

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**AISLAMIENTO DE DESINTEGRINAS DE *Crotalus totonacus* Y
CARACTERIZACIÓN TOXICOLÓGICA DE SU VENENO.**

POR

M.C. ERIC ABDEL RIVAS MERCADO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACOLOGÍA
Y TOXICOLOGÍA**

FEBRERO, 2020

**AISLAMIENTO DE DESINTEGRINAS DE *Crotalus totonacus* Y
CARACTERIZACIÓN TOXICOLÓGICA DE SU VENENO.**

Aprobación de Tesis:



Dr. med. LOURDES GARZA OCAÑAS

Director de Tesis



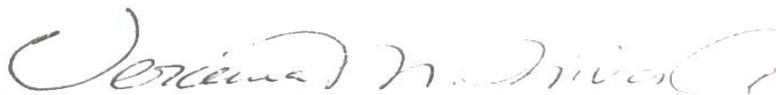
Dr. C. CHRISTIAN BADILLO CASTAÑEDA

Comisión de Tesis



Dr. C. Ma. TERESA ZANATTA CALDERON

Comisión de Tesis



Dr. C. VERONICA MAYELA RIVAS GALINDO

Comisión de Tesis



Dr. C. SANDRA LUCIA MONTOYA EGUÍA

Comisión de Tesis



Dr. med. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ

Subdirector de Estudios de Posgrado

**AISLAMIENTO DE DESINTEGRINAS DE *Crotalus totonacus* Y
CARACTERIZACIÓN TOXICOLÓGICA DE SU VENENO.**

**Presentado por
M.C. ERIC ABDEL RIVAS MERCADO**

**Este trabajo fue realizado en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la
Facultad de Medicina de la UANL bajo la dirección de la Dr. med. Lourdes Garza
Ocañas**



Dr. med. LOURDES GARZA OCAÑAS

Director de Tesis

RESUMEN

M. C. Eric Abdel Rivas Mercado

Fecha de Graduación: Febrero 2020

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del Estudio: AISLAMIENTO DE DESINTEGRINAS DE *Crotalus totonacus* Y CARACTERIZACIÓN TOXICOLÓGICA DE SU VENENO.

Número de páginas: 118

Las desintegrinas son proteínas de bajo peso molecular aisladas principalmente del veneno de serpientes de la familia Viperidae a las cuales se les ha descrito potencial terapéutico como moléculas anti-angiogénesis y anti-metástasis. El presente trabajo se realizó con el propósito de aislar desintegrinas del veneno de *Crotalus totonacus* y evaluar su capacidad para bloquear receptores integrina. El aislamiento se realizó mediante dos etapas de separación por cromatografía (SE-LC y RP-HPLC). De las fracciones obtenidas, se seleccionó la de mayor actividad y abundancia (Fracción 8) y se caracterizó mediante SDS-PAGE, espectrometría de masas y secuenciación por degradación de EDMAN. La secuencia N terminal obtenida para esta fracción reveló que pertenece a la familia de desintegrinas y fue nombrada totonacin. Totonacin inhibió la adhesión celular sobre proteínas de matriz extracelular (vitronectina, fibronectina y laminina) así como la migración en las líneas celulares MDA-MB-231 y HMEC-1 las cuales expresan receptores integrina. En la caracterización toxicológica del veneno, la DL_{50} en ratones CD1 fue 1.29 mg/kg y la actividad proteolítica fue alta por lo tanto el veneno se clasificó como tipo I.

Conclusiones y contribuciones: El presente trabajo es la primera descripción del aislamiento, determinación de masa molecular, secuencia de aminoácidos y actividad biológica de desintegrinas en el veneno de *Crotalus totonacus*. Los resultados obtenidos mostraron que Totonacin es una molécula con potencial terapéutico, su efecto de inhibición de adhesión sobre vitronectina en las células MDA-MB-231 y HMEC-1 sugiere que bloquea uno o más de los cinco receptores integrina de esta proteína ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_1$ y $\alpha_{IIb}\beta_3$) y el efecto de inhibición de migración celular en la línea MDA-MB-231 refuerza el bloqueo del receptor integrina $\alpha_v\beta_3$ que se expresa en estas células y que ha sido reportado como mediador de la migración celular y angiogénesis en el cáncer.

Director de tesis

Dr. med. Lourdes Garza Ocañas

AGRADECMIENTOS

A mis padres: MPG. José Reyes Rivas Enríquez y Bertha Alicia Mercado Romo por su apoyo en todo momento.

A mi prometida: Maricruz Olivares Hernández por su incondicional apoyo tanto en campo como en laboratorio durante el desarrollo del proyecto.

A mi directora de tesis: Dra. med. Lourdes Garza Ocañas por el apoyo brindado para el desarrollo de este trabajo.

A los miembros de la comisión: Dr.C. Christian Badillo Castañeda, Dr.C. Teresa Zanatta Calderón, Dr.C Verónica Mayela Rivas Galindo y Dr.C. Sandra Lucía Montoya Eguia, por las asesorías brindadas durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. C. Rubén Alonso Carbajal Márquez, MVZ. Carlos Alberto García Hernández, Biol. Marco Antonio Domínguez de la Riva, Biol. Manuel Luna, I.Q. Antonio Cano Aguirre por el apoyo brindado en las salidas de campo.

Por su colaboración con la estancia de investigación, al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la SEMARNAT.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo.	Pág.
CAPITULO 1	14
INTRODUCCIÓN	14
1.1 Serpientes venenosas en México	16
1.2 Serpientes venenosas en el estado de Nuevo León	16
1.3 <i>Crotalus totonacus</i> (Gloyd y Kauffeld, 1940)	17
1.4 Principales componentes en veneno de vipéridos	20
1.4.1 Metaloproteasas (SVMP).....	20
1.4.2 Serin proteasas tipo trombina (SVSP).....	22
1.4.3 Nucleasas, nucleotidasas y fosfomonoesterasas.	23
1.4.4 Fosfolipasas A ₂	23
1.4.5 L-Aminoácido oxidasas.	25
1.4.6 Agentes anti-plaquetarios.	26
1.4.7 DESINTEGRINAS	27
JUSTIFICACIÓN	32
OBJETIVO GENERAL	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
CAPÍTULO 2	33
MATERIAL Y MÉTODOS	33
2.1 Obtención del veneno de <i>C. totonacus</i>	33
2.1.1 Muestreo	33

Capítulo.	Pág.
2.1.2 Manejo de las serpientes y extracción de veneno	33
2.1.3 Liofilización del veneno	34
2.1.4 Cuantificación de proteína	34
2.2 Aislamiento de desintegrinas en veneno de <i>C. totonacus</i>.....	34
2.2.1 Cromatografía por exclusión molecular (SE-LC)	35
2.2.2 Cromatografía líquida de alta resolución, fase reversa (RP-HPLC)	37
2.2.3 Inhibición de agregación plaquetaria inducida por ADP.....	38
Tratamiento del material de vidrio con surfacil en tolueno (<i>siliconización</i>).....	38
2.2.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de Dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE).....	39
2.3 Evaluación de la actividad biológica de desintegrinas in vitro	40
2.3.1 Líneas celulares	40
2.3.2 Preparación de medio L-15 (Leibovitz).....	40
2.3.3 Preparación de medio MCDB-131	41
2.3.4 Tripzinización	42
2.3.5 Sembrado de células en placa	43
2.3.6 Evaluación de citotoxicidad mediante prueba del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolio (MTT)	44
2.3.7 Inhibición de adhesión a proteínas de matriz extracelular (MEC).....	45
2.3.8 Inhibición de migración celular	46
2.4 Caracterización toxicológica del veneno de <i>C. totonacus</i>.....	48
2.4.1 Determinación del contenido de crotoxina (Ctx) mediante ELISA	48
2.4.2 Letalidad (DL ₅₀) del veneno en ratón.....	49

Capítulo.	Pág.
2.4.3 Actividad procoagulante.....	50
2.4.4 Actividad proteolítica	50
CAPÍTULO 3.....	52
RESULTADOS	52
3.1 Obtención del veneno de C. totonacus.....	52
3.2 Aislamiento de desintegrinas del veneno de C. totonacus.....	52
3.3 Evaluación de la actividad biológica de desintegrinas in vitro	58
3.3.1 Evaluación de la citotoxicidad de totonacin	58
3.3.2 Inhibición de adhesión a proteínas de MEC	58
3.3.3 Inhibición de migración celular	60
3.4 Caracterización toxicológica del veneno de C. totonacus	62
3.4.1 Evaluación del contenido de crotoxina (Ctx) mediante ELISA.....	62
3.4.2 Letalidad (DL ₅₀) del veneno en ratón.....	65
3.4.3 Actividades procoagulante y proteolítica del veneno.....	66
CAPÍTULO 4.....	69
DISCUSIÓN.....	69
CAPÍTULO 5.....	75
CONCLUSIÓN	75
PERSPECTIVAS.....	76
GLOSARIO	77

Capítulo.	Pág.
BIBLIOGRAFÍA	81
APÉNDICES	97
APÉNDICE A	98
APÉNDICE B.....	100
APÉNDICE C	102
APÉNDICE D	104
APÉNDICE E.....	113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
Figura 1. Serpientes de la familia Viperidae de Nuevo León	19
Figura 2. Cromatografía por exclusión molecular (SE-LC).....	54
Figura 3. RP-HPLC de la fracción 5 proveniente de SE-LC.....	54
Figura 4. Inhibición de agregación plaquetaria.....	55
Figura 5. Espectrometría de masas de fracción 8.....	56
Figura 6. Secuencia de aminoácidos de la fracción 8 (totonacin).....	57
Figura 7. SDS-PAGE aislamiento de Totonacin.....	57
Figura 8. Citotoxicidad.....	59
Figura 9. Inhibición sobre adhesión celular.....	59
Figura 10. Inhibición de migración celular.....	61
Figura 11. RP-HPLC del veneno de <i>C. totonacus</i>	63
Figura 12. RP-HPLC del veneno de <i>C. totonacus</i> adulto y juvenil.....	64
Figura 13. ELISA tipo “sandwich” para detección de crotoxina.....	64
Figura 14. Evaluación de la DL₅₀ del veneno de <i>C. totonacus</i>	65
Figura 15. Actividad procoagulante del veneno de <i>C. totonacus</i>.....	66
Figura 16. Actividad proteolítica del veneno de <i>C. totonacus</i>.....	67
Figura 17. Actividad proteolítica, curva estándar	67

Índice de tablas

Tabla	Pág.
Tabla 1. Actividades del veneno de <i>C. totonacus</i>	18
Tabla 2. Gradiente de elución RP-HPLC	37
Tabla 3. Obtención de veneno de ejemplares de <i>C. totonacus</i>	53
Tabla 4. Actividad proteolítica del veneno sobre HPA.....	68

ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2' – azinobis (3-etilbenzotiazolín) -6-sulfónico
ADAM	Familia de proteínas de membrana multidominio (dominio desintegrina y metaloproteasa).
ADP	Adenosin difosfato
ATCC	American Type Culture Collection
BPP	Péptidos potenciadores de bradiquidinas.
BSA	Albúmina sérica bovina
CI₅₀	Concentración inhibitoria 50
CRiSPs	Péptidos secretorios ricos en cisteínas
Ctx	Crotoxina.
DL₅₀	Dosis letal media.
DMP	Dosis mínima procoagulante.
ECM	Matriz extra celular.
EGF	Factor de crecimiento epidermal
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
FAD	Flavín adenin dinucleótido
FDA	Administración de fármacos y alimentos de Estados Unidos de América.
HPA	Sustrato proteico Hide Powder Azure
RP-HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
i.p.	Vía de administración (veneno) intra peritoneal.
i.v.	Vía de administración (veneno) intra venosa.
kDa	Kilodaltones
KGD	Lisina, Glicina, Ácido aspártico (dominio de unión a integrina)
KTS	Lisina, Treonina, Serina (dominio de unión a integrina)
LAAO	L-aminoácido oxidasa

MDG	Metionina, Ácido aspártico, Glicina (dominio de unión a integrina)
MVD	Metionina, Valina, Ácido aspártico (dominio de unión a integrina)
mg	Miligramo.
µg	Microgramo
M	molar
mM	Milimolar
µM	Micromolar
µm	Micrómetro
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometros
PBS	Buffer de fosfatos
PDE	Fosfodiesterasa
PLA₂	Fosfolipasas A ₂
PRP	Plasma rico en plaquetas
RGD	Arginina, Glicina, Ácido aspártico (dominio de unión a integrina)
RTS	Arginina, Treonina, Serina (dominio de unión a integrina)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato
SE-LC	Cromatografía por exclusión molecular
SFB	Suero fetal bovino
SEMARNAT	Secretaria de Medio Ambiente y recursos Naturales
SVMP	Metaloproteasas del veneno de serpientes
SVSP	Serinproteasas del veneno de serpientes
TFA	Ácido trifluoroacético
TL-SVSP	Enzimas tipo trombina
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular
VIH	Virus de inmunodeficiencia adquirida
WGD	Triptofano, Glicina, Ácido aspártico

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

Las serpientes conforman el grupo de vertebrados con mayor número de especies venenosas (Mackessy, 2010). El veneno de serpiente, contiene secreciones compuestas principalmente por una mezcla de péptidos y proteínas (Kochva et al., 1980; Markland, 1997; Meebs, 2002; Doley y Kini, 2009), producidas en glándulas cefálicas especializadas (Mackessy, 2010).

El veneno puede contener hasta 100 proteínas incluyendo isoformas, aunque la mayoría de los componentes pueden ser clasificados dentro de 10-15 familias proteicas (Sanz *et al.*, 2006; Calvete *et al.*, 2007). En el caso de serpientes de cascabel, las familias proteicas predominantes son: las L-aminoácido oxidasas (LAAO), fosfodiesterasas (PDE), metaloproteasas (SVMP), serinproteasas (SVSP) y fosfolipasas A₂ (PLA₂), compuestos no enzimáticos como homólogos de miotoxina a, desintegrinas, péptidos secretorios ricos en cisteína (CRiSPs) y lectinas tipo C (Mackessy, 2008; Mackessy, 2010).

Además de la importancia del estudio del veneno de serpiente para la obtención desarrollo y mejoramiento de antídotos (antivenenos), el veneno de serpiente ofrece perspectivas con frecuencia únicas dentro del campo de la medicina, particularmente en el área de farmacología, dado el potencial observado para algunos de sus componentes en el desarrollo de nuevos medicamentos (King, 2011).

Las desintegrinas son una familia de péptidos de bajo peso molecular (4 – 16 kDa), encontrados en el veneno de serpientes, principalmente de la familia Viperidae (Gould *et al.*, 1990; Marcinkiewicz *et al.*, 1999; Galán *et al.*, 2008). Las desintegrinas bloquean de manera selectiva a integrinas β_1 , β_3 y β_7 (Mackessy, 2010) debido a la presencia de dominios de unión dentro de la secuencia aminoacídica de cada desintegrina. Se han identificado tres clases funcionales principales; RGD (Arg-Gly-Asp), MLD (Met-Leu-Asp), o R/KTS (Arg/Lys-Thr-Ser) (Calvete *et al.*, 2005). Por otra parte, las integrinas han sido identificadas como agentes promotores de procesos patológicos, y se han propuesto como importantes blancos terapéuticos (Cox *et al.*, 2010), particularmente $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, y $\alpha_5\beta_1$, ya que tienen funciones cruciales respecto a angiogénesis y metástasis de tumores sólidos, representando en consecuencia, blancos farmacológicos excelentes para la terapéutica del cáncer (Avraamides *et al.*, 2008; Desgrosellier y Cheresch, 2010). En el presente estudio, se utilizó veneno de víbora de cascabel totonaca (*Crotalus totonacus*), especie endémica de México (Farr *et al.*, 2015), con el objetivo de caracterizar el contenido de desintegrinas y evaluar su actividad inhibitoria sobre la adhesión celular a proteínas de matriz extracelular así como su efecto sobre la migración en las líneas celulares MDA-MB-231 (cáncer de mama, de origen humano) y HMEC-1 (endotelio de origen humano). Adicionalmente se realizó la caracterización toxicológica del veneno de *C. totonacus*.

1.1 Serpientes venenosas en México

El conocimiento de la herpetofauna mexicana tiene raíces antiguas, sin embargo, su estudio sistemático es reciente, (Vázquez y Quintero, 2005). México se localiza en la porción norte del continente americano y cuenta con una extensión territorial de 1,958,201 km² de los cuales 1,953,128 km² son superficie continental y 75,073 km² corresponden a superficie insular (INEGI, 1991), el territorio nacional se encuentra dividido en dos partes iguales por el trópico de cáncer 23° 27' de latitud norte, que marca una franja de transición entre el clima árido y semiárido del país del clima húmedo y subhúmedo del sur. La ubicación geográfica de México, así como la variedad de climas, aunado a la compleja topografía del territorio mexicano, contribuyeron a formar un mosaico de condiciones ambientales y microambientales que han permitido el desarrollo de una gran variedad de hábitats y formas de vida, entre ellos las serpientes (Canseco y Gutiérrez, 2010).

En México la familia Elapidae está representada por tres géneros: *Pelamis*, con una especie, *Micruroides*, con una especie, y *Micrurus*, con 18 especies. Por otra parte, la familia Viperidae está representada en México por 10 géneros: *Agkistrodon*, *Atropoides*, *Bothriechis*, *Bothrops*, *Cerrophidion*, *Crotalus*, *Mixcoatlus*, *Ophryacus*, *Porthidium* y *Sistrurus*, las cuales suman 59 especies, 39 de ellas son endémicas del país, (Vázquez y Quintero, 2005).

1.2 Serpientes venenosas en el estado de Nuevo León

En Nuevo León existen, registradas, a la fecha, 64 especies de serpientes, agrupadas en cinco familias de las cuales una pertenece a la familia Typhlopidae, tres a la

Leptotyphlopidae, ambos grupos conocidos como culebras ciegas; 49 a la familia Colubridae, es decir, las culebras. Las familias de serpientes venenosas reportadas para el estado de Nuevo León, a la fecha, son; la familia Viperidae, representada por tres géneros y 10 especies (**Figura 1**), mientras que la familia Elapidae esta representada sólo por una especie; la serpiente coral *Micrurus tener* (Lazcano *et al.* 2010).

1.3 *Crotalus totonacus* (Gloyd y Kauffeld, 1940)

C. totonacus (nombre común: cascabel totonaca), es una especie de cascabel cuyo estatus taxonomico ha variado desde que fue descrita por Gloyd and Kauffeld, (1940), presentandose a nivel subespecie como: *C. durissus totonacus* (Smith y Taylor, 1945), *C. basiliscus totonacus* (Taylor, 1950), *C. durissus neoleonensis* (Harris y Simmons, 1978), posteriormente Campbell y Lamar (2004), elevan nuevamente su estatus a especie; *C. totonacus*. Desde el punto de vista filogenético, *C. totonacus* ha sido agrupada dentro del complejo *C. culminatus*, que comprende a *C. culminatus*, *C. simus* y *C. tzabcan* (McCranie, 1993), ademas de ser agrupada dentro del complejo *C. basiliscus*, que comprende a *C. basiliscus* y *C. molossus* (Wüster *et al.*, 2005). *C. totonacus* es especie de clima tropical endémica de México y se distribuye en los estados de: Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo y Veracruz. En el estado de Nuevo León, se reporta para los municipios de: Benito Juárez, Cadereyta Jiménez, Guadalupe, Montemorelos y Santiago. El registro mas al norte para esta especie está en los límites de Monterrey y Guadalupe en el Monumento Natural “Cerro de la Silla (25.649286°N, 100.252342°W) (**Figura 1-J**).

La información acerca del veneno de esta especie es escasa. Possani *et al.*, (1980) reportaron letalidad, actividades enzimáticas, así como inmunogenicidad del veneno de un ejemplar de *C. totonacus* perteneciente al zoológico Gladys Porter, Brownsville, Texas, USA. Los resultados se resumen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Actividades del veneno de *C. totonacus* reportadas por Possani *et al.*, (1980).

Ensayo	Resultados
DL ₅₀ i.p. µg/g (ratón)	2.5
Hemólisis	
- Método indirecto (HU ₅₀) µg	71
Hidrólisis	
- BAEE (unidades/mg)	6.3±0.8
- BTEE (unidades/mg)	0.011±0.001
Fosfolipasa (unidades/mg)	3.4±0.4
Proteinasa (unidades/mg)	0.7±0.12

HU₅₀: Cantidad de proteína a la cual el veneno produjo 50% de hemólisis.

BAEE: (substrato) N-benzoil-L-arginina-etil éster

BTEE: (substrato) N-benzoil-L-tirosina-etil éster



Figura 1. Serpientes de la familia Viperidae reportadas a la fecha para el estado de Nuevo León; A) *Agkistrodon taylori*, B) *Crotalus atrox*, C) *C. scutulatus*, D) *C. lepidus*, E) *C. pricei*, F) *C. morulus*, G) *C. molossus nigrescens*, H) *C. ornatus*, I) *Sistrurus catenatus*, J) *C. totonacus*.

1.4 Principales componentes en veneno de vipéridos.

En general, los componentes proteicos pueden ser divididos en dos grupos:

1. **Polipéptidos** (no enzimáticos). Estas son toxinas con actividad específica hacia estructuras nerviosas y membranas celulares, péptidos con propiedades inhibitorias hacia enzimas (proteasas, acetilcolinesterasas), efectos sobre canales iónicos, péptidos que exhiben efectos sinérgicos con otros componentes no tóxicos, a este grupo pertenecen las desintegrinas, además se tiene la presencia de péptidos con actividad aún desconocida (Meebs, 2002).
2. **Enzimas.** (metaloproteasas, serin proteasas tipo trombina, nucleasas, nucleotidasas y fosfomonoesterasas, fosfolipasas (PLA₂). Estas son en su mayoría hidrolasas, aminoácido-oxidasas, estas tienen función digestiva. Sin embargo, existe un fenómeno, raro en la naturaleza, por lo cual las enzimas pueden convertirse en toxinas funcionales. Esto incluye PLA₂, que pueden ejercer efectos altamente específicos sobre estructuras nerviosas y algunas enzimas, las cuales pueden afectar la coagulación sanguínea o causar daño a los tejidos (miotoxinas, hemorraginas) (Meebs, 2002).

1.4.1 Metaloproteasas (SVMP)

Las metaloproteasas del veneno de serpiente (**SVMP**), comprenden una serie de enzimas dependientes de zinc, de pesos moleculares variados. Estas son responsables del efecto hemorrágico característico en envenenamientos por vipéridos (Gutiérrez y Rucavado, 2000). Estas enzimas han recibido particular atención debido a su asociación

con síntomas notables como la hemorragia sistémica. La subfamilia M12 de metaloproteasas está formada por las **SVMP** y **ADAM** (dominio tipo desintegrina y metaloproteasa), estos son dos grupos de proteínas que comparten ciertas características estructurales incluyendo un dominio metaloproteasa homólogo, así como, en algunos casos estructuras de dominio carboxi para el dominio proteasa. La familia de proteasas **ADAM** representan una familia estructuralmente diversa de proteínas con una variedad de características funcionales (Mackessy, 2010). Las **SVMP** poseen una relativamente alta actividad proteolítica, la cual puede ser inhibida efectivamente mediante agentes quelantes como el EDTA. Además, se demostró en muchos casos que estas proteínas causan hemorragia, se les conoce como factores hemorrágicos. Ahora se sabe que las **SVMP** poseen otras actividades aparte de causar hemorragias (Mackessy, 2010). Las **SVMP** que constan solo con un dominio metaloproteasa son clasificadas como **SVMP P-I**. Las **SVMP P-II** se caracterizan por presentar en su forma naciente un dominio tipo desintegrina que en la mayoría de los casos presenta el canónico motivo RGD, el cual es procesado proteolíticamente, dando lugar a la liberación de una desintegrina. En las **SVMP P-IIb**, el dominio desintegrina no se escinde, permanece formando parte de la estructura de la metaloproteasa. Las **SVMP P-IIc** son la forma dimérica de las **P-IIb**. La clase **P-IId** es la representación de una forma precursora que da lugar a las desintegrinas homodiméricas observadas en los venenos, mientras que la clase **P-IIe** son las **P-II** que liberan desintegrinas con motivos RGD heterodiméricas. Existen cuatro subclasificaciones de las **SVMPs** clase **P-III**, todas ellas presentan dominios desintegrina en su forma naciente y dominios ricos en cisteína. Estos dominios desintegrina con motivos RGD difieren de los de la clase **P-II** en la estructura de sus puentes bisulfuro en la ubicación del sitio de unión a integrina (RGD). En la subclase **P-IIIa** los dominios tipo

desintegrina y los dominios ricos en cisteína no son procesados de la proteasa, mientras que en la clase **P-IIIb** el “espaciador”, los dominios tipo desintegrina y los dominios ricos en cisteína son procesados proteolíticamente del dominio metaloproteasa. La subclase **P-IIIc** es una forma dimérica de la clase **P-IIIa**, mientras que la **P-IIId** está compuesta por la estructura de la **P-IIIa** con la adición de dominios tipo lectina unidos por dos puentes bisulfuro, acoplados postraduccionalmente a la estructura **P-IIIa**. Estas proteínas poseen principalmente actividad hemorrágica, proteolítica, fibrinolítica, apoptótica, inhibición de agregación plaquetaria, activación de macrófagos, activación del factor X y protrombina (Mackessy, 2010). Para *C. lepidus* se reportan **SVMP's** probablemente **P – III** basado en peso molecular (Martínez – Romero, et al., 2013).

1.4.2 Serin proteasas tipo trombina (SVSP)

Las **SVSP** comprenden un grupo creciente de enzimas que catalizan un amplio número de reacciones que involucran la cascada de coagulación, sistema de complemento, células endoteliales y plaquetas. **SVSP** individuales catalizan una o algunas de muchas reacciones envueltas en estos procesos. Un subgrupo de **SVSP**, “tipo trombina” o “trombin like” **SVSP (TL-SVSP)** contienen proteasas funcionalmente relacionadas con la trombina. Sus actividades biológicas se relacionan con la agregación plaquetaria, activación del factor VIII, son principalmente fibrinogenolíticas (Mackessy, 2010). Algunas de estas **TL-SVSP** tienen usos terapéuticos por ejemplo el Reptilase[®] se utiliza en el diagnóstico para disfibrinogenemia (Stocker, 1998).

1.4.3 Nucleasas, nucleotidasas y fosfomonoesterasas.

Los componentes del veneno de serpientes actuando en conjunto dentro de la presa, causan inmovilización e inician la digestión. Ciertas actividades farmacológicas han evolucionado entre algunas enzimas hidrolíticas de los venenos de serpientes, las cuales interfieren con numerosos procesos fisiológicos de la presa. Sin embargo, las enzimas hidrolíticas como las nucleasas (DNasa, RNasa y fosfodiesterasa), nucleotidasas (5' nucleotidasa, ATPasa y ADPasa), y fosfomonoesterasas (fosfomonoesterasas alcalinas y ácidas) no han sido estudiadas exhaustivamente y sus roles farmacológicos en los venenos no están claramente definidos. También muestran especificidades traslapadas y otras propiedades bioquímicas en común, causando incertidumbre acerca de su identidad en los venenos. Por ejemplo, las DNasas, RNasas y fosfodiesterasas comparten propiedades similares respecto a hidrolisis de substratos, pero difieren en su pH óptimo y el requerimiento del ion metálico para su actividad (Mackessy, 2010).

1.4.4 Fosfolipasas A₂.

Las fosfolipasas A₂ (**PLA₂**), son enzimas esterolíticas encontradas abundantemente en la naturaleza. Las **PLA₂** de bajo peso molecular (13-18 kDa) constituyen una familia de proteínas estructuralmente relacionadas que hidrolizan fosfolípidos en la posición *sn* – 2 en una manera dependiente de calcio, liberando ácidos grasos y lisofosfolípidos (Dennis, 1994). Son clasificadas en diferentes grupos de acuerdo a su estructura tridimensional, secuencia de aminoácidos, especificidad catalítica, y sitio de expresión, esta familia de enzimas se está expandiendo rápidamente. Las **PLA₂** presentes en venenos de serpientes pertenecen a los grupos I y II de **PLA₂**. (Mackessy, 2010). Las **PLA₂** de los venenos de serpientes son similares a las enzimas presentes en

mamíferos en sus estructuras primaria y secundaria, pero éstas inducen varios efectos farmacológicos en las presas. Estas enzimas se encuentran en los venenos comúnmente como monómeros y en ocasiones formando complejos con otras **PLA²** o con otras proteínas mediante uniones covalentes o no covalentes (Mackessy, 2010).

Los venenos de serpientes usualmente contienen muchas isoenzimas, por lo tanto, se debe de tener cuidado a la hora de su purificación. Estas isoenzimas pueden inducir diferentes efectos farmacológicos a través de su interacción con receptores/aceptores en proteínas. Esta interacción específica con su proteína blanco está mediada por sitios farmacológicos específicos en la superficie molecular (Mackessy, 2010). Una vez unido a su molécula blanco, éstas inducen sus efectos, los cuales pueden ser dependientes o independientes de su actividad enzimática (Mackessy, 2010).

Las **PLA₂** son conocidas por haber evolucionado a partir de una forma ancestral no tóxica (Mackessy, 2010). En serpientes de cascabel, todas las especies que producen veneno altamente tóxico se presenta la expresión del gen para crotoxina/toxina Mojave; esta neurotoxina presináptica es muy potente y le brinda mayor toxicidad al veneno (Da Silva *et al.*, 2014). La crotoxina (**Ctx**), un componente principal en el veneno de *C. durissus terrificus*, es un heterodímero formado por una subunidad básica: CB, y una ácida (crotapotina), CA. CB es una **PLA₂** Asp 49 que depende de la CA para unirse específicamente a la membrana celular (Bon *et al.*, 1979). Trabajando con ejemplares de cascabel de Mojave, *C. scutulatus scutulatus* se ha mostrado que la mayoría de los venenos muestreados hasta el momento poseen toxina Mojave. Estos venenos, si carecen de actividad hemorrágica, se denominan **venenos tipo A**. Por otra parte, algunas serpientes de esta misma especie capturadas en Arizona central, no poseen toxina Mojave, pero son capaces de producir hemorragia en animales de experimentación, estos venenos son

referidos como **venenos tipo B**. Hay un tercer tipo de veneno que contiene tanto actividad hemorrágica como toxina Mojave, a estos venenos se les conoce como **venenos tipo A + B** (Rael et al., 1993).

1.4.5 L-Aminoácido oxidasas.

Las L-Aminoácido oxidasas (**LAAO**) se encuentran ampliamente en los venenos de serpientes, esta enzima es altamente específica para L-Aminoácidos y generalmente los aminoácidos hidrófobos son los mejores sustratos. Las **LAAO** son flavoproteínas que consisten de dos subunidades idénticas, cada una con un peso molecular de 57 a 68 kDa. Las enzimas purificadas son glicoproteínas (3 a 4% carbohidratos). La desglicosilación de la enzima no altera su actividad enzimática, pero parece alterar su actividad farmacológica. La secuencia de aminoácidos de las **LAAO** del veneno de serpientes muestra un alto grado de homología (Mackessy, 2010). Un análisis estructural mediante el uso de rayos X revela un sitio activo dinámico y la presencia de tres dominios: un dominio de unión a FAD, un dominio de unión al sustrato, y un dominio helicoidal. Estudios recientes muestran que las **LAAO** son enzimas multifuncionales, siendo inductoras de edemas, inductoras o inhibidoras de agregación plaquetaria, inductoras de canal, así como efectos anti-bacteriales, anticoagulantes y anti VIH (Mackessy, 2010). Las **LAAO** pueden ser encontradas en venenos de la mayoría de los géneros de serpientes. La fuente más importante de **LAAO** son los venenos de las serpientes de la subfamilia crotalinae. Esta enzima constituye del 1 al 4% del veneno (Mackessy, 2010).

1.4.6 Agentes anti-plaquetarios.

Es importante para la hemostasia, la detención espontánea de la pérdida de sangre de vasos rotos, esto implica la interacción de varios procesos, tales como la vasoconstricción, activación y agregación de plaquetas, coagulación de la sangre y fibrinólisis. En respuesta a una lesión vascular, las plaquetas se adhieren de manera instantánea al tejido sub-endotelial a través de la presencia del colágeno expuesto, fibronectina y el factor Von Willebrand, vía sus receptores en plaquetas; integrina $\alpha 2 \beta 1$, integrina $\alpha 5 \beta 1$, y glicoproteína Ib-IX. La agregación plaquetaria ocurre a través de la interacción entre el receptor de integrina $\alpha \text{IIb} \beta 3$ y fibrinógeno, llevando a la formación de un trombo plaquetario, el cual cubre los vasos expuestos. En adición las plaquetas activadas también proveen superficies para la activación de múltiples pasos en la coagulación sanguínea (Koh y Manjunatha, 2011). Muchos factores exógenos aislados del veneno de serpientes y otros animales afectan la función de las plaquetas. Muchos han sido usados como bases para estudiar la función plaquetaria y diseñar agentes antiplaquetarios (Koh y Manjunatha, 2011). Estas moléculas pertenecen a diferentes clases estructurales de toxinas de veneno de serpientes y actúan a través de diferentes mecanismos. Estas moléculas incluyen; **desintegrinas**, **proteínas tipo lectinas C**, **PLA₂**, **SVSP**, **SVMP**, nucleotidasas, y **LAAO**. Estos componentes del veneno pueden cumplir un papel similar (Lomonte *et al.*, 2009), relacionado con la inmovilización de las presas de estos reptiles (Camacho *et al.*, 2014), debido a que evolucionaron para interferir en algunos de sus procesos fisiológicos clave (Fry *et al.*, 2008). Por ejemplo, la digestión de tejidos, que se ha pensado generalmente que es realizada por proteasas, especialmente **SVMP**. Sin embargo, existe la posibilidad de que toxinas que inducen necrosis muscular sistémica como la **PLA₂** o la **Ctx**, pueden contribuir a la digestión de masa muscular

haciendo que sea digerida más fácilmente por proteasas intracelulares, así como por secreciones gástricas y pancreáticas (Lomonte *et al.*, 2009). La naturaleza diversa de su estructura, potencia y especificidad, provee múltiples posibilidades para el desarrollo de agentes antiplaquetarios. El mayor de los esfuerzos en el desarrollo de agentes antiplaquetarios a partir de veneno de serpientes se ha concentrado en las desintegrinas, que se describen en el siguiente capítulo (Koh y Manjunatha, 2011).

1.4.7 DESINTEGRINAS

El veneno de serpientes posee gran cantidad de componentes farmacológicamente activos que han demostrado su potencial para el tratamiento de enfermedades en el humano (Mackessy, 2010; Hodgson y Wickramaratna, 2002). Además de constituir una fuente para la obtención de antídotos utilizados para la terapia específica de envenenamiento por mordedura de serpiente (Bénard-Valle *et al.*, 2014), actualmente existen cuatro medicamentos obtenidos del veneno de serpiente aprobados por la FDA (King, 2011). Dos de ellos, son los agentes antiplaquetarios tirofiban (Aggrastat[®]) y eptifibatide (Integrillin[®]) los cuales fueron desarrollados a partir de desintegrinas aisladas del veneno de *Echis carinatus* (echistatina) (Chen *et al.*, 1991; Saudek *et al.*, 1991) y *Sistrurus miliarius barbouri* (barbourina) (Scarborough *et al.*, 1991) respectivamente (**APÉNDICE A**).

Las desintegrinas, descritas inicialmente por Huang *et al.*, (1987), comprenden una familia de proteínas de bajo peso molecular ricas en cisteína encontradas de manera exclusiva en venenos de serpientes, principalmente de la familia Viperidae (Mackessy, 2010), éstas provienen del procesamiento proteolítico de las metaloproteinasas P-II

(SVMP) precursoras (Kini y Evans, 1992; Shimokawa *et al.*, 1996). A la fecha actual se han descrito alrededor de 100 desintegrinas (McLane *et al.*, 2008), de las cuales, provenientes de serpientes endémicas mexicanas únicamente dos desintegrinas han sido descritas: basilicin aislada de *C. basiliscus* (Scarborough *et al.*, 1993) y morulustatin aislada de *C. morulus* (Borja *et al.*, 2016), representando apenas el 6% de las especies mexicanas endémicas (Rivas-Mercado y Garza-Ocañas, 2017).

Según la longitud de su cadena de aminoácidos, así como el contenido de puentes disulfuro (SS), las desintegrinas pueden ser clasificadas como: cortas, compuestas de 41 a 51 aminoácidos y cuatro puentes SS. Medianas, con alrededor de 70 aminoácidos y seis puentes SS. Largas, con alrededor de 84 aminoácidos y siete puentes SS. Finalmente las desintegrinas homo y heterodiméricas conforman un grupo aparte, las desintegrinas diméricas, formadas por subunidades de alrededor de 67 aminoácidos y 10 cisteínas involucradas en la formación de cuatro puentes SS intracatenarios y dos intercatenarios (Calvete, 2013 Calvete, 2000).

Incluidas en sus secuencias aminoacídicas se presenta un tripéptido denominado: dominio de unión, el cual permite clasificar a las desintegrinas en subfamilias, actualmente se reportan como: RGD, MLD y R/KTS (Walsh, 2011). Basados en su actividad inhibitoria, la clasificación incluye desintegrinas RGD, las cuales bloquean integrinas $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_{11b}\beta_3$ (Calvete *et al.*, 2009a). Las desintegrinas con dominio MLD, hasta el momento reportado de manera exclusiva, en desintegrinas heterodiméricas, bloquean integrinas $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$ y $\alpha_4\beta_1$, estas dos últimas presentes en neutrófilos, células endoteliales y linfocitos-T respectivamente (Bazan-Socha *et al.*, 2004; Coelho *et al.*, 2004; Saldanha-Gama *et al.*, 2010). Por otra parte, desintegrinas de las

subfamilias VGD y MGD que bloquean $\alpha_5\beta_1$ y KGD la cual bloquea $\alpha_{IIb}\beta_3$ con un alto grado de selectividad. Se ha reportado que las desintegrinas WGD son potentes inhibidores de integrinas dependientes de RGD tales como $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_{IIb}\beta_3$. Además, la función de adhesión de las integrinas mencionadas es también bloqueada por desintegrinas MVD, mientras que las desintegrinas con dominios KTS o RTS inhiben integrinas $\alpha_1\beta_1$ (Sanz *et al.*, 2006; Calvete *et al.*, 2009b).

Las propiedades moduladoras de las desintegrinas han sido reportadas en investigaciones sobre angiogénesis, metástasis tumorales e inmunosupresión por diabetes mellitus y asma, así como en estudios *in vitro* sobre procesos neurodegenerativos y apoptosis (Walsh y Marcinkiewicz, 2011). Esta familia de proteínas tiene la capacidad de bloquear la función de receptores integrina con alto grado de selectividad, y este bloqueo selectivo de integrinas se ha convertido en un objetivo deseable para la terapia de diversas condiciones patológicas, incluyendo isquemia coronaria aguda y trombosis ($\alpha_{IIb}\beta_3$), metástasis tumoral, osteoporosis, restenosis y artritis reumatoide ($\alpha_v\beta_3$), infecciones bacterianas y enfermedades vasculares ($\alpha_5\beta_1$), inflamación y enfermedades autoinmunes ($\alpha_4\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$), así como angiogénesis tumoral ($\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_v\beta_3$) (Mackessy, 2010). Por otra parte, las integrinas comprenden una familia de receptores transmembrana conocidos como, receptores de adhesión, y están formados por asociación covalente entre subunidades α (18 descritas) y β (8 descritas), conformando un total de 24 receptores integrina reportados a la fecha actual (Barczyk *et al.*, 2010). Dado que, el repertorio de integrinas presentes en una célula dada dictará el grado en el que dicha célula se adherirá y migrará sobre diferentes matrices (Desgrocetier y Cheresh, 2010). Estas además actúan como transductores bidireccionales de señal y regulan diversas funciones tanto en células

sanas como tumorales, ejemplos de estas funciones son: proliferación, supervivencia, migración, angiogénesis, apoptosis, entre otras (Aplin *et al.*, 1999). La expresión de integrinas puede variar de manera considerable entre células normales y tumorales. Un ejemplo lo comprenden las integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_5\beta_1$ usualmente expresadas a niveles bajos o indetectables en el tejido epitelial adulto, pero altamente expresadas en algunos tumores (Desgrosellier y Cheresch, 2010). Por el contrario, la integrina $\alpha_2\beta_1$ se observa disminuida o ausente en adenocarcinoma de mama y en otro tipo de malignidades epiteliales (Albelda, 1993), y su re-expresión en células de cáncer de mama provocó reversión de algunas de las propiedades de malignidad en esas células, sugiriendo a la integrina $\alpha_2\beta_1$ como posible supresor de tumores (Zutter *et al.*, 1995). En fibroblastos, la integrina $\alpha_1\beta_1$ regula a la baja al colágeno y la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), además de promover la proliferación celular (Senger *et al.*, 1997). Aunado a lo anterior, se ha identificado la función crítica y colaborativa de las integrinas $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_2\beta_1$ provocando transducción de señalización mediante VEGF y migración celular endotelial (Senger *et al.*, 2002). Otro de los efectos a través de la unión de integrinas con sus respectivos ligandos, principalmente proteínas de matriz extracelular (MEC), las integrinas forman “clusters” en un determinado sitio (en plano) de la membrana y reclutan diversas proteínas señalizadoras adaptadoras para formar estructuras conocidas como adhesiones focales. Aunque las integrinas carecen de actividad tipo quinasa, mediante su reclutamiento activan a quinasas tales como las quinasas de adhesión focal (FAK's) o la familia de quinasas Src (SFK's). Este tipo de señalización a través de FAK se ha reportado que juega un papel crítico en la migración celular así como en la regulación de la supervivencia de la célula y la progresión del ciclo celular (Carragher y Frame, 2004;

Mitra y Schlaepfer, 2006). Debido a lo anterior, en años recientes, se ha logrado un progreso respecto al bloqueo de integrinas en cáncer, por ejemplo, los estudios en fase clínica II con cilengitide (desarrollado por Merck KGaA), un antagonista de integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ mostraron buenos resultados y pocos efectos adversos en pacientes con glioblastoma, lo que ha permitido el inicio de los estudios en fase clínica III. El avance de los antagonistas de integrinas en la clínica resalta la importancia de continuar la investigación en esta área, con fines de determinar el rol que las integrinas tienen en la progresión de tumores identificando factores que pudiesen influir en la eficacia de estos inhibidores (Desgrosellier y Cheresch, 2010). Debido a su capacidad para bloquear receptores integrina, las desintegrinas se han convertido en uno de los componentes del veneno mas estudiados en la actualidad (Saviola *et al.*, 2015).

JUSTIFICACIÓN

Las desintegrinas son péptidos de bajo peso molecular encontradas en el veneno de serpientes, que actúan como antagonistas de receptores de integrina. Las integrinas juegan un papel crucial en el desarrollo de angiogénesis, crecimiento y metástasis de tumores, por lo que son consideradas como un importante blanco terapéutico.

Crotalus totonacus es una una serpiente de cascabel endémica de México. Dado el potencial farmacológico de las desintegrinas, en el presente estudio, se consideró relevante realizar la caracterización de las desintegrinas de su veneno así como evaluar su potencial como moléculas con actividad farmacológica.

OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar las desintegrinas de *C. totonacus* y evaluar su actividad biológica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener el veneno de *Crotalus totonacus*.
2. Aislar las desintegrinas del veneno.
3. Evaluar actividad biológica de desintegrinas
4. Realizar la caracterización toxicológica del veneno: contenido de crotoxina, letalidad (DL_{50}), actividad procoagulante y proteolítica.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Obtención del veneno de *C. totonacus*.

2.1.1 Muestreo

Se realizaron muestreos exhaustivos en el estado de Nuevo León, del mes de junio a octubre del 2016 en los municipios de Monterrey, Guadalupe, Juárez y Santiago, haciendo recorridos diurnos (de 09:00 h a 15:00 h) y nocturnos (de 18:00 h. a 23:00 h). Permiso de colecta SEMARNAT-SGPA/DGVS/05710/16.

2.1.2 Manejo de las serpientes y extracción de veneno

Las serpientes fueron colectadas directamente en campo. El manejo se realizó mediante el uso de pinzas, ganchos herpetológicos así como tubos de contención, este material permite manipular al animal de manera segura para el manejador y para la serpiente, generando en el ejemplar menos estrés, tal como lo marcan los protocolos de manejo (Meebs, 2002; Fry, 2015). La extracción del veneno se realizó en campo, permitiendo a las serpientes morder un vaso de precipitado de 50 mL cubierto con parafilm, una vez realizado este proceso, el veneno se depositó en tubos eppendorf de 1 mL y fue congelado (-60 °C). Las muestras se almacenaron congeladas hasta su uso.

2.1.3 Liofilización del veneno

Una vez realizada la extracción de veneno de *C. totonacus*, éste fue resuspendido en acetato de amonio 20 mM pH 4.7 y se centrifugó por 3 minutos a 12,000 rpm. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se congeló a -70 °C por 24 horas y se liofilizó a -50 °C y 25 pa durante la noche.

2.1.4 Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína se realizó mediante absorbancia a 280 nm ($A_{280\text{ nm}} = \text{mg/ml}$) de las muestras de cada una de las serpientes.

1. Se hicieron diluciones de la muestra en PBS.
2. Se tomó absorbancia a 280 nm del blanco (PBS).
3. Se tomó absorbancia a 280 nm de las muestras.
4. El valor de la absorbancia se multiplicó por la dilución que se utilizó para dichas muestras.

2.2 Aislamiento de desintegrinas en veneno de *C. totonacus*

El aislamiento de desintegrinas del veneno de *C. totonacus* se realizó en dos etapas de separación por cromatografía: la primera etapa consistió en cromatografía por exclusión molecular (SE-LC), la cual permitió la separación de 120-180 mg de veneno por cada corrida. Las fracciones obtenidas por SE-LC se analizaron mediante SDS-PAGE, las fracciones en las que se observaron bandas con pesos moleculares reportados para desintegrinas (4-14 kDa) se pasaron por la segunda etapa de purificación, la cual se realizó mediante RP-HPLC, las fracciones eluidas en tiempos de retención reportados para

desintegrinas fueron analizadas por SDS-PAGE, además, se les evaluó la actividad típica de este tipo de proteínas: inhibición de agregación plaquetaria.

2.2.1 Cromatografía por exclusión molecular (SE-LC)

Con el objetivo de purificar mayor cantidad de veneno (>100mg), se añadió la SE-LC como paso de purificación previo a la purificación mediante RP-HPLC.

1. Se equilibró la columna con acetato de amonio 20 mM pH 4.7 a temperatura ambiente, a flujo aproximado de 25-30 mL/hora.
2. En dos racks número 2, se colocaron los tubos para cromatografía (limpios y secos) y se encendió el colector de fracciones.
3. Se pesaron los reactivos utilizados como marcadores: azul de dextrán 3.8 mg, ovoalbúmina 4.1 mg, lisozima 4 mg y NaCl 58.4 mg y se resuspendieron en 1.5 mL de acetato de amonio 20 mM. Se centrifugó la mezcla con los estándares por 5 minutos a 14000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, para eliminar cualquier impureza.
4. Se modificó el flujo de la columna a 14 mL/hora. Posteriormente se cargaron los estándares de manera suave, resbalando el líquido por las paredes de la resina, una vez éstos difundieron a través de la resina, se añadieron 5 mL del mismo buffer y se reconectó la columna al suministro de éste y se reajustó el flujo a 14 mL/hora.
5. Una vez colectados los tubos de los 2 racks, se determinó para cada tubo, absorbancia a 214, 260, 280 y 320 nm en espectrofotómetro Agilent.

6. Los datos fueron analizados mediante el software Prisma y Excel, se graficó número de tubo contra absorbancia a 280 nm.
7. Con base en la gráfica resultante, se determinaron las fracciones (picos) y se juntó el contenido de los tubos correspondientes en probeta para medir el volumen final, transferirlo y almacenarlo congelado a -20 °C.
8. El volumen real para cada fracción se calculó dividiendo cada fracción entre el número de tubos que la conformaron. Posteriormente mediante el uso del software Prisma, se graficó volumen (mL) contra absorbancia 280 nm. Para el caso de la sal NaCl, mediante el uso de conductímetro, se determinó la conductividad de la fracción que la contuvo (última fracción) y se graficó volumen (mL) contra conductividad en el Software Prisma.
9. Se resuspendieron 120 mg de veneno de *C. totonacus* en 1.5 mL de acetato de amonio 20 mM y previo a colocar el veneno en la columna: se centrifugaron por 5 minutos a 14,000 rpm con la finalidad de eliminar impurezas antes de inyectar a columna. Posteriormente se cuantificó mediante absorbancia a 280 nm.
10. Se cargó el veneno en columna y se repitieron los pasos del 4 al 8.
11. Para cada una de las fracciones (picos) resultantes se midió absorbancia a 280 nm para la elaboración de la tabla de rendimiento.
12. De cada fracción, se tomaron 10 -15 µg para analizar en SDS-PAGE, el resto se almacenó en congelación (-20 °C) para ser purificada posteriormente mediante RP-HPLC.

2.2.2 Cromatografía líquida de alta resolución, fase reversa (RP-HPLC)

Para cada corrida con fracciones provenientes de SE-LC del veneno de *C. totonacus*, se cargaron de 1 - 3 mg de la fracción de SE-LC resuspendida en buffer de fosfatos (PBS), las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm por 5 min para retirar impurezas antes de su inyección en la columna C₁₈.

Fase móvil:

- a). **Solución A:** Agua + 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA).
- b). **Solución B:** Acetonitrilo + 0.1% de TFA.

Fase estacionaria:

Columna C₁₈ analítica.

Previo a la inyección de la muestra, la columna se lavó con 100% de la solución B durante 15 min y se estabilizó con 100% de la solución A durante 15 minutos.

Tabla 2. Gradiente de elución RP-HPLC

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%A	%B
0	1	100	0
5	1	100	0
15	1	85	15
75	1	55	45
85	1	30	70
94	1	30	70

2.2.3 Inhibición de agregación plaquetaria inducida por ADP

Tratamiento del material de vidrio con surfacil en tolueno (*siliconización*)

Se evitó el contacto de sangre o PRP con vidrio, debido a que esto estimula la vía extrínseca de la coagulación y/o induce agregación de las plaquetas. Debido a esto, las pipetas Pasteur, tubos de vidrio, celdillas para espectrofotómetro se siliconizaron con surfacil en tolueno proporción 10:1 (v/v).

1. Se sumergieron durante 30 minutos y se dejaron secar en campana de extracción.
2. Posteriormente se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Inhibición de agregación plaquetaria.

1. Se incubó plasma rico en plaquetas (PRP) en baño de agua a 37 °C, manteniéndose así durante el transcurso del ensayo.
2. Se leyó absorbancia del PRP a 600 nm en espectrofotómetro BioMate 3S (Thermo Scientific) utilizando celdilla de poliestireno y ajustando a cero con solución salina (NaCl 0.154 M, pH 7.4).
3. En tubo de poliestireno (25 X 95 mm) para centrífuga, se introdujo un imán pequeño cubierto de polietileno, se acomodó sobre agitador magnético justo por debajo del baño de agua a 37 °C, se añadieron 400 µl de PRP en el tubo con la barra imantada, adicionando la fracción de veneno a probar (4 µM) o de PBS (control) y se pre-incubó a 37°C por 5 minutos.
4. Posterior a la pre-incubación (tiempo cero) se adicionaron 200 µl del inductor de agregación correspondiente (ADP 20 µM).

5. La lectura inicial (tiempo cero) se tomó después de un golpe de agitación vigorosa (aproximadamente 1 segundo), suspendiendo la agitación y tomando lectura de absorbancia Abs a 600 nm.
6. El proceso anterior se repitió cada 5 minutos hasta completar 5 lecturas (T₁ a T₅).
7. Mediante el uso de Excel, se graficó tiempo de incubación (min) vs absorbancia a 600 nm.

2.2.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de Dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)

Los reactivos y el procedimiento para la elaboración de los geles concentrador y separador, son descritos en el **APENDICE B**.

Para cada gel, se cargaron 25 µg del veneno de *C. totonacus* (veneno completo o fracciones), adicionalmente, se cargaron 25 µg del marcador de peso molecular, las corridas se realizaron en condiciones reductoras (β -mercaptoetanol) y no reductoras a 200 V por 45 minutos.

Los geles se tiñeron sumergiéndolos en azul de Coomasie durante toda la noche, posteriormente fueron desteñidos con 10% metanol + 10% ácido acético en agua desionizada.

Finalmente, los geles fueron escaneados para su análisis.

2.3 Evaluación de la actividad biológica de desintegrinas in vitro

2.3.1 Líneas celulares

Las líneas celulares empleadas fueron MDA-MB-231 (ATCC[®] CRM-HTB-26), cáncer de mama de origen humano y HMEC-1 (ATCC[®] CRL-3243), endotelio de origen humano. Los medios de cultivo específicos para cada línea celular así como las condiciones específicas de cultivo recomendados por el fabricante se muestran en **APENDICE C**.

2.3.2 Preparación de medio L-15 (Leibovitz)

1. En vaso de precipitado de 1 Litro, se colocó el 90% del volumen total de agua destilada (1 L), a temperatura ambiente 25-30 °C.
2. Manteniendo el agua en agitación suave, se añadió el total del polvo contenido en el vial, agitándolo sin calentar hasta que se disolvió.
3. Con un volumen pequeño de agua (40 mL) se enjuagó el vial que contuvo el polvo del medio y se añadió a la solución en el paso 2.
4. Mientras se mantuvo en agitación, se ajustó pH de 0.1-0.3 unidades por debajo del pH deseado (7.3) ya que puede incrementarse durante la filtración. Se recomienda el uso de HCl 1N o NaOH 1N.
5. Se aforó a 1 L con agua destilada a temperatura ambiente.
6. Inmediatamente después, fue esterilizado mediante filtración con porosidad de membrana de 0.22 μ .

7. Se alicuotó el medio en frascos estériles de 100 y 200 mL, y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

2.3.3 Preparación de medio MCDB-131

1. En vaso de precipitado de 1 Litro, se colocó el 90% del volumen total de agua destilada (1 L), a temperatura ambiente 25-30 °C.
2. Manteniendo el agua en agitación suave, se añadió el total del polvo contenido en el vial, agitándolo sin calentar hasta que se disolvió.
3. Con un volumen pequeño de agua (40 mL) se enjuagó el vial que contuvo el polvo del medio y se añadió a la solución en el paso 2.
4. Se añadieron 1.18 g de bicarbonato de sodio y se mantuvo en agitación hasta disolver completamente.
5. Mientras se mantuvo en agitación, se ajustó pH de 0.1-0.3 unidades por debajo del pH deseado (7.3) ya que puede incrementarse durante la filtración. Se recomienda el uso de HCl 1N o NaOH 1N.
6. Se aforó a 1 L con agua destilada a temperatura ambiente.
7. Por recomendación del fabricante, se suplementó el medio con 50 µL de una solución stock a 0.2 mg/mL de factor de crecimiento epidermal (EGF), para llevar a concentración final de 10 ng/mL.
8. Por recomendación del fabricante, se suplementó el medio con 1 mg de hidrocortizona para llevar a concentración de 1 µg/mL.

9. Inmediatamente después, fue esterilizado mediante filtración con porosidad de membrana de 0.22 μm .
10. Se alicuotó el medio en frascos estériles de 100 y 200 mL, y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

2.3.4 Tripzinización

1. Se pesaron 100 mg de tripsina y se diluyeron en 40 mL de PBS pH 7.3, se almacenó congelada (-4 °C) hasta su uso.
2. En campana de flujo, se retiró el medio de cada frasco con el cuidado de no dañar la monocapa.
3. Se añadió 1 mL de tripsina y se incubaron las células a 37 °C por 5-10 min, hasta que se desprendió la monocapa.
4. Se añadieron 2 mL de medio de cultivo al frasco con tripsina para inactivarla (volumen total en cada frasco 3 mL), se resuspendieron las células y se dividió el contenido en 3 frascos de cultivo estériles.
5. A cada frasco se le añadieron 5 mL de medio del respectivo medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino (SFB) a 10%.
6. Incubación a 37 °C.

Nota: Para las células HMEC-1 se requirió atmósfera con 5% de CO₂, mientras que las células MDA-MB-231 no requirieron de CO₂ para su cultivo (**APÉNDICE C**)

2.3.5 Sembrado de células en placa

1. Previo al sembrado de las células en la placa se verificó su integridad bajo invertoscopio.
2. En campana de flujo laminar y condiciones de esterilidad; se retiró el medio de cultivo del frasco y se añadió 1 mL de tripsina (2.5 mg/mL diluida en PBS pH 7.3).
3. Incubación de 5 a 10 minutos (hasta observar desprendimiento de la monocapa), a la par, se calculó la preparación del medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10%. Placa de 96 pozos, 0.1 mL/ pozo.
4. Transcurrida la incubación y desprendida la monocapa del frasco, se añadieron 2 mL de medio de cultivo y se colocó la suspensión celular (3mL) en vaso de precipitado, se tomó una gota para conteo de células en cámara Neubauer para ajustar a concentración deseada.
5. Una vez ajustada la concentración, se vaciaron 100 μ L de la suspensión a cada pozo (20,000 células/pozo), la placa se colocó en incubación a 37 °C hasta que ocurra la adhesión.

2.3.6 Evaluación de citotoxicidad mediante prueba del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)

1. Las desintegrinas fueron resuspendidas en PBS y se ajustó concentración a 12 μM .
2. Se retiró el medio de cultivo de la placa (con monocapa en pozos) aspirando gentilmente con pipeta Pasteur de vidrio, teniendo cuidado de no tocar el fondo de los pozos.
3. Se añadieron 100 μL de medio de cultivo nuevo, sin SFB a toda la placa (96 pozos), excepto primera columna.
4. En la primera columna se colocaron 200 μL de desintegrina (12 μM), y se realizaron
5. Se añadieron 100 μL del medio de cultivo sin SFB a toda la placa (volumen final de 200 μL) y se incubó a 37 °C por 24 horas.
6. Se disolvieron 6 mg de MTT en 12 mL de medio de cultivo sin SFB.
7. Se retiró el medio de cultivo a la placa y se agregaron 100 μL /pozo de la solución de MTT y la placa se incubó a 37 °C por 3 horas.
8. Posterior a la incubación, se retiró la solución MTT y se agregaron 200 μL de una solución de alcohol isopropílico con HCl al 0.4 N.
9. Se almacenó la placa en oscuridad a temperatura ambiente (25 °C) durante 30 minutos.
10. Se midió absorbancia a 570 nm, utilizando un lector de ELISA.
11. Las absorbancias fueron transformadas a porcentaje de viabilidad, mediante el uso del software Prisma se graficó % de viabilidad celular contra concentración de la desintegrina [μM].

2.3.7 Inhibición de adhesión a proteínas de matriz extracelular (MEC)

1. Se cargaron placas de 96 pozos con 1 μg /pozo de: fibronectina, vitronectina y laminina disuelta en PBS 0.01M, pH 7.3
2. Incubación durante la noche a 4 °C y 2 horas antes de usarse se colocaron a temperatura ambiente (~25 °C).
3. Se lavó excedente de proteína con 100 μL /pozo de solución de lavado (medio de cultivo conteniendo 0.2% de BSA, m/v).
4. Posterior al lavado, las placas se bloquearon con 200 μL /pozo de solución de bloqueo (medio de cultivo conteniendo 2% de BSA) e incubar por 2h a 37°C.
5. A la par del bloqueo de las placas, se colectaron las células con tripsina 2.5 mg/mL en PBS 0.01M pH7.3 e incubación a 37 °C por 5 - 10 min. Se resuspendieron las células en medio de cultivo conteniendo 10% SFB y 1% de BSA, se ajustó la concentración de la suspensión celular a 5×10^5 cel/ml de ahí se tomaró el volumen para alicuotar (800 μL /alícuota).
6. Las desintegrinas fueron añadidas en concentraciones decrecientes (3, 1.5, 0.75, 0.37, 0.18 y 0.09 μM) en volumen final de 100 μL y se colocaron en incubación a 37 °C por 1 hora.
7. Después de 2 horas de bloqueo de la placa, se aspiró la solución de bloqueo (medio de cultivo conteniendo 2 % BSA) y se realizaron 2 lavados utilizando la solución de medio de cultivo conteniendo 0.2 % BSA.
8. Una vez lavada la placa, se sembraron 100 μL /pozo de células preincubadas con desintegrina y se colocaron en incubación a 37 °C por 2 horas para permitir la adhesión.

9. Tras la incubación, se realizaron 2 lavados para retirar células no adheridas utilizando 100 μL /pozo de solución de medio de cultivo conteniendo 0.2 % BSA.
10. Se añadieron 100 μL /pozo de medio de cultivo (sin SFB) conteniendo 1.5 mg/mL MTT y se colocaron en incubación a 37 °C por 3 horas.
11. Posterior a la incubación, se retiró el medio conteniendo MTT y se añadieron 100 μL /pozo de DMSO.
12. Se incubaron en oscuridad por 1 hora a temperatura ambiente (25 °C), para finalmente leer absorbancia a 570 nm.
13. El porcentaje de inhibición se calculó con la fórmula: % Inhibición = $(A_c - A_t) / A_c$. Donde A_c indica la absorbancia del control, A_t indica absorbancia del tratamiento (células preincubadas con desintegrinas). Se graficó porcentaje de inhibición contra concentración μM de desintegrinas.

2.3.8 Inhibición de migración celular

1. Se sembraron placas de 96 pozos con 20,000 células/pozo, se colocaron en incubación a 37 °C por 24 horas.
2. Después de la incubación, se les retiró el medio de cultivo y con el uso de una punta de micropipeta estéril, se realizó una “rayadura” partiendo en dos la monocapa y dejando un espacio sin células en el centro de cada pozo.
3. Se realizaron 2 lavados con medio de cultivo sin SFB con la finalidad de retirar las células desprendidas.
4. $\frac{1}{4}$ Se agregaron 100 μL de desintegrina 3 μM o Tris-HCl 0.2M pH 8.0 (control) a la placa conteniendo la monocapa celular.

5. Previo a que se colocaran en incubación a 37 °C, se observaron bajo invertoscopio para la toma de imágenes al tiempo cero (T_0). A partir de este paso, las células fueron mantenidas en incubación y sólo se les retiró a las 12 y 24 horas para captura de imágenes.
6. El porcentaje de migración celular se calculó con la ecuación: $[(C - E)/C] \times 100$, donde, C es la distancia (mm) entre los bordes celulares al T_0 del control y E es la distancia entre los bordes celulares de la monocapa al tiempo final de incubación (24 horas).
7. Las imágenes fueron analizadas con el software Image J. Se graficó porcentaje de migración celular para cada línea celular (MDA-MB-231 y HMEC-1), control vs tratamiento.

2.4 Caracterización toxicológica del veneno de *C. totonacus*

2.4.1 Determinación del contenido de crotoxina (Ctx) mediante ELISA

1. Se sensibilizaron placas NUPEC con el anticuerpo 4F6 y 2F9 anti-crotoxina (Hernández, 2013) y solución de sensibilizado (Buffer de bicarbonatos pH 9.5) a una concentración de 2 µg/mL, incubando durante una hora a 37°C.
2. Al término de la incubación se desechó la solución de sensibilizado y se agregaron 200 µL de solución de lavado (Tris 1M pH 8 + NaCl 5M + Tween 20). El proceso se repitió tres veces.
3. Se añadieron 200 µL/pozo de solución de bloqueo (Tris 1M pH 8 / gelatina / Tween 20) y la placa se incubó por 2 horas a 37°C.
4. Se realizaron 3 lavados a toda la placa.
5. Se añadieron 150 µL a una placa de 96 pozos de la siguiente forma: pozos A, B estándar (crotoxina), C, D, E, veneno de *C. totonacus* a 25 µg/mL (muestra a evaluar), F, G y H, control positivo (veneno de *C. scutulatus*), se realizaron diluciones 12 diluciones seriadas 1:3
6. Incubación por 1 hora a 37 °C, posteriormente se realizaron 3 lavados.
7. Se añadieron 100 µL de anticuerpo policlonal anti-crotoxina (1 µg/mL), se incubó la placa a 37 °C por 1 hora.
8. Se añadieron 100 µL del anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) en dilución 1:3000, se incubó la placa a 37 °C por 1 hora, para posteriormente realizar 3 lavados.

9. Se reveló la placa con una mezcla de 1 mL de buffer para Ácido 2,2' – azinobis (3- etilbenzotiazolín) -6-sulfónico (ABTS). 75 µL de ABTS, aforado a 10 mL con agua destilada. Incubación a temperatura ambiente (25 °C), en oscuridad.

2.4.2 Letalidad (DL₅₀) del veneno en ratón

Se utilizaron ratones ICR de 18 a 20 g de peso de ambos sexos.

1. Se seleccionaron dosis de veneno, para obtener un 100% de supervivencia y 100% de mortalidad. Se formaron grupos de 3 ratones por dosis. Como control se utilizó NaCl 150 mM.
2. Una vez obtenida la dosis donde se presenta 100% de supervivencia y 100% mortalidad, se seleccionaron 2 dosis intermedias en este rango, las cuales fueron inyectadas en dos grupos de 3 ratones para cada dosis.
3. Se registró el porcentaje de mortalidad a las 24 horas posteriores a la administración.
4. Los datos se procesaron con el software GraphPad Prism 4.

Para obtener la DL₅₀ se graficó el porcentaje de mortalidad en función del logaritmo de la dosis de veneno inyectado por grupo. Estos datos fueron analizados utilizando una regresión no lineal (Curva dosis-respuesta de pendiente variable) en el software Graphpad Prism 4.0. La DL₅₀ fue definida como la dosis de veneno que causa la muerte a la mitad de la población de ratones (Theackston & Reid, 1983).

2.4.3 Actividad procoagulante

1. Se colocaron 200 μL de plasma en tubos de ensayo de vidrio (15 tubos) y se incubaron por 3 min a 37°C .
2. Se añadieron 20 μL de veneno de *C. totonacus* (concentraciones crecientes: 50, 75, 100, 125, 150 μg) a cada muestra y se midió el tiempo transcurrido desde la inyección del veneno hasta la formación del coagulo. Se utilizó veneno de *Bothrops asper* (10, 15, 20, 25 y 30 μg) como control positivo.

La dosis mínima procoagulante (DMP). Se define como la cantidad de veneno necesaria para evidenciar la formación de un coagulo en 60 segundos (Theakston y Reid, 1983; Gené *et al.*, 1989).

2.4.4 Actividad proteolítica

1. Se pesaron y colocaron 5 mg de sustrato “hide powder azure” (HPA) en tubos eppendorff de 2 mL (por triplicado).
2. Se colocaron 100 μg del veneno de *C. totonacus* en cada tubo y el volumen se aforó a 1 mL con TRIS/HCl 0.1 M, pH 8.0
3. Incubación a temperatura ambiente (25°C).
4. Las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm por 5 minutos para posteriormente leer absorbancia del sobrenadante a 595 nm.

La unidad de actividad enzimática (U), se definió como la cantidad de veneno necesaria para digerir 1 mg de HPA en un periodo de 2 horas a temperatura ambiente (25 °C) y se reportó como actividad específica (U/mg) (Rivas *et al.*, 2017; Borja *et al.*, 2018).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Obtención del veneno de *C. totonacus*

Se colectó el veneno de un total de 14 serpientes *C. totonacus* adultas, de las localidades situadas en el municipio de Juarez y Guadalupe, Nuevo León. Cd. Victoria, Tamaulipas. Tanto las localidades como el veneno obtenido por cada ordeña de la serpiente se muestra en la **tabla 3**. Los ejemplares Cto1, Cto2 y Cto4 fueron ordeñados dos veces. De ejemplares adultos se logró obtener hasta 253 mg de una sola extracción (Cto6). En contraste, de los ejemplares juveniles Cto23 y Cto24 se obtuvieron 33 mg.

3.2 Aislamiento de desintegrinas del veneno de *C. totonacus*

De la SE-LC, se obtuvieron 7 fracciones, de las cuales se evaluó el patrón de bandas mediante SDS-PAGE. La fracción 5 mostró las dos bandas de menor peso molecular, mismas que coincidieron con los rangos de peso reportados para desintegrinas (4-14 kDa), (Huang *et al.* 1987; Scarborough *et al.* 1993; Marcinkiewicz *et al.* 1999; Zhou *et al.* 2000), (**Figura 2**), por lo que dicha fracción 5 fue posteriormente re-fraccionada mediante RP-HPLC.

Tabla 3. Obtención de veneno de ejemplares de *C. totonacus*

Marcaje	Localidad	Desarrollo	Veneno (mg)
FarmUANL-Cto1	Juárez, N.L.	Adulto	150
FarmUANL-Cto1	Juárez, N.L.	Adulto	150
FarmUANL-Cto2	Juárez, N.L.	Adulto	151
FarmUANL-Cto2	Juárez, N.L.	Adulto	151
FarmUANL-Cto3	Cerro de la Silla, N.L.	Adulto	70
FarmUANL-Cto4	Juárez, N.L.	Adulto	100
FarmUANL-Cto4	Juárez, N.L.	Adulto	89
FarmUANL-Cto5	Cd. Victoria, Tamps.	Adulto	115
FarmUANL-Cto6	Juárez, N.L.	Adulto	253
FarmUANL -Cto21	Cd. Victoria, Tamps.	Adulto	50
FarmUANL -Cto22	Cd. Victoria, Tamps.	Adulto	53
FarmUANL -Cto25	Ocampo, Tamps.	Adulto	114
FarmUANL -Cto02	Cd. Victoria, Tamps.	Adulto	145
FarmUANL -Cto04	Cd. Victoria, Tamps.	Adulto	108
FarmUANL -Cto23	Cd. Victoria, Tamps.	Juvenil	7
FarmUANL -Cto24	Cd. Victoria, Tamps.	Juvenil	33
Promedio			121.35 ± 52.2 (SD)

Por cada corrida de RP-HPLC, se cargaron en columna C₁₈ de 1.5 a 3 mg de fracción 5 de SE-LC de las cuales se obtuvieron 14 fracciones, de las cuales, las fracciones 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 eluyeron del minuto 22 al 36, los cuales coinciden con los tiempos de retención reportados para desintegrinas. Dichas fracciones mostraron, además, una única banda de aproximadamente 14 kDa en el SDS-PAGE (**figura 3**).

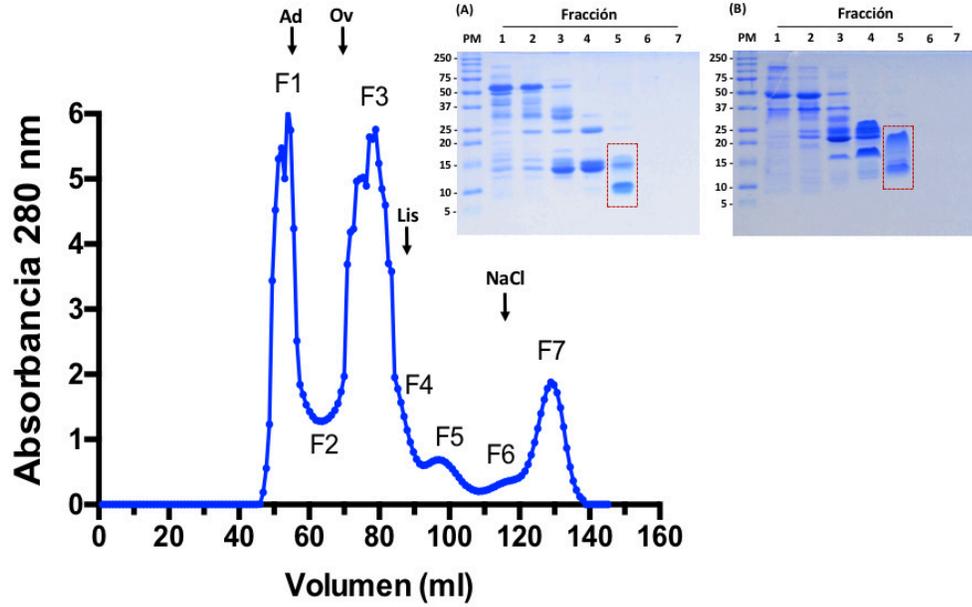


Figura 2. Fraccionamiento del veneno de *C. totonacus* mediante cromatografía por exclusión molecular (*SE-LC*). Marcadores de peso molecular: (Ad), azul dextran 200,000 kDa; (Ov), ovoalbúmina 44.3 kDa; (Lis), lisozima 14.4 kDa; (NaCl), 58.44 g/mol. (A), SDS-PAGE, 15 μ g de cada fracción de *SE-LC* en condiciones reductoras y no reductoras (B). Carril PM; marcador de peso molecular en kDa. Las bandas de menor peso molecular de la fracción 5 se muestran enmarcadas en rojo.

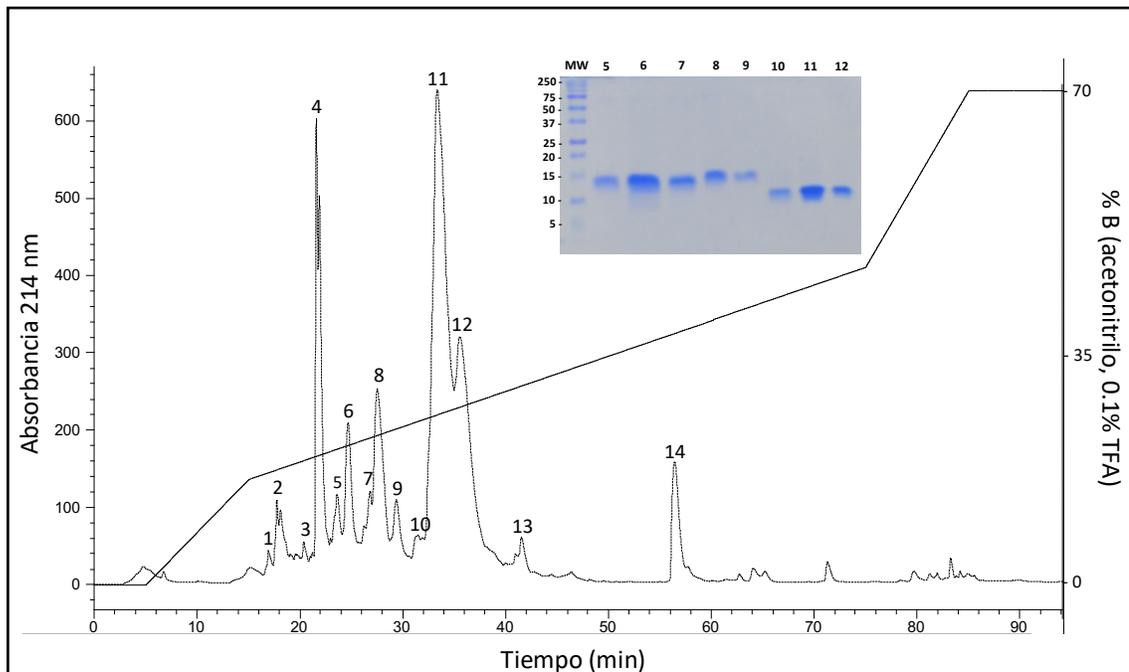


Figura 3. RP-HPLC de la fracción 5 proveniente de SE-LC. Se cargaron 1.5 mg en columna Grace Vydac (como se muestra en material y método). Fracciones eluidas en tiempos de retención correspondientes a posibles desintegrinas (5 a 12) fueron analizadas por SDS-PAGE.

Las fracciones 5, 7 y 8 mostraron actividad inhibitoria sobre la agregación plaquetaria inducida por ADP (actividad propia de desintegrinas) (**Figura 4**), las concentraciones inhibitorias (CI_{50}) de dichas fracciones fueron 300, 100 y 72 nM respectivamente.

La fracción 8, la cual se obtuvo de 200 - 300 μ g por corrida, fue identificada como la de mayor actividad y la de mayor abundancia. Esta fue analizada posteriormente mediante espectrometría de masas, la cual reveló la presencia de dos isoformas con masas similares, 7437 y 7218 Da (**Figura 5**).

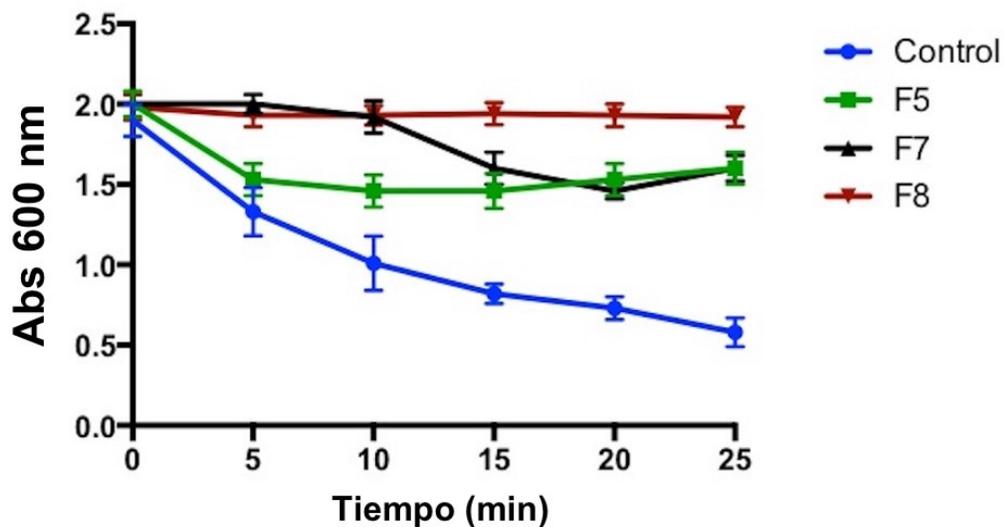


Figura 4. Inhibición de agregación plaquetaria por actividad de desintegrinas en veneno de *C. totonacus*. Fracciones 5, 7 y 8 (F5, F7, F8) mostraron actividad inhibitoria sobre agregación plaquetaria, siendo la F8 la mas potente (CI_{50} 72 nM). Como inductor de agregacion plaquetaria se usó ADP 20 μ M. Los resultados se muestran como el promedio \pm desviación estándar ($n = 3$)

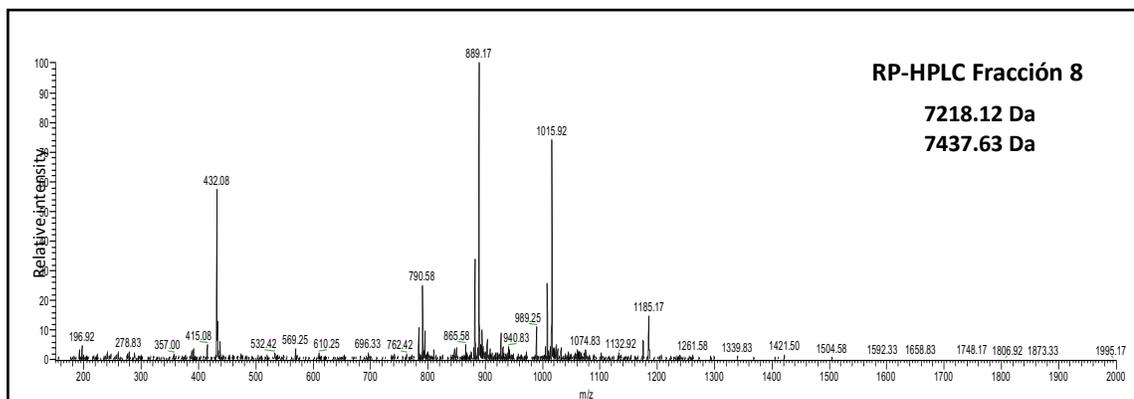


Figura 5. Análisis de la fracción de mayor actividad inhibitoria sobre agregación plaquetaria (fracción 8) por espectrometría de masas, el cual, reveló la presencia de dos isoformas con masas moleculares similares.

Adicionalmente, la secuenciación N-terminal obtenida de la fracción 8 (F8) fue GEECDGSPANPCCDAATCKLR. El BLAST realizado mediante las bases de datos NCBI y UNIPROT indicaron que el N-terminal corresponde a desintegrinas del veneno de serpientes. Para la secuenciación completa de la desintegrina, se realizó una digestión de la F8 con endoproteinasa Lys-C, la cual produjo cuatro péptidos con masas: P1, 2258.4 Da; P2, 3485.5 Da; P3, 3357.1 Da; P4, 2425.2 Da. Péptidos P1 y P4 mostraron masas moleculares idénticas a las masas teóricas de los péptidos obtenidos (*in silico*) de tzabcanina [C0HK50]. La degradación de EDMAN de péptidos P2 y P3 arrojaron la secuencia: KKGTVCRPARGDWDDTCTGQSADCPRNGLYG (**Figura 6-A**). El alineamiento de los 71 aminoácidos de la secuencia permitió clasificarla como desintegrina-RGD mediana, para la cual se propuso el nombre de **totonacin (Figura 6-B)**. Respecto al rendimiento, por cada 150 mg (en promedio) de veneno de *C. totonacus* se obtuvieron 250 µg de totonacin, representando una abundancia relativa aproximada del 0.16% (**Figura 7**). Para llevar a cabo la caracterización y acumular ~1 mg de totonacin, fueron requeridas 12 corridas de SE-LC (**APENDICE D**) y 29 corridas de HPLC (**APENDICE E**).

3.3 Evaluación de la actividad biológica de desintegrinas in vitro

3.3.1 Evaluación de la citotoxicidad de totonacin

El efecto citotóxico de totonacin sobre las células MDA-MB-231 y HMEC-1 fue evaluado mediante la prueba del MTT (Mossman, 1983). El tratamiento en ambas líneas celulares por 24 horas con diferentes concentraciones de totonacin (0.09, 0.18, 0.37, 0.75, 1.5, 3, 6 y 12 μM) produjo un decremento dosis-dependiente en la viabilidad celular. Totonacin a concentraciones de 6 y 12 μM en células MDA-MB-231, disminuyó la viabilidad celular en 31.9 y 48.7% respectivamente; mientras que en las células HMEC-1 produjeron una disminución significativa ($p < 0.05$) de 32.7 y 44.8% respectivamente. Por otra parte, con concentraciones de 3 μM o menores, la viabilidad celular fue mayor al 85% (**Figura 8**), debido a lo anterior se seleccionó la concentración de 3 μM como la más alta a evaluar en los ensayos de inhibición de adhesión celular a proteínas de matriz extracelular (MEC), además de la evaluación de su efecto inhibitorio sobre la migración celular.

3.3.2 Inhibición de adhesión a proteínas de MEC

Totonacin a concentración de 3 μM , inhibió la adhesión de células MDA-MB-231 y HMEC-1 a las proteínas de MEC: vitronectina, laminina y fibronectina en 44, 32.1, 31.2% y 60.8, 51.1, 42.8% respectivamente. El efecto inhibitorio sobre la adhesión celular fue mayor con vitronectina en ambas líneas celulares (**Figura 9**).

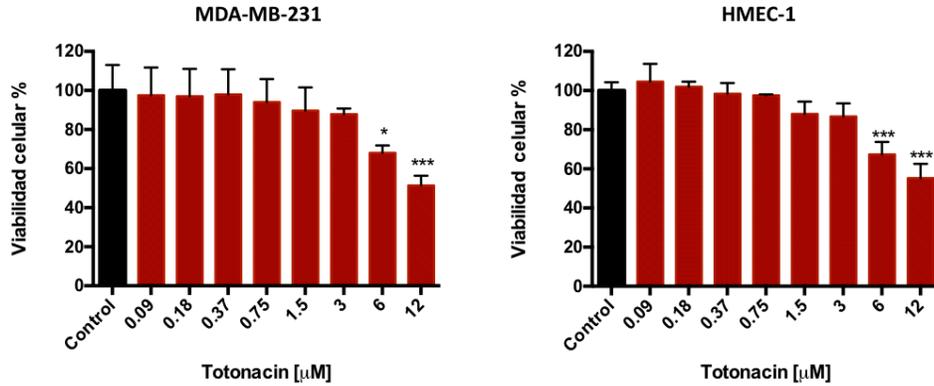


Figura 8. Efecto de citotoxicidad con diferentes concentraciones de tototacin, sobre células MDA-MB-231 y HMEC-1, posterior a exposición por 24 horas. Los resultados se presentan como la media \pm desviación estándar ($n = 3$). Sólo las concentraciones de 6 μM ($*p < 0.05$) y 12 μM ($***p < 0.001$), mostraron citotoxicidad significativa. Los ensayos para cada concentración de tototacin fueron realizados por triplicado y el experimento se repitió en tres ocasiones.

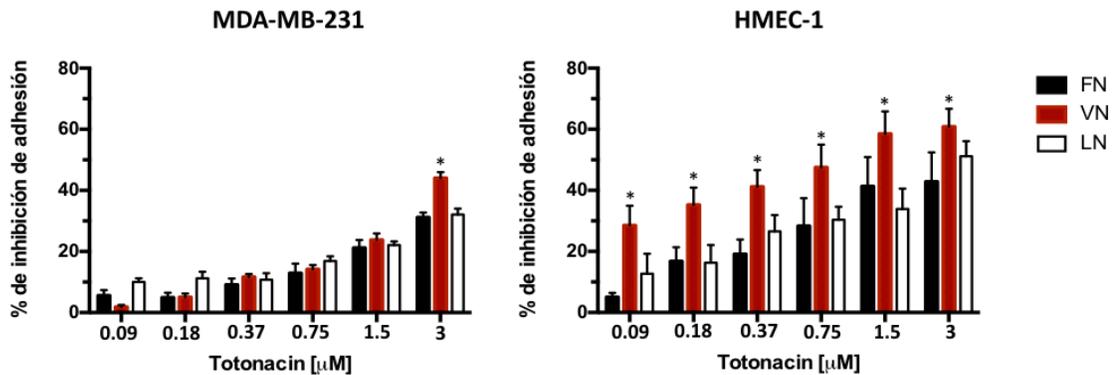


Figura 9. Inhibición sobre adhesión de células MDA-MB-231 y HMEC-1 a las proteínas de MEC: fibronectina (FN), vitronectina (VN) y laminina (LN). Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de tototacin antes de su sembrado en placas de 96 pozos precargadas con fibronectina, vitronectina y laminina. El grupo control consistió en células incubadas únicamente con PBS. Los resultados se presentan como la media \pm desviación estándar ($n = 3$), los valores $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

3.3.3 Inhibición de migración celular

El efecto de bloqueo de la migración celular fue evaluado mediante la prueba “wound-healing assay” generando un “raspado” en forma lineal en la parte central de la monocapa y exponiendo las células a totonacin. A 24 horas de incubación con totonacin a 3 μM , se observó una inhibición significativa sobre la migración de células MDA-MB-231 y HMEC-1 en un 41.4 y 48.3% respectivamente (**Figura 10**).

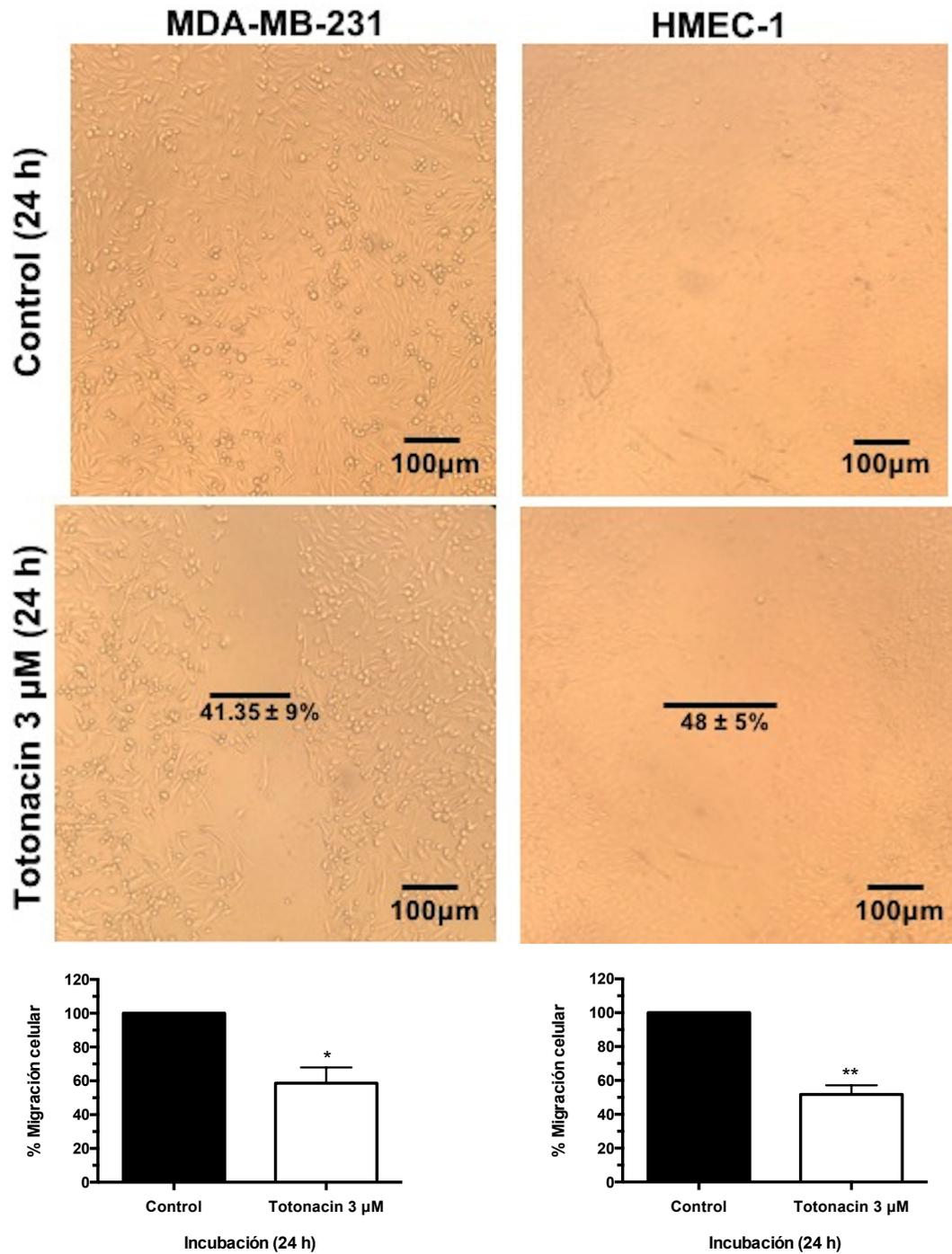


Figura 10. Efecto inhibitorio de totonacin a 3 μ M, sobre la migración de células MDA-MB-231 en 41% y HMEC-1 en 48%, evaluado mediante ensayo “wound-healing”. El porcentaje de migración fue cuantificado mediante el uso del software Image J, realizando tres mediciones a lo ancho del espacio “raspado” (mm) tras 24 horas de incubación. Los resultados se presentan como la media \pm desviación estándar ($n = 3$), los valores $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

3.4 Caracterización toxicológica del veneno de *C. totonacus*

El veneno de serpientes adultas de las diferentes localidades, tanto de Nuevo León (Cerro de la Silla y Juárez), como Tamaulipas (Ocampo y Cd. Victoria) (**Figura 11**), fue similar entre sí en composición, lo que permitió la elaboración del pool de veneno, pesando y mezclando cantidades iguales de cada localidad.

En el caso del veneno de los ejemplares juveniles de *C. totonacus*, se observaron diferencias importantes tanto en el perfil cromatográfico (RP-HPLC) como en el electroforético (SDS-PAGE), los venenos mostraron ser diferentes en el contenido de las proteínas correspondientes a los dos picos del HPLC eluidos entre los minutos 34 y 38, que corresponde a la banda de ~10 kDa del SDS-PAGE. Tanto la actividad biológica, como el peso molecular de dicha proteína sugirieron que se trata de crotamina, en relación a probables SVSP y SVMMP se observó lo contrario, el veneno de las serpientes juveniles mostró menor abundancia relativa respecto al veneno de los adultos (**Figura 12**).

3.4.1 Evaluación del contenido de crotoxina (Ctx) mediante ELISA

La evaluación de Ctx en el veneno de *C. totonacus* se realizó mediante ELISA tipo sandwich (Hernández, 2013) obteniendo un resultado negativo, ya que el veneno de *C. totonacus* no dio señal colorimétrica, indicando que este veneno carecen de Ctx (**Figura 13**).

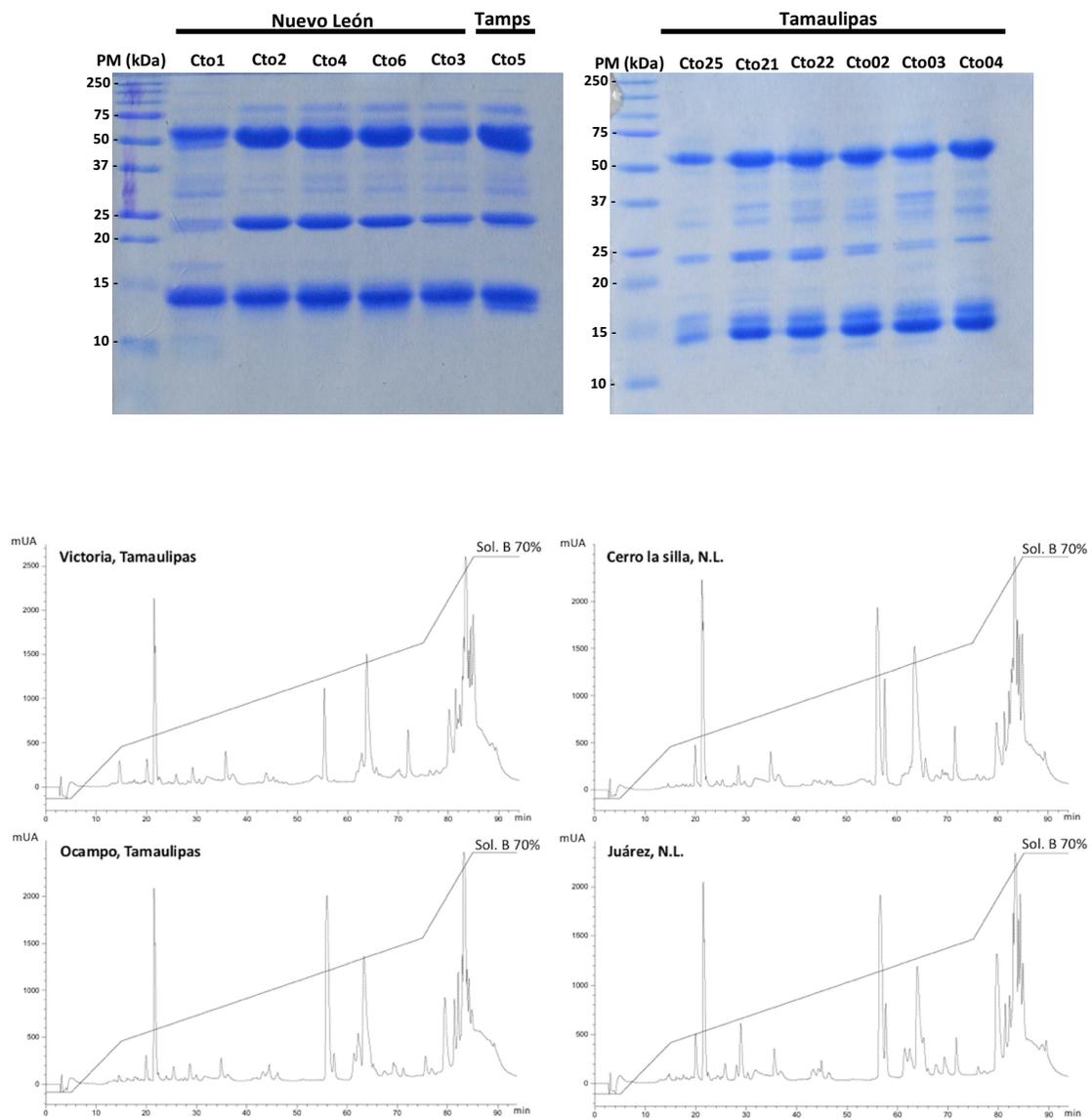


Figura 11. Veneno de *C. totonacus* de los estados de Nuevo León y Tamaulipas. Parte superior: Separación de proteínas por SDS-PAGE en condiciones reductoras (β -mercaptoetanol), se cargaron 25 μ g de veneno por carril, el primer carril (izquierdo) de cada imagen corresponde a los marcadores de peso molecular. Parte inferior: Perfil de proteínas obtenido por RP-HPLC, se cargaron 1.5 mg de veneno en columna C_{18} Grace Vydac (ver material y método).

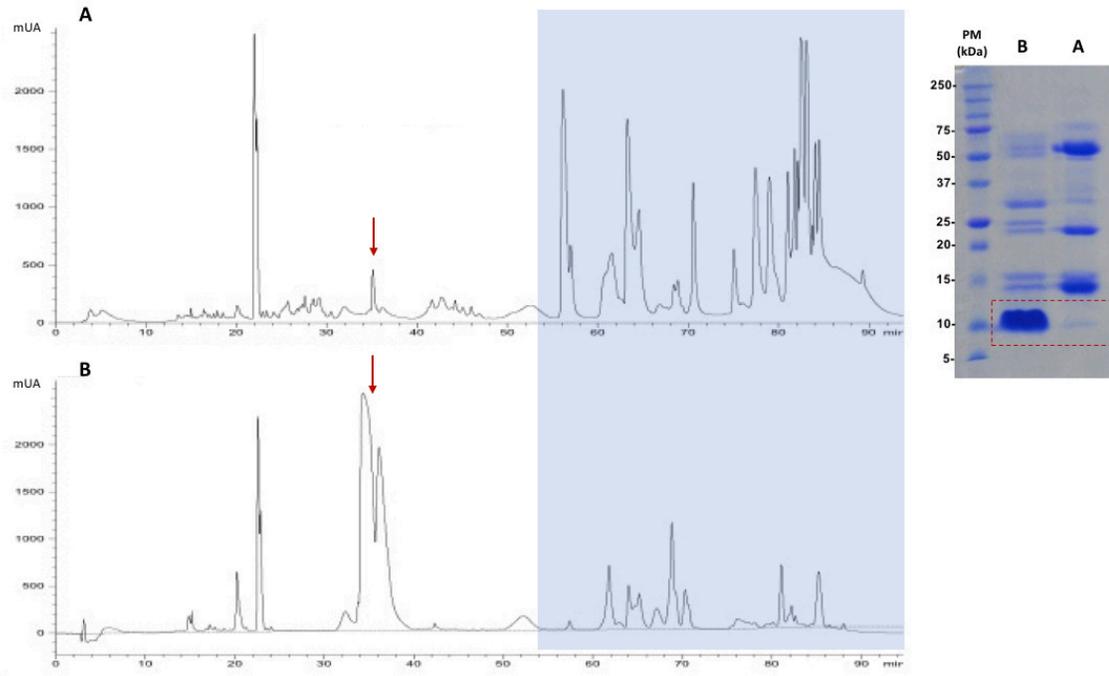


Figura 12. RP-HPLC del veneno de *C. totonacus* adulto (A) y juvenil (B). Las flechas rojas indican los picos correspondientes a crotoxina, mientras que el área en azul representa la región en la que suelen eluir principalmente SVSP y SVMP. De lado derecho: La separación por SDS-PAGE de los mismos venenos; *C. totonacus* adulto (A) y juvenil (B). El recuadro punteado en rojo, representa crotoxina.

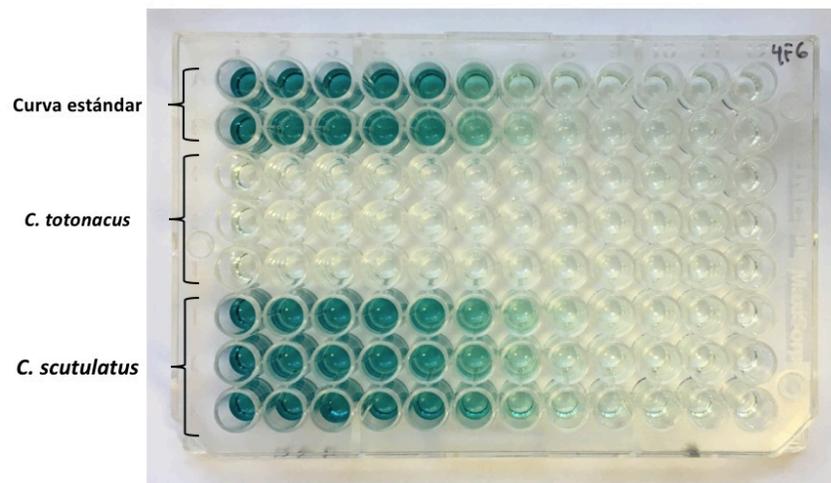


Figura 13. ELISA tipo “sandwich” para detección de crotoxina en veneno de *C. totonacus* (filas C, D, E). Se utilizó crotoxina purificada para la elaboración de la curva estándar (filas A y B). Como control positivo se utilizó veneno de *C. s. scutulatus* (filas F, G, H). Anticuerpos: monoclonal anti-subunidad B (4F6), policlonal anti-crotoxina, anti-conejo acoplado a HRP. Los pozos en color verde representan reacción positiva con intensidad colorimétrica dependiente de la concentración de crotoxina.

3.4.2 Letalidad (DL_{50}) del veneno en ratón

Las dosis utilizadas para evaluar letalidad fueron; 15, 20, 30 y 35 μg . La DL_{50} calculada fue de 1.29 mg/kg (equivalente a $\sim 25.9 \mu\text{g}/\text{ratón}$), los intervalos de confianza fueron: 22.2 y 30.21 y la R^2 fue de 0.9242 (**Figura 14**).

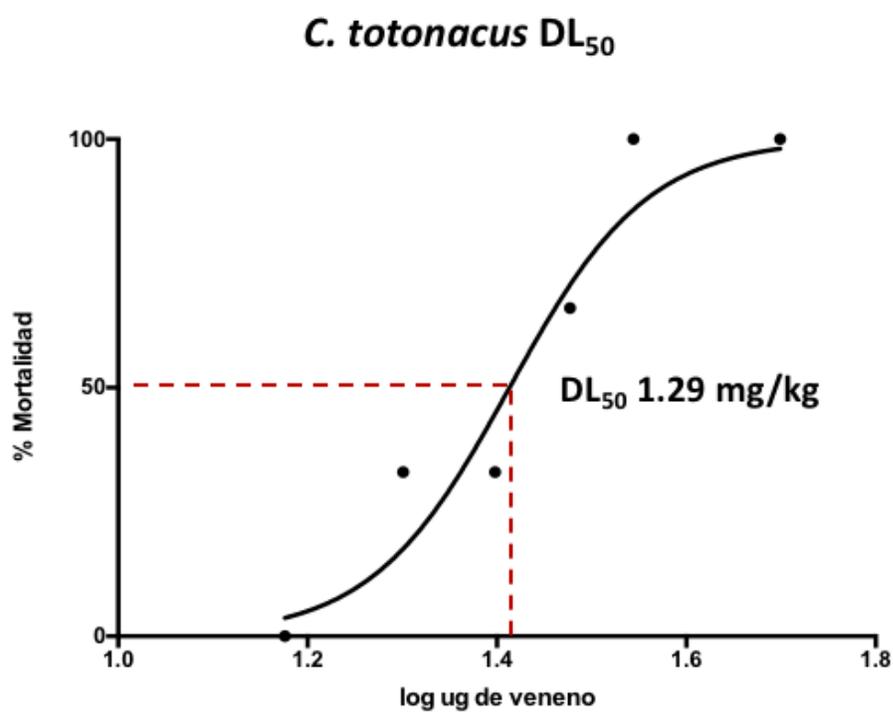


Figura 14. Evaluación de la dosis letal media (DL_{50}) i.v. del veneno de *C. totonacus* en ratones ICR. Registro de mortalidad a 24 horas tras la inoculación de diferentes dosis de veneno. Los ratones fueron agrupados por dosis, con una $n = 3$ ratones por grupo.

3.4.3 Actividades procoagulante y proteolítica del veneno

La actividad procoagulante del veneno fue evaluada mediante la dosis mínima procoagulante (DMP), la cual representa la cantidad de veneno necesaria para evidenciar la formación de un coágulo en 60 segundos (Theakston y Reid, 1983; Gené *et al.*, 1989). La DMP del veneno de *C. totonacus* fue de 93.4 μg (Figura 15).

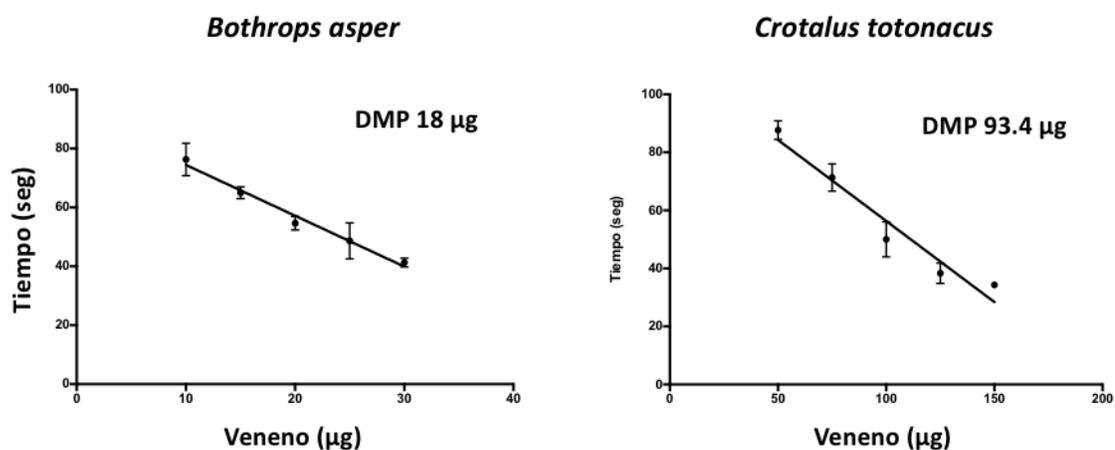


Figura 15. Actividad procoagulante del veneno de *C. totonacus*, como control positivo se utilizó veneno de *B. asper*. Los puntos representan el promedio \pm desviación estándar ($n = 3$).

Se evaluó la actividad proteolítica del veneno sobre HPA (“hide powder azure”) y fue expresada como unidad de actividad enzimática (U), la cual se definió como la cantidad de veneno necesaria para digerir 1 mg de HPA en un periodo de 2 horas a temperatura ambiente (25 $^{\circ}\text{C}$) y se reportó como actividad específica (U/mg). Se calculó que el veneno de *C. totonacus* presenta alta actividad proteolítica ya que contiene 40.3 U/mg comparado con las 3 U/mg que presentó el veneno de *Mixcoatlus melanurus* (Figura 16 y 17; Tabla 4).

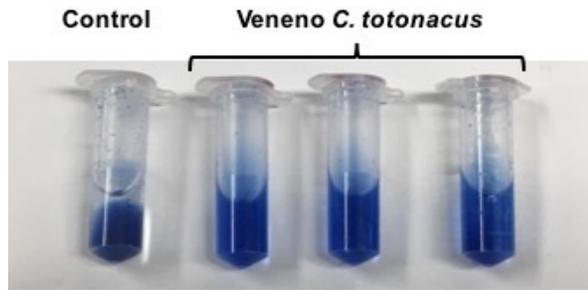


Figura 16. Actividad proteolítica del veneno sobre HPA (triplicado), como control se utilizó veneno de *Mixcoatlus melanurus* del cual se ha reportado baja actividad proteolítica. A mayor actividad proteolítica, mayor solubilidad del HPA, se midió absorbancia a 595 nm del sobrenadante de cada tubo.

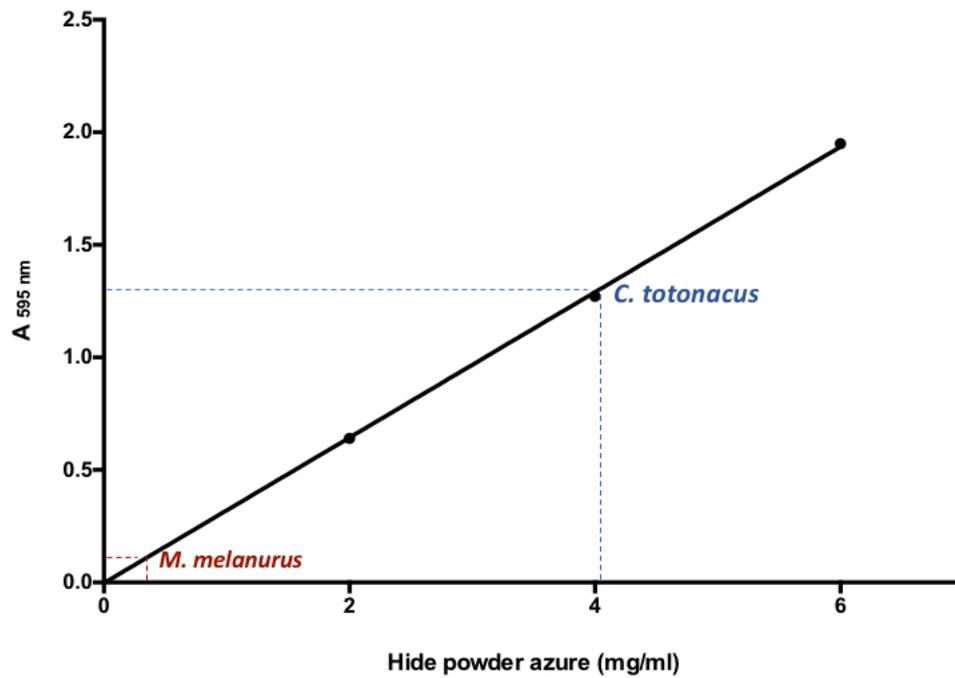


Figura 17. Interpolación de las muestras de veneno sobre la curva estándar; Abs 595 nm Vs HPA (mg/ml).

Tabla 4. Actividad proteolítica del veneno sobre HPA

Veneno	Abs 595	Interpolación	(1*100)/interp	1000/	Prom±ds
<i>Mixcoatlus melanurus</i>	0.17074	0.3179178	314.5	3.2	3.2 ± 0
<i>Mixcoatlus melanurus</i>	0.16533	0.3179178	314.5	3.2	
<i>Mixcoatlus melanurus</i>	0.14972	0.3179178	314.5	3.2	
<i>Crotalus totonacus</i>	1.3792	4.031804	24.8	40.3	40.3 ± 0
<i>Crotalus totonacus</i>	1.3634	4.031804	24.8	40.3	
<i>Crotalus totonacus</i>	1.3164	4.031804	24.8	40.3	

Los valores de absorbancia para *M. melanurus* y *C. totonacus* representan la prueba realizada por triplicado. La columna de la derecha representa el promedio ± desviación estándar de los triplicados. Las unidades de actividad proteolítica (U/mg) se obtuvieron dividiendo 1000 entre el valor de la columna interpolación.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

Se ha demostrado un alto nivel de variación respecto a la cantidad de veneno inoculado por serpientes durante una mordedura ya sea predatoria o defensiva (Smith *et al.*, 2014). En el presente estudio estudio se obtuvo en promedio 121.3 mg por “ordeña”, esto concuerda con lo reportado para la mayoría de las especies, sin embargo cabe señalar que para algunas especies como *C. atrox* que además es de talla similar a *C. totonacus* (1.5 - 1.8 m), se le ha logrado extraer hasta 1 gramo de veneno (Klauber, 1972).

Las desintegrinas se han convertido en una de las familias de proteínas del veneno de serpiente más estudiadas, debido a su potencial farmacológico como compuestos base para la unión y bloqueo de receptores integrina (Saviola *et al.*, 2015). Desde que se aisló la primer desintegrina (Huang *et al.*, 1987), se han aislado y caracterizado desintegrinas de diferentes especies (Angulo *et al.*, 2014). Sin embargo, en México, el aislamiento y caracterización de este tipo de proteínas del veneno de serpientes ha sido poco estudiado. Pese a la elevada cantidad de especies endémicas mexicanas, a la fecha actual, sólo dos desintegrinas aisladas de veneno de especies endémicas de México han sido descritas. Scarborough *et al.*, (1993), obtuvo basilicin, desintegrina de 7704 Da proveniente del veneno de *C. basiliscus*, basilicin bloquea a la integrina $\alpha_5\beta_1$ e inhibe adhesión celular a fibronectina y fibrinógeno. La segunda desintegrina, recientemente descrita por Borja *et*

al., (2016), es morulustatin, aislada del veneno de *C. morulus*, cuya única actividad reportada fue la inhibición de agregación plaquetaria inducida por ADP con un CI_{50} de 89.5 nM. A pesar de su complejidad inherente, especialmente en relación a la presencia de múltiples isoformas, se suelen presentar dificultades cromatograficas adicionales para la purificación de desintegrinas del veneno de serpientes (Moore *et al.*, 2015).

En el presente estudio, se reporta una fracción proveniente de HPLC que contiene dos desintegrinas (isoformas) con masas moleculares 7437 y 7218 Da aisladas del veneno de *C. totonacus*, ambas referidas como totonacin. La diferencia entre las masas moleculares de ambas isoformas puede ser explicada por la variación en la longitud de las secuencias finales, resultado del procesamiento proteolítico de las SVMP PII precursoras (Angulo *et al.*, 2014). En el SDS-PAGE, la fracción 8 mostró una banda de ~14 kDa. Se ha reportado migración electroforética anómala previamente (Yeh *et al.*, 1998; Fernandez *et al.*, 2005; Della-Casa *et al.*, 2011 y Lima-dos-Santos *et al.*, 2015), motivo por el cual se decidió evaluar dicha fracción por medio de espectrometría de masas.

Para la obtención de la secuencia completa, las desintegrinas fueron digeridas utilizando endoproteinasa Lys-C, la cual produjo cuatro péptidos de masas P1, 2258.4 Da; P2, 3485.5 Da; P3, 3357.1 Da y P4, 2425.2 Da, la secuencia obtenida por degradación de EDMAN de los péptidos tuvo una sola variación, P2 presentó doble lisina (KK) en comparación con P3, lo cual explica la diferencia en sus masas moleculares. Con base en la masa molecular, la longitud en aminoácidos (71) y contenido de cisteínas además de la presencia del dominio de unión RGD (Angulo *et al.*, 2014), totonacin puede ser clasificado como desintegrina-RGD de tamaño mediano.

Inicialmente *C. totonacus* fue considerada dentro del complejo de especies de cascabeles tropicales mexicanas, formado por *C. simus*, *C. culminatus* y *C. tzabcan*, sin embargo, estudios filogenéticos recientes la colocaron dentro del complejo de especies formado por *C. basiliscus* y *C. molossus* (Wüster *et al.*, 2005). No obstante, totonacin mostró mayor porcentaje de identidad en secuencia con desintegrinas de especies no cercanas en filogenia, es decir, totonacin mostró 100% de identidad de secuencia con horridistatin de *C. horridus* (Galán *et al.*, 2005), 99% de identidad a durissin de *C. durissus* y crotatroxin de *C. atrox* (Scarborough *et al.*, 1993), 97% de identidad a mojastin-2 de *C. s. scutulatus* (Sánchez *et al.*, 2006) y simusmin de *C. simus* (Angulo *et al.*, 2014), 92% de identidad a tzabcanin de *C. tzabcan* (Saviola *et al.*, 2015). Las dos especies de víboras de cascabel que conforman el complejo al cual pertenece *C. totonacus*, mostraron niveles incluso menores de identidad entre secuencias de sus desintegrinas. Basilicin de *C. basiliscus* y molossin de *C. molossus* (Scarborough *et al.*, 1993), mostraron 89 y 88% de identidad respectivamente.

A pesar de que el dominio RGD se presenta altamente conservado, es posible notar algunas diferencias en los aminoácidos que flanquean dicho dominio (Gould, 1990). Los aminoácidos próximos al dominio de unión pueden influenciar de manera significativa sobre la afinidad a las integrinas (Marcinkiewicz *et al.*, 1997; Calvete *et al.*, 2005; Monleón *et al.*, 2005). En adición, la secuencia del dominio RGD puede ser subclasificada como RGDW (totonacin, horridistatin, durissin, crotatroxin, mojastin-2 y simusmin) o RGDN (tzabcanin, basilicin y molossin). Las desintegrinas que expresan el dominio RGDW suelen mostrar afinidad alta a integrinas α IIb β 3, mientras que aquellas con

dominio RGDN muestran mayor selectividad por $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha_v\beta_3$ (Scarborough *et al.*, 1993; Marcinkiewicz *et al.*, 1997; Juárez *et al.*, 2008).

Las desingrinas están presentes de manera general en venenos de serpientes de la familia Viperidae, con una abundancia relativa que varía de especie a especie. Estas proteínas pueden representar hasta un 17.8% del total de componentes del veneno como es el caso del veneno de *Bitis arietans*, en contraste, el veneno de *Cerastes vipera* contiene menos del 1% de desintegrinas (Mackessy, 2010). Este también es el caso de *C. totonacus* cuyo veneno contiene un 0.2% de desintegrinas. Recientemente, Mackessy *et al.*, (2018) ha reportado proteoma del veneno de otra víbora de cascabel endémica de México, *C. polystictus*, el cual posee 9% de desintegrinas.

Respecto a su actividad biológica, totonacin mostró bajos niveles de citotoxicidad a concentraciones de 0.09 a 3 μM . Dado que las desintegrinas pueden inhibir la adhesión de células a superficies tratadas con proteínas de MEC (Lima-dos-Santos *et al.*, 2015), en el presente estudio se evaluó el efecto inhibitorio de totonacin sobre la adhesión de células MDA-MB-231 y HMEC-1 a fibronectina, vitronectina y laminina. Para la selección de las líneas celulares se consideró que las células HMEC-1 han sido utilizadas para el estudio de angiogénesis y expresan integrinas clave en procesos patológicos relacionados con el cáncer, entre las cuales están: α_1 , 2, 3, 4, 5, 6 y v, así como β_1 , 3, 4 y 5. Mientras que las células MDA-MB-231 expresan altos niveles de integrinas β_1 , 3 y α_v así como altos niveles de integrinas β_5 y $\alpha_v\beta_5$ (Thaerian *et al.*, 2011), por lo tanto, ambas líneas celulares fueron utilizadas para evaluar la capacidad inhibitoria de totonacin sobre la adhesión a proteínas de MEC y la migración celular (Lucena *et al.*, 2012; Minea *et al.*, 2012).

Totonacin mostró efecto inhibitorio significativo sobre la adhesión de células HMEC-1 y MDA-MB-231 a fibronectina, laminina y vitronectina siendo mayor la inhibición para vitronectina. Resultados similares fueron reportados por Saviola *et al.*, (2016), tzabcanin, desintegrina aislada del veneno de *C. tzabcan*, inhibió adhesión de células A-375 (melanoma de origen humano) a vitronectina en ~70%. El hecho de que totonacin mostró efecto inhibitorio mayor sobre la adhesión a vitronectina en ambas líneas HMEC-1 y MDA-MB-231 y dado que vitronectina es ligando de integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_1$ y $\alpha_{11b}\beta_3$ (Barczyk *et al.*, 2010), sugiere que totonacin antagoniza uno o más de los cinco integrinas receptores de vitronectina. El efecto inhibitorio menor observado sobre la adhesión a fibronectina y laminina podría explicarse por el mayor número de integrinas involucradas en la adhesión a ambas proteínas de MEC. Fibronectina se presenta como ligando de nueve integrinas: $\alpha_{11b}\beta_3$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_6$ and $\alpha_v\beta_8$ mientras que laminina, es ligando de siete: $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$ and $\alpha_6\beta_4$ (Saviola *et al.*, 2016). Comparada con tzabcanin, totonacin mostró mayor efecto inhibitorio sobre la adhesión celular a vitronectina.

Un proceso fundamental durante el desarrollo de la metástasis, es la migración celular (Swenson *et al.*, 2004; Galán *et al.*, 2008), para la cual, las células cancerosas expresan moléculas de adhesión que facilitan el movimiento desde el sitio primario del tumor a tejidos u órganos distantes (Desgrosellier y Cheresh, 2010). Por otra parte, las desintegrinas están reportadas como agentes reguladores clave de la migración celular (Minea *et al.*, 2012), ya que se ha demostrado que la expresión y activación de la integrina $\alpha_v\beta_3$ potencia de manera significativa la migración en diversas líneas de células tumorales

tales como MDA-MB-231 (Pecheur *et al.*, 2002; Rolli *et al.*, 2003; Dang *et al.*, 2006; Sloan *et al.*, 2006). Tanto en células MDA-MB-231 como HMEC-1, tras 24 horas de incubación, totonacin inhibió la migración celular en 41.3 y 48.35% respectivamente. Se han reportado resultados similares respecto al efecto inhibitorio que tienen diversas desintegrinas como contortrostatin, r-iridistatin-2, r-mojastin-1, vicrostatin y crotatroxin-2 (Swenson *et al.*, 2004; Galán *et al.*, 2008; Minea *et al.*, 2012; Lucena *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos sugieren un bloqueo de la integrina $\alpha_v\beta_3$ por parte de totonacin. Adicionalmente, la capacidad de totonacin para interrumpir la interacción entre células y proteínas de matriz extracelular, así como su capacidad para bloquear la migración celular refuerzan el potencial de la mencionada desintegrina aislada del veneno de *C. totonacus*, como agente anti-metástasis.

En relación al perfil toxicológico *C. totonacus* se clasificó como **veneno tipo I** los cuales se caracterizan por ser de toxicidad moderada, siendo este el primer reporte sobre la caracterización toxicológica de este veneno

CAPÍTULO 5

CONCLUSIÓN

El presente trabajo es la primera descripción del aislamiento, determinación de masa molecular, secuencia de aminoácidos y actividad biológica de desintegrinas en el veneno de *Crotalus totonacus*. Los resultados obtenidos mostraron que Totonacin es una molécula con potencial terapéutico, su efecto de inhibición de adhesión sobre vitronectina en las células MDA-MB-231 y HMEC-1 sugiere que bloquea uno o más de los cinco receptores integrina de esta proteína ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_1$ y $\alpha_{IIb}\beta_3$) y el efecto de inhibición de migración celular en la línea MDA-MB-231 refuerza el bloqueo del receptor integrina $\alpha_v\beta_3$ que se expresa en estas células y que ha sido reportado como mediador de la migración celular y angiogénesis en el cáncer.

Dado que las desintegrinas en el veneno de *C. totonacus* se obtuvieron en concentraciones menores al 1% del total de componentes del veneno, se propone la expresión recombinante de totonacin con la finalidad de obtenerla en mayor cantidad, lo que permitirá continuar con la evaluación de actividades biológicas en modelos *in vivo*.

PERSPECTIVAS

- Expresión y producción de totonacin recombinante para la comparación de actividades biológicas *in vitro*.
- Evaluación de la actividad biológica *in vivo* (anti-angiogenesis) de totonacin recombinante.
- Establecer un banco de veneno correspondiente al noreste de México para la caracterización de nuevas desintegrinas.

GLOSARIO

A

Angiogénesis tumoral

es el crecimiento de vasos sanguíneos nuevos que los tumores necesitan para crecer.
.....28

Antagonistas

es un tipo de ligando de receptor o fármaco que bloquea o detiene respuestas
mediadas por agonistas en lugar de provocar una respuesta biológica en sí tras su
unión a un receptor celular 30

Apoptosis

vía de destrucción o muerte celular programada o provocada por el mismo organismo,
con el fin de controlar su desarrollo y crecimiento, puede ser de naturaleza
fisiológica y está desencadenada por señales celulares controladas genéticamente.
.....28

B

BLAST

programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN,
ARN o de proteínas..... 60

C

Covalente (enlace)

es la unión química entre dos átomos donde se comparten electrones. Esto hace que
los átomos se comporten como una unidad..... 28

Crotoxina

Heterodímero compuesto de una subunidad ácida (no tóxica, no enzimática) llamada
crotapotina y una subunidad básica fosfolipasa A2 de poca toxicidad, pero que en
conjunto actúan como β -neurotoxina potente 31

D

Dominio

Región de una proteína con interés biológico funcional o estructural. Es una región de la estructura tridimensional de una proteína con una función concreta..... 18

E

Edema

Inchazón causada por la acumulación de líquido en los tejidos del cuerpo..... 23

Endémica

Especie de planta o animal un área de distribución única y limitada. 27

Enzima

Catalizador de las reacciones bioquímicas, que facilita la transformación de los sustratos. Macromoléculas biológicas que actúan como catalizadores para reacciones bioquímicas 23

F

Filogenéticamente

Parte de la biología que estudia la evolución de las especies de forma global, en contraposición a la ontogenia que estudia la evolución del individuo..... 61

Fosfolipasas

Clase de enzimas de especificidad variante que cataliza la degradación de los fosfolípidos 13

G

Glioblastoma

son tumores que nacen de las células de soporte del tejido cerebral. 30

H

Hemostasia

Contención o detención de una hemorragia mediante los mecanismos fisiológicos del organismo o por medio de procedimientos manuales, químicos, instrumentales o quirúrgicos. 23

Herpetología

Estudio de la biología de anfibios y reptiles..... 32

Homología

En el estudio comparativo de los seres vivos, la homología es la relación que existe entre dos partes orgánicas diferentes cuando sus determinantes genéticos tienen el mismo origen evolutivo..... 23

I

Isquemia coronaria

cuando el flujo sanguíneo al corazón se reduce, lo que impide que el músculo cardíaco reciba suficiente oxígeno. La reducción del flujo sanguíneo generalmente se produce debido a una obstrucción parcial o total de las arterias del corazón (arterias coronarias). 28

M

Metastasis

Diseminación del cáncer de una parte del cuerpo en donde se formó originalmente a otra parte del cuerpo..... 28

R

Restenosis

Luego de un tiempo de realizada la angioplastia coronaria puede volver a desarrollarse una nueva obstrucción en el sitio de implante del stent. 28

T

Totonacin

Fracción proveniente de HPLC que contiene dos isoformas de desintegrinas aisladas del veneno de la víbora de cascabel totonaca, *Crotalus totonacus*) 62

Trombosis

es la formación de un coágulo en el interior de un vaso sanguíneo y uno de los causantes de un infarto agudo de miocardio. También se denomina así al propio proceso patológico, en el cual, un agregado de plaquetas o fibrina obstruye un vaso sanguíneo..... 28

V

Variación ontogenética

Cambios en la composición del veneno dentro de una misma especie..... 66

Vasoconstricción

Disminución del calibre de un vaso por contracción de las fibras musculares. 23

BIBLIOGRAFÍA

- Albelda, S. M. 1993. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab. Invest.* 68, 4 – 17.
- Angulo, Y., Castro, A., Lomonte, B., Rucavado, A., Fernandez, J., Calvete, J.J., Gutierrez, J.M., 2014. Isolation and characterization of four medium-size disintegrins from the venoms of Central American viperid snakes of the genera *Atropoides*, *Bothrops*, *Cerrophidion* and *Crotalus*. *Biochimie* 107, 376–384. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.10.010>.
- Aplin, A. E., Howe, A. K., Juliano, R. L. 1999. Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 737 – 744.
- Astorga, C. E., 1991. Actividad inhibitoria de la agregacion plaquetaria por la saliva del murcielago hematofago. Tesis. Maestría en Biotecnología. Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Mexico City, 65pp.
- Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varnier JA. 2008. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer* 8, 604–617.
- Barczyk, M., Carracedo, S., Gullberg, D. 2010. Integrins, *Cell Tissue Res.* 339, 269–280. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6>.
- Bazan-Socha, S., Kisiel, D.G., Young, B., Theakston, R.D., Calvete, J.J., Sheppard, D., Marcinkiewicz, C. 2004. Structural requirements of MLD-containing disintegrins for functional interaction with alpha 4 beta 1 and alpha 9 beta 1 integrins. *Biochemistry* 43, 1639 – 1647.

- Bénard – Valle M., Carbajal – Saucedo A., Roodt A., López – Vera E., Alagón A. 2014. Biochemical characterization of the venom of the coral snake *Micrurus tener* and comparative biological activities in the mouse and a reptile model. *Toxicon*. 77, 6 – 15.
- Borja, M., Neri-Castro, E., Castañeda-Gaytán, G., Ponce-López, R., Lomonte, B., Olvera-Rodríguez, A., Alagón, A., Pérez-Morales, R. 2018. Biological and proteolytic variation in the venom of *Crotalus scutulatus scutulatus* from Mexico. *Toxins (Basel)*. 10, 1 – 19.
- Borja, M., Galan, J., Cantu, E. Jr., Zugasti-Cruz A, Rodríguez-Acosta, A., Lazcano, D., Lucena, S., Suntravat, M., Sánchez, Y.E.E., 2016. Morulustatin, a disintegrin that inhibits ADP-induced platelet aggregation, isolated from the Mexican tamaulipan rock rattlesnake (*Crotalus lepidus morulus*). *Rev. Cient.* 26, 86-94.
- Calvete J. J., Sanz L., Angulo Y., Lomonte B., Gutiérrez J. M. 2009a. Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Letters*. 11, 1736 – 1743.
- Calvete J. J., Juárez P, Sanz L. 2009b. Snake venomics and disintegrins. Portrait and evolution of a family of snake venom integrin antagonists. In: Mackessy S, editor. *Handbook of venoms and toxins of reptiles*. Boca Ratón: CRC Press. p. 337 – 57.
- Calvete, J.J., Juárez, P., Sanz, L., 2007. Snake venomics. Strategy and applications. *J. Mass Spectrom.* 42,1405–1414.
- Calvete, J.J., Marcinkiewicz, C., Monleón, D., Esteve, V., Celda, B., Juárez, P., Sanz, L., 2005. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon* 45, 1063–1074.

<http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.024>.

Calvete, J.J., Moreno-Murciano, M.P., Theakston, R.D.G., Kisiel, D.G., Marcinkiewicz, C. 2003. Snake venom disintegrins: Novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulfide bond engineering. *Biochem. J.* 372, 725 – 734.

Calvete, J. J., M. Jürgens, C. Marcinkiewicz, A. Romero, M. Schrader, and S. Niewiarowski. 2000. Disulfide bond pattern and molecular modelling of the dimeric disintegrin EMF-10, a potent and selective integrin $\alpha_5\beta_1$ antagonist from *Eristocophis macmahoni* venom. *Biochem. J.* 345:573–81.

Camacho E., Villalobos E., Sanz L., Pérez A., Esclante T., Lomonte B., Calvete J. J., Gutiérrez J. M., Rucavado A. 2014. Understanding structural and functional aspects of PII snake venom metalloproteinases: Characterization of BlatH1, a hemorrhagic dimeric enzyme from the venom of *Bothriechis lateralis*. *Biochimie.* 101, 145 – 155.

Campbell A. J. and Lamar W. W. 2004. The venomous reptiles of the western hemisphere. Comstock Publishing Associates. U.S.A. Vol. 2. 870 pp.

Canseco L. M. y Gutierrez Ma. G. M. 2010. Anfibios y reptiles del valle de Tehuacán – Cuicatlán. CONABIO. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México. 302 pp.

Carragher, N. O., Frame, M. C. 2004. Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to proteome invasion. *Trends Cell Biol.* 14 (5), 241 – 249.

Chen, Y., Pitzenberger, S.M., Garsky, V.M., Lumma, P.K., Sanyal, G., Baum, J., 1991. Proton

NMR assignments and secondary structure of the snake venom protein echistatin. *Biochemistry* 30, 11625–11636.

Coelho, A.L., De Freitas, M.S., Mariano-Oliveira, A., Rapozo, D.C., Pinto, L.F., Niewiarowski, S., Zingali, R.B., Marcinkiewicz, C., Barja-Fidalgo, C. 2004. RGD and MLD-disintegrins, jarastatin and EC3, activate integrin-mediated signaling modulating the human neutrophils chemotaxis, apoptosis and IL-8 gene expression. *Exp. Cell Res.* 292, 371e384.

Cox D, Brennan M, Moran N. 2010. Integrins as therapeutic targets: Lessons and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 9, 804–820.

Da Silva R. L., De Faria P. C., Da Silva C. N., Tunes P. A., Costa S. O. D., Fortes Dias L. C., Assis G. D., De Lima M. 2014. Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom induces the release of glutamate from cerebrocortical synaptosomes via N and P/Q calcium channels. *Toxicon.* 85, 5 – 16.

Dang, D., Bamburg, J.R., Ramos, D. M., 2006. Alphavbeta3 integrin and cofilin modulate K1735 melanoma cell invasion. *Exp. Cell. Res.* 312, 468–477. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.11.011>.

Della-Casa, M.S., Junqueira-de-Azevedo, I., Butera, D., Clissa, P.B., Lopes, D.S., Serrano, S.M., Pimenta, D.C., Magalha~es, G.S., Ho, P.L., Moura-da-Silva, A.M., 2011. Insularin, a disintegrin from *Bothrops insularis* venom: inhibition of platelet aggregation and endothelial cell adhesion by the native and recombinant GST-insularin proteins. *Toxicon* 57, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.10.013>.

Dennis, E.A. 1994. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2.

Journal of Biological chemistry. 269. 18, 13057–13060.

Desgrosellier, J.S., and Cheresh, D.A., 2010. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer*. 10, 9–22.

Doley, R., Kini, R.M., 2009. Protein complexes in snake venom. *Cell Mol. Life Sci*. 66, 2851–2871. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0050-2>.

Farr, W. L., Nevárez de los Reyes, M., Banda-Leal, J., Lazcano D., 2015. The distribution of *Crotalus totonacus* in Nuevo León, Mexico. *Mesoam. Herpetol*. 2, 243–251.

Fernandez, J.H., Silva, C.A., Assakura, M.T., Camargo, A.C., Serrano, S.M., 2005. Molecular cloning, functional expression, and molecular modeling of bothrostatin, a new highly active disintegrin from *Bothrops jararaca* venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 329, 457–464. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.01.148>.

Ferreira, S. H. 1965. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *Br. J. Pharmacol. Chemother*. 24, 163 – 169.

Fry, B. G. 2015. *Venomous reptiles and their toxins, evolution, pathophysiology and biodiscovery*. Oxford University Press. U.S.A. 546 pp.

Fry, B. G., Scheib H., van der Weerd L., Young B., McNaughtan J., Ramjan S. F. R. 2008. Evolution of an arsenal: structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). *Molecular & Cell Proteomics*. 7, 215 – 246.

- Galán, J.A., Sánchez, E.E., Rodríguez-Acosta, A., Soto, J.G., Bashir, S., McLane, M.A., Paquette-Straub, C., Pérez, J.C., 2008. Inhibition of lung tumor colonization and cell migration with the disintegrin crotatroxin 2 isolated from the venom of *Crotalus atrox*. *Toxicon*. 51, 1186-1196. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.02.004>.
- Galán J.A., Sanchez E.E., Bashir S., Perez J.C., 2005. Characterization and identification of disintegrins in *Crotalus horridus* venom by liquid chromatography and tandem matrix-assisted laser desorption ionization quadrupole ion trap time-of-flight (MALDI-QIT-TOF) mass spectrometry. *Can. J. Chem.* 83, 1124-1131.
- Gené J. A., Roy A., Rojas G., Gutiérrez J. M., Cerdas L. 1989. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*. 27, 841 – 848.
- Gibbs H. L., Sanz L., Chiucchi J. E., Farrell T. M., Calvete J. J. 2011. Proteomic analysis of ontogenetic and diet-related changes in venom composition of juvenile and adult Dusky Pigmy rattlesnakes (*Sistrurus miliarius barbouri*). *Journal of proteomics*. 74, 2169 – 2179.
- Gloyd, H. K. 1940. The rattlesnakes genera *Sistrurus* and *Crotalus*. A study in zoogeography and evolution. *Chicago Acad. Sci. Spec. Publ.* (4) 266p.
- Gould, R., Polokoff, M., Friedman, P., Huang, T., Holt, J., Cook, J., Niewiarowski. 1990. Disitegrins: A Family of Integrin Inhibitory Proteins form Viper Venoms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 195, 168–171.

- Gutiérrez J. M., Rucavado A. 2000. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*. 82, 841 – 850.
- Harris, H. S., Simmons, R. S. 1978. A preliminary account of the rattlesnakes with the descriptions of four new subspecies. *Bull. Maryland Herpetol. Soc.* 14, 105 – 211.
- Hernández D. A. 2013. Crotoxina en el veneno de la serpiente de cascabel *Crotalus simus* en México: su relación con la toxicidad y distribución geográfica. Tesis (Maestría en Ciencias Bioquímicas). Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biotecnología UNAM. México D. F. 81 pp.
- Hodgson W. C. and Wickramaratna J. C. 2002. *In vitro* neuromuscular activity of snake venoms. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 29, 807 – 814.
- Huang TF., Holt, J.C., Lukasiewicz, H., Niewiarowski, S., 1987. Tigramin a low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex. *J. Biol. Chem.* 33, (262), 16157–16163.
- Juárez, P., Comas, I., González-Candelas, F., Calvete, J.J., 2008. Evolution of snake venom disintegrins by positive darwinian selection. *Mol. Biol. Evol.* 25, 2391–2407. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn179>.
- Kauffeld, C. F. 1940. A new rattlesnake from Mexico. *Bull. Chicago Acad. Sci.* 6, 11 – 14.
- King G. F. 2011. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 11, 1469 – 1484.

- Kini, R., Evans, H.J., 1992. Structural domains in venom proteins: Evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. *Toxicon* 30, 265–93.
- Klauber LM. 1972. *Rattlesnakes: Their Habits, Life Histories and Influence on Mankind*. 2nd ed. Berkeley, CA: University of California Press.
- Koh, C. Y., and Manjunatha Kini, R. 2011. From snake venom toxins to therapeutics. Cardiovascular examples. *Toxicon*. 59, 497–506.
- Kochva, E., Oron, U., Ovadia, M., Simon, T., Bdolah, A., 1980. Venom glands, venom synthesis, venom secretion and evolution. In: Eaker, D., Wadström, T. (Eds.), *Natural Toxins*, pp. 3–12.
- Lazcano-Villarreal, D., Banda-Leal, J., Jacobo-Galvan, R.D. 2010. *Serpientes de Nuevo León*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey City, México. pp. 502.
- Lima-dos-Santos, I., Della-Casa, M.S., Portes-Junior, J.A., Calabria, P.A.L., Magalhães, G.S., Moura-da-Silva A.M., 2015. Characterization of Neuwiedin, a new disintegrin from *Bothrops neuwiedi* venom gland with distinct cysteine pattern. *Toxicon* 104, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.08.006>.
- Lomonte B., Angulo Y., Sasa M., Gutiérrez J. M. 2009. The phospholipase A2 homologues of snake venoms: biological activities and their possible adaptive roles. *Protein and peptide Letters*. 16, 860 – 876.

- Lucena, S., Castro, R., Lundin, C., Hofstetter, A., Alaniz, A., Suntravat, M., Sanchez, Elda E., 2015. Inhibition of pancreatic tumoral cells by snake venom disintegrins. *Toxicon* 93, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.11.228>.
- Lucena, S.E., Jia, Y., Soto, J.G., Parral, J., Cantu, E., Brannon, J., Lardner, K., Ramos, C.J., Seoane, A.I., Sánchez, E.E., 2012. Anti-invasive and anti-adhesive activities of a recombinant disintegrin, r-*viridistatin 2*, derived from the Prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). *Toxicon* 60, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.011>.
- Macêdo, A. K. J., Fox, J. W., Castro, M. S. 2015. Disintegrins from snake venoms and their applications in cancer research and therapy.
- Mackessy, S.P., Leroy, J., Mociño-Deloya, E., Kirk Setser., Bryson, R.W., and Saviola, A.J., 2018. Venom ontogeny in the Mexican Lance-Headed rattlesnake (*Crotalus polystictus*). *Toxins* 10, 271. <https://doi.org/10.3390/toxins10070271>.
- Mackessy S. P. 2010. The handbook of venoms and toxins of reptiles. CRCpress. U.S.A. 521 pp.
- Mackessy, S.P. 2008. Venom composition in rattlesnakes: Trends and biological significance. In *The Biology of Rattlesnakes*; Hayes, W.K., Beaman, K.R., Cardwell, M.D., Bush, S.P., Eds.; Loma Linda University Press: Loma Linda, CA, USA pp. 495–510.
- Marcinkiewicz, C., Calvete, J.J., Vijay-Kumar, S., Marcinkiewicz, M.M., Raida, M., Schick, P., Lobb, R.R., Niewiarowski S., 1999. Structural and functional characterization of EMF10, a heterodimeric disintegrin from *Eristocophis macmahoni* venom that selectively inhibits

$\alpha_5\beta_1$ integrin. *Biochemistry* 38, 13302–13309.

Marcinkiewicz, C., Vijay-Kumar, S., McLane, M. A., Niewiarowski, S., 1997. Significance of RGD loop and C-terminal domain of echistatin for recognition of $\alpha_{IIb}\beta_3$ and $\alpha_v\beta_3$ integrins and expression of ligand-induced binding site. *Blood* 90, 1565–1575.

Markland, F.S. Jr., 1997. Snake venoms. *Drugs* 54, 1–10. <https://doi.org/10.2165/00003495-199700543-00003>.

Martínez – Romero G., Rucavado A., Lazcano D., Gutiérrez J. M., Borja M., Lomonte B., Garza – García Y., Zugasti Cruz A. 2013. Comparison of venom composition and biological activities of the subspecies *Crotalus lepidus lepidus*, *Crotalus lepidus klauberi* and *Crotalus lepidus morulus* from Mexico. *Toxicon*. 71, 84 – 95.

Mc. Cranie, J. r. 1993. *Crotalus durissus* Linnaeus. *Catalogue of American Amphibians and Reptiles* 577.1–577.11.

McLane MA, Joerger T, Mahmoud A. 2008. Disintegrins in health and disease. *Front Biosci*. 13, 6617 – 6637.

Meebs D. 2002. *Venomous and Poisonous Animals*. CRCpress. Germany. 339 pp.

Minea, R., Helchowski, C., Rubino, B., Brodmann, K., Swenson, S., Markland F. Jr., 2012. Development of a chimeric recombinant disintegrin as a cost-effective anti-cancer agent with promising translational potential. *Toxicon* 59, 472–486. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.02.020>.

- Mitra, S. K., Schlaepfer, D. D. 2006. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 18 (5), 516 – 523.
- Monleón, D., Esteve, V., Kovacs, H., Calvete, J., Celda, B. 2005. Conformation and concerted dynamics of the integrin-binding site and the C-terminal region of echistatin revealed by homonuclear NMR. *Biochem. J.* 387, 57–66. <https://doi.org/10.1042/BJ20041343>.
- Moore, W.M., Bhat, V.K., Flatt, P.R., Gault, V.A., McClean, S. 2015. Isolation and characterisation of insulin-releasing compounds from *Crotalus adamanteus*, *Crotalus vegrandis* and *Bitis nasicornis* venom. *Toxicon* 101, 48–54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.05.002>
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65, 55–63.
- Pecheur, I., Peyruchaud, O., Serre, C.M., Guglielmi, J., Voland, C., Bourre, F., Margue, C., Cohen-Solal, M., Buffet, A., Kieffer N., Clézardin, P., 2002. Integrin $\alpha v \beta 3$ expression confers on tumor cells a greater propensity to metastasize to bone. *FASEB J.* <http://doi.org/10.1096/fj.01-0911fje>
- Possani, L. D., Sosa, B. P., Alagón, A. C., Burchfield, P. M. 1980. The venom from the snakes *Agkistrodon bilineatus taylori* and *Crotalus durissus totonacus*: lethality, biochemical and immunological properties. *Toxicon* 18, 356 – 360.

Rael E. D., Lieb C. S., Maddux N., Varela - Ramírez A., Pérez J. 1993. Hemorrhagic and Mojave toxins in the venoms of the offspring of two Mojave rattlesnakes (*Crotalus scutulatus scutulatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 106-B. 3, 595 – 600.

Rivas-Mercado, E. A., Garza-Ocañas, L. 2017. Disintegrins obtained from snake venom and their pharmacological potential. *Medicina Universitaria*. 19 (74), 32 – 37.

Rivas, E., Neri-Castro, E., Bénard-Valle, M., Hernández-Dávila, A. I., Zamudio, F., Alagón, A. 2017. General characterization of the venoms of from two species of rattlesnakes and an intergrade population (*C. Lepidus x aquilus*) from Aguascalientes and Zacatecas, Mexico. *Toxicon*. 138, 191 – 195.

Rolli, M., Fransvea, E., Pilch, J., Saven, A., Felding-Habermann, B., 2003. Activated integrin $\alpha v \beta 3$ cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 9482–9487. <https://doi.org/10.1073/pnas.1633689100>.

Saldanha-Gama, R.F., Moraes, J.A., Mariano-Oliveira, A., Coelho, A.L., Walsh, E.M., Marcinkiewicz, C., Barja-Fidalgo, C. 2010. Alpha(9) beta(1) integrin engagement inhibits neutrophil spontaneous apoptosis: involvement of Bcl-2 family members. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 848 – 857.

Sánchez, E.E., Galán, J.A., Russell, D.H., Pérez, J.C., 2006. Isolation and characterization of two disintegrins inhibiting ADP-induced human platelet aggregation from the venom of *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake). *Toxicol Appl Pharmacol* 212, 59–68.

- Sanz, L., Gibbs, H.L., Mackessy, S.P., Calvete, J.J., 2006. Venom proteomes of closely related *Sistrurus* rattlesnakes with divergent diets. *J. Proteome Res.* 5, 2098–2112.
- Saudek, V., Atkinson, R.A., Pelton, J.T., 1991. Three-dimensional structure of echistatin, the smallest active RGD protein. *Biochemistry* 30, 7369–7372.
- Saviola, A.J., Burnsa, P.D., Mukherjee, A.K., Mackessy, S.P., 2016. The disintegrin tzabcanin inhibits adhesion and migration in melanoma and lung cancer cells. *Int. J. Biol. Macromol.* 88, 457–464. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.008>.
- Saviola, A.J., Modahl, C.M., Mackessy, S.P., 2015. Disintegrins of *Crotalus simus tzabcan* venom: Isolation, characterization and evaluation of the cytotoxic and anti-adhesion activities of tzabcanin, a new RGD disintegrin. *Biochimie* 116, 92–102.
- Scarborough, R.M., Rose, J.W., Naughton, M.A., Phillips, D.R., Nannizzi, L., Arfsten, A., Campbell, A.M., Charo, I.F., 1993. Characterization of the integrin specificities of disintegrins isolated from American pit viper venoms. *J. Biol. Chem.* 268, 1058–1065.
- Scarborough, R.M., Rose, J.W., Hsu, M.A., Phillips, D.R., Fried, V.A., Campbell, A.M., Nannizzi, L., Charo, I.F., 1991. Barbourin. A GPIIb-IIIa specific integrin antagonist from the venom of *Sistrurus m. barbouri*. *J. Biol. Chem.* 266, 9359–9362.
- Senger, D. R., Perruzzi, C. A., Streit, M., Kotliansky, V. E., de Fougères, A. R., Detmar, M. 2002. The $\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_2\beta_1$ integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 160,

- Senger, D. R., Claffey, K. P., Benes, J. E., Perruzzi, C. A., Sergiou, A. P., Detmar, M. 1997. Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 13612 – 13617.
- Shimokawa, K., Jai, L.G., Wang, X.M., Fox, J.W., 1996. Expression, activation and sequencing of the recombinant snake venom metalloproteinase, pro-atrolysin E. *Arch. Biochem. Biophys.* 335, 283–94.
- Sloan, E.K., Pouliot, N., Stanley, K.L., Chia, J., Moseley, J.M., Hards, D.K., Anderson, R.L., 2006. Tumor-specific expression of $\alpha v \beta 3$ integrin promotes spontaneous metastasis of breast cancer to bone, *Breast Cancer Res.* 8, R20. <https://doi.org/10.1186/bcr1398>.
- Smith M. T., Ortega J., Beaupre S. J. 2014. Metabolic cost of venom replenishment by Prairie Rattlesnakes (*Crotalus viridis viridis*). *Toxicon.* 86, 1 – 7.
- Smith, H. M., Taylor, E. H. 1945. An annotated checklist and key to the snakes of Mexico. *Bull. U.S. Nat. Mus.* 187, 239 p.
- Stocker K. F. 1998. Research, diagnostic and medicinal uses of snake venom enzymes. In *enzymes from snake venoms*, ed. G. S. Bailey. 705 – 72.
- Swenson, S., Costa, F., Minea, R. Sherwin, R.P., Ernst, W., Fujii, G., Yang, D., Markland F.S. Jr., 2004. Intravenous liposomal delivery of the snake venom disintegrin contortrostatin limits breast cancer progression. *Mol. Cancer Ther.* 3, 499-511.

- Taherian, A., Li, X., Liu, Y., Haas, T.A., 2011. Differences in integrin expression and signaling within human breast cancer cells. *BMC Cancer* 11, 293.
- Taylor, E. H. 1950. Second contribution to the herpetology of San Luis Potosí. *Univ. Kansas Sci. Bull.* 33, 441 – 457.
- Theakston R. D. G., Reid H. A. 1983. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of the world health organization.* 61, 949 – 956.
- Vázquez D. J. y Quintero D. G. 2005. *Anfibios y reptiles de Aguascalientes.* CONABIO. CIEMA. México. 318 pp.
- Walsh EM, Marcinkiewicz C. 2011. Non-RGD – disintegrins, functional and structural relations. *Toxicon.* 58, 355 – 62.
- Wüster, W., Ferguson, J.W., Quijada-Mascareñas, A., Pook, C.E., Salomão, M., Roger S., Rhorpe, R., 2005. Tracing an invasion: landbridges, refugia, and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). *Mol. Ecol.* 14, 1095–1108. [https://doi.org/ 10.1111/j.1365-294X.2005.02471](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02471).
- Yeh, C.H., Peng, H.C., Yih, J.B., Huang, T.F., 1998. A new short chain RGD-containing disintegrin, accutin, inhibits the common pathway of human platelet aggregation. *Biochim. Biophys. Acta* 1425, 493–504.

Zhou, Q., Sherwin, R.P., Parrish, C., Richters, V., Groshen, S.G., Tsao-Wei, D., Markland, F.S., 2000. Contortrostatin a dimeric disintegrin from *Agkistrodon contortrix contortrix*, inhibits breast cancer progression. *Breast Cancer Res. Treat.* 61, 249–259.

Zutter, M. M., Santoro, S. A., Staatz, W. D., Tsung, Y. L. 1995. Re-expression of the alpha 2 beta 1 integrin abrogates the malignant phenotype of breast carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 7411 – 7415.

APÉNDICES

APÉNDICE A

FÁRMACOS DESARROLLADOS CON BASE EN VENENO DE REPTILES

Especie	Fármaco	Descripción
<i>Bothrops jararaca</i>	Captopril®	Agentes hipotensivos modelados a partir de péptidos potenciadores de bradicininas (BPP's). Inhibidores de enzimas convertidoras de angiotensina (IECA). Indicados para hipertención y falla cardíaca.
<i>Bothrops moojeni</i>	Reptilasa®, Bothroctin®, Stypven®, Ecarin®, Protac®	Reactivos de diagnóstico importantes para hemostasia
<i>Bothrops moojeni</i>	Defibrasa® (Batroxobin)	Enzima coagulante, "pegamento de fibrina", utilizado para detener sangrado difuso de hígado o pulmón durante cirugía, mediante el cubrimiento de la superficie con una capa delgada de fibrina.
<i>Calloselasma rhodostoma</i>	Ancord® o Arvin®	Enzimas coagulantes utilizadas para tratamiento de enfermedades tromboembólicas. Decremento dosis-dependiente en nivel de fibrinógeno, disminuye viscosidad de sangre y plasma.
<i>Echis carinatus</i>	Agrastat® (Tirofiban)	Agente antiplaquetario derivado de desintegrina Echistatin. Uso asociado a AAS y heparina no fraccionada, para: <ul style="list-style-type: none"> - Prevención del infarto de miocardio precoz en pacientes ads. con síndromes coronarios agudos sin elevación del segmento ST (SCA-SEST) cuyo último episodio de dolor torácico se ha producido en las últimas 12 h y que presentan cambios en el ECG y/o aumento de las enzimas cardíacas. - Reducción de eventos cardiovasculares mayores en pacientes con infarto agudo de miocardio (IMCEST) que tengan programada una primera ICP.

<i>Sistrurus miliarius barbouri</i>	Integrilin® (Eptifibatide)	Agente antiplaquetario derivado de desintegrina barbourin. Uso asociado a AAS y heparina no fraccionada, para: prevención del infarto de miocardio precoz en ads. con angina inestable o infarto de miocardio sin onda Q con último episodio de dolor torácico dentro de las 24 h y con cambios en ECG y/o con las enzimas cardiacas elevadas.
-------------------------------------	----------------------------	--

APÉNDICE B

PREPARACIÓN DE DILUCIONES Y PREPARACIÓN DE LOS GELES SEPARADOR Y CONCENTRADOR PARA SDS – PAGE

Solución de acrilamida 30% de acrilamida + 0.8% de bis-acrilamida.

Amortiguador inferior “Lower buffer” (buffer tris 1.5 M, SDS 0.4%). Se disolvieron 18.7 g de tris en 50 mL de agua desionizada y se adicionaron 2 mL de SDS al 20%. Se ajustó el pH a 8.8 con HCl concentrado y se aforó a 100 mL.

Amortiguador superior “Upper buffer” (buffer tris 0.5 M, SDS 0.4%). Se disolvieron 6.06 g de tris en 50 mL de agua desionizada y se adicionaron 2 mL de SDS al 20%. Se ajustó pH a 6.8 con HCl concentrado, posteriormente se aforó a 100 mL.

Amortiguador de corrida (buffer tris 0.25 M, glicina 0.19 M, SDS 0.1%). Para una solución 10X, se disolvieron 15.2 g de tris y 72.1 g de glicina en 300 mL de agua desionizada, se adicionaron 25 mL de SDS al 20% y se ajustó pH a 8.6 con NaOH a 10 M, y se aforó a 500 mL.

Amortiguador de corrida desnaturalizante 5X (10% glicerol + 2.5% SDS + 50 mM tris – HCl pH 6.8 + 5% 2 – mercaptoetanol + 0.002% azul de bromofenol). En un tubo marca Falcon de 15 mL, se mezclaron los siguientes volúmenes: 2.5 mL de glicerol, 3.125 mL de SDS al 20%, 1.25 mL tris – HCl 1 M pH 6.8, 1.25 mL de β – mercaptoetanol, 0.5 mL de 1% azul de bromofenol, se aforó a 10 mL con agua desionizada.

Persulfato de amonio al 10% (catalizador). Se disolvieron 0.1 g de persulfato de amonio en 1 mL de agua desionizada.

Solución de tinción (25% isopropaanol + 10% ácido acético + 0.2% de azul de Coomasie R – 250). Se disolvió 1 g de azul de Coomasie R – 250 en 125 mL de isopropaanol, 50 mL de ácido acético y se aforó a 500 mL con agua desionizada. 94

Solución para desteñir (10% metanol + 10% ácido acético). Se mezclaron 400 mL de agua desionizada, 50 mL de metanol y 50 mL de ácido acético

Gel separador al 15%	
Reactivos	Volumen
Lower buffer	1.5 mL
Sol. Acrilamida	3.0 mL
Agua desionizada	1.5 mL
TEMED	10 μ L
PSA 10%	45 μ L

Gel concentrador al 4%	
Reactivos	Volumen
Upper buffer	0.63 mL
Sol. Acrilamida	0.33 mL
Agua desionizada	1.54 mL
TEMED	10 μ L
PSA 10%	40 μ L

APÉNDICE C

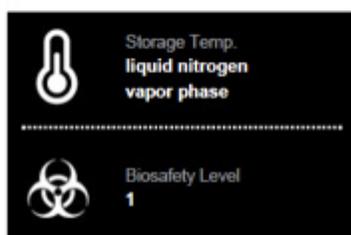
LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO: CÉLULAS MDA-MB-231 Y HMEC-1



Product Sheet

MDA-MB-231 (ATCC® CRM- HTB-26™)

Please read this FIRST



Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Certified Reference Material produced under an [ISO Guide 34:2009](#) accredited process.



Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated Leibovitz's L-15 Medium, Catalog No. 30-2008. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: fetal bovine serum to a final concentration of 10%.

(Note: The L-15 medium formulation was devised for use in a free gas exchange with atmospheric air. A CO₂ and air mixture is detrimental to cells when using this medium for cultivation)

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following

format: [American Type Culture Collection® CRM-HTB-26™](#))

PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA

www.atcc.org

800.838.6597 or 703.365.2700

Fax: 703.365.2750

Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Description

Organism: *Homo sapiens*, human

Tissue: mammary gland/breast; derived from metastatic site: pleural effusion

Disease: adenocarcinoma

Cell Type: epithelial cell (KRAS CRM)

Age: 51 years adult

Gender: female

Morphology: epithelial

Growth Properties: adherent

Isoenzymes:

AK-1, 1

ES-D, 1

G6PD, B

GLO-1, 2

Me-2, 1-2

PGM1, 1-2

PGM3, 1

DNA Profile:

Amelogenin: X

CSF1PO: 12, 13

D13S317: 13

D16S539: 12

D5S818: 12

D7S820: 8, 9

TH01: 7, 9, 3

TPOX: 8, 9

vWA: 15, 18

Cytogenetic Analysis: The cell line is aneuploid female (modal number = 64, range = 52 to 68), with chromosome counts in the near-triploid range. Normal chromosomes N8 and N15 were absent. Eleven stable rearranged marker chromosomes are noted as well as unassignable chromosomes in addition to the majority of autosomes that are trisomic. Many of the marker chromosomes are identical to those shown in the karyotype reported by K.L. Satya-Prakash, et al.

Batch-Specific Information

Refer to the Certificate of Analysis for batch-specific test results.

SAFETY PRECAUTION

ATCC highly recommends that protective gloves and clothing always be used and a full face mask always be worn when handling frozen vials. It is important to note that some vials leak when submersed in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vessel exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris.

Unpacking & Storage Instructions

1. Check all containers for leakage or breakage.
2. Remove the frozen cells from the dry ice packaging and immediately place the cells at a temperature below -130°C, preferably in liquid nitrogen vapor, until ready for use.

Handling Procedure for Frozen Cells

To insure the highest level of viability, thaw the vial and initiate the culture as soon as possible upon receipt. If upon arrival, continued storage of the frozen culture is necessary, it should be stored in liquid nitrogen vapor phase and not at -70°C. Storage at -70°C will result in loss of viability.

1. Thaw the vial by gentle agitation in a 37°C water bath. To reduce the possibility of contamination, keep the O-ring and cap out of the water. Thawing should be rapid (approximately 2 minutes).
2. Remove the vial from the water bath as soon as the contents are thawed, and decontaminate by dipping in or spraying with 70% ethanol. All of the operations from this point on should be carried out under strict aseptic conditions.
3. Transfer the vial contents to a centrifuge tube containing 9.0 mL complete culture medium and spin at approximately 125 x g for 5 to 7 minutes.
4. Resuspend cell pellet with the recommended complete medium (see the specific batch information for



Product Sheet

HMEC-1 (ATCC® CRL-3243™)

Please read this FIRST

Storage Temp.
liquid nitrogen
vapor phase

Biosafety Level
2

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is MCDB131 (without L-Glutamine). To make the complete growth medium, add the following components to the base medium:

- 10ng/mL Epidermal Growth Factor (EGF)
- 1 µg/mL Hydrocortisone
- 10 mM Glutamine
- fetal bovine serum (FBS) to a final concentration of 10%

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: HMEC-1 (ATCC® CRL-3243™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Description

Organism: *Homo sapiens*, human
Tissue: dermal endothelium
Cell Type: dermal microvascular endothelium
Age: newborn
Gender: male
Morphology: endothelial-like
Growth Properties: adherent
DNA Profile: Amelogenin: X,Y
CSF1PO: 10, 12
D13S317: 11, 12
D16S539: 11, 12
D5S818: 12
D7S820: 8, 10
TH01: 7
TPOX: 8, 11
WWA: 15, 17

Batch-Specific Information

Refer to the Certificate of Analysis for batch-specific test results.

SAFETY PRECAUTION

ATCC highly recommends that protective gloves and clothing always be used and a full face mask always be worn when handling frozen vials. It is important to note that some vials leak when submerged in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vessel exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris.

Unpacking & Storage Instructions

1. Check all containers for leakage or breakage.
2. Remove the frozen cells from the dry ice packaging and immediately place the cells at a temperature below -130°C, preferably in liquid nitrogen vapor, until ready for use.

Handling Procedure for Frozen Cells

To insure the highest level of viability, thaw the vial and initiate the culture as soon as possible upon receipt. If upon arrival, continued storage of the frozen culture is necessary, it should be stored in liquid nitrogen vapor phase and not at -70°C. Storage at -70°C will result in loss of viability.

1. Thaw the vial by gentle agitation in a 37°C water bath. To reduce the possibility of contamination, keep the O-ring and cap out of the water. Thawing should be rapid (approximately 2 minutes).
2. Remove the vial from the water bath as soon as the contents are thawed, and decontaminate by dipping in or spraying with 70% ethanol. All of the operations from this point on should be carried out under strict aseptic conditions.
3. Transfer the vial contents to a centrifuge tube containing 9.0 mL complete culture medium, and spin at approximately 125 x g for 5 to 7 minutes.
4. Resuspend cell pellet with the recommended complete medium (see the specific batch information for the culture recommended dilution ratio). It is important to avoid excessive alkalinity of the medium during recovery of the cells. It is suggested that, prior to the addition of the vial contents, the culture vessel containing the complete growth medium be placed into the incubator for at least 15 minutes to allow the medium to reach its normal pH (7.0 to 7.6). pH (7.0 to 7.6).
5. Incubate the culture at 37°C in a suitable incubator. A 5% CO₂ in air atmosphere is recommended if using the medium described on this product sheet.

Handling Procedure for Flask Cultures

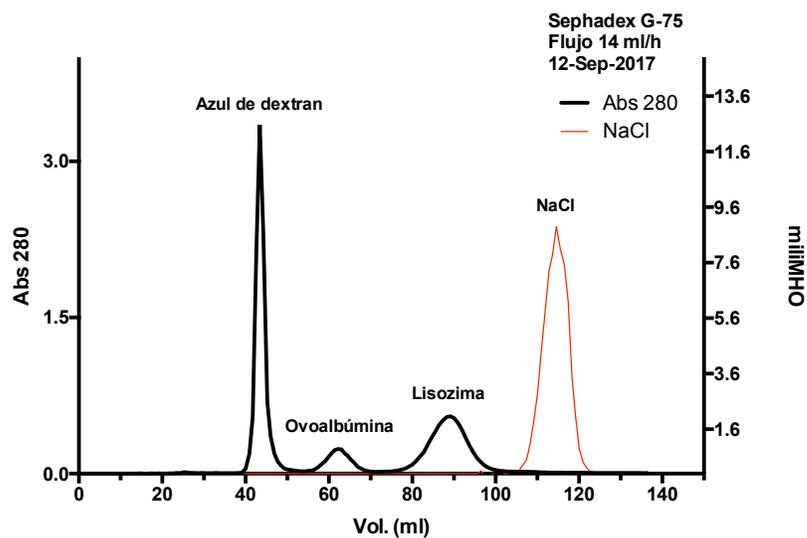
The flask was seeded with cells (see specific batch information) grown and completely filled with medium at ATCC to prevent loss of cells during shipping.

1. Upon receipt visually examine the culture for macroscopic evidence of any microbial contamination. Using an inverted microscope (preferably equipped with phase-contrast optics), carefully check for any evidence of microbial contamination. Also check to determine if the majority of cells are still

APÉNDICE D

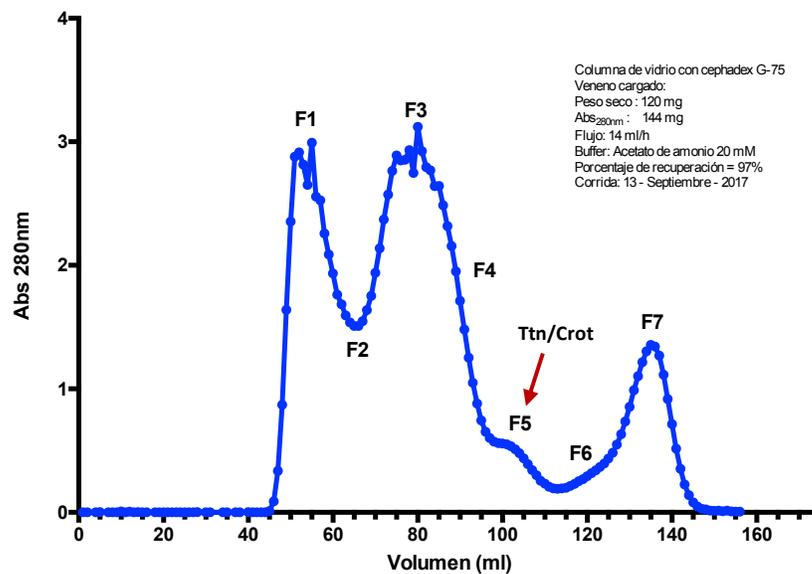
CROMATOGRAFÍA POR EXCLUSIÓN MOLECULAR Y TABLAS DE RENDIMIENTO

Marcadores de peso molecular

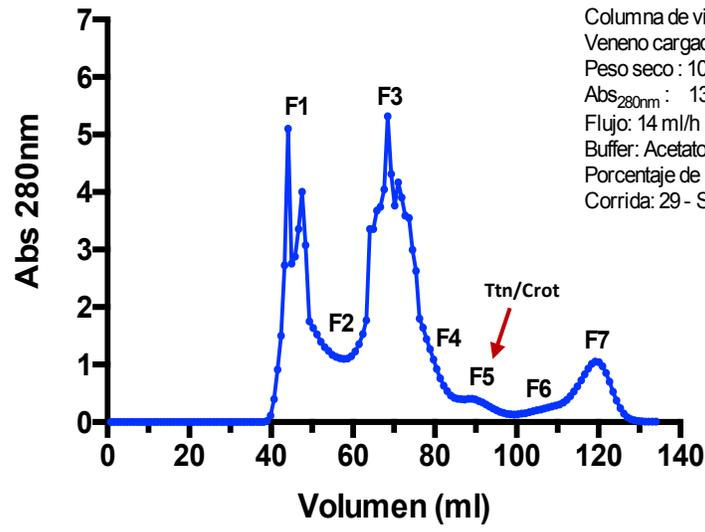


Marcadores: Azul dextran 210,000 kDa; Ovoalbúmina 45 kDa; Lisozima; 14.3 kDa; Nacl 58.4 g/mol

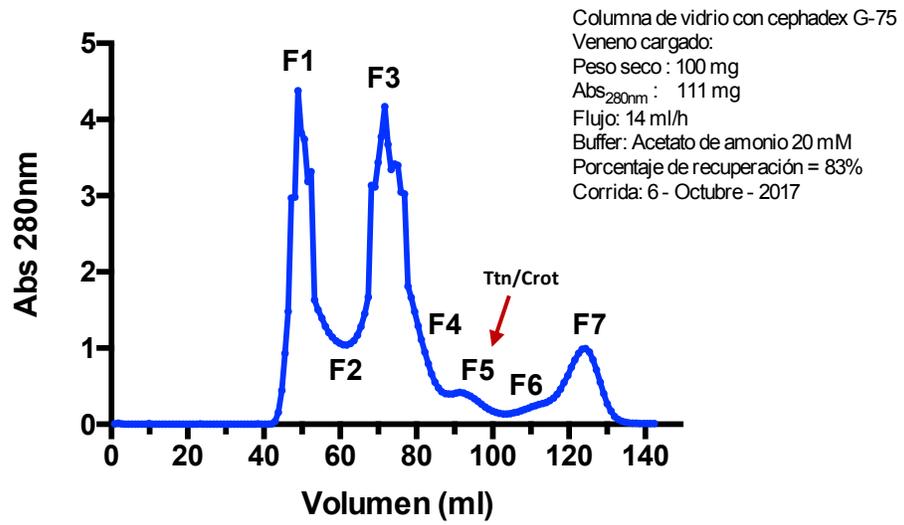
Veneno *C. totonacicus*: SE-LC #1



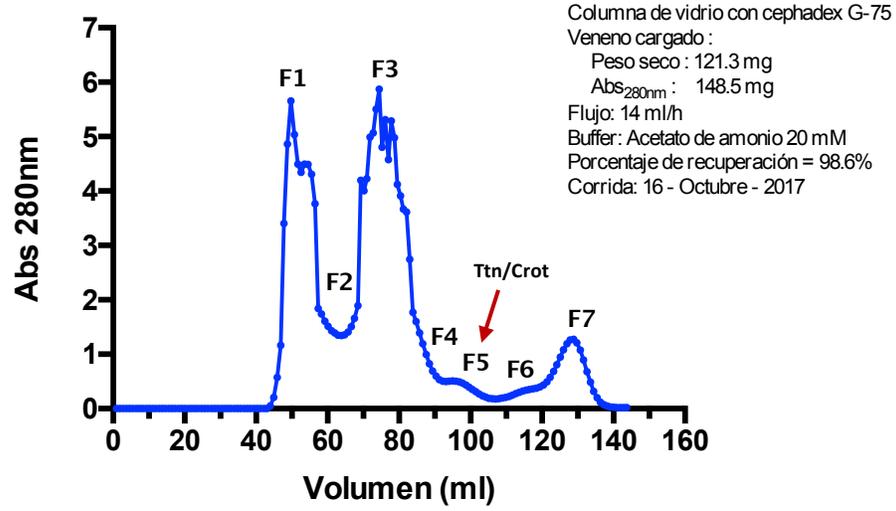
Veneno *C. totonacus*: SE-LC #2



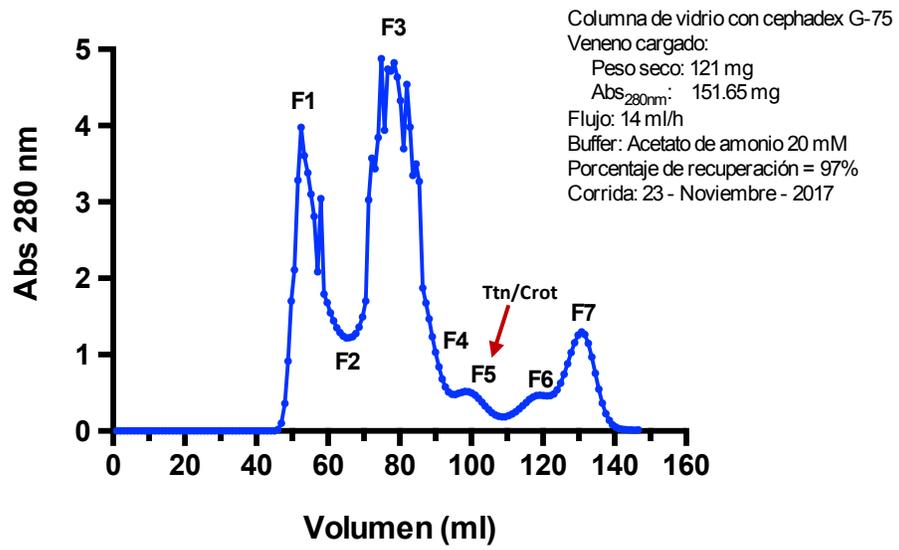
Veneno *C. totonacus*: SE-LC #3



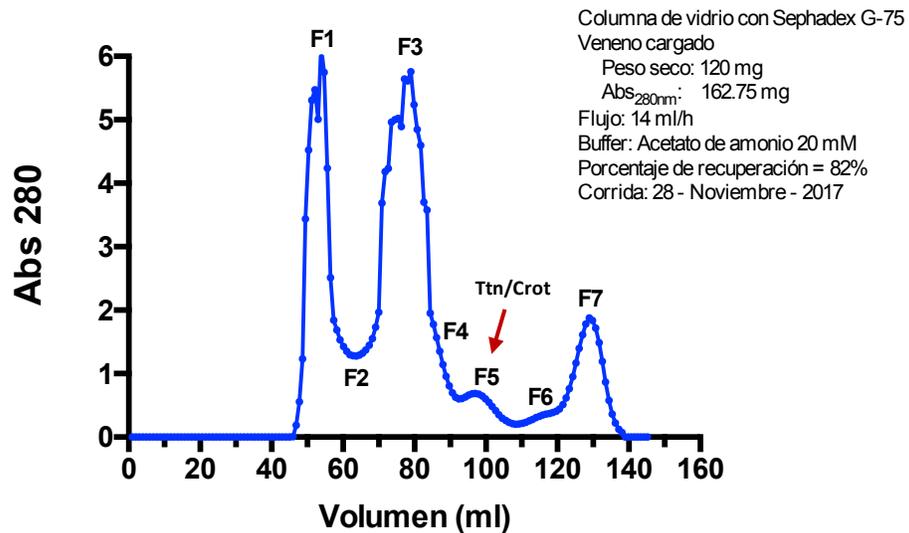
Veneno *C. totonacus*: SE-LC #4



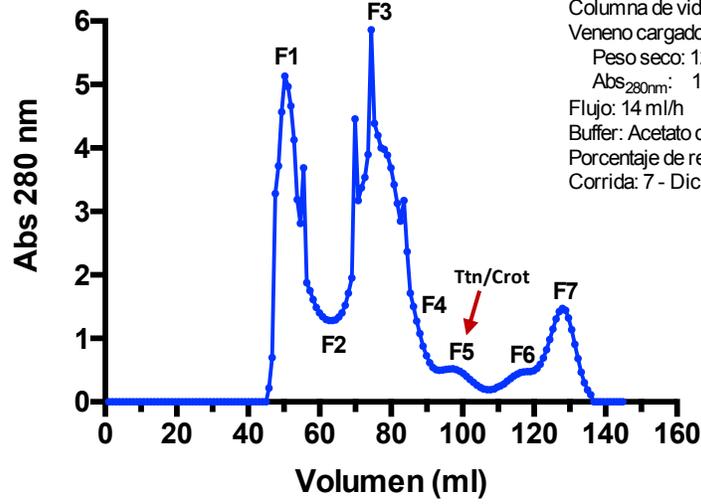
Veneno *C. totonacus*: SE-LC #5



Veneno *C. totonacus*: SE-LC #6

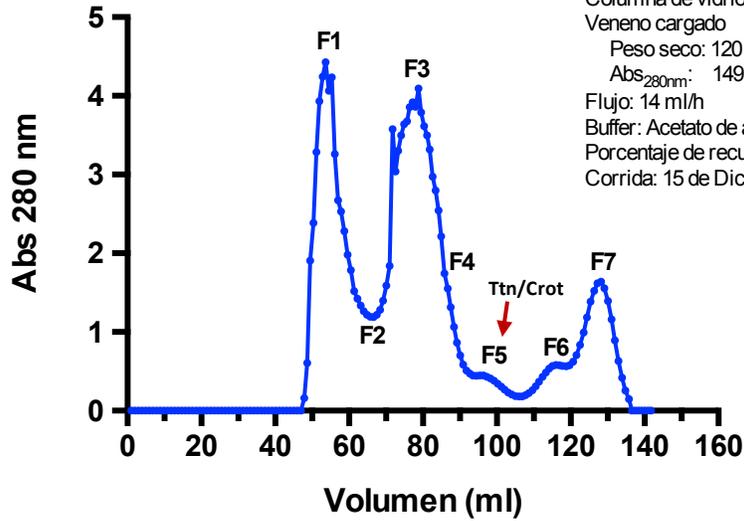


Veneno *C. totonacus*: SE-LC #7



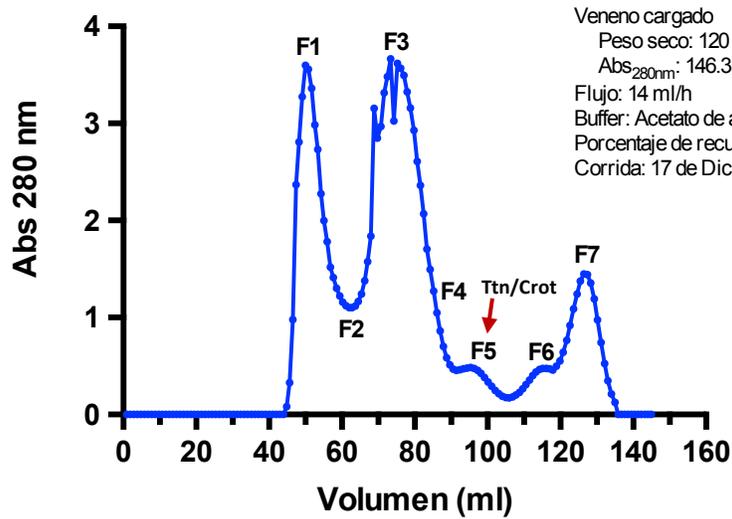
Columna de vidrio con Sephadex G-75
Veneno cargado
Peso seco: 120.3 mg
Abs_{280nm}: 165.6 mg
Flujo: 14 ml/h
Buffer: Acetato de amonio 20 mM
Porcentaje de recuperación = 91%
Corrida: 7 - Diciembre - 2017

Veneno *C. totonacus*: SE-LC #8



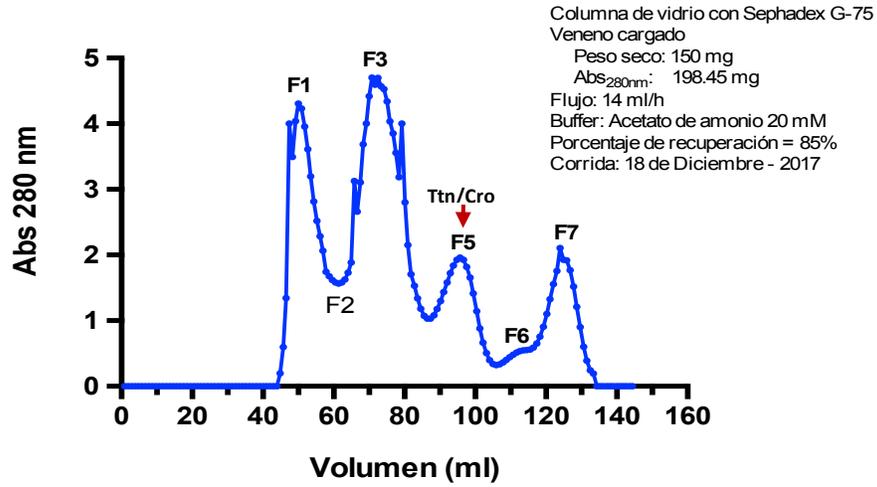
Columna de vidrio con Sephadex G-75
Veneno cargado
Peso seco: 120 mg
Abs_{280nm}: 149 mg
Flujo: 14 ml/h
Buffer: Acetato de amonio 20 mM
Porcentaje de recuperación = 95%
Corrida: 15 de Diciembre - 2017

Veneno *C. totonacus*: SE-LC #9

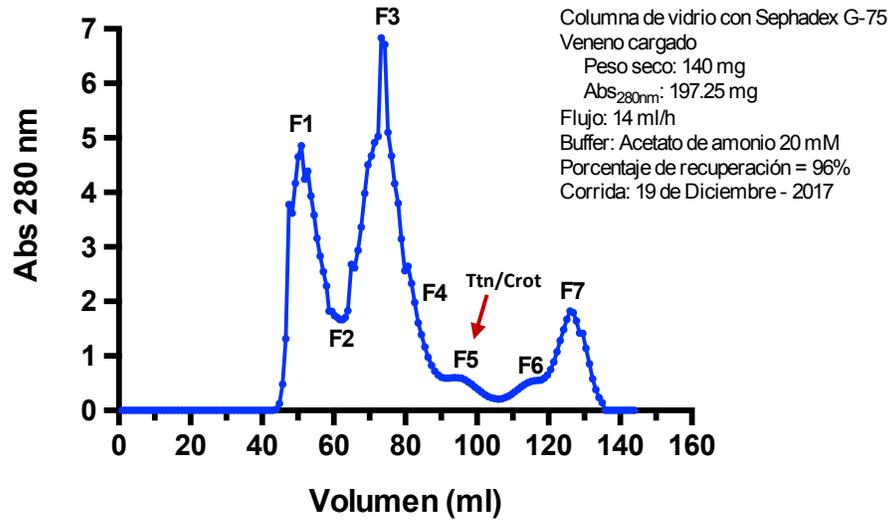


Columna de vidrio con Sephadex G-75
Veneno cargado
Peso seco: 120 mg
Abs_{280nm}: 146.3 mg
Flujo: 14 ml/h
Buffer: Acetato de amonio 20 mM
Porcentaje de recuperación = 90%
Corrida: 17 de Diciembre - 2017

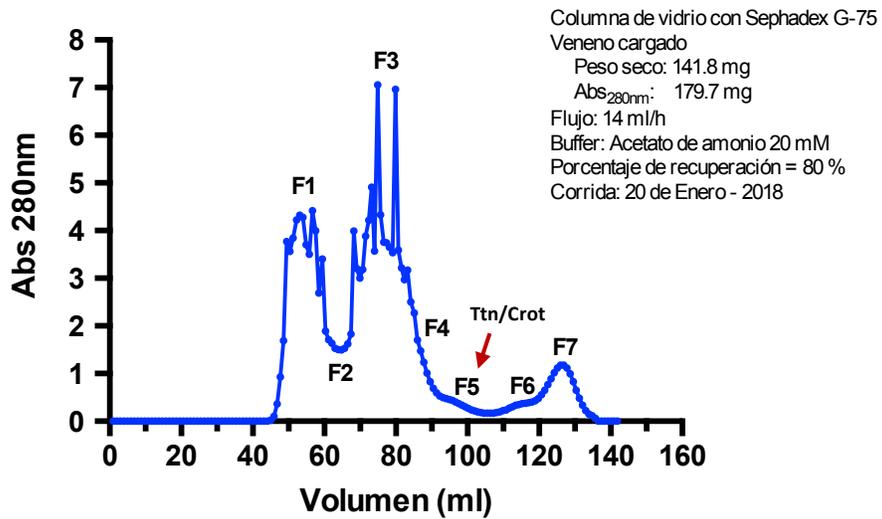
Veneno *C. totonacicus*: SE-LC #10



Veneno *C. totonacicus*: SE-LC #11



Veneno *C. totonacicus*: SE-LC #12



TABLAS DE RENDIMIENTO DE SE-LC

Tabla de rendimiento Exclusión molecular -1- *C. totonacus*

Fraccion	Tubos (rango)	# tubos	Volumen (ml)	Abs 280nm	U.A
F I	46 a 55	10	9	2.8052	25.2468
F II	56 a 66	11	9.6	2.2952	22.0339
F III	67 a 78	12	10.5	2.6205	27.5152
F IV	79 a 98	20	17.5	2.1885	38.2987
F V	99 a 115	17	11	0.36405	4.0045
F VI	116 a 125	10	9.3	0.60069	5.5864
F VII	126 a 146	21	19	0.90025	17.1047
Recuperado:					139.79
Rendimiento:					97.07 %

Tabla de rendimiento Exclusión molecular -2- *C. totonacus*

Fraccion	Tubos (rango)	# tubos	Volumen (ml)	Abs 280nm	U.A
F I	49 a 59	11	9.2	2.00485	18.4446
F II	60 a 74	15	14	1.22159	17.1022
F III	75 a 89	15	13	2.7435	35.666
F IV	90 a 99	10	8.5	1.03902	8.8316
F V	100 a 117	18	15.5	0.2787	4.3198
F VI	118 a 130	13	12	0.2177	2.6128
F VII	131 a 153	23	20	0.4785	9.5716
Recuperado:					96.5486
Rendimiento:					72.05%

Tabla de rendimiento Exclusión molecular -3- *C. totonacus*

Fraccion	Tubos (rango)	# tubos	Volumen (ml)	Abs 280nm	U.A
F I	49 a 59	11	9.4	1.4367	13.5050
F II	60 a 75	16	15	1.1928	17.8933
F III	76 a 86	11	9.5	3.6505	34.6803
F IV	87 a 97	11	9.8	0.9668	9.47493
F V	98 a 116	19	18	0.3022	5.4396
F VI	117 a 129	13	12.2	0.2269	2.76903
F VII	130 a 147	18	17	0.5369	9.12866
Recuperado:					92.8909
Rendimiento:					83%

Tabla de rendimiento Exclusión molecular -4- *C. totonacus*

Fraccion	Tubos (rango)	# tubos	Volumen (ml)	Abs 280nm	U.A
F I	49 a 61	13	12.5	3.3101	41.3762
F II	62 a 74	13	12	1.4301	17.1612
F III	75 a 91	17	14.5	4.0703	59.0193
F IV	92 a 99	8	7.4	1.1101	8.2147
F V	100 a 119	20	18.5	0.3310	6.1235
F VI	120 a 132	13	12.5	0.3129	3.9112
F VII	133 a 148	16	15	0.7534	11.301
Recuperado: 147.082					
Rendimiento: 98.6%					

Tabla de rendimiento Exclusión molecular -5- *C. totonacus*

Fraccion	Tubos (rango)	# tubos	Volumen (ml)	Abs 280nm	U.A
F I	49 a 60	12	11	2.1301	23.4311
F II	61 a 74	14	12.5	1.4201	17.7512
F III	75 a 91	17	15	3.3500	50.2500
F IV	92 a 102	11	10	3.3500	33.5000
F V	103 a 117	15	14	0.3600	5.0400
F VI	118 a 131	14	13.5	0.3606	4.8681
F VII	132 a 147	16	15.4	0.8304	12.7881
Recuperado: 147.628					
Rendimiento: 97.3%					

Tabla de rendimiento Exclusión molecular -6- *C. totonacus*

Fraccion	Tubos (rango)	# tubos	Volumen	Abs 280nm	U.A
F I	48 al 59	12	10.5	2.2392	23.5116
F II	60 al 74	15	13.5	1.8822	25.4097
F III	75 al 89	15	13.5	3.3919	45.79065
F IV	90 al 100	11	9.8	1.2154	11.91092
F V	101 al 117	17	16	0.4228	6.7648
F VI	118 al 128	11	10.4	0.3194	3.32176
F VII	129 al 147	19	17.5	1.0025	17.54375
Recuperado: 134.25318					
Rendimiento: 82.4 %					

Tabla de rendimiento Exclusión molecular -7- *C. totonacus*

Fraccion	Tubos (rango)	# tubos	Volumen	Abs 280nm	U.A	
F I	47 al 58	12	10.5	2.9056	30.5088	
F II	59 al 73	15	13.5	1.6861	22.76235	
F III	74 al 90	17	15.5	4.3044	66.7182	
F IV	91 al 101	11	10	0.8887	8.887	
F V	102 al 115	14	13.5	0.3582	4.8357	
F VI	116 al 129	14	13	0.3922	5.0986	
F VII	130 al 146	17	15	0.8663	12.9945	
					Recuperado:	151.8
					Rendimiento:	91.6 %

Tabla de rendimiento Exclusión molecular -8- *C. totonacus*

Fraccion	Tubos (rango)	# tubos	Volumen	Abs 280nm	U.A	
F I	49 al 60	12	10	2.9056	30.5088	
F II	61 al 76	16	14	1.6861	22.76235	
F III	77 al 94	18	14	4.3044	66.7182	
F IV	95 al 104	10	8.5	0.8887	8.887	
F V	105 al 117	13	12.5	0.3582	4.8357	
F VI	118 al 131	14	12.8	0.3922	5.0986	
F VII	132 al 149	18	17	0.8663	12.9945	
					Recuperado:	142.84
					Rendimiento:	95.8 %

Tabla de rendimiento Exclusión molecular -9- *C. totonacus*

Fraccion	Tubos (rango)	# tubos	Volumen (ml)	Abs 280nm	U.A	
F I	46 al 59	14	12	1.82524	21.90288	
F II	60 al 73	14	12	1.277019	15.324228	
F III	74 al 89	16	14.5	4.409682	63.940389	
F IV	90 al 99	10	9	0.894513	8.050617	
F V	100 al 114	15	14.5	0.340911	4.9432095	
F VI	115 al 127	13	12	0.346035	4.15242	
F VII	128 al 145	18	17	0.782002	13.294034	
					Recuperado:	131.608
					Rendimiento:	89.9%

Tabla de rendimiento Exclusión molecular -10- *C. totonacus*

Fraccion	Tubos (rango)	# tubos	Volumen	Abs 280nm	U.A	
F I	46 al 60	15	13	2.37094	30.82222	
F II	61 al 69	9	8	1.624604	12.99683	
F III	70 al 88	19	16	4.41274	70.60384	
F IV	89 al 94	6	5.5	1.263351	6.94843	
F V	95 al 115	21	19.5	1.223237	23.85312	
F VI	116 al 126	11	10.5	0.473891	4.97585	
F VII	127 al 144	18	17	1.118332	19.01164	
					Recuperado:	169.21
					Rendimiento:	85.2%

Tabla de rendimiento Exclusión molecular -11- *C. totonacus*

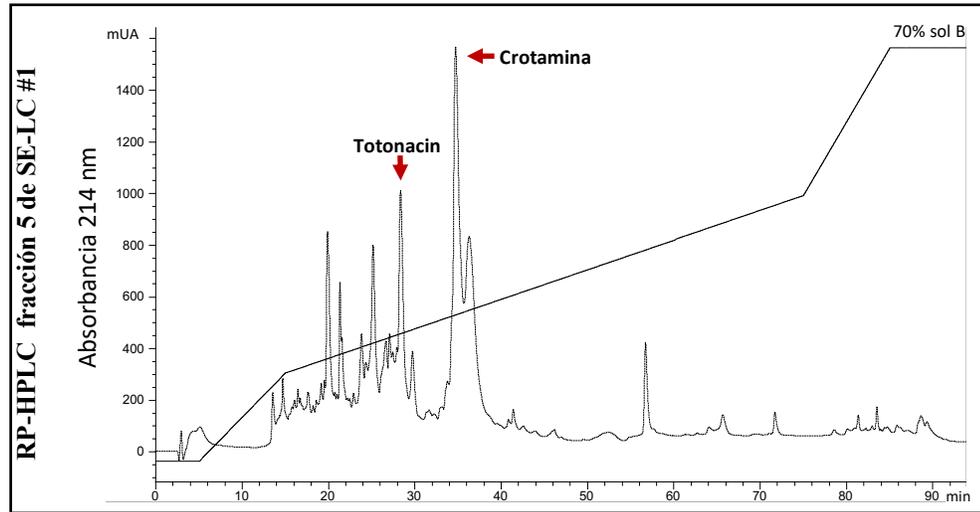
Fraccion	Tubos (rango)	# tubos	Volumen	Abs 280nm	U.A	
F I	46 al 61	16	14	2.64661	37.05254	
F II	62 al 69	8	6	1.724195	10.34517	
F III	70 al 84	15	14	6.64577	93.04078	
F IV	85 al 99	15	14	1.46288	20.48032	
F V	100 al 114	15	14	0.426252	5.967528	
F VI	115 al 126	12	11	0.381801	4.199811	
F VII	127 al 146	20	18	1.061089	19.099602	
					Recuperado:	190.86
					Rendimiento:	96.3%

Tabla de rendimiento Exclusión molecular -12- *C. totonacus*

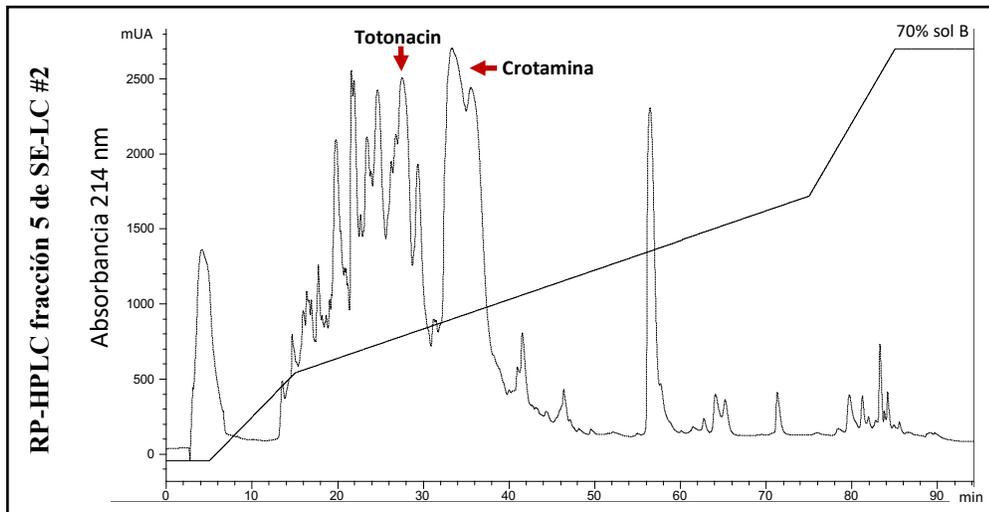
Fraccion	Tubos (rango)	# tubos	Volumen	Abs 280nm	U.A	
F1	47 al 62	16	14.5	2.59703	37.65693	
F2	63 al 71	9	8	1.81436	14.51488	
F3	72 al 89	18	15	3.68199	55.22985	
F4	90 al 99	10	9	1.55258	13.97322	
F5	100 al 116	17	15	0.568655	8.52982	
F6	117 al 130	14	12.5	0.29881	3.73512	
F7	131 al 148	18	16	0.684129	10.94606	
					Recuperado:	144.58
					Rendimiento:	80.45%

APENDICE E

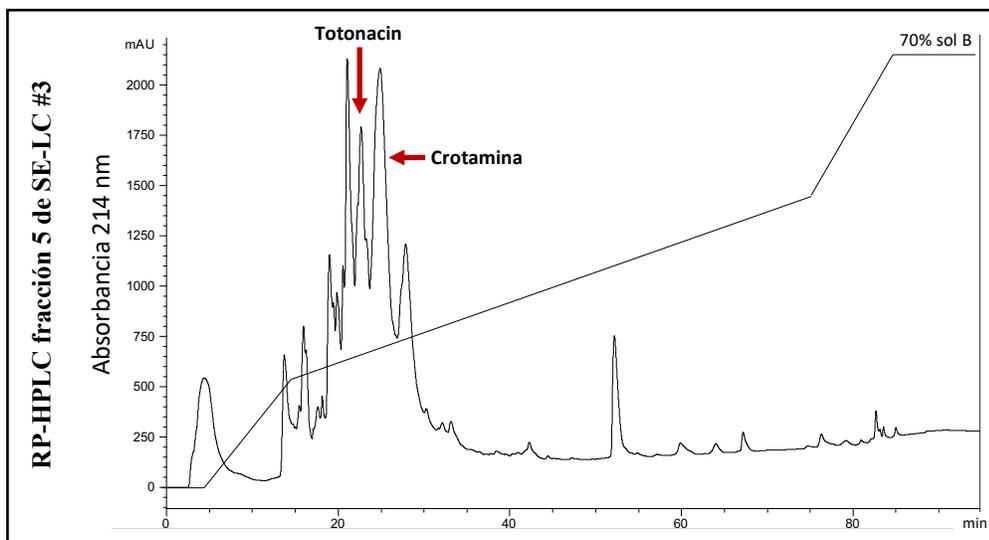
CORRIDAS RP-HPLC DE FRACCIÓN 5 DE SE-LC



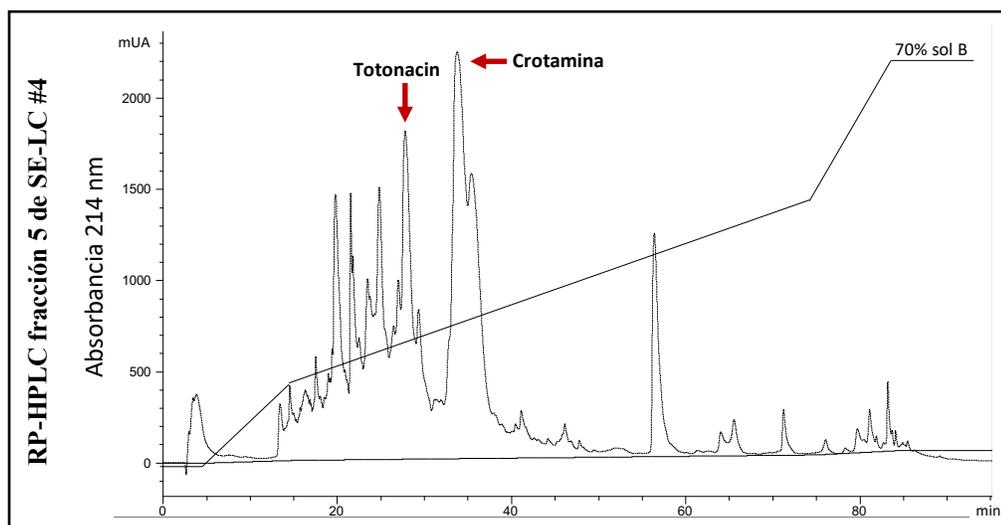
Volúmen cargado a la columna 708 μ g de fracción 5 de SE-LC en 2 mL de agua conteniendo 0.1% TFA.



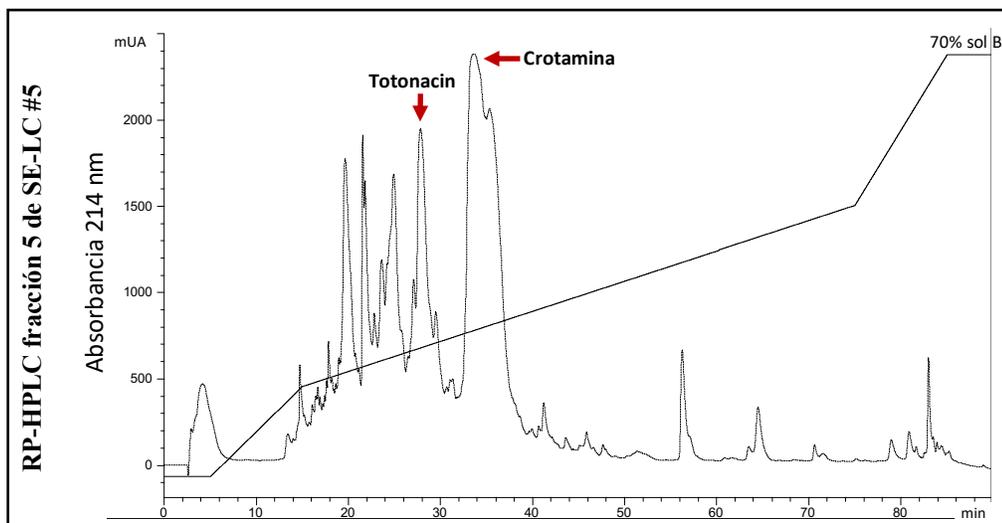
Volúmen cargado a la columna 3.7 mg de fracción 5 de SE-LC en 1.9 mL de agua conteniendo 0.1% TFA



Volúmen cargado a la columna 2.1 y 1.0 mg de fracción 5 de SE-LC en 1.9 y 2.0 mL de agua conteniendo 0.1% TFA respectivamente (2 corridas).

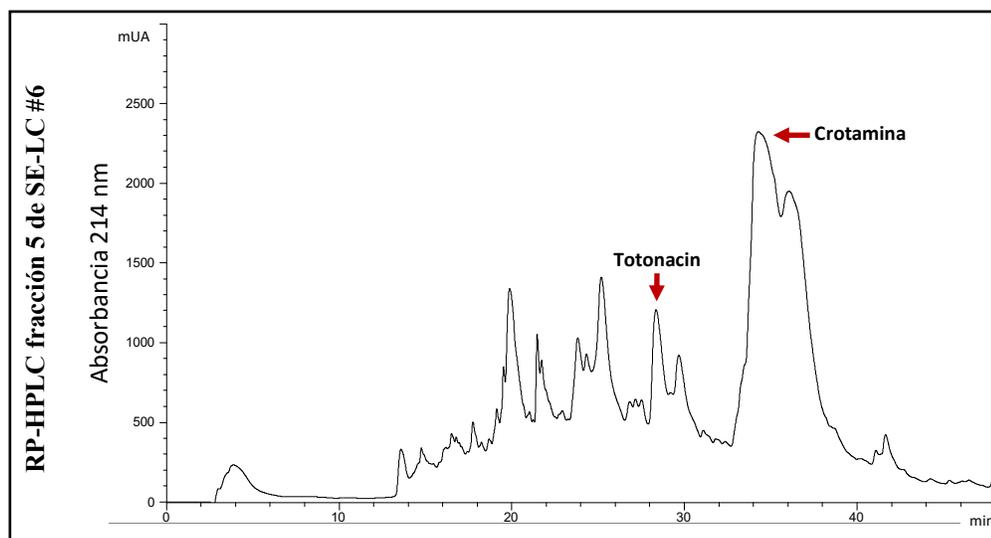


Volúmen cargado a la columna: 1.6 mg de fracción 5 de SE-LC en 0.8 mL de agua conteniendo 0.1% TFA.

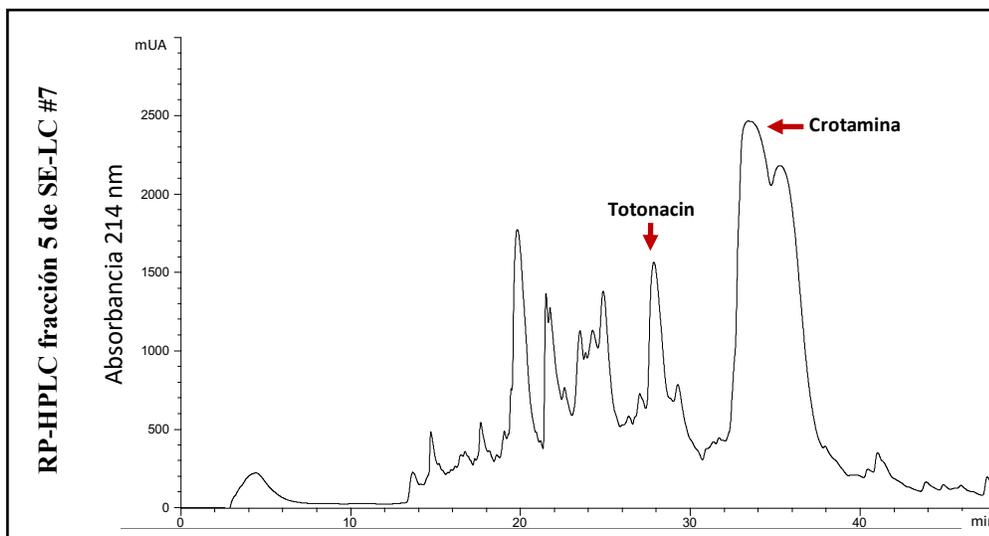


Volúmen cargado a la columna: 2.12 mg de fracción 5 de SE-LC en 1.9 mL de agua conteniendo 0.1% TFA.

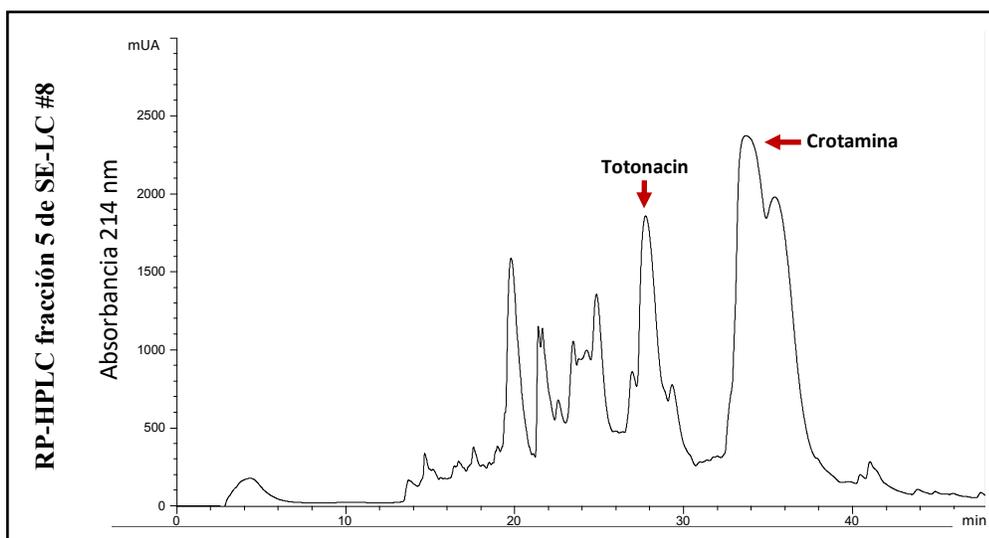
A partir de la SE-LC #6, se completó la caracterización de totonacin, el resto de las corridas de HPLC se detuvieron al minuto 48, posterior a la aparición de la crotamina.



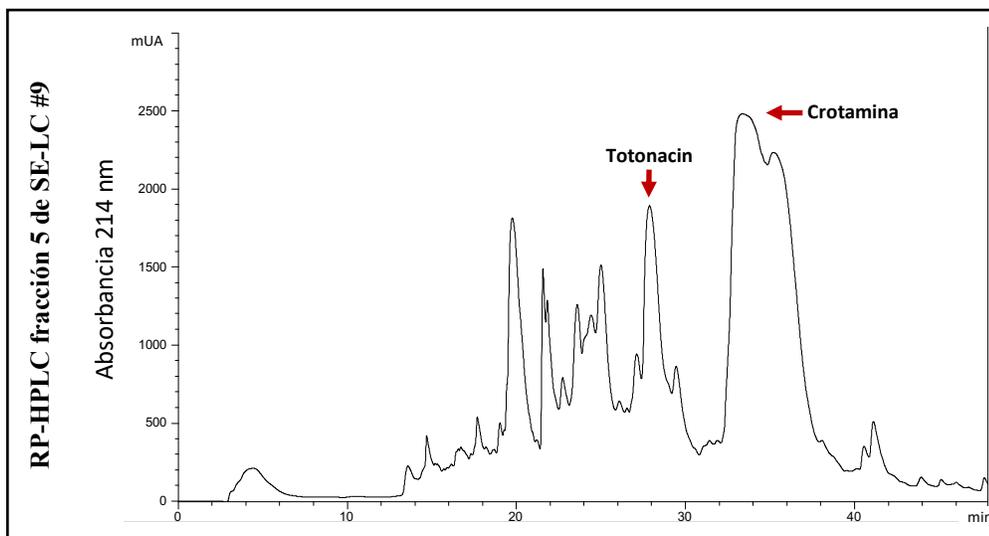
Volúmen cargado a la columna: 3, 1.6 y 1.7 mg de fracción 5 de SE-LC en 1.8, 0.9 y 0.95 mL de agua conteniendo 0.1% TFA respectivamente (3 corridas).



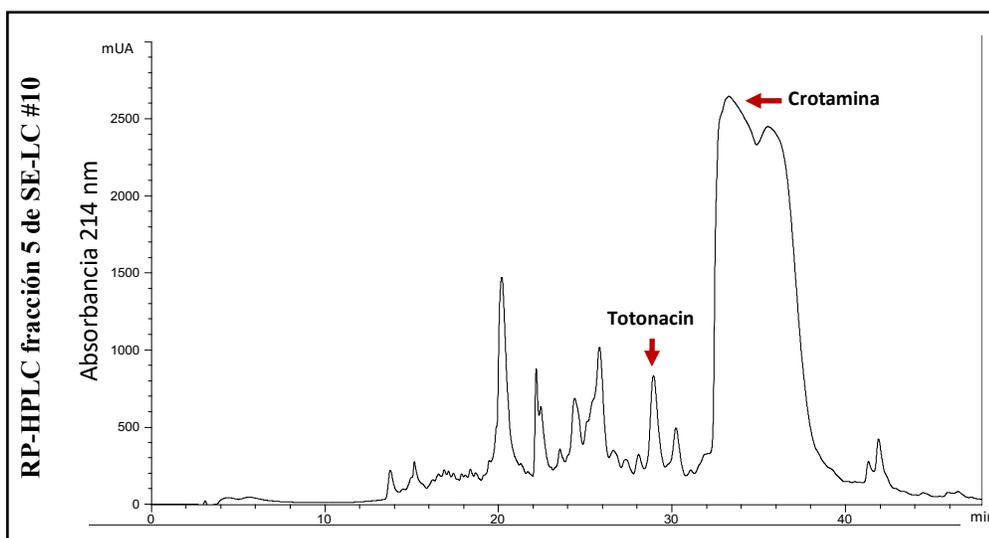
Volúmen cargado a la columna: 2.2 y 2.2 mg de fracción 5 de SE-LC en 2 y 2 mL de agua conteniendo 0.1% TFA respectivamente (2 corridas).



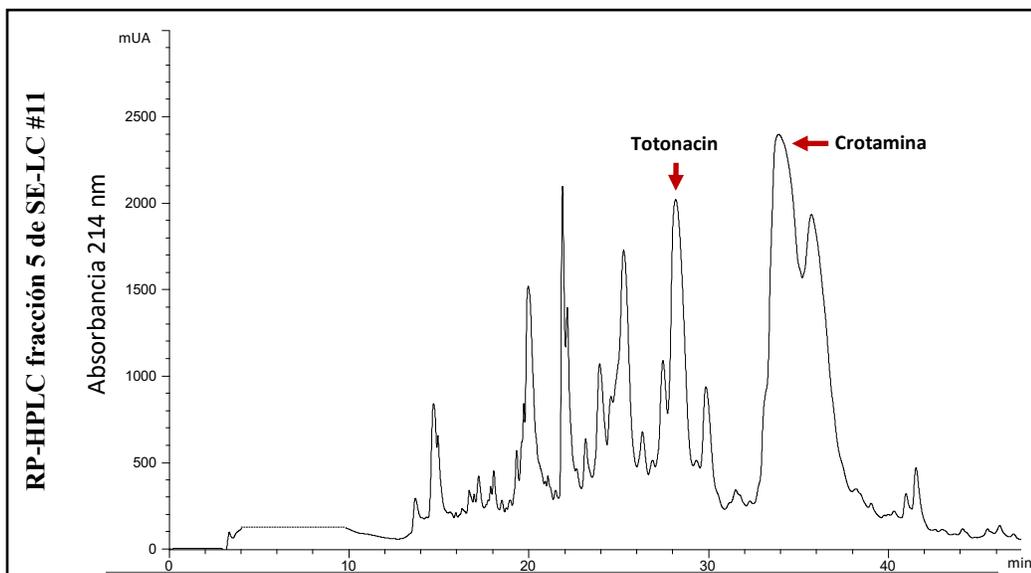
Volúmen cargado a la columna: 1.8 y 1.8 mg de fracción 5 de SE-LC en 2 y 2 mL de agua conteniendo 0.1% TFA respectivamente (2 corridas).



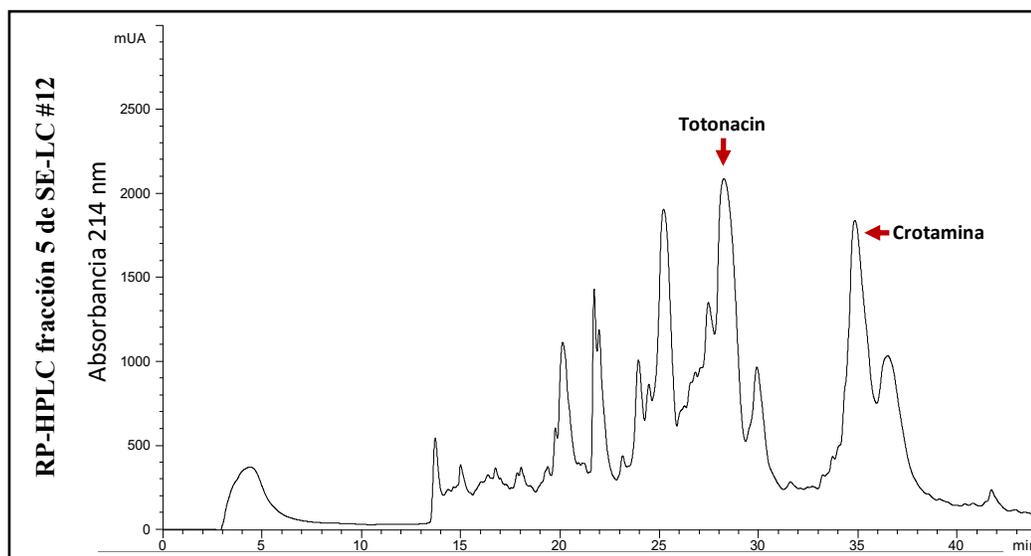
Volúmen cargado a la columna: 2.14 y 2.18 mg de fracción 5 de SE-LC en 1.8 y 1.8 mL de agua conteniendo 0.1% TFA respectivamente (2 corridas).



Volúmen cargado a la columna: 1.86, 1.67, 1.86, 1.48, 1.67, 1.48, 2.86, 2.7 y 2.7 mg de fracción 5 de SE-LC en 1, 0.9, 1, 0.8, 0.9, 0.8, 1.8, 1.7 y 1.7 mL de agua conteniendo 0.1% TFA respectivamente (9 corridas).



Volúmen cargado a la columna: 2, 1.54 y 1.54 mg de fracción 5 de SE-LC en 1.7, 1.3 y 1.3 mL de agua conteniendo 0.1% TFA respectivamente (3 corridas).



Volúmen cargado a la columna: 1.6, 1.6 y 1.6 mg de fracción 5 de SE-LC en 2, 2 y 2 mL de agua conteniendo 0.1% TFA respectivamente (3 corridas).