



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**PERFIL PROTEOLÍTICO, TOXICIDAD Y ANÁLISIS
FENÉTICO DEL VENENO DE *Crotalus aquilus*, *Crotalus polystictus*
Y SUS HÍBRIDOS EN CAUTIVERIO.**

TESIS

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
GRADO DE**

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

OCTAVIO ROLDÁN PADRÓN

CO-DIRIGIDA POR

**DR. ALEJANDRO BLANCO LABRA Y DRA. TERESA GARCÍA
GASCA**

**CENTRO UNIVERSITARIO
QUERÉTARO, QRO. MÉXICO
JUNIO, 2011**

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**PERFIL PROTEOLÍTICO, TOXICIDAD Y ANÁLISIS
FENÉTICO DEL VENENO DE *Crotalus aquilus*, *Crotalus polystictus*
Y SUS HÍBRIDOS EN CAUTIVERIO.**

TESIS

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
GRADO DE**

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

OCTAVIO ROLDÁN PADRÓN

CO-DIRIGIDA POR

**DR. ALEJANDRO BLANCO LABRA Y DRA. TERESA GARCÍA
GASCA**

SINODALES

Dr. ALEJANDRO BLANCO LABRA
DIRECTOR

Dra. MARGARITA TERESA DE JESUS GARCÍA GASCA
CODIRECTOR

M. en C. ULISES PADILLA GARCÍA
SINODAL

Biol. SANDRA CRUZ PÉREZ
SINODAL

M. en C. PATRICIA HERRERA PANIAGUA
SINODAL

Santiago de Querétaro, México
Junio, 2011

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE MECANISMOS DE DEFENSAS DEL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOQUÍMICA DEL CINVESTAV-UNIDAD IRAPUATO, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. ALEJANDRO BLANCO LABRA CON LA COLABORACIÓN DEL IBQ JOSÉ LUIS CASTRO GUILLÉN, Y EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO BAJO LA CO-DIRECCIÓN DE LA DRA. TERESA GARCÍA GASCA Y LA ASESORÍA DEL M. EN C. ULISES PADILLA GARCÍA

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por apoyarme en el transcurso de la carrera y haberme formado como persona.

Al Dr. Alejandro Blanco Labra por darme la oportunidad de realizar la parte de actividad proteolítica de la tesis en su laboratorio y por el apoyo en general, además de los técnicos y estudiantes de maestría y doctorado por apoyarme con los experimentos.

A la Dra. Teresa García Gasca por permitirme trabajar en su laboratorio y asesorarme a lo largo del trabajo.

Al CINVESTAV Unidad Irapuato, por permitir mi estancia para la realización de este trabajo.

Al equipo de trabajo del Herpetario de la Universidad Autónoma de Querétaro, por la donación y su ayuda en las extracciones del veneno,

A María José Serrano, Mariana Aguilera, Josué López y a todos los miembros del laboratorio, que me apoyaron en los experimentos.

Al M en C Ulises Padilla García y a la bióloga Marta Sandra Cruz Pérez por el apoyo a lo largo del trabajo y sus enseñanzas a cerca de los reptiles.

A mis compañeros de grupo y amigos Alejandro, Gerardo, Marco, Elisa, Daniel, María de Jesús, por estar conmigo y apoyarme siempre.

A la MVZ Verónica Andrade por su apoyo en el trabajo dosis letal cincuenta.

A las personas que me ayudaron a hacer las extracciones del veneno, Ulises, Jonathan, Don Rafael, Ricardo.

A la M. en C. Patricia Herrera por su apoyo en la parte de sistemática

A Sarahí García González por ser una buena amiga y estar conmigo durante la estancia en el CINVESTAV

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	i
ÍNDICE GENERAL	ii
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	vii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Clasificación de serpientes	3
Familia <i>Viperidae</i> (serpientes de cascabel).	3
<i>Crotalus aquilus</i> y <i>Crotalus polystictus</i>	4
<i>Crotalus aquilus</i>	5
<i>Crotalus polystictus</i>	5
Características del veneno de serpientes	6
Proteasas presentes en venenos de serpientes	8
Serán proteasas tipo tripsina	9
Serán proteasas tipo quimotripsina.....	10
Estudios sobre venenos e hibridación	11
Hibridación entre especies.....	12
JUSTIFICACIÓN	14
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS	15
Objetivo general.....	15
Objetivos particulares	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
Obtención del veneno.....	16
Determinación de la concentración proteica:	17
Determinación de actividad proteolítica (Anexo 2).....	19
Electroforesis en gel de poliacrilamida	19
Zimogramas en membrana de celulosa	19
Zimogramas copolimerizados con el sustrato.	20
Determinación de pesos moleculares relativos.....	20
Determinación de la Dosis Letal 50 (DL ₅₀).....	21
Descripción morfométrica	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
Determinación de proteína y perfiles electroforéticos	23
Zimogramas de actividad proteolítica en gel co-polimerizado con gelatina.....	25
Zimogramas sobre membrana de celulosa.	30

Actividad proteolítica de serín proteasas	32
Actividad inhibitoria de proteólisis.....	35
Dosis letal media (DL ₅₀)	35
Comparación fenética de híbridos y especies parentales <i>C. aquilus</i> y <i>C. polystictus</i>	39
CONCLUSIONES	42
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
ANEXOS.....	51
ANEXO 1. Determinación de concentración de proteína por el método de Bradford (1976)	51
ANEXO 2. Determinación de actividades proteolíticas y actividad inhibitoria de serín proteasas.	57
ANEXO 3. Electroforesis de poliacrilamida método de Laemmli (1970).....	58
ANEXO 4. Zimogramas.....	61
ANEXO 5. NTSYSpc	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Edad y sexo de los organismos utilizados en el estudio	17
Cuadro 2: Concentración de proteína en el veneno de los individuos estudiados.....	23
Cuadro 3. De actividades proteolíticas tipo tripsina y quimotripsina expresadas en UA/mL.	34
Cuadro 4. Número de organismos muertos por dosis de veneno en 24 horas. n= 4 organismos por dilución.....	35
Cuadro 5. Promedio de número de escamas para las especies <i>C. aquilus</i> , <i>C. Polystictus</i> , híbridos hembra HH., e híbridos macho HM.	39
Cuadro 6. Matriz de datos de tipos de escama y bandas de proteína en kDa	40
Cuadro 7. Diluciones para la determinación de concentración de proteína por el método de Bradford.	51
Cuadro 8. Soluciones para preparar geles de poliacrilamida	59

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Fotografías de <i>C. polystictus</i> (izquierda), híbrido (centro) y <i>C. aquilus</i> derecha...	4
FIGURA 2. Glándula de veneno de viperidos.....	7
FIGURA 3: Estructura de tripsina	9
FIGURA 4. Estructura de quimotripsina	10
FIGURA 5. Características de la escutelación en serpientes. A) Región dorsal de la cabeza, B) Vista lateral, C) Región ventral (Pérez Higareda et al., 2007).	13
FIGURA 6. Extracción de veneno por comprensión de las glándulas.	16
FIGURA 7. Curva patrón de proteína mediante el método de Bradford tradicional.	17
FIGURA 8: Curva patrón de proteína mediante el método de Bradford en microplaca	18
FIGURA 9. Técnica de inyección intraperitoneal.	21
FIGURA 10: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% y 12 %, tabla comparativa de proteínas.	24
FIGURA 11: Actividad proteolítica sobre gel co-polimerizado con gelatina.....	27
FIGURA 12: Zimograma en gel de poliacrilamida al 12% co-polimerizado con gelatina, 20 µg de veneno por pozo e incubado sólo 10 min	29
FIGURA 13: Zimograma de actividad proteolítica en matriz de celulosa saturado con sustrato BApNA, incubado por 3 h.....	31
FIGURA 14: Actividad proteolítica específica tipo tripsina sobre sustrato BApNA incubado por 30 minutos.	33
FIGURA 15: Actividad proteolítica específica tipo tripsina sobre sustrato SAAPFpNA	33
FIGURA 16: Actividad inhibitoria de proteólisis de veneno en microplaca	36
FIGURA 17. Curva dosis respuesta del veneno de híbridos hembras y <i>C. aquilus</i> macho.	37
FIGURA 18. Fenograma obtenido mediante un análisis de similitud utilizando el coeficiente taxonómico de similitud entre organismos híbridos y las especies parentales <i>C. aquilus</i> y <i>C. Polystictus</i>	41

ABREVIATURAS

Abs	Absorbencia
PM	Peso molecular
HSTI	Inhibidor de tripsinas de semilla de chan
PI	Punto isoeléctrico
Tris	Tris-hidroximetil aminometano
UA	Unidades de actividad enzimática
SDS	Dodecil sulfato de sodio
BAPNA	Benzoil arginil para nitro anilida
KDa	kilo Dalton
TLCK	Tosil lisil clorometil cetona
SBTI	Inhibidor de enzimas tipo tripsina aislado de soya
TPCK	Tosil fenilalanil clorometil cetona
<i>C. aquilus</i>	<i>Crotalus aquilus</i>
<i>C. polystictus</i>	<i>Crotalus polystictus</i>

RESUMEN

Los accidentes ofídicos son un problema en zonas tropicales de todo el mundo, registrándose por año más de dos millones de mordeduras. México cuenta con 70 especies venenosas, de las cuales 50 son del grupo de los viperidos. *C. aquilus* y *C. polystictus* pertenecen a este grupo y presentan venenos citotóxicos que causan efecto sobre el sistema hemostático. Estas dos especies habitan en zonas similares del centro de México, lo que podría llevar a hibridismo de manera natural, como ya se ha reportado en cautiverio; sin embargo, no existen suficientes estudios al respecto. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad proteolítica y toxicidad del veneno de individuos de ambas especies y sus híbridos en cautiverio, así como un análisis comparativo de escamas. Se determinó la actividad tipo tripsina, quimotripsina y un análisis del efecto de inhibidores de proteasas sobre dichas actividades. Las actividades tipo tripsina fueron las más altas en todos los casos, aunque no se observó un patrón específico de acuerdo a los individuos estudiados. De forma similar, no se observó inhibición de la actividad proteolítica con los inhibidores de proteasas utilizados. Al llevar a cabo el estudio de toxicidad aguda se encontró que los híbridos hembras presentaron un veneno más tóxico, con una DL_{50} de 1.02 μg de proteína de veneno/g de peso, mientras que en el parental *C. aquilus* se obtuvo una DL_{50} de 2.04 μg de proteína de veneno/g de peso. Valores de la relación Q/T podrían estar relacionados con la letalidad de las mezclas de veneno de híbridos hembra y parental *C. aquilus*, ya que organismos de estas mezclas mostraron valores más altos en esta relación Q/T. El análisis morfológico de escamas mostró que organismos híbridos poseen características intermedias entre las presentadas por las especies parentales y una mezcla de los patrones de coloración de ambas especies, teniendo los híbridos una mayor similitud con la especie parental *C. polystictus*. Los resultados obtenidos muestran que existen diferencias entre los híbridos, así como entre los híbridos y las especies parentales, tanto en el número de escamas, como en la letalidad de sus venenos.

Palabras clave: enzimas en venenos de serpientes, tripsina, quimotripsina, aspártico proteasas, *C. aquilus*, *C. polystictus*, híbridos.

I. INTRODUCCIÓN

El accidente ofídico (mordedura de serpiente) es un problema importante de salud pública en las zonas tropicales, subtropicales y rurales a nivel mundial. Se estima que, a lo largo del mundo, cada año más de 2.5 millones de personas son mordidas por serpientes venenosas, resultando alrededor de 120.000 muertes en las regiones tropicales de Asia, África y América Latina (Pirela de las Salas et al., 2006). En México, los estados con mayor índice de mordeduras de serpiente son; Veracruz, Oaxaca, San Luis Potosí, Hidalgo, Puebla. Hasta mediados de esta década se tenían registradas aproximadamente 70 especies catalogadas como venenosas, de las cuales 50 pertenecen al grupo de los vipéridos. Entre ellas *Crotalus aquilus* y *Crotalus polystictus* las cuales son especies endémicas del centro de México.

Los efectos causados por el veneno de las serpientes se clasifican clínicamente en sistémicos y locales (Gallacciet al., 2002), es decir, actúan de manera directa o local sobre el sitio de la mordida o a nivel general o sistémico sobre otros órganos del cuerpo. Los venenos se dividen en dos grupos; neurotóxicos, que se caracterizan por afectar al sistema nervioso, particularmente a los centros respiratorios, provocando muerte por asfixia; y hemotóxicos, que afectan al sistema circulatorio rompiendo las paredes de los capilares (Dueñas, 1992). Las serpientes de cascabel (vipéridos) son sobre todo hemotóxicos, debido principalmente, a las proteasas presentes en el veneno. Algunas de ellas causan daño considerable sobre el tejido a nivel local como edema, formación de ampollas, hemorragias y mionecrosis tisular (Tu, 1976). El grupo de los crotalidos es sobretodo hemotóxico, actuando sobre las células y el sistema hemostático por contener componentes procoagulantes y anticoagulantes (Maruñak et al., 2005).

El principal problema con los venenos de serpiente es la velocidad con que se desencadena el proceso del envenenamiento. Se debe tener presente que la entrada masiva al organismo de agentes tóxicos como los venenos de serpientes, no le permiten al sistema inmune de un individuo desarrollar una respuesta rápida y protectora. De ahí que el tratamiento con sueros antiofídicos es la única alternativa eficaz para atender las mordeduras de serpientes venenosas (Hardy, 1994). Pruebas de dosis letales medias (DL₅₀) son utilizadas para cuantificar el efecto tóxico de alguna sustancia sobre un organismo, entre más baja es la DL₅₀,

mayor la letalidad y por lo tanto son más peligrosos. Para la determinación de la DL_{50} se utilizan roedores y las vías de inoculación más comunes son la intraperitoneal y la intravenosa, siendo la primera la que presenta mayor susceptibilidad al efecto tóxico del veneno (Bolaños, 1984).

Las especies *C. aquilus* y *C. polystictus* habitan zonas y ambientes similares en el centro del país, siendo filogenéticamente cercanas, lo que podría dar como resultado procesos de hibridación, ya que se ha reportado que en algunos casos la fragmentación del hábitat, aunado a otros factores poblacionales puede dar como resultado la hibridación entre especies. El hibridismo puede generar una combinación de veneno de ambas partes de los parentales pudiendo afectar el grado de letalidad del mismo, y como se sabe existen una gran cantidad de variables que afectan el grado de letalidad de los venenos en cada organismo, como factores de alimentación, grado de estrés o la edad. Así como factores que hacen variar de forma intraespecífica los venenos, como son la ubicación geográfica, el tipo de presas de cada especie, y el tipo de proteasas presentes en los venenos de serpientes. Por estas razones los casos de hibridación resultan importantes, ya que la mezcla genética de las especies puede generar organismos híbridos que, debido a la combinación de proteasas, de cómo resultado un veneno más letal que en las especies parentales. La hibridación de *C. aquilus* y *C. polystictus* se ha presentado en cautiverio, tal es el caso de el herpetario de la Universidad Autónoma de Querétaro, donde se dio el nacimiento de 7 crías. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar los cambios presentes en las serín proteasas y la DL_{50} de los venenos de los híbridos producidos en cautiverio, así como llevar a cabo un análisis fenético para establecer la similitud de los híbridos con los parentales, y describir el numero de escamas en estos organismos híbridos, ya que este es un carácter importante en la identificación de serpientes.

I. ANTECEDENTES

2.1 Clasificación de serpientes

Las serpientes se clasifican en cinco grandes familias que son:

- a) **Familia *Hidrophidae*** (serpientes de mar). Cuerpo lateralmente comprimido y con una cola caudal bien desarrollada. Escamas ventrales reducidas o ausentes, valvulares y nasales están colocadas dorsalmente. Poseen dentición proteroglifa. Los colmillos están estáticos y no pueden ser retraídos hacia la parte prefrontal de la maxila como en los viperidos (Bolaños, 1984).
- b) **Familia *Elapidae*** (serpientes corales). Poseen cabeza pequeña y cuerpos cilíndricos con cola relativamente pequeña. Por lo general sin escamas loreales. Poseen los venenos más tóxicos de las serpientes terrestres, cuerpo uniformemente cilíndrico, cola corta y gruesa. Poseen dentición proteroglifa, patrón de coloración variado, el más usual es rojo-amarillo-negro-amarillo (Campbell y Lamar, 2004)
- c) **Familia *Boidae*** (serpientes constrictoras). Serpientes muy grandes, con cuerpo cubierto ventralmente por escamas transversales cortas en el vientre y pequeñas y circulares en el dorso. A los lados de la cloaca se observa un espolón. (Álvarez, 2005).
- d) **Familia *Colubridae***. Serpientes de cuerpo robusto, cabeza pequeña, con el cráneo redondeado numerosas escamas en la parte superior de la cabeza. Escamas dorsales lisas. Con espolones en la base de la cola. La mayoría poseen dentición aglifa (sin canales para inyectar veneno) (Gutiérrez, 1980).

2.2 Familia *Viperidae* (serpientes de cascabel).

Son todas venenosas, los rasgos anatómicos más importantes son cabeza bien delimitada del resto del cuerpo, generalmente de forma triangular y acorazonada, lleva en la región dorsal varias escamas quilladas, el ojo es grande y la pupila elíptica y vertical, poseen dentición solenoglifa, pudiendo retraer los dientes al descansar, presentan dientes de repuesto que van reemplazando a los viejos. Presentan una glándula de veneno y poseen el aparato venenoso mejor desarrollado, por lo tanto son las mayores productoras de veneno. Su cuerpo en la parte

distal se adelgaza para dar lugar a la cola, que es de escasa longitud con relación al cuerpo, es gruesa y termina en punta. Esta familia tiene incluye los géneros; *Bothrocophias*, *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Porthidium*, *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis* (Campbell y Lamar, 2004), el género *crotalus* incluye a las especies *Crotalus aquilus* y *Crotalus polystictus*.

2.2.1 *Crotalus aquilus* y *Crotalus polystictus*

En México existen especies de serpientes que han sido poco estudiadas. Tal es el caso de *Crotalus aquilus* (Klaubler, 1952) y *Crotalus polystictus* (Cope, 1865), ambas especies endémicas de México que habitan en regiones templadas del centro del País (Figura 1).



Figura 1. Fotografías de *C. polystictus* (izquierda), híbrido (centro) y *C. aquilus* derecha. Fotos de Octavio Roldán.

2.2.2 *Crotalus aquilus*

Los machos adultos son grandes, generalmente exceden los 600 mm de longitud total, y las hembras un poco más pequeñas. El espécimen más grande reportado fue de 683 mm de longitud total (Campbell y Lamar, 1989). La forma del cuerpo es robusta y de talla grande; las escamas de la región dorsal de la cabeza, cuerpo y cola son aquilladas. El color de esta especie es café grisáceo, con parches dorsales café oscuro a lo largo del cuerpo. En la cabeza se presenta un par de manchas café oscuro en la región de la nuca, así como franjas laterales café oscuro bordeadas de blanco que inician en la región preocular y supraocular, y terminan en las escamas supralabiales. La región ventral del cuerpo es de color crema y la zona caudal es crema con anillos café oscuro (Ramírez-Bautista et al., 2004).

Crotalus aquilus es de hábitos diurnos y crepusculares, habita en áreas pedregosas, pastizales, bosque de encino y mezquiales, y altitudes que van de los 1500 a los 4300 m (Ramírez-Bautista y Arizmendi, 2004). Se le puede encontrar en distintos tipos de vegetación como pastizal, bosque de coníferas y bosque de quercus. El rango de distribución para *Crotalus aquilus* es la meseta central y partes de la Sierra Madre Oriental en Hidalgo y San Luis Potosí (Campbell y Lamar, 1989).

2.2.3 *Crotalus polystictus*

Es una serpiente de cascabel de tamaño medio, generalmente con adultos de 700 a 800 mm de longitud. El patrón de coloración es color café ante, café pálido o gris pálido acercándose al color blanco, a menudo presenta tonalidades de oro pálido a café rojizo en la parte mediodorsal y presenta una serie de parches café oscuro distintivo y único de esta serpiente de cascabel (Campbell y Lamar, 1989; Ramírez-Bautista et al., 2004b).

Habita climas de tipo templado, semicálido y templado-subhúmedo. Esta especie se distribuye verticalmente en el altiplano mexicano, en altitudes que van de los 1450 a los 2600 m de la franja central de México. Frecuentemente es hallada en las áreas abiertas de los bosques en zonas rocosas; especialmente aparece en regiones pedregosas o en áreas con numerosas cuevas o madrigueras de tortugas en las cuales puede encontrar refugio fácilmente. Se ha observado que esta especie es activa durante el día y la noche (Campbell y Lamar, 1989).

2.3 Características del veneno de serpientes

El veneno es considerado como una secreción que puede ser simple o muy compleja. Es producida en una glándula especializada que forma parte de un sistema de envenenamiento que incluye una glándula de secreción y una dentición especializada (Figura 1) (Vonk et al., 2008). Una propiedad de los venenos de las serpientes es la de iniciar la digestión extracelular de sus presas (Campbell, 2000). Los venenos de las serpientes contienen alrededor de un 25 % de sólidos totales de los cuales entre un 70 a 90% están constituidos por proteínas y polipéptidos de alta masa molecular, responsables de la mayoría de los efectos farmacológicos. El resto de los componentes (10 a 30%) lo forman sustancias orgánicas de baja masa molecular, tales como carbohidratos, lípidos, péptidos pequeños, aminoácidos libres y nucleótidos, riboflavinas, ácidos orgánicos como también compuestos inorgánicos y elementos, tanto aniónicos como catiónicos (Beiber, 1979).

En las serpientes el aparato de envenenamiento consiste en un par de glándulas bilaterales especializadas (glándula de Duvernoy) localizadas en la parte media superior de las escamas labiales, en la parte posterior a las escamas nasales y por debajo de los ojos. En las serpientes de foseta (familias Atractaspididae, Elapidae y Viperidae) este aparato consiste en una glándula larga de veneno con un largo lumen basal, lo que permite el almacenamiento del veneno para su secreción inmediata a menudo por un conducto primario que se conecta una glándula accesoria y un conducto secundario que conecta la glándula con el colmillo hipodérmico. La contracción de un músculo compresor presuriza la glándula especializada y proporciona el envío de veneno bajo una presión moderada en los tejidos del receptor (Mackessy, 1991). (Fig.2)

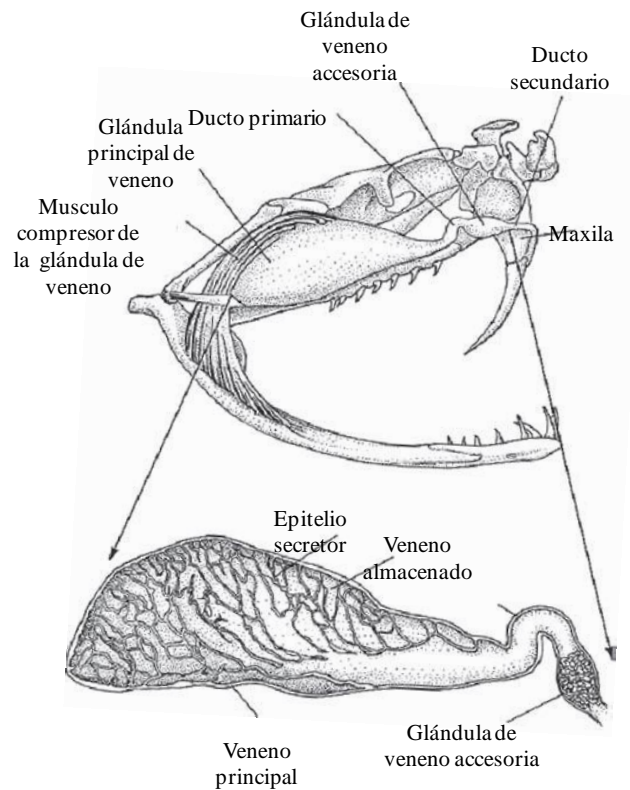


Figura 2. Glándula de veneno de viperidos. El veneno se almacena en el lumen, los músculos compresores presionan la glándula de veneno para su inyección a través de los colmillos (Mackessy, 2010).

El veneno de la familia *Viperidae*, subfamilia *Crotalinae*, en el cual se incluyen las dos especies *C. aquilus* y *C. polystictus*, es sobre todo hemotóxico es decir, actúa sobre las células y el sistema hemostático causando extensas lesiones locales, hemorragias y una variedad de alteraciones sobre la coagulación sanguínea por contener componentes procoagulantes y anticoagulantes (Maruñak et al., 2005). El envenenamiento se caracteriza por prominentes alteraciones a nivel local, incluyendo edema y necrosis; efectos que pueden resultar en secuelas permanentes desarrollándose muy rápidamente (Gutiérrez et al., 2000). Las fracciones del veneno que alteran el mecanismo de la hemostasia han sido clasificadas en cinco grupos diferentes dependiendo de su efecto general: a) fracciones del tipo coagulante que incluyen las enzimas similares a la trombina ó trombino similares y las activadoras de la protrombina; b) fracciones anticoagulantes como las activadoras de la proteína C; c) fracciones que inhiben la función plaquetaria como la familia de las proteínas RGD (Arg-Gly-Asp), las desintegrinas (actúan sobre las glicoproteínas de integrina, que median procesos de

adhesión celular, impidiendo la agregación plaquetaria y generando hemorragias); d) fracciones activadoras de la fibrinólisis y e) las hemorraginas (Huang, 1998).

2.4 Proteasas presentes en venenos de serpientes

Este importante grupo de enzimas constituye aproximadamente un 2% del total del genoma humano, lo que indica su importancia en las diferentes funciones de la vida. Dentro de este grupo se encuentran diferentes tipos mecanísticos, distinguiéndose cinco grupos generales: serín proteasas, sulfhidril proteasas, metaloproteasas, carboxipeptidasas y treonín proteasas (Overal y Kleifeld, 2008).

Las serín proteasas son enzimas caracterizadas por hidrolizar ésteres o enlaces peptídicos y que poseen en su centro activo un aminoácido de Serina esencial para la catálisis enzimática. Comprenden dos familias distintas: La familia de la quimotripsina que incluye a las enzimas de los mamíferos como la quimotripsina, tripsina y elastasa; y la familia de la subtilisina la cual incluye a las enzimas bacterianas como la subtilisina. La estructura tridimensional general es diferente entre las dos familias, pero poseen la misma geometría de su sitio activo y su catálisis procede de acuerdo al mismo mecanismo, por lo que se cree que han evolucionado de un gen común (Castro Guillen, 2005). Las serín proteasas exhiben diferentes especificidades de sustratos, las cuales están relacionadas a las sustituciones de aminoácidos en los múltiples sub-sitios enzimáticos que interactúan con residuos aminoácidos del sustrato. Las serín proteasas juegan un papel importante en varios procesos, como en el caso de la digestión de varios organismos pluricelulares, así como en la coagulación. Algunas son responsables de hidrolizar proteínas de vida media corta, como hormonas peptídicas y otras están presentes en varias rutas metabólicas de diferenciación, desarrollo y cascadas de señalización. Su actividad depende en gran medida de un grupo de residuos de aminoácidos (triada catalítica) presentes en el sitio activo de la enzima compuesto por Aspartato 102, Histidina 57 y Serina 195 siendo éste último su sitio catalítico (Hedstrom, 2002)

a) Serín proteasas tipo tripsina

Las enzimas tipo tripsina (Figura 3) rompen preferencialmente cadenas proteicas en el lado carboxilo de los residuos de aminoácidos básicos, como la arginina o la lisina. Estas enzimas poseen características específicas, su peso molecular varía alrededor de 20 a 35 kDa y los valores de su punto isoelectrico (pI) están la mayoría de ellos en el rango de 4-5. Los pH's óptimos son siempre alcalinos (8-9), las especificidades de estas enzimas son similares (pero no idénticas) a las tripsinas de los vertebrados, sin embargo, las enzimas de los insectos no son activadas o estabilizadas con iones de calcio (Levinsky et al., 1977; Jany et al., 1978; Lemos y Terra, 1992) como las de los vertebrados, en la mayoría de los casos son inestables a pH ácido y tienen diferente sensibilidad a inhibidores naturales de tripsina (Sakal et al., 1989).

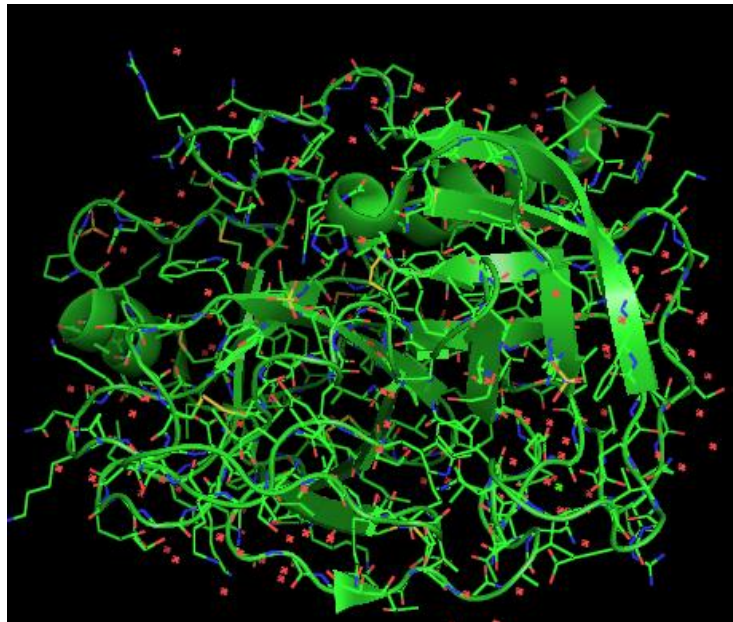


Figura 3: Estructura de tripsina.

PyMOL(TM) Incentive Product - Copyright (C).

b) Serín proteasas tipo quimotripsina

Las enzimas tipo quimotripsina (Figura 4) rompen cadenas proteicas en el lado carboxilo de un aminoácido aromático, o hidrofóbico (como la fenilalanina). Estas enzimas poseen valores de peso molecular de 20 a 30 kDa y pH óptimo en el rango de 8-9. Existen algunos reportes de este tipo de enzimas en varios coleópteros (Elpidina et al., 2005; Aguirre et al., 2009). Las secuencias de enzimas tipo quimotripsina han sido determinadas en *Vespa orientalis*, siendo similares a las de vertebrados (Jany et al., 1983; Casu et al., 1994). Además, las quimotripsinas de insectos actúan sobre el glucagon y la cadena β de la insulina oxidada, de una manera similar a las de vertebrados. De cualquier modo, algunas propiedades de las quimotripsinas de insectos contrastan con sus contrapartes en los vertebrados, tales como su inestabilidad a pH ácido y fuerte inhibición por el inhibidor de tripsina de soya (SBTI). Se ha reportado que este tipo de enzimas puede ser inhibidas por PMSF (Fluoruro de Fenil-metil-sulfonilo), TLCK (Tosil lisil clorometil cetona), SBTI y específicamente por TPCK (Tosil Fenilalanil clorometil cetona) (Castro Guillen, 2005).

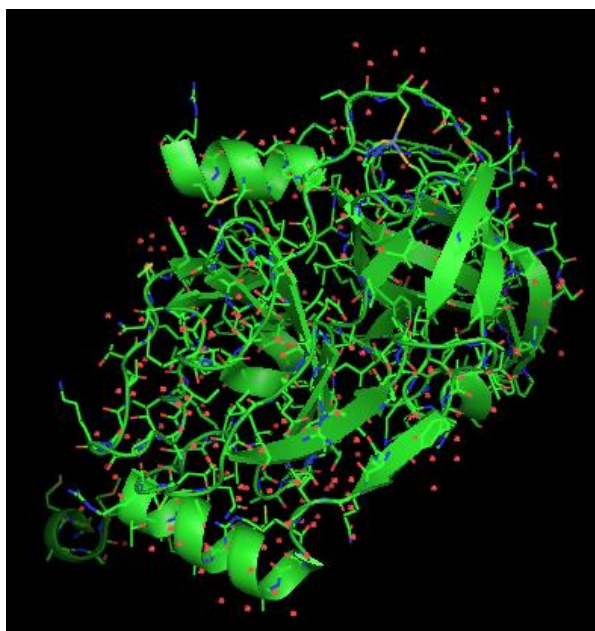


Figura 4. Estructura de quimotripsina.

PyMOL(TM) Incentive Product - Copyright (C)

2.5 Estudios sobre venenos e hibridación

El interés sobre los venenos en serpientes es antiguo y numerosos trabajos explican los efectos y los componentes de éstos, sin embargo, no es hasta esta última década, con el desarrollo de nuevas técnicas y métodos, que se han llevado a cabo estudios más específicos. Pantigoso et al. (2002), analizaron las características de la miotoxina aislada del veneno de la serpiente *Bothrops brazili*, encontrando que incrementa los niveles de calcio intramuscular. Lo anterior podría generar la activación de proteasas y lipasas endógenas dependientes de calcio que conducen a la necrosis muscular. En el 2004, Gayet al. estudiaron los colorantes quelantes de metales; EDTA Na₂ (10 mM), alizarina, arsenazo III y calción (10 mg/mL), como potenciales inhibidores de la actividad proteolítica que exhibe el veneno de *Bothrops alternatus* sobre la caseína, encontrando que la alizarina es un quelante efectivo para inhibir enzimas proteolíticas, específicamente metaloproteasas. De Roodt et al. en el 2005 estudiaron las actividades tóxicas y enzimáticas del veneno de algunas serpientes mexicanas de importancia sanitaria: *Bothrops (B.) asper*, *Agkistrodon (Agk.) billineatus*, *Athropoides (Ath., ex Bothrops) nummifer*, *C. durissus*, *C. scutulatus*, *C. basiliscus*, *C. atrox*, y *Micrurus (M.) nigrocinctus*. Determinaron las potencias letal, hemorrágica, necrotizante, fibrinolítica, procoagulante en plasma, protrombínica, fosfolipásica y fibrinogenolítica. Encontraron que el veneno de vipéridos presenta actividades hemorrágicas, necrotizantes, coagulantes sobre plasma, protrombínica, fibrinogenolítica y fosfolipásica importantes. Los venenos de mayor potencia letal fueron los de *Micrurus nigrocinctus* (DL₅₀ 2.3 + 0.5 µg/g) y *Crotalus scutulatus* (DL₅₀ 2.3 + 0.5 µg/g).

En 2006, Sánchez et al., estudiaron la actividad fibrinógena, actividad aglutinante, actividad hemorrágica y la inhibición de la adhesión celular provocada por la acción del veneno. También llevaron a cabo el análisis y purificación de desintegrinas, así como la determinación de la actividad proteolítica de *Crotalus scutulatus scutulatus* de Texas y Arizona, encontrando dos genes para desintegrinas; scutustatinay mojavestatina. Observaron que las serpientes cascabel que presentaron DL₅₀ de 2.9 a 5.5 mg/kg carecen de ambos genes, mientras que en organismos con DL₅₀ de 0.84 a 1.05 mg/kg ambos genes están presentes, pero carecen de actividad de desintegrina y los que mostraron DL₅₀ de 0.35 a 0.48 mg/kg, presentan ambos

genes para desintegrinas. Lo anterior hace suponer que en el grupo intermedio, estos genes no se están expresando o no presentan el mismo tipo de desintegrinas, por lo que es posible que esta especie de cascabel pudiera producir más de 2 tipos de desintegrinas.

Maruñak et al. (2005) estudiaron los efectos que causa el veneno de *Bothrops jararacussu* de Misiones, Argentina, sobre la coagulación de la sangre, así como la actividad coagulante, fibrinolítica, defibrinante, la capacidad de degradar el fibrinógeno y la letalidad del veneno. El veneno mostró ser α -fibrinogenolítico y los resultados para las actividades ensayadas fueron: concentración coagulante mínima (CCM) 18.5 $\mu\text{g/mL}$, concentración fibrinolítica mínima (CFM) 9.5 mg/mL, dosis defibrinante mínima (DDM) 1.56 μg , DL_{50} 43.52 $\mu\text{g/peso de ratón}$, los que difieren de los obtenidos para otras especies de *Bothrops* e incluso dentro de la misma especie, pero distribuidas en otras regiones sudamericanas. Pirela De las Salas et al. (2006) caracterizaron toxicológicamente el veneno total de la serpiente de cascabel *Crotalus durissus cumanensis* presente en la localidad de Porshoure, Guajira Venezolana. Determinaron la DL_{50} , actividad hemorrágica, actividad edematizante, actividad hemolítica indirecta, actividad coagulante sobre plasma humano (*in vitro*) y actividad defibrinante (*in vivo*).

2.5.1 Hibridación entre especies

En la naturaleza la fragmentación de la vegetación y modificación del hábitat influyen en la distribución y abundancia de los organismos, incrementando la oportunidad de hibridación natural entre especies donde una especie es menos común que la otra (Arnold, 1997). Los casos de hibridación de organismos son importantes en cuanto al conocimiento que pueden aportar sobre los mecanismos de especiación, evolución, reproducción y las barreras biológicas (Coyne y Orr, 2004). Meiket al. (2008) estudiaron un caso de hibridación entre *C. atrox* y *C. horridus*, haciendo una comparación del tipo de escamas y los patrones de coloración. Se observó que la hibridación en este caso se relacionó con modificación del hábitat, así como a la presencia de un número mayor de congéneres reproductivamente compatibles de *C. atrox* que están en contacto directo con *C. horridus*.

En el Estado de Querétaro estas especies comparten la misma zona de distribución, y es muy común que se observen en hábitats muy parecidos. Existen reportes en vida silvestre para

estas especies en el estado de México, reproduciéndose entre ella, y generando híbridos, lo que hace importante el estudio de venenos en estos organismos. (Padilla-García, comunicación personal). En cautiverio se reportó el nacimiento de dos camadas de híbridos de cascabel (*Crotalus polyaquilus*) en el herpetario de Querétaro. Medina-Sánchez et al. (2008) analizaron la concentración de proteínas encontradas en las especies de *C. aquilus* y *C. polystictus*, así como de organismos híbridos de estas dos especies nacidos en el Herpetario de la Universidad Autónoma de Querétaro. Se encontró diferencia en la cantidad y tipo de proteínas, siendo los híbridos los que presentaron mayor variedad de proteínas determinadas mediante perfiles electroforéticos. Es importante considerar que la edad y el sexo son factores importantes en el contenido y tipo de proteínas en el veneno.

Para comparar especies entre sí se utilizan los análisis fenéticos que basan sus clasificaciones tomando en cuenta el número mayor de caracteres que sea posible medir, contar y observar en los organismos, analizándolos con técnicas numéricas y midiendo el parecido de cada organismo (Schrocchi y Domínguez, 1992). Para el caso de las serpientes, este grupo es muy diverso en aspecto y coloración y la variación que puede existir entre individuos de una misma especie o en sus distintas etapas de desarrollo, así como la frecuente semejanza entre organismos de especies completamente diferentes pueden ser causa de una identificación errónea. Generalmente, para la identificación de una serpiente se requiere del conocimiento de las escamas de la cabeza, tanto dorsalmente (Figura 5a) y lateralmente (Figura 5b), como ventralmente (Figura 5c) (Pérez-Higareda et al., 2007).

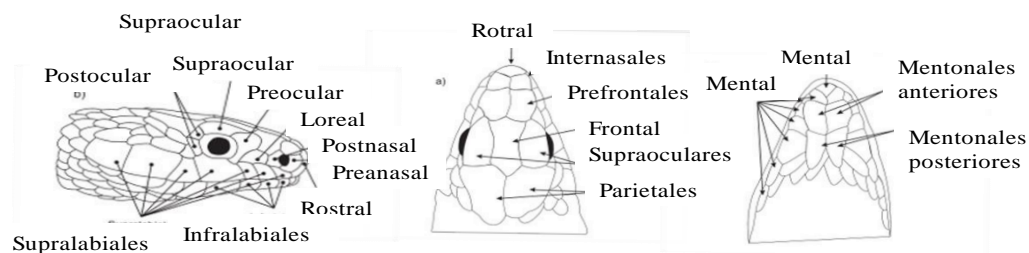


Figura 5. Características de la escutelación en serpientes. A) Región dorsal de la cabeza, B) Vista lateral, C) Región ventral (Pérez Higareda et al., 2007).

II. JUSTIFICACIÓN

En el Estado de Querétaro estas especies tienen una zona de distribución similar y aunque no existen reportes en vida silvestre, la probabilidad de que estas especies se reproduzcan entre ellas generando híbridos es alta, además debido a que no se cuenta con información acerca de las características de híbridos y de las especies mexicanas *C. aquilus*, *C. polystictus*, resulta importante estudiar aspectos específicos sobre las propiedades bioquímicas del veneno, específicamente en el contenido de enzimas tipo tripsina y quimotripsina que son uno de los principales componentes de los venenos hemotóxicos, así como su DL_{50} . Adicionalmente, es importante describir características fenotípicas y determinar la influencia de cada especie parental en los organismos híbridos, debido a los cambios que pueda generar la combinación del material genético de las especies parentales en los híbridos.

III. HIPÓTESIS

Como resultado del intercambio genético de las especies *Crotalus aquilus* y *Crotalus polystictus* se postula que los perfiles electroforéticos, los tipos de proteasas y las DL₅₀ de los venenos de los híbridos, así como la morfología de las escamas, serán diferentes a los encontrados en los parentales.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar las diferencias en el contenido y actividad de serín proteasas tipo tripsina y quimotripsina del veneno de *Crotalus aquilus*, *Crotalus polystictus* e híbridos de estas especies, así como la DL₅₀ y la descripción morfométrica de escamas.

5.1.1 Objetivos particulares

1. Determinar el perfil electroforético de las proteínas presentes en el veneno de individuos de las especies *C. aquilus* y *C. polystictus* así como de sus híbridos.
2. Determinar la actividad proteolítica mediante zimogramas en gel co-polimerizado con gelatina en veneno de las serpientes parentales y sus híbridos.
3. Determinar la actividad proteolítica mediante zimogramas del veneno de las especies parentales y sus híbridos.
4. Determinar la actividad proteolítica en microplaca en veneno de las serpientes parentales y sus híbridos.
5. Determinar la actividad inhibitoria de diferentes tipos de inhibidores sobre la proteólisis del veneno de híbridos y especies parentales.
6. Determinar las DL₅₀ del veneno de organismos híbridos y parentales en ratones CD-1.
7. Describir la morfología diferencial de las escamas de los organismos híbridos.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención del veneno

Los organismos híbridos del Herpetario de la Universidad Autónoma de Querétaro fueron el resultado de la cruce entre *Crotalus aquilus* (macho) y *Crotalus polystictus* (hembra). El veneno fue obtenido por extracción manual (ordeña) (Figura 6) de siete híbridos, cuatro organismos parentales de la especie *Crotalus aquilus* y dos de la especie parental *Crotalus polystictus* (Cuadro 1), dejándose 15 días de reposo entre cada extracción, para evitar el estrés en los organismos. Las extracciones fueron hechas en los meses agosto a noviembre del 2010 para determinación de actividad proteolítica, geles electroforéticos, zimogramas y ensayos DL_{50} , y de enero a mayo del 2011 para la determinación de las DL_{50} . Las extracciones fueron hechas en base a la necesidad de veneno, ya que en el caso de las dosis letales, se utilizo veneno de reciente utilizándolo en los primeros días de su extracción. El veneno se almaceno a $-70^{\circ}C$ hasta su análisis.

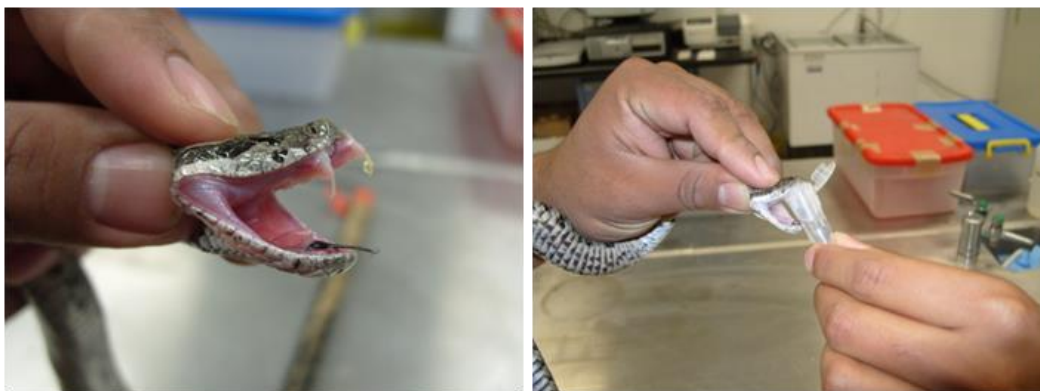


Figura 6. Extracción de veneno por compresión de las glándulas.

Cuadro 1: Edad y sexo de los organismos utilizados en el estudio

ORGANISMO	EDAD	SEXO
Híbrido 1	4 años	Macho
Híbrido 2	4 años	Hembra
Híbrido 3	4 años	Hembra
Híbrido 4	4 años	Macho
Híbrido 5	3 años	Hembra
Híbrido 6	3 años	Macho
Híbrido 7	3 años	Macho
<i>C. aquilus</i> 8	N.D. Parental	Macho
<i>C. aquilus</i> 9	N.D. Parental	Macho
<i>C. polystictus</i> 10	N.D. Parental	Hembra
<i>C. polystictus</i> 11	N.D. Adulto	Macho
<i>C. aquilus</i> 12	3 años. Juvenil	Macho
<i>C. aquilus</i> 13	3 años. Juvenil	Hembra

N.D: No determinado

6.2 Determinación de la concentración proteica:

a) Se utilizó el método de Bradford (1976) (Anexo 1) para determinar la concentración de la proteínas en los venenos, a partir de una curva patrón (Figura7).

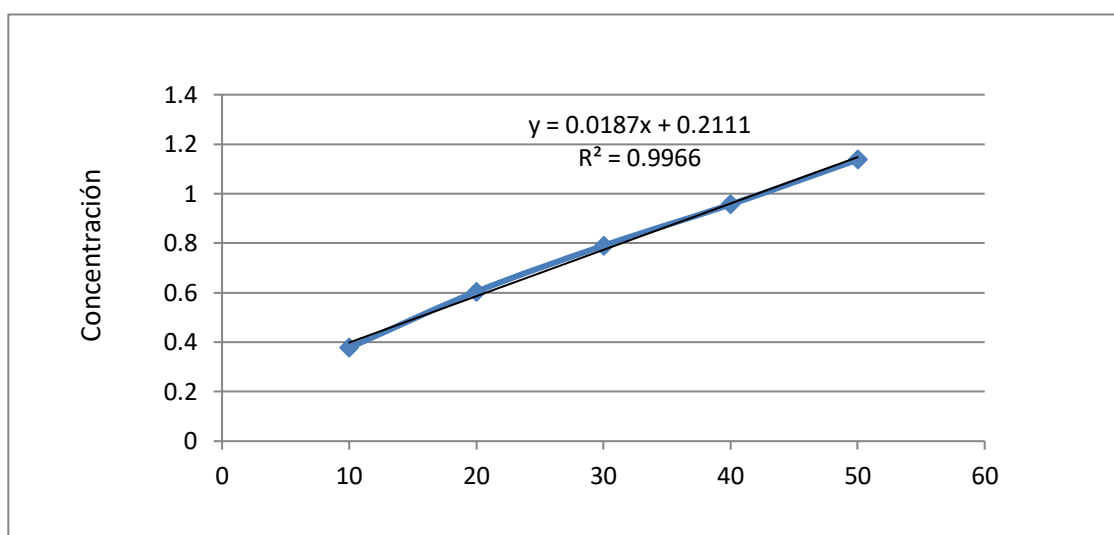


Figura7. Curva patrón de proteína mediante el método de Bradford tradicional.

Se hicieron diluciones del veneno de híbridos y parentales en una concentración 1:100 utilizando PBS. En tubos de ensayo se agregaron 15 µl de cada una de las disoluciones de veneno y se leyó la absorbencia en el espectrofotómetro a 595 nm. Posteriormente se usó la ecuación obtenida de la curva patrón para obtener las concentraciones de proteína del veneno de cada organismo.

b) Método de Bradford en microplaca. Se prepararon 5 diluciones de un estándar de proteína (ASB) a diferentes concentraciones (Anexo 1) En una placa de 96 pozos se agregaron los estándares de ASB y un muestra blanco (agua). Se agregó en cada pozo restante 10 µL de muestra (veneno diluido 1:1000) y 200 µL de reactivo de Bradford en relación 1:4 con agua. El rango lineal del ensayo para ASB es de 1.2 a 10.0 µg/mL.

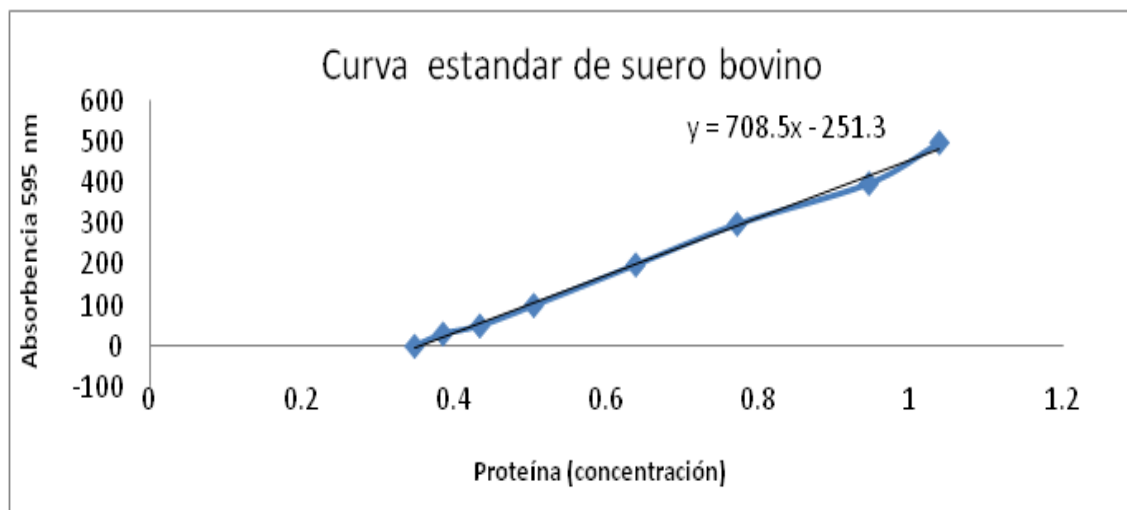


Figura 8: Curva patrón de proteína mediante el método de Bradford en microplaca.

6.3 Determinación de actividad proteolítica (Anexo 2)

La actividad proteolítica tipo tripsina y quimotripsina se determinó mediante el método de Erlanger et al. (1961)

La determinación de la inhibición proteolítica tipo tripsina se determinó de acuerdo al método de Erlanger (1961). Se utilizaron tres inhibidores específicos: dos extraídos de plantas HSTI (Inhibidor de tripsinas de la semilla de chan), TBPI (Inhibidor de Proteasas de frijol tépari) y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético).

6.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las muestras de veneno se prepararon con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Se hicieron diluciones 1 a 10 en PBS y se agregaron 100 µL de buffer de muestra 2x con SDS al 10%. Las muestras fueron calentadas a 100° C durante 5 min y se corrieron en geles homogéneos de acrilamida-bisacrilamida al 12%, de acuerdo al método de Laemmli (1970) (Anexo 3), utilizando una cámara Miniprotean II (BioRad). Una vez completada la electroforesis (aproximadamente por 2 horas) se tiñó el gel con azul de Coomassie por 8 h y se destiñó con una solución de metanol-ácido acético al 40% y 10%, respectivamente.

6.5 Zimogramas en membrana de celulosa

Se realizó una electroforesis nativa (Anexo 4) y se lavó el gel con una solución renaturalizante (Anexo 4) y se colocó una membrana de celulosa cubierta con sustrato BApANA(BApNA 0.01 M en Dimetilsulfoxido (DMSO) [43.5 mg/10 mL]) para medir la actividad proteolítica tipo tripsina. Se incubó a 37°C por 2 h y se lavó con Na₂NO₃ 0.1%, sulfato de amonio y con n-1-naftiletildiamina durante periodos de 5 min cada una.

Terminada la electroforesis nativa, se lavó la muestra con un buffer de activación, mediante un detergente de tritón X-100 no polar, que ayuda a eliminar el SDS. Posteriormente se hizo un lavado con Tris pH 8 para homogenizar el pH y se incubó el gel a 37° C durante 24 h en buffer de reacción. Transcurridas las 24 h el gel se tiñó con azul de Coomassie por 3 h y se destiñó con una solución de ácido acético 10%.

6.6 Zimogramas copolimerizados con el sustrato.

Se hizo electroforesis co-polimerizando acrilamida con gelatina en condiciones nativas y una vez terminada, se utilizó el método de Rice et al., (2000) para detectar actividad proteolítica en gel (Anexo 4). Se agitó el gel en una solución de activación con Tritón X100 para eliminar el SDS durante 1 h, después se lavó durante 30 min en un buffer renaturalizante cistina-cisteína y se incubó durante 12 h en un buffer de reacción. Se hicieron incubaciones a 24 h, 3 h y 10 min para observar las proteasas más activas. Terminada la incubación se tiñó el gel con azul de Coomassie por 24 y 8h. El gel se destiñó con una solución de metanol-ácido acético al 40% y 10%, respectivamente.

6.7 Determinación de pesos moleculares relativos

El peso molecular relativo se determinó en base a los marcadores de peso molecular (MPM) visibles en el gel teñido de poliacrilamida. Las proteínas sometidas a un campo eléctrico se mueven a una velocidad diferente en base a la carga neta y ya que su tamaño es inversamente proporcional a la distancia recorrida en un tamiz molecular, (gel de poliacrilamida) es posible determinar el peso molecular relativo de cualquier proteína en base a la distancia recorrida por los marcadores de peso molecular conocidos (MPM) sometidos a las mismas condiciones que las muestras. Los cálculos de peso molecular relativo fueron determinados tomando la distancia total (en centímetros) del gel de poliacrilamida (LG) y las distancias recorridas por cada una de las bandas correspondientes a las diferentes proteínas (D); posteriormente, se hizo una relación de D/LG (la cual fue denominada como RF de cada una de las bandas. Con los datos anteriores, se hizo una curva estándar de los RF's de las bandas correspondientes a los MPM, contra el logaritmo (base 10) de su peso molecular 50. Mediante una regresión lineal de dicha curva, obteniendo una línea recta y su correspondiente ecuación (mediante el programa de Microsoft-excel); se interpolaron los valores de RF en la ecuación resultante, para obtener el peso molecular relativo de cada proteína.

6.8 Determinación de la Dosis Letal 50 (DL_{50})

A partir del veneno se prepararon mezclas de veneno de híbridos y parentales de cada especie en diluciones 1: 100, con solución salina, completando con la misma un volumen de 0.5 mL para cada concentración de veneno. Se calcularon concentraciones de trabajo de 0.5 a 9 μ g de proteína de veneno/mL para la determinación de la DL_{50} . Para la determinación de la DL_{50} se utilizaron ratones de la cepa CD-1 con un peso entre 18 y 20 g proporcionados por el bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y ciclos de luz-oscuridad de 24 horas. En todo momento se observaron los lineamientos éticos de la NOM (NOM-062-ZOO-1999).

Se inyectaron por vía intraperitoneal (*i.p.*) 0.5 mL de las diluciones (Figura 9). Se emplearon 20 ratones por mezcla de veneno, con cuatro ratones por dosis, de un total de 5 dosis a ensayar y un grupo control. Los animales se mantuvieron en observación durante un período de 24 horas. Los animales del grupo control se inyectaron con solución salina isotónica. La curva de dosis respuesta se calculó mediante el logaritmo base diez de las concentraciones utilizadas contra el porcentaje de sobrevivencia de los organismos utilizados.



Figura 9. Técnica de inyección intraperitoneal.

6.8 Descripción morfométrica

Se llevó a cabo una medición del tipo de escamas tanto de híbridos como de las especies parentales, para conocer los caracteres morfométricos de mayor importancia en la diferenciación de las especies, Se identificaron los tipos de escamas de la cabeza así como el número de escamas tanto dorsalmente como ventralmente. Se tomaron el número y tipo de escamas ventrales y subcaudales y se realizó la descripción del patrón de coloración presente en los híbridos. Los organismos fueron “entubados” en cilindros de plástico transparente que permitió la medición de las escamas, (figura 8), dichas mediciones fueron hechas por las mismas personas para evitar sesgos en los conteos. Los datos fueron analizados haciendo una matriz de datos, usando el coeficiente taxonómico de similitud. El análisis de UPGMA de clúster fue hecho en base a la matriz de similitud usando NTSYSpc versión 2.2 (Rohlf, 1998).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

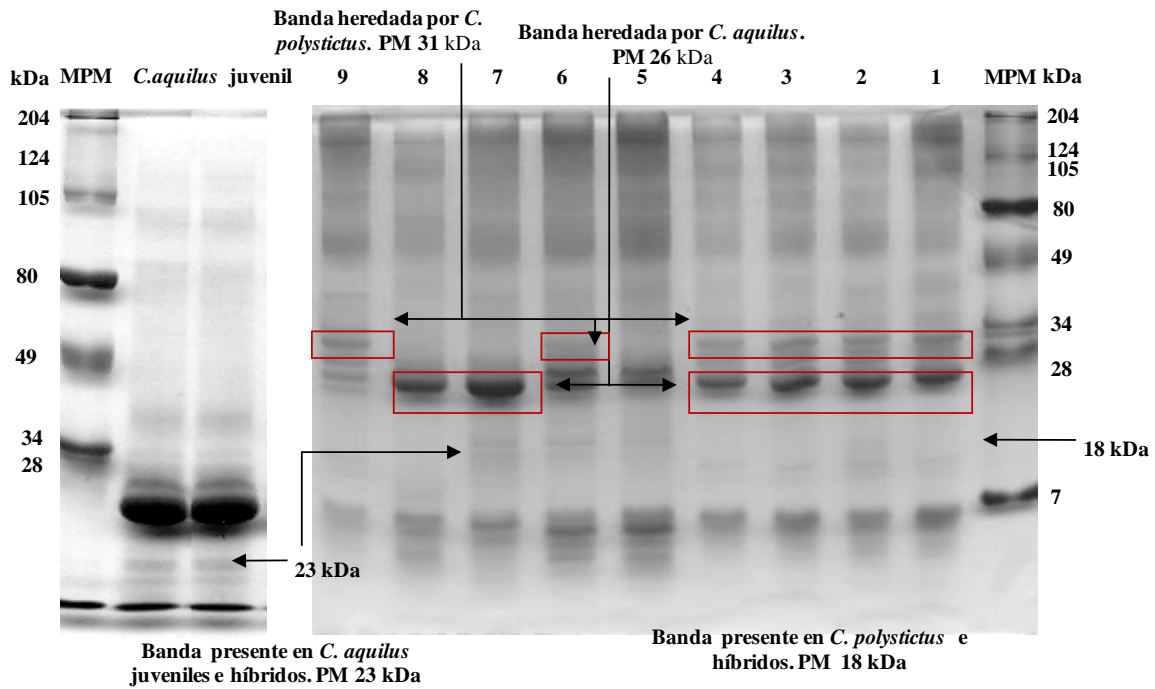
7.1 Determinación de proteína y perfiles electroforéticos

Debido a su elevada concentración, los extractos de veneno fueron diluidos 1:1000 para la determinación de proteína por el método de Bradford (Cuadro 2).

Cuadro 2: Concentración de proteína en el veneno de los individuos estudiados.

Organismo	Concentración µg/mL
Híbrido 1	473.50
Híbrido 2	186.55
Híbrido 3	329.91
Híbrido 4	358.48
Híbrido 5	167.19
Híbrido 6	363.21
Híbrido 7	184.43
<i>C. aquilus</i> 8	502.54
<i>C. aquilus</i> 9	143.57
<i>C. polystictus</i> 10	334.39
<i>C. polystictus</i> 11	259.76
<i>C. aquilus</i> 12	368.64
<i>C. aquilus</i> 13	314.79

El gel de electroforesis mostró una banda de un peso molecular aparente de 31 kDa presente en la especie parental *C. polystictus* y en los híbridos 1, 2, 3, 4 y 6 (Figura 10). *C. aquilus* presentó una banda muy marcada de bajo peso molecular con un peso molecular aparente de 26 kDa. Estas bandas aparecieron en la mayoría de los organismos híbridos y no son compartidas entre las especies parentales. Se observa la presencia de bandas con pesos moleculares aproximados de 23 kDa, las cuales se expresan en los híbridos 5, 6 y 7 y en los organismos juveniles de *C. aquilus* pero están ausentes en el parentales adultos. Lo anterior sugiere que estas proteínas fueron heredadas por la especie parental *C. aquilus*, teniendo activos estos genes en estado juvenil y latentes en los organismos adultos.



Organismo	Género	31 kDa	26 kDa	23 kDa	18-23 kDa
1 H	M	x	x		x
2 H	H	x	x		x
3 H	H	x	x		x
4 H	M	x	x		x
5 H	H		x	x	
6 H	M	x	x	x	
7 H	M		x	x	
8 <i>C. aquilus</i> parental	M		x		
10 <i>C. polistictus</i> parental	M	x		x	
12 <i>C. aquilus</i> juvenil	M		x	x	
13 <i>C. aquilus</i> juvenil	M		x	x	

FIGURA 10: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% y 12 %, tabla comparativa de proteínas. 20 µg de veneno por pozo. Muestras 1-4 (híbridos 4 años), 5-7 (híbridos 3 años); 8 especie parental *C. aquilus*; 9 especie parental *C. polystictus*. Los marcadores de peso molecular se indican a los lados de la figura.

El organismo parental *C. polystictus* (carril 9) presentó 5 bandas proteicas alrededor de 28-34 kDa, mientras que *C. aquilus* presentó sólo 2 bandas alrededor de estos pesos moleculares al igual que el híbrido 7 mientras que los híbridos 1, 2, 3, 4 y 6 presentaron las bandas de ambas especies parentales, siendo la banda de *C. aquilus* la que aparentemente tuvo una concentración mayor. Los híbridos 5 y 6 presentaron no presentaron la banda de 31 kDa presente en la especie parental *C. polystictus*, el cual además presentó una banda de 18 kDa al igual que los híbridos 1, 2, 3 y 4.

7.2 Zimogramas de actividad proteolítica en gel co-polimerizado con gelatina

Con objeto de determinar la actividad proteolítica en los geles de electroforesis de los componentes del veneno, se hicieron experimentos sobre actividad proteolítica directamente en el gel, co-polimerizando con gelatina (Figura 11). Los organismos parentales presentaron un patrón de bandeo con actividad proteolítica muy similar y se observaron bandas con actividad proteolítica con pesos moleculares alrededor de los 200, 77 y 61 kDa para todos los organismos. Los organismos híbridos 1, 2, 5, 6, 7, parental *C. polystictus* y *C. aquilus* juvenil presentaron una banda con actividad proteolítica con un peso molecular aproximado de 86 kDa, la cual no se observó en organismos parentales de *C. aquilus* adulto. Los híbridos 1, 2, 3, *C. aquilus* juvenil 13 y *C. aquilus* parental presentaron una menor actividad proteolítica, sin presentar las bandas de alrededor de 31 kDa presentes en los otros individuos. Las bandas de 26 y 31 kDa, presentes en la mayoría de los híbridos y heredadas por las especies parentales *C. aquilus* y *C. polystictus*, respectivamente, presentaron actividad proteolítica. *C. polystictus* presentó además, dos bandas proteicas sin actividad, las cuales se heredaron en la mayoría de los híbridos.

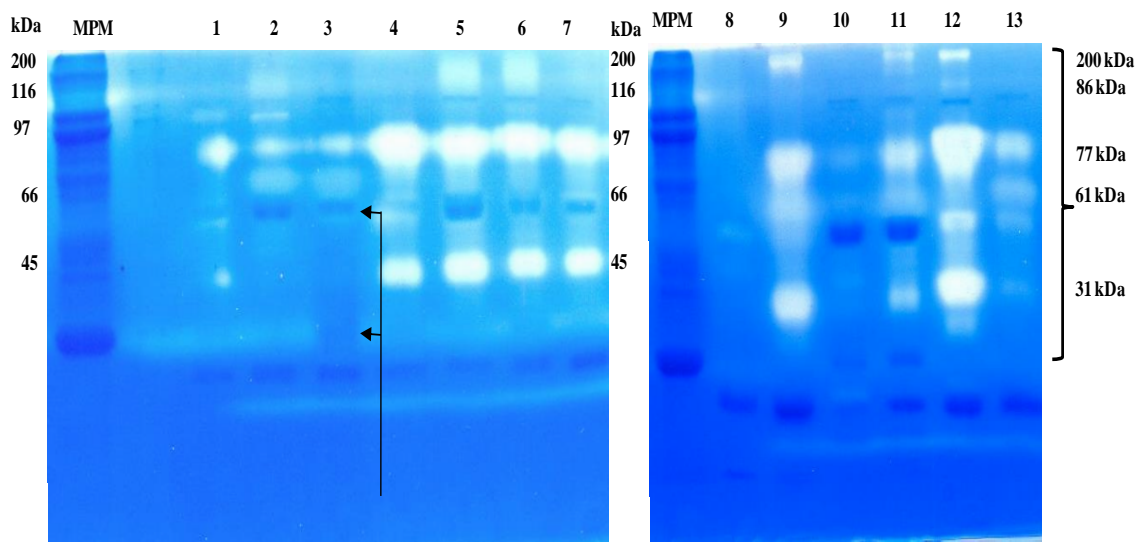
Se observó variabilidad en el contenido y actividad de proteasas entre individuos ya que algunos presentaron pocos tipos de proteasas y/o baja actividad proteolítica mientras que otros presentaron gran cantidad de proteasas activas. La actividad proteolítica más común se encontró alrededor de 77 kDa mientras que las proteasas alrededor de 200, 86 y 50 kDa fueron menos compartidas entre individuos. Es de esperar que los individuos con mayor

cantidad de proteasas activas presenten mayor letalidad sin embargo, hay que considerar que las proteasas actúan en conjunto por lo que la variedad es muy importante.

Se ha reportado para *Bothrops atrox* y *Bothrops asper* (*Crotalus oreganus oreganus*) diferencia en la composición del veneno entre organismos adultos y juveniles, expresando en estos casos distintos tipos de metaloproteasas, lo que les da una mayor letalidad a los venenos de estas especies en estado juvenil (Guercio et al., 2006; Alape-Giron et al., 2008). Las bandas proteicas de bajo peso molecular que no parecen tener actividad proteolítica, y podrían estar relacionadas con neurotoxinas, las cuales confieren una mayor letalidad a especies de serpientes que las contienen en sus venenos, debido a que afectan el sistema nervioso de los organismos ocasionando una parálisis muscular. (Mackessy, 1993).

Con el fin de destacar sólo las bandas de mayor actividad proteolítica, se corrieron zimogramas con un tiempo de incubación de sólo 10 min (Figura 12). Se observan bandas que abarcan desde los 50 a 200 kDa, donde las de mayor peso molecular fueron las más activas y las cuales se encontraron principalmente en los híbridos 1, 5, 6 y *C. aquilus* parental 8.

Bandas de 200 y 50 kDa pudieran estar relacionadas con la DL_{50} obtenida de los híbridos hembra y el parental *C. aquilus*, estando ambas bandas presentes en dichos organismos y en el caso de la banda de 50 kDa ausente en la mayoría de los organismos restantes; por lo que en conjunto estas proteínas pudieran estar relacionadas con reacciones relacionadas con la activación de otras proteasas (presentes en forma de zimógenos), por medio de proteólisis, generando una reacción en cascada que dé como resultado un veneno más activo.



Bandas sin actividad proteolítica presente en *C. polystictus* e híbridos. PM de 54 y 24 kDa.

Organismo	Género	200 kDa	86 kDa	77 kDa	70 kDa	50 kDa	31 kDa
1 H	M		x	xx		x	x
2 H	H		x	x	x		
3 H	H			x	x		
4 H	M			xxx	x	x	xxx
5 H	H	x	x	xxx	x	xx	xxx
6 H	M	x	x	xxx	x		xxx
7 H	M		x	xxx	x		xxx
8 <i>C. aquilus</i> parental	M					x	
9 <i>C. aquilus</i> parental	M	x		xxx	xx	x	xxx
10 <i>C. polystictus</i> parental	H			x	x		
11 <i>C. polystictus</i>	M	x		x	x		x
12 <i>C. aquilus</i> juvenil	M	x	x	xxx	x		xxx
13 <i>C. aquilus</i> Juvenil	M			x	x		x

FIGURA 11: Actividad proteolítica sobre gel co-polimerizado con gelatina. 20 µg de veneno por pozo, en condiciones nativas, en buffer de reacción a 37°C durante 24 h. Muestras 1-4 híbridos primera generación (4 años); 5-7 híbridos segunda generación (3 años), 8-9 parentales *C. aquilus*; 10-11, parental *C. polystictus*; 12-13 congéneres *C. aquilus* (3 años). Marcadores de peso molecular se muestran a la derecha de la imagen. Dos y tres X indican una mayor actividad proteolítica.

Se ha reportado para *Bothrops atrox* y *Bothrops asper* (*Crotalus oreganus oreganus*) diferencias en la composición del veneno entre organismos adultos y juveniles, expresando en estos casos distintos tipos de metaloproteasas, lo que les da una mayor letalidad a los venenos de estas especies en estado juvenil (Guercio et al., 2006; Alape-Giron et al., 2008). Las bandas proteicas de bajo peso molecular que no parecen tener actividad proteolítica, y podrían estar relacionadas con neurotoxinas, las cuales confieren una mayor letalidad a especies de serpientes que las contienen en sus venenos, debido a que afectan el sistema nervioso de los organismos ocasionando una parálisis muscular (Mackessy, 1993).

Con el fin de destacar sólo las bandas de mayor actividad proteolítica, se corrieron zimogramas con un tiempo de incubación de sólo 10 min (Figura 12). Se observan bandas que abarcan desde los 50 a 200 kDa, donde las de mayor peso molecular fueron las más activas y las cuales se encontraron principalmente en los híbridos 1, 5, 6 y *C. aquilus* parental 8. Bajo estas condiciones, la proteasa de alrededor de 200 kDa se observó en la mayoría de los individuos, lo que sugiere que es una proteasas de muy alta actividad ya que cuando se corrió el zimograma a 24 h de incubación y 37° C su actividad fue mucho menor, posiblemente debido a que la misma proteasas se autodegrada. Por otro lado, la actividad encontrada alrededor de 70 kDa no se observó en los híbridos aunque en el zimograma corrido a 37° C y 24 h de incubación se observó en la mayoría de los individuos. Nuevamente se observa variabilidad entre individuos lo cual podría estar relacionado directamente con la letalidad del veneno en cuanto a la participación de proteasas se refiere.

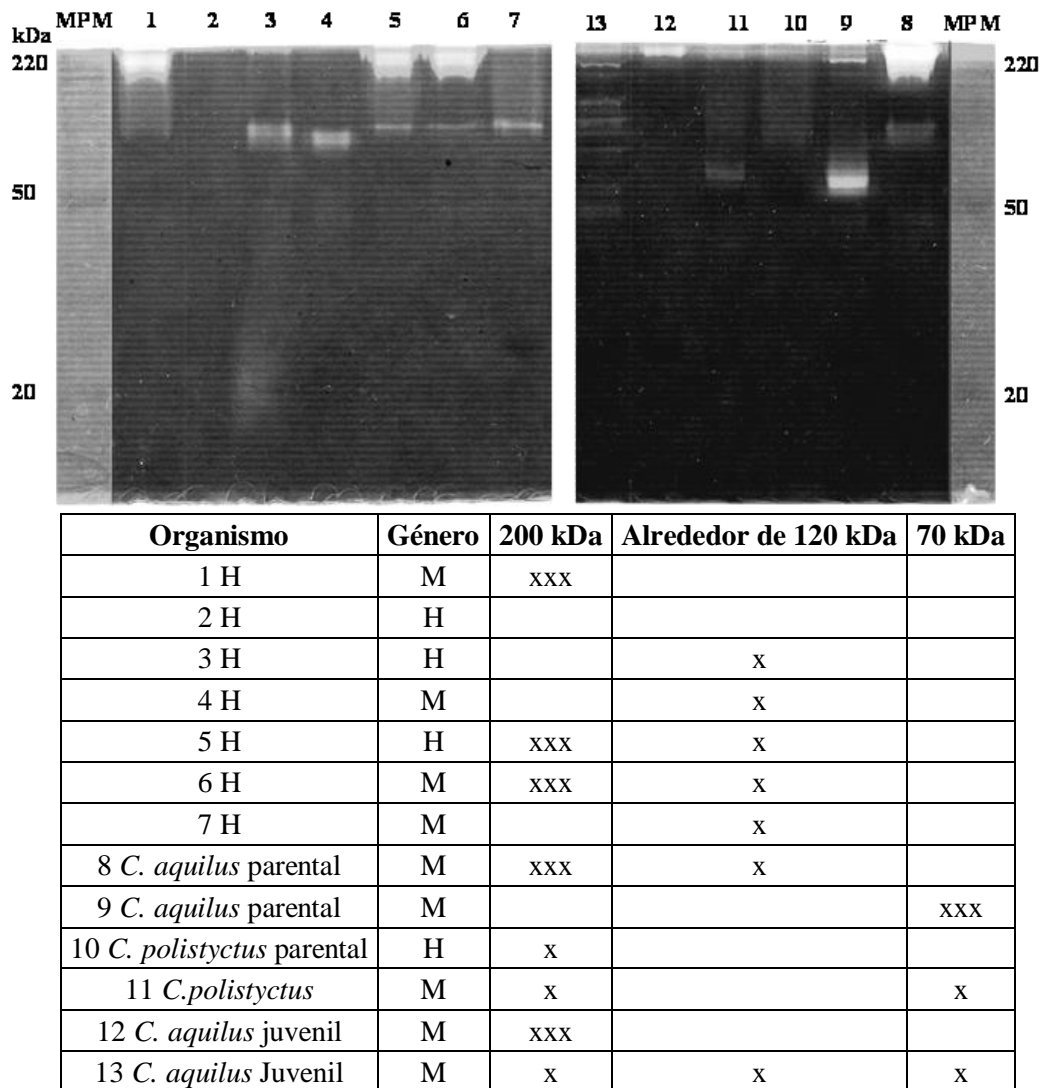


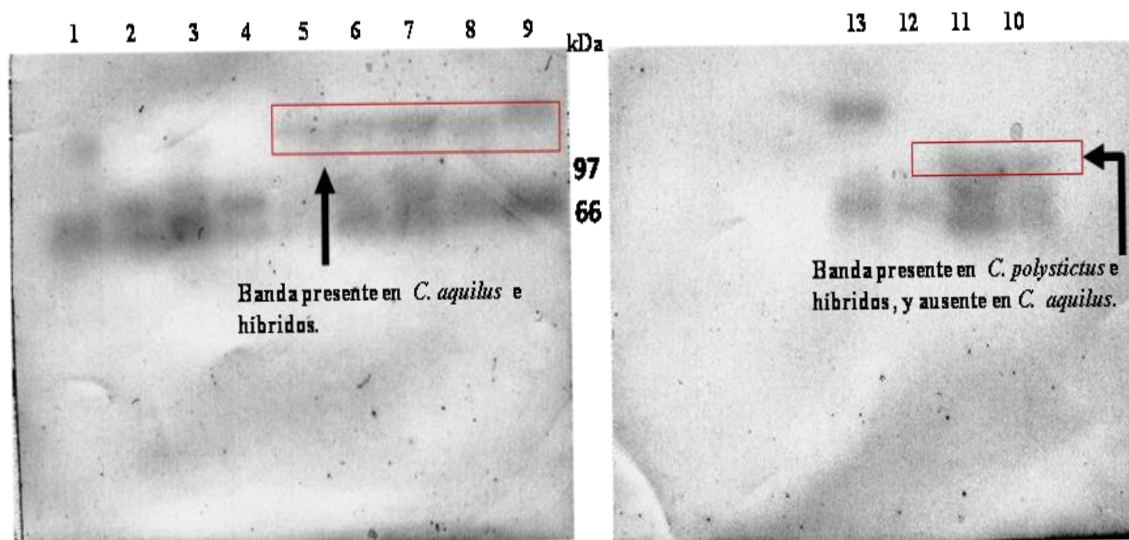
FIGURA12: Zimograma en gel de poliacrilamida al 12% co-polimerizado con gelatina, 20 µg de veneno por pozo e incubado sólo 10 min. Muestras 1-4 (híbridos 4 años), 5-7 (híbridos 3 años); 8-9 especie parental *C. aquilus*; 10-11 especie parental *C. polistictus*; 12,13 *C. aquilus* juvenil (3años). Se utilizó gel de corrida tris pH 8. Los marcadores de peso molecular se indican a los lados de la figura. Dos y tres X indican una mayor actividad proteolítica.

7.3 Zimogramas sobre membrana de celulosa.

Los zimogramas en matriz de celulosa se utilizaron para determinar cuáles de las bandas con actividad proteolítica pertenecen a serín proteasas que del tipo tripsina y quimotripsina, utilizando sustratos específicos (anexo 4). El ensayo para las proteasas tipo quimotripsina resultó negativo mientras que las serín proteasas tipo tripsina resultaron positivas (Figura 13). Los organismos híbridos 1, 5, 6 y 7 presentaron una banda más (200 kDa) que no se observó en los híbridos restantes 2, 3 y 4. La especie *C. aquilus* en estado juvenil presentó 2 bandas con peso molecular entre los 66 y 97 kDa y otra alrededor de los 200 kDa, las cuales estuvieron presentes en los híbridos. *C. polystictus* presentó tres bandas con pesos moleculares aparentes entre los 66 y 97 y no presentó la banda proteica con peso molecular aparente de 200 kDa, presente en los híbridos y la especie parental *C. aquilus*.

Los zimogramas realizados en base al método de Rice et al. (2001) mostraron serín proteasas tipo tripsina de alto peso molecular en híbridos y ambas especies parentales, con pesos moleculares que alrededor de los 200 y 77 kDa, los cuales fueron calculados en base a los marcadores moleculares de geles co-polimerizados con gelatina y estuvieron en el rango de las proteasas de mayor actividad. Las bandas de 31 y 26 kDa de las especies parentales, expresadas en la mayoría de los híbridos, no mostraron actividad en los zimogramas de este tipo sobre sustrato específico para serín proteasas tipo tripsina.

Estos zimogramas no presentaron bandas de peso molecular bajo, las cuales si aparecieron en zimogramas co-polimerizados con gelatina, por lo que dichas bandas pueden tener especificidades diferentes a las usuales, ya sea que funcionen a un pH de 8 al igual que las serín proteasas tipo tripsina o presenten una afinidad distinta hacia el sustrato BapNA.



Organismo	Género	200 kDa	66-97 kDa
1 H	M	X	x
2 H	H		x
3 H	H	X	xx
4 H	M	X	x
5 H	H	X	
6 H	M	X	x
7 H	M	X	x
8 <i>C. aquilus</i> parental	M	X	x
9 <i>C. aquilus</i> parental	M		xx
10 <i>C. polystictus</i> parental	H		xx
11 <i>C. polystictus</i>	M		xxx
12 <i>C. aquilus</i> juvenil	M		x
13 <i>C. aquilus</i> Juvenil	M	X	x

FIGURA 13: Zimograma de actividad proteolítica en matriz de celulosa saturado con sustrato BApNA, incubado por 3 h. Muestras 1-4 híbridos primera generación (4 años); 5-7 híbridos segunda generación (3 años); 8 y 9 parentales *C. aquilus*; 10 y 11 parentales *C. polystictus*; 12 y 13 congéneres *C. aquilus*. Dos y tres X indican una mayor actividad proteolítica.

7.4 Actividad proteolítica de serín proteasas

Se utilizaron sustratos específicos para tripsina y quimotripsina para determinar la posible diferencia en actividad proteolítica entre organismos híbridos y las especies parentales, ya que en los resultados de actividad proteolítica en gel y zimogramas en sustrato de celulosa se observaron diferencias entre organismos híbridos, así como diferencias entre las especies parentales.

La actividad proteolítica se determinó a partir de muestras de veneno diluidas 1:1000 para tripsina y 1:100 para quimotripsina, lo que mostró la alta actividad proteolítica de los venenos de serpientes. De las dos serín proteasas, la mayor actividad proteolítica fue presentada por proteasas tipo tripsina (Figura 14). El veneno de los individuos 1, 3 y 7 presentó los valores más altos de actividad entre los organismos híbridos, incluso el híbrido 1 presentó actividad proteolítica mayor a la de ambas especies parentales. *C. aquilus* y *C. polystictus* presentaron valores de actividad proteolítica diferentes entre sí.

Los organismos *C. aquilus* de tres años de edad presentaron valores de actividad parecidos a organismos adultos de esta misma especie, aunque el juvenil 12 mostró una actividad mucho menor a los demás organismos, lo que puede deberse a que posee un número menor de proteínas con actividad proteolítica tipo tripsina, tal como se observó en los zimogramas en celulosa. En el caso de la actividad proteolítica tipo quimotripsina (Figura 15), los organismos híbridos 1, 3 y 7 presentaron los valores más altos. Entre organismos parentales *C. aquilus* y *C. polystictus*, el primero mostró una actividad mayor, siendo similar a la actividad proteolítica de los demás híbridos.

La mayor actividad proteolítica no siempre es la más importante para ejercer su función biológica. Por ejemplo, se sabe que la actividad tipo quimotripsina es más importante que la tipo tripsina en células cancerígenas, a pesar de que su concentración es menor. En este caso cuando se observa la relación quimotripsina/tripsina (Q/T) en función de la letalidad de los venenos (Cuadro 3), es posible observar que el híbrido 5, el *C. aquilus* parental 9 y el *C. aquilus* juvenil 12 presentan los mayores valores en la relación Q/T y también fueron de los individuos que presentaron mayor variabilidad en proteasas, de acuerdo a los zimogramas.

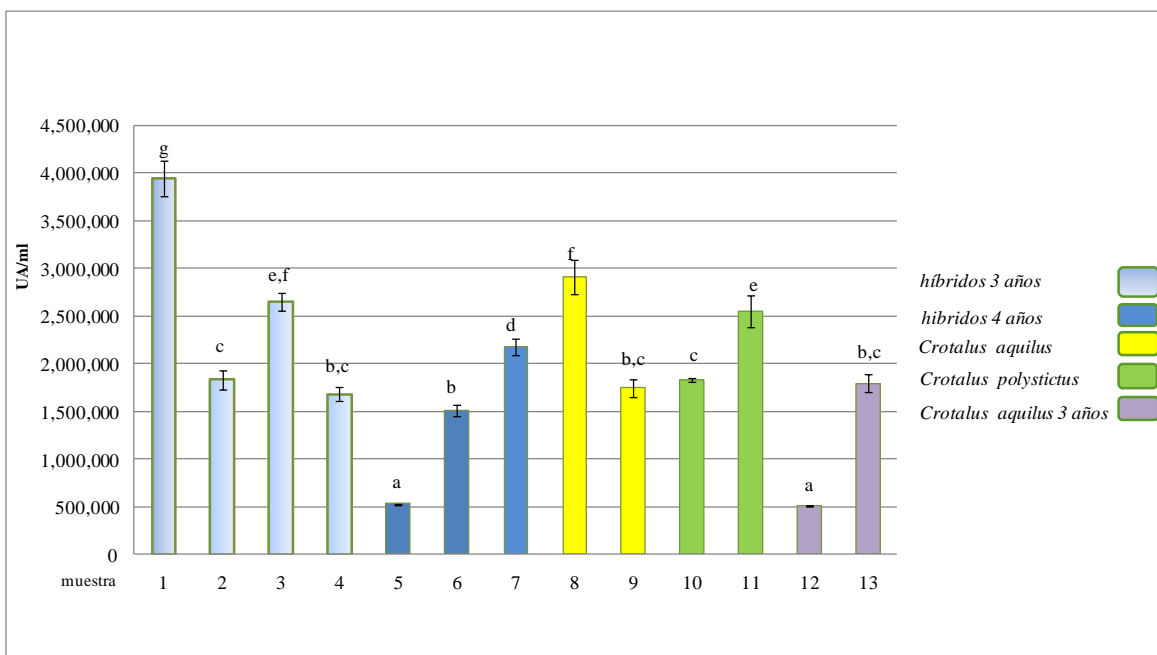


FIGURA 14: Actividad proteolítica específica tipo tripsina sobre sustrato BApNA incubado por 30 minutos. Muestras 1-4 híbridos primera generación (3 años); 5-7 híbridos segunda generación (4 años); muestras 8-9 especie parental *C. aquilus*; muestras 10-11 especie parental *C. polystictus*; 12 y 13 *C. aquilus* (2 años). Letras minúsculas indican diferencia estadística significativa (Tukey, $p \leq 0.05$).

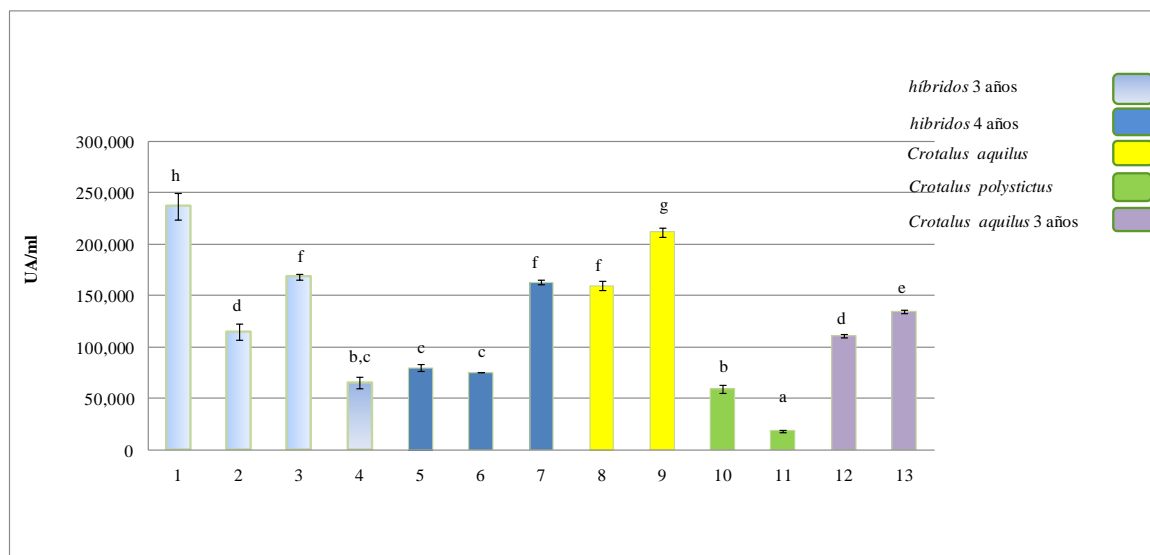


FIGURA 15: Actividad proteolítica específica tipo tripsina sobre sustrato SAAPFpNA. 1-4 híbridos de la primera generación (4 años); 5-7 híbridos de la segunda generación (3 años); muestras 8-9 especie parental *C. aquilus*; muestras 10-11 especie parental *C. polystictus*; 12 y 13 *C. aquilus* (2 años). Letras minúsculas indican diferencia estadística significativa (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 3. De actividades proteolíticas tipo tripsina y quimotripsina expresadas en UA/mL. Organismos 5, 9 y 12 muestran mayor variación Q/T que el resto.

Organismo	Género	Actividad tipo quimotripsina	Actividad tipo tripsina	Relación Q/T
1	M	237166	3943333	0.060
2	H	115500	1836666	0.062
3	H	168500	2646666	0.063
4	M	66000	1685000	0.039
5	H	80333	530000	0.151
6	M	75833	1513333	0.050
7	M	163333	2175000	0.075
8	M	159833	2916666	0.054
9	M	212000	1750000	0.121
10	H	59000	1833333	0.032
11	M	18666	2553333	0.007
12	M	111000	508333	0.218
13	M	134500	1798333	0.074

El veneno de este tipo de serpientes es muy complejo y su letalidad es resultado de la combinación de enzimas y toxinas que lo conforman, por lo que no es posible establecer relaciones directas entre las actividades estudiadas y el comportamiento del veneno. Los venenos de serpientes del género *Crotalus* pueden tener de 50 hasta 100 proteínas y componentes peptídicos, representativos de 10 a 20 familias proteicas de los venenos (Perkins et al., 1993; Perkins y Tomer, 1995; Sanz et al., 2006). Los organismos 1, 3 y 7 presentaron los valores de actividad proteolítica más alta entre los híbridos estudiados, tanto para tripsina como para quimotripsina, con niveles similares a las especies parentales, siendo el organismo híbrido 1 (macho) el que presentó mayor actividad proteolítica. En este sentido, no se observó una tendencia entre las dos actividades proteolíticas para ninguna de las especies parentales, ni para los organismos híbridos, aunque el organismo 1 mostró una tendencia similar, con los valores más altos para ambos tipos de actividad proteolítica.

7.5 Actividad inhibitoria de proteólisis

La determinación de la inhibición proteolítica se llevó a cabo utilizando inhibidores de proteasas HSTI, TBPI, EDTA y EDTA con veneno sometido a 50°C durante 5 min. Los resultados de las pruebas de inhibición de actividad proteolítica fueron sometidos a un análisis estadístico mediante T de student y con Anova, Tukey y Dunnett con una $p \leq 0.05$ (Figura 16). No se observó diferencia significativa entre la actividad proteolítica del veneno al probar los inhibidores de proteasas, lo que indica que no se logró inhibir la actividad proteolítica del veneno de organismos híbridos y especies parentales con los inhibidores utilizados en este estudio. Esto sugiere que estas serán proteasas poseen características diferentes de otras serán proteasa, siendo termoestables y no son afectadas por el uso de quelantes, ni por los inhibidores probados. Esas características pueden ser interesantes para considerar su aplicación biotecnológica.

Estudios anteriores han utilizado quelantes para inhibir actividad proteolítica y se encontró que la alizarina es un quelante efectivo para inhibir enzimas proteolíticas sobre geles co-polimerizados con caseína (Gay, 2004). Sin embargo, en este caso el EDTA no inhibió las actividades proteolíticas determinadas.

7.6 Dosis letal media (DL_{50})

Para calcular las DL_{50} se llevaron a cabo curvas dosis-respuesta utilizando mezclas de veneno de híbridos hembra, híbridos machos y especies parentales por separado (Cuadro 4).

Cuadro 4. Número de organismos muertos por dosis de veneno en 24 horas. n= 4 organismos por dilución.

			µg de proteína de veneno/mL									
Mezcla de veneno	control	0.5	1	1.5	2	3	4	5	5.5	6.5	7	9
Grupo 1 de híbridos hembra	0/4	0/4	3/4	3/4	3/4	4/4	ND	ND	4/4	ND	4/4	ND
Grupo 2 de híbridos machos	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	ND	0/4	ND	0/4	ND
<i>C. aquilus</i> macho (parental)	0/4	0/4	0/4	3/4	3/4	3/4	3/4	ND	ND	ND	3/4	4/4
<i>C. polystictus</i> hembra (parental)	0/4	0/4	ND	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

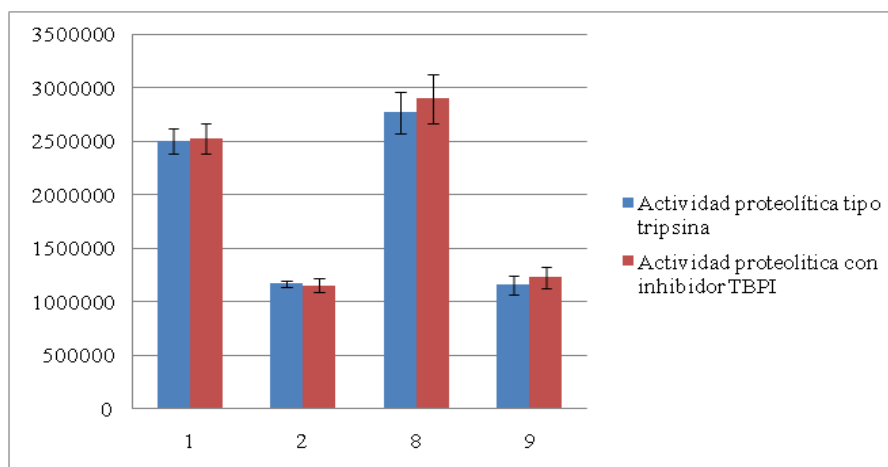
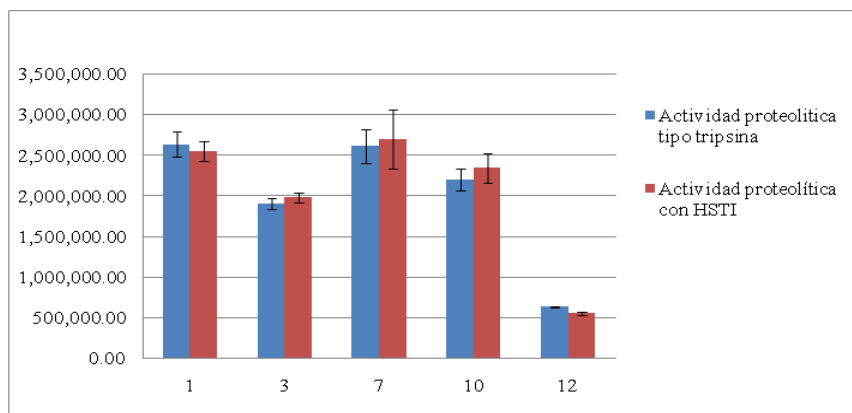
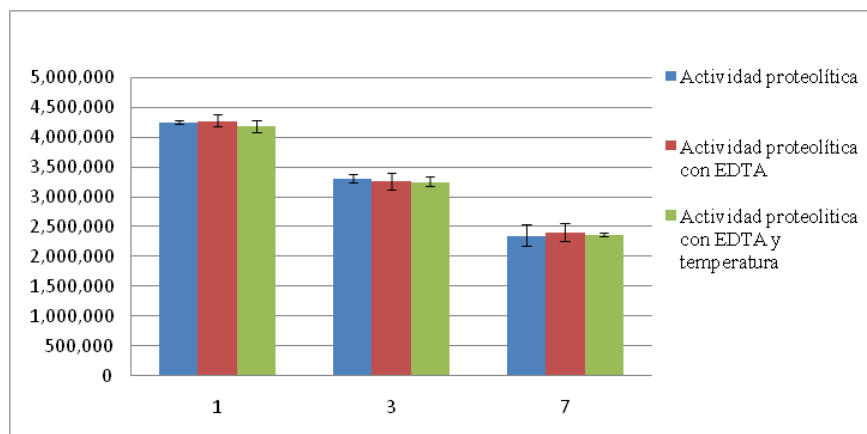


FIGURA 16: Actividad inhibitoria de proteólisis de veneno en microplaca. A) Actividad proteolítica sobre sustrato BApNA. Inhibidor EDTA B) Actividad proteolítica sobre sustrato BApNA. Inhibidor HSTI. C) Actividad proteolítica sobre sustrato BapNA. Inhibidor TBPI. No se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Se observa que únicamente la mezcla de veneno de híbridos hembra y la mezcla de parentales macho presentaron efecto en función de la concentración. Las DL_{50} (Figura 17) fueron de 1.02 y 2.04 μg de proteína de veneno/g de peso para híbridos hembra y parentales *C. aquilus* macho, respectivamente. La DL_{50} encontrada para híbridos hembra sugiere que presentan un veneno más tóxico que el de las especies parentales y el veneno de organismos híbridos macho. Mackessy (2008) reportó una DL_{50} de 3.4 μg de veneno/ g de peso para la especie *C. Polystictus* aunque en el presente no fue posible observar letalidad en el veneno el parental hembra de esta especie.

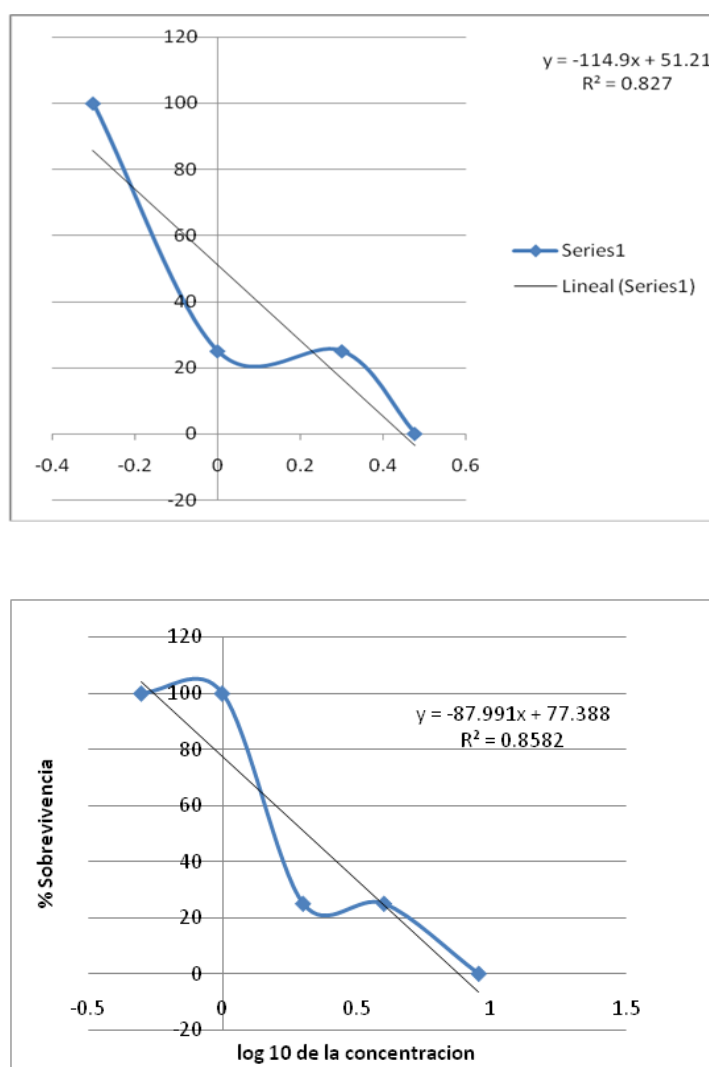


FIGURA 17. Curva dosis respuesta del veneno de híbridos hembras y *C. aquilus* macho.

Los híbridos presentaron una combinación de proteasas provenientes de los venenos de ambas especies parentales las cuales en algunos casos (proteasas tipo tripsina) no fueron compartidas entre especies parentales. Es probable que la expresión de estas proteasas no compartidas puedan estar influyendo en el grado de toxicidad de los venenos de los organismos híbridos, aunado al efecto que tienen los distintos tipos de proteasas y toxinas que no fueron incluidos en las pruebas de actividad proteolítica. Es difícil determinar con los análisis realizados en el presente estudio qué bandas con actividad proteolítica pudieran estar ejerciendo un mayor impacto en la DL_{50} . Sin embargo, es posible observar que algunos individuos presentaron mayor cantidad y diversidad de proteasas con actividad. Entre ellos se encuentran los individuos híbrido hembra 5 y *C. aquilus* parental macho 9. Estos mismos individuos presentaron altas relaciones Q/T lo que podría indicar que este parámetro puede ser útil en el estudio de los venenos. Sin embargo, debemos de considerar que el híbrido 1 que presenta la mayor concentración tanto de proteasa tipo quimotripsina, como de tipo tripsina no resultó de los más letales; lo que se sugiere que se debe ser cuidadosos para establecer este tipo de conclusiones. El hecho de que las mezclas de veneno que incluían a estos dos grupos fueran los únicos en provocar letalidad, puede ser indicativo de que se trate de la influencia del veneno individual de los organismos 5 y 9 que mostraron ser los más tóxicos, sin embargo, esto requiere aún de un mayor análisis.

Al momento de las extracciones se observó que la cantidad de veneno producido por individuos de talla más pequeñas era menor, ya que organismos de 4 años generaron una mayor cantidad de veneno que los organismos de 3 años. Lo anterior puede deberse a que los organismos de menor tamaño poseen glándulas de veneno más pequeñas que los organismos adulto (Mirtschin et al., 2002; Mackessy et al., 2003, 2006).

7.7 Comparación fenética de híbridos y especies parentales *C. aquilus* y *C. polystictus*.

Se hicieron los conteos de tipo de escama para determinar el número promedio en los tipos de escamas (cuadro 5), los cuales son importantes a la hora de identificar especies de serpientes (Pérez-Higareda et al., 2007). Se utilizaron 8 caracteres fenotípicos obtenidos de la escama (Cuadro 5) y 9 de proteína, para comparar a los híbridos con las parentales. El análisis de similitud entre los organismos se hizo mediante el programa NTSys-PC ver. (Rohlf, 1998) utilizando el coeficiente de taxonómico de similitud con los datos estandarizados. (Anexo 5).

Cuadro 5. Promedio de número de escamas para las especies *C. aquilus*, *C. Polystictus*, híbridos hembra HH. , e híbridos macho HM.

Tipo de escamas	<i>Crotalus aquilus</i> machos	<i>Crotalus aquilus</i> hembras	<i>Crotalus polystictus</i>	HM	HH
Patrón de manchado dorsal	24-35	26-32	ND	32-39	31-34
Bandas de la cola	2 a 4	4 a 6	5	4-7	3-5
Escamas alrededor del cascabel	8 a 10	8 a 10	10	10-12	10-12
Subcaudales	18-24	23-28	17 a 29	24-27	19-21
Ventrales	141-150	136-144	161-187	155-158	157-164
Supralabiales	11 a 13	10 a 13	12a 15	13-14	12-14
Infralabiales	11 a 12	10 a 12	11 a 16	11-14	12-14
Interrectales	20-25	20-26	ND	ND	ND
Escamas de la mitad del cuerpo	21-24	21-23	25 a 28	25-26	25
Intersupraoculares	3	2 a 4	3	ND	ND

***ND (no determinado)**

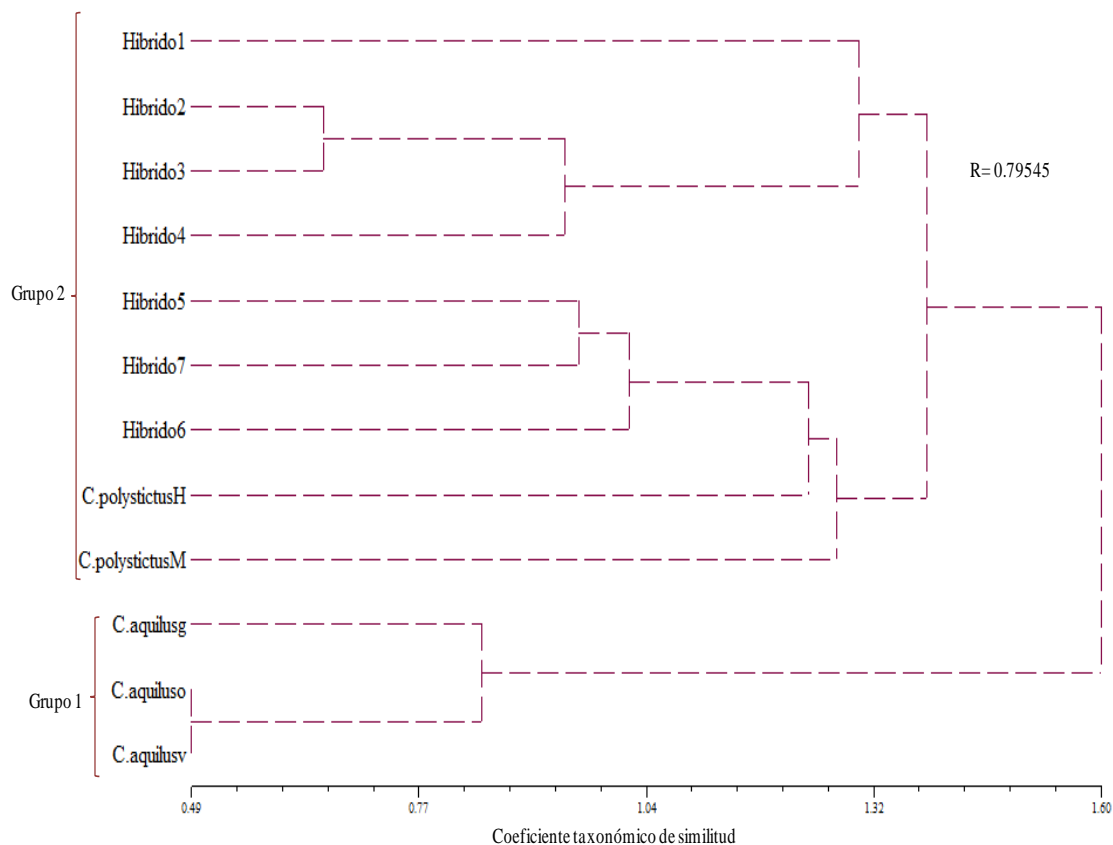
El fenograma (Figura 18) fue generado mediante matriz de datos (cuadro 6) utilizando los caracteres de las escamas y la presencia de proteínas de las especies parentales que se heredaron en algunos híbridos. La banda de 31 kDa se presentó en *C. polystictus* parental

hembra mientras que la de 26 kDa se presentó en *C. aquilus* parental macho. El fenograma mostró similitudes y diferencias entre los organismos híbridos y las especies parentales, mostrando dos grupos en general. El primer grupo está conformado por todos los organismos híbridos y la especie parental *C. polystictus*. Dentro del segundo grupo se encontraron los organismos pertenecientes a la especie *C. aquilus*. Estos resultados sugieren que a demás del tipo de escamas, el patrón de proteínas puede resultar importante para la separación de estas dos especies.

Cuadro 6. Matriz de datos de tipos de escama y bandas de proteína en kDa. Banda de *C. aquilus* CA, banda de *C. polystictus*.

OTUS	PMD	BC	EC	SUB	VEN	SUP	INF	EMC	CA	CP	23	200	86	77	70	50	66 - 97
Híbrido1	39	4	12	24	155	13	11	25	1	1	0	1	1	1	0	1	1
Híbrido 2	34	3	11	19	157	12	12	25	1	1	0	0	1	1	1	0	2
Híbrido3	31	3	10	21	163	13	12	25	1	1	0	0	0	1	1	0	2
Híbrido4	32	4	10	26	160	14	14	26	1	1	0	0	0	1	1	1	2
Híbrido5	32	5	12	21	164	14	14	25	1	0	1	1	1	1	1	1	2
Híbrido6	36	7	12	26	161	14	14	25	1	1	1	1	1	1	1	0	3
Híbrido7	32	4	12	27	158	13	13	25	1	0	1	0	1	1	1	0	3
<i>C. aquilusg</i>	29	4	10	25	152	11	11	23	1	0	0	1	0	0	0	1	2
<i>C. aquiluso</i>	27	4	10	26	145	11	11	23	99	99	99	1	0	1	1	1	2
<i>C. aquilusv</i>	30	4	10	26	143	12	12	23	99	99	99	99	0	99	99	99	99
<i>C. polystictusH</i>	99	5	12	20	165	14	14	25	0	1	1	0	0	1	1	0	3
<i>C. polystictusM</i>	99	5	12	30	141	14	14	27	99	99	99	1	0	1	1	0	3

Tanto *C. aquilus* como *C. polystictus* comparten la misma zona de distribución (Ramírez-Bautista et. al., 2004), y es muy común que se observen en hábitats muy parecidos, lo cual muy probablemente pueda llevar a la hibridación en estado natural en estos sitios de convergencia. Los híbridos poseen características fenotípicas más parecidas a *C. polystictus*, aunque los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la letalidad del veneno es más similar a *C. aquilus*.



	MD	BC	EC	SUB	VEN	SUP	INF		
HíbridoA	39.0000	4.0000	12.0000	24.0000	155.0000	13.0000	11.0000		
HíbridoB	34.0000	3.0000	11.0000	19.0000	157.0000	12.0000	12.0000		
HíbridoC	31.0000	3.0000	10.0000	21.0000	163.0000	13.0000	12.0000		
HíbridoD	32.0000	4.0000	10.0000	26.0000	160.0000	14.0000	14.0000		
HíbridoE	32.0000	5.0000	12.0000	21.0000	164.0000	14.0000	14.0000		
HíbridoF	36.0000	7.0000	12.0000	26.0000	161.0000	14.0000	14.0000		
HíbridoG	32.0000	4.0000	12.0000	27.0000	158.0000	13.0000	13.0000		
C. aquilusg	29.0000	4.0000	10.0000	25.0000	152.0000	11.0000	11.0000		
C. aquilus0	27.0000	4.0000	10.0000	26.0000	145.0000	11.0000	11.0000		
C. aquilusv	30.0000	4.0000	10.0000	26.0000	143.0000	12.0000	12.0000		
C. polystictusH	99.0000	5.0000	12.0000	20.0000	165.0000	14.0000	14.0000		
C. polystictusM	99.0000	5.0000	12.0000	30.0000	141.0000	14.0000	14.0000		
	EMC	BANDA	CA	BANDA	CP	23	200	86	77
HíbridoA	25.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
HíbridoB	25.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000
HíbridoC	25.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000
HíbridoD	26.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000
HíbridoE	25.0000	1.0000	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
HíbridoF	25.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
HíbridoG	25.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000
C. aquilusg	23.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000
C. aquilus0	23.0000	99.0000	99.0000	99.0000	99.0000	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000
C. aquilusv	23.0000	99.0000	99.0000	99.0000	99.0000	0.0000	0.0000	99.0000	99.0000
C. polystictusH	25.0000	0.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000
C. polystictusM	27.0000	99.0000	99.0000	99.0000	99.0000	1.0000	0.0000	0.0000	1.0000
	70	50	66-97						
HíbridoA	0.0000	1.0000	1.0000						
HíbridoB	1.0000	0.0000	2.0000						
HíbridoC	1.0000	0.0000	2.0000						
HíbridoD	1.0000	1.0000	2.0000						
HíbridoE	1.0000	1.0000	2.0000						
HíbridoF	1.0000	0.0000	3.0000						
HíbridoG	1.0000	0.0000	3.0000						
C. aquilusg	0.0000	1.0000	2.0000						
C. aquilus0	1.0000	1.0000	2.0000						
C. aquilusv	99.0000	99.0000	99.0000						
C. polystictusH	1.0000	0.0000	3.0000						
C. polystictusM	1.0000	0.0000	3.0000						

Figura 18. Fenograma obtenido mediante un análisis de similitud utilizando el coeficiente taxonómico de similitud entre organismos híbridos y las especies parentales *C. aquilus* y *C. Polystictus*. Fenograma agrupado mediante UPGMA Se utilizaron valores de tipo de escamas y proteínas. Caq8g, Caq9o, Caq10v (organismos machos *C. aquilus*), CpolyH (*C. polystictus* hembra), CpolyM (*C. polystictus* macho).

VII. CONCLUSIONES

El perfil electroforético mostró diferencias en la presencia de proteínas tanto entre las especies parentales como en los organismos híbridos, presentando combinaciones complejas. De acuerdo a los zimogramas, en todos los casos se encontró actividad proteolítica en proteínas de alto y/o bajo peso molecular, observándose alta variabilidad entre individuos. Al realizar el ensayo específico para proteasas tipo tripsina, sólo se observó actividad en proteínas de alto peso molecular. Lo anterior puede deberse a que algunas proteasas observadas en los zimogramas en gel co-polimerizado, podrían tener una afinidad diferente hacia el sustrato BApNA. Las bandas heredadas por *C. polystictus* (31 kDa) y *C. aquilus* (26 kDa) que se observaron, se encuentran en el rango normal de peso molecular reportado para proteasas tipo tripsina en mamíferos. En general se observó alta variabilidad en la presencia de proteínas y actividades proteolíticas entre individuos, aunque fue posible encontrar bandas diferenciales con actividad. Entre los individuos con mayor diversidad de proteasas se encontraron el híbrido hembra 5 y el parental macho *C. aquilus* 9. Lo anterior sugiere que un estudio profundo sobre algunas proteasas podría arrojar información respecto a la línea hereditaria en individuos híbridos, aunque los patrones de actividad proteolítica por sí mismos no fueron suficientes para explicar la línea hereditaria ni la letalidad de los venenos.

En cuanto a la cuantificación de la actividad proteolítica, no se observó un patrón específico de acuerdo a las actividades individuales de proteasas tipo tripsina o quimotripsina. Los híbridos 1, 3 y 7 presentaron los valores de actividad tipo tripsina más altos. Resulta interesante que la actividad del híbrido 1 fue la mayor para tripsina y quimotripsina, incluyendo a los parentales, lo cual implica que puede haber cambios en la expresión de esas enzimas en los híbridos resultantes. Sin embargo, ese individuo no resultó entre los más tóxicos. Al tratar a las enzimas con inhibidores de proteasas tipo tripsina, no se observó disminución de la actividad proteolítica, lo que implica la existencia de diferencias con las enzimas de mamíferos. Dada la variabilidad en cuanto a actividad enzimática, se determinó la relación Q/T donde los individuos; híbrido hembra 5, parental macho *C. Aquilus* 9, y juvenil macho *C. aquilus* 12 presentaron los mayores valores, de los cuales, los dos primeros fueron los más tóxicos. Las enzimas tipo tripsina usualmente tienen pesos moleculares bajos,

mientras que en este caso se detectaron moléculas con un peso de 200 kDa, por lo que resultaría interesante llevar a cabo su purificación y estudio, ya que mostraron características inusuales con respecto a su peso molecular y resistencia a los inhibidores probados, lo que permite pensar que puedan ser de interés en sus potenciales de aplicación biotecnológica.

Al calcular las DL_{50} con mezclas de veneno de híbridos hembra, híbridos macho, parental hembra *C. polystictus* o parental macho *C. aquilus* se observó que sólo las mezclas de híbridos hembra y parental macho *C. aquilus* fueron letales. Estas mezclas contenían, respectivamente, veneno del híbrido hembra 5 y del parental macho *C. aquilus* 9. Se sugiere profundizar en la utilidad de esta relación en estudios de DL_{50} de venenos. Sería conveniente ampliar el estudio a un mayor grupo de enzimas y determinar las relaciones entre actividades que pudieran dar mayor información sobre el papel que juegan las proteasas individuales y en conjunto sobre la letalidad del veneno de *Crotalus*.

En cuanto a las características fenéticas determinadas por el tipo de escamas, y las bandas de proteína, se observó mayor similitud entre los organismos híbridos y el parental hembra *C. polystictus*. Por lo cual además del tipo de escamas, el perfil proteico puede ser de utilidad al realizar estudios de diversidad fenética.

Se sugiere continuar con estos estudios a fin de conocer mejor las características del veneno de *Crotalus*, la composición y naturaleza de sus proteasas y otros componentes y la relación que tienen con la letalidad del veneno, a fin de aprovechar esta información en la elaboración de antídotos, así como para generar otras posibles aplicaciones biomédicas y biotecnológicas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguirre C; Castro-Guillén J.L; Contreras L, Mendiola-Olaya E, González de la Vara L, Blanco-Labra A. 2009. Partial characterization of a chymotrypsin-like protease in the larger grain borer (*Prostephanus truncatus*(Horn)) in relation to activity of *Hyptis suaveolens*(L.) trypsin inhibitor. J Stored Prod Res. 45(2):133–138.

Alape-Giron A; Sanz L; Escolano J; Flores-Diaz M; Madrigal M; Sasa M; Calvete JJ. 2008. Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: Geographic, individual, and ontogenetic variations. J. Proteome Res. 7:3556–71.

Álvarez-Romero, J., R. A. Medellín, H. Gómez de Silva y A. Oliveras de Ita. 2005. *Boa constrictor*. Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto U020. México. D.F.

Arnold ML. 1997. Natural hybridization and evolution. Oxford Series in Ecology and Evolution, Oxford University Press. 1° edición. New York, NY. PP 228

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72:248-254

Beiber AL. 1979. Metal and nonprotein constituents in snake venoms. In. Lee CY, ed snake venoms Berlin Springer. 295-306

Bolaños R. 1984. Serpientes, venenos y ofidismo en Centro América. Editorial Universidad de Costa Rica. San José, C.R. 136p

Campbell JA, Lamar W. 1989. The Venomous Reptiles of Latin America. Cornell University Press. 1° edición. Ithaca, New York. 424 pp.

Campbell JW. 2000. A las nuevas del pitviper arboreo Versant de America Central Norteña. Revista de Biología Tropical 48: (1001-1013) 1200 pp.

Campbell JA, Lamar W. 2004. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. Vol 1. Cornell University Press. 475 p

Castro Guillen JL. 2005. Estudio del efecto del inhibidor de tripsina de semillas del chan (HSTI), sobre el crecimiento y desarrollo del insecto *Prostephanus truncatus* (Horn). Tesis de Licenciatura Ingeniería Bioquímica. Instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez Chiapas.

Casu RE, Pearson RD, Sarmey JM. 1994. Excretory/secretory chymotrypsin from *Lucilia cuprina*: purification, enzymatic specificity and aminoacid sequence deduced from mRNA. *Insect Mol BioL*. 3:201-211 .

Cope E.D. 1865. Third contribution to the herpetology of tropical America. *Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia* 17:185-189.

Coyne JA, Orr HA. 2004. Chapter 1 in *Speciation*. Sinauer Associates. First Edition. Sunderland, Massachusetts. 545 p

De Lano, 2006. PyMOL(TM) Incentive Product - Copyright (C) Scientific LLC.

De Roodt AR, Estévez-Ramírez J, Paniagua-Solís JF, Litwin S, Carvajal-Saucedo A, Dolab JA, Robles-Ortiz E, Alagón A. 2005. Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México. *Gac Méd Méx* **141** (1):13-21.

Dueñas Laita, A. 1999. En: Dueñas laita A (Ed). Intoxicaciones agudas en medicina de urgencia y cuidados críticos. Editorial Masson. 1ª ed. Barcelona España. (293-296) **452 p**

Elpidina EN, Tsybina T, Dunaevsky YE, Belozersky MA, Zhuzhikov DP, Oppert, B. 2005. A chymotrypsin-like proteinase from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Biochimie*. 87, 771–779.

Erlanger B, Kokowsky N, Cohen W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys*. 95:271-278.

Gallacci Souza FAD, Spencer P, Rogero J, Nascimento N, Dal Pai-Silva M. 2002. Co gamma irradiation prevents *Bothrops jararacussu* venosneurotoxicity and myiototoxicity in isolated mouse neuromuscular junction. *Toxicon* 40:1101-1106.

Gay C, Leiva L, Ruiz R, Acosta O. 2004. Inhibición de la actividad proteolítica del veneno de *Bothrops alternatus* por quelantes de metales. Sección Ciencias Exactas. Trabajo 015. <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/com2004/index.html>.

Guercio RAP, Shevchenko A, Shevchenko A, Lopez-Lozano JL, Paba J, Sousa MV, Ricart CAO. 2006. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome Sci.* 4:11–25.

Gutierrez J.M., Arroyo O., Bolanos R. 1980. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en raton blanco. *Toxicon.* 18 (5-6) ,603-610.

Gutiérrez JM, León G, Valverde J, Rojas G, Lomonte B. 2000. Comparative study on the ability of IgG and Fab sheep antivenoms to neutralize local hemorrhage, edema and myonecrosis induced by *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. *Toxicon.* 38:233-244.

Hardy DL. 1994. *Bothrops asper* (Viperidae) snakebite and field researches in middle America . USA: Bothropica Press.40 p.

Hedstrom L. 2002. Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chem. Rev.*102:4501-4523

Huang, T. 1998. What Snake Venoms Taught us about Integrins. *Cell. Mol. Life. Sci.* 54:527-540.

Jany KD, Haug H, Ishay J. 1978. Trypsin-like endopeptidases from the midguts of the larvae from the hornet of *Vespa orientalis* and *Vespa crabro*. *Insect Biochem.* 8:221-230.

Jany KD, Bekelaer K, Pfeleiderer G, Ishay J. 1983. Aminoacid sequence of an insect chymotrypsin from the larvae or the hornet, *Vespa orientalis*. *Biochem. Biophys. Acta.* 1129: 135-138.

Klauber LM. 1952. Taxonomic Studies of the Rattlesnakes of Maindland México. *Bull. Zool. Soc. San Diego.* (26):1-143.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(259):680-685.

Lemos FJA, Terra WR. 1991. Properties and intracellular distribution of a cathepsin D-like proteinase active at the acid region of *Musca domestica* midgut. *Insect Biochem*. 24:457-465.

Levinsky H, Birk Y, Applebaum SW. 1977. Isolation and characterization of a new trypsin-like enzyme from *Tenebrio molitor* L. Larvae. *Int J Pept Protein Res*. 10:252-264.

Mackessy SP. 1991. Morphology and ultrastructure of the venom glands of the northern Pacific rattlesnake *Crotalus viridis oreganus*. *J. Morphol*. 208:109–28.

Mackessy SP. 1993. Fibrinogenolytic proteases from the venoms of juvenile and adult northern Pacific rattlesnakes (*Crotalus viridis oreganus*). *Comp. Biochem. Physiol*. 106B:181–89.

Mackessy SP, Williams K, Ashton KG. 2003. Ontogenetic variation in venom composition and diet of *Crotalus oreganus concolor*: A case of venom paedomorphosis? *Copeia*. (4): 769-782

Mackessy SP, Baxter LM. 2006. Bioweapons synthesis and storage: The venom gland of front-fanged snakes. *Zool. Anzweiger* 245:147–59.

Mackessy, S.P., 2008. Venom composition in rattlesnakes: trends and biological significance. In: Hayes, W.K., Beaman, K.R., Cardwell, M.D., Bush, S.P. (Eds.), *The Biology of Rattlesnakes*. Loma Linda University Press. Loma Linda, CA. 495-510 pp.

Mackessy SP. 2010. The Field of Reptile Toxinology in *Snakes, Lizards, and Their Venoms*. In Mackessy SP (Ed). *Handbook of venoms and toxins of reptiles*. CRC Press/Taylor & Francis Group. 1° edición. London , New York. pp. 1-21

Maruñak SL, Ruíz De Torrent RM, Teibler GP, Gay CC, Leiva L, Acosta De Pérez O. 2005. Acción del veneno de *Bothrops jararacussu* de Argentina sobre la coagulación sanguínea. *Departamento Ciencias Básicas. In. Vet*. 8(1):119-128

Medina Sanchez JA, Klein Jara E, Del LLano Gilio A. 2008. Cuantificación proteica del veneno de híbridos de *Crotalus aquilus* y *Crotaulus polystictus*. En memorias de la X

Reunión Nacional de Herpetología, Mineral de la Reforma, Hidalgo.

Meik JM, Fontenot BE, Franklin CJ, King C. 2008. Apparent natural hybridization between the rattlesnakes *Crotalus atrox* and *C. horridus*. *The Southwestern Naturalist* 53(2):196–200.

Mirtschin PJ, Shine R, Nias TJ, Dunstan NL, Hough BJ, Mirtschin M. 2002. Influences on venom yield in Australian tigersnakes (*Notechis scutatus*) and brownsnakes (*Pseudonaja textilis*: Elapidae, Serpentes). *Toxicon*.40:1581–92.

NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. <http://148.243.71.63/default.asp?doc=743> Última consulta septiembre 2010

Overall CM, Kleifeld O. 2008. Protease proteomics: Revealing protease in vivo functions using systems biology approaches. *Molecular Aspects of Medicine*, 29 (5), pp. 339-358.

Padilla-García U. 2010. Comunicación personal. Herpetario Universidad Autónoma de Querétaro. México.

Pantigoso C, Escobar E, Yarlequé A. 2002. Acción de la miotoxina del veneno de *Bothrops brazili* Hoge, 1953(Ophidia: Viperidae Rev. Peru. Biol.9(2):74 –83.

Pérez-Higareda G, López-Luna MA, Smith HM. 2007. Serpientes de la región de los Tuxtlas, Veracruz, México. Guía de identificación ilustrada. Universidad Nacional Autónoma de México. 189 p

Perkins JR, Parker CE, Tomer KB. 1993. The characterization of snake venoms using capillary electrophoresis in conjunction with electrospray mass spectrometry: Black mambas. *Electrophoresis*. 14:458–68.

Perkins JR, Tomer KB. 1995. Characterization of the lower-molecular-mass fraction of venoms from *Dendroaspis jamesoni kaimosae* and *Micrurus fulvius* using capillary-electrophoresis electrospray mass spectrometry. *Eur. J. Biochem*. 233:815–27.

Pirela de las Salas RC, Lopez-Jonsthon JC, Hernandez Rangel JL. 2006. Caracterización toxinológica del veneno total de la serpiente de cascabel *Crotalus durissus cumanensis* (Viperidae), presente en la localidad de Porshoure, Guajira Venezolana. *Revista Científica, FCV-LUZ* / 16(3):232-238.

Ramírez Bautista A, Arizmendi MC. 2004a. *Crotalus aquilus*. Sistemática e historia natural de algunos anfibios y reptiles de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO), Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto W013. México. D.F.

Ramírez Bautista A, Arizmendi MC.. 2004b. *Crotalus polystictus*. Sistemática e historia natural de algunos anfibios y reptiles de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO), Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto W013. México. D.F.

Rice K, Peralta R, Bast D, De Azavedo J, McGavin MJ. 2001. Description of *staphylococcus* serine protease (ssp) operon in *Staphylococcus aureus* and nonpolar inactivation of ssp-encoded serine protease. *Infect Immun*. 69(1):159-169.

Rholf, F.J. 1998. NTSYSpc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Vers. 2.02. Exeter software, New York.

Sakal E, Applebaum SW, Birk Y. 1989. Purification and characterization of trypsins from digestive tract of *Locusta migratoria*. *Int J Pept Protein Res*. 34:498-505.

Sanz, L, Gibbs HL, Mackessy SP, Calvete JJ. 2006. Venom proteomes of closely related *Sistrurus* rattlesnakes with divergent diets. *J. Proteome Res*. 5:2098–112.

Sánchez EE, Galán JA, Russell WK, Soto JG, Russell DH, Pérez JC. 2005. Isolation and characterization of two disintegrins inhibiting ADP-induced human platelet aggregation from the venom of *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mohave Rattlesnake). *Toxicol Appl Pharmacol*. 212:59 –68

Schrocchi GJ, Dominguez E. 1992. Introducción a las escuelas de sistemática y biogeografía. Opera Lilloana .Fundación Miguel Lillo. 1° edición. Tucumán. Argentina 40.120 p.

Tu A. 1976. Hemolysis. In Venoms: Chemistry and Molecular Biology. Capítulo 20. A Wiley Interscience publication John Wiley & Sons. 321-328 pp.

Vonk FJ, Admiraal JF, Jackson K, Reshef R, de Bakker MA, Vanderschoot K, van den Berge I, van Atten M, Burgerhout E, Beck A, Mirtschin PJ, Kochva E, Witte F, Fry BG, Woods AE, Richardson MK. 2008. Evolutionary origin and development of snake fangs. Nature 454:630–33.

IX. ANEXOS

9.1 ANEXO 1. Determinación de concentración de proteína por el método de Bradford (1976)

Método de Bradford tradicional.

1. Reactivo de Bradford: se pesan 100 mg de Commassie Blue G-250 en un vaso de precipitados de 200 mL. Se agregan 50 mL de etanol al 95% y se mantiene en agitación continua hasta su completa dilución por 1 hora. Se añaden de forma gradual 100 mL de ácido fosfórico al 85%. Se afora a 1 L con agua tridestilada, se filtra a través de membrana de 0.45 micras y se almacena a 4°C en un recipiente ámbar por lo menos una noche antes de su uso.

2. Solución de albumina (ASB) 1mg/mL

3. Procedimiento. Mediante una micropipeta de 200 µL se preparan las diluciones de albumina por duplicado de acuerdo al Cuadro 7:

Cuadro 7. Diluciones para la determinación de concentración de proteína por el método de Bradford.

Tubo	µl de PBS	µl de ASB (mg/mL)
0	50	0
1	40	10
2	30	20
3	20	30
4	10	40
5	0	50

Una vez agregado el PBS y la ASB se agregan 2.5 mL de reactivo de Bradford, se agitan en vortex y se dejan reposar por 15 min. Leer en el espectrofotómetro a 595 nm.

Método de Bradford (Placa de Elisa 96 pozos)

1. Se prepararon 5 diluciones de un estándar de proteína el cual será representativo para la solución de proteína que será probado. El rango linear del ensayo para BSA es de 1.2 a 10.0 $\mu\text{g/mL}$, mientras que con IgG el rango linear es de 1.2 a 25 $\mu\text{g/mL}$.

2. Preparación de estándares:

- a. Hacer una solución de BSA de 1 mg/mL , para dejar estándares a las concentraciones de

- 50 $\mu\text{g/mL}$

- 300 $\mu\text{g/mL}$

- 100 $\mu\text{g/mL}$

- 400 $\mu\text{g/mL}$

- 200 $\mu\text{g/mL}$

- 500 $\mu\text{g/mL}$

- b. Preparación del Reactivo de Bradford [*Proveniente de Bio-Rad*]:

Se diluyen: 1 parte (en volumen) del reactivo de Bradford en 4 partes de agua (1:4).

Se prepara tomando en cuenta el volumen total de las muestras a medir, con un rango de 500 a 800 μL de exceso, debido a que se pega a las paredes del recipiente del cual se toma.

3. Las soluciones de proteína son analizadas normalmente con duplicados o triplicados.
4. Adicione 10 μL de la muestra (o de agua pura, en caso del blanco) en el pozo.
5. Adicione 200 μL del reactivo concentrado a cada uno de los tubos y agite con el vortex.
6. Incube a temperatura ambiente por lo menos 5 min. La absorbencia se incrementará conforme pase el tiempo; las muestras no deben incubarse por más de 1 hora.
7. Realice las lecturas a 595 nm.

9.2 ANEXO 2. Determinación de actividades proteolíticas y actividad inhibitoria de serín proteasas.

Actividad proteolítica tipo serín proteasas (Erlanger et al., 1961)

a) Actividad tipo tripsina: Se cargaron 20 µL de muestra de veneno de *Crotalus* en una dilución 1:1000 en agua desionizada, 20 µL de sustrato BApNA (BApNA 0.01 M en Dimetilsulfoxido (DMSO) [43.5 mg/10 mL]) y 200 µL de buffer tris pH 8 (Tris-HCl 0.1 M pH 8 [6.005 g /500 mL agua]) en una placa de 96 pozos la cual fue colocada en un espectrofotómetro de placas BioRad y se leyó a una longitud de onda de 405 nm después de 30 min de incubación.

b) Actividad tipo quimotripsina: Se utilizaron 20 µL de muestra de veneno de *Crotalus* en una dilución 1:100, 20 µL de sustrato SAAFpNA 0.01 M en Dimetilsulfoxido (DMSO) [43.5 mg/10 mL] y 150 µL de buffer Tris pH 8 en una placa de 96 pozos la cual fue colocada en un espectrofotómetro de placas BioRad y se leyó a 405 nm. Debido a la baja actividad de quimotripsina, las muestras se incubaron durante 2 h a 37°C.

La actividad de las proteasas se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$UA/mL = \text{Abs Enz} / (0.01 * V_e)$$

Dónde: V_e = volumen (mL) del extracto enzimático. Una unidad de actividad proteolítica se define como un incremento de 0.01 de absorbencia a 405 nm

Determinación de actividad inhibitoria de serín proteasas (tipo tripsina) Erlanger (1961).

Se preparó la muestra con 140 µL de buffer Tris pH 8, 20 µL de veneno (de una dilución 1:1000) y 70 µL de inhibidor. Se dejó incubar 15 min, se agregó el sustrato BApNA, específico para tripsina y se leyó la absorbencia a 405 nm. Se utilizó una muestra blanco con 200 µL de buffer Tris pH 8 y 20 µL de veneno (de una dilución 1:1000) en las mismas condiciones. Se utilizaron tres inhibidores específicos: dos extraídos de plantas Hyptis suaveolens Tripsin inhibitor) HSTI , TBPI (Inhibidor de Proteasas de frijol tépari) y EDTA

(ácido etilendiaminotetraacético). La actividad Inhibitoria es definida como el número de unidades de enzima inhibida de acuerdo a los siguientes cálculos:

$$UI/mL = (Abs\ Enz - Abs\ Inh) / (0.01 * V_i)$$

Donde V_i = volumen de inhibidor

ANEXO 3. Electroforesis de poliacrilamida método de Laemmli (1970)

1. Limpiar los cristales con jabón y enjuagarlos con abundante agua destilada. Después limpiarlos con metanol para deslipidizarlos.
2. Colocar entre ambos cristales el separador del grosor indicado. Fijar los cristales procurando que queden a la misma altura con el fin de que el gel no se salga. Para ello se utiliza el soporte de las placas donde posteriormente se polimerizará el gel.
3. En el soporte para las placas se colocan las gomas inferiores. Se prepara el gel separador. Se añade dicho gel entre las placas hasta una altura media del cristal. Después de añadir el gel se pone etanol sobre la superficie.
4. Completa la polimerización del gel separador se elimina el agua con ayuda de papel secante. Se adiciona el gel concentrador, hasta llenar totalmente el espacio entre los dos cristales. Rápidamente se incluye el peine con cuidado de que no se formen burbujas. Se polimeriza en unos 10 min.
5. Sacar el peine con cuidado de no romper el gel. Añadir el tampón de electroforesis en las calles del gel concentrador.
6. Montar el gel en la cámara de electroforesis: Acoplar el gel al electrodo y cargar las muestra con una micropipeta, 20 μ l por cada pozo. Poner el tampón de electroforesis en la cámara interna del electrodo hasta cubrir el gel por completo y el resto depositarlo en la cubeta de electroforesis. Conectar los electrodos rojo y negro con su propio color a la

fuente de alimentación. El gel se corre a 80 V, hasta que el frente de azul de bromofenol llega al final del gel.

7. Se desmonta el gel y se separa de las placas.

Los geles una vez corridos se fijaran y colorearan con Azul brillante de Coomasie (BioRad). Se correrá simultáneamente marcadores de peso molecular (SIGMA).

Los geles de corrida se preparan de acuerdo al siguiente cuadro al 10%:

Cuadro 8. Soluciones para preparar geles de poliacrilamida

Concentración final del gel (20 mL; 2 ea. 1.5mm)						
		5%	7.50%	10%	12.50%	15%
Solución del monómero		3.3 mL	5 mL	6.7 mL	8.3 mL	10 mL
4x Buffer para correr gel		5mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
SDS al 10%		0.2 mL	0.2 mL	0.2 mL	0.2 mL	0.2 mL
ddH ₂ O		11.4 mL	9.7 mL	8 mL	6.4 mL	4.7 mL
Persulfato de amonio		100 ul	100 ul	100 ul	100 ul	100 ul
TEMED		6.7 ul	6.7 ul	6.7 ul	6.7 ul	6.7 ul
Concentración final del gel (20 mL; 2 ea. 1.5mm)						
		5%	7.50%	10%	12.50%	15%
Solución del monómero		1.67 mL	2.5 mL	3.3 mL	4.2 mL	5 mL
4x Buffer para correr gel		2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
SDS al 10%		0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
ddH ₂ O		5.7 mL	4.9 mL	4 mL	3.2 mL	2.4 mL
Persulfato de amonio		50 ul	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul
TEMED		3.3 ul	3.3 ul	3.3 ul	3.3 ul	3.3 ul

Método de preparación de soluciones stock

Solución del monómero (30.8% T 2.7% C_{bis})

Se preparó con 60 g de acrilamida (FW 71.08), 1.6 de bisacrilamida (FW 154.2) y se aforó con 200 mL con ddH₂O y se guardó a 4°C en oscuridad.

4X Buffer para correr gel (1.5 M Tris-Cl, PH 8.8)

Se preparó con 36.3 Tris (FW 121.1) y se agregó 150 mL ddH₂O. Se ajustó el pH hasta 8.8 con HCl y se aforó a 50 mL con ddH₂O. Se guardó a 4°C en oscuridad

SDS al 10%

Se preparó con 10 g de SDS y se aforó a 100 mL con ddH₂O. Se guardó a temperatura ambiente

Persulfato de Amonio al 10% (iniciador)

Se preparó con 0.1 g de persulfato de amonio y se aforó a 1.0 mL con ddH₂O. Se preparó al momento de necesitarla para evitar degradación.

Buffer de tanque (0.025 M de Tris, 0.192 M de glicina, 0.1% de SDS, pH 8.3)

Se preparó con 30.28 g de Tris (FW 121.1); 144.13 g de glicina y 10 g SDS. Se aforó a 10 L con ddH₂O. Se guardó a temperatura ambiente

Buffer renaturalizante 0.1 M Tris-HCL pH 8

Se preparó un volumen final de 200 mL con 2.41 g de Tris HCL PM 121 0.1 M (para 200 mL); 0.007g de Cistina PM 240.3 (para 100 mL); 0.0363g Cisteína PM 121.2 (para 100 mL) y 0.0744g de EDTA PM 372.2 (para 200 mL)

Los g de cistina-cisteína se hicieron al doble para que las relaciones fuesen iguales a los g pesados para el buffer tris y el EDTA. 1 mM de EDTA, 0.3 Mm de cistina y 3mM de cisteína disueltos en buffer tris.

9.3 ANEXO 4. Zimogramas

Zimogramas en matriz de celulosa

Terminada la electroforesis se lava el gel con agua desionizada para homogenizar el pH.

Después se lava con una solución renaturalizante de cisteína-cistina por 30 min lo que restablece los puentes disulfuro.

Se desecha el sobrenadante y se agrega buffer tritón x100 más tris pH 8 durante 5 minutos para eliminar el SDS 10%.

Se enjuaga con agua desionizada por 15 segundos.

Se agrega buffer tris por 10 minutos para equilibrar el pH, se tira el sobrenadante y se coloca papel filtro para eliminar el exceso de agua.

Una vez quitado el exceso de agua se coloca una matriz de celulosa saturada con sustrato BApNA para proteólisis por enzimas tipo tripsina

Se incuba por 2 horas a 37°C o hasta que se observen bandas amarillas resultado de la proteólisis.

Una vez observados indicios de proteólisis se hacen lavados con agua desionizada. Se lava con Na_2NO_3 0.1%, sulfato de amonio y con n-1-naftiletildiamina, durante 5 minutos cada una.

Para el análisis de quimotripsina se siguen los mismos pasos anteriores, utilizando el sustrato SAAFpNA, como sustrato específico para estas serin proteasas.

Zimogramas con geles de acrilamida co-polimerizado con el sustrato

Electroforesis se efectúa de acuerdo al método de Laemmli (Laemmli 1970)

Terminada la electroforesis se lava el gel para activar las proteínas, semi-desnaturalizadas por el SDS, por medio de un detergente no polar, el Tritón X-100. Mediante dos lavados de 30 minutos con la solución de activación.

Buffer de activación

Se preparó con 6.057 g de Tris HCl 0.05 M, pH 7.4 (para 1000 mL); 25 mL de Tritón X-100, 2.5% (v/v) (para 1000 mL)

El gel se deja incubar por 24 horas a 37°C en el buffer de reacción:

Buffer de reacción

Se preparó con 6.057 g de Tris HCl 0.05 M, pH 7.4 (1000 mL); NaCl 2 0.005 M (con 0.5549 g de CaCl₂ – 1000 mL); 11.688g de NaCl 0.2 M (para 1000 mL) y 0.02 mL de Triton X-100, 0.02 % (v/v) (para 1000 mL)

Una vez activadas las proteínas, se lava los geles dos veces con buffer tris pH 7.4 por 10 minutos (Fernández -Resa, *et al.*, 1995)

Al terminar la incubación el gel se tiñe con azul de Coomassie R-250 0.05%(p/v), disuelto en metanol-ácido acético (40:10)(Wagstaff, *et al.*, 2002). De 30 min a 3 horas.

Los geles se destiñen con una solución metanol: acido actico (40:10), hasta que las bandas son apreciadas de manera clara.

9.4 ANEXO 5. NTSYSpc

Excel:

Se copia la matriz de base de datos a un archivo nuevo, y se pega en A2. En las columnas los OTUS (organismos) y en las filas los caracteres.

En la primer fila (A1) se pone el número 1, en B1 el numero de caracteres, en C1 el numero de OTUS; si existen dato faltantes se coloca en D1 el código 99.

NTSYSpc

1. Se abre Edit y se importa el archivo-DDE. Se guarda como archivo .NTS
2. General-output para ver la matriz.
3. En la opción Similarity-calcular el coeficiente taxonómico de similitud (DIST) utilizando la matriz anterior. se guarda la matriz resultante como archivo .NTS
4. Se calcula la matriz del árbol en base al archivo anterior, y se obtiene el fenograma mediante clustering -SHAN-se utiliza UPGMA, y se guarda el archivo como upg.nts.
5. Para ver el fenograma, en el paso 4 se selecciona el icono del fenograma: Plot Tree, se utiliza el archivo anterior de UPGMA.
6. Coeficiente de correlación (r) en clustering-cophenetic values (coph)-se utiliza la matriz del árbol y se guarda el archivo nuevo. Graphics-Matriz de comparación-(x) matriz de similitud original y en (y) la matriz cophenetic. Se obtiene el valor de r.

Datos pueden o no ser estandarizados, dependiendo del grado de diferencia entre esos.