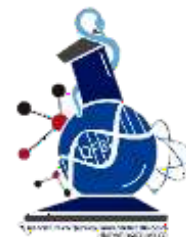




**Universidad Autónoma Metropolitana**  
**Unidad Xochimilco**  
**Licenciatura en QFB, División de CBS**



Calzada del Hueso 1100 Col. Villa Quietud C.P.  
04960 CDMX

**Enzimas fibrin(ogeno)líticas en veneno  
de la serpiente de cascabel *Crotalus  
atrox*: Presencia actividad y  
neutralización por antivenenos.**

Alumno:

Ayala Niño Carlos Javier

Asesora interna:

M. en C. Leticia Ortega Almanza

X

M. en C Leticia Ortega Almanza

Asesor externo:

Dr. Roberto Arreguin Espinosa  
de los Monteros

Línea de investigación:  
Biomacromoléculas

Realizó: Ayala Niño Carlos Javier

## **INTRODUCCIÓN**

Los venenos de serpientes son ricos en enzimas, proteínas como PLA2s, SVSPs, SVMPs.

Estos venenos contienen enzimas que son un conjunto de proteínas, estas catalizan reacciones químicas, en este caso hablaremos del ataque del veneno hacia al fibrinógeno, que principalmente este compuesto de fibrina. Los venenos de serpientes contienen enzimas proteolíticas. Sin embargo, las investigaciones previas han dirigido sus búsquedas a otros efectos del veneno, pero sus acciones enzimáticas sobre el fibrinógeno no han sido desarrolladas por completo.

En México se han registrado 471 especies de serpientes, de las cuales un 20% del total de serpientes son de importancia médica. A su vez el total lo dividimos en 2 grandes familias, la viperidae y elapidae. En este protocolo se hablará de la *crotalus atrox* que se distribuye por Norteamérica, su veneno contiene crotamina e inhibidores de metaloproteinasas de venenos de serpiente (MPi), esta especie es una de las serpientes con mayor tasa de mordeduras y el envenenamiento por esta especie se caracteriza por sintomatología como necrosis, hemorragia, coagulopatía, shock e insuficiencia renal aguda entre otras.

Y entramos al campo de los antivenenos, estos interactúan con los sitios activos cuerpo e impiden la unión de las fracciones del veneno e impiden que se accionen los mecanismos tóxicos.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

En México existe una gran variedad de serpientes y ampliamente distribuidas, un 20% son del total de estas tienen importancia farmacéutica, dada la composición del veneno llega a representar un gran riesgo desde la sintomatología hasta la muerte. Dado esto se pretende tomar medidas para contrarrestar los efectos en zonas que no tengan acceso a un hospital cercano, usando antivenenos

comerciales, se buscara que tenga un efecto positivo en contra del veneno de serpiente para así reducir los decesos por mordedura.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

-Determinar la capacidad neutralizante de dos antivenenos comerciales hacia la actividad fibrinogenolítica del veneno completo y de algunas enzimas de mediano peso molecular, purificadas del veneno de la serpiente de cascabel *C. atrox* de interés farmacéutica.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1-Determinar el nivel de variación en actividad fibrinogenolítica en 23 muestras de veneno de *C. atrox* de diferentes partes de México.

2-Determinar la actividad fibrinogenolítica de enzimas purificadas de mediano peso molecular.

3-Determinar la potencia neutralizante de los antiveneno contra veneno completo y enzimas purificadas.

## **MARCO TEORICO Y ANTECEDENTES.**

### **Serpientes.**

En México se han registrado 471 especies diferentes de serpientes divididas en varias familias, dos de las cuales resaltan por su importancia por sus venenos, la viperidae y elapidae, aproximadamente el 20% del total de serpientes son de importancia médica (Uetz et al., 2022). Específicamente en esta revisión se hablará de la *C. atrox*, es de la familia viperidae, se distribuye por estados unidos y gran parte de México, pasando por aproximadamente 15 estados de la república, su reproducción es ovípara y es una de las serpientes con mayor tasa de mordeduras en el norte de América (Uetz et

al., 2022).

### **Veneno composición.**

Los venenos de serpientes son las secreciones más ricas en enzimas y toxinas en la naturaleza y están compuestos por múltiples moléculas tóxicas están compuestos principalmente de proteínas que se pueden clasificar en familias proteicas con base en la similitud de su secuencia de aminoácidos. (de Roodt et al., 2005) En una revisión de los proteomas de los venenos de las principales familias se reportaron que en el veneno de las serpientes de la subfamilia Viperine se pueden encontrar al menos once familias proteicas como son: fosfolipasas A2 (PLA2s), serino proteasas (SVSPs), metaloproteinasas (SVMPs) como componentes principales y de mayor proporción. Por su parte, los venenos de las serpientes de la subfamilia Crotaline presentan ocho de las once familias anteriores y contienen dos familias de proteínas adicionales denominadas crotamina (DEF) e inhibidores de metaloproteinasas de venenos de serpiente (MPi). (Castro et al.,2020)

El envenenamiento por serpientes de la familia Viperidae se caracteriza por efectos locales prominentes, que incluyen necrosis, hemorragia, edema y dolor, que se desarrollan rápidamente después del accidente y a menudo resultan en secuelas permanentes. (Teixeira et al., 2005) Además, pueden presentarse alteraciones sistémicas como hemorragia, coagulopatía, shock e insuficiencia renal aguda. Tanto los efectos locales como sistémicos de estos venenos de serpiente se han asociado con la acción de una variedad de componentes del veneno, que incluyen metaloproteinasas. (Teixeira et al., 2005)

En este caso específico de la serpiente *C. atrox*, su veneno contiene un componente más, la crotoxina que posee actividad miotóxica, conforma aproximadamente 30–50% de la masa total del veneno. Es una de las neurotoxinas más potentes y es el mayor responsable de la actividad tóxica del mismo. (de Roodt et al., 2005)

### **Enzimas.**

Las enzimas son un conjunto de proteínas, formados por aminoácidos con enlaces covalentes, estas catalizan en los organismos una gran variedad de reacciones químicas como son ambientación del medio, aumentar temperaturas o modificar

sustratos. La actividad catalítica de las enzimas depende de que mantengan su estructura. En esta estructura tridimensional se forman cavidades, llamadas “sitio activo”, las cuales muestran afinidad por los sustratos que se convertirán en productos. (Ramírez et al., 2014)

### **Fibrina.**

La fibrina (polímero del fibrinógeno) es una malla proteica constituyente del tapón hemostático. Esta red se caracteriza principalmente por su estructura espacial, las dimensiones de sus fibras, el grado de ramificación, porosidad, elasticidad y rigidez, propiedades que dependen de factores como temperatura, concentración de iones y otras sustancias plasmáticas, pero principalmente de fibrinógeno, trombina y factor XIII. Cuando aumentan las concentraciones de fibrinógeno o trombina, las redes de fibrina son más densas, de menor porosidad y formadas por fibras más cortas. (Laucerilla et añ., 2007)

### **Fibrinógeno.**

El fibrinógeno es un complejo polipeptídico que por acción enzimática se convierte en fibrina, que formará con las plaquetas la red del coágulo de sangre.

El fibrinógeno también es un reactante de fase aguda que aumenta en procesos de daño tisular o inflamación. Es, también, uno de los determinantes más importantes de la eritrosedimentación.

### **Actividad fibrinogenolítica.**

Los venenos de serpientes, especialmente de Crotalidae y Viperidae, contienen muchas enzimas proteolíticas. (Castro et al.,2020) Sin embargo, la investigación se ha centrado en estudiar sus efectos coagulantes, hemorrágicos, necróticos y neuromusculares. Sus acciones enzimáticas (catalíticas) sobre el fibrinógeno o la fibrina no han sido desarrolladas por completo.

### **Anti-venenos comerciales Antivipmyn y Birmex**

El mecanismo de acción de estos antivenenos Impiden que el sitio activo del veneno interactúe con su receptor y, por lo tanto, evita que se desencadenen los mecanismos fisiopatológicos de la intoxicación, la vía de administración es por venoclisis. (instituto bioclon 2015)

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Materiales.**

- Balanza analítica AND GR-300
- EnzCheck Protease Assay Kit
- EnzCheck PhosPholipase A2 Assay Kit
- Espectrofotometro Thermo Scientific™ NanoDrop™ One/One<sup>C</sup>
- HPLC Shimadzu SCL-10Avp
- Columna C18 Aligent
- Columna C8 Aligent
- Reactivos Sigma Aldrich

### **Metodos**

#### **1-Cuantificación de la proteína total.**

Los venenos de serpiente son originarios de distintas regiones de México, como son Querétaro, Coahuila, Veracruz, Sonora, Sinaloa, Zacatecas y Durango. Fueron liofilizados para su transporte. Se realizo el pesado de los venenos liofilizados en una balanza analítica y posteriormente una re-suspensión. A continuación, se realizó la cuantificación de la concentración de la proteína total de cada muestra en un espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop™ One/One<sup>C</sup> y se separaron alícuotas.

#### **2-SDS-page.**

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12% siguiendo los protocolos del instituto de química, posteriormente las muestras de venenos pasaron por un tratamiento para inyectar en el gel la concentración sugerida. Los geles polimerizados se montan en la cámara de electroforesis y se colocan las muestras deseadas en los carriles designados previamente junto a un marcador de peso molecular, esto para poder hacer más fácil la lectura de los pesos moleculares aproximados.

Una vez que los geles estén listos, los retiramos de la cámara, los sumergimos en solución fijadora y posteriormente se realiza la tinción con azul de coomasie, una

vez pasado el tiempo debido, se destiñó con agua caliente para retirar poco a poco la coloración del gel.

Acabando esto, se procedió a capturar fotos y hacer las comparaciones respecto al marcador de peso molecular para así determinar el contenido del veneno.

### **3-Zymograma.**

Se prepararon geles de SDS-page con la variante para el estudio de zymografía al 12% igualmente que el SDS-Page, una vez estén polimerizados los geles se procede a preparar las muestras de acuerdo con los protocolos del instituto de química.

Se sigue el mismo procedimiento que el SDS-Page a partir de este punto con pequeñas variaciones, al desteñir se utiliza una solución de isopropanol y agua. Una vez terminado se procede a revisar la zona en la cual se nota una banda de degradación del color, esto nos indicó una actividad enzimática en algunos puntos del gel en el mediano peso molecular y por lo tanto indica que el veneno tiene la actividad enzimática frente a la caseína.

### **4-HPLC**

Se realizarán diluciones de las 23 muestras de venenos y se harán pool, de región norte, centro y sur del país. Posteriormente se correrá por HPLC de intercambio iónico con una columna c18, una vez pasado por el HPLC, se recolectará la fracción de interés y se recirculará ahora por HPLC de fase reversa, volviendo a fraccionar y recolectar la parte de interés.

Una vez obtenido nuestro pico de interés, se harán pruebas con antiveneno y de actividad.

### **5-Actividad de fosfolipasas**

El procedimiento de esta prueba fue hecho siguiendo los protocolos del laboratorio y siguiendo el procedimiento del kit de fosfolipasas.

### **6-Actividad de fibrina en placa**

El procedimiento de esta prueba fue hecho siguiendo los protocolos del laboratorio y siguiendo el procedimiento del kit de fibrina.

## RESULTADOS

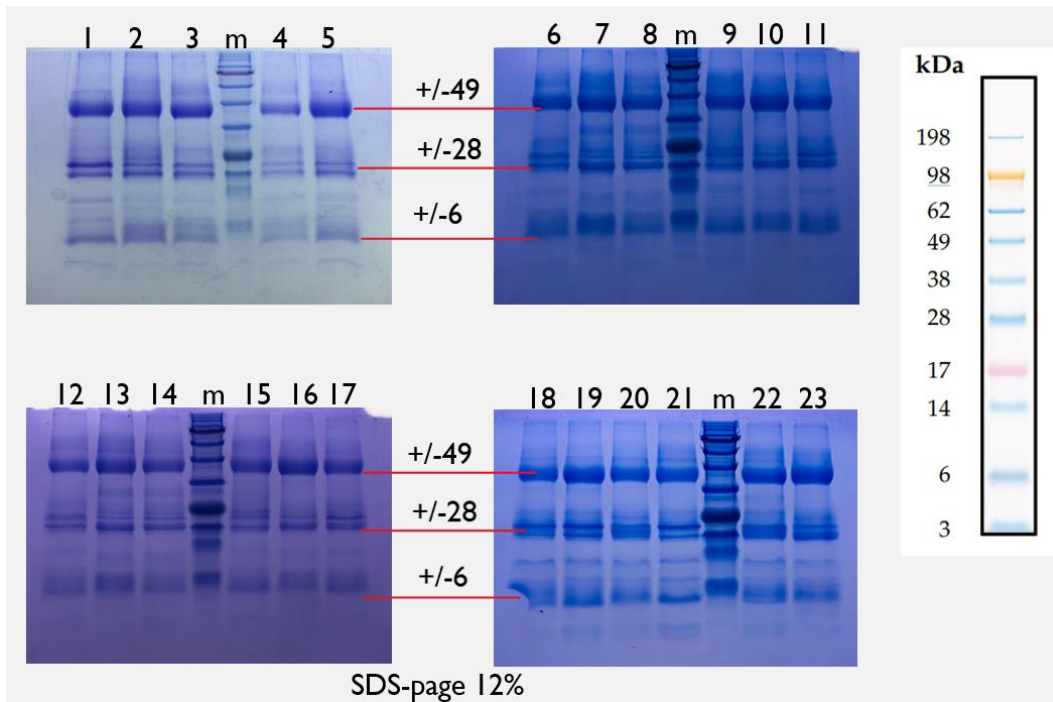
### 1-Cuantificación de la proteína total.

Pool N: 26.489 mg/ml

Pool O: 27.627 mg/ml

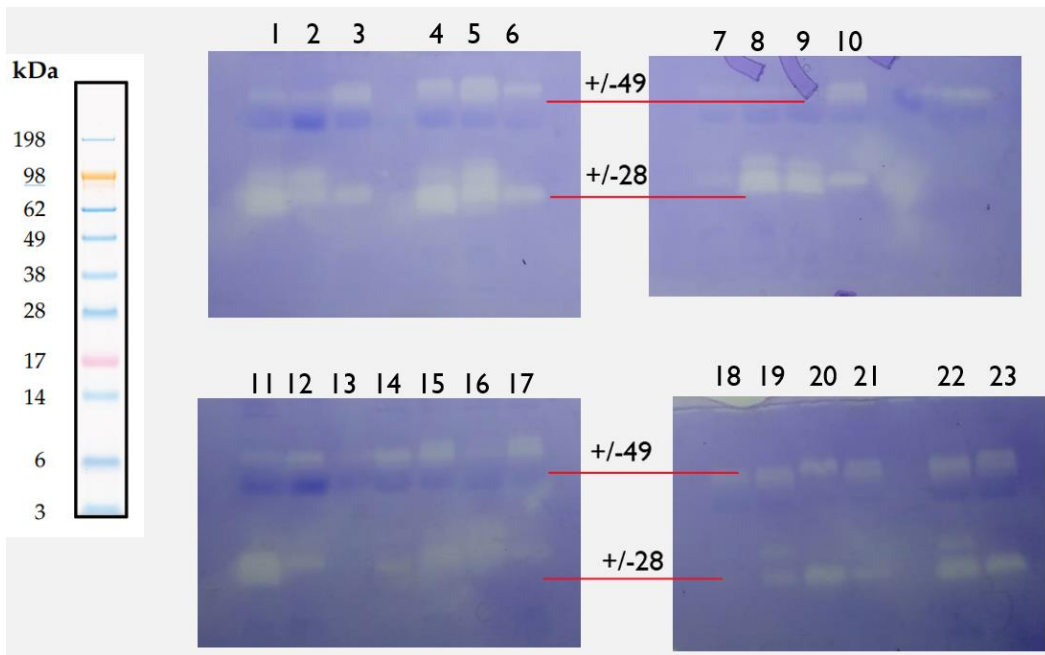
Pool SE: 25.921 mg/ml

### 2-SDS-page.

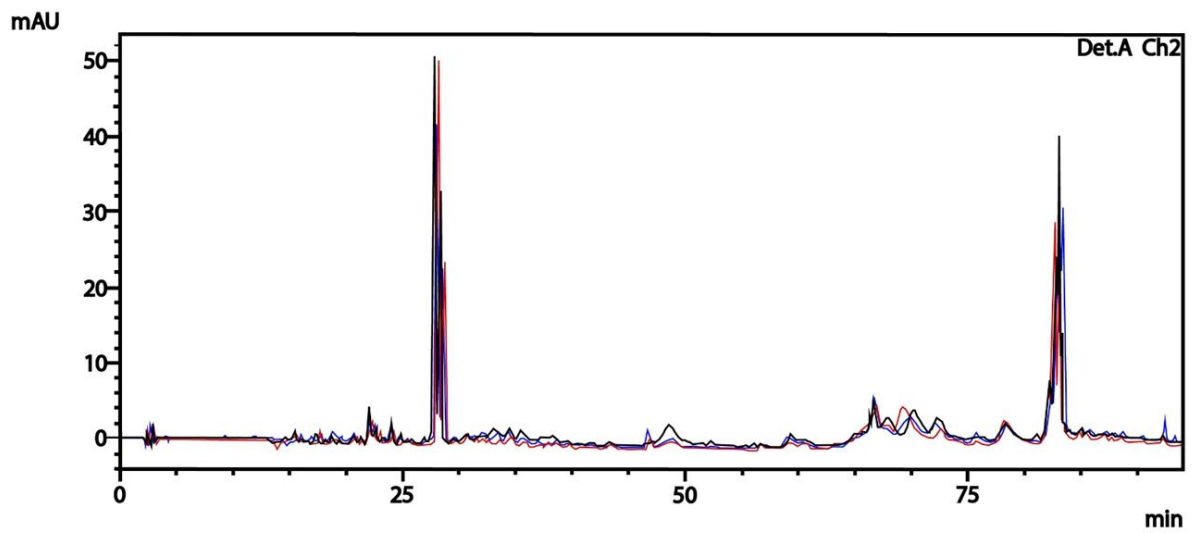


### 3-Zymograma.



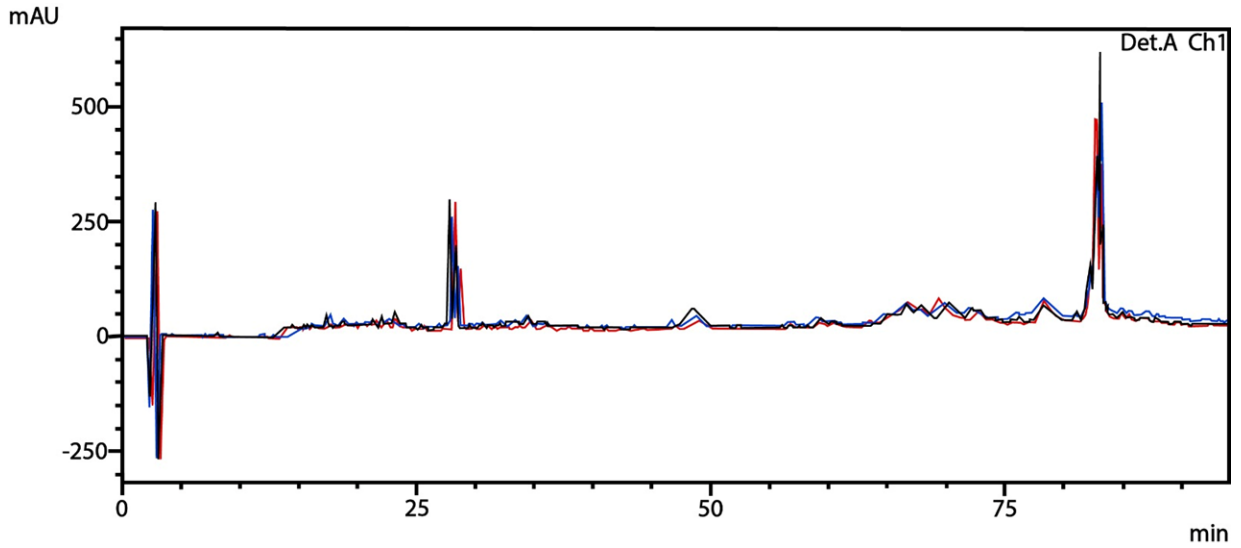


#### 4-HPLC

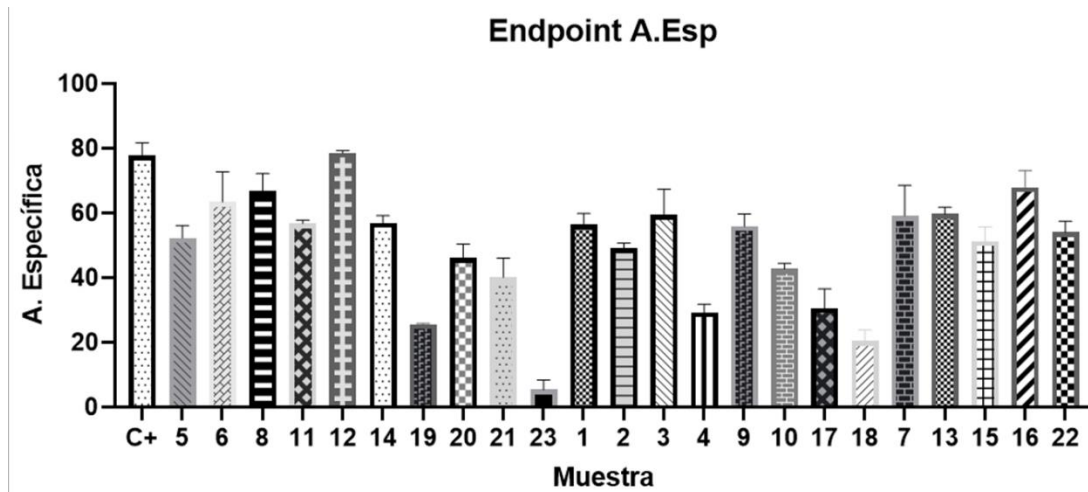


-Negro \_ Pool SE  
 -Azul \_ Pool O  
 -Rojo \_ Pool N

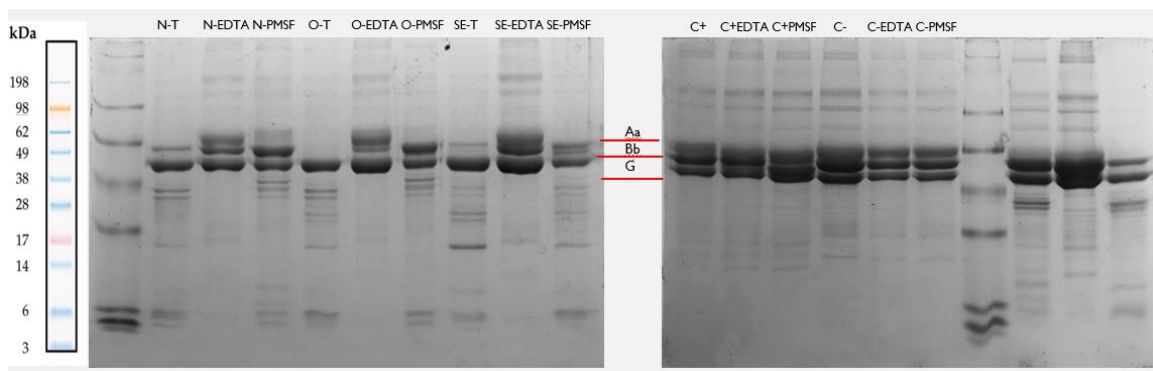
215 y 280nm columna c18



### 5-Actividad de fosfolipasas



### 6-Actividad de fibrina en placa



## DISCUSIÓN

Sé contaba con 23 muestras de *c.atrox* de diferentes regiones del país, algunas pruebas se hicieron con ellos pero dada la falta de material se decidió separar en

3 grandes regiones (Norte, Occidente y Sureste), se re suspendió el veneno liofilizado y se procedió a cuantificar su cantidad de proteína, las 3 regiones mostraron bastante cantidad de ella, se realizó una caracterización básica de las muestras y estas muestran una gran similitud.

Como se puede notar en el SDS-Page y en los zimogramas a base de gelatina, se forman 3 grupos importantes a diferentes pesos moleculares, que indican a las 3 grandes familias de proteínas que se contienen en los venenos: metaloproteasas (49kDa) , serinoproteasas (28kDa) y fosfolipasas.

Posteriormente se realizaron screenings en HPLC y FPLC, en ambos casos observamos y confirmamos que hay presencia de los 3 grupos de proteínas de nuestro interés en la región alta que abarca desde el min. 45 al 90 aproximadamente.

Una vez caracterizando el veneno se realizan las pruebas de actividad específicas, esta es la prueba electroforética de actividad sobre fibrinógeno, en esta se observó que hay una gran actividad a pesar de los inhibidores, estos inhibidores (EDTA y PMSF) actúan sobre diferentes grupos de proteínas (metaloproteasas y serinoproteasas respectivamente) y dado esto, la actividad muestra una aparente sinergia entre metaloproteasas y serinoproteasas, esta prueba nos dice que el veneno tiene una gran actividad degradadora del fibrinógeno, descomponiendo este en subproductos, en este caso el veneno de *C. atrox* tiene dos tipos de proteínas con actividad fibrin(ogeno)lítica específica, llamada alfa-beta defibrinogenasas, esto por el hecho de que degrada la subunidad a- alfa y b- beta del fibrinogeno sin tocar la subunidad gamma y dados los inhibidores que se usaron, podemos inferir que se trata de una actividad conjunta de una metaloproteasa y de una serinoproteasa.

Dado esto se procedió a fraccionar el veneno completo por medio de FPLC y liofilizar las fracciones de los pool's de venenos para comenzar con las pruebas de inhibición.

## **CONCLUSIÓN**

Se realizaron variados experimentos y se concluye que el veneno de *c.atrox* tiene actividad enzimática sobre el fibrinógeno, degradando las subunidades alfa y beta,

teniendo una actividad específica y sinérgica llamada alfa-beta-desfibrinogenasas. Queda abierto el proyecto para partir de las fracciones, aislar y purificar la o las proteínas responsables de esta actividad que con los experimentos realizados se puede inferir que es algún miembro de la familia de las metaloproteasas y algún miembro de las serinoproteasas. Se espera que esta tenga alguna aplicación médica o farmacológica.

## REFERENCIAS

1. Uetz, P. & J. Hosek. 2022. THE REPTILE DATABASE. <http://www.reptile-database.org>, [Consultado en noviembre 2022]
2. Neri Castro, E. E., Bénard-Valle, M., Alagón, A., Gil, G., López de León, J., & Borja, M. (2020). SERPIENTES VENENOSAS EN MÉXICO: UNA REVISIÓN AL ESTUDIO DE LOS VENENOS, LOS ANTIVENENOS Y LA EPIDEMIOLOGÍA. *Revista Latinoamericana De Herpetología*, 3(2), 5–22. <https://doi.org/10.22201/fc.25942158e.2020.2.205>
3. de Roodt, Adolfo R, Estévez-Ramírez, Judith, Paniagua-Solís, Jorge F, Litwin, Silvana, Carvajal-Saucedo, Alejandro, Dolab, Jorge A, Robles-Ortiz, Luis E, & Alagón, Alejandro. (2005). TOXICIDAD DE VENENOS DE SERPIENTES DE IMPORTANCIA MÉDICA EN MÉXICO. *GACETA MÉDICA DE MÉXICO*, 141(1), 13-21. Recuperado en 07 de noviembre de 2022, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0016-38132005000100003&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-38132005000100003&lng=es&tlng=es).
4. Teixeira, Catarina P., et al. INFLAMMATORY EFFECTS OF SNAKE VENOM METALLOPROTEINASES. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* [online]. 2005, v. 100, suppl 1 [Accessed 6 November 2022] , pp. 181-184. Available from: <<https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000900031>>. Epub 14 June 2005. ISSN 1678-8060. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000900031>.
5. RAMÍREZ R., Aceves M., et al." ENZIMAS: ¿QUÉ SON Y CÓMO FUNCIONAN?" *Revista Digital Universitaria* [en línea]. 1 de noviembre de

(2014), Vol. 15, No.11 [Consultada:]. Disponible en Internet: <<http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art91/index.html>> ISSN: 1607-6079.

6. Lauricella, A., (2007). VARIABILIDAD DE LAS REDES DE FIBRINA. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 41(1), 7-19. Recuperado en 09 de noviembre de 2022, de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-29572007000100002&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572007000100002&lng=es&tlng=es).
7. Instituto Bioclon, S. A. de C. V. (2015, enero 1). *ANTIVIPMYN SOLUCIÓN INYECTABLE*. vademecum. [https://www.vademecum.es/equivalencia-lista-antivipmyn+solucion+inyectable-mexico-j06aa03-1387463-mx\\_1](https://www.vademecum.es/equivalencia-lista-antivipmyn+solucion+inyectable-mexico-j06aa03-1387463-mx_1)