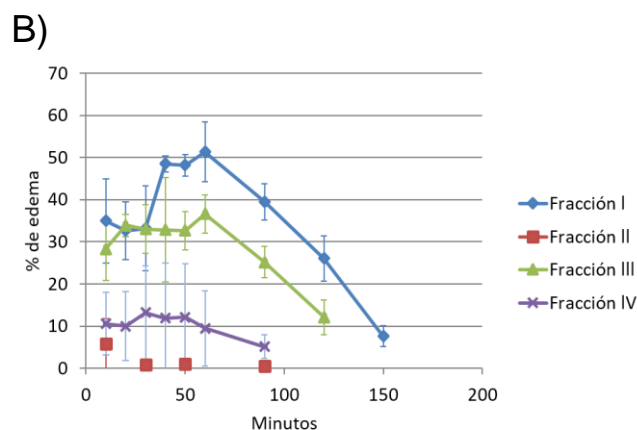
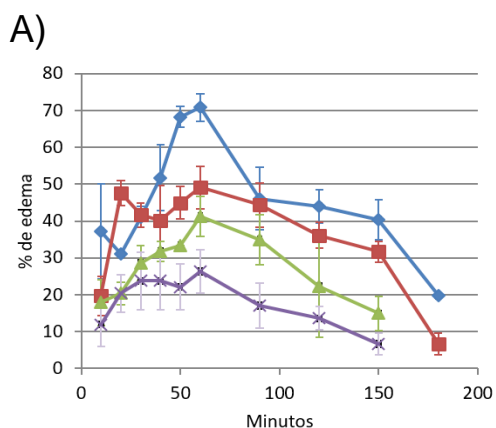


Figura 10. A) Cinética de la formación de edema del veneno completo con diferentes dosis. **B)** Cinética de la formación de edema para cada fracción con una dosis de 0.5 µg/ratón.

Posterior a la identificación de las fracciones se determinó la Dosis Mínima Edematizante a los 60 minutos de éstas. Se observó que para la FI la DME fue de 0.1 µg, mientras que para la FIII fue de 0.4 µg. (Tabla 6A y B. Figura 11A y B).

Tabla 6

A) Dosis y porcentaje de edema de la fracción I. B) Fracción III

A)

Dosis	% de edema	D. E.
0.5	51.3	7.1
0.25	42.1	8.4
0.125	28.2	5.3
0.0625	25.1	5.1

B)

Dosis	% de edema	D. E.
0.5	32.6	4.6
0.25	26.4	4.8
0.125	20	1.1

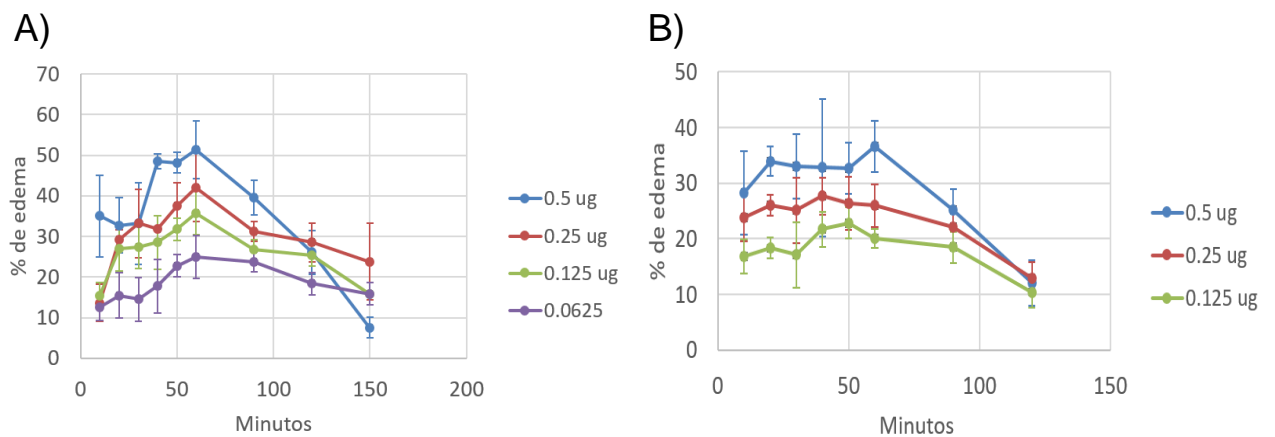


Figura 11. A) Cinética de la formación de edema de la fracción I con diferentes dosis. **B)** Cinética de la formación de edema de la fracción III con diferentes dosis.

10. 8. Cuantificación de óxido nítrico

Posterior a la inoculación del veneno completo (9 µg), FI (1.9 µg) y FIII (3.8 µg) a ratones de la cepa BALB/c por vía intraperitoneal se extrajeron los sueros y de éstos se cuantificó óxido nítrico. Para los ratones expuestos a veneno completo se observó en un rango de entre 18 y 30 µM NaNO₂/ml, siendo el pico máximo entre las 2 y 4 horas. Para la FI se mantuvo en un rango entre 20 y 39 µMolas NaNO₂/ml, con un pico máximo a las 2 horas. Correspondiente a la FIII se observó un aumento mayor en las concentraciones de óxido nítrico que en los ratones expuestos con veneno completo y FI, al menos a los primeros tiempos. El óxido nítrico se mantuvo entre 17 y 75 µM NaNO₂/ml, siendo el pico máximo a las 2 horas. (Figura 12).

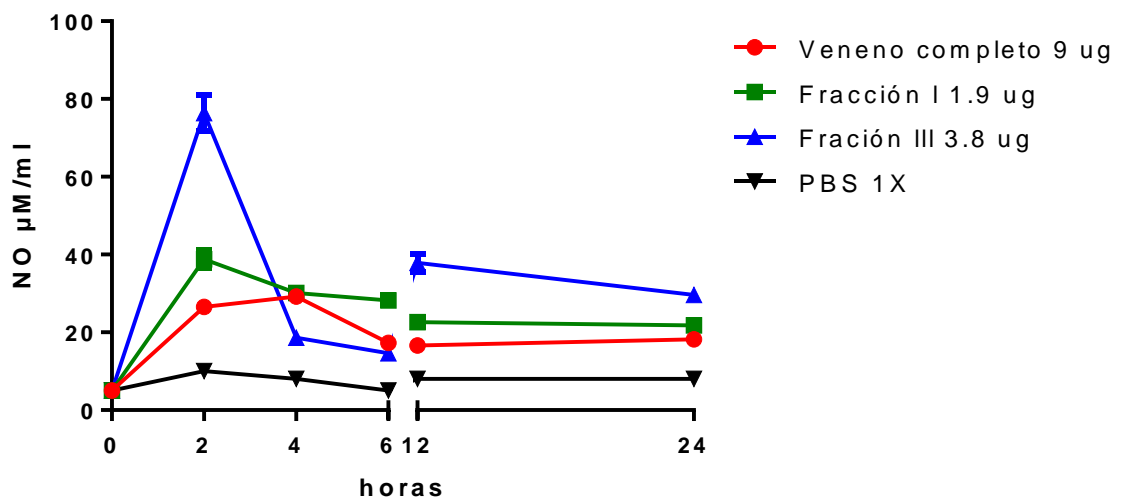


Figura 12. Producción de óxido nítrico del suero de ratones inyectados con veneno completo, FI y FIII, a diferentes tiempos. Los datos fueron expresados en umolas/ml. Cada punto comprende a los sueros de 3 ratones.

10. 9. Cuantificación de citocinas

Con las mismas muestras las cuales se obtuvieron por a la inoculación del veneno completo (9 µg), FI (1.9 µg) y FIII (3.8 µg) se cuantificaron IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10 e IFN-γ. Para IL-1β; la FI y la FIII fueron los que provocaron un mayor aumento en la concentración a las 2 horas, para IL-4; la FIII produjo mayor aumento a las 12 horas, IL-6 obtuvo mayor aumento por la estimulación del veneno completo y FIII a las 12 horas, para IL-10, el mayor aumento se observó las 24 horas y fue mayormente estimulada por FIII, y por último IFN-γ se observó en un máximo de concentración a las 2 horas y estimulada por FI. (Figura 13).

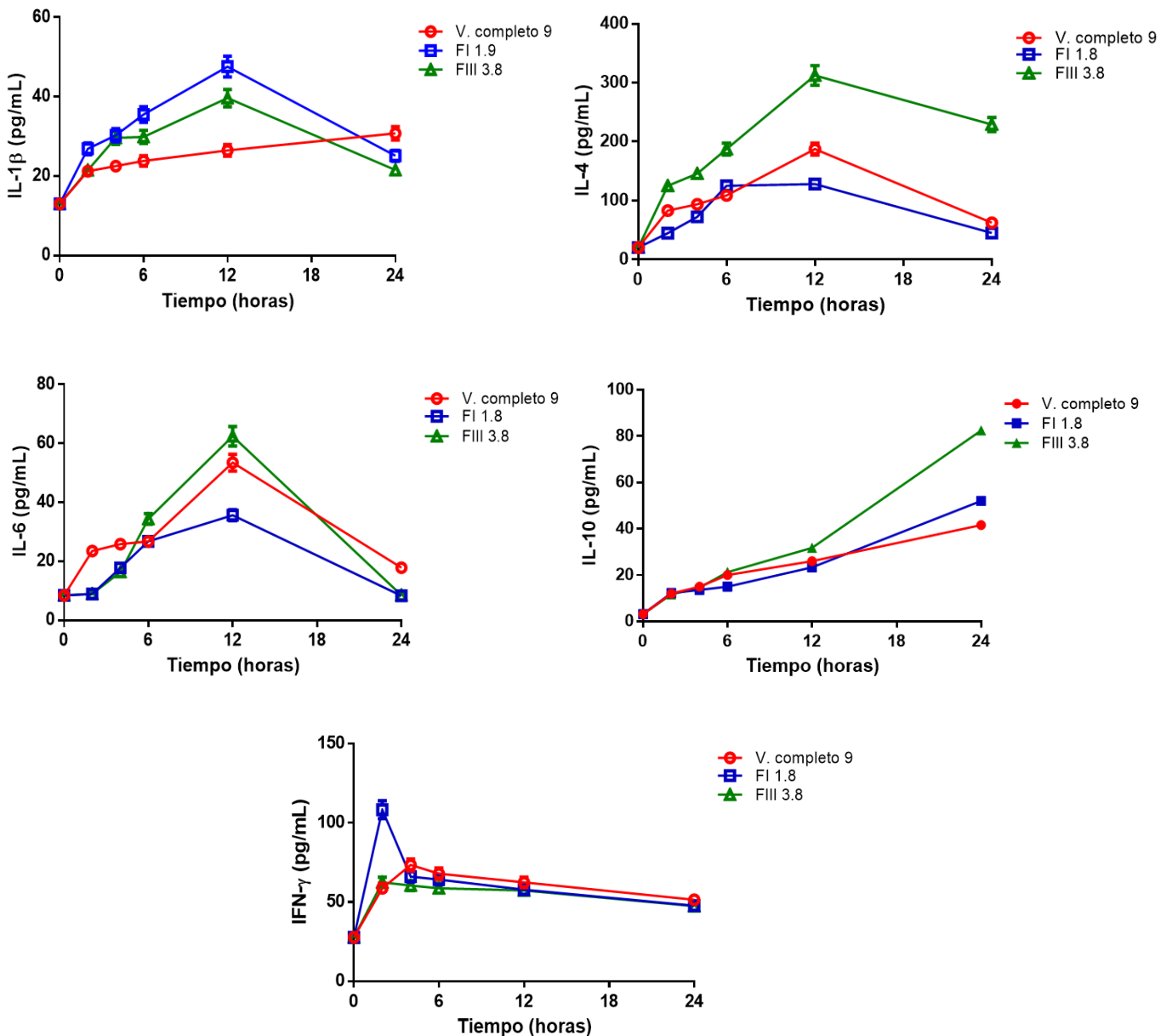


Figura 13. Cinética de la producción de citocinas por el método de ELISA. Datos expresados en pg/ml. Los rangos mínimos de detección fueron de 1 g/ml para IL-1β, IL-4, IL-6 e IL-10 y 10 pg/ml para IFN-γ. Cada punto comprende a los sueros obtenidos de 3 ratones (n=3)

10. 10. Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC)

Se realizó un RP-HPLC de las fracciones FI Y FIII para observar si había contaminación con algún otro componente del veneno. Se cargaron 3 mg de cada una con el método y condiciones antes descritas. En el cromatograma de la FI se observaron picos con un tiempo de retención entre los 65 y 87 minutos, lo que con base a la experiencia en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón, eluyen las metaloproteasas. (Figura 14).

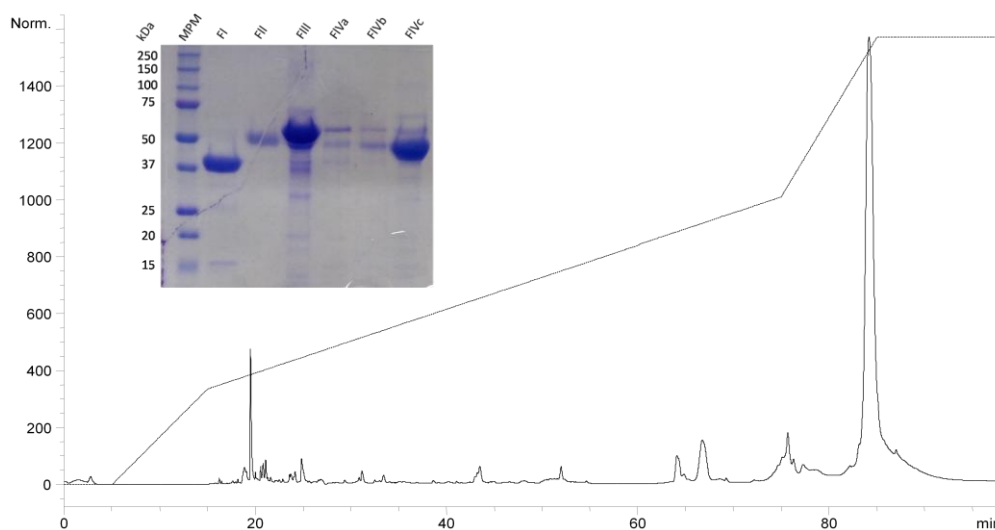


Figura 14. Cromatografía de la fracción FI. C-18 analítica. Buffer A: H₂O +0.1 % de TFA, Buffer B: CH₃CN + 0.1 % de TFA. Gradiente de H₃CN de 0 %. Con un gradiente de 0 % a 70 % en 97 min, con flujo de 1 ml/min. 3 UA₂₈₀ cargados. Gel en condiciones reductoras, 15 µg cargados.

En el caso de la FIII se recuperaron picos alrededor de los 60 minutos, tiempos de elución característicos de otras fosfolipasas evaluadas en el laboratorio. (Figura 15).

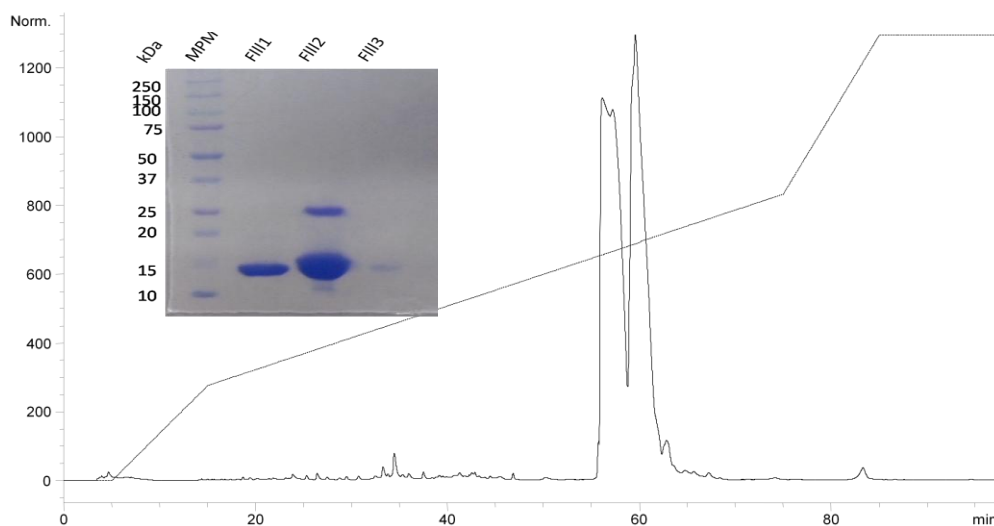


Figura 15. Cromatografía de la fracción FIII. C-18 analítica. Buffer A: H₂O +0.1 % de TFA, Buffer B: CH₃CN + 0.1 % de TFA. Gradiente de H₃CN de 0 %. Con un gradiente de 0 % a 70 % en 97 min, con flujo de 1 ml/min. 3 UA₂₈₀ cargados. Gel en condiciones reductoras, 20 µg cargados.

En el cromatograma de la FIV se pudieron observar ocho picos que presentaron un tiempo de elución entre los 10 y 40 minutos. Posteriormente se tomó la fracción FIV-4 para realizar un análisis de espectrometría de masas, la cual resultó con un peso de 1037 Da, basados en el proteoma realizado por Lomonte y colaboradores (2014), podría referirse a un Péptido Potenciador de Bradicinina (PPB), el cual eluye en el mismo tiempo de retención y con similar peso molecular. (Figura 16).

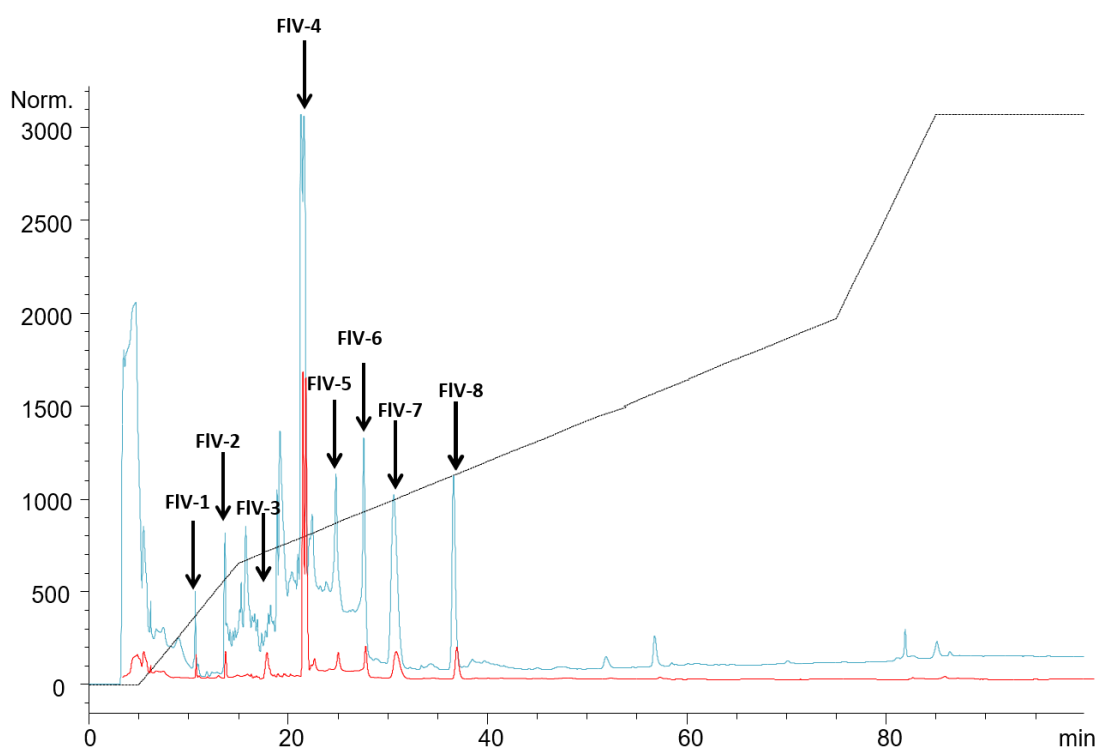


Figura 16. Cromatografía de la fracción FIV. C-18 analítica. Buffer A: H₂O +0.1 % de TFA, Buffer B: CH₃CN + 0.1 % de TFA. Gradiente de H₃CN de 0 %. Con un gradiente de 0 % a 70 % en 97 min, con flujo de 1 ml/min. 2.4 UA₂₈₀ cargados.

10. 11. Cromatografía de intercambio iónico

Se realizó una cromatografía de intercambio aniónico y catiónico de las FI y la FIII, respectivamente, para obtener fracciones con actividad biológica. Para la FI se pudieron observar cuatro fracciones que eluyeron entre los 10 y 80 minutos corrida. Figura 17. Posteriormente se evaluó la actividad proteolítica de dichas

fracciones, las cuales presentaron un rango de actividad de entre 0.9 a 4.4 U/mg. (Tabla 7).

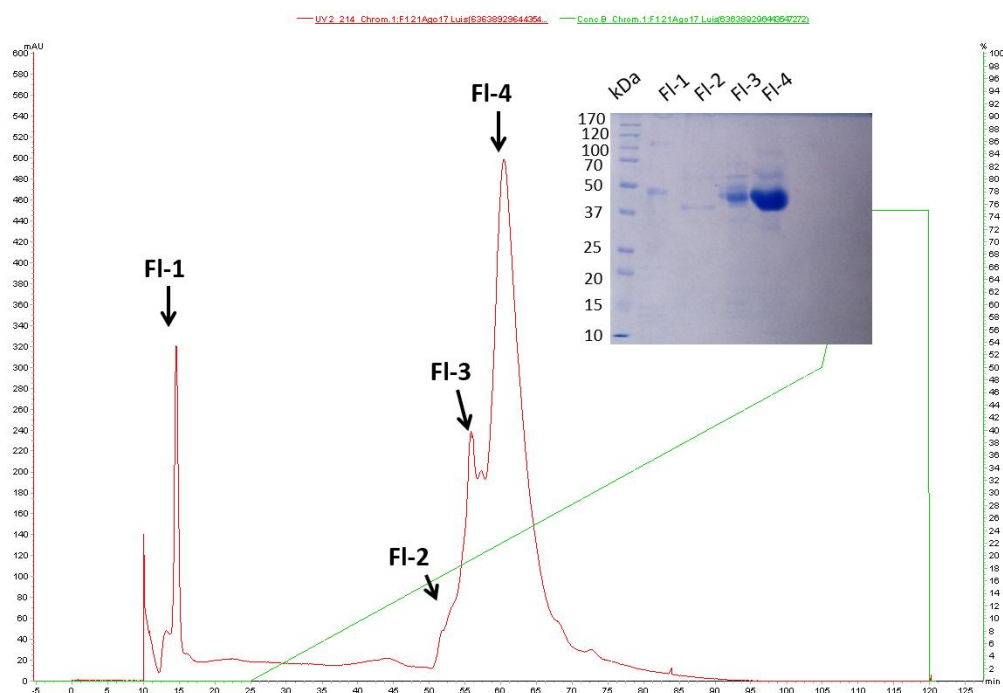


Figura 17. Cromatografía de intercambio aniónico de la FI. Buffer de elución Tris-HCl + NaCl. Gradiente: 0 a 0.5 M de NaCl en 80 min, 0.5 M a 0.75 M de NaCl en 15 min por 5 min. 8.8 UA₂₈₀ cargados. Gel al 12.5% en condiciones reductoras, 20 µl cargados.

Tabla 7

Actividad proteolítica posterior al fraccionamiento por I. aniónico de FI. 10 µg probados.

Muestra	U/mg	D. E.
FI-1	1.4	0.6
FI-2	1.05	0.5
FI-3	1.6	0.3
FI-4	2.9	0.3

Consecutivamente se realizó la detección de las fracciones con actividad edematizante, en la cual únicamente la FI-4 presentó actividad edematizante. (Figura 18).

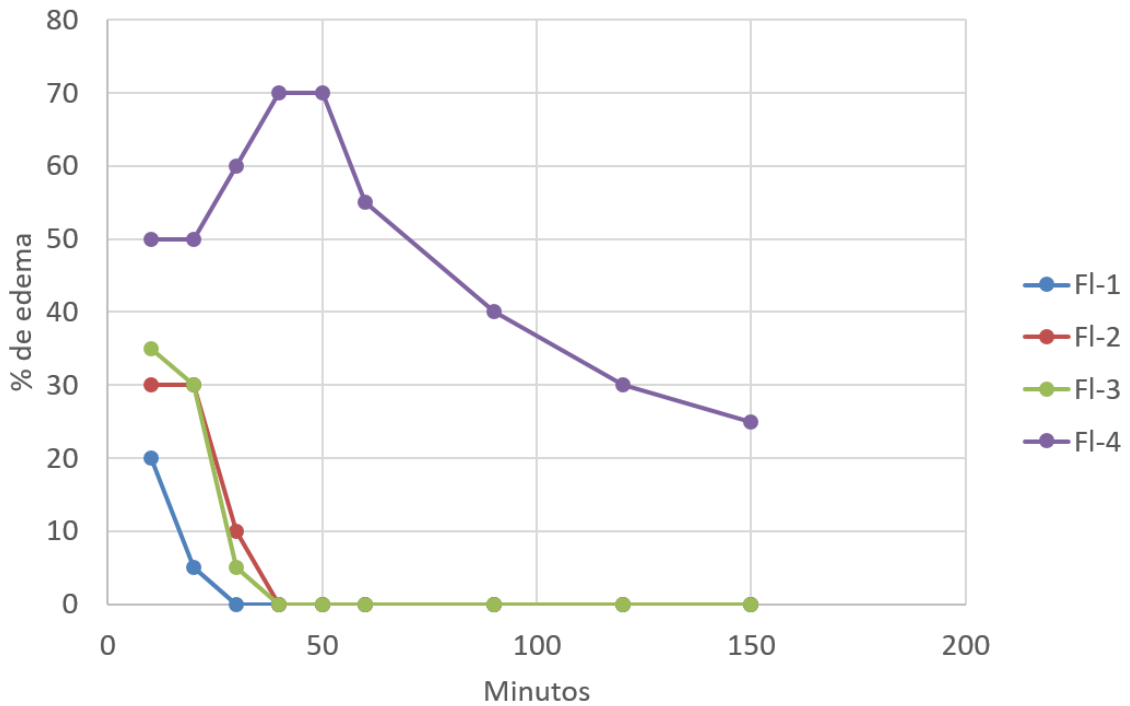


Figura 18. Cinética de edema por las fracciones de FI. 1 µg inyectado por ratón. N= 3.

La FIII se separó utilizando una columna de intercambio catiónico con Tris-HCl pH 8.0 y como buffer de elución Tris-HCl pH 8.0 + NaCl 1M. Se pudieron observar cuatro picos que eluyeron entre los 10 y 90 minutos. (Figura 19).

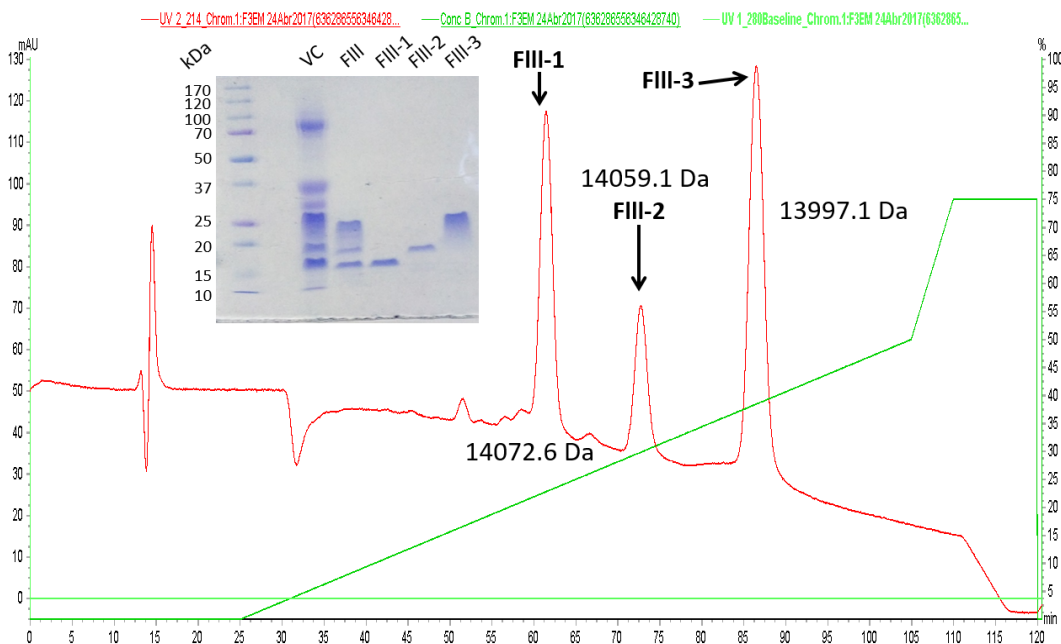


Figura 19. Cromatografía de intercambio aniónico de la FIII. Buffer de elución Tris-HCl + NaCl. Gradiente: 0 a 0.5 M de NaCl en 80 min, 0.5 M a 0.75 M de NaCl en 15 min por 5 min. 13.1 UA₂₈₀ cargados. Gel en condiciones no reductoras al 12.5 %, 15 µg cargados³⁴

De igual forma se evaluó la actividad fosfolipasa A₂ de las fracciones obtenidas de la cromatografía. Se observó que todas presentaron actividad, se mantuvieron en un rango de entre 24.4 y 87.5 U/mg. Tabla 8. Posteriormente se realizó un ensayo para detectar las fracciones con actividad edematizante, en la cual las fracciones FIII-2- y FIII-3 presentaron actividad similar e intermedia, por otro lado, la FIII-1 fue la que presentó la mayor actividad edematizante con una progresión y disminución de edema similar al observado anteriormente con la FIII. (Figura 20).

Tabla 8

Actividad fosfolipasa A₂ posterior al fraccionamiento por I. aniónico de FIII.

Muestra	U/mg
FIII-1	87.5
FIII-2	94.7
FIII-3	24.4

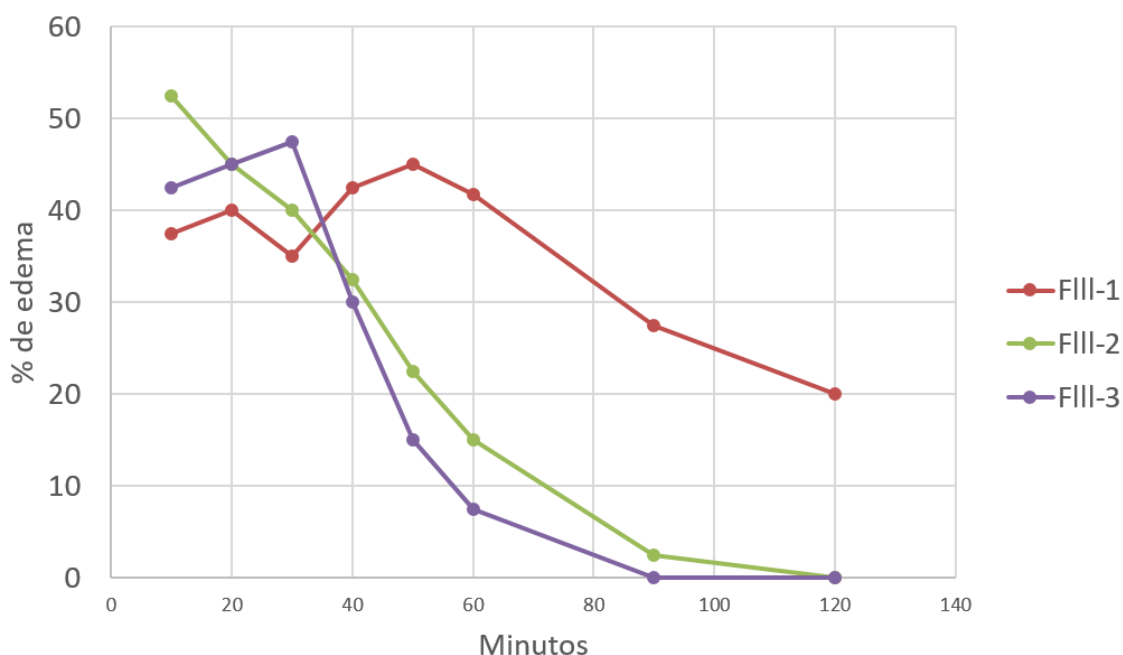


Figura 20. Progresión del porcentaje de edema posterior al fraccionamiento por intercambio catiónico de FIII. 1 µg inyectado por ratón. N= 3.

11. Discusión

En estudios previos, se observó la poca variación intraespecífica de los venenos de la especie *Agkistrodon bilineatus* (Román, 2015), de igual forma visto en los perfiles electroforéticos de los individuos que conforman la mezcla de veneno utilizado para la realización del presente trabajo son equivalentes; todos los individuos presentaron bandas de alto, mediano y bajo peso molecular, pertenecientes principalmente a metaloproteasas, serinoproteasas y fosfolipasas A₂, respectivamente (Lomonte y colaboradores, 2014). La letalidad del veneno de *A. bilineatus* por vía intraperitoneal en ratones de la cepa BALB/c (DL₅₀ 45.1 µg/ratón) fue más baja con respecto a la letalidad observada por vía intravenosa (37.6 µg/ratón). La letalidad evaluada en ratones de la cepa CD1 fue mayor (DL₅₀ 30.7 µg/ratón), mostrando mayor susceptibilidad al veneno, siendo comparable con la letalidad del veneno de cascabeles con componentes no neurotóxicos. La dosis mínima edematizante (DME) de *A. bilineatus* fue muy baja (0.13 µg) en comparación con el veneno de serpientes de cascabel (promedio de 2 a 5 µg).

En la cromatografía por exclusión molecular en columna Sephadex G-75 del veneno completo se pudieron observar cuatro fracciones, las cuales eluyeron en volúmenes de 39.5 ml, 49.2 ml, 68.5 ml y 91.1 ml, respectivamente. Munawar y colaboradores en el 2016, realizaron un fraccionamiento del veneno de *A. bilineatus* en una columna Superdex-75 (16x69 mm pH 5.0), en ésta pudieron observar 10 fracciones las cuales eluían en volúmenes parecidos a nuestras fracciones y de igual forma en el análisis por SDS-PAGE se observaron bandas que corresponden a proteínas de alto, mediano y bajo peso molecular. La diferencia en el número de fracciones obtenidas reside a las variantes en las características de la resina utilizada, en el tamaño de la columna, en el buffer y por consecuencia al pH utilizado para realizar la cromatografía.

Consecuentemente a la separación por exclusión molecular de las proteínas, se realizó la caracterización de las actividades enzimáticas de las fracciones obtenidas. La FI, obtuvo un perfil electroforético con bandas que corresponden a proteínas de alto peso molecular alrededor de los 50 kDa en condiciones reductoras y mostró tener actividad proteolítica sobre sustrato de azocaseína, por otro, lado al preincubarla con EDTA 8 mM se inhibió por completo su actividad enzimática. En la familia de las metaloproteasas el Zinc es un ion muy importante,

ya que funciona como cofactor dando un arreglo a las proteínas para que puedan realizar su función proteolítica, dado que el EDTA es un agente quelante (arrestaciones) no permite que se una a la enzima y ejerza su función, por lo cual hablaríamos que la F-I se trata de proteínas pertenecientes a dicha familia. En los SDS-PAGE, la FIII se observó en bandas de bajo peso molecular alrededor los 15 kDa en condiciones reductoras. Al realizar la prueba de actividad PLA₂, ésta fue la única que presentó dicha actividad y además fue alta, tratándose de proteínas pertenecientes a la familia de las fosfolipasas A₂, presentes en buena proporción en los venenos de esta especie (Lomonte y colaboradores, 2014). Con respecto a la FIV, ésta no presentó actividad de ningún tipo y no se observó en geles un contenido proteico, por lo que se le realizó un análisis de espectrometría de masas de la muestra, y sus componentes presentan un peso molecular cercano a proteínas llamadas péptidos potenciadores de bradicinina (PPB), reportados para este veneno por Lomonte y colaboradores en el 2014, igualmente por Munawar y colaboradores en el 2016.

En venenos de serpientes y en muchos otros animales venenosos, sólo algunos de los componentes son los responsables en la letalidad del veneno completo (Mackessy, 2010). En el caso de *A. bilineatus* únicamente presentó alta letalidad la fracción de metaloproteasas, demostrando que dichas proteínas generan hemorragias importantes, siendo este el principal factor que interviene en la letalidad. Al mismo tiempo, en dicho veneno se encuentra reportada una metaloproteasa tipo p-II llamada Bilitoxina-1, la cual presente una letalidad de 9.9 µg/ratón, que podría estar involucrada en ésta (Imai y colaboradores, 1989). En la realización del HPLC, se observó un pico con el mismo tiempo de retención para esta proteína, tal como lo reporta Lomonte y colaboradores (2014). Secuencia.

Las familias proteicas presentes en veneno de serpientes que se han reportado con actividad edematizante han sido las metaloproteasas, PLA₂ y serinoproteasas (Gutiérrez y Lomonte, 2013; De Freitas *et al.* 2009; Mackessy, 2010), mismas que se encuentra en buena proporción dentro del veneno de *A. bilineatus* (Lomonte y colaboradores, 2014). En el caso de la especie estudiada, se observan resultados similares con trabajos anteriores, ya que las fracciones que mostraron la generación de edema fueron la FI y FIII, correspondiendo a metaloproteasas y fosfolipasas A₂, respectivamente. En otros trabajos de igual forma se ha reportado

la actividad edematizante para estas dos familias proteicas, como es el caso de Chaves y colaboradores, que en 1995 estudiaron la actividad edematizante del veneno de *B. asper* y encontraron que al preincubar el veneno completo con EDTA e inhibidores de fosfolipasas y cicloxigenasas el edema se reducía significativamente, lo cual indica que en este veneno también las metaloproteasas, fosfolipasas y derivados de ácido araquidónico estaban involucrados en dicha actividad. Por otro lado, en *B. jararacá*, la actividad edematizante está dada exclusivamente por metaloproteasas, ya que al ser el veneno completo incubado con un inhibidor específico de esa familia (1,10-fenantrolina) el edema disminuía significativamente, lo que no sucedía al incubar con inhibidores para fosfolipasas y serinoproteasas (Zychar y colaboradores, 2009). Al realizar el segundo fraccionamiento tanto de las metaloproteasas como las fosfolipasas, sólo una fracción de cada una fue la que presentó tener actividad edematizante. Con respecto a la FI, la FI-4 tuvo generación de edema alto y además se observaron hemorragias importantes en la zona de inoculación. Por otro lado, en la FIII se presentó el edema con una progresión característica del veneno completo con la FIII-1. Lo cual nos indica que solamente algunas proteínas de cada familia son las responsables de dicha actividad.

Uno de los venenos más estudiados en cuando a generación de edema y su relación con el sistema inmune ha sido *B. asper*. En 1995, Chaves y colaboradores reportan que el veneno de esta especie desencadena toda una compleja red de mediadores inflamatorios que de manera contribuyente culminan en un estado inflamatorio severo. Se han reportado mediadores adrenérgicos, derivados de ácido araquidónico, citocinas y óxido nítrico (Zamuner y colaboradores, 2001). Particularmente se ven aumentadas las concentraciones de IFN- γ e IL-6, especialmente se ha asociado el aumento de IFN- γ en suero con la expresión de Óxido Nítrico Sintasa (iNOS) y la subsecuente formación de óxido nítrico (NO), produciendo un aumento en calibre de las venas provocando una extravasación de líquido al espacio intersticial y la consecuente tumoración (Zamuner y colaboradores, 2001, 2005). De igual manera, los ratones estimulados por vía intraperitoneal con el veneno completo de *A. bilineatus*, presentaron un aumento en la concentración basal de citocinas pro-inflamatorias, tales como IL-1 β , IL-6 e IFN- γ , que se mantuvieron hasta la lectura máxima que fue de 24 horas.

Con respecto al óxido nítrico, los niveles máximos se presentaron entre las 2 y 4 horas, de igual forma que IFN- γ , pareciendo que también existe una relación entre la expresión y formación de ambos, respectivamente.

Cada familia proteica en los venenos de serpientes presenta diferentes características que les atribuyen actividades particulares, así como efectos farmacológicos e interacción con el sistema inmune de forma diferente. Con respecto a las metaloproteasas de *B. asper*, éstas juegan un papel muy importante en la inflamación. Una de sus principales efectos es favorecer la inducción de infiltrado celular en la zona de la lesión, atrayendo particularmente a leucocitos polimorfonucleares y macrófagos e incrementar la concentración de citocinas como IL-1 β e IL-6 (Rucavado y colaboradores, 1995, 2002). Lo observado en el perfil de citocinas de ratones estimulados con la fracción de metaloproteasas, coincidió con lo reportado en el aumento de IL-1 β con un máximo de concentración en suero a las 12 horas post-inyección, por otro lado, las concentraciones de IL-6 fueron menores, comparadas con las estimulaciones del veneno completo y la FIII. El infiltrado celular que provoca, reportado de igual manera por Fernández y colaboradores en el 2006, probablemente se deba a la ruptura de los vasos sanguíneos y el favorecimiento del paso de células a la zona del daño sin que ocurra un proceso de diapédesis. Otro factor, es la activación del sistema de complemento el cual culmina en derivados como C5a que funciona como quimioatrayente de neutrófilos. En cuanto a las fosfolipasas de *B. asper*, se ha observado que tanto las miotoxinas (Lys-49) como las PLA₂ catalíticas (Asp-49) están involucradas en la generación de inflamación en la zona del daño (Lomonte y Carmona, 1992). Por otro lado, las PLA₂ catalíticas inducen una reacción más marcada en la zona (Zuliani y colaboradores 2005) y estimulan la expresión de cicloxigenasa-2 (COX-2), la cual a partir de ácido araquidónico produce prostaglandinas y tromboxanos, mismos que estimulan la liberación de óxido nítrico. Los niveles observados de óxido nítrico con la estimulación de fosfolipasas del veneno de *A. bilineatus* fueron mayores con respecto a los estimulados con metaloproteasas y veneno completo. Las fosfolipasas estimularon, además, el aumento de IL-1 β , IL-6 y en particular IL-4 e IL-10, estas últimas siendo citocinas anti-inflamatorias. La pronta y elevada aparición de citocinas anti-inflamatorias, en este caso, podría deberse a que el daño no es tan

grave como lo es con lo generado con las metaloproteasas y la inflamación cese en un período de tiempo más corto, lo cual dichas citocinas estarían realizando la regulación de la respuesta inflamatoria.

Con respecto a las citocinas proinflamatorias (IL- 1 β , IL-6 e IFN- γ), en éstas se observó una concentración máxima a las 12 horas y en particular IFN- γ a las 2 horas estimulada con la Fracción I. La concentración de las citocinas antiinflamatorias comienza a ser considerable desde las 12 horas y en particular IL-10 hasta las 24 horas, estimuladas por la Fracción III. El aumento temprano en las concentraciones de citocinas inflamatorias, conlleva a que el veneno completo y sus fracciones direccionan hacia un fenotipo proinflamatorio y posteriormente mediante citocinas antiinflamatorias y otros mecanismos del sistema inmune se lleva a cabo un control de la respuesta inflamatoria temprana.

Las diferentes características de los componentes presentes en los venenos de serpientes, así como sus diversos efectos fisiopatológicos, provee una amplia gama de procesos por los cuales se desencadene una respuesta inflamatoria, dando así, una acción cooperativa que culmina en un cuadro de edema muy severo y la dificultad para el tratamiento en los envenenamientos en humanos.

12. Conclusiones

Mediante el fraccionamiento realizado por exclusión molecular del veneno de *A. bilineatus*, se obtuvo la separación por familias proteicas, las cuales solamente las fosfolipasas y metaloproteasas presentaron tener actividad edematizante, y esta última involucrada prácticamente en la letalidad del veneno completo.

El perfil de citocinas y óxido nítrico con la estimulación de veneno completo, metaloproteasas y fosfolipasas resultó ser diferente entre sí, lo cual habla de diferentes mecanismos de acción para la generación de una respuesta inflamatoria.

13. Perspectivas

El conocimiento de las proteínas causantes de la generación de edema en el veneno de *A. bilineatus* junto con la necesidad de saber el mecanismo de acción el cual ejercen éstas, podría conllevar al mejoramiento en el tratamiento clínico de mordeduras causadas por dicha especie.

14. Referencias

Alvarado D. J y Suazo O. I. 2006. *Reptiles Venenosos de Michoacán*. México: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Barros S. F., Friedlanskaia I., Petricevich V. L. y Kipnis T. L. 1998. "Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom." *Mediators of inflammation* 7:339-346.

Benton, M. J. 2009. "Reptilia (Reptiles)." *Encyclopedia of Life Sciences* 1–9.

Brunton L.L., Lazo J. S., Parker K. L. 1996. *Bases farmacológicas da terapêutica*. 9th ed. Goodman & Gilman. Mc Graw-Hill, Río de Janeiro.

Campbell J. A. y Lamar W. W. 2004. *The venomous reptiles of the western hemisphere*. Cornell University Press, Ithaca, NY

Chaves F., Barboza M., y Gutiérrez J. M. 1995. "Pharmacological Study of Edema Induced by Venom of the Snake *Bothrops asper* (Terciopelo) in Mice." *Toxicon* 33(1):31–39.

De Freitas Oliveira C., da Silva Lopes D., Machado Mendes M., Homs-Brandeburgo M. I., Hamaguchi A., Machado de Alcántara T., Clissa P. B. y de Melo Rodrigues V. 2009. "Insights of Local Tissue Damage and Regeneration Induced by BnSP-7, a Myotoxin Isolated from *Bothrops (neuwiedii) pauloensis* Snake Venom." *Toxicon* 53(5):560–69.

Fernandes C. M., Zamuner S. R., Zuliali J. P. Rucavado A., Gutiérrez J. M. y Teixeira C. F. P. 2006. "Inflammatory effects of BaP1 a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* snake venom: leukocyte recruitment and release of cytokines." *Toxicon*. 47:549-559.

Gomez H. F. y Dart R. C. 1995. "Clinical toxicology of snakebite in North America." *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons*." CRC. Press. Boca Raton, Florida, USA. 619-644.

Gutiérrez J. M., Chaves F., Gene J. A., Lomonte B., Camacho Z. y Schosinsky K. 1989. "Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumper viper) from Costa Rica." *Toxicon* 27(7):735-45

Gutiérrez J. M., Rojas G., Lomonte B., Gené J. A. Y Cerdas L. 1986. "Comparative Study of the Edema-Forming Activity of Costa Rican Snake Venoms and Its Neutralization by a Polyvalent Antivenom." *Comparative biochemistry and physiology. C, Comparative pharmacology and toxicology* 85(1):171–75.

Gutiérrez J. M. 2002. "Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina" *Rev. Biol. Trop.* 50(2):377-394.

Gutiérrez J. M. y Lomonte B. 2013. "Phospholipases A2: Unveiling the Secrets of a Functionally Versatile Group of Snake Venom Toxins." *Toxicon* 62:27–39.

Gutiérrez J. M. y Ownby C. L. 2003. "Skeletal Muscle Degeneration Induced by Venom Phospholipases A 2: Insights into the Mechanisms of Local and Systemic Myotoxicity." *Toxicon* 42(8):915–31.

Hernández A., Mendonca R. Z. y Petricevich V. L. 2005. "*Crotalus durissus terrificus* venom interferes with morphological, functional, and biochemical changes in murine macrophages." *Mediators of inflammation* 2005(6):349-359.

Hodgson E. 2012. "Toxins and Venoms." *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 112(20):373–415.

Hogg N., Darley-Usmar V. M., Wilson M. T. y Moncada S. 1992. "Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide." *Biochem J.* 281:419-24.

Imai K., Nikai T., Sugihara H. y Ownb C. L. 1989. "Hemorrhagic toxin from the venom of *Agkistrodon bilineatus* (common cantil)." *Int. J. Biochem* 21(6):667-673.

Kendall H. K., Marshall R. I. y Bartold P. M. 2001. "Nitric oxide and tissue destruction." *Oral Dis* 7(1):2-10.

Lee, M. S. Y. 2002. "Serpentes (Snakes)." *Encyclopedia of Life Sciences* 1–5.

Leitao R. F., Ribeiro R. A., Chaves H. V., Rocha F. A. C., Lima V. y Brito G. A. C. 2005. "Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats." *J Periodontol* 76(6):956-63.

Lomonte B. y Carmona E. 1992. "Individual expression patterns of myotoxins isoforms in the venom of the snake *B. asper*." *Comp. Biochem. Physiol. B.* 102:325-329.

Lomonte B., Tsai W., Ureña-Díaz J. M., Sanz L., Mora-Obando D., Sánchez E. E., Fry B. G., Gutiérrez J. M., Gibbs H. L., Sovic M. G. y Calvete J. J. 2014. "Venomics of New World Pit Vipers: Genus-Wide Comparisons of Venom Proteomes across *Agkistrodon*." *Journal of Proteomics* 96:103–16.

Mackessy S. P. 2010. *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. CRC Press, Taylor & Francis Group.

Marletta M. A. 1993. "Nitric oxide synthase: structure and mechanism." *J Biol Chem.* 268(17):12231-4.

Moncada S., Palmer R. M. y Higgs E. A. 1991. "Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology." *Pharmacol Rev.* 43(2):109-42.

Munawar A., Zahid A., Negm A., Akrem A., Spencer P. y Betzel C. 2016. "Isolation and characterization of Bradykinin potentiating peptides from *Agkistrodon bilineatus* venom". *Proteome Science* 14:1.

Nikai T., Taniguchi K., Komori Y., Masuda K., Fox J. W. y Sugihara H. 2000. "Primary Structure and Functional Characterization of Bilitoxin-1, a Novel Dimeric P-II Snake Venom Metalloproteinase from *Agkistrodon bilineatus* Venom." *Archives of biochemistry and biophysics* 378(1):6–15.

Owen J. A., Punt J., Stranford S. A. y Jones P. P. 2014. "*Kuby. Inmunología.*" McGraw Hill interamericana.

Petricevich V. L., Teixeira C. F. P., Tambourgi D. V. y Gutiérrez J. M. 2000. "Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venom." *Toxicon* 38: 1253-66.

Porras L. W., Wilson L. D., Schuett G. W. y Reiserer R. S. 2013. "A Taxonomic Reevaluation and Conservation Assessment of the Common Cantil, *Agkistrodon bilineatus* (Squamata: Viperidae): A Race against Time." *Amphibian and Reptile Conservation* 7(1):48–73.

Radi R. B. J. S., Beckman J. S., Bush K. M. y Freeman M. A. 1991. "Peroxynitriteoxidation of sulphhydryls: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide." *J Biol Chem* 266:4244-50.

Rojas G., Gutiérrez J. M., Gené J. A. y Gómez M. 1987. "Neutralización de las actividades tóxicas y enzimáticas de cuatro venenos de serpientes de Guatemala y Honduras por el antiveneno polivalente producido en Costa Rica." *Biología Tropical* 35(1):59–67.

Román L. "Caracterización bioquímica e inmunoquímica de venenos de serpientes del género *Agkistrodon*." Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Ciencias Biológicas, 2015.

Rucavado A., Escalante T., Teixeira C. F. P., Fernandes C. M., Diaz C. y Gutiérrez J. M. 2002. "Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*." *Mediators Inflamm.* 11:121-128.

Rucavado A., Lomonte B., Ovadia M. y Gutiérrez J. M. 1995. "Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom." *Exp. Mol. Pathol.* 63(1):186-199.

Schmidt H. H., Wilke P., Evers B. y Böhme E. 1989. "Enzymatic formation of nitrogen oxides from L-arginine in bovine brain cytosol." *Biochem Biophys Res Commun* 165(1):284-91.

Schumacher J. R., O`Garra A., Schrader P., Van Kimmenade A., Bond M. W., Mosman T. R., Coffman R. L. 1988. "Characterization of 4 monoclonal antibodies to mouse interleukin-5 and development of mouse and human IL-5 ELISA assays." *The Journal of Immunology* 5:1575-1581.

Serrano S. M. T. 2013. "The long road of research on snake venom serine proteinases." *Toxicon* 62:19-26.

Skaleric U., Gaspirc B., McCartney-Francis N., Masera A. y Wahl S. M. 2006. "Proinflammatory and antimicrobial nitric oxide in gingival fluid of diabetic patients with periodontal disease." *Infect Immun* 4(12):7010-13.

Snyder S. y Bredt D. S. 1992. "Biological roles of oxide nitric." *Scientific American*. 68-77.

Tambourgi D. V., dos Santos M. C., Furtado M de F., de Freitas M. C., da-Silva D. W. y Kipnis T. L. 1994. "Pro-inflammatory activities in elapid snake venoms." *Br J Pharmacol* 112(3):723-7.

Theakson R. D. G. y Reid H. A. 1983. "Development of Simple Standard Assay Procedure for the Characterization of Snake Venoms." *Bulletin of the World Health Organization* 61(6):949-56.

Walker, J. P. y Morrison R. L. 2011. "Current Management of Copperhead Snakebite." *Journal of the American College of Surgeons* 212(4):470-74.

Walter F. G., Bilden E. F. y Gibly R. L. 1999. "Envenomations." *Environmental Emergencies* 15(2):353-86.

Wiechelman K., Braun R. y Fitzpatrick J. 1988. *Anal. Biochem* 71:231-237.

Yamakawa M., Nokazi M. y Hokama Z. 1976. "Fractionation of sakishima-habu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic and edema-forming activities of the fractions." *Animal, Plant and Microbial Toxins* 1:97-109.

Zad O., Cooper H., Crocker P. y Milling T. 2009. "Shock, Respiratory Failure, and Coagulopathy after an Intravenous Copperhead Envenomation." *American Journal of Emergency Medicine* 27(3).

Zichar B. C., Dale C. S., Demarchi D. S. y Goncalves L. R. C. 2010. "Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A₂ to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice" *Toxicon* 55(1):227-234.

Zamuner S. R., Gutiérrez J. M., Múscara M. N., Teixeira S. A y Teixeira C. F. P. 2001. "*Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbial functions of peritoneal leukocytes in vivo." *Toxicon* 39(1):1505-1513.

Zuliani J. P., Fernandez C. M., Zamuner S. R., Gutiérrez J. M. y Teixeira C. F. P. 2005a. "Inflammatory events induce by Lis-49 and Asp-49 phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity." *Toxicon*. 45:335-346.

Zamuner S. R., Zuliani J. P., Fernandes C. M, Gutiérrez J. M. y Teixeira C. F. P. 2005. "Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration." *Toxicon* 46(1):806-813.