



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Doctorado en Ciencias Biológicas

**Caracterización Bioquímica de Serín Proteasas, Fosfolipasas A2,  
Hialuronidasas y Metaloproteasas del Veneno de *Crotalus aquilus*, *Crotalus  
polystictus* y *Crotalus molossus nigrescens***

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas

**Presenta:**

Octavio Roldán Padrón

**Dirigido por:**

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

**Co-dirigido por**

Dr. Alejandro Blanco Labra

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca  
Presidente

Dr. Alejandro Blanco Labra  
Secretario

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez  
Vocal

Dr. Alejandro García Arredondo  
Suplente

Dr. José Luis Castro Guillen  
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Julio del 2019

México

## I. RESUMEN

El envenenamiento por mordedura de serpiente es un problema médico grave en diferentes áreas del mundo. En América Latina, la mayor prevalencia se debe a las serpientes de la familia *Viperidae*, donde se incluyen las serpientes de cascabel (*Crotalus*). Estos venenos producen veneno hemotóxico que causa sangrado, degradación de los tejidos y necrosis. Cada veneno presenta varias actividades enzimáticas, lo que hace que sus efectos clínicos sean difíciles de estudiar, además, la comparación entre las moléculas de veneno es difícil cuando se usan diferentes técnicas y, por lo tanto, su identificación/caracterización por la misma metodología es necesaria. En este trabajo, se realizó la caracterización bioquímica de veneno de serpiente en cuanto a serín proteasas (SVSP), fosfolipasas A<sub>2</sub> (SVPLA<sub>2</sub>), metaloproteasas (SVMP) y hialuronidasas (SVHA) de *Crotalus aquilus* (Ca), *Crotalus polystictus* (Cp) y *Crotalus molossus nigrescens* (Cmn). Se observaron diferencias en el patrón de proteínas, el contenido de enzimas y las actividades enzimáticas. Todos los venenos mostraron una alta actividad de SVPLA<sub>2</sub>, SVSP de alto peso molecular y una amplia variedad de formas de SVMP y SVHA. Ca y Cp mostraron las actividades enzimáticas más altas de SVMP y SVSP tipo tripsina y quimotripsina, mientras que Cmn mostró la mayor actividad de la SVHA y SVPLA<sub>2</sub>, similar a Ca. Todos los venenos mostraron péptidos con una masa molecular similar a la de las miotoxinas tipo crotamina. No se cuenta con información previa sobre la caracterización de veneno de *C. aquilus* y no existen análisis previos que incluyan estas cuatro familias de proteínas en estos venenos de *Crotalus*.

**Palabras clave:** *Crotalus*, fosfolipasas, hialuronidasas, metaloproteasas, proteasas, serín proteasas, veneno de serpiente.

## II. SUMMARY

Snakebite envenoming is a serious medical problem in different areas of the world. In Latin America, the major prevalence is due to snakes of the family *Viperidae*, where rattlesnakes (*Crotalus*) are included. They produce hemotoxic venom which causes bleeding, tissue degradation and necrosis. Each venom has several enzymatic activities, producing different effects in the envenoming, which makes difficult to determine the role for each one of these enzymes. On top of this, doing its clinical effects difficult to study, also, comparison between different venoms molecules is difficult when different techniques to measure their activities, therefore, their identification/characterization by the same methodology is necessary. In this work, a general biochemical characterization of snake venom serine proteases (SVSP), snake venom phospholipases A<sub>2</sub> (SVPLA<sub>2</sub>), snake venom metalloproteases (SVMP) and snake venom hyaluronidases (SVHA) of *Crotalus aquilus* (Ca), *Crotalus polystictus* (Cp) and *Crotalus molossus nigrescens* (Cmn) was done. Differences in protein pattern, enzyme content and enzymatic activities were observed. All the venoms showed high SVPLA<sub>2</sub> activity, high molecular weight SVSP, and a wide variety of SVMP and SVHA forms. Ca and Cp showed the highest enzymatic activities of SVMP and SVSP trypsin-like and chymotrypsin-like, whereas Cmn showed the highest SVHA and similar SVPLA<sub>2</sub> activity with Ca. All the venoms showed peptides with similar molecular mass to crotamine-like myotoxins. To our knowledge, no previous biochemical characterization of *C. aquilus* has been reported and there are not previous analyses that include these four protein families in these *Crotalus* venoms.

**Key words:** *Crotalus*, hyaluronidases, metalloproteases, phospholipases, serine proteases, snake venom.

### **III. AGRADECIMIENTOS**

A mi familia por su apoyo incondicional.

Al Doctor Alejandro Blanco Labra y a la Dra. Teresa García Gasca por su amistad, confianza, apoyo y por mostrarme el camino de la investigación.

Al Dr. Alejandro García Arredondo, José Luis Castro Guillen y Carlos Saldaña Gutiérrez, por sus críticas, consejos y opiniones.

A mis amigos, por sus consejos y los días de buenas charlas.

A CONACYT por la beca otorgada.



## IV. ÍNDICE

I. RESUMEN.....	i
II. SUMMARY .....	ii
III. AGRADECIMIENTOS.....	iii
IV. ÍNDICE.....	iv
VI. ÍNDICE DE FIGURAS .....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. JUSTIFICACIÓN.....	8
3. ANTECEDENTES.....	9
3.1. Accidente ofídico .....	9
3.2. Venenos de serpiente .....	9
3.2.1. Serín proteasas .....	11
3.2.2. Metaloproteasas .....	14
3.2.3. Fosfolipasas A <sub>2</sub> .....	15
3.2.4. Hialuronidasas.....	16
3.3. Efectos fisiológicos y variabilidad en los venenos de serpiente .....	17
3.4. Modelo de estudio.....	18
4. HIPÓTESIS .....	20
5. OBJETIVOS.....	20
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	20
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
6.1 Obtención del veneno de serpiente .....	21
6.2 Determinación de la concentración proteica y perfil proteolítico del veneno de serpiente mediante electroforesis .....	21
6.3 Zimografías.....	22
6.3.1 Zimografía de serín proteasas sobre sustratos cromogénicos.....	22
6.3.2 Zimografía de metaloproteasas.....	22
6.3.3 Zimografía de SVPLA <sub>2</sub> .....	23

6.3.4	Zimografía de actividad enzimática de hialuronidasas .....	23
6.4	Ensayos de actividad enzimática .....	23
6.4.1	Actividad de serín proteasas .....	23
6.4.2	Actividad proteolítica.....	24
6.4.3	Actividad de fosfolipasa A <sub>2</sub> .....	24
6.4.4	Actividad de hialuronidasa .....	24
6.5	RP-HPLC .....	25
6.6	MALDI-TOF-MS .....	25
6.7	Purificación parcial del veneno de serpiente .....	25
6.8	Análisis estadístico.....	26
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
7.1	Patrón de bandeo de proteínas .....	27
7.2	Zimografía y actividad enzimática de serín proteasas del veneno de serpiente (SVSP) 27	
7.3	Zimografía de actividad enzimática sobre gelatina y actividad sobre caseína de SVMP 31	
7.4	Zimografía y actividad enzimática de fosfolipasas A <sub>2</sub> .....	35
7.5	Zimografía y actividad enzimática de hialuronidasas.....	36
7.6	RP-HPLC .....	38
7.7	MALDI-TOF-MS .....	39
7.8	Purificación parcial del veneno de serpiente .....	42
8.	CONCLUSIONES.....	44
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45

## VI. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Glándula de veneno de vipéridos.....	10
Figura 2. Alineamiento de serín proteasas del veneno de serpiente..	13
Figura 3. Alineamiento múltiple de la metaloproteasas.....	15
Figura 4. Serpientes de genero Crotalus. Organismos utilizados para la extracción de veneno. ....	19
Figura 5. Patrón de bandeo de proteína del veneno de <i>C. aquilus</i> (Ca), <i>Crotalus polystictus</i> (Cp) and <i>C. molossus nigrescens</i> (Cmn).....	28
Figura 6. Actividad proteolítica de serín proteasas del veneno de <i>C. aquilus</i> (Ca), <i>C. polystictus</i> (Cp) y <i>C. molossus nigrescens</i> (Cmn). ....	29
Figura 7. Actividad proteolítica de serín peptidasas del veneno de <i>C. aquilus</i> (Ca), <i>C. polystictus</i> (Cp) y <i>C. molossus nigrescens</i> (Cmn). ....	31
Figura 8. Zimografía de gelatina en geles de poliacrilamida al 10% y actividad proteolítica utilizando sustrato de caseína. ....	32
Figura 9. Zimografía de SVMP en SDS-PAGE al 10 % de acrilamida co-polimerizado con gelatina. ....	33
Figura 10. Zimografía y actividad enzimática de SVPLA <sub>2</sub> .....	36
Figura 11. Actividad de SVHA.....	37
Figura 12. Fraccionamiento de los venenos por RP-HPLC..	39
Figura 13. Análisis por MALDI-TOF-MS de los venenos de serpientes..	41
Figura 14. Veneno de <i>C. aquilus</i> fraccionado por filtración en gel G75. ....	43
Figura 15. Veneno de <i>C. molossus nigrescens</i> fraccionado por filtración en gel G75..	43

## 1. INTRODUCCIÓN

Los venenos de serpiente son mezclas biológicas complejas de proteínas, péptidos y componentes orgánicos responsables de su efecto hemotóxico y neurotóxico (Bieber, 1979). En Centro y Sudamérica, Estados Unidos, Australia, India y África, cerca de 2.5 millones de personas al año, sufren accidentes por mordedura de serpientes y, de estos casos, más de 100,000 resultan fatales (Chippaux, 1998; Fry, 2018; Kasturiratne y col., 2008).

Las serpientes de la familia Viperidae son unas de las responsables del mayor número de mordeduras en América Latina (Peterson, 2006). Dentro de esta familia se encuentran distintas especies pertenecientes al género *Crotalus*, las cuales se caracterizan por tener mayoritariamente un veneno hemotóxico (Chippaux, 1998; Trape y col., 2001; WHO, 1981; Winkel y col., 1998). Dentro de la composición enzimática en estos tipos de veneno se encuentran enzimas tipo serín proteasas, metaloproteasas, fosfolipasas y hialuronidasas (Braud y col., 2000; Xiong y Huang, 2018), proteínas tipo lectina tipo C y otros componentes menores (Calvete, 2011).

Los efectos fisiológicos en el envenenamiento incluyen manifestaciones tanto a nivel local como sistémico, hemorragias, necrosis, edema, hipovolemia, nefrotoxicidad, coagulopatía y shock cardiovascular (Sartim y col., 2017). Sin embargo, el mecanismo de acción de los componentes del veneno, es poco conocido, además, la composición y los síntomas provocados por los venenos puede ser variable. Dicha variación se ha reportado en organismos de diferentes grupos taxonómicos, organismos de distintas edades e inclusive entre organismos de una misma especie ubicados en diferentes zonas geográficas.

Es necesario el estudio continuo de las moléculas que componen los venenos de serpiente, con el fin de comprender mejor los síntomas ocasionados por este tipo de accidentes, así como mejorar las terapias clínicas existentes. Las enzimas del veneno de serpiente pueden tener distintos papeles en los efectos generales del envenenamiento, por lo que, la caracterización y purificación individual de los componentes del veneno, es necesaria en la

toxicología para poder conocer y analizar la serie de eventos que ocurren durante el envenenamiento.

Por lo anterior, en este trabajo se analizaron algunas de las principales actividades enzimáticas asociadas al daño hemotóxico (serán proteasas, metaloproteasas, hialuronidasas y fosfolipasas A<sub>2</sub>) del veneno de *Crotalus polystictus*, *Crotalus molossus* y *Crotalus aquilus*, llevando a cabo una purificación parcial de éstas mediante filtración en gel y un análisis por espectrometría de masas.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente no se ha informado de una caracterización bioquímica previa que incluya las cuatro principales familias de enzimas de serpientes del género *Crotalus*, particularmente *C. aquilus* y *C. polystictus*. Se debe prestar atención a la alta variabilidad debida a las diferencias en la forma en que se obtienen las muestras, su conservación, tipo y concentración de sustratos utilizados para determinar sus actividades, así como la metodología utilizada, ya que estas pueden influir en los resultados (Moss, 1970; Roy y col., 2018).

En este trabajo, mostramos datos nuevos sobre las actividades enzimáticas para SVSP, SVPLA<sub>2</sub>, SVMP y SVHA de los venenos de las tres especies de serpiente y un análisis de HPLC-MS y MALDI-TOF-MS. La comparación entre los venenos de *Crotalus*, utilizando la misma metodología, proporcionará conocimiento sobre la composición. Lo que podría ayudar en el desarrollo de tratamientos específicos para la mordedura de serpiente (Mackessy, 2010a).

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. Accidente ofídico

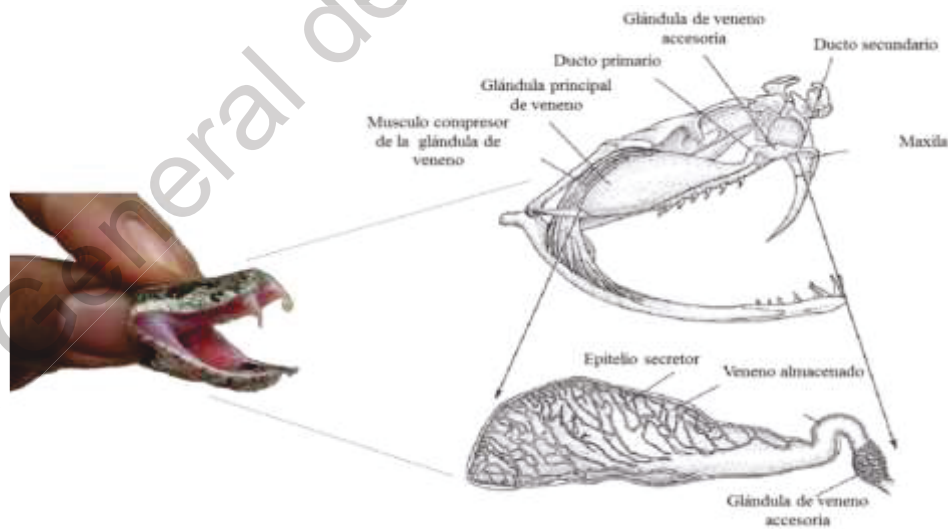
El accidente ofídico o mordedura de serpiente, es un problema grave a nivel mundial, considerado por la Organización Mundial de la Salud como uno de los principales padecimientos desatendidos en zonas tropicales (Gutiérrez y col., 2006). Las estadísticas sobre este tipo de accidentes son variables, a nivel mundial se estima que anualmente 2.5 millones de personas sufren accidentes de este tipo, de las cuales 125 mil resultan en muerte y alrededor de 100 mil resultan con pérdida de miembros o secuelas permanentes (Chippaux, 1998; Fry, 2018; Kasturiratne y col., 2008).

América latina ocupa la tercera posición en este tipo de accidentes, después de África y Asia (Chippaux, 1998). En México este tipo de accidentes no representa uno de los problemas sanitarios más graves, sin embargo, es un problema común en algunas zonas, en donde los géneros *Bothrops* y *Crotalus*, pertenecientes a la familia *Viperidae*, son los causantes principales del accidente ofídico (Zúñiga y Caro, 2013).

#### 3.2. Venenos de serpiente

El veneno de serpientes es considerado como una secreción que puede ser muy compleja, cuya función incluye el inicio de la digestión extracelular de sus presas, así como, funciones de defensa (Campbell y Lamar, 2004a). 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 (Bieber, 1979). Los venenos de serpiente pueden ser clasificados de manera muy general como neurotóxicos, hemotóxicos, necrotóxico, cardiotoxico y nefrotóxico. Los venenos de los miembros de la familia *Elapidae* son principalmente neurotóxicos, mientras que los de la familia *Viperidae* y *Crotalidae* son hemotóxicos y necrotóxicos (Adukauskiénė y col., 2011). Los principales componentes de los venenos hemotóxicos en serpientes del género *Crotalus* son serín proteasas, metaloproteasas, fosfolipasas y hialuronidasas (Braud y col., 2000; Xiong y Huang, 2018). El veneno de

serpientes del genero *Viperidae* o serpientes de foseta, es producido en una glándula especializada que incluye una glándula de secreción y una dentición especializada que permite la inyección profunda del veneno sobre la presa (Figura 1). Los colmillos de los vipéridos están articulados de modo que pueden ser retraídos cuando no están en uso, este tipo de dentición se conoce como solenoglifa (Vidal, 2002; Vonk y col., 2008). 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 este aparato es una glándula larga de veneno con un largo lumen basal, donde ocurre la activación mayoritaria de los zimógenos (enzimas inactivas) a enzimas activas, entre ellas las metaloproteasas (Portes y col., 2014), lo que permite el almacenamiento del veneno para su secreción inmediata, a menudo por un conducto primario que se conecta a 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, 2010b).



**Figura 1. Glándula de veneno de vipéridos.** El veneno se almacena en el lumen, los músculos compresores presionan la glándula de veneno para su inoculación a través de los colmillos (Mackessy, 2010b).

### 3.2.1. Serín proteasas

Distintas serín proteasas han sido aisladas de venenos de serpientes del grupo de los vipéridos (Matsui y col., 2000), éstas son denominadas como serín proteasas de venenos de serpiente (SVSP, por sus siglas en inglés), se caracterizan por ser multifuncionales y presentar una triada catalítica compuesta por los aminoácidos histidina, ácido aspártico y serina (HDS) (Barrett y Rawlings, 1995). Las serín proteasas pertenecen a la familia S1 de la quimotripsina del clan SA, la cual es la familia más grande de peptidasas (Rawlings y Salvesen, 2012). Las SVSP son estructuralmente similares a sus homologas presentes en mamíferos, manteniendo conservada la triada catalítica (Zelanis y col., 2015). Estas enzimas se encuentran entre las enzimas mejor caracterizadas de los venenos y afectan diferentes componentes de la cascada de coagulación, además de los sistemas fibrinolítico y de calicreína-cinina, causando un desbalance del sistema hemostático de la presa (Markland, 1997; Pirkle, 1998).

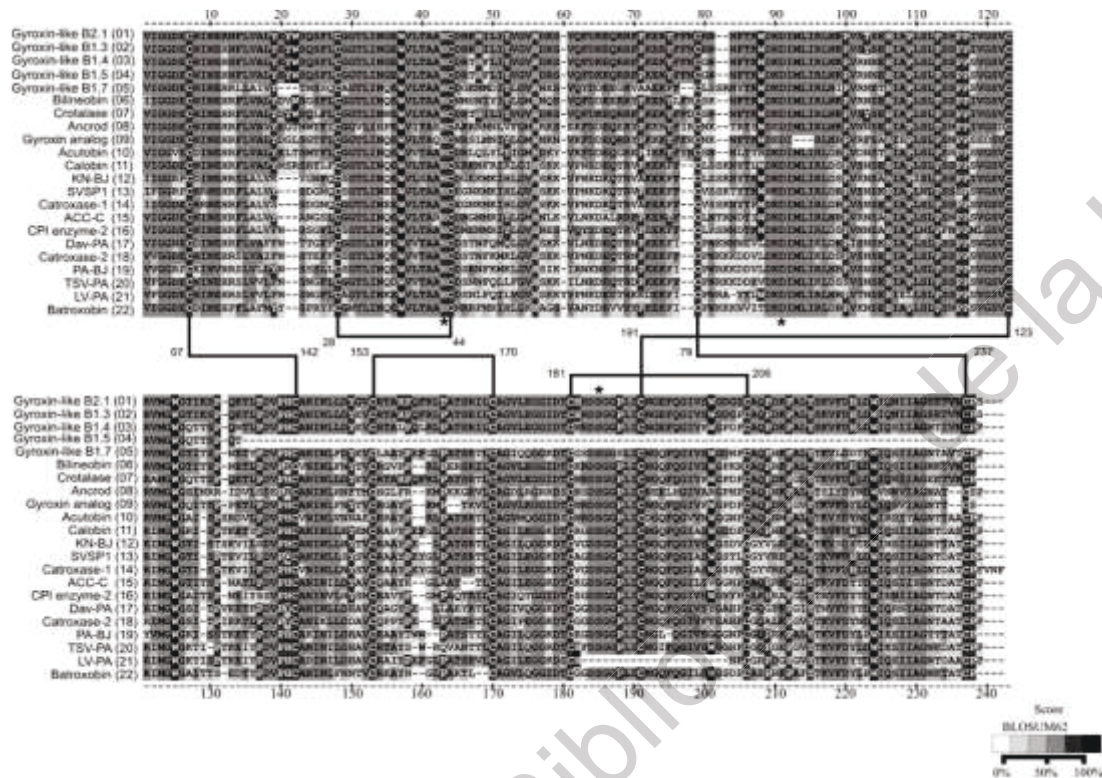
Las SVSP son sintetizadas como zimógenos (peptidasas inactivas) de 256-247 aminoácidos, con un péptido señal putativo de 18 aminoácidos y una señal peptídica de activación de 6 residuos de aminoácidos (Gln-Lys-Ser-Ser-Glu-Leu) (Serrano y Maroun, 2005). Estas peptidasas contienen 12 residuos de cisteínas, 10 de los cuales forman puentes bisulfuro (Itoh y col., 1987), las dos cisteínas restantes forman un puente disulfuro único y conservado entre las SVSP (Parry y col., 1998). Muchas serín proteasas son glicoproteínas que muestran un número variable de N- u O-glicosilaciones en posiciones no conservadas de las secuencias de aminoácidos (Itoh y col., 1987).

Los pesos moleculares de las SVSP varían entre los 26 y 67 kDa y están disponibles más de 50 secuencias de aminoácidos en las bases de datos (Serrano y Maroun, 2005). Algunas de las SVSP son similares a la trombina, una enzima multifuncional que juega papeles clave en la coagulación sanguínea (la cual corta tanto el fibrinopéptido A (FPA) como el B (FPB) del fibrinógeno, mediante dos sitios activos hidrofóbicos independientes) (Stubbs y Bode, 1993). Este tipo de serín proteasas son denominadas enzimas tipo trombina del veneno de serpiente (SVTLEs, por sus siglas en inglés) (Pirkle, 1998) y son clasificadas como enzimas coagulantes; la mayoría de las SVSP pertenecen a este grupo de enzimas cortando



en su mayoría solamente el fibrinopéptido A (FPA, por sus siglas en inglés). La actividad de las SVTLEs sobre el fibrinógeno, difiere de la  $\alpha$  trombina, ya que al liberar solo un fibrinopeptido, producen monómeros de fibrina que no son estabilizados por otros factores coagulantes (XIII), haciendo que los coágulos sean rápidamente dispersados (Stocker y col., 1982). En la Figura 2 se muestran algunos alineamientos entre SVSP y SVTLEs así como otros grupos de enzimas tipo serina de venenos que actúan en otras partes de la cascada de coagulación, como son enzimas tipo calicreína (KN), activadores del plasminógeno (PA), enzimas tipo proteína C y activadores del factor V (Koh y col., 2006).

Numerosas estructuras primarias de SVSP han sido originadas directamente de la secuenciación de proteínas o de secuencias de cDNAs, las cuales muestran homología en las secuencias de aminoácidos aun cuando existen una especificidad hacia diferentes sustratos macromoleculares (Serrano y Maroun, 2005). Aun dada su alta similitud de secuencias, que va de 50 a 70%, las SVSP presentan una alta especificidad hacia distintos sustratos (Marsh y Williams, 2005). Esto puede observarse a su vez en el alineamiento de secuencias de la Figura 2 entre SVSP (Miyagui y col., 2013) de serpientes de la familia *Viperidae*, entre las que se agrupa las serpientes de cascabel (Chippaux, 1998; Trape y col., 2001; WHO, 1981; Winkel y col., 1998). Las SVSP que se han reportado en los venenos de serpiente del genero *Crotalus* son enzimas tipo Gyroxin B2.1, B1.3, B1.4, B1.5, B1.7 de *Crotalus durissus terrificus*, Crotalase una enzima tipo trombina de *Crotalus adamanteus*, SVSP-1 una serín proteasa de veneno de *Crotalus adamanteus*, Catroxase-1 y Catroxase-2 de *Crotalus atrox*, enzimas tipo calicreína, que presentan una alta homología con serín proteasas de otros venenos de serpientes (Serrano y Maroun, 2005).



**Figura 2. Alineamiento de serín proteasas del veneno de serpiente.** 1-5) tipo Gyroxin B2.1, B1.3, B1.4, B1.5, B1.7 de *Crotalus durissus terrificus* (Q58G94, B0FXM1, B0FXM2, EU360953, B0FXM3, respectivamente). 6) Bilineobin de *Agkistrodon bilineatus* (Q9PSN3). 7) Crotalase de *Crotalus adamanteus*. 8) Ancrod de *Agkistrodon rhodostoma* (P26324). 9) Análogo de Gyroxin de *Lachesis muta muta* (P33589). 10) Acutobin de *Agkistrodon acutus* (Q9I8X2). 11) Calobin de *Agkistrodon caliginosus* (Q91053). 12) KN-BJ de *Bothrops jararaca* (O13069). 13) SVSP-1 serín proteasa de veneno de *Crotalus adamanteus* (Q8UUK2). 14) Catroxase-1 de *Crotalus atrox* (Q8QHK3). 15) ACC-C activador de proteína C de *Agkistrodon contortrix contortrix* (P09872). 16) CPI enzima de *Agkistrodon caliginosus* (O42207). 17) Dav-PA de *Agkistrodon acutus* (Q9I8X1). 18) Catroxase-2 de *Crotalus atrox* (Q8QHK2). 19) PA-BJ de *Bothrops jararaca* (P81824). 20) TSV-PA de *Trimeresurus stejnegeri* (Q91516). 21) LV-PA de *Lachesis muta muta* (P84036). 22) Batroxobin de *Bothrops atrox* (P04971). Los números de acceso indicado son de la base de datos Swissprot. Las líneas indican los puentes bisulfuro y la triada catalítica (His, Asp and Ser) es representada por un asterisco (\*). Tomado de (Miyagui y col., 2013).

### 3.2.2. Metaloproteasas

Las metaloproteasas dependientes de Zinc, son componentes comunes de los venenos de serpientes del grupo de los vipéridos (Braud y col., 2000; Mackessy, 2010a). Las metaloproteasas del veneno de serpientes (SVMP, por sus siglas en inglés), pertenecen a la familia M12, basado en la secuencia consenso de residuos de aminoácidos del sitio catalítico (HEXXHXXGXXH seguido de una metionina) llamadas metzicinas, se agrupan dentro de las reprotolisinas (subfamilia B), basados en estructuras cristalográficas de miembros representativos de estas familias (Fox y Serrano, 2005). Las metaloproteasas muestran un sitio activo altamente conservado que contiene tres histidinas (Stöcker y col., 1995) unidas a zinc en el sitio catalítico y una metionina conservada que se encuentra debajo del sitio activo (Zhang y col., 1994).

Las SVMP son los factores primarios responsables de hemorragias a nivel local y sistémico (Takeda y col., 2012), degradan componentes de la membrana basal y afectan principalmente los capilares de las células endoteliales, causando disrupción de las paredes de los vasos sanguíneos y provocando el escape de sangre hacia el estroma (Gutiérrez y col., 2005), además de actuar sobre componentes del sistema hemostático (Kamiguti y col., 1996). Las SVMP que requieren zinc en su sitio activo son clasificadas en 4 clases (PI a PIV), basados en su organización de multidominios. Las metaloproteasas de la clase PI, con una masa molecular de 20–30 kDa, se componen de un péptido señal (pre) y un prodominio, además del dominio de metaloproteasa (M), son la clase más simple de estas enzimas (Ramos y Selistre-de-Araujo, 2006). A su vez, las SVMP de la clase P-II, de masa molecular de 30-60 kDa, contienen el dominio de metaloproteasa seguido de un dominio desintegrina (D). Las SVMP de la clase P-III S, de masa molecular alta con rangos de 60–100 kDa, se conforman del dominio M, dominio tipo desintegrina (D) y un dominio rico en cisteína (C). La clase P-IV son SVMP heterodiméricas y contienen adicionalmente un dominio tipo-lectina tipo C de serpiente (snaclec) (Clemetson y col., 2009). De acuerdo a la base de datos PDB (Protein Data Bank) existen 136 secuencias de metaloproteasas reportadas para el género *Crotalus*, el alineamiento múltiple de algunas de estas secuencias de aminoácidos se muestra en la Figura 3, observándose una alta homología. Basados en la

similitud de sus secuencias, las metaloproteasas muestran un sitio activo altamente conservado (HEXXHXXGXXH, mostrado en verde) que contiene tres histidinas seguido de una metionina (Stöcker y col., 1995).



**Figura 3. Alineamiento múltiple de la metaloproteasas.** 4 de *Crotalus adamanteus* (gi|338855316), metaloproteasa PII de *Crotalus durissus collilineatus* (gi|224038264), metaloproteasa del veneno de serpiente atrolisina-C (gi|82216950), precursor de metaloproteasa de *Crotalus molossus molossus* P-I (gi|20530313), metaloproteasa P-I de *Crotalus durissus durissus* P-I (gi|89519389) y los precursores de metaloproteasas de *Crotalus molossus molossus* P-I (gi|20530317; gi|20530319). El sitio activo del dominio metaloproteasa se muestra en verde. Las líneas azules muestran los puentes bisulfuro. \* Secuencias de aminoácidos conservados en todas las secuencias analizadas. clustalo version1.2.1.

### 3.2.3. Fosfolipasas A<sub>2</sub>

Las fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) son una súper familia de proteínas que hidrolizan el enlace éster de los glicero-fosfolípidos en la posición sn-2. Se pueden dividir en 4 grupos principales: fosfolipasas secretorias (sPLA<sub>2</sub>), fosfolipasas citosólicas (cPLA<sub>2</sub>), fosfolipasas



independientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (iPLA<sub>2</sub>) y fosfolipasas asociadas a lipoproteínas (LpPLA<sub>2</sub>) (Burke y Dennis, 2009). Las sPLA<sub>2</sub> fueron las primeras en ser reportadas y se encuentran en venenos de serpiente, abeja, avispa y escorpiones (Kini y Koh, 2016), contienen de 5 a 8 puentes disulfuro y necesitan de la presencia de calcio para llevar a cabo su función enzimática. Su mecanismo de acción es similar al de las SVSP, donde una molécula de agua funciona como nucleófilo mediando el ataque hacia el enlace que será hidrolizado (Kang y col., 2011).

Las fosfolipasas de veneno de serpiente (SVPLA<sub>2</sub>) son un componente principal de los venenos de las familias *Colubridae* y *Viperidae*. Sus principales efectos fisiológicos pueden ser neurotóxicos, como es el caso de la toxina de mojave y la crototoxina presentes en *Crotalus scutulatus* y *Crotalus durissus*, respectivamente, sin embargo pueden presentar efecto miotóxico, dañando las fibras musculares (French y col., 2004). Las SVPLA<sub>2</sub> miotóxicas de serpientes de la familia *Viperidae* generalmente inducen daño tisular a nivel local y junto con metaloproteinasas hemorrágicas, generan patología tisular compleja y generalizada, además pueden provocar en algunos casos miotoxicidad sistémica asociada a mioglobinuria e insuficiencia renal aguda (Gutiérrez y Lomonte, 2013).

#### 3.2.4. Hialuronidasas

Las hialuronidasas de los venenos de serpiente (SVHA, por sus siglas en inglés), tienen pesos moleculares en el rango de 33 a 110 kDa (Kemparaju y col., 2009). Son conocidas como un factor de dispersión para los demás componentes de los venenos, degradando el hialuronano (ácido hialurónico, ácido D-glucurónico, N-acetil-D-glucosamina), polisacárido estructural de la matriz extracelular (El-Safory y col., 2010). Su actividad de difusión o dispersión, se relaciona con un efecto sinérgico junto con SVMP, en la promoción del efecto hemorrágico, ocasionado por su acción sobre la integridad estructural de la matriz extracelular, debido a la degradación del ácido hialurónico (Girish y col., 2004), que a su vez tiene efecto sobre la degradación de secciones del tejido muscular (Anai y col., 2002).

### 3.3. Efectos fisiológicos y variabilidad en los venenos de serpiente

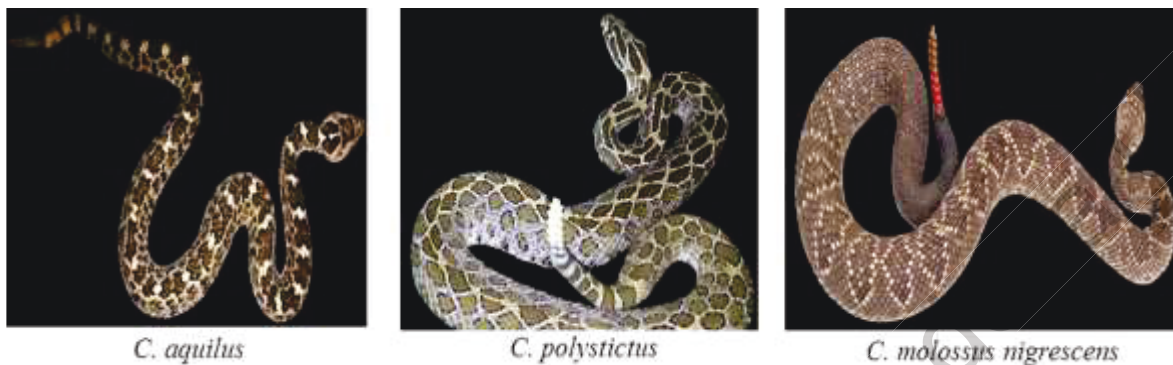
El veneno de la familia *Viperidae*, es principalmente hemotóxico, actúa sobre las células y el sistema hemostático causando extensas lesiones locales, hemorragias y una variedad de alteraciones sobre la coagulación sanguínea por contener componentes procoagulantes y anticoagulantes (Maruňak y col., 2005). El envenenamiento se caracteriza por prominentes alteraciones a nivel local, incluyendo edema y necrosis, efectos que pueden resultar en secuelas permanentes de muy rápido desarrollo (León y col., 2000). Las enzimas responsables de estos efectos son enzimas tipo serina, metaloproteasas y fosfolipasas (Braud y col., 2000).

Después de la mordedura de serpiente, el veneno se activa por la temperatura corporal de la presa y por el cambio de pH. La enzima hialuronidasa destruye los constituyentes de la pared intersticial favoreciendo la permeabilidad y permitiendo la dispersión del veneno. La mayoría de los vipéridos (serpientes de foseta) causan dolor dentro de los primeros 5 min después de la mordedura y rápidamente provocan hinchazón. Estos venenos hemotóxicos provocan disminución de los niveles de fibrinógeno y disminución del número de plaquetas en el torrente sanguíneo hasta dos semanas después del envenenamiento. Las reacciones sistémicas ocasionadas por los venenos incluyen síndromes similares a la coagulación intravascular diseminada, falla renal aguda, shock hipovolémico y muerte (Boyer y col., 1999; Sartim y col., 2017). Si bien el veneno de la familia *Viperidae* es principalmente hemotóxico, hay que tener en cuenta que dicha clasificación sirve para definir de alguna forma el veneno de serpiente sin embargo, se deben considerar las limitaciones de la clasificación, ya que los venenos de serpiente afectan múltiples sistemas y órganos, generando efectos diversos ya que son mezclas complejas de proteínas y péptidos (Adukauskiénė y col., 2011). Existe una alta variación en los componentes del veneno, la cual se ha observado a distintos niveles taxonómicos entre familias, géneros, especies, subespecies; variación entre organismos de la misma especie, dimorfismo sexual variación geográfica, cambios dependientes de la edad y variación por ubicación geográfica (Chippaux y col., 1991). Las variaciones geográficas pueden deberse a factores ecológicos (mantenimiento de moléculas que permiten la captura más rápida de la presa) y

divergencias en poblaciones cercanas por simpatría -diferenciación de poblaciones que habitan en áreas comunes- (Safran y Nosil, 2012). Se ha observado que en algunas especies de serpientes, como *Crotalus durrisus* y sus diferentes subespecies, poseen variabilidad en la composición de sus venenos y en el efecto fisiológico de los mismos, ya que organismos que habitan en Brasil y otras partes de Sudamérica, poseen venenos caracterizados por ocasionar un grave daño neurotóxico y daño miotóxico, en contraste con accidentes causados por estas especies en América central, los cuales son menos severos a nivel sistémico y provocan mayormente daño a nivel local, edema, hemorragia, necrosis y alteraciones sistémicas moderadas como coagulopatías (Castro y col., 2013; Saravia y col., 2002). La caracterización del veneno de serpiente es una de las principales vías para conocer con mayor detalle su composición y es una de las estrategias en toxicología para analizar la sintomatología que ocurre durante el envenenamiento (Angulo y Lomonte, 2009). Estas consideraciones hacen necesario el estudio continuo de los venenos de serpiente, con el fin de obtener datos más precisos de su composición y conocer las diferencias que puedan llegar a presentarse entre ellos.

#### 3.4. Modelo de estudio

En este trabajo se analizó la composición enzimática de los venenos de las serpientes *C. molossus nigrescens* (Cmn), subespecie que se distribuye en el altiplano mexicano, desde el sur de Chihuahua hasta el norte de Oaxaca (Campbell y Lamar, 2004b) así como *C. aquilus* (Ca) y *C. polystictus* (Cp), especies endémicas al centro de México (Campbell y Lamar, 1989; McCranie, 1976) (Figura 4).



**Figura 4. Serpientes de genero Crotalus.** Organismos utilizados para la extracción de veneno.

Algunos componentes enzimáticos de estas especies han sido reportados. En el caso de *Crotalus molossus molossus* (serín proteasas, metaloproteasas y fosfolipasas), ya se han estudiado basadas principalmente en el peso molecular determinado por SDS-PAGE (Mackessy, 2010a) además, se ha reportado una serín proteasa tipo trombina (Ramírez y col., 1990) y un análisis de la variación ontogenética, que indica la presencia de crotamina, SVSP, SVMP, actividad proteolítica, coagulante y fibrinogenolítica, analizada por RP-HPLC y Western blot (Borja y col., 2018). En el caso de Cp, hay un trabajo de caracterización por LC-MS/MS y actividades enzimáticas para SVMP, SVSP, fosfodiesterasa y L-aminoácido oxidasa (LAAO) (Mackessy y col., 2018). Sin embargo, para Ca, solo se ha identificado la actividad proteolítica de su veneno (Rivas y col., 2017) y no hay suficientes datos sobre la composición del mismo.



#### 4. HIPÓTESIS

Los venenos de las tres especies de serpientes estudiadas presentan enzimas asociadas con venenos hemotóxicos pero con diferentes actividades, lo que permitirá establecer la importancia de contar con los datos de la caracterización bioquímica para futuras estrategias terapéuticas.

#### 5. OBJETIVOS

##### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar bioquímicamente las principales actividades enzimáticas del veneno de *Crotalus molossus*, *Crotalus polystictus* y *Crotalus aquilus*.

##### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar cualitativa y cuantitativamente la actividad enzimática de serín proteasas del veneno de serpiente
- Cuantificar e identificar la actividad enzimática de hialuronidasas del veneno de serpiente.
- Determinar la actividad enzimática de fosfolipasas del veneno de serpiente.
- Cuantificar de manera cualitativa y cuantitativa la actividad de metaloproteasas del veneno de serpiente.
- Purificar parcialmente serín proteasas y fosfolipasas del veneno de serpiente mediante filtración en gel e intercambio iónico.
- Analizar las enzimas mediante espectrometría de masas

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Obtención del veneno de serpiente

El veneno se obtuvo por extracción manual (ordeña) de 4 organismos de la especie *Crotalus aquilus* (30 cm de largo), 4 de la especie *C. polystictus* (30 cm de largo) y 10 organismos de la especie *Crotalus molossus* (65 cm largo), sin distinción de sexo entre 2015 y 2018. La extracción del veneno se realizó mediante la contención física del ejemplar y colocando frente a la boca de la serpiente un frasco de precipitado cubierto con parafilm para permitir al animal morder y de esta manera se colectó el veneno. El recipiente con la muestra fue colocado inmediatamente en hielo seco, liofilizado y almacenado a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Se dejaron 20 días de reposo entre cada extracción para evitar el estrés en los organismos. Los especímenes se encuentran en la Unidad de Manejo Ambiental Herpetario de la Universidad Autónoma de Querétaro, que está regulada bajo la Ley General de Vida Silvestre. El protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética de la FCN-UAQ.

### 6.2 Determinación de la concentración proteica y perfil proteolítico del veneno de serpiente mediante electroforesis

Las muestras de veneno fueron diluidas en agua tridestilada y la cantidad de proteína fue estimada con base al método de Bradford (1976) utilizando diluciones de un estándar de proteína (ASB), a diferentes concentraciones (Bradford, 1976). Se utilizaron  $20\text{ }\mu\text{g}$  de proteína de veneno diluido con  $10\text{ }\mu\text{L}$  de buffer de muestra y se analizaron por SDS-PAGE con base a la metodología de Laemmli (1970). Las muestras se analizaron bajo condiciones no reductoras y reductoras (buffer de muestra con  $\beta$  mercaptoetanol calentadas a temperatura de ebullición durante 5 min) en geles homogéneos de acrilamida-bisacrilamida al 10 y/o 12%, se utilizó una cámara Miniprotean II (BioRad). Terminada la incubación se tiñó el gel con azul de Coomassie durante toda la noche y posteriormente se destiñó con una solución de metanol al 40% y ácido acético al 10% o tinciones con azul de Coomassie calentadas hasta comenzar a hervir y posteriormente incubadas durante 10 min en donde los geles fueron desteñidos utilizando agua hirviendo.

### 6.3 Zimografías

#### 6.3.1 Zimografía de serín proteasas sobre sustratos cromogénicos

Las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE al 10% de poliacrilamida, 50 y 100 µg de proteína de veneno fueron utilizados para el análisis de serín proteasas tipo tripsina y quimotripsina, respectivamente. Posteriormente se detectó la actividad proteolítica usando una membrana de nitrocelulosa previamente embebida durante 30 min en el sustrato específico para cada serín proteasa: sustratos BApNA para enzimas tipo tripsina (N-Succinyl -Arginine-p-nitroanilide) y SAAPFpNA para enzimas tipo quimotripsina (N-Succinyl alanine-alanine-proline-phenylalanine-p-nitroanilide), los cuales fueron preparadas a 20 mM en dimetilformamida (DMF) y diluidos 1:20 en buffer Tris-HCl 0.1 M pH 8, para obtener una concentración final de 1 mM. El sustrato impregnado en la membrana de nitrocelulosa fue incubado sobre el gel de poliacrilamida por 2 h (o hasta observar coloración amarilla en alguno de los carriles) a 37° C y se lavó con Na<sub>2</sub>NO<sub>3</sub> 0.1%, sulfato de amonio y con N-1-naftiletilendiamina por periodos consecutivos de 5 min, para revelar la actividad enzimática (Ohlsson y col., 1986; Vinokurov y col., 2005). Terminada la incubación el gel se tiñó con azul de Comassie y posteriormente fue desteñido.

#### 6.3.2 Zimografía de metaloproteasas

Para la detección de metaloproteasas, se analizaron 20 µg de proteína de veneno por SDS-PAGE al 10% co-polimerizado con gelatina al 0.12 % como sustrato. Una vez terminada la electroforesis el gel se agitó durante 1 h en una solución con Tritón X-100, 0.02% (v/v) y cistina-cisteína 0.001 M para eliminar el SDS. Después se lavó durante 30 min en un buffer renaturalizante cistina-cisteína y finalmente se incubó 2 o 2.5 h a 37° C, en un buffer compuesto por tris HCl 0.05 M pH 7.4. Tris-HCl 0.05 M, pH 8, NaCl 0.2 M, CaCl<sub>2</sub> 0.02 M. A su vez, se utilizaron muestras de veneno incubadas por 30 min con EDTA al 10, 50 y 100 mM utilizando un buffer sin CaCl<sub>2</sub>, para confirmar la presencia de metaloproteasas (Rice y col., 2001). Terminada la incubación se teñirá el gel con azul de Comassie durante 1 h y posteriormente se destiñó con una solución de metanol-ácido acético al 40% y 10%, respectivamente. Las bandas claras indicaron actividad proteolítica.

### 6.3.3 Zimografía de SVPLA<sub>2</sub>

Se analizaron 20 ó 40 µg de muestras de veneno en un gel SDS-PAGE al 10% bajo condiciones no reductoras, el gel fue lavado una hora con una solución de Triton X-100 2.0% (v/v) y Tris-HCl 1500 mM, pH 7.4 (Rossignol y col., 2008). Posteriormente, el gel fue lavado 30 min en una solución NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM y Tris-HCl 50 mM pH 7.4 e incubado 2.5 h a 37° C con un gel de agarosa al 1% co-polimerizado con una solución de 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> y yema de huevo al 2%. Las zonas claras indicaron la presencia de SVPLA<sub>2</sub>.

### 6.3.4 Zimografía de actividad enzimática de hialuronidasas

Se utilizaron 100 µg de las muestras de veneno en geles SDS-PAGE al 10% co-polimerizados con ácido hialurónico. Terminada la electroforesis en condiciones no reductoras, el gel fue lavado 30 min con una solución compuesta de acetato de sodio 0.2 M, NaCl 0.15 M pH 6 y tritón X-100 al 2.5 % (v/v) y posteriormente incubado por 2.5 h a 3 h a 37° C en un buffer compuesto de acetato de sodio 0.2 M y NaCl 0.15 M pH 6. El gel se tiñó con colorante Alcian Blue al 0.5 % (p/v) y posteriormente fue desteñido con una solución de metanol/ácido acético al 40% y 10% respectivamente, con base al método de Guntenhöner y col., (1992)

## 6.4 Ensayos de actividad enzimática

### 6.4.1 Actividad de serín proteasas

Se determinó mediante el método de Erlanger y col. (1961), utilizando 50 µg de proteína de los venenos para la medición de serín proteasas tipo tripsina (sustrato BApNA), tipo quimotripsina (sustrato SAAPFpNA) y tipo elastasa (sustrato N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val *p*-nitroanilide) a una concentración de 0.01 M, en DMSO. La reacción se llevó a un volumen final de 120 µL con buffer Tris 0.1 M, pH 8 y se agregaron 10 µL de cada sustrato. El aumento de absorbancia por la liberación *p*-nitroanilida fue medida a 405 nm. Se utilizaron como controles positivos 50 µg de quimotripsina y tripsina bovina, así como, elastasa porcina, respectivamente.

#### 6.4.2 Actividad proteolítica

La actividad proteolítica fue determinada de acuerdo a Gutiérrez y col. (2008) y a Ponce-Soto y col. (2007) con modificaciones. Cien  $\mu\text{g}$  de proteína de veneno fueron agregados a 500  $\mu\text{L}$  de una mezcla compuesta con 2% (p/v) caseína (Sigma-Aldrich) y 0.1 mM Tris-HCl (pH 7.4) y 0.15 M NaCl. Después de 2.5 h de incubación a 37° C, la reacción fue detenida agregando 500  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético al 5% (p/v) a 37° C o temperatura ambiente, posteriormente se dejó reposar durante 30 min y se centrifugó a 12,000 g durante 15 min y la hidrólisis del sobrenadante fue medida a 280 nm en un espectrofotómetro de placas de 96 pozos. Se utilizó agua como control negativo. Muestras de veneno fueron incubadas con 50 mM de EDTA (Sigma-Aldrich) durante 30 min a temperatura ambiente, antes de ser agregadas a la mezcla con caseína, para confirmar la actividad proteolítica de metaloproteasas. La actividad proteolítica fue reportada como unidades de actividad (UA)/proteína ( $\mu\text{g}$ ), donde una unidad de actividad corresponde al incremento de 0.01 de absorbancia a 280 nm.

#### 6.4.3 Actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>

La actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> (SVPLA<sub>2</sub>) de 100 ng veneno se analizó mediante un ensayo colorimétrico utilizando el kit Cayman Chemical, Ann Arbor, MI USA. El ensayo utiliza como sustrato análogo el 1,2-ditio diheptanoil fosfatidilcolina. Los tioles generados por hidrólisis del enlace tioester son detectados utilizando el reactivo DTNB [(5,5'-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzónico)]. El aumento de absorbancia fue medido mediante un espectrofotómetro (Benchmark Plus, Bio-Rad, USA) a 414 nm cada minuto por 10 min. Se utilizó como control positivo 10  $\mu\text{g}$  de PLA<sub>2</sub> de veneno de abeja. La actividad enzimática se expresó en  $\mu\text{mol}$  de sustrato hidrolizado/min/ $\mu\text{g}$  de proteína.

#### 6.4.4 Actividad de hialuronidasa

Se siguió el método de Di Ferrante, (1956) utilizando concentraciones de 10 a 200  $\mu\text{g}$  de proteína de los venenos. Se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de buffer pH 6 de acetato de sodio 0.2 M y NaCl 0.15 M, 100  $\mu\text{L}$  de sustrato (1mg/mL de ácido hialurónico de *Streptococcus equi*), llevados a un volumen final de 250  $\mu\text{L}$ . Una vez hecha la mezcla, se incubó durante 15 min

a 37° C. Posteriormente se agregó 1 mL de bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 2.5% en NaOH al 2%, se dejó reposar durante 30 min y se leyó la turbidez a una longitud de onda de 400 nm en un lector de placas (Benchmark Plus, Bio-Rad, USA), utilizando como control una hialuronidasa tipo IV-S de testículos bovinos.

#### 6.5 RP-HPLC

Para el análisis se utilizaron 200 µg de proteína de veneno de Ca, Cp y Cmn, se separaron por RP-HPLC utilizando una columna symmetry C18 (150 x 4,6 mm. tamaño de partícula 3.5 µm) equilibrada con solución A (H<sub>2</sub>O al 0,1% con ácido trifluoroacético (TFA, por sus siglas en ingles), utilizando un cromatógrafo Agilent 1200. La elución se realizó a 1 mL/min usando un gradiente generado con la solución B (CH<sub>3</sub>CN al 0.1% con TFA) como sigue: B al 0% por 5 min, B al 0-60% durante 60 min. La absorbancia fue medida a 280 nm.

#### 6.6 MALDI-TOF-MS

Las muestras de venenos de Ca, Cp y Cmn se analizaron utilizando 70 µg de veneno diluido con 3 µL de matriz de ácido sinapínico (10 mg/mL en ddH<sub>2</sub>O), se mancharon en placas objetivo MALDI y se analizaron utilizando un espectrómetro de masas Ultraflex-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). La abundancia de iones se obtuvo en modo reflector, utilizando un voltaje de aceleración de 20 kV. El software Bruker Daltonics Flexcontrol (Bremen, Alemania) se utilizó para el análisis de datos.

#### 6.7 Purificación parcial del veneno de serpiente

Los venenos de Ca y Cmn fueron parcialmente purificados mediante filtración en gel, utilizando 50 mg de muestra, diluidos en buffer de bicarbonato de amonio 0.02 M y se cargaron en una columna de Sephadex G-75, equilibrada con 0.02 M de bicarbonato de amonio. Las fracciones con actividad enzimática contra serín proteasas tipo tripsina, quimotripsina y SVPLA<sub>2</sub> fueron concentradas y liofilizadas. Posteriormente estas muestras

fueron purificadas por intercambio aniónico con una columna Bio-Scale Mini Macro-Prep High Q Cartridge de Bio-Rad, Campos y col. (1997), con modificaciones.

#### 6.8 Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Los datos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism V5.0 de ANOVA (Tukey  $p < 0.05$ ) para evaluar las diferencias entre las actividades enzimáticas de los venenos.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Patrón de bandeo de proteínas

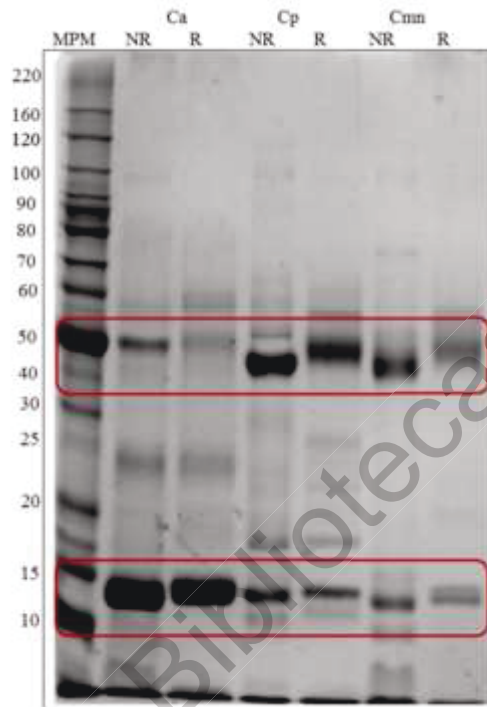
Los venenos de serpientes de la familia *Viperidae* pueden tener hasta 100 componentes proteicos, incluidos 10 tipos de familias distintas de proteínas, siendo mezclas complejas de proteínas y péptidos (Serrano y col., 2005). Los venenos de las especies *C. aquilus*, *C. polystictus* y *C. molossus nigrescens* contienen un patrón de bandeo con proteasas de pesos moleculares aparentes similares bajo condiciones no-reductoras y reductoras, sin embargo, en el último caso se detectó la presencia de bandas de proteínas adicionales, resultantes del desdoblamiento de las proteínas bajo estas condiciones. Las proteínas de los venenos abarcan un rango de pesos molecular aparente (PMA) desde los 6 kDa hasta los 180 kDa, con patrones de bandas proteicas que presentan similitud con algunas diferencias entre ellos, indicando la alta variabilidad en la composición de los venenos de serpiente (Figura 5). Los patrones de proteína encontrados para Cm y Cp fueron similares a los reportados por (Borja y col., 2018) y (Mackessy y col., 2018). Los venenos analizados presentaron una coloración amarilla, la cual está relacionada con la presencia de L-amino ácido oxidasas (LAAO), una familia de enzimas con un peso molecular reportado 50 kDa. En el presente trabajo, los venenos de las tres especies mostraron bandas de proteína con este peso molecular, sin embargo, los análisis para LAAO son necesarios para confirmar su presencia.

### 7.2 Zimografía y actividad enzimática de serín proteasas del veneno de serpiente (SVSP)

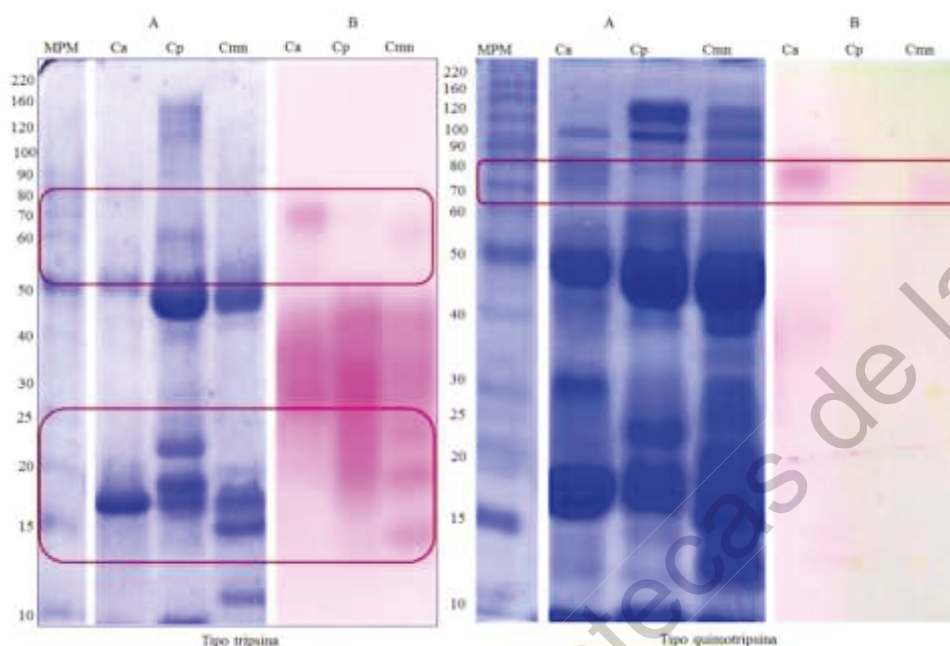
Usualmente las SVSP son reportadas en un rango de peso molecular de 25-76 kDa (Serrano, 2013) sin embargo, las bandas de proteasas de los venenos de Ca y Cm, fueron detectadas en un rango de 15 a 95 kDa, para serín proteasas tipo tripsina y de 40 y 80 kDa, para tipo quimotripsina (Figura 6), lo que podría ser atribuido a su grado de glicosilación (Serrano y Maroun, 2005). En el zimograma con sustrato SAAFpNA se observó un menor número de proteasas en comparación con las del zimograma con sustrato BApNA, el cual puede ser reconocido por serín proteasas tipo trombina de venenos de serpiente, así como serín proteasas tipo tripsina (Castro y col., 2004) asociadas con la activación de zimógenos



de metaloproteasas (Khan y James, 1998), lo cual podría favorecer su presencia en un mayor número de formas.



**Figura 5. Patrón de bandeo de proteína del veneno de *C. aquilus* (Ca), *Crotalus polystictus* (Cp) and *C. molossus nigrescens* (Cmn).** Veinte  $\mu\text{g}$  de proteína del veneno analizado por SDS-PAGE al 10% bajo condiciones NR (no-reductoras) y R (reductoras). Marcadores de peso molecular (MPM) en kDa. La variabilidad en las bandas de proteasas está marcada con cuadros rojos.

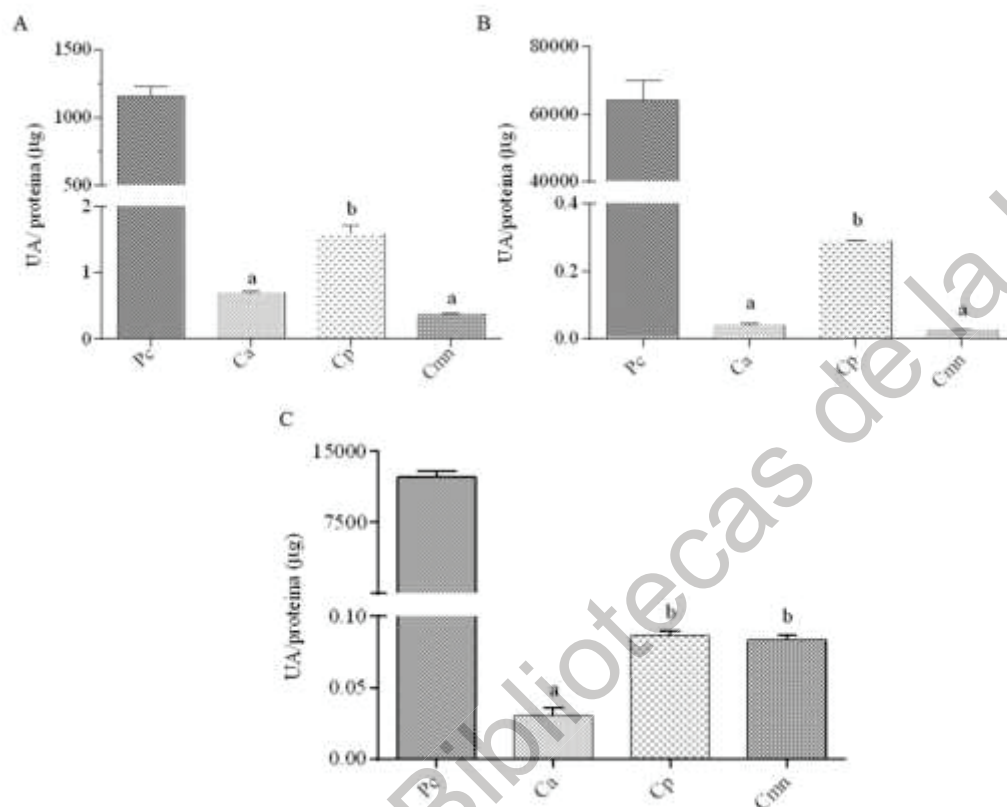


**Figura 6. Actividad proteolítica de serín proteasas del veneno de *C. aquilus* (Ca), *C. polystictus* (Cp) y *C. molossus nigrescens* (Cmn).** (A) Gel de SDS-PAGE 10% y (B) zimografía. Proteasas tipo tripsina utilizando 50 µg de proteína de veneno con sustrato BApNA, análisis de proteasas tipo quimotripsina utilizando 100 µg de proteína de veneno con sustrato SAAFpNA. Después de la electroforesis una membrana de celulosa con el sustrato para cada serín proteasa fue colocado sobre el gel e incubado 2.5 y 5 h a 37° C, respectivamente. Marcadores de peso molecular (MPM) en kDa. La variabilidad en las bandas de proteasas está marcada con cuadros rojos.

Los venenos de Ca y Cmn mostraron diferencias en SVSP tipo tripsina en el rango de los 70 kDa, mientras que el veneno de Cp no presentó actividad en este rango de peso molecular. Además, Cmn y Cp mostraron tres bandas de proteasas en el rango de 14 a 25 kDa, las cuales estuvieron ausentes en el veneno de Ca. Para las SVSP tipo quimotripsina, el veneno de Ca presentó dos bandas de proteasas de 40 y 80 kDa, mientras que Cmn no presentó la segunda banda y en el veneno de Cp, ambas bandas no fueron detectadas.

Algunas de las bandas de proteínas fueron observadas débilmente marcadas en el gel de SDS-PAGE utilizado para la zimografía de serín proteasas tipo tripsina, esto puede ser ocasionado por las condiciones de incubación o la utilización de una baja cantidad de proteína, sin embargo, la actividad enzimática sí fue detectada por zimografía, debido a la alta sensibilidad de detección de la técnica (Wagner y col., 1985). Estas bandas de proteasas sí se lograron observar en el patrón de proteínas observado en gel de SDS-PAGE y en el gel de SDS-PAGE usado para la zimografía de serín proteasas tipo quimotripsina, la cual fue hecha con una mayor cantidad de proteína de veneno (100  $\mu$ g).

En ambos venenos, la actividad de serín proteasas registró una mayor actividad amidolítica sobre el sustrato BApNA (220 UA/mL) en comparación de la actividad sobre el sustrato SAAFpNA (100 a 150 UA/mL) y el sustrato utilizado para identificar enzimas tipo elastasa. Las SVSP tienen mayor afinidad hacia sustratos que contienen Arginina en la posición P1, similares a los reconocidos por la tripsina bovina y enzimas tipo trombina de venenos de serpiente, las cuales son componentes abundantes de éstos y reconocen el sustrato BApNA (Castro y col., 2004). Lo anterior podría favorecer la alta actividad de proteólisis sobre este sustrato. Cp mostró los valores más altos de actividad enzimática tipo tripsina y quimotripsina, mientras que Ca mostró el valor más bajo de actividad tipo elastasa (Figura 7).

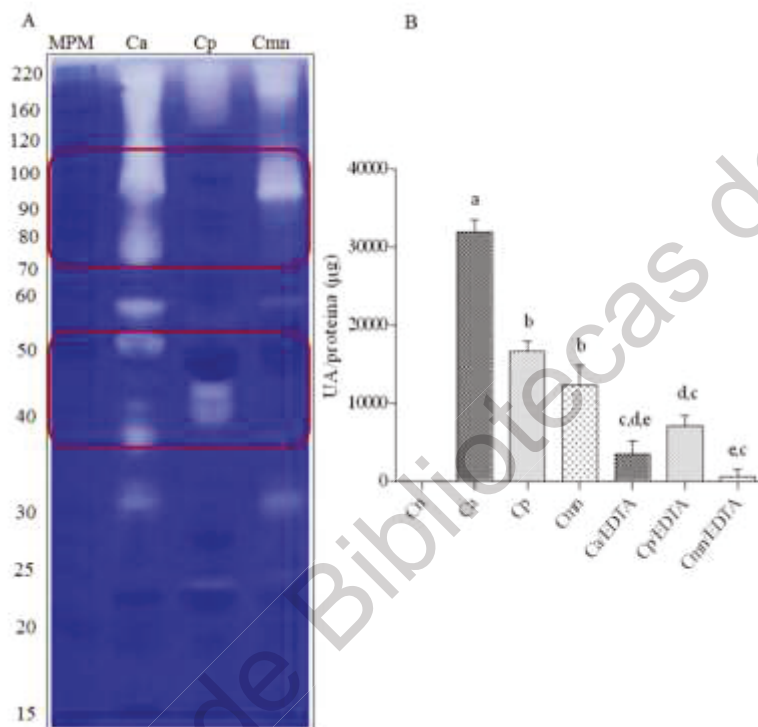


**Figura 7. Actividad proteolítica de serín peptidasas del veneno de *C. aquilus* (Ca), *C. polystictus* (Cp) y *C. molossus nigrescens* (Cmn). (A) enzimas tipo tripsina, utilizando tripsina bovina como control positivo; (B) tipo quimotripsina, usando quimotripsina bovina como control positivo; (C) enzimas tipo elastasa, utilizando elastasa porcina como control positivo. La actividad enzimática fue expresada en unidades de actividad (UA/µg de proteína). Las letras pequeñas muestran diferencias significativas (Tukey  $p < 0.05$ ) entre las muestras para cada enzima, sin comparación con los controles positivos (Pc).**

### 7.3 Zimografía de actividad enzimática sobre gelatina y actividad sobre caseína de SVMP

La actividad proteolítica de metaloproteasas de los venenos de serpientes ha sido analizada, mediante la ruptura de componentes proteicos de la membrana basal. La actividad proteolítica del veneno de estas especies sobre gelatina se muestra en la Figura 8. El veneno de Ca mostró la mayor actividad caseinolítica, seguido del veneno de Cp y Cmn. Cuando la misma actividad enzimática fue analizada en presencia de EDTA, los venenos de Ca y Cmn no tuvieron actividad, mientras que el veneno de Cp mantuvo un 40% de actividad. Esto

puede ser debido a la presencia de serín proteasas que reconozcan la caseína como sustrato, como ha sido reportado por Krogdahl y Holm (1983) en serín proteasas de mamíferos y aves.

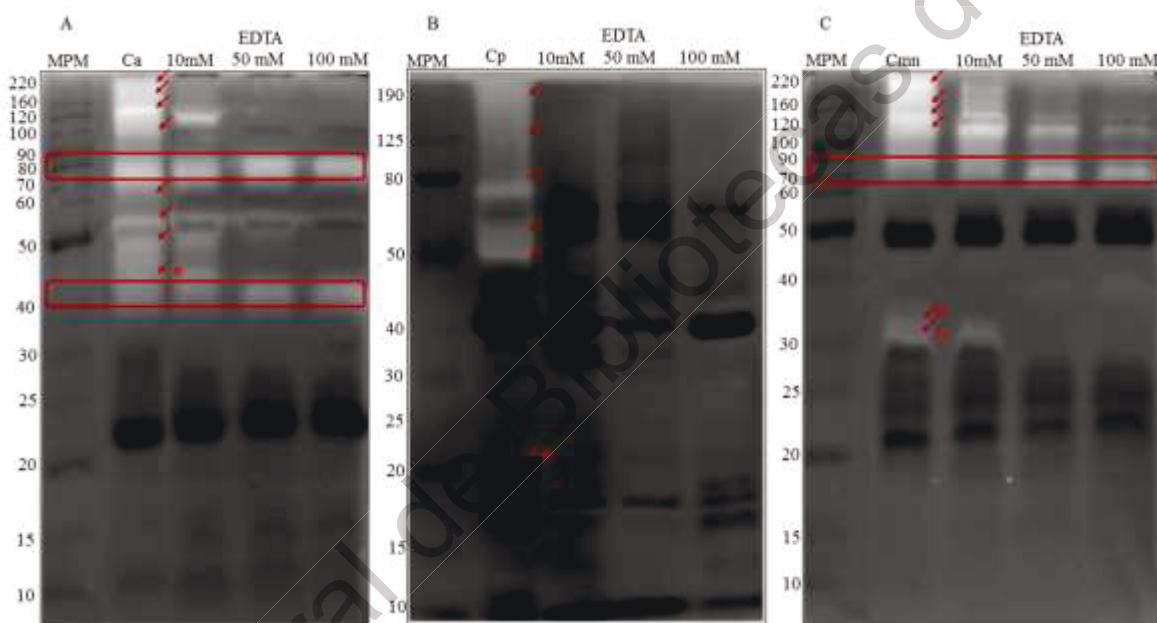


**Figura 8. Zimografía de gelatina en geles de poliacrilamida al 10% y actividad proteolítica utilizando sustrato de caseína.** (A) Diez microgramos de proteína de veneno de *C. aquilus* (Ca), *C. polystictus* (Cp) y *C. molossus nigrescens* (Cmn) incubados después de la electroforesis durante 2,5 horas a 37° C. marcadores de peso molecular (MPM) en kDa. (B) Actividad proteolítica de 100 µg de muestras de veneno en presencia/ausencia de EDTA 50 mM incubado con caseína como sustrato durante 2,5 horas a 37° C. Control negativo (Nc). La variabilidad en las bandas de proteasas está marcada con cuadros rojos. Las letras pequeñas muestran diferencias significativas (Tukey  $p < 0.05$ ) entre las muestras, ya sea con o sin ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Estos resultados coinciden con la alta actividad enzimática tipo tripsina y quimotripsina del veneno de Cp. El decremento en la actividad debido al efecto quelante del EDTA indica que la actividad proteolítica principal utilizando caseína como sustrato, corresponde a metaloproteasas. La zimografía de actividad gelatinolítica mostró que Ca contiene el mayor

número de metaloproteasas, seguido por los venenos Cmn y Cp (Baramova y col., 1989; Sanchez y col., 2017). Estas enzimas son capaces de romper fibronectina, laminina, colágeno tipo IV y gelatina tipo I, III and V (Bjarnason y Fox, 1994).

Debido a que la actividad de todas las SVMP son dependientes de Zinc ((Bjarnason y Fox, 1994; Fox y Serrano, 2008), su presencia en ambos venenos se confirmó utilizando EDTA, (Figura 9).



**Figura 9. Zimografía de SVMP en SDS-PAGE al 10 % de acrilamida co-polimerizado con gelatina.** Diez microgramos de proteína de veneno de (A) *C. aquilus* (Ca), (B) *C. polystictus* (Cp) y (C) *C. molossus nigrescens* (Cmn) incubados durante 30 min con 10, 50 y 100 mM de EDTA y analizados por electroforesis e incubados posteriormente 2,5 horas a 37 °C. Las flechas rojas indican la inhibición de SVMP por EDTA, asteriscos rojos (\*) muestra bandas no compartidas entre los venenos, los cuadros rojos muestran bandas de proteasas con actividad gelatinolítica no afectadas por el EDTA. Marcadores de peso molecular (MPM) en kDa.

Las proteasas de todos los venenos corresponden a bandas de proteína con un PMA entre 30-200 kDa, las cuales fueron inactivadas utilizando EDTA en concentraciones de 10 a 50 mM, indicando que se trata de SVMP. En la especie Cp, la mayoría de las SVMP perdieron su actividad bajo las condiciones usadas mientras que, en Ca algunas proteasas de PMA de



40, 50 y 70 kDa permanecieron activas y en Cmn, las proteasas de 70 y 90 kDa, mantuvieron su actividad enzimática. Dichas bandas pueden pertenecer a enzimas tipo trombina, algunas de las cuales en pueden hidrolizar gelatina (Zaqueo y col., 2014), sin embargo, la mayoría de las serín proteasas detectadas por zimografía para Cp y las de peso molecular menor a 25 kDa para Ca y Cmn, no mostraron actividad gelatinolítica.

En la subespecie *C. molossus molossus*, Sánchez y col. (2001) y Chen & Rael (1997) reportaron 2 metaloproteasas, una de 26 kDa y otra de 25 kDa, respectivamente. Además, (Ramírez y col., 1990) reportó el aislamiento de una proteasa y una serín proteasa tipo trombina del veneno de Cmn, y Mackessy en 2010a, basado en el peso molecular reportado en literatura para SVMP, reportó metaloproteasas de PMA de 21 y 45 kDa para *C. molossus molossus*. En este estudio Cmn se observaron al menos seis SVMP de 30, 120 y 170 kDa y dos de 200 kDa, lo que muestra diferencias en la composición de veneno comparado con la subespecie *C. molossus molossus*. Por otro lado, en la especie Ca y Cp se identificaron SVMP de 50, 75, 180 y 190 kDa, distintas a las MP de 20 y 50 kDa, reportadas anteriormente por espectrometría de masas para Cp (Mackessy, 2010a; Mackessy y col., 2018); en el caso de Ca no existen reportes previos de SVMP.

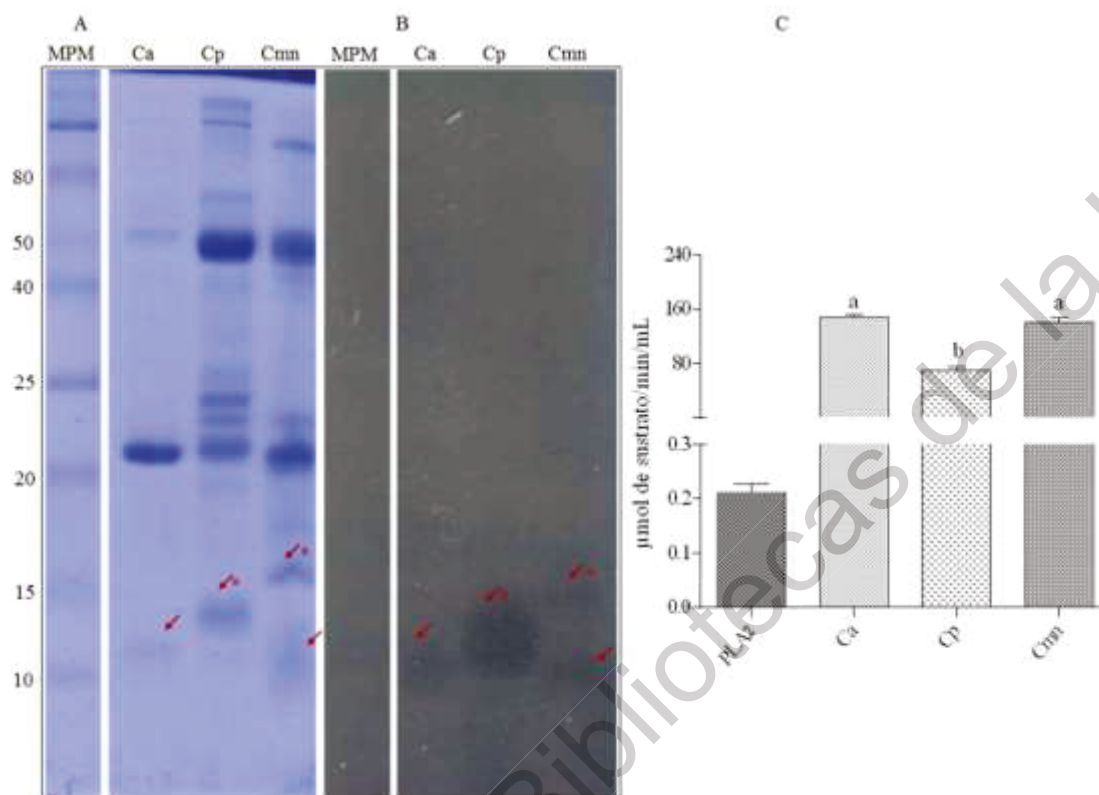
En algunos de los venenos de serpiente de cascabel, los componentes más abundantes son SVMP y SVSP (Mackessy, 2010c). En Ca, Cp y Cmn la mayoría de las proteínas de alto peso molecular detectadas corresponden a estos dos tipos de proteasas. Esto puede ser dado por la presencia de complejos proteicos que formen homodímeros o heterodímeros. Este fenómeno está reportado para SVMP de la clase P-III, los cuales son complejos formados con una unidad extra que interactúa a través de interacciones covalente y no-covalentes y exhiben mayor actividad farmacológica comparado con los componentes individuales, jugando un papel importante el efecto patofisiológico durante el envenenamiento. Este tipo de complejos está reportado también para SVPLA<sub>2</sub>, LAAO y toxinas *three-finger* (enzimas no proteicas) (Doley y Kini, 2009). La identificación de SVMP y SVSP (tipo trombina) en los venenos de serpientes es de particular interés, ya que ambas tienen efectos sinérgicos y en conjunto provocan fuertes sangrados, cuyo efecto es de difícil manejo durante el tratamiento clínico (Gutiérrez, 2010; Gutiérrez y col., 2010).

Los venenos de Cp y Ca mostraron valores altos de estos dos tipos de actividades enzimáticas, similar o incluso mayor a las actividades de este tipo para el veneno de Cmn, el cual ha sido descrito como altamente hemorrágico y hemolítico (Macias-Rodríguez y col., 2014; Meléndez-Martínez y col., 2017). Para el veneno de Cmn, al menos dos SVSP han sido reportadas como los componentes principales asociados con la letalidad determinado a través de análisis de toxicidad utilizando el veneno fraccionado (Borja y col., 2018).

#### 7.4 Zimografía y actividad enzimática de fosfolipasas A2

En el veneno de la subespecie *Crotalus molossus nigrescens* se observaron dos bandas de proteasas de 10 y 17 kDa, similares a las dos proteasas de 15.7 y 17 kDa reportadas por Ferlan y col. (1983), y de 13.7 y 13,6 kDa, reportadas por Tsai y col. (2001), analizadas por espectrometría de masas. Para Ca se encontró una SVPLA<sub>2</sub> de 14 kDa y para Cp una de 15 kDa, que están dentro del rango de peso molecular (13–18 kDa) reportado para SVPLA<sub>2</sub> (Zhou y col., 2009). En este estudio, la composición encontrada de PLA<sub>2</sub> en los venenos de Ca, y Cmn, fue diferente (Figura 10), sin embargo, los valores de actividad de SVPLA<sub>2</sub> entre Ca y Cmn fueron similares, y los más bajos en Cp, a su vez, estos valores de actividad, comparados con la fosfolipasa de abeja utilizada como control, presentaron una mayor actividad enzimática de este tipo, lo cual podría estar relacionada con el daño miotóxico sobre las fibras musculares (Oliveira y col., 2018). En el veneno de Cmn, el efecto hemolítico ha sido relacionado con la actividad de SVPLA<sub>2</sub>, las cuales se asocian con degradación de la membrana plasmática (Meléndez-Martínez y col., 2017).



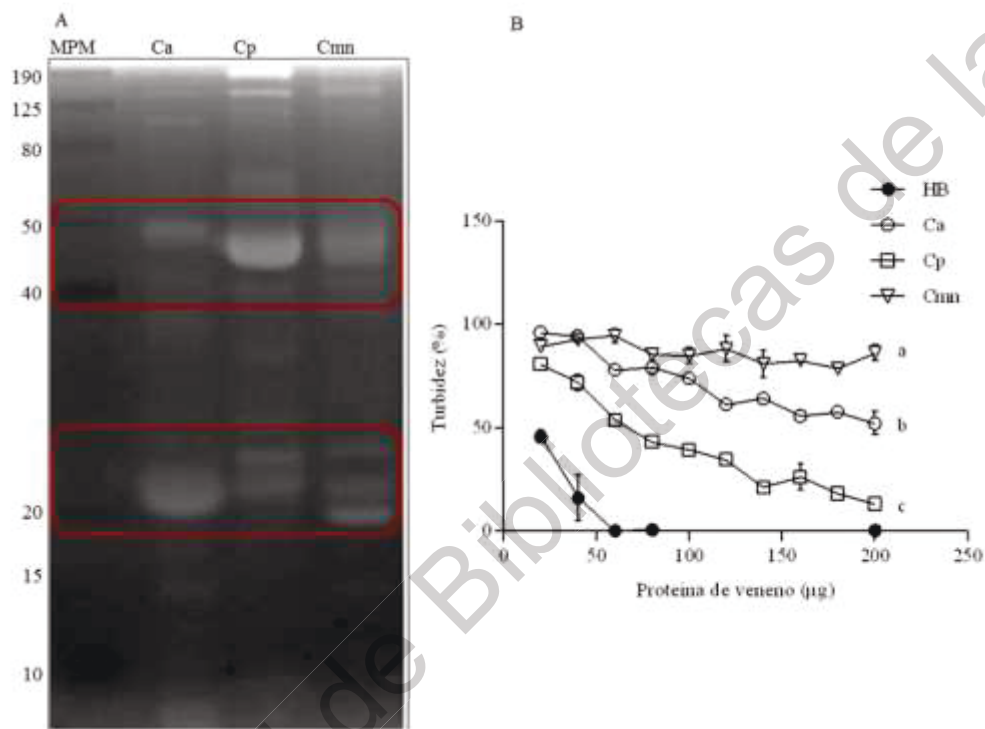


**Figura 10. Zimografía y actividad enzimática de SVPLA<sub>2</sub>.** (A) SDS-PAGE al 12%, (B) zimograma en gel al 4% agarosa co-polimerizado con yema de huevo utilizando 20 μg de proteína de veneno de *C. aquilus* (Ca), *C. polystictus* (Cp) y *C. molossus nigrescens* (Cmn). Después de la electroforesis, el gel fue incubado durante 2 horas a 37 °C. Marcadores de peso molecular (MPM) en kDa. (C) Actividad enzimática de fosfolipasa de 10 μg de veneno de abeja (BPLA<sub>2</sub>) usada como control positivo y 100 ng de venenos de Ca, Cp y Cmn. Las letras pequeñas (a, b) indican diferencia estadística (Tukey p <0.05) entre las muestras, no se comparó el control positivo. Las flechas rojas muestran bandas con actividad SVPLA<sub>2</sub>, y el asterisco rojo muestra bandas no compartidas entre los venenos.

### 7.5 Zimografía y actividad enzimática de hialuronidasas

Las hialuronidasas de los venenos (SVHA) tienen pesos moleculares en el rango de 33 a 110 kDa (Kemparaju y col., 2009). En el veneno de *C. molossus nigrescens* no se habían logrado detectar previamente (Ramírez y col., 1990) y en el veneno de Cp, han sido analizadas mediante RHPLC/MS (Mackessy y col., 2018), mientras que para Ca, no existen reportes previos de este tipo de enzimas. En este estudio, en los venenos de Ca, Cp y Cmn se observó el patrón de enzimas con actividad de hialuronidasa, con un rango de pesos

moleculares de 10 a 150 kDa (Figura 11), algunas de ellas no son compartidas entre las tres especies, sin embargo, cuando se comparan los porcentajes de turbidez del ácido hialurónico en presencia de los venenos, los valores son similares, aun cuando en cada especie, el número de proteasas de este tipo fue distinto.



**Figura 11. Actividad de SVHA.** (A) Zimografía en SDS-PAGE co-polimerizado con ácido hialurónico de 100 µg de proteína de veneno, incubada después de la electroforesis durante 2.5 horas a 37° C. Marcadores de peso molecular (MPM) en kDa. (B) Actividad enzimática de SVHA de los venenos de *C. aquilus* (Ca), *C. polystictus* (Cp) y *C. molossus nigrescens* (Cmn), utilizando concentraciones de 20 a 200 µg de proteína de veneno. En el ensayo de turbidez se usó como control positivo la hialuronidasa de testículos bovinos (BHA). Los rectángulos rojos indican variabilidad entre las hialuronidasas de los venenos. Las letras pequeñas muestran diferencias estadísticas entre las muestras (Tukey  $p < 0.05$ ), sin comparación contra el control positivo.

En cuanto a los valores de actividad enzimática, el veneno de Cp presentó la mayor actividad de SVHA (menor porcentaje de turbidez), seguido por los venenos de Ca y Cmn. Estas actividades fueron menores que la actividad de la hialuronidasa de testículos bovinos, usada como control positivo. Las hialuronidasas de venenos de serpiente son usualmente conocidas como factores de dispersión del veneno, ya que degradan el ácido hialurónico de

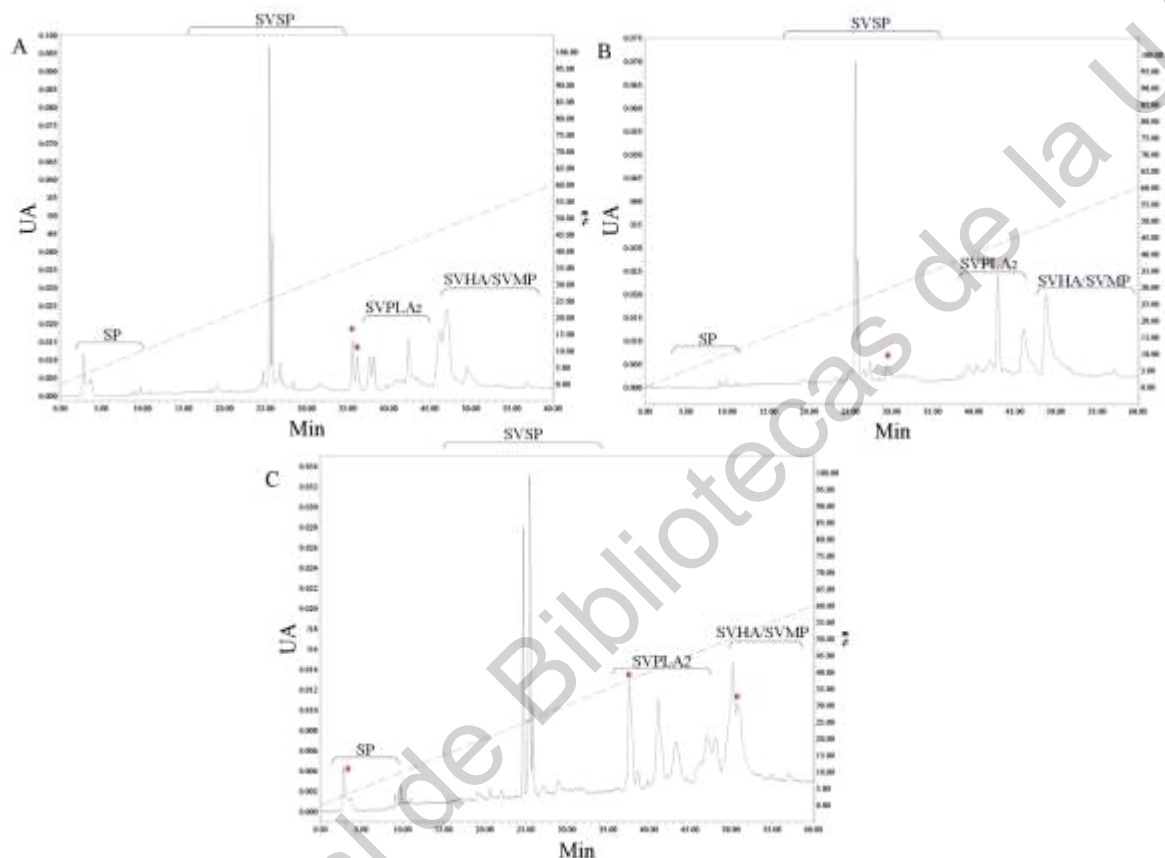
la matriz extracelular, lo cual puede potenciar indirectamente la inducción de hemorragias junto con MP y el daño miotóxico de SVPLA<sub>2</sub>, favoreciendo un efecto sinérgico sobre el efecto necrótico a nivel de la mordedura, sin embargo, hasta ahora se les ha dado poca importancia y existen pocos estudios sobre su caracterización (Girish y col., 2004; Kemparaju y col., 2009). En los venenos analizados de Ca, Cp y Cmn, las hialuronidasas se encuentran presentes en un elevado número de formas, las cuales no habían sido reportadas anteriormente en estas especies. Éstas y otras de las proteasas analizadas presentaron PMA distintos a los rangos de peso molecular usualmente reportados y representan proteasas de interés para una posterior caracterización individual

#### 7.6 RP-HPLC

El fraccionamiento de los venenos de las tres especies por RP-HPLC (Figura 12) mostró perfiles de elución similares, sin embargo, las concentraciones entre ellos fueron diferentes.

Se encontraron abundantes picos (10) entre 40 y 55 min, donde se determinaron tiempos de elución para proteínas como las fosfolipasas A<sub>2</sub> (35-45 min) (Marangoni y col., 2013), metaloproteasas y hialuronidasas ( $\geq 50$  min) (Menaldo y col., 2012). Los picos que aparecieron a los 20 y 30 min fueron menos abundantes (6), esos picos presentaron tiempos de elución similares a los reportados previamente para algunas serín proteasas (Lomonte y Calvete, 2017). El último grupo de componentes, probablemente péptidos pequeños, se eluyó entre 5 y 10 min. El veneno de Ca presentó dos picos a los 36 min, ausente en los venenos de Cp y Cmn, mientras que el veneno de Cmn mostró dos picos a los 50 y 51 min no compartidos con las dos especies restantes. A los 5 min, las fracciones más hidrófilas eluyeron en los venenos de Ca y Cmn. El veneno de Cmn mostró mayor variabilidad en picos eluidos entre los 25, 47 y 50 min, seguidos de los venenos de Ca y Cp con un número menor de fracciones. Los tiempos de retención de elución son consistentes con los datos obtenidos para las fosfolipasas A<sub>2</sub>, serín proteasas y péptidos pequeños (detectados por zimografía y ensayos enzimáticos), y podrían indicar su presencia, sin embargo, los tiempos de retención para las metaloproteasas y las hialuronidasas no correspondieron con los tiempos de retención informados. Para otros venenos, sin embargo,

la identificación mediante análisis enzimáticos o el análisis MALDI-TOF-MS-MS es necesaria, aunque las fracciones no se detectaron después de 60 min.



**Figura 12. Fraccionamiento de los venenos por RP-HPLC.** Pools de los venenos de A) *C. aquilus* (Ca); B) *C. polystictus* (Cp) y C) *C. molossus nigrescens* (Cmn). Las flechas rojas muestran picos no compartidos entre los venenos. Picos correspondientes a SVSP (serín proteasas de veneno de serpiente), SVPLA<sub>2</sub> (fosfolipasas de veneno de serpiente), SVMMP (metaloproteasas de veneno de serpiente) y SVHA (hialuronidasas del veneno de serpiente) determinados con base a los tiempos de elución reportados en la literatura, son indicados. Unidades de absorbancia (UA) a 280 nm.

### 7.7 MALDI-TOF-MS

En Cmn está reportada una miotoxina (familia de proteínas pequeñas no enzimáticas de aproximadamente 4,8 kDa determinada por SDS-PAGE) tipo crotamina de 10 kDa que produce un efecto de parálisis espástica en las extremidades posteriores de ratones y necrosis en las células musculares, además de siete isoformas de miotoxinas tipo crotamina,

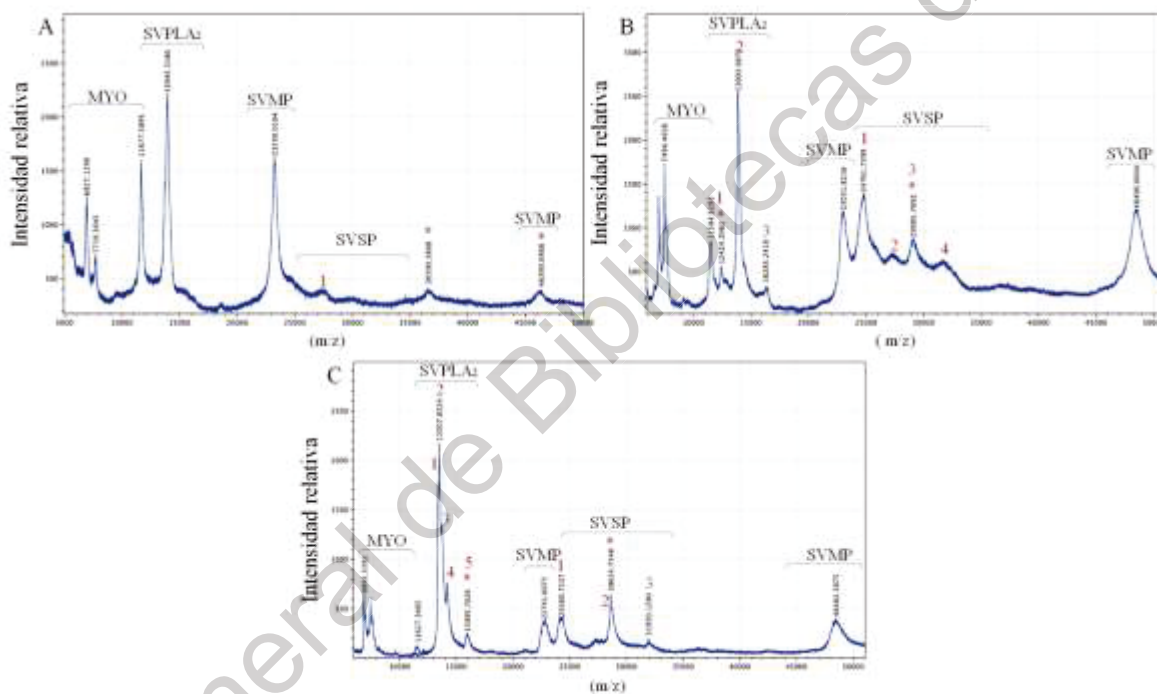
con pesos moleculares entre 4.9 y 5.1 kDa determinadas por espectrometría de masas ESI-MS (Borja y col., 2018). En la Figura 13 muestra el análisis mediante espectrometría MALDI-TOF, donde todos los venenos analizados mostraron moléculas de peso molecular bajo (6, 7 kDa y 11 kDa), que podría indicar la presencia de miotoxinas tipo crotamina.

Para el veneno de Cmn, se han reportado cuatro SVPLA<sub>2</sub> con pesos moleculares entre 13.6 y 17 kDa (Ferlan y col., 1983; Meléndez-Martínez y col., 2017). En este estudio se encontraron cinco picos entre 13 y 16 kDa para el veneno de Cmn y un pico de 13.9 kDa para el veneno de Ca. En el caso del veneno de Cp, se ha reportado una SVPLA<sub>2</sub> de 13.9 kDa (Mackessy y col., 2018), mientras que en los resultados obtenidos se observan dos picos de 12.4 y 16.2 kDa. Los picos de los tres venenos estaban en el rango de pesos moleculares de SVPLA<sub>2</sub> (Zhou y col., 2009) y son consistentes con los informes anteriores de SVPLA<sub>2</sub>, mostrando la mayor intensidad para los venenos de Cp y Cmn.

En el caso de las SVMP, se ha reportado una proteasa de peso molecular de 22.6 kDa para el veneno de Cmn (Borja y col., 2018); en este trabajo se observó un pico de 22.7 kDa para Cmn, posiblemente la misma enzima y para los venenos de Ca y Cp se encontraron picos de 23.2 y 23 kDa. Además, se observaron picos de 46.3 kDa para el veneno de Ca y 48 kDa para los venenos de Cp y Cmn, estos pesos moleculares son consistentes con los pesos moleculares reportados para SVMP en venenos de Cmn y Cp (Borja y col., 2018; Mackessy y col., 2018).

Las SVSP se han reportado entre 24-30 kDa para el veneno de Cp (Borja y col., 2018), en este trabajo se determinó un pico de 27 kDa para el veneno de Ca, cinco picos entre 24 y 32 kDa para el veneno Cp y cuatro picos entre 24 y 31 kDa para el veneno de Cmn, todos ellos en el rango de peso molecular para el SVSP (Serrano, 2013), los cuales fueron los picos más abundantes para los venenos de Cp y Cmn. Para el veneno de Cmn, al menos dos SVSP han sido reportados como los principales compuestos asociados con la letalidad del veneno, basados en análisis de toxicidad del veneno fraccionado, además de la presencia de proteínas y péptidos inferiores a 20 kDa con bajo o nulo reconocimiento por parte de dos antivenenos (Borja y col., 2018). Estos componentes podrían jugar un papel similar en los

venenos de Ca y Cp ya que todos los venenos mostraron perfiles de proteínas y péptidos con similitudes en algunos picos de SVSP y péptidos en pesos moleculares similares a miotóxicas tipo crotamina, observados por zimografía, R-HPLC y espectrometría de masas, sin embargo, también se observaron picos diferenciales entre los tres venenos, 36.5 kDa (SVSP) y 46.3 kDa (SVMP) para el veneno de Ca; 12.4 (SVPLA<sub>2</sub>) y 29 kDa para el veneno de Cp (SVSP) y 28.6 kDa (SVSP) para el veneno de Cmn. El veneno de Cp mostró mayor abundancia de picos, seguido de los venenos de Cmn y Ca.



**Figura 13. Análisis por MALDI-TOF-MS de los venenos de serpientes.** 100 µg de los pools de venenos de A) *C. aquilus* (Ca); B) *C. polystictus* (Cp) y C) *C. molossus nigrescens* (Cmn) fueron usados. Los asteriscos rojos indican picos no compartidos entre los venenos. MYO (Miotoxinas), SVSP (serín proteasas de veneno de serpiente), SVPLA<sub>2</sub> (fosfolipasas de veneno de serpiente), SVMP (metaloproteasas de veneno de serpiente). El número de picos para SVPLA<sub>2</sub> y SVSP está indicado en la figura.

El veneno de Ca mostró la mayor actividad SVMP con un mayor número alto de bandas de peso molecular. El veneno de Cp mostró un mayor contenido de bandas de SVSP, así como la mayor actividad de SVHA. El veneno de Cmn presentó un valor de actividad similar para las SVSP (tipo elastasa), comparado con Ca y Cp, y sólo una mayor actividad de SVPLA<sub>2</sub>

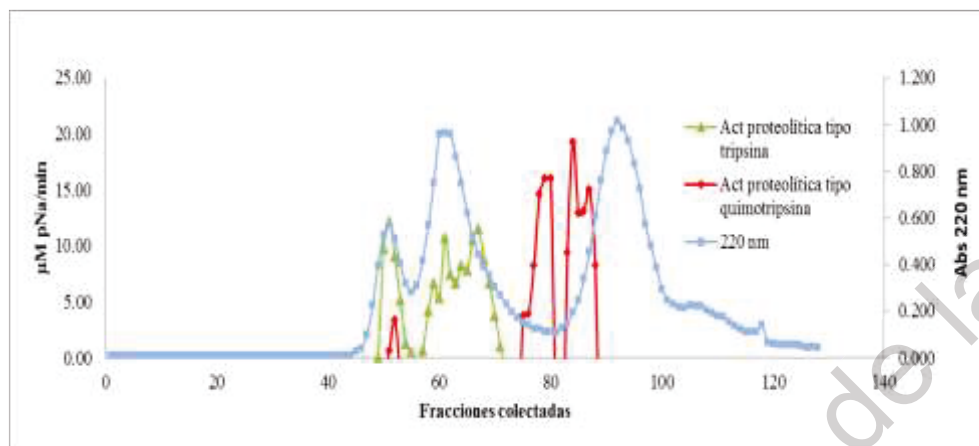


que el veneno de Cp, pero con bandas de SVMP de bajo peso molecular menos abundantes. La actividad enzimática SVPLA<sub>2</sub> fue alta en todos los venenos. El veneno de Cmn es altamente hemorrágico y hemotóxico (Macias-Rodríguez y col., 2014; Meléndez-Martínez y col., 2017), y ya que estas actividades se relacionan mayoritariamente con la actividad de SVMP, SVSP y SVPLA<sub>2</sub> (Gutiérrez y col., 2010; Meléndez-Martínez y col., 2017), se esperaba que estas actividades enzimáticas fueran más altas en esta especie, sin embargo, únicamente presento mayor actividad de SVPLA<sub>2</sub> que Cp, mientras que las actividades de SVMP y SVSP (tipo tripsina y quimotripsina), fueron menores que las presentadas en los venenos de Ca y Cp. Estas actividades sugieren que los venenos de Ca y Cp podrían tener los mismos efectos hemorrágicos y hemotóxicos altos que se han reportado para Cmn.

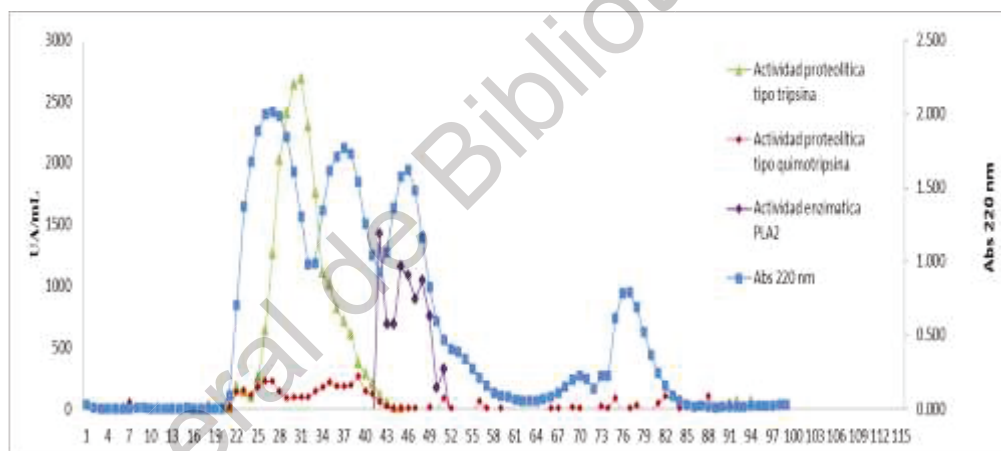
#### 7.8 Purificación parcial del veneno de serpiente

Los venenos de Ca y Cmn fueron fraccionados mediante filtración en gel, separando muestras con actividad de serín proteasas tipo tripsina y quimotripsina y con actividad de SVPLA<sub>2</sub> (Figuras 14 y 15). La actividad de hialuronidasa no se logró detectar, sin embargo, ambos venenos presentan este tipo de actividad en zimografía. El análisis por filtración en gel permitió la separación entre serín proteasas tipo tripsina y quimotripsina así como, SVPLA<sub>2</sub>, por lo que fue posible la detección de un número mayor de picos mediante RP-HPLC en comparación con muestras de veneno sin fraccionamiento previo, analizadas por el método anterior. Las muestras separadas por filtración en gel se utilizarán para análisis siguientes de toxicología y obtención de secuencias por MALDI-TOF-MS-MS.





**Figura 14. Veneno de *C. aquilus* fraccionado por filtración en gel G75.** Treinta mg cargados de proteína de veneno utilizada. P1, P2, P3, P4, P5 y P6 indican los rangos de las fracciones colectadas.



**Figura 15. Veneno de *C. molossus nigrescens* fraccionado por filtración en gel G75.** Treinta mg de proteína de veneno usados. P1, P2, P3, P4, P5 y P6 indican los rangos de las fracciones colectadas.

## 8. CONCLUSIONES

El análisis de los venenos de las tres especies de *Crotalus*: *Crotalus aquilus* (Ca), *Crotalus polystictus* (Cp) y *Crotalus molossus nigrescens* (Cmn) muestra que estos son principalmente hemotóxicos ya que presentan los principales grupos de familias de enzimas que generalmente se encuentran en el veneno de la familia *Viperidae*: metaloproteasas, serín proteasas, fosfolipasas A<sub>2</sub> y hialuronidasas. Se encontraron diferencias entre especies para el número y la concentración de las enzimas estudiadas, patrones diferenciales en los distintos rangos de peso molecular y diferencias en sus actividades enzimáticas. Algunas de las proteasas encontradas presentaron altos pesos moleculares no reportados previamente, que podrían estar relacionadas con la formación de oligómeros de enzimas, sin embargo las pruebas que validen su presencia son necesarias.

El veneno de Cmn se ha reportado como altamente hemorrágico y hemotóxico. Debido a que las actividades enzimáticas, así como los resultados de zimografías, RP-HPLC y espectrometría de masas, mostraron patrones similares entre los venenos, se sugiere que los venenos de Ca y Cp podrían tener un efecto similar al del veneno de Cmn. En el caso del veneno de Cmn, las serín proteasas son un componente directamente asociado con su letalidad, además de presentar miotóxicas tipo crotamina, no reconocidas por algunos antivenenos, estos péptidos y enzimas podrían estar presentes en los venenos de Ca y Cp.

Finalmente, la presencia de una amplia gama de enzimas hidrolíticas en los venenos estudiados puede jugar un papel importante en su efecto tóxico. El conocimiento de la variabilidad del veneno podría ser útil para desarrollar estrategias más efectivas en la terapia antiveneno además, las proteasas en sí, tienen un potencial importante para su posible aplicación biotecnológica. En estudios posteriores, utilizando las fracciones de los venenos de Ca y Cmn, se determinará la secuencia peptídica de las enzimas principales para cada veneno de serpiente con el fin de tener un mejor conocimiento sobre ellos y el posible desarrollo de antídotos terapéuticos, así como sus posibles aplicaciones biotecnológicas.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adukauskiene, D., Varanauskienė, E., Adukauskaitė, A., 2011. Venomous snakebites. *Medicina (Kaunas)*. 47, 461–7.
- Anai, K., Sugiki, M., Yoshida, E., Maruyama, M., 2002. Neutralization of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection of *Bothrops jararaca* venom in rats. *Toxicon* 40, 63–8. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00189-1](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00189-1)
- Angulo, Y., Lomonte, B., 2009. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* 54, 949–957. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.12.014>
- Baramova, E.N., Shannon, J.D., Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 1989. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. *Arch. Biochem. Biophys.* 275, 63–71. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(89\)90350-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(89)90350-0)
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D., 1995. Families and clans of serine peptidases. *Arch. Biochem. Biophys.* 318, 247–250. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1227>
- Bieber, A.L., 1979. Metal and Nonprotein Constituents in Snake Venoms. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 295–306. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-66913-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-642-66913-2_9)
- Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 1994. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol. Ther.* [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(94\)90049-3](https://doi.org/10.1016/0163-7258(94)90049-3)
- Borja, M., Neri-Castro, E., Pérez-Morales, R., Strickland, J., Ponce-López, R., Parkinson, C., Espinosa-Fematt, J., Sáenz-Mata, J., Flores-Martínez, E., Alagón, A., Castañeda-Gaytán, G., 2018. Ontogenetic Change in the Venom of Mexican Black-Tailed Rattlesnakes (*Crotalus molossus nigrescens*). *Toxins (Basel)*. 10, 501. <https://doi.org/10.3390/toxins10120501>
- Boyer, L. V., Seifert, S.A., Clark, R.F., McNally, J.T., Williams, S.R., Nordt, S.P., Walter, F.G., Dart, R.C., 1999. Recurrent and persistent coagulopathy following pit viper envenomation. *Arch. Intern. Med.* 159, 706–710. <https://doi.org/10.1001/archinte.159.7.706>
- Bradford, M.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, 248–54.
- Braud, S., Bon, C., Wisner, A., 2000. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie*. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)01178-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01178-0)
- Burke, J.E., Dennis, E.A., 2009. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J. Lipid Res.* 50, S237. <https://doi.org/10.1194/JLR.R800033-JLR200>
- Calvete, J.J., 2011. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. *Expert Rev. Proteomics*. <https://doi.org/10.1586/epr.11.61>
- Campbell, J.A., Lamar, W.W., 2004a. The venomous reptiles of the Western Hemisphere.

Comstock Pub. Associates.

- Campbell, J.A., Lamar, W.W., 1989. The Venomous Reptiles of Latin America . Q. Rev. Biol. 65, 516–517. <https://doi.org/10.1086/417006>
- Campbell, J.A., Lamar, W.W. coaut., 2004b. The venomous reptiles of the western hemisphere. Comstock books Herpetol.
- Campos, J.E., Martinez-Gallardo, Norma Mendiola-Olaya, E., Blanco-Labra, A., 1997. Purification and partial characterization of a proteinase inhibitor from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) seeds. J. Food Biochem. 21, 203–218. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1997.tb00215.x>
- Castro, E.N., Lomonte, B., del Carmen Gutiérrez, M., Alagón, A., Gutiérrez, J.M., 2013. Intraspecies variation in the venom of the rattlesnake *Crotalus simus* from Mexico: Different expression of crotoxin results in highly variable toxicity in the venoms of three subspecies. J. Proteomics 87, 103–121. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.024>
- Castro, H.C., Zingali, R.B., Albuquerque, M.G., Pujol-Luz, M., Rodrigues, C.R., 2004. Snake venom thrombin-like enzymes: From reptilase to now. Cell. Mol. Life Sci. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3325-z>
- Chen, T., Rael, E.D., 1997. Purification of M5, a fibrinolytic proteinase from *Crotalus molossus molossus* venom that attacks complement. Int. J. Biochem. Cell Biol. 29, 789–799. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(96\)00139-2](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(96)00139-2)
- Chippaux, J.P., 1998. Snake-bites: Appraisal of the global situation. Bull. World Health Organ. <https://doi.org/10.1086/505866>
- Chippaux, J.P., Williams, V., White, J., 1991. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. Toxicon 29, 1279–303.
- Clemetson, K.J., Morita, T., Manjunatha Kini, R., 2009. Scientific and standardization committee communications: Classification and nomenclature of snake venom C-type lectins and related proteins, in: Journal of Thrombosis and Haemostasis. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), p. 360. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03233.x>
- Di Ferrante, N., 1956. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. J. Biol. Chem. 220, 303–306.
- Doley, R., Kini, R.M., 2009. Protein complexes in snake venom. Cell. Mol. Life Sci. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0050-2>
- El-Safory, N.S., Fazary, A.E., Lee, C.-K., 2010. Hyaluronidases, a group of glycosidases: Current and future perspectives. Carbohydr. Polym. 81, 165–181. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2010.02.047>
- Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch. Biochem. Biophys. 95, 271–278. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(61\)90145-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90145-X)

- Ferlan, I., Ferlan, A., Capel, M.S., Russell, F.E., 1983. Isolation and characterization of two phospholipases from *Crotalus molossus molossus* venom. *Toxicon* 21, 129–132. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(83\)90172-1](https://doi.org/10.1016/0041-0101(83)90172-1)
- Fox, J.W., Serrano, S.M.T., 2008. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS J.* <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06466.x>
- Fox, J.W., Serrano, S.M.T., 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 45, 969–985. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2005.02.012>
- French, W.J., Hayes, W.K., Bush, S.P., Cardwell, M.D., Bader, J.O., Rael, E.D., 2004. Mojave toxin in venom of *Crotalus helleri* (Southern Pacific Rattlesnake): molecular and geographic characterization. *Toxicon* 44, 781–791. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.08.008>
- Fry, B.G., 2018. Snakebite: When the Human Touch Becomes a Bad Touch. *Toxins (Basel)*. 10, 170. <https://doi.org/10.3390/toxins10040170>
- Girish, K.S., Shashidharamurthy, R., Nagaraju, S., Gowda, T.V., Kemparaju, K., 2004. Isolation and characterization of hyaluronidase a “spreading factor” from Indian cobra (*Naja naja*) venom. *Biochimie* 86, 193–202. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2004.02.004>
- Guntenhöner, M.W., Pogrel, M.A., Stern, R., 1992. A substrate-gel assay for hyaluronidase activity. *Matrix* 12, 388–396. [https://doi.org/10.1016/S0934-8832\(11\)80035-1](https://doi.org/10.1016/S0934-8832(11)80035-1)
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2013. Phospholipases A2: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon* 62, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.006>
- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., Díaz, C., 2005. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: Biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 45, 997–1011. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.029>
- Gutiérrez, J.M., Sanz, L., Escolano, J., Fernández, J., Lomonte, B., Angulo, Y., Rucavado, A., Warrell, D.A., Calvete, J.J., 2008. Snake venomomics of the lesser antillean pit vipers *Bothrops caribbaeus* and *Bothrops lanceolatus*: Correlation with toxicological activities and immunoreactivity of a heterologous antivenom. *J. Proteome Res.* 7, 4396–4408. <https://doi.org/10.1021/pr8003826>
- Gutiérrez, J.M., Theakston, R.D.G., Warrell, D.A., 2006. Confronting the Neglected Problem of Snake Bite Envenoming: The Need for a Global Partnership. *PLoS Med.* 3, e150. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030150>
- Gutiérrez, M.J., 2010. Snakebite Envenomation in Central America, in: *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. CRC Press, pp. 491–507. <https://doi.org/10.1201/9781420008661.ch24>



- Gutiérrez, M.J., Rucavado, A., Escalante, T., 2010. Snake Venom Metalloproteinases, in: *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. CRC Press, pp. 115–138.
- Itoh, N., Tanaka, N., Mihashi, S., Yamashina, I., 1987. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. *J. Biol. Chem.* 262, 3132–5.
- Kamiguti, A.S., Hay, C.R.M., Theakston, R.D.G., Zuzel, M., 1996. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon* 34, 627–642. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(96\)00017-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(96)00017-7)
- Kang, T.S., Georgieva, D., Genov, N., Murakami, M.T., Sinha, M., Kumar, R.P., Kaur, P., Kumar, S., Dey, S., Sharma, S., Vrieling, A., Betzel, C., Takeda, S., Arni, R.K., Singh, T.P., Kini, R.M., 2011. Enzymatic toxins from snake venom: Structural characterization and mechanism of catalysis. *FEBS J.* <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08115.x>
- Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A.R., De Silva, N., Gunawardena, N.K., Pathmeswaran, A., Premaratna, R., Savioli, L., Lalloo, D.G., De Silva, H.J., 2008. The global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med.* <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050218>
- Kemparaju, K., Girish, K.S., Nagaraju, S., 2009. Hyaluronidases, a Neglected Class of Glycosidases from Snake Venom, in: *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. CRC Press, pp. 237–258. <https://doi.org/10.1201/9781420008661.ch11>
- Khan, A.R., James, M.N.G., 1998. Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci.* 7, 815–836. <https://doi.org/10.1002/pro.5560070401>
- Kini, R.M., Koh, C.Y., 2016. Metalloproteases affecting blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation from snake venoms: Definition and nomenclature of interaction sites. *Toxins (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/toxins8100284>
- Koh, D.C.I., Armugam, A., Jeyaseelan, K., 2006. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 3030–3041. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6315-0>
- Krogdahl, A., Holm, H., 1983. Pancreatic proteinases from man, trout, rat, pig, cow, chicken, mink and fox. Enzyme activities and inhibition by soybean and lima bean proteinase inhibitors. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 74, 403–9.
- León, G., Valverde, J.M., Rojas, G., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., 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. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00152-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00152-X)
- Lomonte, B., Calvete, J.J., 2017. Strategies in ‘snake venomomics’ aiming at an integrative view of compositional, functional, and immunological characteristics of venoms. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 23, 26. <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0117-8>

- Macías-Rodríguez, E.F., Martínez-Martínez, A., Gatica-Colima, A., Bojórquez-Rangel, G., Plenge-Tellechea, L.F., 2014. Análisis comparativo de la actividad hemolítica entre las subespecies *Crotalus molossus* y *Crotalus molossus nigrescens*. *Rev. Bio Ciencias* 2, 302–312. [https://doi.org/10.15741/REV\\_BIO\\_CIENCIAS.V2I4.85](https://doi.org/10.15741/REV_BIO_CIENCIAS.V2I4.85)
- Mackessy, S.P., 2010a. The Field of Reptile Toxinology, Snakes, Lizards, and Their Venom. *Handb. Venoms Toxins Reptil.* 3–23. <https://doi.org/10.1201/9781420008661.sec1>
- Mackessy, S.P., 2010b. *Handbook of venoms and toxins of reptiles*. CRC Press/Taylor & Francis.
- Mackessy, S.P., 2010c. Thrombin-like enzymes in snake venoms, in: *Toxins and Hemostasis: From Bench to Bedside*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 519–557. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-9295-3\\_30](https://doi.org/10.1007/978-90-481-9295-3_30)
- Mackessy, S.P., Leroy, J., Mociño-Deloya, E., Setser, K., Bryson, R.W., Saviola, A.J., 2018. Venom ontogeny in the mexican lance-headed rattlesnake (*Crotalus polystictus*). *Toxins (Basel)*. 10, 271. <https://doi.org/10.3390/toxins10070271>
- Marangoni, F.A., Ponce-Soto, L.A., Marangoni, S., Landucci, E.C.T., 2013. Unmasking snake venom of *Bothrops leucurus*: purification and pharmacological and structural characterization of new PLA2 Bleu TX-III. *Biomed Res. Int.* 2013, 941467. <https://doi.org/10.1155/2013/941467>
- Markland, F.S., 1997. Snake Venoms. *Drugs* 54, 1–10. <https://doi.org/10.2165/00003495-199700543-00003>
- Marsh, N., Williams, V., 2005. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon* 45, 1171–1181. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.016>
- Maruñak, S.L., Ruíz de Torrent, R.M., Teibler, G.P., Gay, C.C., Leiva, L., Acosta De Pérez, O., 2005. Acción del veneno de *Bothrops jararacussu* de Argentina sobre la coagulación sanguínea, *InVet. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias*.
- Matsui, T., Fujimura, Y., Titani, K., 2000. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 146–56.
- McCranie, J.R., 1976. *Crotalus polystictus*. *Soc. study Amphib. Reptil.* 180, 1–2.
- Meléndez-Martínez, D., Macías-Rodríguez, E., Vázquez-Briones, R., López-Vera, E., Cruz-Pérez, M.S., Vargas-Caraveo, A., Gatica-Colima, A., Plenge-Tellechea, L.F., 2017. In vitro hemotoxic,  $\alpha$ -neurotoxic and vasculotoxic effects of the Mexican black-tailed rattlesnake (*Crotalus molossus nigrescens*) venom. *J Venom Res J. Venom Res.* 8, 1–8.
- Menaldo, D.L., Bernardes, C.P., Santos-Filho, N.A., Moura, L. de A., Fuly, A.L., Arantes, E.C., Sampaio, S.V., 2012. Biochemical characterization and comparative analysis of two distinct serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom. *Biochimie* 94, 2545–2558. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.07.007>



- Miyagui, C., Brando Prieto da Silva, Ivano R. de, Santana, G., 2013. Serine proteases — Cloning, Expression and Potential Applications, in: An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications. InTech. <https://doi.org/10.5772/53063>
- Moss, D.W., 1970. Accuracy, precision, and quality control of enzyme Assays. *J. Clin. Pathol.* S1-4, 22–30. <https://doi.org/10.1136/jcp.s1-4.1.22>
- Ohlsson, B.G., Weström, B.R., Karlsson, B.W., 1986. Enzymoblotting: A method for localizing proteinases and their zymogens using para-nitroanilide substrates after agarose gel electrophoresis and transfer to nitrocellulose. *Anal. Biochem.* 152, 239–244. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90404-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90404-5)
- Oliveira, A., Bleicher, L., Schrago, C.G., Silva Junior, F.P., 2018. Conservation analysis and decomposition of residue correlation networks in the phospholipase A2 superfamily (PLA2s): Insights into the structure-function relationships of snake venom toxins. *Toxicon* 146, 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.03.013>
- Parry, M.A., Jacob, U., Huber, R., Wisner, A., Bon, C., Bode, W., 1998. The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. *Structure* 6, 1195–206.
- Peterson, M.E., 2006. Snake Bite: Pit Vipers. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 21, 174–182. <https://doi.org/10.1053/j.ctsap.2006.10.008>
- Pirkle, H., 1998. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. Scientific and Standardization Committee's Registry of Exogenous Hemostatic Factors. *Thromb. Haemost.* 79, 675–83.
- Ponce-Soto, L.A., Bonfim, V.L., Novello, J.C., Navarro Oviedo, R., Yarlequé Chocas, A., Marangoni, S., 2007. Isolation and characterization of a serine protease, Ba III-4, from Peruvian *Bothrops atrox* venom. *Protein J.* 26, 387–394. <https://doi.org/10.1007/s10930-007-9078-z>
- Portes, J.J.A., Yamanouye, N., Carneiro, S.M., Knittel, P.S., Santanna, S.S., Nogueira, F.C.S., Junqueira, M., Magalhaes, G.S., Domont, G.B., Moura-Da-Silva, A.M., 2014. Unraveling the processing and activation of snake venom metalloproteinases. *J. Proteome Res.* 13, 3338–3348. <https://doi.org/10.1021/pr500185a>
- Ramírez, G.A., Fletcher, P.L., Possani, L.D., 1990. Characterization of the venom from *Crotalus molossus nigrescens* Gloyd (black tail rattlesnake): Isolation of two proteases. *Toxicon* 28, 285–297. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(90\)90064-E](https://doi.org/10.1016/0041-0101(90)90064-E)
- Ramos, O.H.P., Selistre-de-Araujo, H.S., 2006. Snake venom metalloproteases — structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 142, 328–346. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2005.11.005>
- Rawlings, N.D., Salvesen, G., 2012. Handbook of proteolytic enzymes, 3rd ed. Academic Press, Cambridge, Massachusetts. <https://doi.org/10.1016/C2009-1-60990-4>

- Rice, K., Peralta, R., Bast, D., De Azavedo, J., McGavin, M.J., 2001. Description of staphylococcus serine protease (ssp) operon in *Staphylococcus aureus* and nonpolar inactivation of sspA-encoded serine protease. *Infect. Immun.* 69, 159–169. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.159-169.2001>
- Rivas, E., Neri-Castro, E., Bénard-Valle, M., Hernández-Dávila, A.I., Zamudio, F., Alagón, A., 2017. General characterization of the venoms from two species of rattlesnakes and an intergrade population (*C. lepidus* x *aquilus*) from Aguascalientes and Zacatecas, Mexico. *Toxicon* 138, 191–195. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.09.002>
- Rossignol, G., Merieau, A., Guerillon, J., Veron, W., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., 2008. Involvement of a phospholipase C in the hemolytic activity of a clinical strain of *Pseudomonas fluorescens*. *BMC Microbiol.* 8, 189. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-189>
- Roy, K., Dey, S., Uddin, M.K., Barua, R., Hossain, M.T., 2018. Extracellular Pectinase from a Novel Bacterium *Chryseobacterium indologenes* Strain SD and Its Application in Fruit Juice Clarification. *Enzyme Res.* 2018, 3859752. <https://doi.org/10.1155/2018/3859752>
- Safran, R., Nosil, P., 2012. Genomic islands of speciation in *Anopheles gambiae*. *PLoS Biol.* 3, 1572–1578. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030285>
- Sánchez, E.E., Soliz, L.A., Ramírez, M.S., Pérez, J.C., 2001. Partial characterization of a basic protein from *Crotalus molossus molossus* (northern blacktail rattlesnake) venom and production of a monoclonal antibody. *Toxicon* 39, 523–537. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00165-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00165-3)
- Sanchez, E.F., Flores-Ortiz, R.J., Alvarenga, V.G., Eble, J.A., 2017. Direct fibrinolytic snake venom metalloproteinases affecting hemostasis: Structural, biochemical features and therapeutic potential. *Toxins (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/toxins9120392>
- Saravia, P., Rojas, E., Arce, V., Guevara, C., López, J.C., Chaves, E., Velásquez, R., Rojas, G., Gutiérrez, J.M., 2002. Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: pathophysiological and therapeutic implications. *Rev. Biol. Trop.* 50, 337–46.
- Sartim, M.A., Cezarette, G.N., Jacob-Ferreira, A.L., Frantz, F.G., Faccioli, L.H., Sampaio, S. V., 2017. Disseminated intravascular coagulation caused by moojenactivase, a procoagulant snake venom metalloprotease. *Int. J. Biol. Macromol.* 103, 1077–1086. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.146>
- Serrano, S.M.T., 2013. The long road of research on snake venom serine proteinases. *Toxicon*. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.003>
- Serrano, S.M.T., Maroun, R.C., 2005. Snake venom serine proteinases: Sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.020>
- Serrano, S.M.T., Shannon, J.D., Wang, D., Camargo, A.C.M., Fox, J.W., 2005. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis:

- An approach to understanding venom proteomics. *Proteomics* 5, 501–510. <https://doi.org/10.1002/pmic.200400931>
- Stocker, K., Fischer, H., Meier, J., 1982. Thrombin-like snake venom proteinases. *Toxicon* 20, 265–73.
- Stöcker, W., Grams, F., Reinemer, P., Bode, W., Baumann, U., Gomis-Rüth, F. -X, Mckay, D.B., 1995. The metzincins — Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a super family of zinc-peptidases. *Protein Sci.* <https://doi.org/10.1002/pro.5560040502>
- Stubbs, M.T., Bode, W., 1993. A player of many parts: The spotlight falls on thrombin's structure. *Thromb. Res.* 69, 1–58. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(93\)90002-6](https://doi.org/10.1016/0049-3848(93)90002-6)
- Takeda, S., Takeya, H., Iwanaga, S., 2012. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.04.009>
- Trape, J.F., Pison, G., Guyavarch, E., Mane, Y., 2001. High mortality from snakebite in south-eastern Senegal. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95, 420–423. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(01\)90202-0](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(01)90202-0)
- Tsai, I.H., Chen, Y.H., Wang, Y.M., Tu, M.C., Tu, A.T., 2001. Purification, sequencing, and phylogenetic analyses of novel Lys-49 phospholipases A2 from the venoms of rattlesnakes and other pit vipers. *Arch. Biochem. Biophys.* 394, 236–244. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2524>
- Vidal, N., 2002. COLUBROID SYSTEMATICS: EVIDENCE FOR AN EARLY APPEARANCE OF THE VENOM APPARATUS FOLLOWED BY EXTENSIVE EVOLUTIONARY TINKERING. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 21, 21–41. <https://doi.org/10.1081/TXR-120004740>
- Vinokurov, K.S., Oppert, B., Elpidina, E.N., 2005. Notes & Tips An overlay technique for postelectrophoretic analysis of proteinase spectra in complex mixtures using p-nitroanilide substrates. *Anal. Biochem.* 337, 164–166. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.10.043>
- Vonk, F.J., Admiraal, J.F., Jackson, K., Reshef, R., de Bakker, M.A.G., Vanderschoot, K., van den Berge, I., van Atten, M., Burgerhout, E., Beck, A., Mirtschin, P.J., Kochva, E., Witte, F., Fry, B.G., Woods, A.E., Richardson, M.K., 2008. Evolutionary origin and development of snake fangs. *Nature* 454, 630–633. <https://doi.org/10.1038/nature07178>
- Wagner, O.F., Bergmann, I., Binder, B.R., 1985. Chromogenic substrate autography: A method for detection, characterization, and quantitative measurement of serine proteases after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis or isoelectric focusing in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 151, 7–12. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90044-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90044-2)
- WHO, 1981. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms.

- WHO Offset Publ. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(81\)90095-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(81)90095-7)
- Winkel, K., Hawdon, G., Ashby, M.K., 1998. Venomous bites and stings. *Hazard* 35, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.mpmmed.2009.09.025>
- Xiong, S., Huang, C., 2018. Synergistic strategies of predominant toxins in snake venoms. *Toxicol. Lett.* <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.02.004>
- Zaqueo, K.D., Kayano, A.M., Simões-Silva, R., Moreira-Dill, L.S., Fernandes, C.F.C., Fuly, A.L., Maltarollo, V.G., Honório, K.M., Da Silva, S.L., Acosta, G., Caballol, M.A.O., De Oliveira, E., Albericio, F., Calderon, L.A., Soares, A.M., Stábeli, R.G., 2014. Isolation and biochemical characterization of a new thrombin-like serine protease from *Bothrops pirajai* snake venom. *Biomed Res. Int.* 2014, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/595186>
- Zelanis, A., Huesgen, P.F., Oliveira, A.K., Tashima, A.K., Serrano, S.M.T., Overall, C.M., 2015. Snake venom serine proteinases specificity mapping by proteomic identification of cleavage sites. *J. Proteomics* 113, 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.10.002>
- Zhang, D., Botos, I., Gomis-Rüth, F.X., Doll, R., Blood, C., Njoroge, F.G., Fox, J.W., Bode, W., Meyer, E.F., 1994. Structural interaction of natural and synthetic inhibitors with the venom metalloproteinase, atrolysin C (form d). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 8447–51. <https://doi.org/10.1073/PNAS.91.18.8447>
- Zhou, X., Manjunatha Kini, R., Doley, R., 2009. Snake Venom Phospholipase A2 Enzymes, in: *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. CRC Press, pp. 173–205. <https://doi.org/10.1201/9781420008661.ch8>
- Zúñiga, C., Caro, L., 2013. Aspectos clínicos y epidemiológicos de la mordedura de serpientes. *Evid Med Invest Salud* 6, 126–136.