

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES



“Caracterización toxinológica del veneno de la
serpiente mano de piedra (*Metlapilcoatlus
occiduus*: Viperidae) y su variación ontológica”

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Mariana Rivas Gálvez

para optar al grado académico de **Licenciada en Biología**

Guatemala
2022

“Caracterización toxinol6gica del veneno de la
serpiente mano de piedra (*Metlapilcoatlus*
occiduus: Viperidae) y su variaci6n ontol6gica”

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES



“Caracterización toxinológica del veneno de la
serpiente mano de piedra (*Metlapilcoatlus*
occiduus: Viperidae) y su variación ontológica”

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Mariana Rivas Gálvez

para optar al grado académico de **Licenciada en Biología**

Guatemala

2022

Vo.Bo.

(f)



M.Sc. Daniel Ariano Sánchez

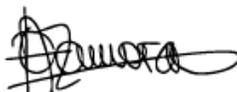
Terna Examinadora

(f)



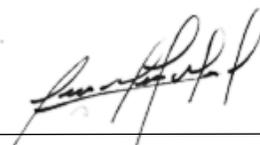
M.Sc. Daniel Ariano Sánchez

(f)



Ph.D. Alejandra Zamora

(f)



M.Sc. José Miguel Morales

Fecha de aprobación: Guatemala, 08 de diciembre, 2022

PREFACIO

A los primeros que debo agradecer por la realización de este estudio es a **Dios**, por abrirme las puertas y las oportunidades necesarias que me permitieron llegar hasta aquí. Luego, quiero agradecer a mi familia, mi mamá **Ana Lucía Gálvez de Rivas**, mi papá **Oscar René Rivas Godoy** y a mi hermano **Oscarodrigo Rivas Gálvez** quienes desde el inicio me apoyaron incondicionalmente a cumplir mis metas a pesar de los obstáculos durante el camino. Quiero agradecer a **Carlos Andrés Letona Torres**, que durante el desarrollo de este trabajo estuvo presente en cada momento para motivarme a seguir adelante. Agradezco a mi amiga y compañera de carrera **Rocío León** por su apoyo incondicional durante la ejecución del presente estudio, quien me acompañó a realizar extracciones de veneno y aportar información valiosa a mi tesis.

El mundo y la ciencia de los animales siempre ha sido y será un universo de infinitas posibilidades. En el planeta, tenemos tanta fauna y mucho por descubrir. Esto también puede reducirse a Guatemala, un país con altos porcentajes de riqueza y abundancia de fauna silvestre, en donde irónicamente se conoce muy poco de sus fascinantes especies. Es por eso, que aportar al conocimiento de la serpiente mano de piedra (*Metlapilcoatlus occiduus*) para mi es un honor, considerando que es una especie tan poco y muy conocida al mismo tiempo. Lo que vengo a aportar en este trabajo, es para y por el mundo, yo solo he sido la herramienta que ha traído a la luz todo este conocimiento que pertenece al pueblo. Este proyecto no hubiera sido posible sin el apoyo y las ideas de mi asesor de tesis principal **M.S.c. Daniel Ariano Sánchez**, quien desde el principio plasmó las incógnitas y la inspiración para llevar a cabo este estudio, el cual sería de los primeros en ser reportados a nivel internacional. Su conocimiento, estudios, experiencia, profesionalismo y actitud fueron factores vitales para que este proyecto pudiera llevarse a cabo. Por otro lado, también agradezco a mis dos asesores de laboratorio para esta tesis, **PhD. Alejandra Zamora** y **M.S.c. Miguel Morales** quienes con su experiencia, voluntad y profesionalismo estuvieron dispuestos en todo momento a apoyarme a perfeccionar mis técnicas de laboratorio para poder generar los resultados más precisos y exactos posibles. Estuvieron disponibles en todo momento para ayudarme con cualquier problemática que encontrara durante el proyecto. En ambos casos, tuve una excelente atención y logré aprender mucho sobre su buena actitud y motivación por enseñar. Quiero dar gracias a **PhD. Jiichiro Yoshimoto** por prestarme espacio en el laboratorio de Entomología del CEAB de la Universidad del Valle de Guatemala, en donde pude mantener mis grillos y realizar mis bioensayos experimentales. En todo momento, estuvo pendiente para ver en qué podía apoyarme. Agradezco a **Priscila Juárez**, por siempre estar pendiente, autorizar y brindarme todo el material de laboratorio necesario para mi trabajo de tesis, pues en todo momento estuvo disponible para resolver y apoyarme al respecto. Asimismo, agradezco a **José Roberto Ordoñez** y al **personal de bodega** por otorgarme todo material y reactivos necesarios para mi estudio, así como abrir los laboratorios para que pudiera ejecutar mi trabajo. De igual manera, agradezco a **M.S.c. Gabriela Alfaro** y a **Ericka Odily** por hacer posibles todos los trámites y permisos necesarios para la autorización y revisión del presente trabajo de graduación. Doy gracias también a mi compañero **Daniel Reyes** por compartir el espacio de laboratorio en donde se trabajó durante un tiempo experimentaciones similares entre nuestros trabajos de tesis.

Por otro lado, agradezco a el Zoológico la Aurora, a **PhD. Rowland Griffin**, al **Doctor Alejandro Striedinger** y **Erick Hernández** quienes hicieron posible la extracción de muestras de veneno de *Metlapilcoatlus occiduus*, cuestión que fue vital para el desarrollo de este estudio. Agradezco a **PhD. Rowland Griffin** por realizar las extracciones de veneno, junto con brindarme información valiosa sobre la Biología de la serpiente de la presente tesis. También por estar pendiente de mis llegadas al Zoológico la Aurora y tramitar los respectivos permisos para las ordeñadas de veneno. Gracias a **Erick Hernández** que durante su estadía en el Zoológico la Aurora me enseñó técnicas de manipulación de reptiles venenosos incluyendo a *M. occiduus*. Al mismo tiempo aportó datos importantes sobre su Biología, cuestión que fue de mucha utilidad para el desarrollo de este estudio. También dar gracias a la **Universidad del Valle de Guatemala**, la **Facultad de Ciencias y Humanidades** y el **departamento de Biología** por patrocinar este trabajo y todo el material necesario para llevarlo a cabo. Agradezco también al departamento de **Bioquímica y Biotecnología de la Universidad del Valle de Guatemala**, quienes accedieron a trabajar en conjunto con el departamento de Biología para compartir material de laboratorio y reactivos para la presente investigación. También agradezco al **comité de Bioética de la Universidad del Valle de Guatemala** y a la **Doctora Vanesa Granados** por la revisión y autorización de las metodologías de trabajo del presente estudio.

Gracias a las serpientes *Metlapilcoatlus occiduus* quienes fueron el sujeto principal de este estudio, y me regalaron de su veneno. Aprendí mucho sobre esta especie, fue todo un privilegio haber podido trabajar con estos animales así de cerca. Agradezco **por la vida de los grillos** que fueron los sujetos experimentales de la presente tesis, quienes fueron sacrificados y pasaron por incomodidad al ser inoculados, todo por y para la ciencia.

Este trabajo me lo dedico **a mí misma**, como muestra de amor propio y de todo lo que puedo lograr cuando me lo propongo con liderazgo, esfuerzo, perseverancia y sobre todo haciéndolo con amor. Esto es evidencia de mi capacidad como persona y mujer de ciencia, y me demuestra que todo lo que sueño lo podré lograr mientras entienda que mi único límite es la mente. *Todos estamos destinados a cumplir nuestros sueños cuando seguimos nuestra pasión y confiamos en nosotros mismos.* ¡Mi primer logro de muchos!

“Cualquier cosa que quieras hacer en este mundo, se puede lograr. Lo más importante que he descubierto que quizás puedas usar, es ser apasionado y entusiasta en la dirección que tú eliges en la vida y serás un ganador ”. - **Steve Irwin**

ÍNDICE

PREFACIO.....	i
LISTA DE CUADROS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	xiv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS	3
A. GENERAL.....	3
B. ESPECÍFICOS.....	3
III. HIPÓTESIS.....	4
IV. JUSTIFICACIÓN.....	5
V. MARCO TEÓRICO.....	7
A. Aspectos generales de la Biología de las víboras de foseta brincadoras (" <i>Jumping pitviers</i> ").....	7
B. Aspectos de la Biología de <i>Metlapilcoatlus occiduus</i>	11
C. Características del veneno de <i>Metlapilcoatlus occiduus</i>	17
1. Acción y características de las proteínas y enzimas en el veneno de <i>Metlapilcoatlus</i> y <i>Atropoides</i>	19
a. Metaloproteasas dependientes del Zinc.....	19
b. Serina proteasas.....	20
c. Fosfolipasas A ₂	21
D. Variación y composición de en los venenos de las serpientes modernas (Viperidae).....	23
a. Particularidades de la biología del veneno de serpientes modernas.....	23
b. Cambios ontológicos en el veneno de serpientes.....	25
c. Cambio ontológico en el veneno de otras especies de víboras.....	28
VI. METODOLOGÍA.....	31
1. Extracción de veneno en víboras.....	31
2. Cuantificación de proteínas en el veneno.....	33
3. Ensayo de SDS-PAGE.....	34
4. Bioensayo de letalidad y determinación de la DL ₅₀ en grillos domésticos (<i>Acheta domesticus</i>).....	40
a. Preparación de recintos para los grillos.....	42
b. Preparación y limpieza de cajas experimentales.....	43
c. Descarte de material con residuos de veneno.....	44
d. Descarte de grillos muertos e inoculados con veneno.....	44
1. Determinación de la solución control y solvente.....	44
2. Bioensayos de letalidad del veneno en grillos.....	45

3. Bioensayos para la determinación de la DL ₅₀ de las muestras de veneno.....	45
4. Disecciones de grillos.....	47
VII. RESULTADOS.....	50
A. Análisis y caracterización del veneno de <i>Metlapilcoatlus occiduus</i>	50
1. Cuantificación total de proteínas en las muestras de veneno.....	50
2. Proteínas presentes en las muestras de veneno.....	51
B. Bioensayos e inoculación de venenos en grillos domésticos (<i>A. domesticus</i>).....	55
1. Bioensayos de letalidad y efectos de los venenos en la etología de los grillos.....	55
2. Determinación de la DL ₅₀ en los venenos.....	62
3. Disecciones y efectos sistémicos del veneno.....	64
IX. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	72
A. Análisis y caracterización biológica del veneno de <i>Metlapilcoatlus occiduus</i>	72
1. Cuantificación de proteínas con bioensayo de Bradford.....	72
2. Proteínas presentes en las muestras de venenos SDS PAGE.....	72
B. Bioensayos e inoculación de venenos en grillos domésticos (<i>A. domesticus</i>).....	76
1. Etología y efectos sistémicos de los solventes y el veneno en los grillos.....	76
2. LD ₅₀ y porcentaje de mortalidad.....	80
3. Disecciones y efectos del veneno en el tejido.....	84
X. CONCLUSIONES.....	88
XI. RECOMENDACIONES.....	90
XII. LITERATURA CTADA.....	91
XIII. ANEXOS.....	108
Anexo 1. Cálculo para obtención de concentración de veneno inoculado en grillo por diluciones.....	113
Anexo 2. Cálculos para determinar concentración de veneno inoculado en tratamientos de diluciones por el volumen de inyección (50 µL).....	113
Anexo 3. Script utilizado para la obtención de la DL ₅₀ en veneno de juveniles. Se utilizó el paquete “HelpersMG” y el modelo “logistic”. Se usó el mismo Script para calcular la DL ₅₀ en el veneno de serpientes adultas.....	116
Anexo 4. Carta de autorización para el presente trabajo del Comité de Bioética UVG para trabajar extracciones de veneno de <i>M.occiduus</i>	120
Anexo 5. Recomendaciones para bioensayo de SDS-PAGE.....	121

LISTADO DE CUADROS

METODOLOGÍA

Cuadro 1. Preparación de estándares de solución madre BSA.....	34
Cuadro 2. Bioensayos en triplicado para cada muestra de veneno.....	34
Cuadro 3. Preparación de soluciones y reactivos para geles SDS PAGE.....	35
Cuadro 4 y 5. Preparación de <i>Resolving</i> y <i>Stacking Gel</i>	36
Cuadro 6. Diluciones seriadas para las muestras de veneno juvenil y adulta de <i>M.occiduus</i>	46
Cuadro 7. Metodología de inoculación para diluciones de las muestras de veneno de <i>M.occiduus</i>	46

RESULTADOS

Cuadro 8. Rangos de los pesos moleculares (kDa) para proteínas y componentes de los veneno de serpientes de la familia Viperidae.....	51
Cuadro 9. Tiempo transcurrido para periodos de parálisis y muerte de los sujetos experimentales.....	60
Cuadro 10. Efectos sistémicos y en el tejido de los sujetos experimentales tras la inoculación de las distintas diluciones para las dos muestras de veneno: adulta y juvenil.....	73

ANEXOS

Cuadro 11. Etograma 1 para registro de comportamiento individual de cada grillo post-inoculación del bioensayo de letalidad y pruebas de solvente.....	108
Cuadro 12. Etograma 2 para el resumen y registro del comportamiento de grillos post-inoculación del Etograma 1 (Cuadro 15).....	109
Cuadro 13. Etograma 3 para el registro de datos de la post-inoculación de dilución de veneno para bioensayo de DL50 a las 24 horas.....	110
Cuadro 14. Etograma 4 para el registro de datos de la post-inoculación de dilución de veneno para bioensayo de DL50 inmediatamente y una (1) hora después.....	111
Cuadro 15. Etograma 5 para el resumen y registro del comportamiento de grillos post-inoculación del Etograma 3 y 4 (Cuadro 17 y 18).....	112
Cuadro 16. Cálculos para determinar la dosis exacta inoculada en los grillos.....	114
Cuadro 17. Dosis de veneno inyectadas en grillos y número de muertes según la dilución para el veneno de serpientes adultas.....	115

Cuadro 18. Dosis de veneno inyectadas en grillos y número de muertes según la dilución para veneno de serpientes juveniles.....**115**

LISTADO DE FIGURAS

MARCO TEÓRICO

- Figura 1.** Características morfológicas principales de las víboras brincadoras (*Metlapilcoatlus olmec*).....9
- Figura 2.** Especies representativas de las víboras brincadoras (“Jumpig Pit Vipers”). 1. *Metlapilcoatlus occiduus*; 2. *M. mexicanus*; 3. *M. indomitus*; 4. *M. nummifer*; 5. *M. olmec*; 6. *Atropoides picadoi*9
- Figura 3.** Árbol taxonómico de la agrupación de las víboras brincadoras. ****Nota:** Este árbol taxonómico no está a escala evolutiva, este diagrama tiene fines de ilustrativos y explicativos.....10
- Figura 4.** Relación filogenética entre género *Atropoides*, *Cerrophidion spp.*, *Agkistrodon contortrix*, *Porthidium spp.* según Jadin, et al., 2010. Observar que *Atropoides picadoi* muestra ser un grupo monofilético, formando un clado con *Porthidium spp.* También se muestra una división basal entre *A. picadoi* y el especies restantes de *Atropoides*11
- Figura 5.** Mapa de distribución de *Metlapilcoatlus occiduus*. Se extiende desde el sur de Chiapas, por toda la vertiente del Pacífico de Guatemala hasta ciertas zonas del sureste de El Salvador y Canseco.....15
- Figura 6.** Ejemplar *Metlapilcoatlus occiduus* adulto. Tamaño mediano. A. Coloración oscura de *M. occiduus* con patrones de rombos sobrepuestos. B. Cabeza ancha, gruesa, triangular con ojo pequeño. Hocico corto y plano. Banda de escamas formada desde la punta del ojo hasta la zona inferior de la mandíbula, de tonalidad más oscura que el resto del cuerpo, escamas agrupadas formando una mancha bajo el ojo. C. Morfología del cuerpo de *M. occiduus*: cuerpo grueso y ancho. Cola corta parcialmente prensil y más oscura que el resto del cuerpo. Cabeza triangular y ancha.....15
- Figura 7.** Características principales de *M. occiduus* que la diferencian del resto de víboras brincadoras (Jumping Pit Vipers). Se observa la termofoseta que caracteriza a Viperinae, grupo al cual pertenece *M.occiduus*. Se observa la prominente banda de color café oscuro o negra que se extiende desde las escamas post-oculares hasta unos centímetros después de las escamas ultimas-infralabiales. Es evidente el grupo de escamas oscuras interoculabiales bajo el ojo que forman la mancha café-negra que caracteriza a la especie.16

Figura 8. Tipo de dentadura en *M. occiduus*: Solenoglifa. Dos colmillos en la zona frontal del maxilar. Ambos con ductos de veneno en el centro que conectan con la glándula venenosa ubicada en la zona superior cefálica. El veneno pasa por el ducto y es inoculado en la presa por los orificios de salida de la dentadura.....17

Figura 9. Serpientes *M. occiduus* juveniles alimentándose en cautiverio. Muerden a la presa y la retienen en sus fauces de 5 a 10 minutos. El animal muere por los efectos del veneno. Luego engullen el alimento. Esto se observó tanto en juveniles como en adultas.17

Figura 10. Efectos físicos del coctel proteico de SVPs, SVMPs y PLA₂ en extremidades humanas. “A.” Incisiones aplicadas en la mano y pierna de dos pacientes mordidos por una serpiente venenosa desconocida en Chittagong, Bangladesh. Los cortes en la piel son necesarios por la inflamación severa del tejido causado por las enzimas. “B.” Formación de hematomas, ampollas e iniciación de proceso de necrosis por mordida de *Bothrops asper*. “C.” Edema local marcado, con presencia de equimosis, linfangitis, adenopatías regionales y dolor intenso. Se evidencia la acción hemorrágica y formación de trombos y coágulos en el cuerpo a causa del coctel proteico del veneno (serpiente desconocida). “D.” Edema sobrepasa la extremidad, coagulación intravascular diseminada, hemolisis, necrosis, dolor intenso, muerte de las capas de la piel (serpiente desconocida).....23

Figura 11. Diferencias en las dietas de serpientes adultas y juveniles/neonatos. Los ejemplares juveniles se alimentan de presas de tamaño pequeño mayormente ectotérmicas, así como también de crías de roedores. Los ejemplares adultos se alimentan de presas de tamaño grande mayormente endotérmicas, pero también pueden alimentarse de reptiles como otras serpientes o lagartijas. Para fines de ilustrativos se colocaron fotografías de *N. atara* y *B. atrox* por los informes reportando variación ontológica en ambas especies.....27

METODOLOGÍA

Figura 12. Extracción de veneno de víbora adulta *M. occiduus* adulta en el Zoológico la Aurora.....32

Figura 13. Extracciones de veneno de víbora *M. occiduus* en el Zoológico la Aurora. “A.” Masaje de glándulas de veneno de víbora adulta. Veneno depositado en beaker de 100 mL. “B.” Ordeñada de víbora juvenil. Inserción de colmillos en capas de papel Parafilm. Veneno depositado en beaker de 100 mL. “C.” Limpieza de gotas de veneno que quedaron atrapadas en las capas de papel Parafilm. Se transfirieron al pool de muestras con una pipeta de 100 µL.....32

Figura 14. Preparación de pools de veneno para el estudio. Se hicieron dos pools para la obtención de dos (2) muestras: Muestra 1: víboras adultas (izquierda); Muestra 2: víboras juveniles (derecha).....	33
Figura 15. Diferencia de la consistencia y periodo de gelificación de los geles Stacking y Resolving entre las dos recetas de prueba. “A.1.” Resolving y Stacking gel de receta BioRad, 2011; Merk, 2021. Consistencia blanda, delgada y tiempo de gelificación 20-50 minutos. “A.2.” <i>Resolving</i> y <i>Stacking</i> gel de la receta Laemli, 1970; Brunelle y Green, 2014. Consistencia sólida, compacta, gruesa; tiempo de gelificación 3-7 minutos (con corrección). “B.” Comparativa entre geles <i>Stacking</i> (B.1.) y <i>Resolving</i> (B.2.) realizados con dos recetas diferentes. En los dos (2) geles se observó una mejor consistencia y menor tiempo de gelificación para la receta de Laemli, 1970; Brunelle y Green, 2014 (L.) en contraste de la receta BioRad y Merk.....	37
Figura 16. Mapa para cargar los pozos con las dos muestras de veneno preparadas: Veneno de juveniles y veneno de adultas. **Nota: El diagrama solo muestra 4 cargas de veneno preparado (por muestra) en los pozos, debido a que la figura disponible en la aplicación solo tenía 10 espacios (en el experimento se usaron 15 pozos).....	38
Figura 17. Diagrama de flujo general para preparación de electroforesis SDS-PAGE para las muestras de veneno de <i>M.occiduus</i> juvenil y adulta.	39
Figura 18. Método de inoculación de tratamientos en especie modelo <i>A. domesticus</i> . Vista dorsoventral de la vía de inyección: zona lateral del abdomen atrás de las patas posteriores. “A.” Vista dorsoventral boca-abajo; “B.” Vista dorsoventral boca-arriba.....	40
Figura 19. Método de inoculación de tratamientos en especie modelo <i>A. domesticus</i> durante bioensayos del estudio. “A.” Vista dorsoventral de la vía inoculadora de veneno puro de <i>M.occiduus</i> juvenil. “B.” Acercamiento de Figura “25 A”.....	41
Figura 20. Cajas experimentales para aislar a cada grillo de manera individual en una celda después de la inoculación de tratamiento.....	42
Figura 21. Grillos separados por celdas en las cajas experimentales después de la inoculación de uno de los tratamientos del estudio. A ningún individuo se le dejó provisiones: agua y/o comida.....	42
Figura 22. Cajas camiseras con hoyuelos en las tapas, cartones de huevo, sustrato de periódico y alimento para albergar a los grillos durante la experimentación. Las cajas estuvieron colocadas en un lugar seco y fresco.....	43
Figura 23. Metodología de disección en grillos. “A.” Se colocaron dos alfileres en la zona ventral del grillo, uno en el centro del tórax y otro en la punta del abdomen. Esto inmovilizó al cuerpo del insecto. “B.” Se realizó un corte longitudinal entre los dos alfileres previamente insertados. El corte	

se hizo con tijerillas de disección y/o bisturí. “C.” Colocación de alfileres en los pliegues laterales del grillo formado por los cortes. Estos alfileres facilitaron la apertura del plano ventral para la observación del estado del tejido interno.....49

RESULTADOS

Figura 24. Curva estándar a base de BSA para determinar la concentración proteica de las dos muestras de veneno. Se generó la ecuación $y = 2839.5x - 331.42$ a partir de la gráfica.....50

Figura 25. Perfil de SDS-PAGE de los principales componentes y/o proteínas del veneno de *Metlapilcoatlus occiduus* adulta. “A.” Esquema elaborado en *GelAnalyzer* de las bandas proteicas y sus pesos moleculares basados en el gel original. La escala y dimensionales para el peso molecular es logarítmica kDa. “B.” Gel de SDS-PAGE original con bandas detectadas; promedio del peso molecular de todas las bandas formadas a partir de los valores d “A.”; “C”. Gel de SDS-PAGE original.....52

Figura 26. Proteínas y componentes identificadas en las bandas formadas en SDS-PAGE de veneno de adulta. Se formó un total de 9 bandas, todas con pesos moleculares diferentes (kDa). Las proteínas fueron identificadas a partir de su peso molecular según lo reportado en literatura previa.....53

Figura 27. Perfil de SDS-PAGE de los principales componentes y/o proteínas del veneno de *Metlapilcoatlus occiduus* juvenil. “A.” Esquema elaborado en *GelAnalyzer* de las bandas proteicas y sus pesos moleculares basados en el gel original. La escala y dimensionales para el peso molecular es logarítmica y kDa. “B.” Gel de SDS-PAGE original con bandas detectadas; promedio del peso molecular de todas las bandas formadas a partir de los valores d “A.”; “C”. Gel de SDS-PAGE original.....54

Figura 28. Proteínas y componentes identificadas en las bandas formadas en SDS-PAGE de veneno de juvenil. Se formó un total de 5 bandas, todas con pesos moleculares diferentes (kDa). Las proteínas fueron identificadas a partir de su peso molecular según lo reportado en literatura previa.....54

Figura 29. Espasmos y rigidez en los grillos inoculados con veneno de serpiente juvenil. “A.” Cuerpo recto y patas rígidas, parálisis casi completa. “B.” Posición “tipo estrella”: Cuerpo recto perpendicular a las patas; patas estiradas y rígidas, haciendo la forma de una “estrella”. Posición completamente inmóvil. “C.” Flechas que indican la dirección de las patas después de que el grillo fue inoculado con veneno. Rectas, tiesas e inmóviles. Lo presentado en la Figura 29., también se observó para el veneno de adultas.....57

Figura 30. Posición de parálisis completa en grillos inoculados con veneno de serpiente adulta. Las flechas rojas (→) indican las extremidades que sufrieron espasmos o calambres, quedando

totalmente rígidas. Las líneas azules (---) muestra la postura totalmente rígida y acalambrada del cuerpo de los grillos durante la parálisis completa. Lo presentado en la Figura 30., también fue observado para el veneno de serpientes juveniles.....	57
Figura 31. Comparación de la postura de un grillo sano y un grillo inoculado con veneno. “A.” Grillo sano en dos posiciones. Patas traseras dobladas, antenas paralelas entre sí, patas anteriores y medias relajadas, dobladas o acomodadas. “B.” Grillos inoculados con veneno de <i>M. occiduus</i> . Postura del cuerpo rígido, antenas dobladas en las puntas, extremidades tensas, patas traseras totalmente rectas y tiesas.....	58
Figura 32. Agitación de patas delanteras de un grillo inoculado con veneno de serpiente juvenil. Las patas anteriores las frotaba entre sí de manera acelerada, al mismo tiempo que se rozaba la mandíbula y los palpos. Movía la cabeza y las antenas de un lado a otro de manera rápida, denotando un posible efecto en su sistema nerviosos simple por parte del veneno. Este patrón etológico también se observó para el veneno de adulta. El comportamiento se observó inmediatamente después de la inyección.....	58
Figura 33. Mortalidad durante los periodos de post-inoculación de los individuos sometidos a experimentación con dos tipos de solventes: Agua ultrapura (“UP.”) y Buffer de fosfatos (“B.”).....	59
Figura 34. Mortalidad durante los periodos de post-inoculación de los individuos sometidos a experimentación con las dos muestras de veneno crudo: Muestra 1: Veneno de adulto (“A.”) y Muestra 2: Veneno de juvenil (“J”)......	60
Figura 35. DL ₅₀ para las muestras de veneno de serpiente. “A.” DL ₅₀ para veneno de <i>Metlapilcoatlus occiduus</i> adultas; “B.” DL ₅₀ para veneno de <i>Metlapilcoatlus occiduus</i> juvenil.....	62
Figura 36. Cantidad de grillos muertos según la cantidad de dosis inyectada de veneno de adulto.....	62
Figura 37. Cantidad de grillos muertos según la cantidad de dosis inyectada de veneno de juvenil.....	63
Figura 38. Posición de grillo inmediatamente después de la inoculación de diluciones 0.1 y 0.01 para ambos venenos. La posición del abdomen apunta hacia arriba, y la zona del tórax hacia abajo.....	64
Figura 39. Disección de grillos sanos. “A.” Disección de grillo sano inmediatamente después de ser ejecutado. “B.” Disección de grillo 24 horas después de ser ejecutado.....	65
Figura 40. Efectos sistémicos y en el tejido de los sujetos experimentales tras inocular 50 µL de veneno crudo (Ambas muestras por separado: Muestra 1: veneno de adulta; Muestra 2: veneno de	

juvenil. “A.” Periodo de 1 hora después post-inoculación. “B.” Periodo de 24 horas post-inoculación. “C.” Disección de grillo sano. Muerte inmediata.....	67
Figura 41. Señalización de los efectos sistémicos y en el tejido de los sujetos experimentales tras inocular 50 µL de veneno crudo. Cada color en las flechas la indica la presencia de algún efecto en particular. “A.” Periodo de 1 hora después post-inoculación. “B.” Periodo de 24 horas post-inoculación.....	67

ANEXOS

Figura 42. Código de registro para el comportamiento de los grillos post-inoculación de tratamientos: veneno crudo (Juvenil y Adulto) y prueba de solventes (Agua UP y buffer PBS). El código se utilizó para el etograma (15 y 16).....	109
Figura 43. Bioensayo de cuantificación de proteínas Bradford. “A.” Equipo y material para bioensayo. “B.” Preparación de solución madre a partir de BSA para soluciones estándar. “C.” Preparación de diluciones de veneno: 1:100 y 1:200. “D.” Mezcla de diluciones (60 µL) con reactivo de Bradford (940 µL) previo a lectura en espectrofotómetro.....	116
Figura 44. Metodología y trabajo de laboratorio para el bioensayo de SDS-PAGE. “A.” Preparación de Sample Buffer. “B.” Preparación de soluciones Tris-HCl pH 6.8 y 8.8. “C.” Manipulación de muestra de veneno de <i>M. occiduus</i> juvenil. “D.” y “E.” Preparación de diluciones de muestras de veneno. “F.” Ajuste de pH de las soluciones Tris-HCl. “G.” Material de trabajo para ejecución de bioensayo SDS-PAGE. “H.” Carga de muestras y de Running Buffer en la cámara de corrida. “I.” Muestras de veneno corriendo en la cámara de SDS-PAGE.....	117
Figura 45. Provisiones para los grillos durante la etapa experimental. “A.” Avena, manzana y naranja como parte del alimento de los grillos. “B.” Algodones mojados como recurso de agua. “C.” Grillo alimentándose de naranja. “D.” Limpieza y cambio de material del recinto de los grillos.....	117
Figura 46. Método de descarte para los materiales desechables con contacto al veneno o diluciones. “A.” Bolsa de Ecotermo® donde fueron descartados todos los materiales. “B.” Material contaminado tratado con etanol 90% y desechado en sus respectivos envases. Todo descarte estuvo rotulado con el tipo de contaminante, tipo de desecho, tratamiento y el contacto en caso de dudas del desecho (riv18403@uvg.edu.gt – Mariana Rivas Gálvez).....	118
Figura 47. Metodología para pesar a los grillos en el bioensayo de DL ₅₀ . Se colocó un recipiente plástico sobre la pesa para evitar que el insecto escapara. El peso de cada individuo fue registrado en gramos (g) en la plataforma virtual Microsoft Excel®. Se usó una pesa marca <i>Ohaus</i> ® modelo Scout-Pro de hasta 200 g.....	118

Figura 48. Grupo de grillos post-inoculación de tratamientos en cajas experimentales, rotuladas con el número de grillo y el tipo de tratamiento inyectado. Las cajas fueron colocadas en un lugar ventilado y fresco, de modo que quedaran descubiertas para la circulación del aire hacia dentro de las celdas por los hoyuelos de las tapaderas.....**119**

Figura 49. Visita al Zoológico la Aurora para la extracción de veneno de *M. occiduus*.....**119**

RESUMEN

La variación en la composición y características proteicas del veneno de las serpientes de manera intraespecífica es algo que ha sido bien reportado por diversos estudios, especialmente para la familia Viperidae. Estos cambios se dan en función de factores externos que ejercen una presión sobre la serpiente, influyendo sobre la producción de distintas familias proteicas en su veneno destinadas a cumplir algún efecto sobre el tejido de la presa. Algunos de estos factores pueden ser dimorfismo sexual y distribución geográfica, aunque los más comunes son variación en hábitos alimenticios y cambios ontológicos. *Metlapilcoatlus occiduus* es una serpiente de la familia Viperidae, perteneciente al grupo de víboras de foseta brincadoras. Se encuentran distribuidas desde el Sureste de Chiapas, México, la vertiente del Pacífico de Guatemala, hasta el oeste del Salvador.

A pesar de ser una especie relativamente común en Guatemala, la información sobre su biología es limitada, especialmente la toxínología de su veneno. Mucho se debe a los pocos esfuerzos de investigación para dicho reptil. Es posible que *M.occiduus* presente cambios ontológicos en sus etapas de juvenil y adulta, considerando que lo anterior ya se ha reportado para otras especies de víboras e incluso para el mismo género *Metlapilcoatlus*. La víbora es de importancia médica a nivel humano, pecuario y para animales domésticos, por lo que estudiar su veneno es de vital importancia, especialmente si los síntomas de una mordida pueden variar en función si el veneno inoculado fue de una juvenil o de una adulta.

El objetivo principal de este estudio fue comprobar si existe variación ontológica en el veneno de víboras juveniles y adultas de la especie *M. occiduus*. Esto se logró determinar por medio de los bioensayos de Bradford, electroforesis SDS-PAGE, bioensayos de LD₅₀ y de letalidad. Se esperaba que el veneno de juveniles fuese más tóxico que el de adultas para invertebrados, considerando que estos son uno de los alimentos principales durante su etapa juvenil. Contrario a la hipótesis propuesta, se determinó que el veneno de víboras adultas es más tóxico para invertebrados, aunque los efectos sistémicos y en el tejido de los grillos fueron muy similares para ambas muestras de veneno.

Esto podría estar asociado a que las serpientes juveniles de este estudio estaban más cercanas a su etapa de adulta que de neonato. Los resultados también podrían sugerir que las víboras *M.occiduus* siguen alimentándose de ortópteros durante su etapa adulta, junto con otra variedad de presas como mamíferos, aves y herpetofauna. Lo anterior explicaría la mayor variedad de proteínas en el veneno de adultos, junto con el nivel más alto de toxicidad en comparación a las juveniles. Es importante complementar este estudio con otros bioensayos de laboratorio como espectrofotometría de masas, Western Blot, secuenciación de ADN y transcriptómica, PCR-ADN y análisis de muestras de heces, con la finalidad de determinar con mayor precisión los tipos de familias específicas en el veneno de *M.occiduus*.

I. INTRODUCCIÓN

Metlapilcoatlus occiduus es una serpiente de a la familia Viperidae, perteneciente al grupo de las “víboras de foseta brincadoras”. Es una víbora mediana, de cuerpo y cabeza gruesa y coloraciones grises y cafés. Su distribución se extiende desde el sureste de Chiapas, México, hasta el oeste del Salvador. En Guatemala, se encuentra distribuida a una altitud de 1,000 a 1,6000 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m), por toda la vertiente del Pacífico, en el centro y sur del país incluyendo a San Marcos, Retalhuleu, Suchitepéquez, Escuintla, Jutiapa y Santa Rosa. Habita principalmente en bosques húmedos de coníferas. A pesar de que es un víbora relativamente común en la región, los esfuerzos de investigación para la especie son limitados o nulos, especialmente los relacionados con su venómica.

Se sabe que la dieta de *M.occiduus* en su etapa adulta se basa principalmente en mamíferos, y en su etapa juvenil en invertebrados o vertebrados pequeños. Sin embargo, esta información es antigua y poco precisa, debido a que las observaciones en campo de estos reptiles son limitadas y mucho se basa en la dieta de otras especies del mismo género y/o grupo. Al igual que otras víboras y elápidos, la dieta de *M.occiduus* en sus distintas etapas de desarrollo podría influir sobre las características y composición de su veneno. A lo anterior se le conoce como “cambio ontológico”, que hace referencia a la variación en la composición del veneno de una especie de serpiente basado en las distintas dietas que tienen durante sus etapas de vida. Las tres principales etapas de vida son neonato, juvenil y adulto.

Estudiar las características del veneno de las serpientes venenosas en sus distintas etapas de vida es de vital importancia, considerando que el cambio en la composición de su veneno influye sobre la sintomatología después de una mordida. Esto va a depender del tipo de familias proteicas en la secreción, junto con la selectividad de estas hacia los tejidos de la víctima. Además, esta información aporta de manera significativa al conocimiento de la biología de las especies, puesto que el veneno juega un papel importante sobre la evolución, adaptación, ecología, y desarrollo de estos reptiles.

Especies del género *Metlapilcoatlus* y *Atropoides* relacionadas con *M.occiduus* han reportado cambios ontológicos en su veneno por cambios de la dieta en sus etapas de crecimiento. Por lo anterior, es posible que *M.occiduus* presente similitudes en cuanto a los datos reportados para dichas especies. Esto es importante para la serpiente *M.occiduus*, considerando que la información de su biología y esfuerzos de investigación son limitados a pesar de ser una especie bien conocida en la región guatemalteca. Esta serpiente es de importancia médica humana, pecuaria y para animales domésticos. Además, incide cerca de áreas antropogénicas como hortalizas, fincas, fragmentos de bosque e incluso en jardines cercanos a bosques. Esto hace aún más relevante el hecho de conocer sobre su veneno y biología, a manera de evitar o manejar posibles accidentes ofídicos.

II. OBJETIVOS

A. OBJETIVOS GENERALES

1. Comprobar si existe variación ontológica en el veneno de víboras juveniles y adultas de la especie mano de piedra *Metlapilcoatlus occiduus* (Viperidae).
2. Contrastar y comparar los resultados del veneno de ejemplares adultos y juveniles de *M. occiduus*.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la concentración proteica del veneno de *M. occiduus* por medio del bioensayo colorimétrico de Bradford.
2. Determinar el grupo de proteínas presentes en el veneno de *M. occiduus* a partir de su separación en un ensayo de SDS-PAGE.
3. Determinar la DL₅₀ y el porcentaje de letalidad del veneno de *M. occiduus* en grillos comunes (*Acheta domesticus*).
4. Evaluar el efecto del veneno de *M. occiduus* en el tejido de grillos comunes (*Acheta domesticus*) tras su inoculación subcutánea.

III. HIPÓTESIS

1. Existe un cambio ontológico entre el veneno de juveniles y adultos de la especie *Metlapilcoatlus occiduus* determinado por la diferencia de dieta en las distintas etapas de crecimiento de la víbora.
2. La composición proteica y características entre el veneno de juveniles y adultos de la especie *M. occiduus* son distintas.
3. La letalidad del veneno de víboras juveniles de *M. occiduus* es mayor que el veneno de adulto para grillos comunes.
4. La DL₅₀ en grillos comunes es menor para el veneno de *M.occiduus* de juvenil que para el de adulto.
5. Habrá un mayor daño en el tejido de los grillos comunes con el veneno de juvenil *M. occiduus*.

IV. JUSTIFICACIÓN

Guatemala tiene alrededor de 270 especies de reptiles, de las cuales 128 son serpientes, y 22 son venenosas pertenecientes a la familia Viperidae y Elapidae (López, 2014). A pesar de la diversidad de este grupo, en la actualidad existen pocos estudios que aporten información para ciertas especies. Este es el caso de la serpiente *Metlapilcoatlus occiduus* de la familia Viperidae, o mejor conocida como “mano de piedra”. A pesar de ser una especie endémica de la Meseta Central, relativamente común en áreas antropogénicas y presentar importancia médica por su veneno (Dugas, *et al.*, 2009), existen pocos o ningún estudio que refleje la biología de este reptil, incluyendo la rama de venómica. De hecho, son pocas las investigaciones para el género *Metlapilcoatlus* que reporten información toxicológica del veneno de estas serpientes (Campbell, *et al.*, 2019; García, *et al.*, 2020).

Se ha reportado que el veneno de las víboras del género *Metlapilcoatlus* posee actividades hemorrágicas, formadoras de edema y necrotizantes (Angulo, *et al.*, 2014; García, *et al.*, 2020). Esto es de importancia médica, considerando que el veneno puede producir daños al tejido humano o cualquier otro mamífero doméstico en caso de un accidente ofídico. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que la sintomatología de una mordida por un individuo adulto puede variar con respecto a la de un juvenil dentro de la misma especie (García *et al.*, 2020). Esto se debe a que la composición del veneno de una serpiente puede verse afectada por diferentes factores como la edad del animal, hábitos de alimentación, dimorfismo sexual, cambios ontológicos y distribución geográfica (Guércio, *et al.*, 2006; Calvete, 2017; García, *et al.*, 2020).

Estudios anteriores, han reportado la presencia de cambios en la composición del veneno en miembros de la familia Viperidae, como en especies del género *Crotalus* (*C. simus*, *C. tzabcan* y *C. culminatus*), *Bothrops* (*B. atrox*) e incluso para *Metlapilcoatlus* (*Metlapilcoatlus numiffer*) (Gúerico, *et al.*, 2006; Durban, *et al.*, 2017; García, *et al.*, 2020). Asimismo, recientemente se han reportado datos similares para la cobra china (*Naja atra*) miembro de la familia Elapidae (Nie, *et al.*, 2022). Lo anterior se debe a los diferentes tipos

de alimentación que las serpientes llevan en sus distintas etapas de vida, en donde las adultas tienden a alimentarse de mamíferos y aves, mientras las juveniles de invertebrados o vertebrados pequeños como reptiles y anfibios e incluso peces (Mackessy, *et al.*, 2003; Nie, *et al.*, 2022). En este sentido, el veneno de cada etapa/edad tendrá una composición distinta, dependiendo del tipo de presa en la cual el veneno debería ejercer un efecto, ya sea para acelerar la parálisis o muerte de la presa. Tomando en cuenta que otras especies de la familia Viperidae, incluyendo el género *Metlapilcoatlus* ha mostrado la presencia de un cambio ontológico en la composición del veneno entre juveniles y adultas, es posible que la especie *Metlapilcoatlus occiduus* presente la misma variación, pues al igual que las demás víboras, esta especie posee dietas diferentes en sus etapas de juvenil y adulto. Los juveniles/ neonatos se alimentan de invertebrados y los adultos de mamíferos pequeños (Kohler, 2003). Hasta el momento, no se han realizado estudios con respecto al análisis toxinológico o reportes de cambios ontológicos en el veneno de la especie *Metlapilcoatlus occiduus*. Esto hace que el presente estudio contribuya con información nueva para la especie, lo cual será útil para conocer mejor la biología de la serpiente y la de su veneno.

Para evaluar estos objetivos en estudios anteriores, por lo general se usan modelos vivos de vertebrados como ratones (*Mus musculus*), ratas (*Rattus norvegicus domestica*) y/o pollos (*Gallus gallus*) (Zelanis, *et al.*, 2008). Esto, con la finalidad de determinar con precisión el nivel de letalidad y sintomatología de un organismo al estar expuesto al veneno de serpiente. Sin embargo, son muy pocos los estudios que reportan el uso de un modelo *in vivo* de invertebrado para poder evaluar el efecto del veneno de serpiente en su organismo. Este estudio, sería de los primeros en latino américa en utilizar un modelo *in vivo* de invertebrado (grillos comunes: *Acheta domesticus*) para evaluar el efecto del veneno de la serpiente *M.occiduus*. De esta manera, se estarán reportando metodologías para llevar a cabo inoculaciones de tratamientos en modelos *in vivo* de invertebrados.

V. MARCO TEÓRICO

A. Aspectos generales de la Biología de las víboras de fosa brincadoras (“*Jumping pitvipers*”)

Las víboras de fosa brincadoras (“*Jumping pitvipers*”) pertenecen al clado Squamata y familia Viperidae. Son endémicas de América Central, México y su distribución llega extenderse hasta Panamá. Sus hábitats suelen ser de elevaciones baja a media, con climas templados, tropicales o nubosos (Castoe, *et al.*, 2003; Campbell y Lamar, 2004; Jadin, *et al.*, 2010). Su dieta abarca pequeños vertebrados y mamíferos de talla pequeña a media (Guerra, *et al.*, 2012). En ocasiones se ha reportado que pueden incluso alimentarse de aves (Hoser, 2012). Por lo general, poseen un veneno de tipo hemotóxico y/o neurotóxico (Chang, 2016).

Las serpientes de este grupo se diferencian del resto de miembros de Crotalinae por sus particulares características morfológicas. Estas tienen cuerpos muy robustos y extremadamente gruesos, cabezas anchas cubiertas de escamas pequeñas y quilladas, junto con ojos pequeños y un hocico redondo y ancho. Poseen coloraciones café, grisáceo, amarillo, rojizo, verde, amarillo y/o negro con patrones a lo largo del cuerpo, superpuestos por rombos y manchas laterales y dorsales. Poseen una cola corta que no es totalmente prensil, la cual representa al menos el 15% del total de su cuerpo. Una de las características de mayor importancia en estas serpientes, es su particular habilidad de saltar y rebotar en respuesta a peligro o defensa. Esto lo logran enrollándose, contrayendo sus músculos y ejecutando el salto. Su forma robusta, gruesa y con escamas opacas, es la razón por la cual son conocidas como “mano de piedra”, “serpiente roca” o “serpiente sapo” (Castoe, *et al.*, 2005; Castoe y Parkinson, 2006; Hoser, 2012; Campbell, *et al.*, 2019).

Las víboras brincadoras del género *Metlapilcoatlus*, inicialmente eran parte del género *Atropoides*. Originalmente se incluían tres especies dentro del género: *A. nummifer*, *A. olmec* y *A. picadoi*, las cuales fueron trasladadas previamente del género *Porthidium*. Tiempo después, el género *Atropoides* incluyó tres especies más, formando un grupo de

seis especies para el género. Las especies incluidas fueron *A. mexicanus*, *A. occiduus* y *A. indomitus* (Campbell y Lamar, 2004; Smith y Ferrari, 2008; Tepos, *et al.*, 2021). Sin embargo, estudios recientes han reportado que *A. picadoi* es un grupo polifilético, y que dicha especie no forma un clado con el resto de las especies dentro de *Atropoides*, sino más bien muestra ser un linaje hermano del género *Porthidium* o *Cerrophidion*. En este sentido, *Atropoides picadoi* debía ser transferido a cualquiera de los dos géneros anteriores, o bien proponer al género *Atropoides* como “monotípico”. Lo anterior se determinó con diferencias y variaciones genotípicas principalmente. Lo reportado provocó que el resto de las especies (6) del género *Atropoides*, ya no pudieran ser agrupados en el mismo grupo (Castoe *et al.*, 2005; Alençar *et al.*, 2016; Campbell, *et al.*, 2019; Tepos, *et al.*, 2021). Por esto, Campbell, *et al.*, 2019 propuso un nuevo género llamado “*Metlapilcoatlus*”.

La etimología del nombre se deriva de “náhuatl metapil” que refiere a los morteros gruesos y robustos de piedra que se usan para moler el metate y otras comidas, y “coatl” que significa “serpiente” (Campbell, *et al.*, 2019). El resto de las especies del género *Atropoides* (*A. mexicanus*, *A. occiduus*, *A. nummifer*, *A. olmec* y *A. indomitus*) también fueron trasladadas a el género *Metlapilcoatlus*. Dicho género, difiere del resto de las víboras del Nuevo Mundo por sus características fisiológicas tan particulares (Alençar, *et al.*, 2016; Campbell, *et al.*, 2019).

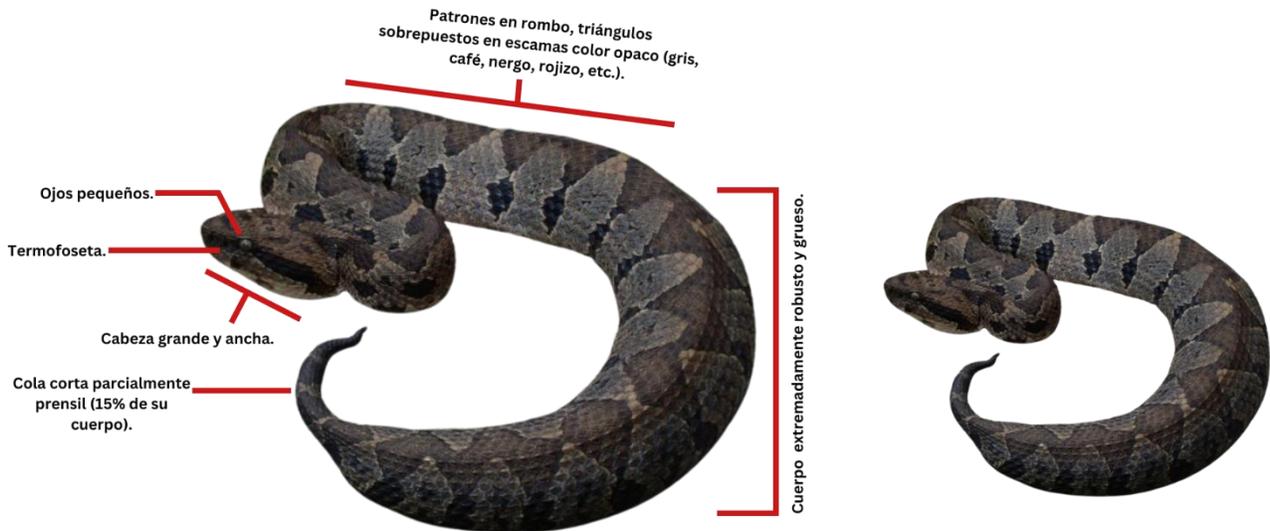


Figura 1. Características morfológicas principales de las víboras brincadoras (*Metlapilcoatlus olmec*)

(Fotografía: Padilla, 2008; modificada por elaboración propia).



Figura 2. Especies representativas de las víboras brincadoras (“Jumpig Pit Vipers”). **1.** *Metlapilcoatlus occiduus* (Fotografía: Zorilla, 2021; modificada por elaboración propia); **2.** *M. mexicanus* (Fotografía: Gazo, 2022; modificada por elaboración propia); **3.** *M. indomitus* (Fotografía: Xulhn, 2018; modificada

por elaboración propia); 4. *M. nummifer* (Fotografía: Simon, 2019; modificada por elaboración propia); 5. *M. olmec* (Fotografía: Padilla, 2008; modificada por elaboración propia); 6. *Atropoides picadoi* (Fotografía: Gjverspui, 2019; modificada por elaboración propia).

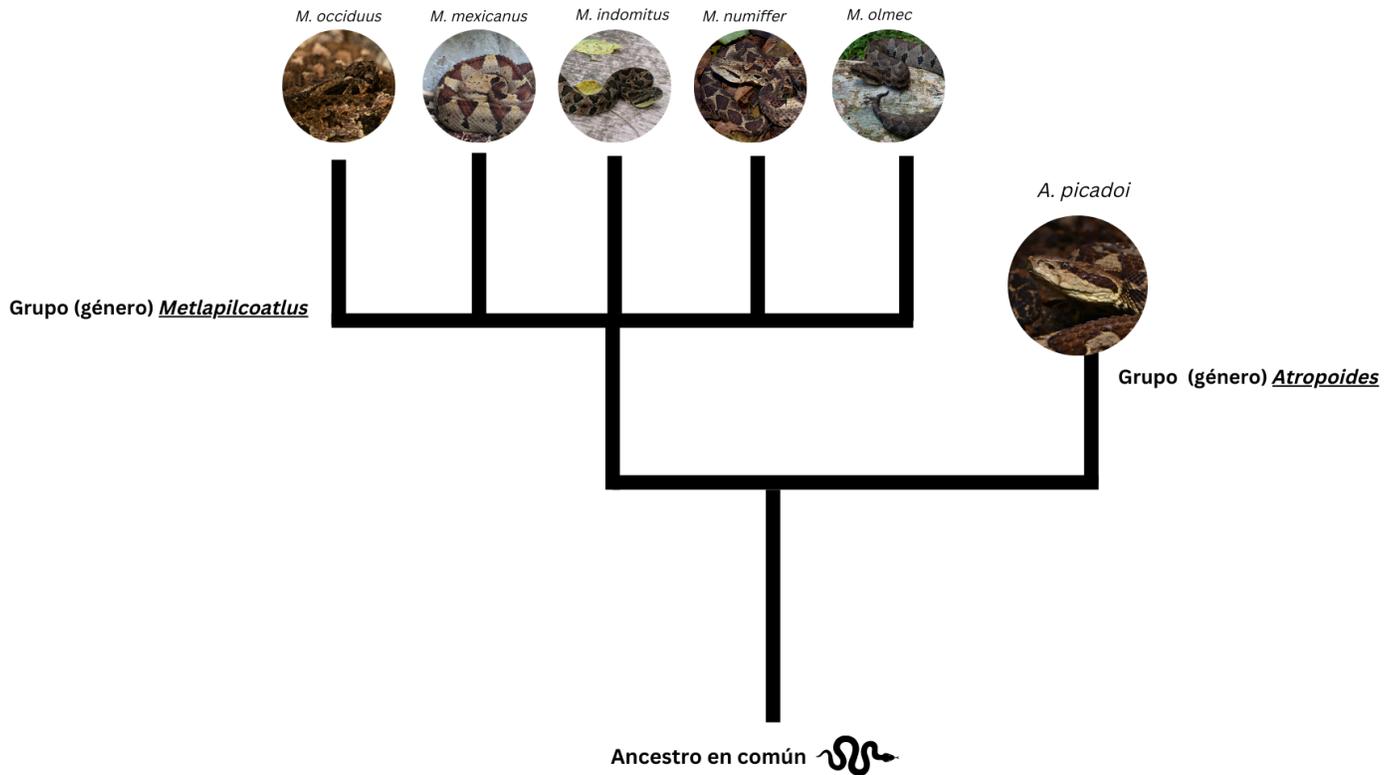


Figura 3. Árbol taxonómico de la agrupación de las víboras brincadoras según Campbell, *et al.*, 2019.

****Nota:** Este árbol taxonómico no está a escala evolutiva, este diagrama tiene fines ilustrativos y explicativos.

(Diagrama por elaboración propia).

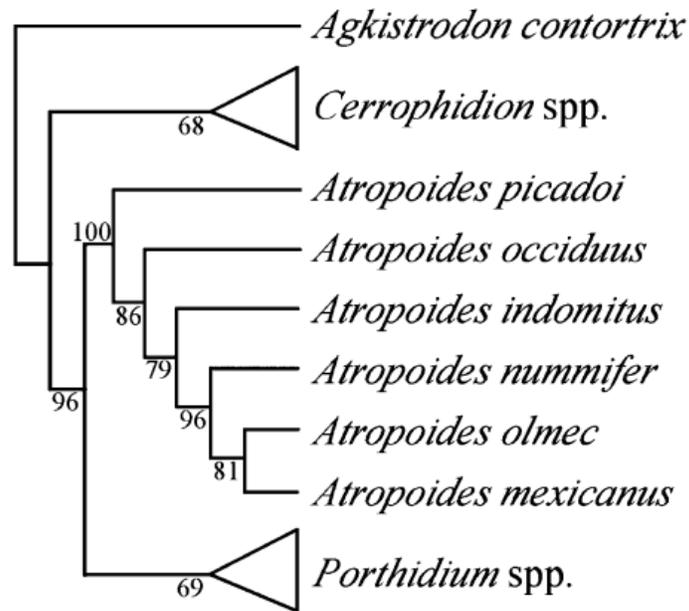


Figura 4. Relación filogenética entre género *Atropoides*, *Cerrophidion spp.*, *Agkistrodon contortrix*, *Porthidium spp.* según Jadin, *et al.*, 2010. También se muestra una división basal entre *A. picadoi* y el especies restantes de *Atropoides*. (“*Metlapilcoatlus*” según Campbell, *et al.*, 2019).

B. Aspectos de la Biología de *Metlapilcoatlus occiduus*

Metlapilcoatlus occiduus, o también conocida como “mano de piedra”, es una de las serpientes pertenecientes al grupo de las víboras de foseta brincadoras. Esta especie pertenece a la familia Viperidae y subfamilia Crotalinae (serpientes con termofoseta), que fue descrita por Hoge, 1966. Su distribución se extiende desde el Sureste de Chiapas, México, hasta el oeste del Salvador (Sosa y Ramos, 2015). En Guatemala, se encuentra distribuida a una altitud entre 1,000 a 1,6000 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m), por toda la vertiente del Pacífico, en el centro y sur del país incluyendo a San Marcos, Retalhuleu, Suchitepéquez, Escuintla, Jutiapa y Santa Rosa (Acevedo, 2006; OPS/OMS, 2009; Guerra, *et al.*, 2012).

Las serpientes *M. occiduus* se caracterizan por tener un cuerpo robusto y grueso que mide entre 35 a 60 cm de longitud total para los adultos, 25-40 cm para juveniles y 15 a 20 cm en neonatos. Presentan coloraciones café claro u oscuro, rosáceo, rojizo, café-púrpura, negro y/o crema. Tienen sobrepuesto a lo largo del cuerpo patrones triangulares o en rombos, los cuales por lo general son más oscuros que el resto de sus escamas. La cola es

de tamaño medio (5 a 10 cm en adultos), y presenta un color más oscuro que el resto del cuerpo (OPS/OMS, 2009). Poseen una cabeza ancha y triangular, junto con un par de ojos redondos y pequeños. La distribución de sus escamas consiste en la presencia de 7 a 12 escamas intersupraoculares, y las supraoculares nunca están fragmentadas. Tienen de 8 a 10 escamas supralabiales y de 9 a 12 infralabiales. Asimismo, poseen 21 a 27 hileras de escamas a la mitad de su cuerpo. En machos, se pueden encontrar de 125 a 135 escamas ventrales, mientras que en hembras el número de estas escamas difiere en 126 a 137. De igual manera, se observa diferencia en el número de escamas subcaudales enteras entre sexos, en donde los machos presentan de 26 a 36 escamas y las hembras 24 a 32. Todas las escamas a la mitad del dorso en estas serpientes son de tipo quilladas (Campbell y Lamar, 1989; OPS/OMS, 2009, Campbell y Lamar, 2004). La característica más destacada de *M. occiduus* es su prominente banda color café oscuro o negra que se extiende justo desde las escamas postoculares hasta unos centímetros después de las escamas últimas-infralabiales, junto con un grupo de escamas interoculabiales bajo el ojo, que forman una mancha redondeada de color café oscuro o negro.

El hábitat predominante de esta serpiente, son los bosques húmedos y/o nubosos subtropicales y bosques de pino encino. Es una serpiente de hábitos principalmente diurnos, aunque también se les puede ver activas al atardecer cuando se acerca la noche (Campbell y Lamar, 2004; Acevedo, 2006; Guerra, *et al.*, 2012). Lo anterior se debe a que, en su hábitat natural, la temperatura desciende considerablemente durante la noche, cuestión que afecta la velocidad de su metabolismo, haciendo que su actividad sea predominante durante el día (Jadin, *et al.*, 2019). Es una especie terrestre, y suele encontrarse bajo hojarasca, troncos, madrigueras pequeñas, a la orilla de caminos y/o bultos de ramas. De igual manera, se ha reportado la presencia de *M. occiduus* en sitios antropogénicos, principalmente en áreas de cultivos de hortalizas de café, maíz, flores, hortalizas y aguacate (Campbell, 1992; Campbell, 1998; Acevedo, 2006; OPS/OMS, 2009). Asimismo, es posible encontrarla en jardines, parques o áreas verdes cercanas a bosques donde habitan. Esta serpiente es considerada relativamente común, lo cual tiene sentido considerando que no es una serpiente de hábitos específicos o que dependan de sobremanera de algún recurso limitado en particular. Su presencia cerca de seres humanos

puede provocar accidentes ofídicos. De hecho, se hipotetiza que el 22.1% de accidentes ofídicos causados por serpientes no identificadas, incluye en gran parte a *M. occiduus* (OPS/OMS, 2009).

M. occiduus posee una dieta variada, la cual cambia a lo largo de su desarrollo al igual que otras especies de víboras crotalinas (Zelanis, *et al.*, 2008; García, *et al.*, 2020). Los adultos se alimentan principalmente de mamíferos, aunque también pueden comer pequeños vertebrados como lagartijas o anuros pequeños (Campbell y Lamar, 2004; Kohler, 2003; OPS/OMS, 2009; Guerra, *et al.*, 2012). En algunos casos se ha reportado que pueden incluso consumir aves pequeñas o medianas (OPS/OMS, 2009; Hoser, 2012). En su estado juvenil, su alimentación es principalmente de invertebrados y mamíferos pequeños o crías de estos. Por otro lado, al estar en la etapa de neonatos, se alimentan principalmente de invertebrados como Ortópteros, Blatoideos, Hemípteros y/o Arácnidos.

Para cazar sus presas, esperan en un sitio hasta que estas se aparezcan. Al fijar la mirada en la presa, lanzan una mordida con el peso de su cuerpo hacia adelante (OPS/OMS, 2009). Esto permite que puedan apuntar con precisión, de tal manera que se inocule su veneno por medio de la inserción de sus dos colmillos en el tejido de la presa. Su dentadura solegnoglifa caracterizada por tener los colmillos al frente de la mandíbula conectados a una glándula de veneno sobre el maxilar (Cassan, 2006), facilitan la captura de su alimento. Sus colmillos, dirigen el veneno hacia el interior de la presa, en donde se secreta por los orificios de salida en el centro de estos (Chang, 2016). En cautiverio se ha observado tanto para neonatos, juveniles y adultas que las serpientes *M. occiduus* lanzan una o dos mordidas a la presa. Al momento de atraparla, retienen al animal en su boca durante varios minutos. De esta manera, la presa muere en las fauces del reptil en consecuencia al efecto del veneno. Luego de unos 5 a 10 minutos de haberla atrapado, la serpiente comienza a engullir su alimento. Es probable que este comportamiento sea el mismo en vida silvestre, sin embargo, por el momento aún no existe un estudio que reporte dicha información.

Al igual que el resto de las víboras brincadoras, *M. occiduus* en estado de defensa, posee el comportamiento de enroscar todo su cuerpo, formando un “bulto”. Posteriormente,

contraen sus músculos y comienzan a dar saltos para ahuyentar a su depredador (Campbell, *et al.*, 2019). Si esto no es suficiente, proceden a lanzar mordidas al aire mostrando sus colmillos para advertir de su veneno. Si ninguna de las advertencias anteriores provoca que el depredador se vaya, lanzan una mordida de defensa hacia el animal que las invade. Por lo regular, estas mordidas van dirigidas a pies, tobillos o piernas debido a sus hábitos terrestres (OPS/OMS, 2009). Este comportamiento suele ahuyentar a sus depredadores en la mayoría de los casos, especialmente cuando no existe ningún tipo de resistencia hacia su veneno. Sin embargo, para depredadores que no presentan síntomas por el veneno de *M. occiduus*, la estrategia de defensa de esta serpiente no evitará que sea el alimento de otro animal. Este es el caso del colúbrido, *Drymarchon melanurus* especie que se alimenta de otras serpientes, incluyendo víboras como *M. occiduus*. Lo anterior es debido a que *D. melanurus* es resistente al veneno de *M. occiduus* (Sosa y Ramos, 2015; Hernandez *et al.*, 2021).

Actualmente la información de la biología, taxonomía y toxicología de *Metlapilcoatlus occiduus* es limitada, debido a que no se han realizado variedad de estudios sobre la especie a pesar de ser relativamente común. Considerando que es una especie endémica del sur de México, la vertiente del Pacífico de Guatemala y el sureste de El Salvador, es vital poder conocer mejor de sobre su biología, especialmente por ser un reptil de importancia médica que puede encontrarse cercano a áreas antropogénicas.



Figura 5. Mapa de distribución de *Metlapilcoatlus occiduus*. Se extiende desde el sur de Chiapas, por toda la vertiente del Pacífico de Guatemala hasta ciertas zonas del sureste de El Salvador. (López y Canseco, 2022; IUCN Red List, 2022).

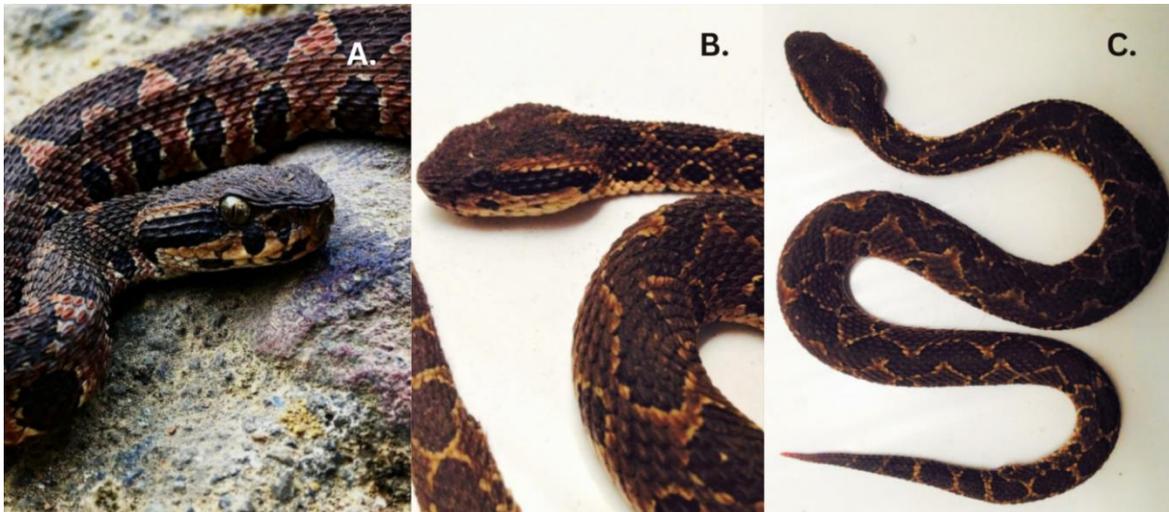


Figura 6. Ejemplar *Metlapilcoatlus occiduus* adulto. Tamaño mediano. **A.** Coloración oscura de *M. occiduus* con patrones de rombos sobrepuestos (Fotografía: Maquin, 2021; modificada por elaboración propia). **B.** Cabeza ancha, gruesa, triangular con ojo pequeño. Hocico corto y plano. Banda de escamas formada desde la punta del ojo hasta la zona inferior de la mandíbula, de tonalidad más oscura que el resto del cuerpo, escamas agrupadas formando una mancha bajo el ojo (Fotografía: Herrera, 2015; modificada

por elaboración propia). C. Morfología del cuerpo de *M. occiduus*: cuerpo grueso y ancho. Cola corta parcialmente prensil y más oscura que el resto del cuerpo. Cabeza triangular y ancha (Fotografía: Herrera, 2015; modificada por elaboración propia).

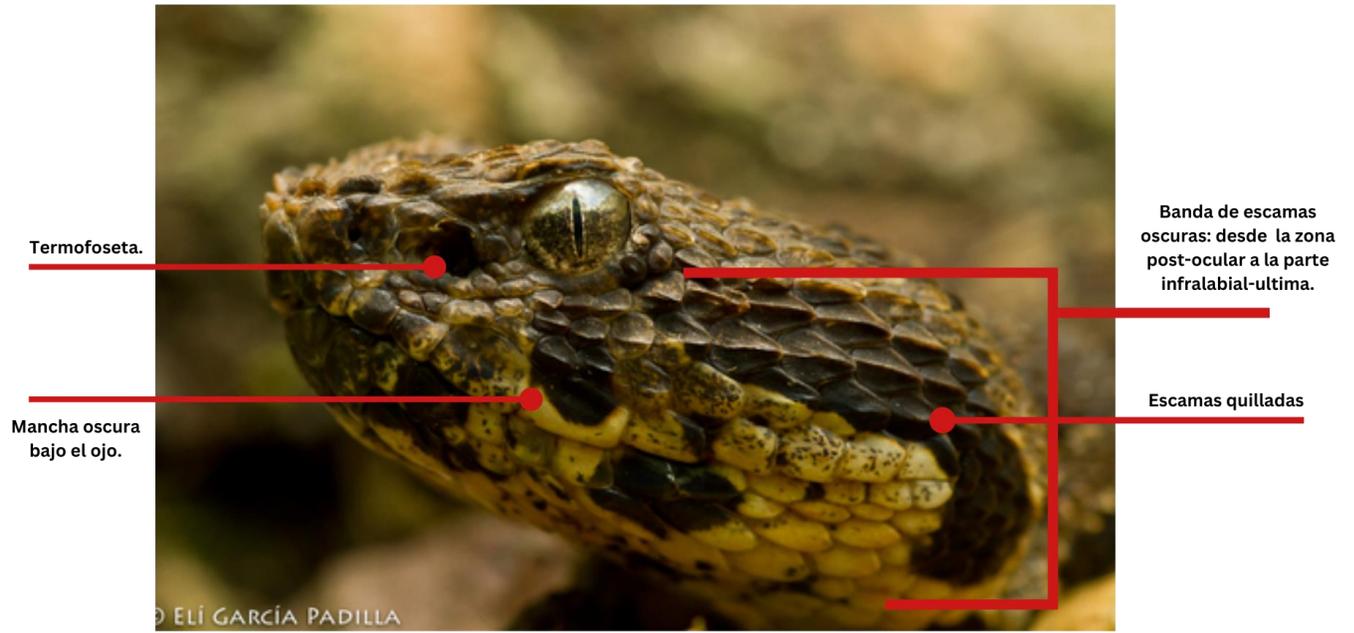


Figura 7. Características principales de *M. occiduus* que la diferencian del resto de víboras brincadoras (*Jumping Pit Vipers*) Se observa la termofoseta que caracteriza a Viperinae, grupo al cual pertenece *M.occiduus*. Se observa la prominente banda de color café oscuro o negra que se extiende desde las escamas post-oculares hasta unos centímetros después de las escamas ultimas-infralabiales. Es evidente el grupo de escamas oscuras interoculabiales bajo el ojo que forman la mancha café-negra que caracteriza a la especie.

(Fotografía: Padilla, 2011; modificada por elaboración propia).

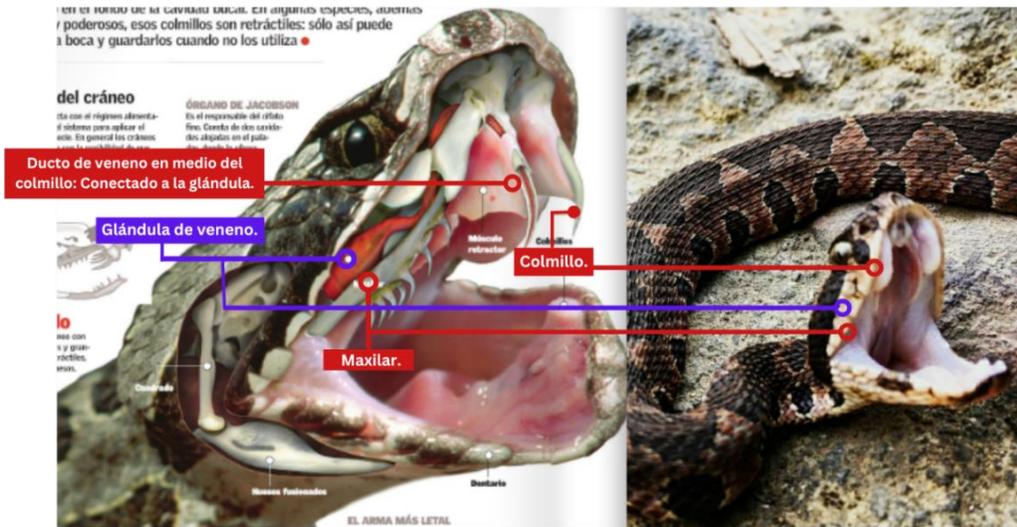


Figura 8. Tipo de dentadura en *M. occiduus*: Solenoglifa. Dos colmillos en la zona frontal del maxilar. Ambos con ductos de veneno en el centro que conectan con la glándula venenosa ubicada en la zona superior cefálica. El veneno pasa por el ducto y es inoculado en la presa por los orificios de salida de la dentadura.

(Cassan, 2006; Zorrilla, 2021).



Figura 9. Serpientes *M. occiduus* juveniles alimentándose en cautiverio. Muerden a la presa y la retienen en sus fauces de 5 a 10 minutos. El animal muere por los efectos del veneno. Luego engullen el alimento. Esto se observó tanto en juveniles como en adultas.

C. Características del veneno de *Metlapilcoatlus occiduus*

El veneno de las serpientes (Elapidae y Viperidae), es una mezcla compleja de componentes biológicos activos, que forman cocteles enzimáticos, proteicos y/u orgánicos. Entre estos se incluyen enzimas, proteínas/péptidos no enzimáticos y pequeñas cantidades de moléculas orgánicas e inorgánicas (Bieber, 1979; Aird, 2005; Mackesy, 2010). El

veneno de las serpientes no tiene una finalidad adaptativa de autodefensa, sino más bien está dirigido a la inmovilización de presas y promover una digestión más eficiente (Urdaneta, *et al.*, 2004; Pawlak, *et al.*, 2006). Sin embargo, las serpientes pueden usar su veneno contra depredadores o amenazas si lo amerita, y de igual manera causar daños significativos en el organismo de la víctima. En ambos casos, el veneno induce efectos sistemáticos y locales, interfiriendo con varias funciones fisiológicas (Aird, 2002; Fry, 2005; Mackessy, 2010). Entre los efectos más comunes reportados se encuentra la neurotoxicidad, (post/ presináptica), cardiotoxicidad, pro y anticoagulantes y miotoxicidad. Dependiendo de la familia, género o especie de la serpiente, el veneno puede provocar algunos o todos los efectos mencionados anteriormente.

Para la familia Viperidae, la composición y las características proteicas de su veneno es similar entre especies. Por lo general, el veneno de estos reptiles está compuesto por fosfodiesterasas, nucleotidasas, metaloproteinasas, miotoxinas, arginina esterasas, lectinas de tipo C, neurotoxinas, L-amino oxidasas, hialuronidasa, ADP-asas, fosfolipasas y otros componentes. Todas las formas proteicas del veneno presentan diferentes masas moleculares según la complejidad de la forma y estructura de la proteína (Mackessy, 2010). La presencia, proporción y cantidad de proteínas en los venenos de las diferentes especies de víboras, varía entre especie e incluso la etapa del desarrollo del reptil (Zelanis, *et al.* 2008).

Actualmente, no existe un informe que haya determinado en su totalidad el tipo de proteínas presentes en el veneno de *Metlapilcoatlus occiduus*. Sin embargo, existen otros estudios que ya han reportado la caracterización de las secreciones de *M. numiffer* (García, *et al.*, 2020). Para *M. numiffer* se reportó que las proteínas predominantes en el veneno fueron metaloproteasas, serina proteasas, fosfolipasas (A₂). La proporción de estas proteínas en las secreciones, varía en las diferentes etapas de crecimiento de la serpiente (neonato-juvenil-adulto) (Rojas, 2001; García, *et al.*, 2020). Lo anterior coincide con lo reportado por Mackessy, 2010, quien menciona que el género *Metlapilcoatlus* y *Atropoides*, poseen un veneno con predominancia de fosfolipasas A₂ y metaloproteinasas dependientes del Zinc (Zn) (SVMPs).

1. Acción y características de las proteínas y enzimas en el veneno de *Metlapilcoatlus* y *Atropoides*

a. Metaloproteasas dependientes del Zinc.

El veneno de varios miembros de Viperidae posee concentraciones altas de metaloproteinasas dependientes del Zinc. En inglés, estas se conocen como “SVMPs” (“Snake venom metakkiproteinasas”). Este tipo de proteínas, pertenecen a la familia M12 de las metaloproteinasas, en conjunto con las ADMs (“A disintegrin and metalloproteinase”). Ambas, forman la familia de las proteínas “reprolisinas” (Fox y Serrano, 2005; Gutiérrez, *et al.*, 2016). Sus masas moleculares difieren entre sí, dependiendo del tipo de metaloproteasas. Por lo regular, van desde **22 kDa** hasta más de **70- 100 kDa**. Estas presentan en su proteína madura, un dominio de “metaloproteinasas”, en donde se encuentra la secuencia de unión a zinc y el bucle donde está la metionina (Fox y Serrano, 2005; Gutiérrez, *et al.*, 2016).

Este grupo de proteínas forman parte importante de la función del veneno por su acción biológica dentro del organismo inoculado. Principalmente, este grupo de proteínas se encarga de la inmovilización de las presas, inducir la muerte y pre digerirlas (Gutiérrez, *et al.*, 2010). Entre los efectos de las metaloproteasas, se encuentra la actividad hemorrágica, procoagulante, inhibición de agregación plaquetaria, degradación de matriz extracelular, inflamación y la iniciación y proceso de necrosis en consecuencia de la isquemia (Gutierrez, *et al.*, 2010; Fry 2015; Gutierrez, *et al.*, 2016).

La actividad toxica de las SVMPs, pueden ser a nivel local o sistemático, llevando a patologías y sindonología variadas y complejas. Lo anterior provoca la presencia de secuelas permanentes del daño provocado por las proteínas. Esto incluso puede llegar a generar alteraciones hemodinámicas severas, que terminan en choques cardiovasculares, daños microvasculares e incluso muerte (Gutierrez, *et al.*, 2005). Las metaloproteasas también actúan directamente sobre el factor X de la cascada complemento. Dichas moléculas activan el factor X y la protrombina, llevando a la formación de microtrombos

y coágulos. Estos coágulos pueden causar infartos, problemas cardiovasculares e incluso fallo renal. Al mismo tiempo, aparece una desfibrinogénación y alteración de las pruebas de coagulación. También se inhibe la agregación plaquetaria inducida por el colágeno (Kamiguti, 2005; Teixeira, *et al.*, 2005; Gutierrez, *et al.*, 2016).

b. Serina proteasas.

Otra de las proteínas en el veneno de algunas víboras, es la serina proteasa, o también conocida como SVSPs (“Snake venom serine proteinases”). Su principal característica es que afectan el sistema hemostático por acción proteolítica (Serrano y Moreno, 2005; Madrigal, 2006; Fry, 2015). Estas proteínas pertenecen a la familia de las tripsinas S1 del clan SA, formando parte del grupo de las peptidasas (Madrigal, 2006). Las serinas proteasas tienen una actividad semejante a la trombina cuestión que produce alteraciones en la coagulación y de las L-aminoácido oxidasas (Nina, *et al.*, 2020). En la mayoría de este tipo de proteínas, se ha visto que se encuentran glicosiladas, pero con un número variable de sitios de glicosilación N- u O-. Lo anterior es lo que diferenciará a una serina de otra. De igual manera, se ha reportado que dentro de su estructura hay 12 residuos de cisteína, de los cuales 10 forman 5 puentes de disulfuro. El resto, da paso a la formación de un único puente conservado entre las SVSPs (Madrigal, 2006). El peso molecular de estas enzimas es de entre **30 a 35 kDa** (Nina, *et al.*, 2020). Otros autores mencionan que el peso puede ir de **26 a 67 kDa**. Su peso dependerá de la proporción de N- u O- en la molécula (Latinovic, *et al.*, 2020).

Similar a las SVMPs, las SVSPs afectan a las vías de la cascada de coagulación y la hemostasis, así como en los sistemas fibrinolíticos y de calicreína-cinina (Menaldo, *et al.*, 2013). Las serinas proteasas, degradan los coágulos de fibrina, afectan la agregación de plaquetas e influyen sobre la degradación proteolítica (Guerrero y López, 2005; Serrano y Maroun, 2005). Aunado a lo anterior, una de las características más importantes de las serinas proteasas es que algunos de sus tipos imitan a la trombina. Esto ha hecho que también se les conozca como “enzimas análogas a la trombina”. De esta forma, se comienza a dar un proceso de “incoagulabilidad” en la sangre, debido a que todo el

fibrinógeno ha sido consumido por las enzimas análogas a la trombina (Ghorbanput, *et al.*, 2009; Zaqueo, *et al.*, 2016).

Sin embargo, las SVMPs son conocidas por tener funciones múltiples. A pesar de que se ha reportado que influye sobre la inhibición de formación de coágulos, al mismo tiempo puede dar paso a la aparición de trombos. Esto se debe a su efecto sobre la fibrinolisis, lo que provoca que los coágulos no dejen de crecer y producirse en exceso, ya que las fibras y agregados de fibrina no se descomponen en consecuencia de la alteración de las enzimas que regulan la conversión de plasminógeno en plasmina, ya que la plasmina es la molécula encargada de evitar la formación de trombos al inducir a la lisis de fibrina (Espinosa y Reverter, 2001; Serrano y Maroun, 2005; Madrigal, 2006). De igual manera, puede haber efectos sobre la kalikereína y la bradiquinina, cuestión que influye sobre la salida de fluidos y hemorragias por la vasodilatación, dolor e inflamación (Kuoppala, *et al.* 2000; Espinosa y Reverter, 2001; Madrigal, 2006).

c. Fosfolipasas A₂.

Las fosfolipasas A₂ o también conocidas como PLA₂, son un grupo de enzimas que conforman la superfamilia de proteínas con capacidad de hidrolizar fosfolípidos (enzimas hidrolasas lipasas), específicamente en las posiciones sn-2 de los enlaces éster (García y García, 2009; Quintana, *et al.*, 2017). Su principal función es actuar sobre la membrana fosfo-lipídica de las células en el tejido, alterando su integridad causando daños irreversibles en las mismas (Hiu y Khai, 2020). Esto lleva a la producción de diversas sustancias bioactivas como ácidos grasos libres, lisofosfo-lípidos y mediadores lípidos de la inflamación (Valdés, *et al.*, 2002). Las fosfolipasas representan un 40% a 90% en proporción en el veneno de las serpientes. Esto varía entre grupos, familias y/o especies (Inga, 2010; Cedro, *et al.*, 2018; Hiu y Khai, 2020).

Las fosfolipasas se dividen en dos grupos principales: PLA₂ secretorias y PLA_{2c} citosólicas. Las PLA₂ secretorias presentan una masa molecular pequeña de **13 a 18 kDa**, mientras que las PLA_{2c} poseen una masa molecular más elevada de **40 a 85 kDa** (Valdés, *et al.*, 2002; Harris y Scott, 2013; Cedro, *et al.*, 2018). Estas pueden ser dependientes o

independientes al calcio (García y García, 2009). Las fosfolipasas que se encuentran de manera más abundante en veneno y secreciones de serpientes son las “PLA₂ de secreción de tipo I y II”. Para Elapidae e Hydrophiidae, la PLA₂ más abundante es la tipo I, mientras que para Viperidae y Crotalidae es la de tipo II (Valdés, *et al.*, 2002; Harris y Scott, 2013; Cedro, *et al.*, 2018). De manera general, las PLA₂ son selectivas a la posición del enlace éster acilo de los fosfolípidos, aunque también pueden variar en selectividad teniendo cierta “preferencia” por los fosfolípidos que contienen ácido araquidónico (AA) esterificado en la posición sn-2 del glicerol, por ejemplo (Valdés, *et al.*, 2002; Harris y Scott, 2013).

Las fosfolipasas A₂ en venenos ofídicos, son responsables de una variedad de actividades fisiológicas en el organismo de la víctima que recibió la mordida. Entre estas, se encuentran la miotoxicidad, citotoxicidad, degradación de tejido, la neurotoxicidad, la anticoagulación, formación de edema, cardiotoxicidad, y también influyen sobre el dolor y la inflamación (Quintana, *et al.*, 2017; Cedro, *et al.*, 2018; Hiu y Khai, 2020). Asimismo, presentan otras actividades fisiológicas que afectan la hemostasis. Esto se debe a que provoca efectos anticoagulantes, pro agregante plaquetario y/o inhibidor de la agregación plaquetaria y actividad hemolítica y/o hemorragias (García, *et al.*, 2012; Harris y Scott, 2013). Algunos tipos de PLA₂ están involucradas en la predigestión y/o digestión de las presas capturadas por las serpientes (Harris y Scott, 2013; Cedro, *et al.*, 2018). A pesar de que son de las enzimas más estudiadas en los venenos de serpiente por su potencial uso en tratamientos de cáncer, tumores y antibióticos, el mecanismo de acción de muchas es aún desconocido (Cedro, *et al.*, 2018).



Figura 10. Efectos físicos del coctel proteico de SVPs, SVMPs y PLA₂ en extremidades humanas. “A.” Incisiones aplicadas en la mano y pierna de dos pacientes mordidos por una serpiente venenosa desconocida en Chittagong, Bangladesh. Los cortes en la piel son necesarios por la inflamación severa del tejido causado por las enzimas (Harris y Scott, 2013). “B.” Formación de hematomas, ampollas e iniciación de proceso de necrosis por mordida de *Bothrops asper* (Harris y Scott, 2013). “C.” Edema local marcado, con presencia de equimosis, linfangitis, adenopatías regionales y dolor intenso. Se evidencia la acción hemorrágica y formación de trombos y coágulos en el cuerpo a causa del coctel proteico del veneno (serpiente desconocida) (Zuñiga y Carrasco, 2013). “D.” Edema sobrepasa la extremidad, coagulación intravascular diseminada, hemolisis, necrosis, dolor intenso, muerte de las capas de la piel (serpiente desconocida) (Zuñiga y Carrasco, 2013).

D. Variación y composición en los venenos de serpientes modernas (Viperidae).

1. Particularidades de la biología y composición del veneno en serpientes modernas.

Los sistemas de producción de veneno son una importante adaptación que evolucionado de manera independiente en distintos linajes en los animales (Casswell, *et al.*, 2013; Casswell, *et al.*, 2014). De todos los tipos de veneno en el reino animal, el de las serpientes ha sido de los que mayor interés científico posee, debido a la complejidad en su composición y la variedad de moléculas proteicas contenidas en la secreción. El coctel proteico producido por las serpientes ha sido utilizado para aislar moléculas de importancia medica que pueden ser aplicadas en tratamientos para la salud o biotecnología en general. Asimismo, algunos venenos pueden representar un peligro para los humanos y animales

domésticos al momento de experimentar una mordida. Por lo anterior, se han estudiado a profundidad muchos de los venenos de diferentes especies de serpientes para poder generar un tratamiento efectivo que contrarresten su acción biológica (Caswell, *et al.*, 2014; Fry, 2015).

El veneno de las serpientes está diseñado principalmente para depredación. El veneno facilita la captura y muerte de las presas a las serpientes que carecen de extremidades para cazar o perseguir su alimento (Fry, 2015). Su composición se basa en toxinas, proteínas o péptidos que poseen diversas acciones fisiológicas sobre un organismo objetivo. Estas pueden ser patologías neurotóxicas, hemotóxicas, citotóxicas y/o neurotóxica según el tipo de veneno y la familia o especie de la serpiente (Casswell, *et al.*, 2014). En este sentido, la finalidad principal del veneno es paralizar a la presa y en menores escalas digerirla. Sin embargo, el veneno tiene la función secundaria de actuar como “herramienta” defensiva en casos donde la serpiente perciba peligro o se sienta vulnerable por depredadores u otras amenazas (Fry, 2015). La complejidad y las características encontradas en los cocteles proteicos de los venenos en serpientes, ha sido un factor de gran influencia sobre la diversificación de especies de este tipo a lo largo del mundo. El veneno fue una adaptación ventajosa que favoreció el fitness de las serpientes, permitiéndoles asegurar alimento sin necesidad de la caza activa (Fry, *et al.*, 2008; Fry, 2015).

Las glándulas productoras de veneno en las serpientes evolucionaron una sola vez durante la “radiación de colúbridos” hace 60 a 80 millones de años. Tanto las glándulas como el veneno fueron cambiando y evolucionando en respuesta a las diferentes presiones adaptativas del contexto de la época (Fry y Wüster 2004; Fry 2005). Algunos autores proponen que una gran variedad de las toxinas presentes en el veneno de las serpientes, evolucionaron de un único ancestro de ribonucleasa (Fry, 2005).

La diversidad y complejidad del veneno de las serpientes modernas, se debe a tres diferentes factores. El primero, es debido a la producción de diferentes isoformas de las toxinas por parte de “geners multilocus” (pertenecientes a 5 o 10 familias). Cada familia es capaz de producir diferentes isoformas de las toxinas, generadas por eventos de

duplicación genética durante los tiempos evolutivos de las especies (Fry, *et al.*, 2008; Vonk, *et al.*, 2013; Caswell, *et al.*, 2014). La segunda, es la hipótesis que los genes del veneno en serpientes modernas son de tipo parálogos. Esto indica que hubo procesos de duplicación que pudieron influir en el tipo de proteínas en el veneno en los diferentes grupos de serpientes modernas. Esto influyó sobre la selectividad del veneno hacia la presa por los procesos de evolución y adaptación, dando como resultado un conjunto complejo de toxinas que actúan sinérgicamente para causar una muerte rápida al alimento objetivo (Fry, 2005; Caswell, *et al.*, 2014; Fry, *et al.*, 2015). Esto lleva a la tercera, en donde se plantea que la variación en la composición del veneno es un resultado de las adaptaciones en respuesta a las presiones selectivas y selección natural sobre las serpientes venenosas. Ente estas, se encuentran, los hábitos de la especie, distribución geográfica, dimorfismo sexual, cambios ontológicos y el principal, selección y tipo de dieta (Fry, *et al.*, 2008; Caswell, *et al.*, 2014; García, *et al.*, 2020)

2. Cambios ontológicos en el veneno de serpientes.

El cambio intraespecífico en la composición del veneno de los diferentes grupos de serpientes ha ganado mucho interés científico, pues las diferencias suelen indicar patrones evolutivos, de adaptación, etológicos e incluso variación en la sintomatología post-mordedura (García, *et al.* 2020). Esto se debe a que las características del veneno en una especie de serpiente pueden cambiar según factores como distribución geográfica, dimorfismo sexual, hábitos, entre otros (Zelanis, *et al.*, 2008; Bolívar, *et al.*, 2020; García, *et al.*, 2020). Entre las características que influyen sobre la variación en la composición de secreciones, se encuentra el “**cambio ontológico**”, es decir, una variación en la composición del veneno de una especie basado en las distintas etapas de crecimiento del ejemplar. Estas se dividen en tres principales: neonato, juvenil y adulto (Brown, *et al.*, 2013; Guérico, *et al.*, 2006). Las variación ontológica, se ha reportado principalmente para miembros de la familia Viperidae y/o la sub-familia Crotalinae. Sin embargo, recientemente se ha reportado esta variación en miembros de la familia Elapidae (Nie, *et al.*, 2022).

La principal característica que influye sobre el cambio ontológico en algunas serpientes es el tipo de dieta que llevan en sus diferentes etapas de vida (neonato, juvenil y adulto). Para las víboras del género *Bohtrops* sp., *Metlapilcoatlus* sp., y *Crotalus* sp., se ha observado variación ontológica, en donde en las distintas etapas de vida del animal muestran una composición y proporción proteica distinta en su veneno. En algunas especies, las PLA₂ son más abundantes en la etapa adulta, mientras que las proporciones de SVSP y SVMP son mayores en estadios de neonatos o juveniles. De igual manera, puede encontrarse la proporción inversa en otras especies (Brown, *et al.*, 2013; García, *et al.*, 2020). Lo anterior, está directamente relacionado con la dieta de los individuos en sus etapas de vida. Por lo general, los neonatos y juveniles suelen alimentarse de invertebrados y/o vertebrados pequeños (crías de roedores, peces, ranas y lagartijas pequeñas). Por otro lado, en la etapa adulta (según la especie), las serpientes comienzan a alimentarse de mamíferos y/o aves. En ambos casos lo que influye es la selectividad del veneno a la presa, de modo que las proteínas en la secreción sean las más “efectivas” para generar efectos fisiológicos específicos que causen muerte o parálisis (Brown, *et al.*, 2013; Zelanis, *et al.*, 2008; Borja, *et al.*, 2018). Es por ello que en venenos de neonatos y juveniles, se encontraran mayores proporciones de enzimas y proteínas que estén dirigidas a ejercer efectos sobre el tejido de invertebrados o vertebrados pequeños, al igual que en mamíferos y aves en serpientes adultas.

A pesar de que la mayoría de los reportes han sido para la familia Viperidae, se publicó un estudio reciente (2022) en donde mostraron cambios ontológicos para la familia Elapidae, en cobras chinas (*Naja atra*) de cautiverio. En el estudio, se mostró una proporción mayor de proteínas SVMP y CRISP (proteínas de secreción ricas en cisteína) en neonatos, mientras que en adultos reportaron contenidos mayores de toxinas 3-FTX, CVF y PLA₂. Al igual que en casos anteriores, determinaron que las diferencias estaban ligadas a la dieta, pues las proteínas reportadas en los venenos son selectivas para presas ectotérmicas o endotérmicas. Las proteínas SVMP y CRISP tienen un efecto mayor en animales ectotérmicos, por lo que es lógico encontrarlas en el veneno de neonatos de *N. atra*. Su dieta en vida silvestre se basa en pequeños peces, anfibios y a veces lagartijas. Por otro lado, las toxinas 3-FTX, CVF y PLA₂, pueden presentar mayor especificidad en el

organismo de animales endotérmicos. Siguiendo la lógica de la dieta, era esperado encontrar este tipo de enzimas en adultos, puesto que comen roedores (ratones y/o ratas) y aves (Nie, *et al.*, 2022). A pesar de los pocos estudios relacionados con la variación ontológica en la familia Elapidae, es posible que estos resultados sean similares para otras especies del grupo.



Figura 11. Diferencias en las dietas de serpientes adultas y juveniles/neonatos. Los ejemplares juveniles se alimentan de presas de tamaño pequeño mayormente ectotérmicas, así como también de crías de roedores. Los ejemplares adultos se alimentan de presas de tamaño grande mayormente endotérmicas, pero también pueden alimentarse de reptiles como otras serpientes o lagartijas (Guérico, *et al.*, 2006; Borja, *et al.*, 2018; García, *et al.*, 2020; Nie, *et al.*, 2022). Para fines de ilustrativos se colocaron fotografías de *N. atara* y *B. atrox* por los informes reportando variación ontológica en ambas especies (Guérico, *et al.*, 2006; Nie, *et al.*, 2022).

3. Cambio ontológico en el veneno de otras especies de víboras.

El veneno de las serpientes (Familia: Viperidae y Elapidae), juega un papel sumamente importante en la vida del animal (Wray, *et al.*, 2015). Esto se debe a que el veneno cumple funciones que benefician al desarrollo y crecimiento de dichos reptiles. Algunas de estas son, alimentarse, digerir comida, defensa y el sometimiento de las presas (Zelanis, *et al.*, 2008). La importancia del veneno en las serpientes es tal, que dicha secreción puede cambiar sus características a lo largo del periodo de crecimiento de algunas serpientes. Esta variación puede darse por ontogenia, distribución geográfica, sexo y variaciones inter e intraespecíficas (Daltry *et al.*, 1996; Zelanis, *et al.*, 2008).

Sin embargo, uno de los factores principales por el cual se ha reportado variación en las características del veneno en serpientes de la misma especie, es el cambio en la dieta a lo largo de su crecimiento. El veneno se “adapta” al tipo de presa que la serpiente consume, de tal manera que contribuya a digerir y someter a la misma por la acción biológica específica en su organismo. El caso más frecuente, resulta ser la variación del veneno entre serpientes juveniles y adultas. Lo anterior se debe a que las juveniles tienden a alimentarse de presas ectotérmicas, mientras que las adultas comen presas endotérmicas (Valdujo, *et al.*, 2002; Mackensy, *et al.*, 2003).

La variación ontológica del veneno en las serpientes suele expresarse respecto a la presencia de ciertas proteínas y/o enzimas y la proporción de estas en su secreción. En este sentido, es posible encontrar proporciones y distintos tipos de proteínas en el veneno de una misma especie. Esto se observa con los reportes de estudios anteriores, en donde se menciona que el veneno de serpientes como *Bothrops asper* o *Metlapilcoatlus numiffer* en diferentes etapas de crecimiento presenta distintas proporciones proteicas. En el veneno de juveniles, suele encontrarse un mayor porcentaje de proteína SVMPs (Serina proteasa catroxasa-2 de veneno de serpiente) y poca o cero cantidad de PLA₂ (Fosfolipasa A₂). Lo anterior, resulta ser lo contrario para las víboras en su etapa adulta (Alope, *et al.*, 2008; García, *et al.*, 2020). La presencia y ausencia de cierto grupo de proteínas, concuerda con el tipo de dieta que llevan estos animales en sus distintas etapas de vida.

En el caso de las proteinasa SVSPs, se ha observado que llegan a afectar diferentes funciones fisiológicas como inducir a la coagulación de la sangre, fibrolisis, aumentar la presión arterial y agregación de paletas e incluso necrosis (Solangue, 2013). Por otro lado, las PLA₂ hidroliza los fosfolípidos de la posición n-2 del glicerol, llevando a la liberación de liso-fosfolípidos y ácidos grasos (Quispe, *et al.*, 2019). El daño de las fosfolipasas A₂ a nivel fisiológico, incluye efecto anticoagulante, hemorrágico, inhibidor de la agregación plaquetaria, neurotóxico, convulsivo y miotóxico. Asimismo, pueden verse involucradas en procesos fisiopatológicos del reumatismo, osteoartritis, psoriasis, shock séptico, síndrome distrés respiratorio e incluso inducir a síntomas de asma (Soares y Giglio, 2003; Inga, *et al.*, 2010). A partir de los distintos efectos producidos por estas proteínas, puede observarse como cada molécula se encuentra dirigida a un tipo de presa en específico, en el caso de las SVSPs a invertebrados y vertebrados pequeños, mientras que las PLA₂ regularmente son dirigidas principalmente a mamíferos (Cruz, *et al.*, 2017; García, *et al.*, 2020). Cabe recalcar que estas proporciones pueden cambiar entre especies, en donde se encuentra una mayor cantidad de algún tipo de fosfolipasas A₂ en juveniles que en adultos, y lo mismo para SVSPs (García, *et al.*, 2020).

Los cambios ontológicos ya se han reportado en diferentes especies de víboras como *Bothrops asper* (Alape, *et al.*, 2008), *Bothrops atrox* (Guérico *et al.*, 2006), *Bothrops insularis* (Zelanis, *et al.*, 2008), *Crotalus oreganus concolor* (Mackessy, *et al.*, 2003), *Crotalus simus* y *Crotalus tzabcan* (Durban, *et al.*, 2017). De igual manera, se ha reportado un cambio en las características del veneno entre ejemplares juveniles y adultos para el género *Metlapilcoatlus* (García *et al.*, 2020), en donde se reporta que el veneno de juveniles presentó un mayor porcentaje de proteínas SVMP (55%) y ausencia completa de proteínas PLA₂. En cuanto a los adultos, estas presentaron un menor porcentaje de proteínas SVMP (24%), pero la presencia en gran proporción de PLA₂ (31%). Los autores sugieren que el cambio se debe a la variación de dieta en las etapas de la serpiente (García, *et al.*, 2020). Por lo anterior mencionado, es posible encontrar un cambio ontológico en el veneno de la víbora mano de piedra *Metlapilcoatlus occiduus*, pues al igual que la especie hermana *M. numiffer*, se alimenta de diferentes animales a lo largo de su periodo de vida.

La mayoría de los reportes con esta información, son para los miembros de la familia Viperidae. Sin embargo, recientemente (2022) se publicó un estudio mostrando la existencia de variación ontológica en cobras chinas (*Naja atra*) en cautiverio. En el informe se reportó una mayor proporción de proteínas 3-FTX, CVF y PLA₂ en adultos y mayor contenido de SVMP y CRISP (proteínas de secreción ricas en cisteína) en neonatos. Los resultados coincidieron con la dieta de la especie en sus distintas etapas de crecimiento. Las proteínas SVMP y CRISP están diseñadas para afectar sistemas de animales ectotérmicos, mientras que las proteínas 3-FTX, CVF y PLA están dirigidas a los animales endotérmicos. Lo encontrado coincidió con la dieta de *N. atra* a nivel ontológico, pues los neonatos se alimentan de reptiles, anfibios y peces, y los adultos de roedores y aves (Nie, *et al.*, 2022).

En Guatemala, hay muy pocos reportes informativos para *Metlapilcoatlus occiduus*, por lo que su biología y venómica son muy poco conocidas. Tomando en cuenta que es un reptil relativamente común, con veneno de importancia médica e incidencia frecuente en áreas antropogénicas y en el campo (OPS/OMS, 2009), realizar este tipo de investigaciones es de suma importancia para contribuir con el conocimiento de la especie. Asimismo, *M.occiduus* pertenece a las “víboras de termo-foseta brincadoras”, un grupo de serpientes de elevado interés científico, del cual se sabe poco para algunas de sus especies. De esta manera, todo estudio relacionado con cualquiera de las especies de las víboras brincadoras, contribuye a un mejor entendimiento sobre tales reptiles.

VI. METODOLOGÍA

A. Análisis del veneno de *M. occiduus*

****Nota:** Las extracciones de veneno fueron autorizadas por el Comité de Ética de la Universidad del Valle de Guatemala (carta adjuntada en Anexos).

1. Extracción de veneno en víboras.

El protocolo de extracción de veneno se basó en el reporte por Goswami, *et al.*, 2014. Las tres (3) extracciones se llevaron a cabo en ejemplares *M. occiduus* mantenidos en cautiverio dentro del Zoológico la Aurora por M.S.c Daniel Ariano y PhD. Rowland Griffin. Las extracciones fueron realizadas con 15 a 30 días de diferencia para minimizar el estrés en los animales (Fernandes, *et al.*, 2021). La ordeñada de las víboras se realizó con guantes de látex/nitrilo y el apoyo de ganchos herpetológicos. Los ejemplares fueron divididos en dos grupos: juveniles (un año y medio) y adultos (+2 años), con el objetivo de formar dos (2) *pools* de veneno: Uno para víboras jóvenes y otro para adultas. En este sentido, se formaron un total de dos muestras: **Muestra 1:** “pool-veneno de ejemplares adultos” y **Muestra 2:** “pool-veneno de ejemplares juveniles”. En la primera y segunda visita se realizaron las extracciones en 6 juveniles y 3 adultas, y en la tercera se ordeñaron 8 juveniles y 2 adultas. Las serpientes no fueron separadas por sexo o por medidas morfométricas. El origen de los ejemplares adultos era desconocido, y los juveniles eran crías de las víboras adultas del zoológico. El área de extracción fue desinfectada con antiséptico y etanol al 70%. Se colocó una membrana doble de papel Parafilm en la apertura de beakers de vidrio estériles de 100 y/o 200 mL. La capa de papel Parafilm se fue cambiando por cada individuo ordeñado. Los colmillos de las víboras fueron insertados en la membrana de papel Parafilm al mismo tiempo que se masajearon las glándulas de veneno para estimular la secreción. Al finalizar la recolección del veneno, los beakers fueron sellados con 3 capas de papel Parafilm, y se colocaron en una hielera para ser transportados a los laboratorios de la Universidad del Valle de Guatemala. En los laboratorios, el veneno fue trasladado con micropipetas de 100 μ L a tubos Eppendorf de 1.5 mL, rotulados con el tipo de Muestra (Muestra 1: adultos; Muestra 2: juveniles) y cantidad de veneno obtenido. Los tubos con muestras fueron almacenados a -20°C. Toda actividad que incluyera la manipulación de veneno dentro del laboratorio fue realizada con guantes de látex/nitrilo, bata de laboratorio, lentes de protección y mascarilla. Con el objetivo de desnaturalizar las proteínas del veneno, el equipo y cristalería (no desechable) con contacto al veneno, este fue esterilizado con agua hirviendo, cloro (hipoclorito de sodio 5%) y etanol 90%. El material

desechable con veneno fue tratado con cloro (hipoclorito de sodio 5%) y etanol al 90%. Luego fue descartado en bolsas de *Ectotermo*[®] debidamente rotuladas (Richmond y McKinney, 2009; Timberlake, 2013; Universidad del Trabajo del Uruguay, 2020).



Figura 12. Extracción de veneno de víbora adulta *M. occiduus* adulta en el Zoológico la Aurora.



Figura 13. Extracciones de veneno de víbora *M. occiduus* en el Zoológico la Aurora. “A.” Masaje de glándulas de veneno de víbora adulta. Veneno depositado en beaker de 100 mL. “B.” Ordeñada de víbora juvenil. Inserción de colmillos en capas de papel Parafilm. Veneno depositado en beaker de 100 mL. “C.” Limpieza de gotas de veneno que quedaron atrapadas en las capas de papel Parafilm. Se transfirieron al pool de muestras con una pipeta de 100 μ L.

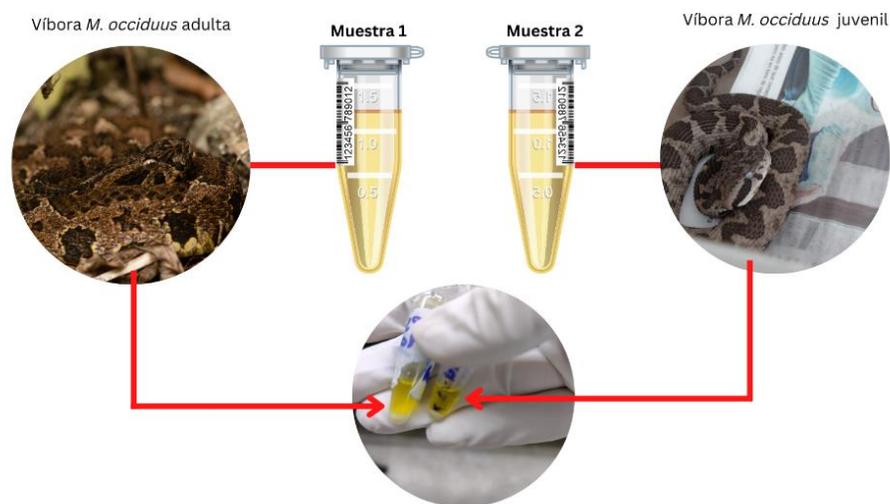


Figura 14. Preparación de pools de veneno para el estudio. Se hicieron dos pools para la obtención de dos (2) muestras: **Muestra 1:** víboras adultas (izquierda); **Muestra 2:** víboras juveniles (derecha).

Fotografía de *M.occiduus* adulta: Bernardo Zorilla Garza.

2. Cuantificación de proteínas en el veneno.

Se llevó a cabo el método de colorimétrico de Bradford standard (Bradford, 1976) basado en el protocolo de Universidad de Texas, 2019. Para generar la curva patrón de cuantificación, se usó albumina sérica bovina (BSA). Se preparó una solución madre con 0.1g de BSA en 10 mL de agua ultrapura a temperatura ambiente. Las diluciones de la curva fueron realizadas con los valores del **Cuadro 1**. Se mezclaron 60 μL de cada estándar con 940 μL de reactivo de Bradford (para un volumen total de 1,000 μL), y se incubaron por diez (10) a treinta (30) minutos en un sitio oscuro. El blanco se hizo de la misma manera, sustituyendo la solución proteica por agua ultrapura. La absorbancia se midió a 595 n.m. en un espectrofotómetro marca *Eppendorf*[®]. Lo anterior se realizó en triplicado para sacar un promedio final de los valores obtenidos. A partir de la curva, se obtuvo la ecuación de la recta que fue utilizada para determinar la concentración de proteínas del veneno. Se hicieron dos diluciones para cada muestra, siendo estas 1:100 y 1:200. Se determinó que la dilución óptima para medir un mejor perfil de concentración proteica fue la dilución 1:100. Tres (3) bioensayos en triplicado para cada veneno fueron hechos, tal y como lo muestra en el **Cuadro 2**. Para medir la absorbancia de las muestras de veneno se repitió el mismo proceso de la preparación de estándares, sustituyendo la solución proteica de BSA por las diluciones de veneno. La absorbancia fue medida a 595 n.m. Todos los valores obtenidos fueron tabulados en la

plataforma de *Microsoft Excel*[®], en donde se generó la curva y la ecuación de la recta. Los valores de la concentración proteica obtenidos fueron convertidos a µg/mL.

Cuadro 1. Preparación de estándares de solución madre BSA.

[BSA] µg/ml	Volume (µL) of 10 mg/ml BSA Stock	Volume (µL) of MilliQ water
100	5	495
200	10	490
400	20	480
600	30	470
900	45	455
1,200	60	440
1,500	75	425

(Universidad de Texas, 2019).

Cuadro 2. Bioensayos en triplicado para cada muestra de veneno.

Muestra	Factor de dilución 1:100 / 1:200		
	Bioensayo 1	Bioensayo 2	Bioensayo 3
1: “Pool-veneno de ejemplares adultos”	1	1	1
	2	2	2
	3	3	3
2: “Pool-veneno de ejemplares juveniles”	1	1	1
	2	2	2
	3	3	3

3. Ensayo de SDS-PAGE

Se llevaron a cabo dos recetas para preparar geles de SDS-PAGE con el objetivo de determinar cuál de las dos era más efectiva en cuanto en consistencia, tiempo de gelificación, formación de bandas, etc. La primera receta utilizada fue la reportada por Brunelle y Green, 2014, la cual se basa en el protocolo de SDS-PAGE estandarizado de Lemmli, 1970. La otra receta puesta a prueba fue el protocolo utilizado en el laboratorio del curso de TOXINOLOGÍA de la Universidad del Valle de Guatemala, basado en el reporte de BioRad, 2011 y Merk, 2021. Se determinó que la receta más efectiva fue la reportada por Brunelle y Green, 2014. Fue realizado un gel por muestra de veneno: uno para veneno de juveniles y otro para veneno de adultas.

Se prepararon las siguientes soluciones para el bioensayo de SDS-PAGE (Ver **Cuadro 3**).

Cuadro 3. Preparación de soluciones y reactivos para geles SDS-PAGE.

Reactivo/Solución	Preparación	Resultado
<i>Buffers para los geles (Stacking y Resolving)</i>		
Tris-HCl (6.8)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 80 mL de agua ultrapura ✓ 12.1 g de Tris base ✓ Ajustar pH de 6.8 con HCl (gota a gota). Medir con papel pH o pHímetro. ✓ Ajuste de volumen a 100 mL 	1 M Tris-HCl, pH 6.8
Tris-HCl (8.8)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 80 mL de agua ultrapura ✓ 18.15 g de Tris base ✓ Ajustar pH de 8.8 con HCl (gota a gota). Medir con papel pH o pHímetro. ✓ Ajuste de volumen a 100 mL 	1.5 M Tris-HCl, pH 8.8
Soluciones		
APS	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 1mL de agua ultrapura ✓ Disolver 0.1g de persulfato de amonio ✓ Ajustar el volumen si es necesario 	APS 10%
Acrilamida	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 20g de acrilamida ✓ 5.2g de bis acrilamida ✓ 50 mL de agua ultrapura ✓ Ajustar el volumen si es necesario 	Acrilamida al 40%

(Laemli, 1970; Brunelle y Green, 2014).

Para preparar el *Resolving Gel* se utilizaron los volúmenes y reactivos presentados en la **Cuadro**

4.

Cuadro 4. Preparación de *Resolving Gel*.

Reactivo	Volumen (μL)
Agua	4400
Acrilamida/bis acrilamida (19:1)	3000
Tris-HCl. pH 8.8	2500
SDS 12%	100
APS 10%	50
TEMED	5

La mezcla fue trasladada con una pipeta de 1,000 μL a las placas del equipo, y se dejó reposar durante sesenta (60) minutos o hasta su gelificación. Durante ese periodo, se preparó el *Stacking Gel*.

Para preparar el *Stacking Gel* se utilizaron los volúmenes y reactivos presentados en la **Cuadro 5.**

Cuadro 5. Preparación de *Stacking Gel*.

Reactivo	Volumen (μl)
Agua	3697
Acrilamida/bis acrilamida (19:1)	623
Tris-HCl. pH 6.8	630
SDS	5
APS 10%	40
TEMED	10

La mezcla se colocó sobre el *Resolving Gel* gelificado, seguido de los peines para formar los pozos. Fueron extraídos del gel al momento de la polimerización de este. Se dejó gelificar durante cuarenta (40) a treinta (30) minutos.

Para el gel *Resolving*, se aumentó la cantidad de TEMED (15 μL) (Laemli, 1970; Brunelle y Green, 2014), debido a que se observó una mayor eficiencia de polimerización al agregar 15-20 μL de este reactivo.

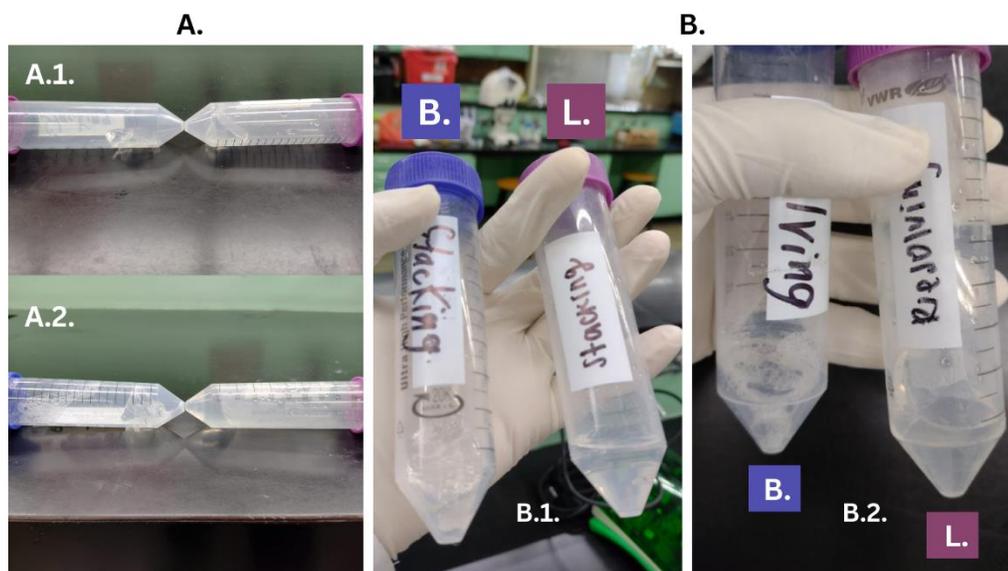
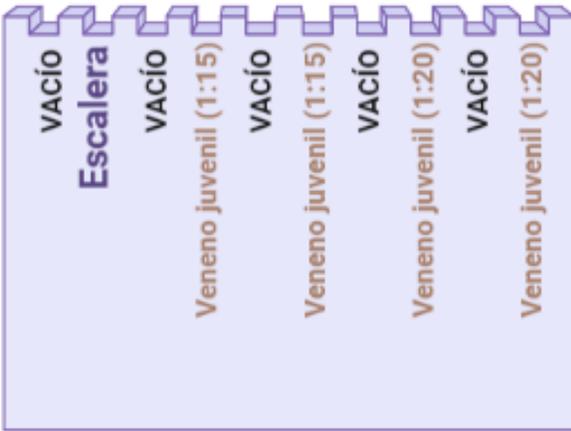
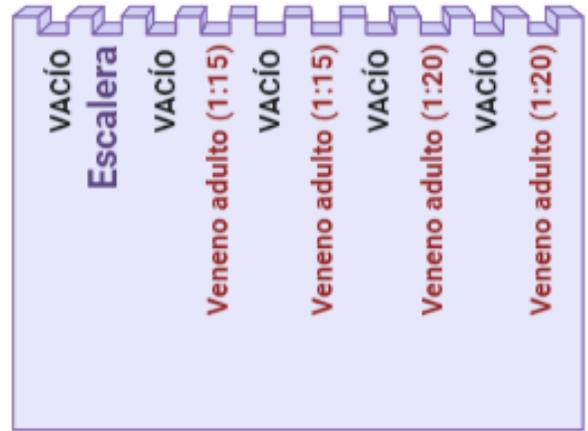


Figura 15. Diferencia de la consistencia y periodo de gelificación de los geles *Stacking* y *Resolving* entre las dos recetas de prueba. “A.1.” *Resolving* y *Stacking* gel de receta BioRad, 2011; Merk, 2021. Consistencia blanda, delgada y tiempo de gelificación 20-60 minutos. “A.2.” *Resolving* y *Stacking* gel de la receta Laemli, 1970; Brunelle y Green, 2014. Consistencia sólida, compacta, gruesa; tiempo de gelificación 10- 15 minutos (con corrección). “B.” Comparativa entre geles *Stacking* (B.1.) y *Resolving* (B.2.) realizados con dos recetas diferentes. En los dos (2) geles se observó una mejor consistencia y menor tiempo de gelificación para la receta de Laemli, 1970; Brunelle y Green, 2014 (L.) en contraste de la receta BioRad, 2011; Merk, 2021 (B.).

Para ambos venenos, se prepararon 3 diluciones de 1:15 y 3 diluciones 1:20 (1 μL de veneno y 15/20 μL de agua UP) para un total de 6 muestras. Se tomaron 15 μL de cada dilución, y se mezclaron con 10 μL de *Sample Buffer* (preparado con 0.6 mL Tris-HCl (pH 6.8), 2 mL solución SDS 10%, 1 mL de Glicerol, 0.267 mL de b-mercaptoetanol y 0.0025g de Azul de Bromofemol). Las muestras fueron calentadas en un termociclador durante 5 minutos a 95°C. Se dejaron enfriar, y se cargaron 10 μL de cada muestra en un pozo siguiendo la lógica de la **Figura 16**.



Gel 1. Pool de veneno de víboras juveniles.



Gel 2. Pool de veneno de víboras adultas.

Figura 16. Mapa para cargar los pozos con las dos muestras de veneno preparadas: Veneno de juveniles y veneno de adultas (El diagrama está basado en el informe reportado por García, *et al.*, 2014). ****Nota:** El diagrama solo muestra 4 cargas de veneno preparado (por muestra) en los pozos, debido a que la figura disponible en la aplicación solo tenía 10 espacios (en el experimento se usaron 15 pozos).

Los geles con muestra fueron colocados en la cámara, y se llenó de Running Buffer (preparado con 3.025g de Tris Base, 14.4g de glicerol, 10 mL de solución SDS 10% y agua ultrapura para ajustar volumen a 1L, pH ajustado a 8). La tapa fue conectada a los electrodos, ajustados por color (negativo-negro; positivo-rojo). Se corrieron los geles durante 60 -90 minutos a 110 voltios. Los geles fueron teñidos en solución de azul de Coomassie (preparado 25 mL ácido acético 10%, 100 mL metanol 40%, y 0.25g de azul de Coomassie) y agitó durante veinticinco (25) minutos. Se decoloraron con solución de ácido acético y metanol sin agitación durante al menos 12 – 24 horas (Preparado con 50 mL de ácido acético, 200 mL de metanol y 250 mL de agua ultrapura). Al día siguiente, los geles se lavaron con agua ultrapura/destilada. Para el análisis de bandas, se utilizó la plataforma virtual *GelAnalyzer*, la cual generó las respectivas gráficas y diagramas para evaluar la masa molecular de las proteínas detectadas en el bioensayo del veneno de *M.occiduus*. Debido a que se cargó la misma muestra en todos los pozos para ambos venenos, se sacó un promedio del peso molecular de todas las bandas formadas en el gel. La identificación de proteínas se hizo basado en su peso molecular reportado en literatura previa.

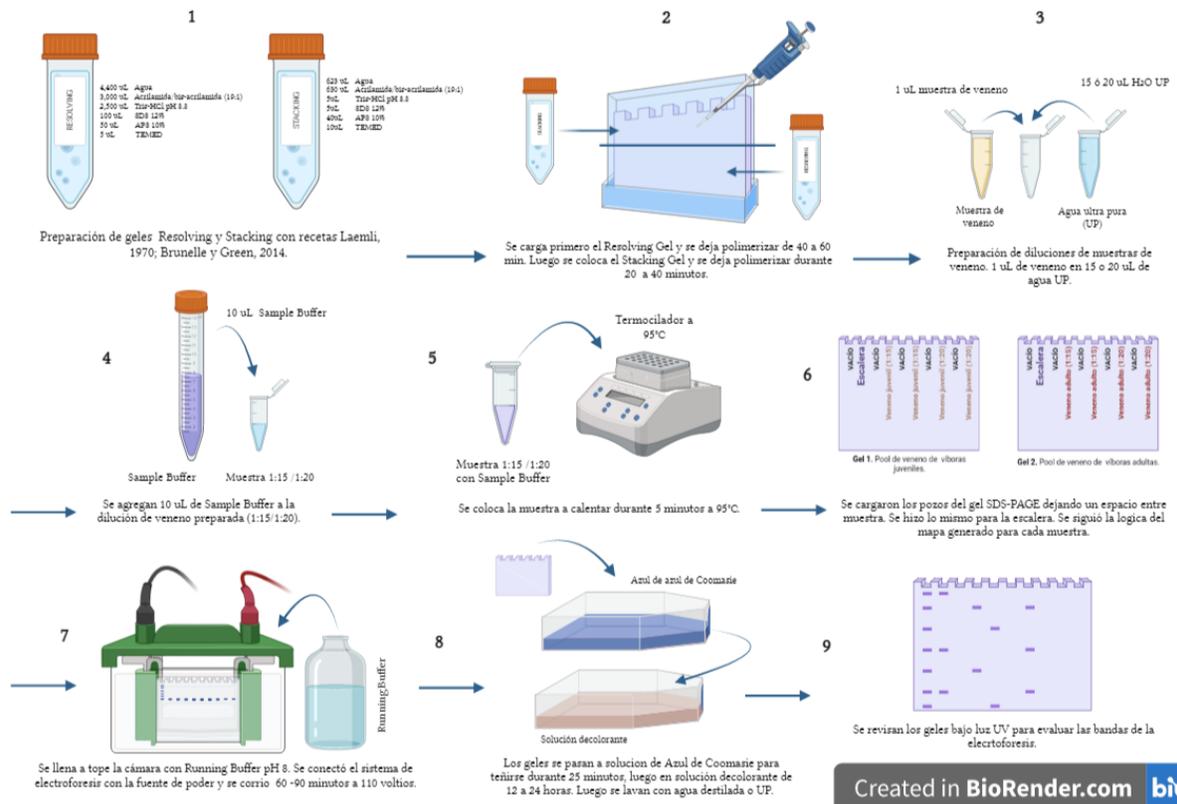


Figura 17. Diagrama de flujo general para preparación de electroforesis SDS-PAGE para las muestras de veneno de *M.occiduus* juvenil y adulta.

Se inicia con la preparación de los gels *Resolving* y *Stacking* con la receta propuesta por Laemli, 1970; Brunelle y Green, 2014. El gel *Resolving* debe dejarse polimerizar entre 40 a 60 minutos o hasta que se encuentre en estado completamente sólido. Se prepara el *Stacking* gel cuando *Resolving* gel ya está completamente polimerizado. El *Stacking* gel se deja gelificar entre 20 a 40 minutos (**1 y 2**). Se hacen las diluciones de veneno, en este caso se realizaron prepararon muestras de 1 μ L de veneno en 15 μ L de agua (1:15) y 1 μ L de veneno en 20 μ L de agua (1:20) (**3**). A cada dilución se le agregan 10 μ L de Sample Buffer, y posteriormente se calientan a 95°C por 5 minutos en una incubadora o termociclador (**5**). Las muestras deben dejarse enfriar unos minutos a T° ambiente. Los gels se cargan a partir del mapa generado para cada muestra, de manera que se deja un pozo vacío entre cada dilución y para la escalera (**6**). Los gels son colocados en la cámara de electroforesis, la cual se llena a tope con Running Buffer ajustado a pH 8. La corrida se lleva a cabo durante 60 a 90 minutos a 110 V (**7**). Al terminar, los gels son teñidos en azul de Coomassie durante 25 minutos, y luego se pasan a solución decolorante en donde se quedan de 12 a 24

horas. Finalmente son enjuagados con abundante agua destilada o UP (8). Finalmente, los geles se revisan bajo luz UV para evaluar las bandas de proteínas formadas para cada muestra (9).

4. Bioensayo de letalidad y determinación de la DL₅₀ en grillos domésticos (*Acheta domesticus*).

Para el bioensayo de DL₅₀ y porcentaje de letalidad de *M. occiduus*, se utilizaron modelos vivos de invertebrados exclusivamente. El *in vivo* con el que se trabajó fue el grillo común (*Acheta domesticus*; Familia: Gryllidae). Lo anterior se tomó en cuenta debido a que se ha reportado que las víboras juveniles *M.occiduus* se alimentan de pequeños invertebrados (Clase: Insecta) y pequeños vertebrados (Greene y Campbell, 1992; RedTox, 2020). Para los bioensayos se inyectaron 50 µL de las diferentes soluciones/ tratamientos a cada grillo. La inoculación se realizó en la zona lateral del abdomen, posterior a las patas traseras (Zelanis, *et al.*, 2008; Heep, *et al.*, 2019) (**Observar Figura 18 y 19**), con una jeringa de insulina U-100 de 0.5 mL (31G x 6mm) de la marca *BD Ultra-Fine*[®]. El volumen inyectado de 50 µL fue seleccionado ya que es la medida mínima que puede cargarse en las jeringas empleadas (50 µL = 0.5 mL).

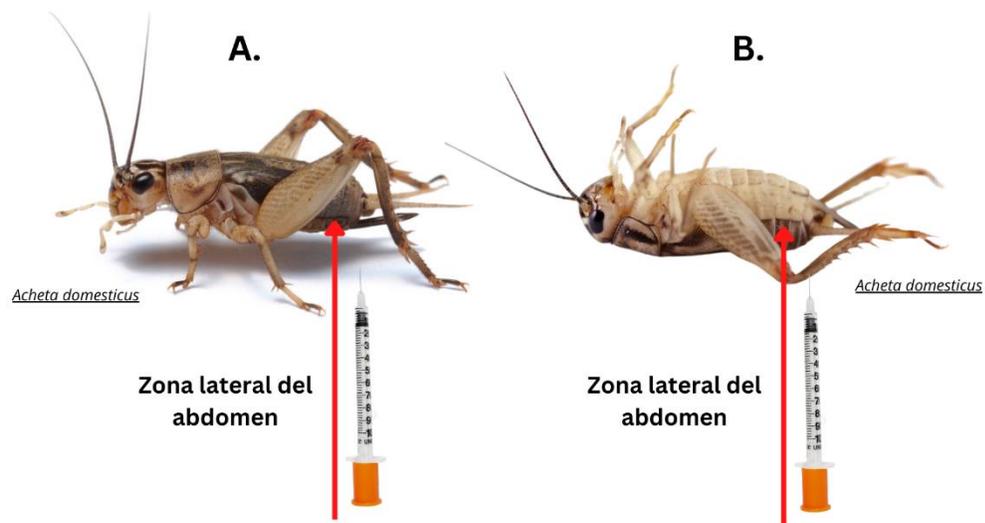


Figura 18. Método de inoculación de tratamientos en especie modelo *A. domesticus*. Vista dorsoventral de la vía de inyección: zona lateral del abdomen atrás de las patas posteriores. “A.” Vista dorsoventral boca-abajo; “B.” Vista dorsoventral boca-arriba.

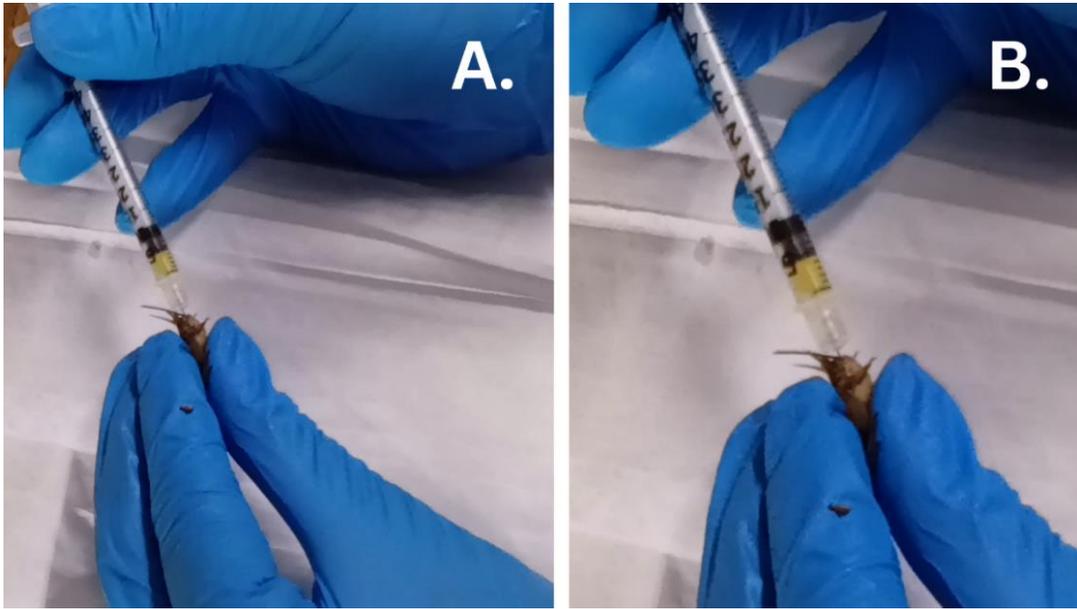


Figura 19. Método de inoculación de tratamientos en especie modelo *A. domesticus* durante bioensayos del estudio. “A.” Vista dorsoventral de la vía inoculadora de veneno puro de *M.occiduus* juvenil. “B.” Acercamiento de **Figura “25 A”**.

Los grillos fueron adquiridos por medio de empresas criadora de insectos. Para las observaciones, los grillos se colocaron en cajas transparentes separadoras/organizadoras con agujeros en las tapas. De esta manera, cada grillo inoculado con tratamiento estaría siendo separado por una celda del resto (**Observar Figura 18 y 19**). Los grillos permanecieron en las cajas en periodos de 1 hora y 24 horas sin ningún tipo de provisión (agua o comida).

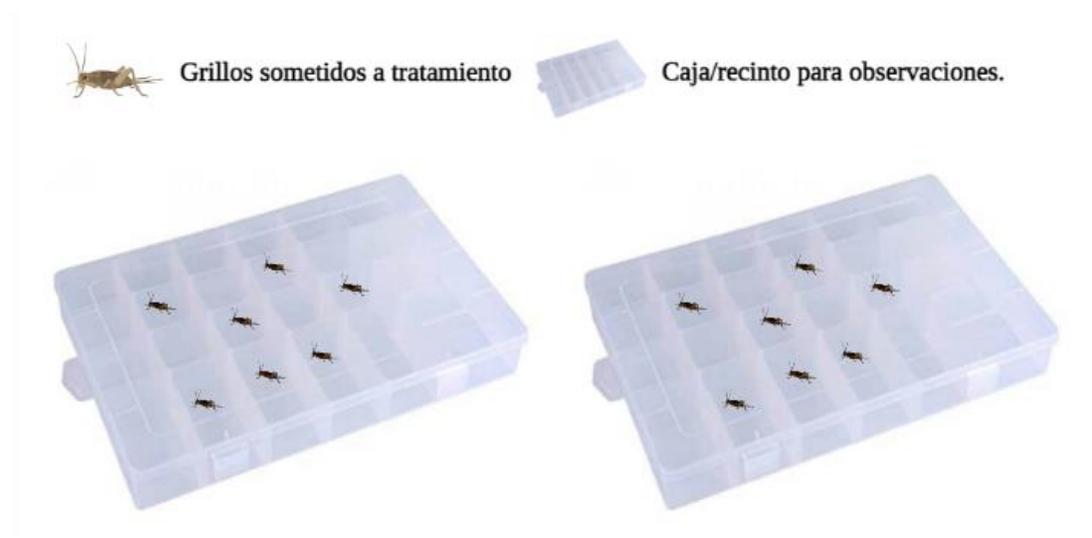


Figura 20. Cajas experimentales para aislar a cada grillo de manera individual en una celda después de la inoculación de tratamiento.



Figura 21. Grillos separados por celdas en las cajas experimentales después de la inoculación de uno de los tratamientos del estudio. A ningún individuo se le dejó provisiones: agua y/o comida.

a. Preparación de recintos para los grillos.

Cuatro (4) cajas camiseras fueron arregladas para albergar grillos por aproximadamente un mes y una semana. Se les abrieron agujeros en las tapaderas con un taladro para permitir el paso del oxígeno. Tanto las tapas como las cajas fueron lavadas y desinfectadas con jabón líquido marca *Lysol*[®], hipoclorito de sodio 5%, etanol al 70% y se enjuagaron con agua destilada dos (2) veces. Las cajas fueron transportadas al laboratorio de Entomología del Centro de Estudios Ambientales y Biodiversidad (CEAB) de la Universidad del Valle de Guatemala.

Se acondicionaron con papel periódico como sustrato y cartones de huevo. Los grillos fueron alimentados y limpiados de dos (2) a tres (3) veces por semana. Se les alimento dos veces por semana con naranja, zanahoria y/o manzana y una vez a la semana con alimento seco: concentrado y avena. El agua fue proporcionada en algodones redondos.



Figura 22. Cajas camiseras con hoyuelos en las tapas, cartones de huevo, sustrato de periódico y alimento para albergar a los grillos durante la experimentación. Las cajas estuvieron colocadas en un lugar seco y fresco.

b. Preparación y limpieza de cajas experimentales.

Ocho (8) cajas separadoras/organizadoras de plástico obtenidas en *Cemaco*[®], fueron lavadas y desinfectadas con jabón líquido marca *Lysol*[®], hipoclorito de sodio 5%, etanol al 70% y se enjuagaron con agua destilada 2 veces. Se abrieron dos hoyos con un taladro en cada sección de las tapas separadoras. Estas fueron enumeradas y/o rotuladas con el número de celda y el tipo de tratamiento inyectado (veneno crudo, dilución seriada, control). Las cajas fueron llevadas y almacenadas en el laboratorio de Entomología del Centro de Estudios Ambientales y Biodiversidad (CEAB) de la Universidad del Valle de Guatemala. Entre cada bioensayo, las cajas experimentales fueron limpiadas para quitar el exceso o restos de veneno y/o diluciones. El objetivo fue desnaturalizar las proteínas del veneno con ácidos-bases y compuestos orgánicos (Richmond y McKinney, 2009; Timberlake, 2013; Universidad del Trabajo del Uruguay, 2020). Se dejaron enjuagar con agua y tres (3) cucharadas de jabón líquido *Axion*[®] durante 10 minutos. El exceso de jabón fue eliminado con agua del grifo. Las cajas fueron

dejadas en remojo con etanol al 90% durante 10 minutos. Se enjuagaron las cajas con agua, y se secaron para el próximo bioensayo (CDC y NIH, 2020).

c. Descarte de material con residuos de veneno.

Todos los materiales con contacto de veneno fueron tratados con etanol al 90% (reposo durante diez (10) minutos en etanol 90%; enjuague con agua). Las jeringas fueron cerradas con su tapadera y seguro, y se envolvieron en una capa gruesa de papel Parafilm. Se desecharon en envases para objetos cortopunzantes de *Ecotermo*[®]. El resto de material desechable utilizado en las experimentaciones (guantes, pipetas plásticas, etc.) fue colocado en vasos plásticos cerrados con papel Parafilm y su respectiva tapadera. El vaso se envolvió en dos capas de papel Parafilm y/o plástico para asegurar el cierre. Se descartaron en bolsas de *Ecotermo*[®]. Todos los desechos fueron rotulados con la información de su contenido (“residuos/desechos de veneno de serpiente *M.occiduus* tratado con etanol 90%” + contacto por dudas del descarte). (**Ver sección de Anexos Figura 46**) (Richmond y McKinney, 2009; Timberlake, 2013; Universidad del Trabajo del Uruguay, 2020).

d. Descarte de grillos muertos e inoculados con veneno.

Los grillos muertos con inoculaciones de veneno fueron tratados en etanol 90% por veinticuatro (24) horas. El exceso de etanol fue desechado, y el recipiente plástico con grillos fue sellado con papel Parafilm y su respectiva tapadera. El recipiente se envolvió con dos capas de papel Parafilm o plástico. Los grillos que quedaron vivos en algún tratamiento, fueron sometidos a criogenización por veinticuatro (24) previo a su descarte. Los envases fueron rotulados con la información de su contenido (residuos/desechos de veneno de serpiente *M.occiduus* tratado con etanol 90% + contacto por dudas del descarte) y desechados en bolsas de *Ecotermo*[®] (**Ver sección de Anexos Figura 46**) (Richmond y McKinney, 2009; Timberlake, 2013; Universidad del Trabajo del Uruguay, 2020).

1. Determinación de la solución control y solvente.

Previo a la realización de bioensayos, se hicieron dos pruebas para determinar el solvente y medio de control que presentara un 0% de mortalidad en los grillos. Se inyectaron treinta (30) grillos con 50 µL de buffer de fosfatos (PBS) y treinta (30) grillos con 50 µL de agua ultrapura (UP). Se registro el comportamiento y mortalidad de los grillos inmediatamente, una (1) hora después y veinticuatro (24) horas después de la inyección. Los datos se tabularon en el **Etograma 1 y 2** (Ver sección de Anexos). Dichos datos fueron registrados en la plataforma

virtual *Microsoft Excel*[®]. El solvente seleccionado fue agua UP con un 0% de mortalidad. PBS mostró 30% de mortalidad (6 muertes de 20 grillos: 6/20).

*** Para todos los Bioensayos con grillos se comparó a un grillo paralizado con uno muerto, con el objetivo de establecer las diferencias y asegurarse que el grillo había perdido la vida después de las inoculaciones.*

2. Bioensayos de letalidad del veneno en grillos.

Para cada muestra (**Muestra 1:** veneno de adultos y **Muestra 2:** veneno de juveniles) se realizaron dos tratamientos de inyección:

A. **Tratamiento I:** Control negativo-agua UP.

B. **Tratamiento II:** Control positivo- veneno crudo.

Se inocularon veinte (20) grillos para el tratamiento control positivo con 50 µL de veneno puro. Cada grillo inoculado fue colocado en una celda de la caja experimental, y sobre la tapadera se rotuló el tipo de tratamiento y el número de grillo inoculado (**Ver sección de Anexos Figura 48**). Se hicieron observaciones del comportamiento y mortalidad de los grillos inmediatamente, una (1) hora después y veinticuatro (24) horas después de la inyección. Se tomó el tiempo aproximado en el cual comenzaba el proceso de parálisis y/o muerte. Los datos se tabularon basados en el **Etograma 1 y 2** (Ver sección de Anexos). Se tomaron datos video y fotográficos, los cuales fueron almacenados en la plataforma de *Google Drive*[®] separado por carpetas. Las cajas experimentales con los grillos se cerraron con el seguro de la tapadera de cada caja, y se almacenaron en un lugar ventilado sin nada encima de ellas para permitir el ingreso del oxígeno (**Ver sección de Anexos Figura 48**). Se realizaron diagramas de barras para comparar los porcentajes de grillos muertos y vivos después de los bioensayos, tanto para el veneno crudo como para los solventes.

3. Bioensayos para la determinación de la DL50 de las muestras de veneno.

Se prepararon cuatro (4) diluciones seriadas para las dos (2) muestras de veneno (juveniles y adultas) en las siguientes proporciones:

Cuadro 6. Diluciones seriadas para las muestras de veneno juvenil y adulta de *M.occidius*.

Dilución/Tratamiento	Proporción de veneno/dilución	Solvente (agua UP)
0.1	75 µL de veneno puro	675 µL
0.01	75 µL de dilución 1:10	675 µL
0.001	75 µL de dilución 1:100	675 µL
0.0001	75 µL dilución 1: 1,000	675 µL

****Nota:** Cada dilución está representada por un color, de manera que el color de las flechas indica de que dilución deben tomarse 75 µL para llegar a la siguiente (mezclar con 675 µL de agua UP).

Para las dos (2) muestras, los tratamientos consistieron en inyectar 50 µL de disolución en 10 grillos (4 tratamientos-diluciones (40) + 10 tratamiento veneno puro = 50 grillos: por muestra (2) = **100 grillos**).

Cuadro 7. Metodología de inoculación para diluciones de las muestras de veneno de *M.occidius*.

Disolución/Tratamiento	Dosis de inyección	Cantidad de grillos inyectados
0.1	50 µL	10
0.01	50 µL	10
0.001	50 µL	10
0.0001	50 µL	10

Previo a la inoculación, cada grillo fue pesado con una balanza electrónica, con un recipiente tipo tóper para evitar que estos se escaparan (**Ver sección de Anexos Figura 47**). Se calculó un promedio de todos los pesos para establecer el valor del peso en gramos (g) para cada tratamiento/dilución. Después de la inyección, los grillos fueron colocados de manera individual en una de las celdas de la caja experimental sin ningún tipo de provisión. Las cajas experimentales se dividieron por la dilución inoculada (esto se rotuló en su tapadera). A pesar de que para la DL50 no se necesitan datos de comportamiento, si no solo mortalidad (Shaala, *et al.*, 2015), en esta parte del bioensayo se realizaron observaciones etológicas de los grillos sometidos a los cuatro (4) distintos tratamientos. El tiempo aproximado en el cual comenzaba el proceso de parálisis y/o muerte fue tomado y anotado. Se registraron los datos etológicos inmediatamente, una hora (1) después y veinticuatro (24) horas después de la inyección. Las cajas fueron almacenadas en un lugar ventilado, permitiendo que los hoyuelos de las tapaderas tuvieran entrada de oxígeno.

veinticuatro (24) horas después, se determinó la mortalidad de todos los grupos de grillos. Los datos fueron registrados en la plataforma virtual *Microsoft Excel*[®]. Se tomó registro videográfico y fotográfico, el cual fue almacenado en la plataforma *Google Drive*[®]. Se realizaron cálculos para determinar las concentraciones y dosis exactas de veneno inoculadas por peso (g) en grillos (Sección de Anexos).

Los datos fueron cargados y analizados en la plataforma de *R studio*[®]. Para calcular la DL_{50} de las dos muestras, se utilizó el paquete de *R Studio*[®] “HelpersMG”, junto con el modelo “logistic” (*Script* en sección de Anexos) La guía base para realizar el *Script* fue “Package ‘HelpersMG’”, 2022. Los valores de DL_{50} tienen las dimensionales en $\mu\text{g/g}$.

4. Disecciones de grillos.

Se realizaron disecciones de los grillos inyectados en todos los bioensayos para ambas muestras (Bioensayo 1: Letalidad; Bioensayo 2: DL_{50}) para comparar los efectos de cada veneno en el tejido de los grillos. Para los bioensayos de DL_{50} se hicieron disecciones tanto de los grillos muertos como de los grillos que quedaron vivos después de ser inoculados con tratamiento. Se hicieron disecciones de grillos sanos para comparar con el resto de los resultados: Grillo sano inducido a muerte (inmediatamente); Grillo sano tras veinticuatro (24) horas de muerte. Grillo sano Para sacrificar a los grillos que quedaron vivos, se les sometió a un proceso de criogenización por 15- 20 minutos.

Cada disección se realizó en una superficie tipo duroport. Se quitaron las patas traseras de los grillos para evitar que estorbaran durante los cortes. Se clavó un alfiler en la zona ventral del tórax de los grillos, y otro en la zona ventral de la punta inferior del abdomen, a modo de formar una “línea imaginaria” vertical (donde sería ejecutado el corte). En medio de ambos alfileres, en la parte ventral del grillo se ejecutó un corte con tijerillas de disección y/o bisturí. Luego se tomaron los pliegues laterales del insecto, y se clavaron con alfileres comunes en la superficie del duroport (**Ver Figura 23**). Se realizaron observaciones de consistencia, color, olor y estado del tejido interno del grillo. Se tomó evidencia videográfica y fotográfica, la cual fue registrada en *Google Drive* dividido por carpetas.

Para contrastar con las disecciones de los grillos inoculados con veneno se hicieron los siguientes cortes y observaciones:

- **Disección comparativa 1.** Grillos saludables sin inoculación de veneno.
- **Disección comparativa 2.** Grillos saludables sin inoculación de veneno muerto tras veinticuatro (24) horas.
- **Disección comparativa 3.** Grillo muerto veinticuatro (24) horas después de la inoculación de veneno crudo.
- **Disección comparativa 4.** Grillo muerto/paralítico una (1) hora después de inoculación de veneno.
- **Disección comparativa 5.** Grillo vivo veinticuatro (24) horas después de la inoculación de dilución (0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001).
- **Disección comparativa 6.** Grillo muerto veinticuatro (24) horas después de la inoculación de disolución (0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001).
- **Observación comparativa 1.** Estado de un grillo saludable, muerto y paralítico.

Todas las disecciones se realizaron para las dos muestras de veneno con el objetivo de comparar los resultados obtenidos para ambas muestras.

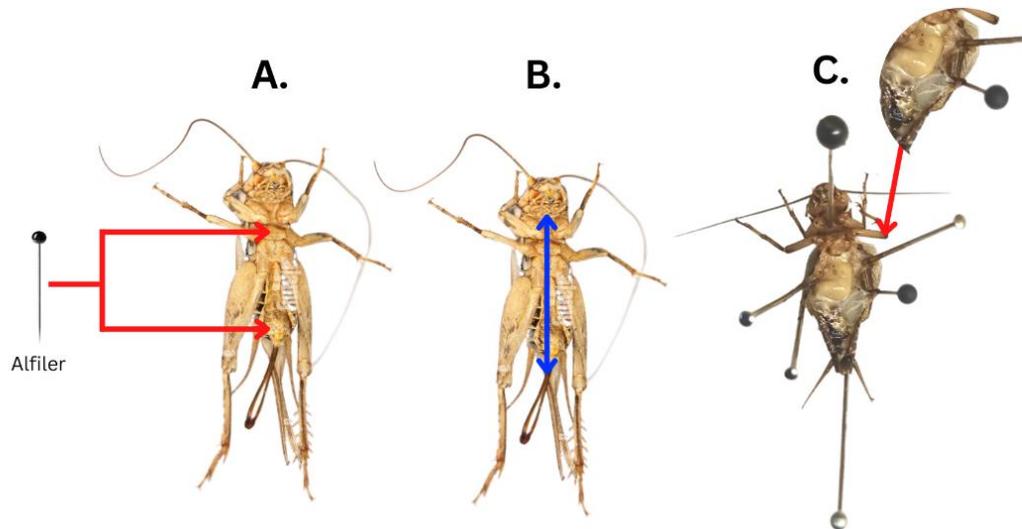


Figura 23. Metodología de disección en grillos. “A.” Se colocaron dos alfileres en la zona ventral del grillo, uno en el centro del tórax y otro en la punta del abdomen. Esto inmovilizó al cuerpo del insecto. “B.” Se realizó un corte longitudinal entre los dos alfileres previamente insertados. El corte se hizo con tijerillas de disección y/o bisturí. “C.” Colocación de alfileres en los pliegues laterales del grillo formado por los cortes. Estos alfileres facilitaron la apertura del plano ventral para la observación del estado del tejido interno.

VII. RESULTADOS

A. Análisis y caracterización del veneno de *Metlapilcoatlus occiduus*

Con el método descrito en este estudio, para la extracción de veneno de *Metlapilcoatlus occiduus* juveniles se extrajo un promedio de 50 μL por individuo, mientras que para los adultos se extrajo un total de 75 μL . Ambas secreciones presentaron un intenso color amarillo transparente. El color está asociado a la presencia de enzima L-aminoácido oxidasa en la secreción (Olivera, *et al.*, 2021). El veneno en ambos casos fue poco viscoso y de consistencia acuosa. El veneno no presentó ningún tipo de olor.

1. Cuantificación total de proteínas de las muestras de veneno.

Al determinar la concentración proteica total por medio del método colorimétrico de Bradford, se generó una regresión lineal a partir de una curva estándar a base de BSA. Se obtuvo la ecuación $y = 2839.5x - 331.42$ ($r^2 = 0.9831$). La concentración de proteínas ([BSA] $\mu\text{g/ml}$) está en el eje X y la absorbancia (ABS 595 n.m.) en el eje Y. Con esto, se determinó que la concentración proteica del veneno de serpiente juvenil es de **125.58 $\mu\text{g/ml}$** , y en el veneno de adulto fue un total de **131.06 $\mu\text{g/mL}$** .

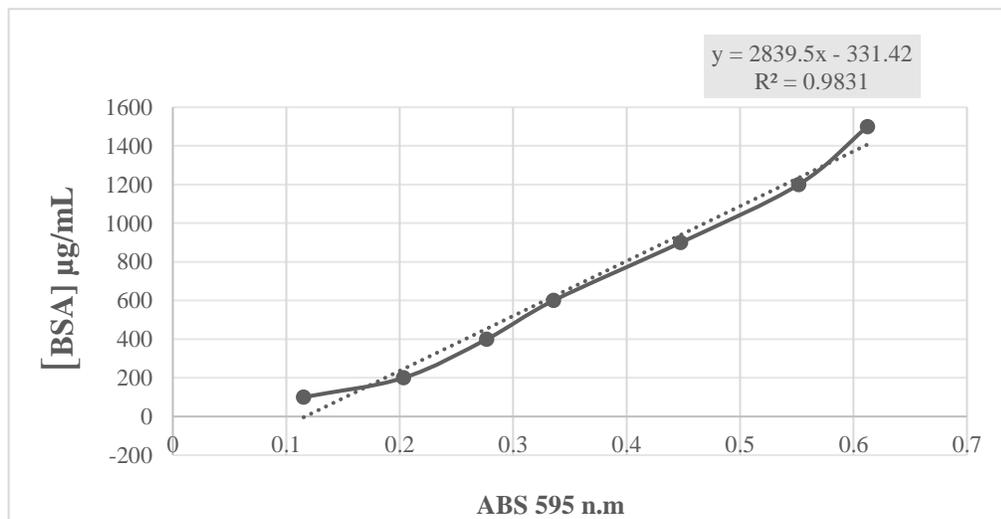


Figura 24. Curva estándar a base de BSA para determinar la concentración proteica de las dos muestras de veneno. Se generó la ecuación $y = 2839.5x - 331.42$ a partir de la gráfica.

2. Proteínas presentes en muestras de veneno.

Cuadro 8. Rangos de los pesos moleculares (kDa) de las proteínas y componentes presentes en el veneno de Viperidae.

Familia de proteínas	Rango pesos moleculares (kDa)	Reporte de proteínas y pesos moleculares
Miotoxinas	4 - 5	(Calvete, <i>et al.</i> , 2011; Xiao, <i>et al.</i> , 2017; Hiu <i>et al.</i> , 2020)
Desintegrina	6 - 9	
Inhibidor tipo Kunitz		(Calvete, <i>et al.</i> , 2011; Xiao, <i>et al.</i> , 2017)
Fosfolipasas A ₂ secretoras	13 - 18	(Harris y Scott, 2013; Xiao, <i>et al.</i> , 2017; Hiu, <i>et al.</i> , 2020)
Metaloproteasas (SVMPS)		
PI	20 -30	
PII	30-60	(Markland y Swenson, 2013; Xiao, <i>et al.</i> , 2017; González, <i>et al.</i> , 2020; Ha, <i>et al.</i> , 2022)
PIII	60-100	
CRSP	20-30	(Clavete, <i>et al.</i> , 2011; Bernardes, <i>et al.</i> , 2012; Xiao, <i>et al.</i> , 2017)
Serinaproteasas (SVSP)	30-35	(Xiao, <i>et al.</i> , 2017; González, <i>et al.</i> , 2020; Nina. <i>et al.</i> , 2020)
L-aminoácido oxidasas (LAAOS)		
LAAOS monómero	50-70	(Costa, <i>et al.</i> 2014; Xiao, <i>et al.</i> , 2017; Hiu, <i>et al.</i> , 2022)
LAAOS forma nativa	120-150	

Las proteínas de las bandas SDS-PAGE se identificaron a partir de su peso molecular (kDa). El **Cuadro 8**, muestra los pesos moleculares (kDa) de las proteínas y componentes reportadas en el veneno de otras serpientes de la familia Viperidae.

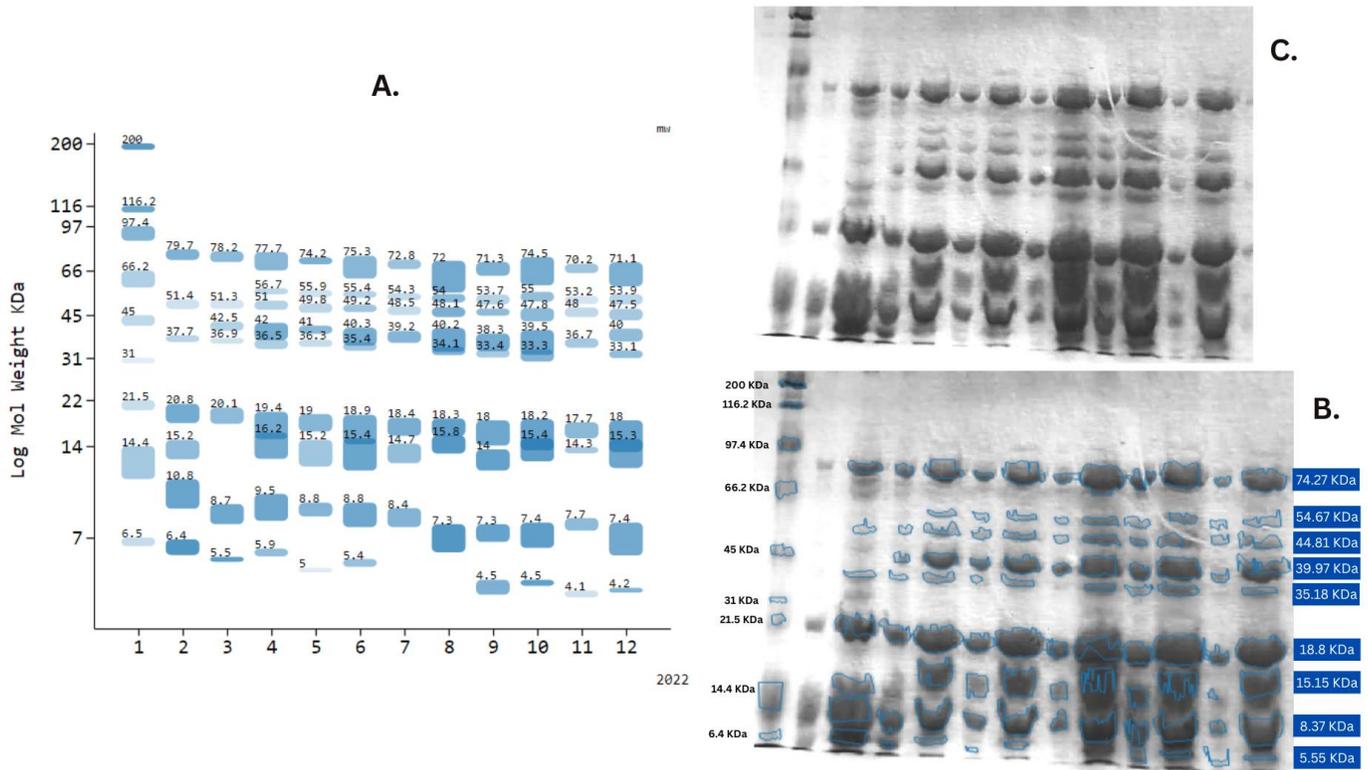


Figura 25. Perfil de SDS-PAGE de los principales componentes y/o proteínas del veneno de *Metlapilcoatlus occiduus* adulta. "A." Esquema elaborado en GelAnalyzer de las bandas proteicas y sus pesos moleculares basados en el gel original. La escala y dimensionales para el peso molecular es logarítmica kDa. "B." Gel de SDS PAGE original con bandas detectadas; promedio del peso molecular de todas las bandas formadas a partir de los valores d "A."; "C". Gel de SDS-PAGE original.

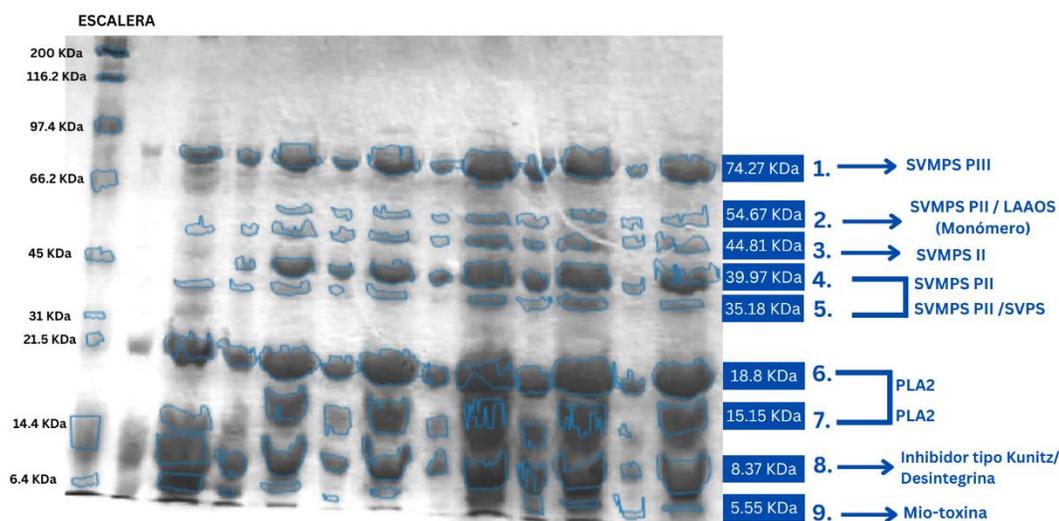


Figura 26. Proteínas y componentes identificadas en las bandas formadas en SDS-PAGE de **veneno de adulta**. Se formaron un total de 9 bandas. Las proteínas fueron identificadas a partir de su peso molecular según lo reportado en literatura previa.

El gel de SDS-PAGE para la Muestra 1, mostró una evidente variedad de proteínas para la secreción, debido a las abundantes bandas formadas en el gel. Se formaron alrededor de 9 bandas por cada carril, todas con distinto peso molecular. Los pesos moleculares fueron desde un rango de **5.55 kDa** hasta **74.27 kDa**. Este rango de pesos moleculares denotó la presencia de las familias proteicas fosfolipasas de secreción (**PLA₂**), metaloproteasas tipo PII y PIII (**SVMPs**), serina-proteasas (**SVSPs**), L-aminoácido oxidasas en su forma de monómero (**LAAOs**), miotoxinas, inhibidor tipo Kunits y/o desintegrinas. La identificación de las proteínas se realizó basado en su peso molecular (kDa) reportados en literatura previa (Ver Cuadro 8). Las bandas 1, 4, 6, 7 y 8 presentaron una mayor intensidad y tamaño que el resto, indicando una posible mayor proporción de estas en el veneno de serpiente adulta. Los resultados de este estudio coinciden con lo reportado por García, *et al.*, (2020) para *M. nummifer* con respecto a el tipo de proteínas dentro del veneno. Sin embargo, no coinciden con la proporción de proteínas presentes en el veneno, pues *M. occiduus* adulta pareciera tener mayores cantidades de SVMPs mientras que *M. nummifer* SVSPs.

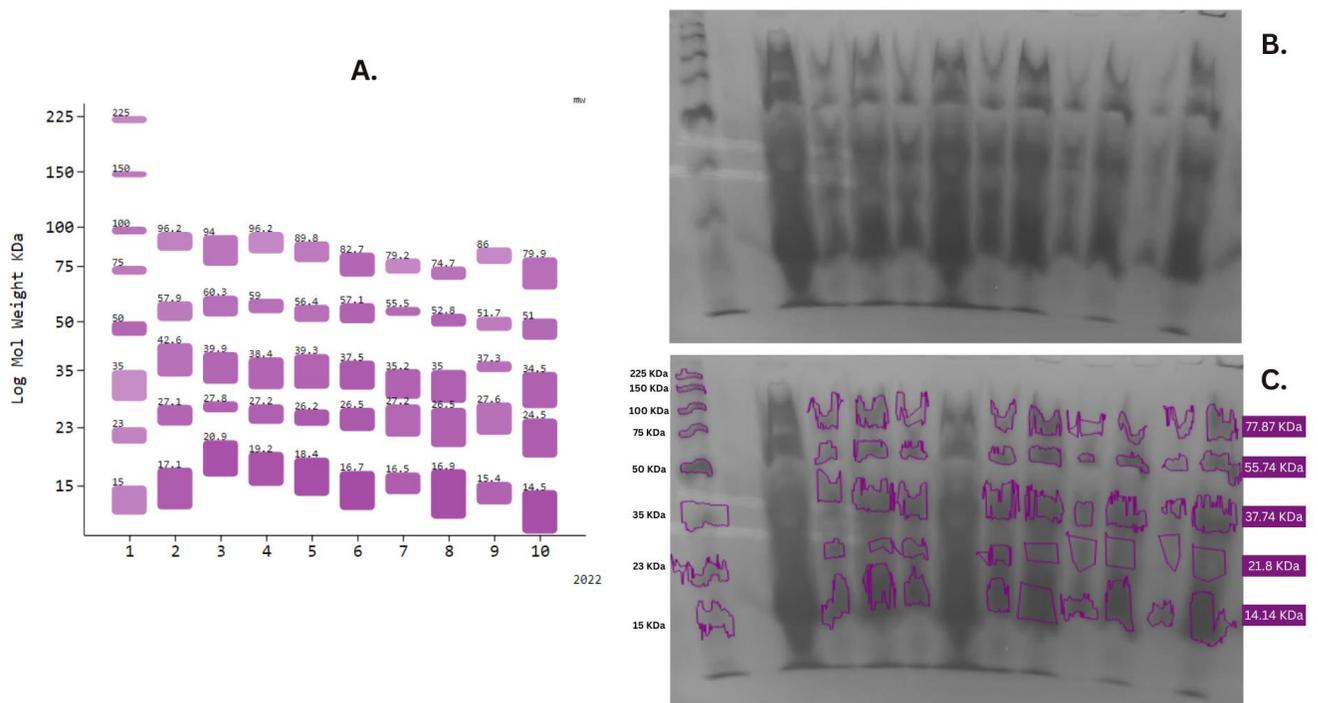


Figura 27. Perfil de SDS-PAGE de los principales componentes y/o proteínas del veneno de *Metlapilcoatlus occiduus* juvenil. “A.” Esquema elaborado en *GelAnalyzer* de las bandas proteicas y sus pesos moleculares basados en el gel original. La escala y dimensionales para el peso molecular es logarítmica y kDa. “B.” Gel de SDS-PAGE original con bandas detectadas; promedio del peso molecular de todas las bandas formadas a partir de los valores d “A.”; “C”. Gel de SDS-PAGE original.

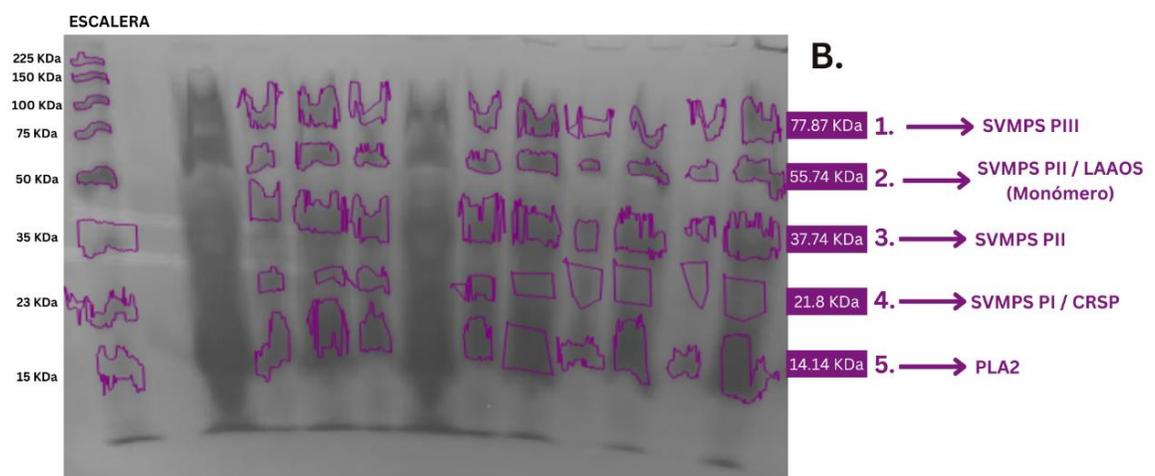


Figura 28. Proteínas y componentes identificadas en las bandas formadas en SDS-PAGE de veneno de juvenil. Se formó un total de 5 bandas, todas con pesos moleculares diferentes

(kDa). Las proteínas fueron identificadas a partir de su peso molecular según lo reportado en literatura previa.

El gel SDS-PAGE para juveniles, muestra un total de 5 bandas formadas, 4 menos que lo presentado por *M. occiduus* adulta. El rango de pesos moleculares para las proteínas de este gel va de **14.14 kDa** hasta **77 kDa**. Las familias de proteínas identificadas según su peso molecular (Cuadro 8) son metaloproteasas de tipo PI, PII y PIII (**SVMPs**), fosfolipasas de secreción (**PLA₂**), L-aminoácido oxidasas en su forma de monómero (**LAAOs**) y proteínas secretoras ricas en cisteína (**CRISPs**). Las bandas con mayor tamaño e intensidad son la 1, 2, 3 y 5, indicando una mayor proporción de metaloproteasas que el resto de las proteínas. La intensidad y tamaño de la banda 5 muestra una alta concentración de fosfolipasas A₂. Los resultados coinciden con lo reportado por González, *et al.*, (2020), para neonatos de *M. nummifer*, en donde indican que el mayor porcentaje de proteínas en el veneno son SVMPs. Por el contrario, para *M. occiduus* juveniles si se obtuvo la presencia de PLA₂, mientras que esta familia de proteínas no fue identificada ni encontrada en el veneno de neonatos de *M. nummifer*

B. Bioensayos e inoculación de venenos en grillos domésticos (*A. domesticus*)

1. Bioensayo de letalidad y efectos de los venenos en la etología de los grillos.

Aunque se esperaba que los sujetos experimentales presentaran comportamientos que difirieran notablemente entre los dos venenos inoculados, lo anterior no se observó. La etología para los individuos fue muy parecida entre muestra (juvenil y adulto), denotando que los venenos tuvieron una acción biológica similar en el sistema de los grillos.

En ambos bioensayos los grillos presentaron evidente daño fisiológico y sistémico (**C.D.F.**) debido al cambio brusco en su comportamiento. Inmediatamente después de la inyección de veneno, los grillos presentaron movimientos acelerados parecidos a un “éxtasis” o “ataques nerviosos”. Sus extremidades (antenas, patas, mandíbula, etc.) se movían rápidamente, y por unos segundos los grillos se desplazaban acelerados alrededor de la celda. Algunos trataban de escapar tras la ejecución de saltos y escalar las paredes de la caja. Después de unos minutos, los grillos dejaban de moverse aceleradamente para quedarse quietos en un solo lugar, o moverse pocos centímetros de forma lenta. Varios sujetos experimentales perdieron líquido, pues dejaban gotas en el suelo de la celda. El líquido pudo salir por los espiráculos de los insectos.

Rápidamente perdieron la habilidad de saltar y generar impulso con todas sus patas. Los grillos que trataron de escapar solo pudieron realizar de uno a tres saltos, de manera torpe. Los saltos ejecutados fueron lentos y sin fuerza de impulso. En algunos casos, las patas traseras quedaron paralelas, rectas e inflexibles, mostrando una posible parálisis rígida. No paraban de mover las antenas y la cabeza de lado a lado, acompañado de un particular movimiento de sus patas anteriores. Este consistía en frotarlas entre sí de manera muy acelerada (parecido al frote de las patas anteriores de una mosca (*Musca* spp.)). Las patas anteriores también las frotaban con su mandíbula continuamente.

El movimiento de los grillos se ralentizó por completo entre los 3:00 a 10 -15:00 minutos de inyección. Para ese momento, los grillos solo podían mover levemente las patas anteriores, debido a que el veneno estaba inmovilizando su sistema. Esto provocó que solo pudieran desplazarse arrastrándose por la celda de las cajas experimentales. Entre el minuto 10:00 y el 30:00, los grillos dejaron de moverse por las celdas, mostrando parálisis casi completas y/o completas. Sus cuerpos se tornaron completamente blandos, y todas sus patas seguían estiradas y rígidas, mostrando parálisis rígida y flácida a la vez. Los grillos tomaron una postura “tipo estrella”: cuerpo recto, patas estiradas y rígidas a lo largo de la celda. Los únicos movimientos que se observaban durante ese periodo era el movimiento leve de sus antenas y el de sus patas anteriores y medias, las cuales se agitaban de arriba abajo (en forma de aleteo).

Para los grillos de tamaño grande y cuerpos robustos (usualmente hembras), los efectos de los venenos fueron más leves al inicio, y tardaron más en llegar a la parálisis y muerte. Algunos grillos con estas características seguían moviéndose lenta y torpemente en la celda tras 20 minutos post-inoculación. Sin embargo, el resto de los síntomas siguieron presentándose como en el resto de los individuos. A los 40- 60 minutos de inyección, los grillos estaban en completa parálisis o muertos (Nivel 1 Etograma 1-2). Todos los grillos murieron ya sea en posición lateral (Nivel 1.3 Etograma 1-2) o boca abajo (Nivel 1.4 Etograma 1-2). Las patas rígidas y la posición “tipo estrella” permanecieron hasta la muerte en la mayoría de los grillos.

Para estos bioensayos de letalidad, ningún ejemplar presentó “Comportamiento sin daño fisiológico” (**C.S.F**) en ninguno de los niveles del **Etograma 1-2** (Sección de Anexos). Todos los comportamientos **C.S.F** se basaban en la etología “natural” de un grillo. De tal modo, el nivel 7 y 5 no fueron tomados en cuenta como **C.D.F**. Esto se debe a que la etología que representan estos niveles no es la misma que se observó después de la inyección a los grillos,

pues el comportamiento presentado en los individuos era alejado de ser un estado “natural” (Reed Collage, 2010).

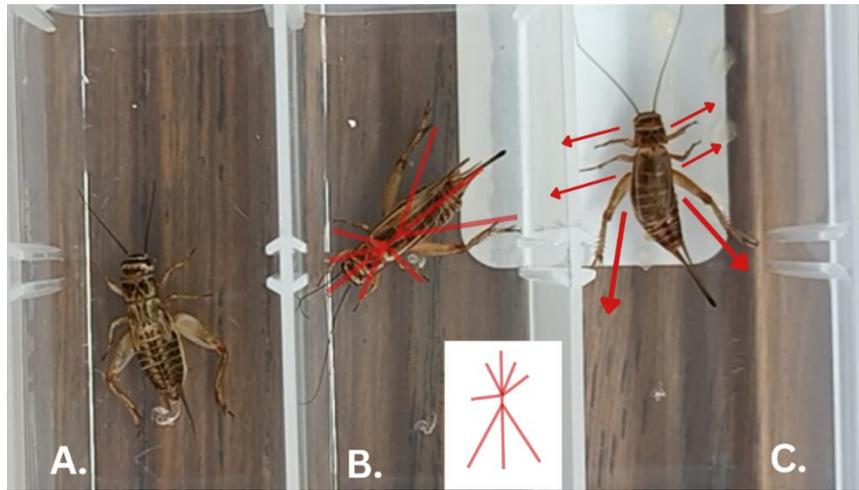


Figura 29. Espasmos y rigidez en los grillos inoculados con veneno de serpiente juvenil. “A.” Cuerpo recto y patas rígidas, parálisis casi completa. “B.” Posición “tipo estrella”: Cuerpo recto perpendicular a las patas; patas estiradas y rígidas, haciendo la forma de una “estrella”. Posición completamente inmóvil. “C.” Flechas que indican la dirección de las patas después de que el grillo fue inoculado con veneno. Rectas, tiesas e inmóviles. Lo presentado en la Figura 29., también se observó para el veneno de adultas.

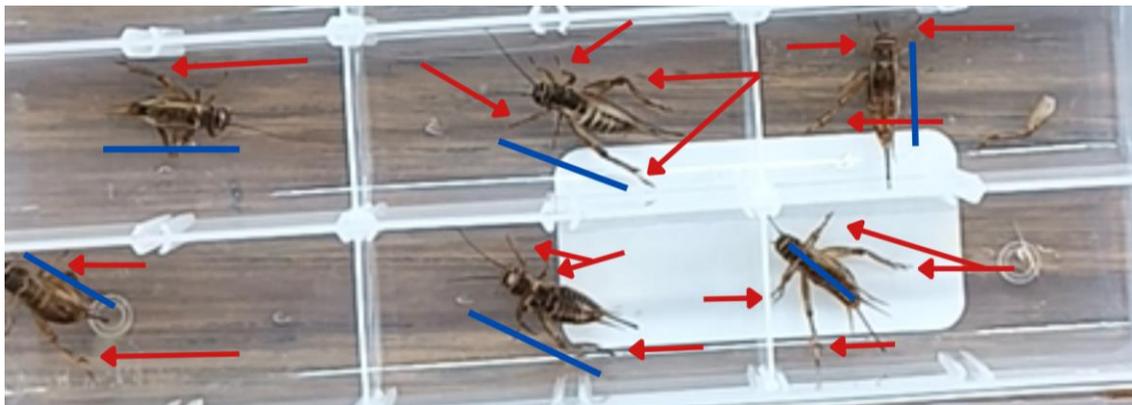


Figura 30. Posición de parálisis completa en grillos inoculados con veneno de serpiente adulta. Las **flechas rojas (→)** indican las extremidades que sufrieron espasmos o calambres, quedando totalmente rígidas. Las **líneas azules (---)** muestra la postura totalmente rígida y acalambrada del cuerpo de los grillos durante la parálisis completa. Lo presentado en la Figura 30., también fue observado para el veneno de serpientes juveniles.

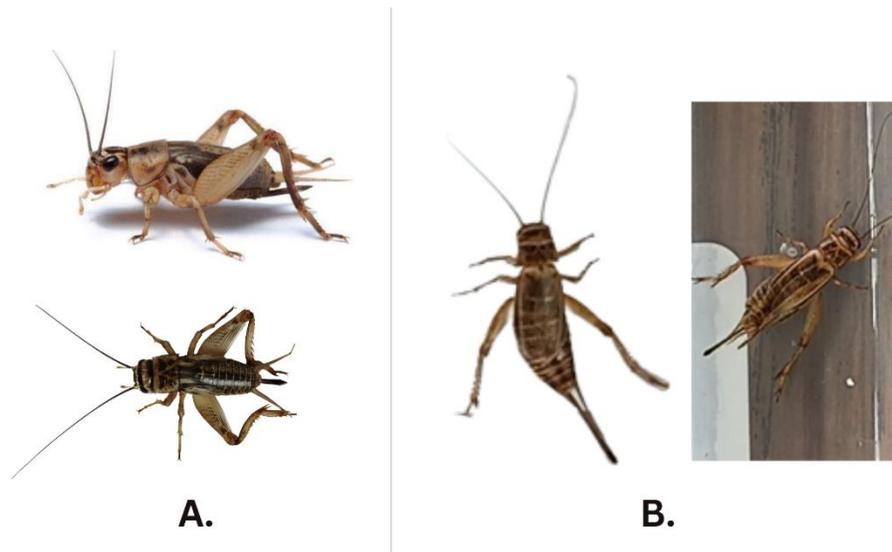


Figura 31. Comparación de la postura de un grillo sano y un grillo inoculado con veneno. “A.” Grillo sano en dos posiciones. Patas traseras dobladas, antenas paralelas entre sí, patas anteriores y medias relajadas, dobladas o acomodadas. “B.” Grillos inoculados con veneno de *M. occiduus*. Postura del cuerpo rígido, antenas dobladas en las puntas, extremidades tensas, patas traseras totalmente rectas y tiesas.



Figura 32. Agitación de patas delanteras de un grillo inoculado con veneno de serpiente juvenil. Las patas anteriores las frotaba entre sí de manera acelerada, al mismo tiempo que se rozaba la mandíbula y los palpos. Movía la cabeza y las antenas de un lado a otro de manera rápida, denotando un posible efecto en su sistema nervioso simple por parte del veneno. Este patrón etológico también se observó para el veneno de adulta. El comportamiento se observó inmediatamente después de la inyección.

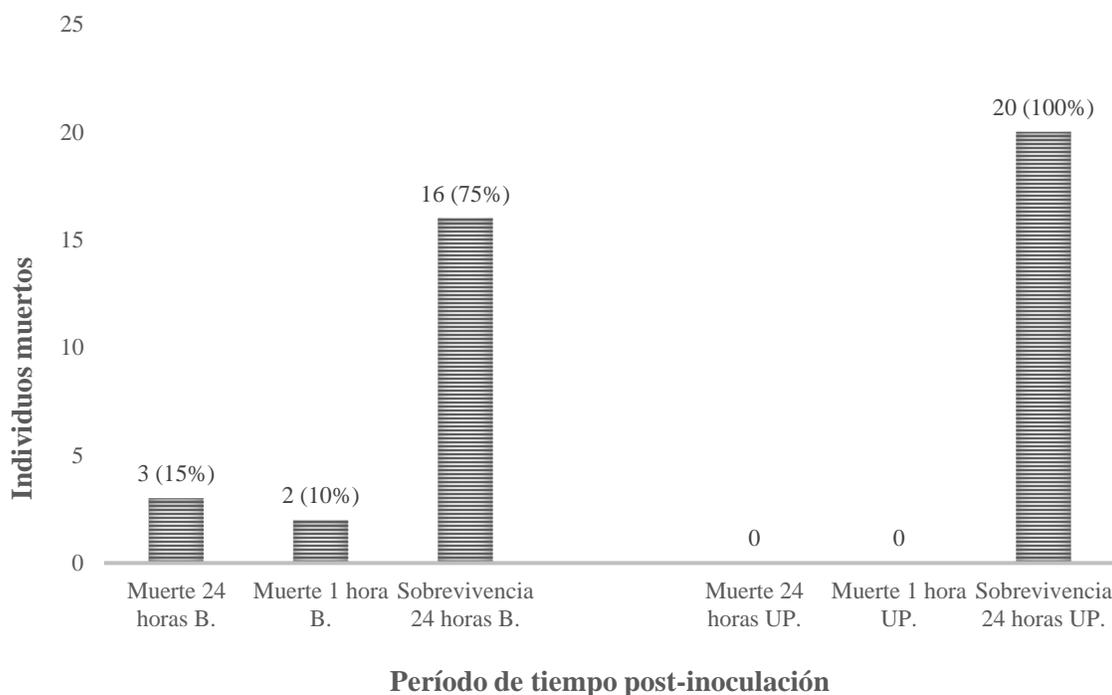
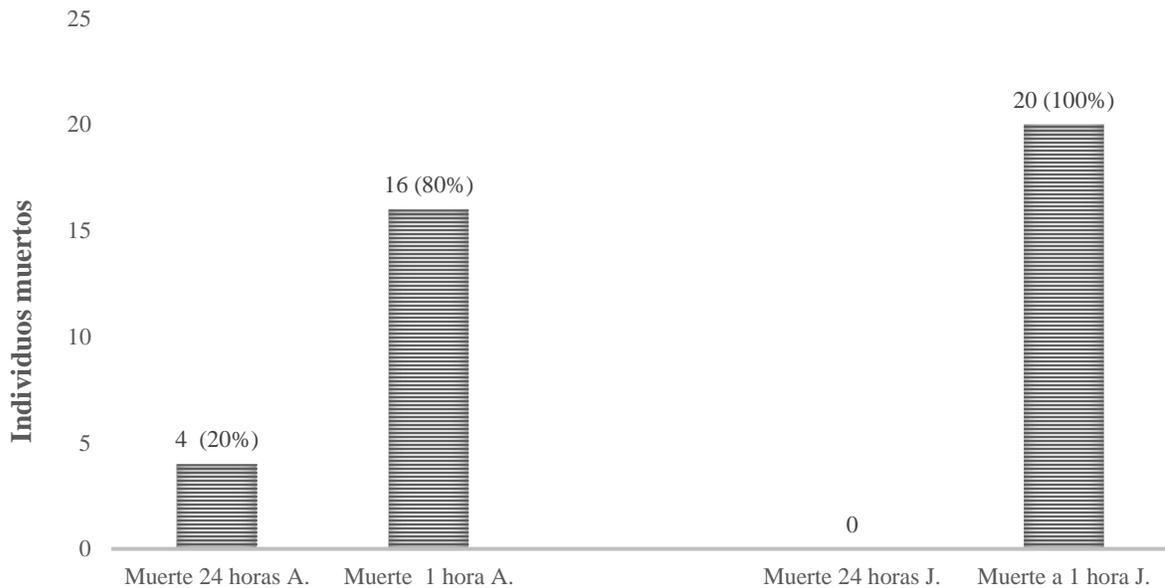


Figura 33. Mortalidad durante los periodos de post-inoculación de los individuos sometidos a experimentación con dos tipos de solventes: Agua ultrapura (“UP.”) y Buffer de fosfatos (“B.”).

En la **Figura 33.**, se observa la cantidad y el porcentaje de individuos que sobrevivieron y murieron durante los periodos de experimentación, después de ser inoculados con los dos tipos de solventes: **Agua ultrapura (UP)** y **Buffer de fosfatos (B)**. El **solvente UP** mostró el mayor porcentaje de sobrevivencia con un 100% (20/20 grillos) 24 horas después de ser inoculados. Para el **solvente B**, se obtuvo un 75% de sobrevivencia (16/20 grillos) 24 horas después de la inyección. El 15% de grillos (3/20 grillos) murió a las 24 horas de ser inoculado, y 10% (2/20 grillos) murió 1 hora después de la inyección. Los resultados obtenidos demostraron que el mejor solvente para llevar a cabo los bioensayos es el **solvente UP**.



Período de tiempo post-inoculación

Figura 34. Mortalidad durante los periodos de post-inoculación de los individuos sometidos a experimentación con las dos muestras de veneno crudo: Muestra 1: Veneno de adulto (“A.”) y Muestra 2: Veneno de juvenil (“J”).

Cuadro 9. Tiempo transcurrido para periodos de parálisis y muerte de los sujetos experimentales.

	Inicio de parálisis	Parálisis casi completa	Parálisis completa	Muerte
Veneno de adulto	4 minutos (±0.25980762)	15 minutos (±0.262741952)	30:01 minutos (±0.061101)	40 - 60 minutos (±11.5470054) **
Veneno de juvenil	3:30 minutos (±.02516611)	20 minutos (±0.03214550)	30:01 minutos (±0.0776745)	40- 60 minutos (±11.5470054) **

Nota: Los “**” indican que hubo individuos que murieron después de los 40- 60 minutos de inoculación para la muestra de adultos (24 horas después). La desviación estándar es de ±11.5470054 debido a que la mayoría de los individuos murieron a los 60 minutos (4), el resto a los 40 (2).

A partir de la **Figura 34.**, se observa que la muestra que presentó mayor porcentaje de mortalidad fue la de veneno de serpientes juveniles con una sobrevivencia del 0% de grillos. Los individuos murieron desde los 40-60 minutos post-inoculación (Cuadro 11), previo al cumplimiento de 24 horas post-inoculación. Lo anterior también se observó para la muestra de

veneno de serpientes adultas, representando un 80% (16/20 grillos) de grillos muertos del total de muestra. El 20% (4/20) grillos restante, murió hasta las 24 horas de ser inyectados con muestra. En este sentido, se observó que el porcentaje de mortalidad es mayor para el veneno de serpientes juveniles (100%: 20/20 grillos) en contraste con la muestra de veneno de adultas (80%: 16/20).

El tiempo para los periodos de parálisis y el tiempo de muerte registrados, fueron parecidos para ambas muestras. En ambos casos la parálisis completa se observó a los **30:01 minutos** aproximadamente. Asimismo, la muerte en los individuos sucedió entre los **40 a 60 minutos** de inyección, con la excepción del 20% (4/20 grillos) de individuos que murieron a las 24 horas de ser inoculados con veneno crudo de adultas. Por otro lado, el tiempo de inicio de la “Parálisis casi completa y la Parálisis completa”, varió con pocos segundos y minutos entre muestras. El veneno de juvenil presentó un menor tiempo para llegar al “Inicio de parálisis” con **3:30 minutos**, mientras que el veneno de adultos **4:00 minutos**. La diferencia para este parámetro fue de 30 segundos. La “Parálisis casi completa” la alcanzaron primero los grillos inoculados con **veneno de adultos en 15 minutos**, mientras los grillos inyectados con **veneno de juvenil** la alcanzaron a los **20 minutos**, mostrando una diferencia de **5 minutos (Ver Cuadro 9)**. Los valores de tiempo fueron tomados a individuos al azar para ambas muestras. Por lo anterior, es importante repetir el bioensayo midiendo el tiempo por individuo (20 medidas = 20 grillos). El objetivo es obtener un promedio de los periodos y tiempos de parálisis y muerte que generen datos más precisos.

2. Determinación de la DL₅₀ en los venenos.

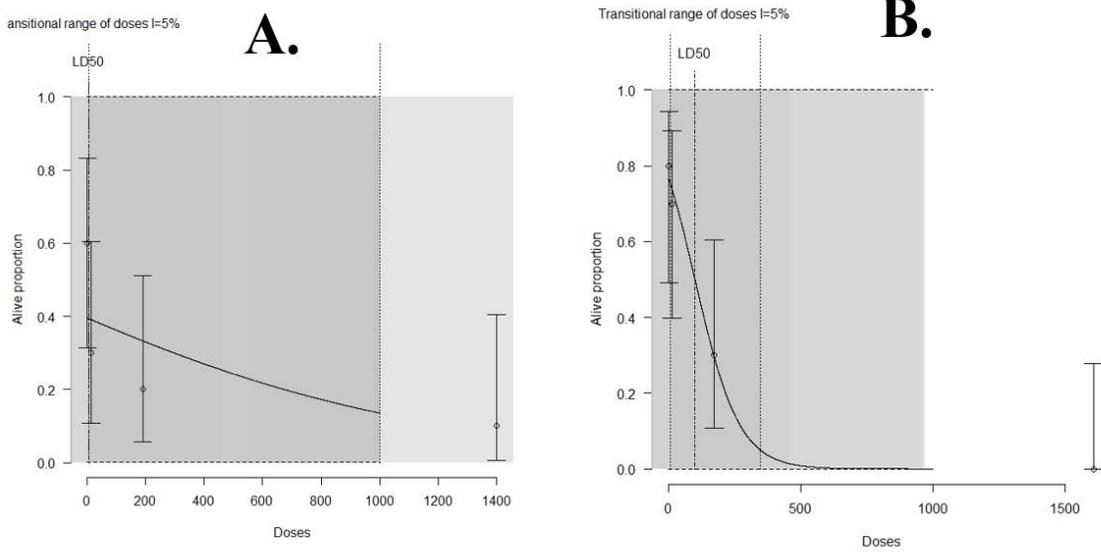


Figura 35. DL₅₀ para las muestras de veneno de serpiente. “A.” DL₅₀ para veneno de *Metlapilcoatlus occiduus* adultas; “B.” DL₅₀ para veneno de *Metlapilcoatlus occiduus* juvenil.

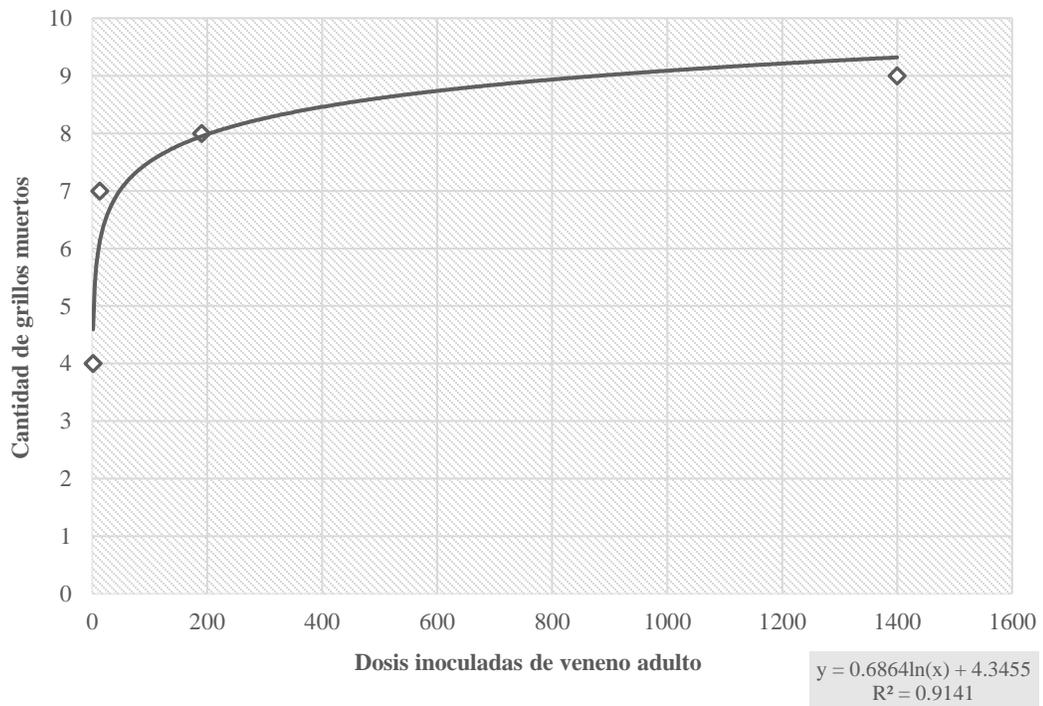


Figura 36. Cantidad de grillos muertos según la cantidad de dosis inyectada de veneno de adulto.

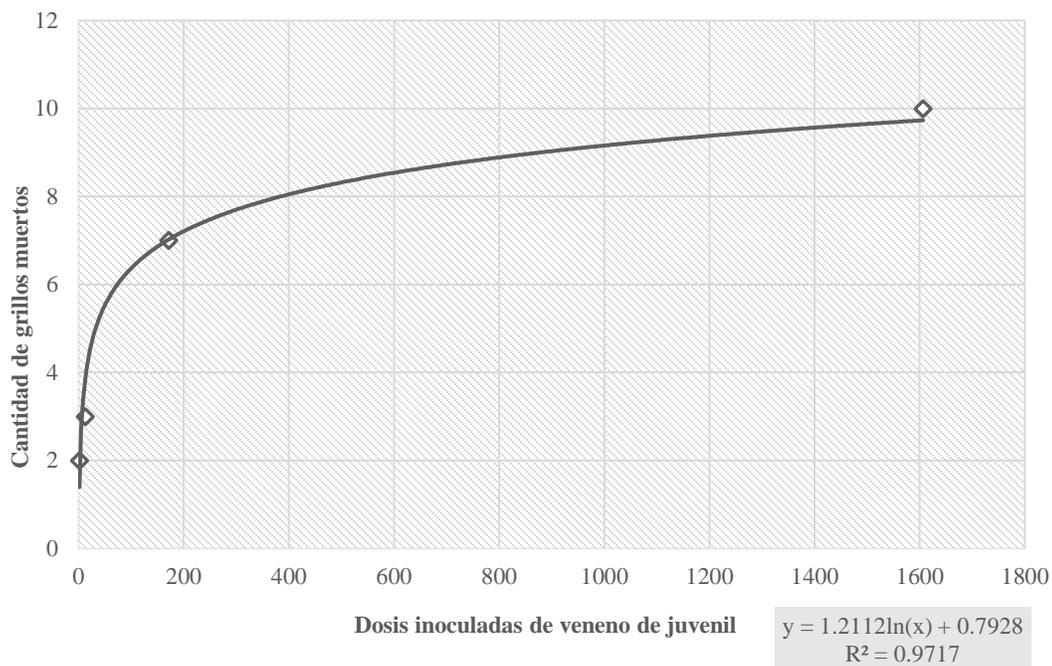


Figura 37. Cantidad de grillos muertos según la cantidad de dosis inyectada de veneno de juvenil.

Se obtuvo una DL_{50} de 99.089 mg de veneno por gramo (g) de grillo (**99.089 $\mu\text{g/g}$**) para el veneno de serpientes juveniles. Por otro lado, el veneno de serpientes adultas obtuvo una DL_{50} mucho menor, con 5.00 mg de veneno por gramo (g) de grillo (**5.00 $\mu\text{g/g}$**) (Figura 45). Contrario a la hipótesis propuesta por este estudio, se determinó que el veneno de serpientes adultas es más tóxico para los grillos que el de juveniles. Esto también puede observarse en la cantidad de individuos muertos después de las 24 horas de inoculación en ambos venenos. En adultos, se observó mayor mortalidad en dosis más bajas en contraste a los juveniles (**Figura 36 y 37**). Esto podría explicar la diferencia en la DL_{50} de ambos venenos.

Los grillos inyectados con las diluciones/dosis de las dos muestras mostraron diferentes síntomas a medida que la concentración de veneno disminuía. De esta manera, los síntomas fueron proporcionales a las dosis inyectadas. Para ambas muestras (veneno de juvenil y adulta) en la dilución 0.1 y 0.01 los grillos tuvieron síntomas similares a los presentes en la inyección de veneno crudo. Aparecieron problemas de coordinación, tensión y rigidez en el cuerpo y patas, movimiento acelerado de las patas anteriores, cabeza y antenas, la pérdida de habilidad para saltar y posterior parálisis. Sin embargo, los síntomas tardaron en aparecer más que en el bioensayo de letalidad con

veneno crudo. Una pauta etológica que apareció para estas dos diluciones en ambos venenos fue la palpitación del abdomen de los grillos post-inoculación y una inclinación hacia adelante, dejando al abdomen apuntando hacia arriba. Los grillos sobrevivientes de las diluciones para las muestras se encontraban en un estado completamente paralizado y con rigidez y/o espasmos en las extremidades. Los que podían moverse lo hacían de manera lenta y con poca coordinación. Algunos individuos perdieron líquido por espiráculos o la zona de inoculación.

En las diluciones 0.001 y 0.0001 los síntomas fueron más leves y tardaron más tiempo en aparecer en comparación al veneno crudo y las diluciones 0.1 y 0.01 en ambas muestras. Los grillos no presentaron parálisis completas o parálisis totales. En su mayoría podían moverse por la celda, e incluso saltar afuera de la caja. El frote de sus patas anteriores y movimiento de cabeza y antenas ya no fue un comportamiento frecuente en dichas diluciones. De igual manera, respondían a los estímulos de contacto del pincel y/o pinzas de manera inmediata. Sí presentaron rigidez en su patas, principalmente en las traseras. A pesar de que podían moverse, los individuos lo hacían de manera muy lenta. Los individuos que sobrevivieron 24 horas después de las inoculadas, no se encontraban paralizados, aun podían moverse, saltar y mover las antenas, aunque seguían haciéndolo de manera lenta y tosca. Algunos individuos perdieron líquido por espiráculos o la zona de inoculación.



Figura 38. Posición de grillo inmediatamente después de la inoculación de diluciones 0.1 y 0.01 para ambos venenos. La posición del abdomen apunta hacia arriba, y la zona del tórax hacia abajo.

3. Disecciones y efectos sistémicos del veneno.

Para ambas muestras de veneno crudo, se observó un notorio cambio en el tejido de los grillos una hora y veinticuatro horas después de la inyección en contraste al tejido de un grillo sano en los mismos intervalos de tiempo. Los grillos sanos presentaban órganos bien formados y ordenados

en el interior del grillo. El tejido interno y externo era de consistencia sólida, especialmente por la quitina alrededor del cuerpo de los grillos. El tórax y el abdomen permanecían firmemente pegados entre sí. En algunos casos se observó la hemolinfa de los individuos, de una consistencia líquida y color blanco o transparente alrededor de los órganos de los grillos. El color del tejido de los grillos sanos era café, blanco o marrón y de tonalidades opacas. Las patas de los grillos podían estar dobladas, relajadas o estiradas, más no rígidas y/o tiesas. Ambas observaciones fueron realizadas para el grillo de muerte inmediata y el de 24 horas después de muerte.

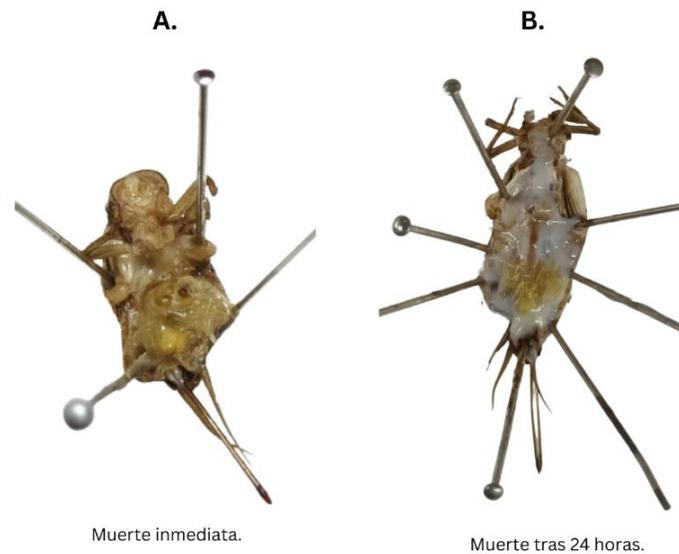


Figura 39. Disección de grillos sanos. “A.” Disección de grillo sano inmediatamente después de ser ejecutado. “B.” Disección de grillo 24 horas después de ser ejecutado.

- Una hora después de haber sido inyectados con veneno crudo.

Los grillos con veneno de juvenil mostraron un fluido espeso color amarillento y blanco opaco. De igual manera, los órganos habían perdido por completo su integridad, de manera que solo se encontraba fluido y líquidos, como si el insecto estuviera licuado por dentro en consecuencia a la actividad de las enzimas en el veneno. Por otro lado, en adultos también se observó la presencia del fluido espeso color amarillo, sin embargo, este no era tan abundante como en el caso del veneno de juveniles. Los órganos de los grillos en este caso aun mantenían su integridad, pues a pesar de que estaban frágiles, aun podían apreciarse en la disección. El color en el tejido de los grillos mostró ser ligeramente más oscuro que en el caso del veneno de juvenil, especialmente en el borde de las extremidades y el cuerpo de los individuos. En ambos casos se observó una película acuosa y transparente sobre toda la zona interna de los grillos.

Aunque ambos tejidos se encontraban frágiles, grillos inoculados con veneno de adulto presentaron tejidos con consistencias más aguadas y blandas. Esto incluso fue un problema al momento de ejecutar las disecciones, pues algunos ejemplares se partían a la mitad. En cuanto a las extremidades, antenas y la cabeza, en ambos venenos permanecieron rígidas y tensas.

- Veinticuatro horas después de haber sido inyectados con veneno crudo.

Para este periodo de tiempo, el tejido de los grillos inoculado con cualquiera de las dos muestras se encontraba completamente oscuro, indicando una probable incidencia de necrosis, mio-toxicidad y daño celular. El olor que desprendieron los grillos fue prominente y apestoso. Era un aroma rancio, ácido y fétido, indicando la descomposición de los cuerpos de los grillos. En el caso del veneno de juveniles, se observó que el tejido oscurecido predominaba en la zona central del grillo, mientras que, en el veneno de adultas, las zonas que mostraron estar más oscuras fueron el borde del cuerpo y las extremidades, aunque también se observó que la coloración oscura era homogénea en todo el interior del cuerpo en comparación del otro veneno. El tejido de los grillos con veneno de adulta siguió con la característica de estar más blando, aguado y frágil que para el otro veneno. Todo el cuerpo se encontraba quebradizo, el tórax y el abdomen se desprendían y se despedazaban las extremidades. Su consistencia parecía dirigirse hacia lo líquido, mientras que para el veneno de juveniles la apariencia era tipo gelatinosa. La película acuosa permaneció en el interior de las dos muestras. En la mayoría de los individuos, para las dos muestras de veneno se había evidenciado una pérdida casi completa o total de los órganos en el grillo. Las extremidades, cabeza y antenas permanecieron tensas y rígidas, especialmente las patas anteriores y traseras que apuntaban hacia afuera del cuerpo del insecto.

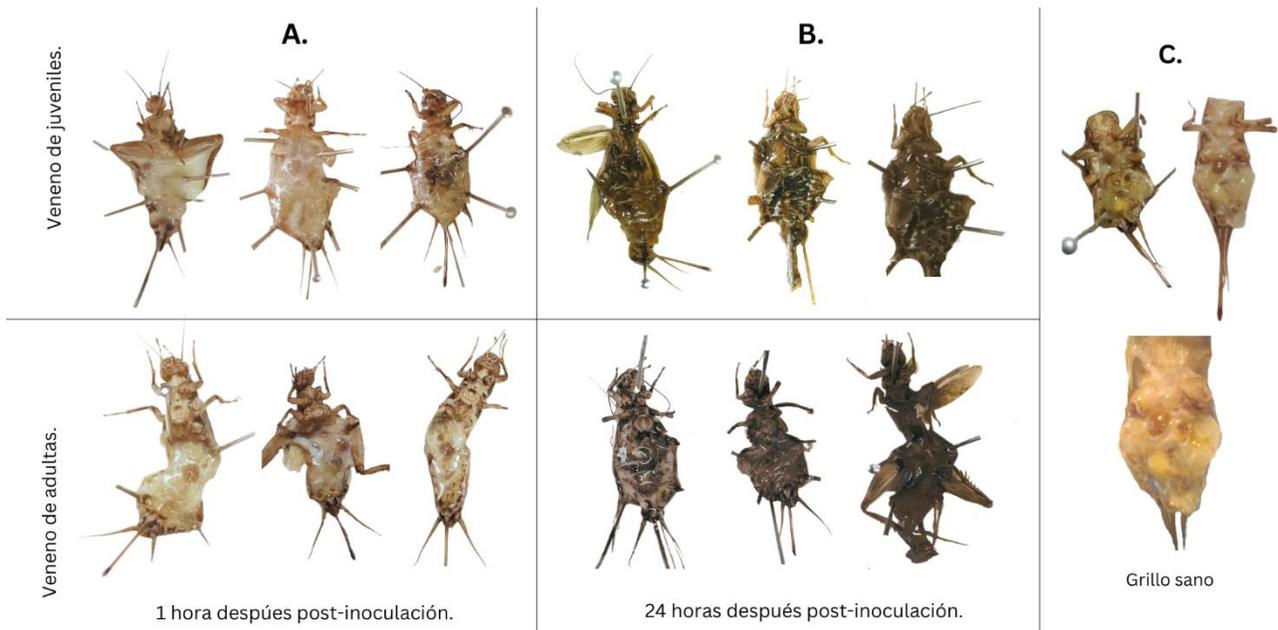


Figura 40. Efectos sistémicos y en el tejido de los sujetos experimentales tras inocular 50 μ L de veneno crudo (Ambas muestras por separado: **Muestra 1:** veneno de adulta; **Muestra 2:** veneno de juvenil. “A.” Periodo de 1 hora después post-inoculación. “B.” Periodo de 24 horas post-inoculación. “C.” Diseción de grillo sano. Muerte inmediata.

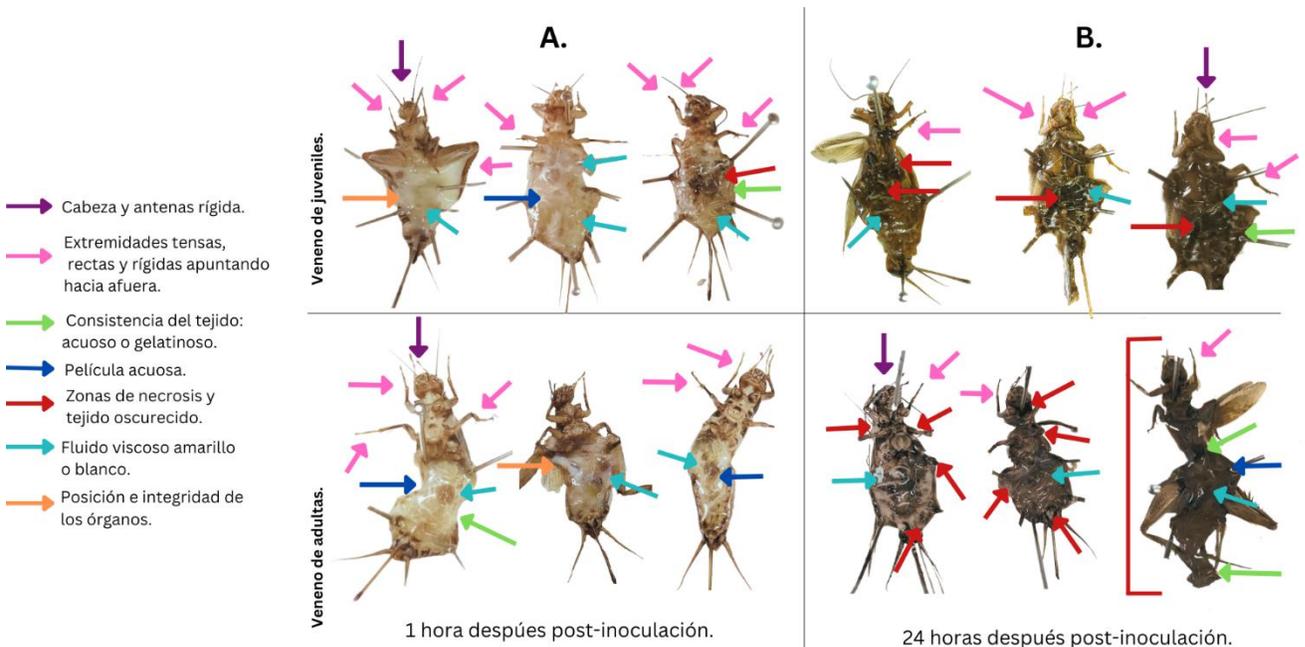


Figura 41. Señalización de los efectos sistémicos y en el tejido de los sujetos experimentales tras inocular 50 μ L de veneno crudo. Cada color en las flechas la indica la presencia de algún efecto en particular. “A.” Periodo de 1 hora después post-inoculación. “B.” Periodo de 24 horas post-inoculación.

- **Disecciones para las diluciones de DL₅₀.**

Las disecciones a los grillos se ejecutaron 24 horas después de las inoculaciones de la DL₅₀ para ambas muestras. A medida que la concentración de veneno iba disminuyendo por cada dilución, el daño interno y en el tejido del grillo era menor. En las diluciones 0.1 y 0.01 se observó el mayor daño al tejido de los grillos, mientras que en las diluciones 0.001 y 0.0001 aunque si hubo un efecto de los venenos en el interior de los grillos, la integridad del cuerpo era más similar al de un grillo sano. En estas disecciones fue más evidente la diferencia del efecto del veneno de juvenil y adulta en el organismo de los grillos, probablemente porque se inyectó una menor proporción de veneno en los insectos. Las diluciones inyectadas que mostraron ser más dañinas en los grillos fueron las del veneno de serpiente adulta.

- **Efectos de la dilución 0.1.**

Se ve una abundante presencia de fluido viscoso y amarillento, siendo esta la hemolinfa alterada por la presencia del veneno en el cuerpo del grillo. Asimismo, puede verse que el tejido de los grillos se encuentra con una consistencia acuosa y sumamente frágil, provocando incluso que el tórax y el abdomen se desprendan en comparación con el veneno de juvenil en donde no se observa lo mismo. La zona de necrosis y oscurecimiento del tejido se nota en todo el cuerpo del grillo para el veneno de adulta, mientras que para el veneno de juvenil predomina en el lateral del abdomen exclusivamente. Aunque se observa que en veneno de juveniles hubo una pérdida de integridad en los órganos y su posición, para el veneno de adulta este patrón es más prominente, pues los órganos son muy poco visibles y se pierden con la consistencia tipo “licuada” del interior del grillo. La película acuosa sobre el interior de los órganos y tejido de los grillos permanece presente para los dos tipos de muestra.

- **Efectos de dilución 0.01.**

Se sigue observando la presencia abundante de fluido viscoso en el interior de los grillos inoculados con veneno de adulta, en contraste a la otra muestra. Sin embargo, para esta dilución dicho fluido presenta un color blanco o transparente más que amarillo. Para las dos muestras, es notable que el efecto de narcosis disminuyó, pues ya no se observa un evidente y prominente oscurecimiento en el tejido o en las zonas internas del insecto. Sin embargo, esto no indica que el efecto de necrosis y daño celular haya desaparecido, pues puede apreciarse que aún permanece el color marrón oscuro en el tejido, cutícula y epidermis de los grillos, diferente al que posee un grillo sano. La consistencia del tejido se tornó a blanda y no acuosa para el veneno de adulta, aunque sigue siendo más débil que el tejido de los grillos con veneno de juvenil, el

cual presenta una consistencia menos blanda, gelatinosa y flexible. La integridad de los órganos para esta dilución es muy similar para ambos venenos. Se observa una mejor composición, forma y posición de algunos órganos a diferencia de la dilución 0.1 y el veneno crudo. Sin embargo, en ambos casos aún siguen mezclándose con los fluidos en el interior de los grillos, impidiendo que se aprecien en su totalidad como en el caso de los grillos sanos. La película acuosa sobre órganos y tejidos del interior de los grillos permanece para ambas muestras en esta dilución.

- **Efectos dilución 0.001.**

La consistencia de la epidermis y el tejido de los grillos adquirió una consistencia más compacta, aunque la de los grillos con veneno de adulta seguía más blanda y suave que la otra muestra. Para esta dilución, el fluido viscoso había desaparecido en ambas muestras de veneno, y solo permanecía la película acuosa sobre los órganos y el interior de los grillos. Para el veneno de juvenil se observó un color marrón en el interior del grillo, mientras que para el veneno de adulta las coloraciones predominantes fueron el blanco, amarillo y café claro. Parecía que la necrosis había desaparecido en ambos casos, pues ya no hubo un oscurecimiento en el interior de los grillos o en la epidermis, aunque no puede afirmarse en su totalidad hasta hacer cortes histológicos y revisar las células en un microscopio. Las extremidades, antenas y cabeza para esta dilución ya no se encontraban tensas ni rígidas, si no dobladas o relajados. La integridad y forma de los órganos fue mejor que en las diluciones 0.1, 0.01 y veneno crudo, pero aun así seguían fusionados entre sí y con el fluidos internos de los grillos, denotando que el veneno seguía ejerciendo efectos en estos.

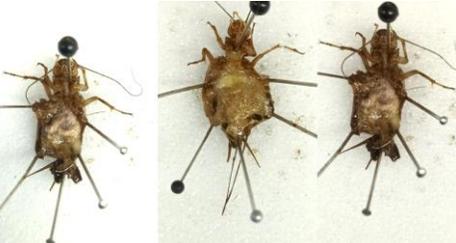
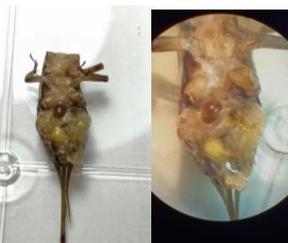
Efecto de la dilución 0.0001.

La integridad de los órganos para la dilución 0.0001 para el veneno de juveniles mostró ser similar a las de un grillo sano. En este punto podía apreciarse la forma y posición de estos. Sin embargo, aún era evidente el daño provocado por el veneno, pues estos presentaban una color grisácea y café, cuestión que no se observa en un grillo sano. Encima de los órganos se observó una fibra blanca, parecido al sistema nervioso ventral del insecto. Esta también se visualizó para el veneno de adulto, pero se encontraba en la zona lateral fusionada con el fluido de los grillos. El color oscuro del tejido interno y la epidermis del grillo ya no era evidente, ya que las coloraciones predominantes eran marrón, café y blanco para el veneno de juvenil, pues los grillos con la otra muestra presentaban un color más oscuro marrón y/o cobrizo en la parte interna. Por otro lado, para el veneno de adulto la integridad y forma de los órganos seguía

afectada. Estos seguían fusionados entre sí junto con el fluido dentro del grillo, aunque si eran más visibles que en el resto de las diluciones y veneno crudo. El tejido seguía viéndose acuoso, con un poco de fluido viscoso color grisáceo, amarillo y café. La consistencia del tejido y cutícula en ambas muestras de veneno era menos blanda que el de diluciones anteriores y veneno crudo. Sin embargo, para el veneno de adulta, el tejido seguía permaneciendo más frágil y blando que el de veneno de juvenil.

El **Cuadro 14** compara los efectos sistémicos y en el tejido del veneno crudo, las diluciones de las muestras de veneno de adulta y juvenil y el sistema de grillos sano sin ningún tipo de inyección (control).

Cuadro 10. Efectos sistémicos y en el tejido de los sujetos experimentales tras la inoculación de las distintas diluciones para las dos muestras de veneno: adulta y juvenil.

Tratamiento	Juveniles	Adultas	Grillo sano
Veneno crudo			
0.1			
0.01			
0.001			
0.0001			

VIII. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

A. Análisis y caracterización biológica del veneno de *Metlapilcoatlus occiduus*.

1. Cuantificación de proteínas de Bradford.

La curva de Bradford generada obtuvo la ecuación de la recta $y = 2839.5x - 331.42$. El R^2 tuvo un valor de **0.9831**, indicando precisión en la ecuación y la curva. A partir del bioensayo colorimétrico de Bradford, se determinó que la concentración proteica para el veneno de juveniles fue de 125.58 $\mu\text{g/mL}$ y para adultas 131.06 $\mu\text{g/mL}$. La concentración de proteínas del veneno de serpientes adultas pareciera ser ligeramente más alta que la de juveniles, con una diferencia de 5.48 $\mu\text{g/mL}$. Debido a que el valor anterior no parece ser significativo para ambas muestras, es posible considerar que la concentración proteica para ambos venenos fue muy similar. Los valores anteriores variaron en comparación a los valores de otros miembros de la familia Viperidae. Ambas muestras presentaron una concentración mayor de proteínas en contraste a *Crotalus durissus* con 78.1 $\mu\text{g/mL}$ y *Bothrocophias myersi* con 108.6 $\mu\text{g/mL}$ y *Bothrops asper* con 74.1 $\mu\text{g/mL}$ (Scovino, *et al.*, 2020). Por otro lado, los valores obtenidos fueron menores a los de *Agkistrodon contortrix* con 152.229 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Bocian, *et al.*, 2020). Los valores anteriormente mencionados son estrictamente de víboras adultas, de manera que no son comparables con el valor de 125.58 $\mu\text{g/mL}$ del veneno de juveniles de *M.occiduus*. Cabe mencionar que el valor de la cuantificación proteica en los venenos no denota el nivel de letalidad, sino más bien la proporción y cantidad de moléculas proteicas en la secreción (Caswell, *et al.*, 2014).

2. Proteínas presentes en las muestras de venenos SDS PAGE.

Las familias proteicas representando las bandas de los geles, se identificaron a partir de su peso molecular. Este era comparado con datos reportados previamente en literatura (**Cuadro 8**). Por lo anterior, una misma banda en los geles, puede representar más de un tipo proteína. En este sentido, los resultados obtenidos son un acercamiento de las posibles familias proteicas presentes en el veneno de *M.occidus* adultas y juveniles. Para tener más precisión y establecer con exactitud que proteínas contienen las secreciones, es necesario

complementar con otros tipos de bioensayos como espectrofotometría de masas, análisis de proteómica, actividad molecular, Western Blot, o incluso transcriptómica y secuenciación.

A partir del bioensayo de SDS- PAGE, se determinó que el veneno de adulto de *M.occiduus* tiene aproximadamente nueve tipos y/o familias de proteínas. El veneno de juveniles mostró un total de cinco bandas formadas, mostrando una diferencia de cuatro proteínas en comparación al veneno de adulto. De este modo, parecía que el veneno de adultos tenía una mayor cantidad de proteínas. Según el promedio del peso molecular obtenido de cada banda, se determinó que las proteínas en el veneno de adultos fueron SVMPs de tipo P II y III, SVSPs, LAAOs (monómero), PLA₂ de secreción, desintegrina/inhibidor tipo Kunitz y miotoxinas. Las bandas de mayor intensidad y tamaño fueron la **1** con **SVMPs PIII**, **4** con **SVMPs PII**, **6** y **7** con **PLA₂** y la **8** con **Inhibidor tipo Kunitz/Desintegrinas**. Esto tiene sentido considerando que dichas proteínas y enzimas están dirigidas a generar efectos hemotóxicos, miotóxicos, daños epidérmicos y parálisis en mamíferos, alimento principal de las víboras *M.occiduus* en etapa adulta (Guérico, *et al.*, 2005; Fry, 2015).

En el veneno de juveniles, las proteínas identificadas en las bandas fueron SVMPs PI, PIII y PIII, LAAOs (monómero), CRSP y PLA₂. Las bandas más intensas y de mayor tamaño para esta muestra fueron la **1** con **SVMPs PIII**, **3** con **SVMPs PII** y **5** con **PLA₂**. Lo anterior, fue similar a lo observado en el veneno de víboras adultas, no solo porque son las proteínas que tienen en común ambas muestras, sino también porque las características de las bandas indican que las SVMPs III, II, y PLA₂ son de las proteínas más abundantes en ambos venenos. La presencia y alta concentración de las proteínas de la banda 1, 3 y 5 parecidas al veneno de adulta, podría indicar que la secreción se encuentra en una etapa de “transición” hacia “un veneno de víbora adulta”. Esto se debe a que las víboras en etapa juvenil (18-20 meses) comienzan el cambio de dieta de neonato hacia lo que estarán consumiendo durante el resto de su etapa adulta, seleccionando mamíferos y/o aves en vez de reptiles y/o anfibios o invertebrados como insectos. Por ello, es indispensable que comiencen a sintetizarse las proteínas PLA₂ y SVMPs, las cuales inducirán el daño fisiológico para someter a su nuevo tipo de presa. Esto sigue teniendo sentido considerando

que en el veneno de juveniles aún no se detectan SVSPs, proteínas que podría sintetizarse más adelante mientras el veneno va adquiriendo más selectividad hacia presas como mamíferos y/o aves. Los resultados, coinciden con lo observado en cautiverio, en donde las víboras juveniles ya comenzaban a alimentarlas con crías de roedores y ya no aceptaban grillos. En literatura también se menciona que en la etapa juvenil otras especies de víboras como del género *Crotalus* sp., o *Bothrops* sp., se alimentan de pequeños vertebrados, presentando proteínas en común con el veneno de adultos de su especie (Guérico, *et al.*, 2017). Es en la etapa de neonatos es donde se muestra de manera más evidente la variación proteica en el veneno de las víboras (Borja, *et al.*, 2018; Neri y Ponce, 2018; García, *et al.* 2020).

En las dos muestras para la banda 2 se identificaron la proteína SVMPs o LAAOs (monómero). Lo más probable es que sea la proteína LAAOs (monómero), debido a al color amarillo transparente del veneno de ambas muestras que es causado por la presencia de esta molécula (Olivera, *et al.*, 2021). Asimismo, el peso molecular de ambas bandas coincide con el reportado en literatura para la proteína en su forma de monómero, que va desde 50 a 70 kDa (Costa, *et al.* 2014; Xiao, *et al.*, 2017; Hiu, *et al.*, 2022). Además, las LAAOs se han reportado en el veneno de otros miembros de la familia Viperidae, por sus actividades biológicas en la presa como la generación de edemas, miotoxicidad y citotoxicidad (Costal, *et al.*, 2019).

Debido a que la composición del veneno de algunas serpientes, tiende a cambiar por las presiones ambientales como dieta, dimorfismo sexual, distribución geográfica, entre otras, es necesario hacer este estudio toxinológico del veneno de *M.occiduus* en víboras silvestres. Debido a la sensibilidad del veneno de serpientes al cambio ambiental (Borja, *et al.*, 2018), es posible que el estado en cautiverio y el alimento que consumían en dicho sitio haya influido sobre el coctel proteico del veneno de las serpientes. Las serpientes en cautiverio y de vida silvestre, no comparten las mismas condiciones ambientales. Por ello en literatura previa, se ha reportado y sugerido que la composición proteica puede variar de manera intraespecífica (juveniles y/o adultas) en las especies a partir de los cambios en dieta, manipulación, ambientación de recintos y estrés en cautiverio, en contraste a

individuos silvestres que no comparten esas condiciones (Olivera, *et al.*, 2021; Nie, *et al.*, 2022). Es necesario seguir investigando que tipo de dieta tienen las serpientes silvestres de *M.occiduus* adultas y juveniles, para poder correlacionar con precisión la presencia de ciertas proteínas en su veneno con su dieta, o bien si esto puede verse alterado por un estado en cautiverio.

Para evaluar con precisión el cambio ontológico en el veneno de *M.occiduus*, debe incluirse la caracterización del veneno de *M.occiduus* en etapa de neonatos. Se ha reportado que para el género *Metlapilcoatlus* y *Crotalus* los perfiles proteicos entre neonatos y adultos muestran diferencias significativas por la diferencia marcada en la dieta (Durban, *et al.*, 2017; García, *et al.*, 2020). Debido a que se sabe poco de la dieta en vida silvestre de *M.occiduus*, es importante completar el presente estudio con la información de la dieta y biología en la etapa neonato de la serpiente, con el fin de establecer un perfil más claro de la variación del veneno en las serpientes dirigido por la dieta. Lo anterior puede completarse con estudios *DNA bar-coding* de muestras de heces de la especie en sus diferentes etapas de crecimiento. Con esto se puede determinar qué grupo de presas son las principales dentro de la dieta de la serpiente a partir de secuenciación de ADN

Aunque se logró identificar el patrón de bandas con la plataforma virtual *Gel Analyzer*, es recomendable repetir el bioensayo especialmente para el veneno de las víboras juveniles. Las bandas en general se ven difusas, alargadas, con ondas o el pozo manchado. Esto podría indicar que las muestras aún siguen muy concentradas con veneno, o bien que el sistema de electroforesis podría estar fallando en cuestiones de voltaje y/o amperaje. Lo recomendable es mantener la corrida de 35 -60 minutos a voltaje constante entre 150 a 200 (Laemli, 1970; Brunelle y Green 2014). En este bioensayo, los geles se corrieron más de 60 minutos, lo cual pudo influir en la malformación de las bandas en el SDS PAGE. Al mismo tiempo, la calidad de las bandas para ambos venenos podría mejorar con el uso de geles SDS-PAGE tamaño XL, lo cual permitirá determinar con mayor precisión los tamaños y el desplazamiento de las proteínas en el gel.

B. Bioensayos e inoculación de venenos en grillos domésticos (*A. domesticus*)

1. Etología y efectos sistémicos de los solventes y veneno en los grillos.

Para el solvente de PBS se obtuvo una mortalidad del 25% en los individuos. Esta solución es bien conocida por su uso en procedimientos bioquímicos, pues su osmolaridad, pH y concentración de iones (Cl^- , Na^+ y K^+) es muy parecida a la del líquido extracelular de los mamíferos (UASLP, 2008). En estudios de genética, moleculares y de microbiología, se ha utilizado el PBS como solvente o medio para células aisladas de insectos.

El Buffer ha demostrado ser eficiente para mantener la osmolaridad del medio, así como la integridad de las células (Rosinski, *et al.*, 2000; Thongjued, *et al.*, 2019). Sin embargo, esto solo se ha visto al momento de suspender las células de los insectos en un medio con PBS, por lo que inyectarlo en el organismo del grillo pudo haber alterado la osmolaridad de las células y/o la hemolinfa, causando la muerte de algunos ejemplares (Thongjued, *et al.*, 2019). Esto cobra sentido considerando la sensibilidad de las células y la hemolinfa de algunos que los iones más abundantes de la hemolinfa en los insectos del grupo Exopterygota poseen altas concentraciones de sodio y magnesio, cuestión que puede alterar osmolaridades al encontrarse con iones Cl^- del PBS (Kanost, *et al.*, 2009).

Debe considerarse que el volumen de PBS que se usa en los bioensayos de genética y microbiología suele ser de 20 μL (Thongjued, *et al.*, 2019). En este estudio, se inyectaron 50 μL de PBS 1x. Disminuir el volumen de PBS inyectado es una solución para evaluar si este factor tuvo efecto sobre la muerte de algunos ejemplares. Por otro lado, es posible que la temperatura del buffer PBS inoculado haya generado efectos sobre el sistema de los grillos. Estudios han reportado que la hemolinfa y los metabolitos dentro de las células de algunos insectos son sensibles al cambio de temperatura, especialmente a las frías. Esto provoca pérdida de iones extracelulares y la homeostasis del agua del organismo, lo cual conduce a lesiones por frío y luego la muerte (Olsson, *et al.* 2016). Los grupos tolerantes al frío se caracterizan por una hemolinfa con una concentración más baja de Na^+ , ya que mejora la homeostasis de iones y agua durante la exposición a estas temperaturas. Ortóptera

forma parte de uno de estos grupos tolerantes a temperaturas frías (varía entre especies, géneros, familias) (Toxopeus, *et al.*, 2019; Olsson, *et al.*, 2016). El buffer PBS fue inyectado a una temperatura de -20-25°C recién sacado de la refrigeradora. Tomando en cuenta lo anterior, la sensibilidad a las bajas temperaturas de las células y hemolinfa en conjunto con las contracciones variadas de iones dentro de los grillos, pudieron provocar un desbalance iónico al combinarse con la composición y concentración iónica del buffer PBS.

El agua UP fue el solvente que presentó 100% de sobrevivencia en los individuos tras 24 horas de ser inoculada, mostrando que no genera ningún efecto negativo sobre el sistema de los grillos. Al mismo tiempo denotó que no estaba ejerciendo ninguna alteración sistémica en los sujetos de estudio, por lo que se pudo asegurar que los efectos observados en las diluciones experimentales, eran causadas meramente por el veneno de víboras *M.occiduus*. Lo encontrado coincide con lo reportado por Heep, *et al.*, 2019, en donde utilizan como control negativo inyecciones de agua destilada en pulgones sin ningún efecto sistémico negativo o muerte (Heep, *et al.*,2019)

Aunque se esperaban distintos patrones etológicos post-inoculación en los grillos para ambas muestras, las pautas de comportamiento fueron muy similares. Esto indicó que las proteínas del veneno tenían una acción biológica similar, al menos en invertebrados. El comportamiento denotó un daño sistémico evidente, principalmente por los movimientos acelerados, nerviosos y en éxtasis mostrados por los grillos. Entre ellos el que más resaltó fue la frotación acelerada de las patas frontales junto con el movimiento de cabeza y antenas. Esto se le conoce como “parálisis excitatoria”, comportamiento que también se ha reportado en grillos envenenados con secreciones de arañas insectívoras (Zobel, *et al.*, 2019). Este daño sistémico puede atribuirse a las proteínas CRISP identificadas en el veneno de juveniles, las cuales comúnmente se encuentran en venenos de otras especies de serpientes formando parte de la subfamilia CRISP-3. La razón, se debe a sus sitios conservados, sus dominios y/o su N-terminal que son ricos en cisteína. Esta característica genera problemas en los canales de sodio-potasio y/o calcio de las células, produciendo diversos tipos de parálisis según el “blanco” de las CRISPs. En este sentido, la presencia

de dicha molécula pudo haber afectado la coordinación de los grillos causando las pautas de comportamiento excitatorias. Esto coincide con literatura previa, en donde se demostró que CRISP bloquea los canales iónicos de Ca^{+} y K^{+} y alteró la contracción muscular en grillos y cucarachas (Osipov, *et al.*, 2005; Adade, *et al.*, 2014).

Para el caso de los adultos, los causantes de esta actividad pudieron ser los inhibidores de Kunitz, que igualmente poseen sitios conservados y dominios de cisteína como el caso de CRISP. Aunque están involucrados en otras acciones fisiológicas como coagulación de sangre, fibrinólisis, e inflamación, también tienen efectos sobre el bloqueo o alteración de los canales iónicos celulares (Hernández, *et al.*, 2019). Considerando que los geles SDS-PAGE son un acercamiento de las proteínas en el veneno de las serpientes, es posible pensar que en realidad ambas muestras poseen CRISPs e inhibidores de Kunitz al mismo tiempo. La sintomatología del veneno inoculado se da a partir de un grupo de proteínas generando efectos biológicos en conjunto más que de manera individual (Fry, 2015). Por ello es necesario complementar con otro tipo de análisis proteómicos que determinen con precisión que proteínas contienen las secreciones de *M. occiduus*. Aparte de sus alteraciones a nivel de hemostasis y en el tejido celular, las serinas proteasas también han mostrado efectos en el sistema nervioso y muerte neuronal. Por eso, podría hipotetizarse que en el veneno de adultos estas también estuvieron involucradas, ya que la banda 5 de SDS-PAGE denota la presencia de esta familia proteica. Sin embargo, esto solo ha sido demostrado para mamíferos, por lo que no se sabe si este tipo de acción es también aplicable para invertebrados (Ceña, *et al.*, 2004).

El efecto de los canales iónicos causado por CRISP e inhibidoras de Kunitz, también se evidencia en la parálisis flácida y rígida en los grillos segundos después de la inyección. La parálisis flácida fue la primera en aparecer. Los grillos se volvieron mucho más lentos, y perdieron por completo la habilidad de saltar al mismo tiempo que se debilitaron y su cuerpo se tornó blando. Entre los 3:30- 4:00 minutos comenzó a iniciar el proceso de inmovilización, en donde predominó la parálisis rígida hasta las 24 horas post-inoculación. Los grillos tomaron una postura completamente inflexible, con una posición recta con patas, cabeza y antenas extendida en forma de estrella. Esta misma postura se observó

también para grillos inyectados con veneno de la araña insectívora *Physocyclus mexicanus*, causado por la alta concentración de metaloproteasas en su veneno, las cuales también pueden ejercer este tipo de efectos en las víctimas. En este estudio, las proteínas más abundantes son las metaloproteasas para ambos venenos, por lo que se podría pensar que dichas proteínas también causaron la parálisis rígida. Además, fuera del grupo de arácnidos, se han detectado metaloproteasas análogas a las de *P. mexicanus* que causan la parálisis rígida como la Neprilisina en *Crotalus horridus* (Rokyta *et al.*, 2013,2015), y cobras *Naja kaouthia* (Tan *et al.*, 2017). Algunas metaloproteasas afectan eventos de señalización en la superficie celular, metabolizan reguladores péptidos (Turner, *et al.*, 2001; Zobel, *et al.*, 2019), degradan matrices celulares alrededor de la sinapsis y facilitan el ingreso de toxinas a los objetivos celulares (Zobel, *et al.*, 2019).

En ambos casos, el comportamiento de parálisis, inmovilización, descoordinación y ralentización de cualquier movimiento, podrían indicar cierto grado de selectividad del veneno de *M.occiduus* tanto de juvenil como de adulta para insectos. Esto debido a que la secreción cumple con el objetivo de someter a la presa en poco tiempo y evitar su fuga. Además, el comportamiento observado en los grillos post-inoculación de veneno, es similar al descrito para artrópodos insectívoros que poseen venenos dirigidos a dichas presas, el cual utilizan para capturarlos, matarlos y/o digerirlos (Zobel, *et al.*, 2019). Aunque son pocos los grupos, ya se han observado serpientes venenosas y no venenosas que consumen artrópodos como parte de su dieta incluso en su etapa adulta. Este es el caso del género *Vipera*, que tienen a miembros del grupo Ortóptera como parte principal de su dieta, por lo que se ha reportado que su veneno es muy tóxico para grillos del género *Gryllus* (Starkov, *et al.*, 2007). Al igual que las víboras de este género, es probable que la dieta de *M.occiduus* en etapa adulta sea igual de variada que la de *Vipera* sp., considerando que es una especie generalista y rastrera de hojarasca, troncos y madrigueras. En este sentido, la dieta podría ir desde artrópodos, herpeto-fauna, aves hasta mamíferos. Esto explicaría el efecto de las diferentes parálisis a nivel sistémico de su veneno en los grillos. La misma lógica puede ser aplicada a las víboras juveniles de *M.occiduus*, quienes también podrían seguir alimentándose de artrópodos a la vez que comienzan a consumir un nuevo grupo de presas (mamíferos, aves), lo cual explicaría la producción de “nuevos tipos” de proteínas y

enzimas en su veneno dirigidas a vertebrados. Además, los geles SDS-PAGE mostraron la presencia de una variedad de proteínas, en donde algunas eran dirigidas hacia animales endotérmicos como el caso de las PLA₂ y SVMPs, y las otras a animales ectotérmicos como CRSP y SVSPs (Nie, *et al.*, 2022). Esto es similar a lo observado en víboras juveniles/neonatos de *M.nummifer* y elápidos como *Naja atra* (García, *et al.*, 2020; Nie, *et al.*, 2022). De esta manera, se podría sugerir que la especie *M.occiduus* no tiene dietas distintas y específicas a medida que pasa por sus etapas de crecimiento como el caso de otras víboras, sino más bien su dieta comienza a adquirir variedad a medida que se convierte en adulto. Lo anterior tiene sentido si se considera que otro factor por el cual las serpientes varían su dieta a nivel ontológico, es meramente por sus diferentes tamaños en cada etapa de crecimiento. El tamaño de la serpiente suele ser proporcional a lo que tienen la capacidad de consumir, tragar y digerir. Como otras víboras, los neonatos de *M.occiduus* miden alrededor de 10-20 cm, por lo que tienen la capacidad de consumir presas muy pequeñas como insectos (grillos). En la etapa juvenil, su tamaño aumenta junto con las necesidades nutricionales, por lo que ya comienzan a consumir presas pequeñas-medianas (crías de roedores-aves, roedores muy pequeños, etc.) con mayores valores nutricionales, sin necesariamente dejar de consumir insectos. En la etapa adulta, vuelve a suceder el mismo patrón, y ya tienen la capacidad de alimentarse de más tipos de presas desde medianas a grandes, sin eliminar a los artrópodos por completo. Sin embargo, es probable que en su etapa adulta prefieran alimentarse de vertebrados como mamíferos medianos o grandes, siendo esta su “dieta principal” sobre los insectos.

2. LD₅₀ y porcentaje de mortalidad.

Contrario a la hipótesis propuesta para este estudio, se determinó que la DL₅₀ para grillos de las víboras adultas de *M.occiduus* es menor que la de juveniles. Las víboras adultas obtuvieron un valor de DL₅₀ de 5.00 µg/g, mientras las juveniles 99.089 µg/g, indicando que el veneno de adulta es más tóxico en menores cantidades en grillos. Usualmente la DL₅₀ de neonatos y juveniles tienden a ser menores que la de los adultos. Esto se cumple para otras especies de víbora como *Bothrops asper*, *B. atrox*, *Crotalus atrox*, *C. durissus durissus*, *C. molossus nigrescens*, *C. simus* y *C. polystictus* (García, *et al.*, 2020). Sin embargo, los valores de DL₅₀ pueden depender de factores como el tipo de

modelo empleado durante los bioensayos o el tipo de alimentación de la serpiente. En este sentido, se espera que los valores DL_{50} en el veneno sean bajos para modelos animales que forman parte de la dieta de las serpientes. Esto se observa con *Metlapilcoatlus nummifer* y *Crotalus oreganus concolor*, en donde las DL_{50} para juveniles es mayor que la de adultos en roedores, indicando una mayor toxicidad por parte del veneno de adulto hacia los mamíferos, pues este grupo forman parte principal de su dieta mientras que los neonatos solo comen animales ectotérmicos (Mackessy, *et al.*, 2003; García, *et al.*, 2020). Siguiendo esta lógica, el valor de DL_{50} en *M.occiduus* adultas, puede estar relacionado con el hecho que los insectos siguen formando parte de su dieta en dicha etapa, lo cual tiene sentido según las pautas de comportamiento observadas en los grillos post-inoculación de este veneno crudo. Además, el resultado es muy similar con lo reportado por Lang, *et al.*, 2020 para la serpiente *Vipera ursinii*, una especie de víbora que tiene a los ortópteros como parte de su dieta, presentando una DL_{50} de 9.8 $\mu\text{g/g}$ de su veneno en *Gryllus assimilis*.

También se observan DL_{50} bajas para otras especies del género que también comen insectos, como *V. lotievi* con 17.4 $\mu\text{g/g}$ y *V. renardi* con 19.3 $\mu\text{g/g}$ (Starkov, *et al.*, 2007). En los tres casos, se evidencia una selectividad activa del veneno hacia insectos, puesto que las DL_{50} son mayores en roedores, indicando la preferencia de las serpientes por artrópodos. Asimismo, se ha evidenciado que *Bothrops insularis* posee valores de DL_{50} bajos de entre 1.6 -2.4 $\mu\text{g/g}$ para abejas de miel (*Apis mellifera*), por lo mismo que los insectos forman parte principal de su dieta junto con aves por ser especies que viven en islas (Zelanis, *et al.*, 2008). Una DL_{50} baja indica selectividad a cierto tipo de presas, por lo que es lógico que *M.occiduus* adultas si se alimenten de invertebrados. Esto coincide con la DL_{50} de *M.nummifer* adultas de 6.9 $\mu\text{g/g}$ para roedores que es su alimento principal (García, *et al.*, 2020), el cual es parecido al valor obtenido para *M.occiduus* adulta de 5.00 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$

El hecho que el veneno de adultas sea más tóxico que el de juveniles, puede estar relacionado con las distintas composiciones y tipos de proteínas presentes en ambas muestras. El nivel de toxicidad en el veneno de serpientes se lo dará la proporción y las clases de proteínas presentes, pero sobre todo las combinaciones que las proteínas forman

en el veneno. El coctel proteico es el que llevará a cabo todos los efectos sistémicos en la presa objetivo (Fry, 2015; Caswell, *et al.*, 2020). El gel SDS-PAGE mostró que el veneno de adulta tenía una mayor variedad proteica en contraste al veneno de juvenil, junto con altas proporciones de SVMPs PII y II, PLA₂ y Desintegrinas/Inhibidor tipo Kunitz. Estas combinaciones proteicas pudieron generar una mayor toxicidad en los grillos. La variedad y proporciones de proteínas en el veneno de *M.occiduus* adultas podría justificar la hipótesis de que sí poseen una dieta tipo generalista y no específica durante dicha etapa, incluyendo animales ectotérmicos y endotérmicos. Por esto, tiene sentido que el veneno tenga diferentes tipos de proteínas, las cuales están dirigidas a todos los tipos de presas disponibles. Considerando que son serpientes rastreras de suelo, es lógico considerar que pueden encontrarse una variedad de animales en el suelo y entre la hojarasca (Sociedad Herpetológica Mexicana, 2019).

Las serpientes juveniles poseen algunos tipos de proteínas en común con las adultas en su veneno, como las SVMPs PII y III, LAAOs y PLA₂. Esto es otra evidencia de que las víboras juveniles *M.occiduus* comienzan la transición hacia veneno de adulta. Las juveniles comienzan a adquirir una dieta más generalista, dejando la especificidad por animales ectotérmicos como insectos y herpeto-fauna, e iniciar incluyendo mamíferos a su alimentación (Mackessy, *et al.*, 2003). En ese sentido, pareciera que las proteínas del veneno entre juvenil y adulta no se pierden o cambian por completo, si no que se conservan algunas, al mismo tiempo que aparecen otras proteínas/ enzimas para los nuevos tipos de presa. Por otro lado, la razón por la cual para el veneno de juveniles la mortalidad a 1 hora pos-inoculación fue del 100% y en adultos del 80%, puede explicarse por el tamaño y peso de los grillos más que por el efecto del veneno en estos. Los 4 grillos que no murieron a la hora de ser inyectados pesaban entre 0.85- 0.98g y tenían un cuerpo robusto y grueso. En grillos de tamaño grande los efectos del veneno solían retrasarse unos minutos. Además, los cuatro individuos se encontraban en un estado completo de parálisis una hora después de ser inoculados, lo cual coincide con la alta toxicidad del veneno de adultas.

Para confirmar los resultados de este estudio es necesario evaluar la DL₅₀ en otros modelos animales como anfibios reptiles y mamíferos. Los valores obtenidos permitirán

determinar si existe especificidad hacia alguna presa en particular en las diferentes etapas de crecimiento de *M.occiduus*. De igual manera, se debe incluir el dato de la DL₅₀ para neonatos de *M.occiduus* con el objetivo de tener un perfil completo del análisis del veneno de la especie en sus distintas etapas de desarrollo. (Guerico, *et al.*, 2006; Zelanis, *et al.*, 2008; García, *et al.*, 2020; Lang, *et al.*, 2020). Se debe considerar la poca información sobre la dieta de *M.occiduus* en vida silvestre y cautiverio, por lo que deben aumentarse los esfuerzos de investigación y muestreo para tener un perfil informativo más completo.

Se debe considerar que la DL₅₀ de las víboras juveniles y adultas pudo estar influenciada por la dieta que se les daba a los ejemplares en cautiverio. El origen de las víboras adultas es desconocido, por lo que no se sabe si durante todos su crecimiento han sido alimentadas con animales ectotérmicos y/o endotérmicos. Por otro lado, a las víboras juveniles se les dejó de alimentar desde muy temprano con grillos, sustituyéndolos con crías de ratones y colas de ratones adultos (*Mus musculus*). Se ha comprobado que la dieta en cautiverio también puede influir sobre las características y la toxicidad del veneno en las serpientes (Oliveira, *et al.*, 2021; Nie, *et al.*, 2022). Por lo anterior, es posible que el veneno de las víboras juveniles haya desarrollado selectividad hacia mamíferos, ya que esa era su dieta principal en el zoológico. Esto también explicaría el valor de DL₅₀ mayor en juveniles que en adultos para grillos.

En este sentido lo recomendable sería realizar la caracterización toxinológica del veneno de víboras *M.occiduus* silvestres, ya que la toxicidad secreción puede incluso ser mayor para sus presas naturales que el alimento proporcionado en cautiverio. Esto se reportó para *Micrurus nigrocinctus*, en donde se mostró que su veneno es más toxico para su alimento de vida silvestre como el colubrido *Geophis godmani*, que otro tipo de presas proporcionadas en cautiverio. También se comprobó que la composición del veneno era diferente entre ejemplares silvestres y de cautiverio (Urdaneta *et al.*, 2004; Starkov, *et al.*, 2007).

3. Disecciones y efectos del veneno en el tejido.

Las disecciones en los grillos mostraron que para ambas muestras de veneno hubo un evidente daño sistémico y en el tejido, evidenciando la acción de las proteínas de las secreciones de *M.occiduus*. Esto se observó para 1 hora y 24 horas después post-inoculación de veneno crudo. El daño más intenso en el tejido de los ejemplares fue observado tras 24 horas post-inoculación, debido a que estuvieron expuestos por más tiempo al veneno.

El tejido de los grillos se tornó completamente blando después de las inyecciones, indicando la pérdida de integridad de la quitina en su cuerpo. En este caso, las principales proteínas involucradas fueron los tipos PLA₂ por su actividad en enzimas que hidrolizan los glicerofosfolípidos de las paredes celulares, lo cual provoca la desintegración del tejido en animales. Además, la acción de estas proteínas puede también asociarse con la necrosis observada en los individuos debido al daño celular que llegan a generar (Harris y Scott, 2013). Debido a que las PLA₂ también tienen una naturaleza que afecta la homeostasis, es lógico pensar que dicha enzima tuvo efecto sobre el sistema de coagulación de la “cascada activadora PPO” de los grillos. Se considera lo anterior ya que la cascada activadora PPO influye sobre la producción de proteínas para el endurecimiento de la quitina después de infecciones, daños mecánicos o ingreso de sustancias/agentes extraños (Theopold, *et al.*, 2002; Schmid, *et al.*, 2019). En este sentido, el tejido extremadamente blando fue un indicador de que la cascada activadora PPO no estaba ejerciendo la función esperada de endurecer del exoesqueleto del insecto después de un daño mecánico y presencia la presencia de una sustancia extraña. Las PLA₂ también tienen efectos en el tejido muscular de animales, por ello estas enzimas en conjunto con las miotoxinas generaron daño en el tejido muscular de los grillos, lo cual influyó sobre la rigidez sus extremidades o de su desprendimiento (Quintana, *et al.*, 2017; Cedro, *et al.*, 2018; Hiu y Khai, 2020).

Por otro lado, el hecho que en el cuerpo de los grillos haya aparecido con un mayor nivel de necrosis y tejido más blando con la muestra de adulto, puede asociarse a la presencia de otras proteínas degradadoras de tejido/proteolíticas como las desintegrinas y miotoxinas no identificadas en el veneno de juvenil. Además, las adultas presentan mayor

proporción de SVMPs de tipo II y III, las cuales tienen una mayor actividad proteolítica y hemorrágica debido a la presencia de los dominios adicionales en esta última (dominios desintegrinasrico en cisteína) en comparación a las PI encontradas en juveniles (Van de Velde, 2017).

Aunque las SVMPs y SVSPs son conocidas por afectar la cascada de coagulación de vertebrados que difiere en función y tipos de proteínas con la de invertebrados, los resultados mostraron una evidente acción biológica por parte de estas en el sistema de coagulación de los grillos. Lo anterior se determinó por el fluido viscoso y amarillento, junto con la película acuosa sobre el tejido de los grillos. El tejido amarillento, viscoso (juveniles) y/o acuoso (adultos) era la hemolinfa completamente desnaturalizada por el veneno. En la hemolinfa es donde toma lugar el sistema de coagulación en invertebrados, puesto a que tienen un sistema circulatorio abierto. En este fluido se encuentran proteínas como los hemocitos, enzima transglutaminas y lipoforinas que forman parte importante en inducir la formación de coágulos en insectos (Theopold, *et al.*, 2002). Además, algunas SVMPs tienen la capacidad de degradar la membrana extracelular arredro de la sinapsis, al mismo tiempo que pueden metabolizar péptidos y proteínas reguladoras del sistema interno de los insectos (Zobel, *et al.* 2019). Lo anterior también explicaría la consistencia tipo “licuada” en los grillos. La pérdida de líquidos estuvo influenciada por la acción de las SVMPs y SVSPs, pues estas inhibieron a las proteínas de coagulación que evitan que los fluidos salgan del cuerpo del insecto (Schmid, *et al.*, 2019). La película líquida observada puede ser el agua restante de la hemolinfa luego de haber sido metabolizada por las proteínas del veneno. Esto tiene sentido considerando que el 20 a 50% de la hemolinfa está compuesta por agua (Kanost, 2009).

El color amarillo intenso y café en la hemolinfa pudo ser adquirido por la acción de las LAAOs en los venenos que catalizan la desaminación oxidativa estereo-específica de los L-aminoácidos libres en la hemolinfa de los grillos (Oliveira, *et al.*, 2019). Asimismo, su acción pudo influir sobre la degradación de los pigmentos B-caroteno, riboflavina y/o biliverdina que le dan el característico color natural a la hemolinfa, tornándola a un color café, naranja o amarillo oscuro (Kanost, 2009).

Considerando que el sistema circulatorio de los insectos es abierto, es lógico esperar que, a diferencia de vertebrados, los efectos del veneno no serán locales si no sistémicos, pues el veneno viajará por toda la hemolinfa que circulará por todo el cuerpo del grillo, bañando a los órganos y tejidos (Kanost, 2009). Es por ello por lo que pudo observarse una evidente pérdida de la integridad de los órganos de los grillos, así como de todo el cuerpo en general por la acción en conjunto de las PLA₂, LAAOs, desintegrinas, miotoxinas y SVSPs y SVMPs. Por lo anterior, el tejido de los grillos estaba completamente desintegrado después de la inoculación de los dos venenos de serpiente, lo cual podría significar que el veneno de *M.occiduus* ejerce una función pre-digestiva en los grillos en vez de tener un objetivo depredatorio. Esto coincide con lo observado en *B.insularis*, en donde su veneno no solo presentó una función depredatoria si no también pre-digestiva en insectos y aves para evitar la putrefacción del alimento, así como acelerar su metabolización (Zelanis, *et al.*, 2008). Es por ello que las proteínas más abundantes en el veneno de *B. insularis* eran las proteasas (SVMPs, SVSPs y PLA₂), cuestión que coincide con lo obtenido para *M.occiduus*. Estas proteínas junto con CRSP (en juveniles) también concuerdan con las reportadas para el veneno de serpientes del género *Vipera* que se alimentan de ortópteros como parte de su dieta (Lang, *et al.*, 2020).

Entre el veneno de adulta y juvenil se observaron algunas diferencias en el daño generado en los grillos, especialmente en la consistencia y coloración del tejido y hemolinfa, las zonas de necrosis, y la coloración y/o cantidad de fluido presente. Esto demuestra que las proteínas presentes en ambos venenos, aunque pertenecen a familias similares son de distinto tipo, y por lo tanto las zonas de selectividad también son diferentes entre sí en los tejidos de invertebrados. La selectividad de las proteínas a nivel local también podría observarse en otras presas como vertebrados. Esto evidencia nuevamente que si existe un cambio ontológico en el veneno de *M.occiduus* adulta y juvenil dirigido por la dieta.

En cuanto a las disecciones de las diluciones, para la 0.1 y 0.01 se observaron de manera más clara las diferencias entre el tejido inoculado con veneno de adulta en contraste con el veneno de juvenil. El veneno de adulta siguió mostrando un mayor daño en el tejido,

la integridad de los órganos y una consistencia acuosa de la hemolinfa. Esto denotó que, a menores dosis del veneno, la secreción seguía ejerciendo efectos digestivos y enzimáticos sobre los grillos, demostrando nuevamente que el veneno de *M.occiduus* es muy toxico para estos invertebrados. Asimismo, se observó una “relación proporcional” entre las concentraciones de veneno en las diluciones respecto a los efectos en el tejido de los grillos, de manera que los efectos en el tejido disminuían a medida que la concentración del veneno bajaba en las diluciones. Sin embargo, en ninguna dilución se observó algún grillo que tuviera la totalidad de sus órganos, tejidos y hemolinfa iguales a lo de un grillo sano, pues incluso a concentraciones muy bajas de veneno, este seguía ejerciendo efectos sobre los individuos.

IX. CONCLUSIONES

- Se determinó que si existe un cambio ontológico en el veneno de adultas y juveniles de *M.occiduus*, debido a la diferencia en proteínas identificadas en SDS-PAGE y los distintos valores de DL₅₀ entre ambas muestras de veneno.
- Contrario a la hipótesis propuesta del estudio, la DL₅₀ de las víboras adultas es menor que el de las juveniles, indicando que durante esta etapa siguen consumiendo animales ectotérmicos o invertebrados.
- La mayor toxicidad del veneno en ejemplares adultos hacia los grillos en comparación a las víboras juveniles puede atribuirse a la variedad y complejidad del coctel proteico presente en su veneno.
- Las proteínas identificadas en los geles SDS-PAGE denotaron que ambos venenos son principalmente de tipo hemotóxicos.
- El veneno de adulta tiene familias de proteínas selectivas tanto para animales ectotérmicos como endotérmicos, mostrando una posible dieta variada y generalista durante esta etapa.
- El comportamiento de los grillos post-inoculación mostró evidentes efectos sistémicos causados por las proteínas CRISPs, Inhibidores de Kunitz y SVSPs y algunas metaloproteasas análogas a las de *Physocylus mexicanus*, indicando cierto grado de selectividad de ambos venenos hacia invertebrados, parecido a lo reportado en víboras entomófagas del género *Vipera*.
- Los tipos de parálisis y mortalidad en los grillos indicaron que los efectos del veneno eran causados por el conjunto de proteínas que potencia los efectos sistémicos, más que un efecto individual por proteína/enzima.
- Las pautas etológicas de los grillos post-inoculación de veneno mostraron que el veneno si cumple con la función de someter a la presa y evitar su fuga (parálisis excitatoria, flácida y rígida), nuevamente indicando una potencial selectividad de los venenos a invertebrados.
- El estado y los efectos del tejido de los grillos post-inoculación de veneno denotó que las proteínas hacia invertebrados también tienen una función pre-digestiva.

- Las diferencias en los efectos del tejido de los grillos post-inoculaciones de veneno, mostraron una evidente diferencia en el tipo de proteínas en ambas muestras.
- Las diferencias en los efectos del tejido en los grillos por el veneno fueron más evidentes con las diluciones 0.1 y 0.01, indicando que el volumen de veneno inyectado pudo influir sobre los grillos.
- El solvente más efectivo fue el agua UP, ya que el Buffer PBS tuvo una mortalidad del 30% a causa de los cambios de osmolaridad en las células de los grillos por algunos componentes del buffer.

X. RECOMENDACIONES

- A. Continuar la investigación del veneno de *M. occiduus* con el objetivo de establecer un perfil completo de las características de la secreción, en cuanto a proporciones proteicas, tipos específicos de proteínas, síntomas de mordeduras, etc. Lo anterior debe hacerse tomando en cuenta que los estudios para esta especie son muy limitados a pesar de que es una especie relativamente común, de importancia médica y con incidencia en zonas antropogénicas reportada.
- B. Incluir a individuos de la especie *M. occiduus* en la etapa de neonatos dentro del estudio para determinar con mejor precisión si existe un cambio ontológico en el veneno de las tres etapas de crecimiento del reptil.
- C. Incluir otros modelos vivos para los bioensayos de letalidad y determinación de DL₅₀ en *M. occiduus* como mamíferos y aves. Esto permitirá establecer comparaciones concretas para evaluar si el veneno de las diferentes etapas de la serpiente tiene efectos diferentes o similares en los sujetos experimentales.
- D. Para pruebas de letalidad, tomar el tiempo de “inicio de parálisis”, “parálisis casi completa”, “parálisis completa” y “muerte” a los ejemplares experimentales de manera individual, para sacar un promedio de los valores y obtener datos más precisos.
- E. Realizar otro grupo de bioensayos como espectrofotometría de gases, Western Blot, *DNA bar-coding* de muestras de heces, secuenciación de proteínas y/o transcriptómica para poder identificar con mayor precisión los componentes específicos del veneno de serpiente.
- F. Correr geles SDS-PAGE XL al menos por 120 minutos para una mejor formación y desplazamiento de las bandas proteicas de las muestras de veneno.
- G. En pruebas de letalidad se debe inyectar un volumen menor de los 50 µL de veneno inoculados en los individuos. Esto permitirá observar si el volumen de veneno inyectado influyó sobre la aparición de síntomas.
- H. Realizar el presente estudio con individuos en cautiverio y ejemplares de vida silvestre, para comparar si las diferentes presiones ambientales pueden influir sobre la selectividad y características del veneno.

XI. LITERATURA CITADA

1. Acevedo M. (2006). *Anfibios y reptiles de Guatemala: una breve síntesis con bibliografía*. En: Biodiversidad de Guatemala, volumen I. Cano, EB Editor. Guatemala, publicado por Universidad del Valle de Guatemala.
2. Adade, C. M., Carvalho, A. L. O., Tomaz, M. A., Costa, T. F., Godinho, J. L., Melo, P. A., y Souto-Padron, T. (2014). Crovirin, a snake venom cysteine-rich secretory protein (CRISP) with promising activity against *Trypanosomes* and *Leishmania*. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(10).
3. Aird, S. D. (2002). Ophidian envenomation strategies and the role of purines. *Toxicon* 40.
4. Aird, S. D. (2005). Taxonomic distribution and quantitative analysis of free purine and pyrimidine nucleosides in snake venoms. *Comp. Biochem. Physiol.* 140.
5. Alape, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores, M., Madrigal, M., Sasa, M., Calvete, J. J. (2008). Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*. Geographic, individual, and ontogenetic variations. *J. Proteome Res.* 7, 3556–3571. <https://doi.org/10.1021/pr800332p>.
6. Alencar, L.R.V., T.B. Quental, F.G. Grazziotin, M.L. Alfaro, M. Martins, M. Venzon, & H. Zaher. 2016. Diversification in vipers: Phylogenetic relationships, time of divergence and shifts in speciation rates. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 105:50- 62.
7. 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.

8. Bernardes, C. P., Menaldo, D. L., Camacho, E., Rosa, J. C., Escalante, T., Rucavado, A., y Sampaio, S. V. (2013). Proteomic analysis of *Bothrops pirajai* snake venom and characterization of BpirMP, a new PI metalloproteinase. *Journal of proteomics*.
9. Bieber, A. L. (1979). Metal and nonprotein constituents in snake venoms. In Snake venoms, handbook of experimental pharmacology, Berlin: Springer-Verlag.
10. BioRad (2021). A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection. https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf
11. Bolívar, J. A., y Rodríguez, A. L. (2020). Neurotoxic activity of *Micrurus* snake venom and methods for its analysis. A literature review. *Revista de la Facultad de Medicina*, 68(3), 453-462.0656.
12. Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72.
13. Brunelle, J. L., y Green, R. (2014). One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). In *Methods in enzymology* (Vol. 541, pp. 151-159). Academic Press.
14. Bocian, A., Sławek, S., Jaromin, M., Hus, K. K., Buczkowicz, J., Łysiak, D., y Legáth, J. (2020). Comparison of methods for measuring protein concentration in venom samples. *Animals*, 10(3), 448.

15. Borja, M., Neri-Castro, E., Pérez-Morales, R., Strickland, J. L., Ponce-López, R., Parkinson, C. L., y Castañeda-Gaytán, G. (2018). Ontogenetic change in the venom of Mexican black-tailed rattlesnakes (*Crotalus molossus nigrescens*). *Toxins*, 10(12).
16. Brown, D. S., Ebenezer, K. L., & Symondson, W. O. (2014). Molecular analysis of the diets of snakes: changes in prey exploitation during development of the rare smooth snake *Coronella austriaca*. *Molecular Ecology*, 23(15), 3734-3743.
17. Casewell, N. R., Jackson, T. N., Laustsen, A. H., & Sunagar, K. (2020). Causes and consequences of snake venom variation. *Trends in pharmacological sciences*, 41(8).
18. Campbell, J. A. y W. W. Lamar. (1989). The venomous reptiles of Latin America. Comstock Publishing Associates. Ithaca, N. Y.: Cornell University Press.
19. Campbell J. A. (1998). The amphibians and reptiles of northern Guatemala, Yucatán, and Belize. University of Oklahoma Press, Norman, Oklahoma. E.U.A.
20. Campbell, J. A. & Brodie, E. (1992). Biology of the pitvipers. Selva.
21. Campbell, J. A. y W. W. Lamar. (2004). The venomous reptiles of the western hemisphere. Volume II. Comstock Publishing Associates. Ithaca, New York. Cornell University Press.
22. Campbell, J.A., Frost, D.R., Castoe, T.A. (2019). New generic name for jumping pitvipers (Serpentes: viperidae). *Rev. Latinoam. Herpetol.* 2.
23. Calvete, J. J. (2011). Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. *Expert review of proteomics*, 8(6).
24. Calvete, J. J. (2017). Venomics: integrative venom proteomics and beyond. *Biochemical Journal*, 474(5).

25. Campbell J.A., Lamar W.W. (2004) *Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Cornell University Press, Ithaca, New York
26. Cassan, F. (2006). Gran Atlas de la Ciencia: Reptiles y dinosaurios. Disponible en <https://ciencia.edactiva.com/ebook-demo/index.html#p=76>
27. Castoe T.A, Chippindale P.T., Campbell J.A., Ammerman L.K., Parkinson C.L. (2003). Molecular systematics of the Middle American jumping pitvipers (genus *Atropoides*) and phylogeography of the *A. nummifer* complex. *Herpetologica* 59.
28. Castoe, T. A., Mahmood, M. S. and Parkinson, C. L. (2005). Modeling nucleotide evolution at the mesoscale: The phylogeny of the Neotropical pitvipers of the *Porthidium* group (Viperidae: Crotalinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37(3).
29. Castoe, T. A. and Parkinson, C. L. (2006). Bayesian mixed models and the phylogeny of pitvipers (Viperidae: Serpentes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39(1):91-110.
30. Dunn, E. R. 1939. A new pit viper from Costa Rica. *Proc. Biol. Soc. Washington* 52.
31. Casewell N., Wüster W., Vonk F.J., Harrison R.A., Fry B.G. (2013). Complex cocktails: The evolutionary novelty of venoms. *Trends Ecol Evol* 28(4).
32. Casewell, N. R., Wagstaff, S. C., Wüster, W., Cook, D. A., Bolton, F. M., King, S. I., y Harrison, R. A. (2014). Medically important differences in snake venom composition are dictated by distinct postgenomic mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(25).

33. CDC y NIH. (2020). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. U.S. Department of Health and Human Services; Public Health Service; Centers for Disease Control and Prevention National Institutes of Health.
34. Cedro, R. C., Menaldo, D. L., Costa, T. R., Zoccal, K. F., Sartim, M. A., Santos-Filho, N. A., y Sampaio, S. V. (2018). Cytotoxic and inflammatory potential of a phospholipase A 2 from *Bothrops jararaca* snake venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 24.
35. Ceña, V., Galindo, M. F., Jordán, J., y Fuster Lluch, O. (2004). Las serina proteasas y su función en los procesos de muerte neuronal. *Rev. neurol.*(Ed. impr.), 449-457
36. Chang, J. (2016). Inhibición in vitro del efecto hemotóxico del veneno de la serpiente mano de piedra (*Atropoides nummifer*) causado por alcaloides de *Sansevieria trifasciata* y *Tradescantia spathacea*. Tesis de pre-grado. Guatemala, Guatemala. Universidad Del Valle de Guatemala.
37. Costa, T. R., Burin, S. M., Menaldo, D. L., de Castro, F. A., y Sampaio, S. V. (2014). Snake venom L-amino acid oxidases: an overview on their antitumor effects. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*.
38. Cruz, V., Reynoso, A., Canseco, L., y Pérez, E. (2017). *Atropoides nummifer* (Rüppell, 1845), Cannibalism. *Mesoamerican Herpetology*, 4(4).
39. Durban, J., Sanz, L., Trevisan-Silva, D., Neri-Castro, E., Alagón, A., y Calvete, J. J. (2017). Integrated venomomics and venom gland transcriptome analysis of juvenile and adult mexican rattlesnakes *Crotalus simus*, *C. tzabcan*, and *C. culminatus* revealed miRNA-modulated ontogenetic shifts. *Journal of Proteome Research*, 16(9).
40. Espinosa, G., y Reverter, J. C. (2001). Coagulación y fibrinólisis plasmática. Estados de hipercoagulabilidad. *Med. integral* (Ed. impr).

41. Fernandes, K. F., Vieira, S. E. M., Vidueiros, J. P., Serapicos, E. D. O., Barbarini, C. C., Silveira, G. P. M. D. y Sant'Anna, S. S. (2021). Maintenance of venomous snakes in captivity for venom production at Butantan Institute from 1908 to the present: a scoping history. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*,
42. Fry, B.G. y Wüster, W. (2004). Assembling an arsenal: Origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences. *Mol. Biol. Evol.* (21).
43. Fry, B. G. (2005). From genome to “venome”: Molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome Res.* 15.
44. Fry, B. G., Scheib, H., van der Weerd, L., Young, B., McNaughtan, J., Ramjan, S. R., y Norman, J. A. (2008). Evolution of an arsenal: structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(2).
45. Fry, B. (2015). *Venomous Reptiles and their Toxins*. Oxford University Press is a department of the University of Oxford. Oxford University Press 2015.
46. Fox, J.W., Serrano, S.M.T., (2005). Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 45.
47. García, A. y García, A. (2009). Fosfolipasas A2: grandes familias y mecanismos de acción. *Repert.med.cir.*;18(4).
48. García Denegri, M. E., Bustillo, S., Romero-Vargas, F., Leiva, L. C., y Acosta, O. C. (2012). Actividades farmacológicas de la fosfolipasa A2 Ba SpII RP4 del veneno de *Bothrops alternatus*. *Revista veterinaria*, 23(1), 25-31.

49. García, B., Lomonte, B., Bénard, M., de León, J. L., Román, L., Mejía, N. R., y Castro, E. (2020). Ontogenetic changes in the venom of *Metlapilcoatlus nummifer*, the mexican jumping viper. *Toxicon*, 184.
50. Gazo, J. (2022). Mano de piedra, timbó o saltadora (*Metlapilcoatlus mexicanus*) Disponible en <https://www.acguanacaste.ac.cr/biodiversidadacg/observaciones-de-biodiversidad/5545-mano-de-piedra-o-timbo-metlapilcoatlus-mexicanus>
51. Ghorbanpur, M., Zare Mirakabadi, A., Zokaee, F., Zolfagarrian, y H., Rabiei, H. (2009). Purification and partial characterization of a coagulant serine protease from the venom of the Iranian snake *Agkistrodon halys*. *J. Venomous Anim. Toxins Incl. Trop.*
52. Gjverspui. (2019). Mano de Piedra Costarricense (*Atropoides picadoi*). Disponible en <https://colombia.inaturalist.org/photos/47832599>
53. Guércio, R. A., Shevchenko, A., Shevchenko, A., López-Lozano, J. L., Paba, J., Sousa, M. V., y Ricart, C. A. (2006). Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome science*, 4(1).
54. Guerra, D., Fuentes, H., y Morán, V. (2012). Serpientes de Guatemala: Guía para identificación de especies. Unidad de Vida Silvestre, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
55. Guerrero, B., y López, M. (2015). Generalidades del sistema de la coagulación y pruebas para su estudio. *Investigación Clínica*, 56(4).
56. Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., y Díaz, C. (2005). Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 45.

57. Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., y Escalante, T., (2010). Snake Venom metalloproteinases. Biological roles and participation in the pathophysiology of envenomation. In: Mackessy, S.P. (Ed.), Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles. CRC Press, Boca Raton.
58. Gutiérrez, J.M., Muñoz, T., y Rucavado, A. (2016). Metaloproteinasas dependientes de Zinc: Protagonistas centrales en la Fisiopatología de Envenenamientos por Serpientes de la familia Viperidae. Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica. <https://www.kerwa.ucr.ac.cr/handle/10669/76866>
59. Harris, J. B., y Scott, T. (2013). Secreted phospholipases A2 of snake venoms: effects on the peripheral neuromuscular system with comments on the role of phospholipases A2 in disorders of the CNS and their uses in industry. *Toxins*, 5(12).
60. Ha, S. J., Choi, Y. O., Kwag, E. B., Kim, S. D., Yoo, H. S., Kang, I. C., y Park, S. J. (2022). Qualitative Analysis of Proteins in Two Snake Venoms, *Gloydus Blomhoffii* and *Agkistrodon Acutus*. *Journal of Pharmacopuncture*, 25(1), 52.
61. Hernández-Goenaga, J., López-Abán, J., Protasio, A. V., Vicente Santiago, B., Del Olmo, E., Vanegas, M. y Muro, A. (2019). Peptides derived of Kunitz-type serine protease inhibitor as potential vaccine against experimental schistosomiasis. *Frontiers in immunology*, 10, 2498.
62. Hernández, E. E., Solís, M. E., Rivera, M. A., Salas, J. A., Lazcano, D., Cruz, D., y Wilson, L. D. (2021). Notes on Mexican Herpetofauna 38: Predation by a Central American Indigo Snake (*Drymarchon melanurus*) on a Western Ribbonsnake (*Thamnophis proximus*) in the municipality of Juárez, Nuevo León, México.
63. Herrera, N. (2015). Mano de Metate (*Metlapilcoatlus occiduus*). Extraído de <https://inaturalist.mma.gob.cl/photos/77523992>

64. Hiu, J. J., y Khai, M. K. (2020). Cytotoxicity of snake venom enzymatic toxins: Phospholipase A2 and l-amino acid oxidase. *Biochemical society transactions*, 48(2).
65. Hiu, J. J., y Yap, M. K. K. (2020). Cytotoxicity of snake venom enzymatic toxins: Phospholipase A2 and l-amino acid oxidase. *Biochemical society transactions*, 48(2), 719-731.
66. Helpers MG. (2022). PACKAGE FOR LD₅₀.
67. Hoser, R. (2012). A new genus of Jumping Pitviper from Middle America (Serpentes: Viperidae). *Australasian Journal of herpetology*, 10.
68. Inga, R., Vivas, D., Palermo, P., Mendoza, J., Lazo, F., y Yarlequé, A. (2010). Caracterización biológica y acción de inhibidores de una fosfolipasa A2 del veneno de *Lachesis muta*: Biological characterization and inhibitors action of Phospholipase A2 from *Lachesis muta* venom. *Revista peruana de biología*, 17(1).
69. Jadin, R. C., Gutberlet Jr, R. L., y Smith, E. N. (2010). Phylogeny, evolutionary morphology, and hemipenis descriptions of the Middle American jumping pitvipers (Serpentes: Crotalinae: Atropoides). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 48(4).
70. Jadin, R. C., Mihaljevic, J. R., & Orlofske, S. A. (2019). Do New World pitvipers “scale-down” at high elevations? Macroecological patterns of scale characters and body size. *Ecology and Evolution*, 9(16).
71. Kamiguti, A.S., (2005). Platelets as targets of snake venom metalloproteinaes. *Toxicon* 45.
72. Kanost, M. R. (2009). Hemolymph. In *Encyclopedia of insects*. Academic Press.

73. Kholer, G. (2003). *Reptiles of Central America*. Ofbnbach: Herpeton Verlag. ISBN 3-936180-02-4
74. Kuoppala, A., Lindstedt, K. A., Saarinen, J., Kovanen, P. T., y Kokkonen, J. O. (2000). Inactivation of bradykinin by angiotensin-converting enzyme and by carboxypeptidase N in human plasma. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*,
75. 278(4),
76. Latinović, Z., Leonardi, A., Koh, C. Y., Kini, R. M., Trampuš Bakija, A., Pungercar, J., y Križaj, I. (2020). The procoagulant snake venom serine protease potentially having a dual, blood coagulation factor V and X-Activating activity. *Toxins*, 12(6).
77. Laemmli, U. K. (1970). SDS PAGE BIOASSAY. *Nature*, 227, 680–685.
78. Lang Balija, M., Leonardi, A., Brgles, M., Sviben, D., Kurtović, T., Halassy, B., y Križaj, I. (2020). Biological activities and proteomic profile of the venom of *Vipera ursinii ssp.*, a very rare karst viper from Croatia. *Toxins*, 12(3).
79. López, S. (2014). Algunas representaciones de víboras en la escultura del Altiplano y la Costa Sur de Guatemala. En XXVII Simposio de Investigaciones Arqueológicas en Guatemala, 2013 (editado por B. Arroyo, L. Méndez Salinas y A. Rojas), Museo Nacional de Arqueología y Etnología, Guatemala.
80. López, M.A. y Canseco, L. (2022). *Atropoides occiduus* (amended version of 2014 assessment). The IUCN Red List of Threatened Species 2022: e.T197459A217774988. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2022-1.RLTS.T197459A217774988.en>. Accessed on 26 October 2022.
81. Mackessy, S. P., Williams, K., y Ashton, K. G. (2003). Ontogenetic variation in venom composition and diet of *Crotalus oreganus concolor*: a case of venom paedomorphosis? *Copeia*, (4).

82. Markland Jr, F. S., y Swenson, S. (2013). Snake venom metalloproteinases. *Toxicon*, 62.
83. Mcquin, B. (2021) Mano de Metate (*Metlapilcoatlus occiduus*). Extraído de <https://www.naturalista.mx/photos/123554068>
84. Madrigal, M. (2006). Serina proteasas de *Lachesis stenophrys* y *Bothrops asper*. Producción de anticuerpos mediante inmunización con ADN y subclonaje. Tesis pregrado. Instituto tecnológico de Costa Rica: Escuela de Biología.
85. Menaldo, D. L., Bernardes, C. P., Pereira, J. C., Silveira, D. S., Mamede, C. C., Stanziola, L., ... & Sampaio, S. V. (2013). Effects of two serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom on the complement system and the inflammatory response. *International Immunopharmacology*, 15(4),
86. Merk (2021). Introduction to SDS-PAGE - Separation of Proteins Based on Size. <https://www.sigmaaldrich.com/GT/es/technical-documents/protocol/protein-biology/gel-electrophoresis/sds-p ag>
87. Morgenstern, D., & King, G. F. (2013). The venom optimization hypothesis revisited. *Toxicon*, 63.
88. Neri E., y Ponce, R. (2018). Variación ontogénica en el veneno de *Crotalus simus* en México. *Aridociencia*, 3.
89. Nie, X., Chen, Q., Wang, C., Huang, W., Lai, R., Lu, Q., y Yu, X. (2022). Venom Variation of Neonate and Adult Chinese Cobras in Captivity Concerning Their Foraging Strategies. *Toxins*, 14(9), 598.
90. Nina, O., Olazábal, D., Quispe, J., Alzamora, A., Gomes, M., y Huancahuire, S. (2020). Caracterización bioquímica del veneno de la serpiente *Bothrops roedingeri* Mertens, y sus actividades edematógena, hemorrágica y miotóxica. *Biomédica*, 40(4).
91. Oliveira, F., Stransky, S., Guerra-Duarte, C., Naves de Souza, D. L., Vivas-Ruiz, D. E., Yarlequé, A., y Braga, V. M. (2019). L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox*

snake venom triggers autophagy, apoptosis, and necrosis in normal human keratinocytes. *Scientific reports*, 9(1).

92. Olsson, T., MacMillan, H. A., Nyberg, N., Staerk, D., Malmendal, A., y Overgaard, J. (2016). Hemolymph metabolites and osmolality are tightly linked to cold tolerance of *Drosophila* species: a comparative study. *Journal of Experimental Biology*, 219(16).
93. Osipov, A. V., Levashov, M. Y., Tsetlin, V. I., y Utkin, Y. N. (2005). Cobra venom contains a pool of cysteine-rich secretory proteins. *Biochemical and biophysical research communications*, 328(1).
94. Padilla, E. (2008). Nauyaca de Los Tuxtlas (*Metlapilcoatlus olmec*). Disponible en <https://www.naturalista.mx/photos/378403>
95. Padilla, E. (2011). Mano de Metate (*Metlapilcoatlus occiduus*). Extraído de <https://inaturalist.mma.gob.cl/photos/321965>
96. Pawlak, J., S. P. Mackessy, B. G. Fry, M. Bhatia, G. Mourier, C. Fruchart-Gaillard, D. Servent, R. Menez, E. Stura, A. Menez, and R. M. Kini. (2006). Denmotoxin, a three-finger toxin from the colubrid snake *Boiga dendrophila* (mangrove catsnake) with bird-specific activity. *J. Biol. Chem.* 28.
97. Quintana, J., Ávila, I., Ceballos, J., Vargas, L., Estrada, S. (2016). Cytotoxic effect of A2 phospholipases of the venom of *Crotalus durissus cumanensis* from Colombia. *Revista de Investigación en Salud*. Universidad de Boyacá ;4(1).
98. Quispe, E., Torrejón, D., Bautista, L., Sandoval, G., Rodríguez, E., Lazo, F., y Yarlequé, A. (2019). Purificación y algunas propiedades bioquímicas y moleculares de una nueva fosfolipasa A2 no miotóxica del veneno de la serpiente *Bothrops atrox*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 85(4).
99. Richmond, J. Y., y McKinney, R. W. (2009). Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. US Government Printing Office.

- 100.** Reed Collage. (2010). Behavior of the House Cricket, *Acheta domestica*. Disponible en PDF. Chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.reed.edu/biology/professors/srenn/pages/teaching/2010_syllabus/2010_readings/Cricket_lectu
- 101.** Rojas, E., Saravia, P., Angulo, Y., Arce, V., Lomonte, B., Chavez, J.J., Velasquez, R., Thelestam, M., y Gutierrez, J.M., (2001). Venom of the crotaline snake *Atropoides nummifer* (jumping viper) from Guatemala and Honduras: comparative toxicological characterization, isolation of a myotoxic phospholipase A2 homologue and neutralization by two antivenoms. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 129. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00198-3](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00198-3).
- 102.** Rokyta, D. R., Wray, K. P., y Margres, M. J. (2013). The genesis of an exceptionally lethal venom in the timber rattlesnake (*Crotalus horridus*) revealed through comparative venom-gland transcriptomics. *BMC Genomics*, 14:394. doi: 10.1186/1471-2164-14-394
- 103.** Rokyta, D. R., Wray, K. P., McGivern, J. J., and Margres, M. J. (2015). The transcriptomic and proteomic basis for the evolution of a novel venom phenotype within the Timber Rattlesnake (*Crotalus horridus*). *Toxicon*. 98, 34–48. doi: 10.1016/j.toxicon.2015.02.015
- 104.** Rosinski, M., Reid, S., & Nielsen, L. K. (2000). Osmolarity effects on observed insect cell size after baculovirus infection are avoided using growth medium for sample dilution. *Biotechnology progress*, 16(5), 782-785.
- 105.** Sabrewing. (2019). Mano de Metate (*Metlapilcoatlus occiduus*). Extraído de <https://www.naturalista.mx/photos/34840491>
- 106.** Schmid, M. R., Dziedziech, A., Arefin, B., Kienzle, T., Wang, Z., Akhter, M., y Theopold, U. (2019). Insect hemolymph coagulation: Kinetics of classically and non-classically secreted clotting factors. *Insect biochemistry and molecular biology*, 109.
- 107.** Scovino, S., Sarmiento, K., Galvis, C., Castiblanco, A. L., y Aristizabal, F. A. (2021). Análisis del perfil proteico de los venenos de *Bothrops asper*, *Bothrocophias myersi* y *Crotalus durissus* serpientes de la Región Andina en Colombia obtenidos

por RP-HPLC. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 23(1).

108. Serrano, S.M. y Maroun, R.C. (2005). Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*, 45: 1115-1132.
109. Serrano, S. M. T. (2013). The long road of research on snake venom serine proteinases. *Toxicon*, 62, 19–26. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.09.003
10.1016/j.toxicon.2012.09.003
110. Simon, R. (2019). Mano de Metate de la Sierra Madre Oriental (*Metlapilcoatlus nummifer*). Disponible en <https://colombia.inaturalist.org/photos/40274139>
111. Shaala, N. M. A., Zulkifli, S. Z., Ismail, A., Azmai, M. N. A., y Mohamat-Yusuff, F. (2015). Lethal concentration 50 (LC50) and effects of Diuron on morphology of brine shrimp *Artemia salina* (Branchiopoda: Anostraca) Nauplii. *Procedia Environmental Sciences*, 30.
112. Starkov, V. G., Osipov, A. V., y Utkin, Y. N. (2007). Toxicity of venoms from vipers of Pelias group to crickets *Gryllus assimilis* and its relation to snake entomophagy. *Toxicon*, 49(7).
113. Smith, E. N., y J. A. Ferrari (2008). A new species of jumping pitviper of the genus *Atropoides* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae) from the Sierra de Botaderos and the Sierra La Muralla, Honduras. *Zootaxa* 1948.
114. Soares A.M. y J.R. Giglio. (2003). Chemical modifications of phospholipases A₂ from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. *Toxicon* 42.
115. Sociedad de Herpetología Mexicana. (2019). ANFIBIOS Y REPTILES: DISTRIBUCIÓN E HISTORIA NATURAL. 2(2), ISN: 2594-2158

- 116.** Sosa, A. y Ramos, K. (2015) . Predation evento and a distributional record for *Atropoides occiduus* (Hoge, 1966). Sistema de Estudios de Posgrado en Biología, Escuela de Biología, Campus Rodrigo Facio, Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica.
- 117.** Tan, K. Y., Tan, C. H., Chanhome, L., and Tan, N. H. (2017). Comparative venom gland transcriptomics of *Naja kaouthia* (monocled cobra) from Malaysia and Thailand: elucidating geographical venom variation and insights into sequence . *PeerJ*, doi: 10.7717/peerj.3142
- 118.** Tepos, M., Flores, O., Velasco, J. A., Lara, C. P., García Rubio, O. R., y Jadin, R. C. (2021). Molecular phylogenetics and morphometrics reveal a new endemic jumping pitviper (Serpentes: Viperidae: *Metlapilcoatlus*) from the Sierra Madre Oriental of Mexico. *Journal of Herpetology*, 55(2).
- 119.** Teixeira, C.F.P., Fernandes, C.M., Zuliani, J.P., y Zamuner, S.F., (2005). Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. *Memorias Inst. Oswaldo Cruz*.
- 120.** Theopold, U., Li, D., Fabbri, M., Scherfer, C., y Schmidt, O. (2002). The coagulation of insect hemolymph. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59(2).
- 121.** Thongjued, K., Chotigeat, W., Bumrungsri, S., Thanakiatkrai, P., y Kitpipit, T. (2019). A new cost-effective and fast direct PCR protocol for insects based on PBS buffer. *Molecular ecology resources*, 19(3).
- 122.** Timberlake, K. (2013). Química general, orgánica y biológica: estructuras de la vida. México: Pearson Educación.
- 123.** Trichan, R. (2021). Mano de Metate (*Metlapilcoatlus occiduus*). Extraído de <https://www.naturalista.mx/photos/167177602>.
- 124.** Turner, A. J., Isaac, R. E., and Coates, D. (2001). The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases. *Genomics and function. Bioessays* 23, doi: 10.1002/1521-1878(200103)23:3<261::AID-BIES1036>3.0.CO;2-K

- 125.** UASLP: Facultad de Medicina. (2008). Preparación de Phospahte Buffered Saline (PBS). Disponible en PDF chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_PBS_SPA.pdf
- 126.** Universidad de Texas. (2019). Determination of the Relative Protein Concentrations of Cell Free and Stage 1 Extracts from the Purification of Alkaline Phosphatase. Disponible en: <https://www.coursehero.com/file/35012706/media-1pdf/>
- 127.** Universidad del Trabajo del Uruguay (2020). Hidrolisis y desnaturalización de proteínas. Química Bio-Orgánica ITS Paysandú 3°BI.
- 128.** Urdaneta, A. H., F. Bolaños, and J. M. Gutiérrez. (2004). Feeding behavior and venom toxicity of coral snake: *Micrurus nigrocinctus* (Serpentes: Elapidae) on its natural prey in captivity. *Comp. Biochem. Physiol.* 138.
- 129.** Urdaneta, A.H., Bolaños, F., y Gutiérrez, J.M., (2004). Feeding behavior and venom toxicity of coral snake *Micrurus nigrocinctus* (Serpentes: Viperidae) on its natural prey in captivity. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 138.
- 130.** Valdés, Y., Bilbao, M., Álvarez, L., y Merchán, F. (2002). Origen e importancia de la Fosfolipasa A2 de secreción. *Rev Cubana Farm;* 36(2).
- 131.** Valdujo, P., Nogueira, C. y Martins, M. (2002). Ecology of *Bothrops neuwiedi pauloensis* in the Brazilian Cerrado. *J Herpetol.* 36.
- 132.** Vonk, F. J., Casewell, N. R., Henkel, C. V., Heimberg, A. M., Jansen, H. J., McCleary, R. J., y Richardson, M. K. (2013). The king cobra genome reveals dynamic gene evolution and adaptation in the snake venom system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(51), 20651-20656.
- 133.** Wray, K. P., Margres, M. J., Seavy, M., y Rokyta, D. R. (2015). Early significant ontogenetic changes in snake venoms. *Toxicon*, 96.

134. Xiao, H., Pan, H., Liao, K., Yang, M., y Huang, C. (2017). Snake venom PLA2, a promising target for broad-spectrum antivenom drug development. *BioMed Research International*.
135. Xuhln. (2018). *Metlapilcoatlus indomitus*. Disponible en <https://www.naturalista.mx/photos/54921437>
136. Zaqueo, K. D., Kayano, A. M., Domingos, T. F., Moura, L. A., Fuly, A. L., da Silva, S. L., y Soares, A. M. (2016). BbrzSP-32, the first serine protease isolated from *Bothrops brazili* venom: Purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 195.
137. Zelanis, A., Travaglia-Cardoso, S. R., y Furtado, M. D. F. D. (2008). Ontogenetic changes in the venom of *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae) and its biological implication. *South American Journal of Herpetology*, 3(1).
138. Zobel-Thropp, P. A., Mullins, J., Kristensen, C., Kronmiller, B. A., David, C. L., Breci, L. A., y Binford, G. J. (2019). Not so dangerous after all? Venom composition and potency of the pholcid (daddy long-leg) spider *Physocyclus mexicanus*. *Frontiers in ecology and evolution*, 256.
139. Zorrilla, B. (2021). *Metlapilcoatlus occiduus*. Disponible en <https://www.gbif.org/tools/zoom/simple.html?src=/api.gbif.org/v1/image/unsafe/https%3A%2F%2Finaturalist-open-data.s3.amazonaws.com%2Fphotos%2F116153985%2Foriginal.jpg>

XII. ANEXOS

Etogramas para bioensayo de letalidad.

Cuadro 11. Etograma 1 para registro de comportamiento individual de cada grillo post-inoculación del bioensayo de letalidad y pruebas de solvente.

# Grillo	Tiempo de inoculación	Sobrevivencia (Si/No)	Comportamiento	Anotaciones
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				

Cuadro 12. Etograma 2 para el resumen y registro del comportamiento de grillos post-inoculación del Etograma 1 (Cuadro 11).

Tiempo de inoculación (d.i.)	# de sobrevivientes	Comportamiento	Anotaciones
Inmediatamente			
1 Hrs.			
24 Hrs.			

Nota: “d.i.” indica “después de inoculación”.

Código para registrar comportamiento:

Comportamiento de daño fisiológico.

1: Muerte.; **1.2:** Muerte patas arriba.; **1:3:** Muerte lateral; **1.4.** Muerte boca abajo

2: Caídas y tambaleo.

3: Caída patas arriba y tambaleo.

4: Otro: se anota.

Comportamiento sin daño fisiológico.

5: Saltos y movimiento.

6: Forrajeo.

7: Movimiento de antenas, patas y mandíbula.

8: Ruido.

9: Neutral

10: Otro: se anota.

C.S.F: Comportamiento sin daño fisiológico.

C.D.F. Comportamiento con daño fisiológico.

Figura 42. Código de registro para el comportamiento de los grillos post-inoculación de tratamientos: veneno crudo (Juvenil y Adulto) y prueba de solventes (Agua UP y buffer PBS). El código se utilizó para el etograma (Cuadro 11 y 12).

En el Etograma 1 se registraron los comportamientos observados después de la inoculación de los grillos para los bioensayos de letalidad y las pruebas de la determinación del solvente (agua UP y buffer PBS). El Etograma 1 es una ejemplificación del diagrama original realizado en *Microsoft Excel*®, pues los datos se tomaron de manera individual para cada grillo. Estos datos fueron resumidos en un solo etograma (Etograma 2) con la finalidad de resaltar los patrones etológicos más constantes para todos los grillos después de ser inyectados. Para llenar la columna de comportamiento en los dos etogramas, se utilizó el código de la Figura 46. En la sección de anotaciones se escribió tal cual lo que se observaba. Los individuos que no sobrevivieron una (1) hora después de ser inoculados, fueron marcados de color amarillo. Si el individuo moría a las doce (12) o veinticuatro (24) horas se marcó de color verde. Esto se ejemplifica en el Etograma 1. Se realizó un etograma para cada tipo de muestra: Muestra 1: veneno de adultos; Muestra 2: veneno de juveniles; Solventes: Buffer PBS y agua UP.

Etograma para bioensayo de DL₅₀.

Cuadro 13. Etograma 3 para el registro de datos de la post-inoculación de dilución de veneno para bioensayo de DL₅₀ a las 24 horas.

No. de grillo	Peso (g)	Sobrevivencia (Si/No) 24H. después.
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		

8		
9		
10		
Promedio del peso (g) /total de sobrevivencia		

Cuadro 14. Etograma 4 para el registro de datos de la post-inoculación de dilución de veneno para bioensayo de DL₅₀ inmediatamente y una (1) hora después.

No. de grillo	Peso (g)	Sobrevivencia inmediatamente	Sobrevivencia 1 Hra.
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			

Cuadro 15. Etograma 5 para el resumen y registro del comportamiento de grillos post-inoculación del Etograma 3 y 4 (Cuadro 13 y 14).

No. de dosis	Dilución	#Grillos inyectados	Peso de los grillos (promedio)	No. de sobrevivientes inmediato. d.i.	No. de sobrevivientes 1 Hra.	No. de sobrevivientes 24 Hrs.
1	1					
2	0.1					
3	0.01					
4	0.001					
5	0.0001					

Nota: “d.i.” indica “después de inoculación”.

El Etograma 3 fue utilizado para registrar los datos obtenidos posterior a la inoculación de tratamiento para el bioensayo de la DL₅₀. Este etograma fue realizado para las dos muestras de veneno, y se realizó un Etograma 3 para cada dilución preparada (crudo, 1/10, 1/100, 1/1,000, 1/10,000: 4 etogramas en total). El registro de los datos para este etograma se hizo veinticuatro (24) horas después de la inoculación de las diferentes disoluciones. El Etograma 4 siguió la misma lógica que el Etograma 3, pero en esa tabla se registraron los datos para “inmediatamente” y “una (1) hora” después de la inoculación de disoluciones. Finalmente, en el Etograma 5 se anotó el resumen y promedios de los datos obtenidos del Etograma 3 y 4. Los datos del Etograma 5 fueron utilizados para el análisis estadístico de la DL₅₀ en la plataforma *R Studio*®.

Valores y cálculos para veneno de juvenil:

Cuantificación proteica BRADFORD: **125.82 µg/mL**

A. Determinación de la concentración de veneno inoculada en grillos por dilución.

- 1: 10; 0.1 → 125.58 mg/mL /10 = **12.58 µg/mL**
- 1: 100; 0.01 → 125.82 mg/mL /100 = **1.2558 µg/ mL**
- 1:1,1000; 0.001 → 125.82 mg/mL/1,000 =**0.1258 µg/mL**
- 1:10,000; 0.0001 → 125.83 mg/mL/10,000 = **0.012558 µg/mL**
-

Anexo 1. Cálculo para obtención de concentración de veneno inoculado en grillo por diluciones.

B. Multiplicación por el volumen inoculado (50 µL).

$$0.1 = 12.58 \text{ mg/mL} * 50 \text{ µL} = \mathbf{629.1133 \text{ µg}}$$

$$0.01 = 1.2558 \text{ mg/mL} * 50 \text{ µL} = \mathbf{62.91133 \text{ µg}}$$

$$0.001 = 0.12558 \text{ mg/mL} * 50 \text{ µL} = \mathbf{6.291133 \text{ µg}}$$

$$0.0001 = 0.012558 \text{ mg/mL} * 50 \text{ µL} = \mathbf{0.6291133 \text{ µg}}$$

Anexo 2. Cálculo para determinar concentración de veneno inoculado en tratamientos de diluciones por el volumen de inyección (50 µL).

C. Determinación de dosis inoculada por peso de grillo (g).

Los valores del **Anexo 2** – Sección B, fueron multiplicados por el peso individual de cada grillo (g). Al final, se calculó un promedio para cada dilución (marcado en color amarillo).

Los valores marcados en amarillo, junto con el número de muertes (Sobrevivencia si/no), fueron ingresados a la base de datos de *R Studio* para calcular la DL₅₀.

Cuadro 16. Cálculos para determinar la dosis exacta inoculada en los grillos.

Dilución 1::10			Valor de concentración de veneno (Anexo 2) * peso del grillo (g)
No. de grillo	Peso (g)	Sobrevivencia (Si/No)	
1	0.57	No	1103.707544
2	0.44	No	1429.802955
3	0.35	No	1797.466571
4	0.92	No	683.8188043
5	0.27	No	2330.049259
6	0.46	No	1367.637609
7	0.45	No	1398.029556
8	0.48	No	1310.652708
9	0.2	No	3145.5665
10	0.42	No	1497.88881
	0.456	0	1606.462032
Dilución 1::100			
No. de grillo	Peso (g)	Sobrevivencia (Si/No)	
1	0.54	No	116.502463
2	0.4	No	157.278325
3	0.84	Sí	74.89444048
4	0.34	Sí	185.0333235
5	0.45	Sí	139.8029556
6	0.31	No	202.9397742
7	0.37	No	170.0306216
8	0.36	No	174.7536944
9	0.24	No	262.1305417
10	0.27	No	233.0049259
	0.412	3	171.6371065
Dilución 1.:1000			
No. de grillo	Peso (g)	Sobrevivencia (Si/No)	
1	0.85	Sí	7.401332941
2	0.35	Sí	17.97466571
3	0.65	No	9.678666154
4	0.34	No	18.50333235
5	0.48	No	13.10652708
6	0.55	Sí	11.43842364
7	0.39	Sí	16.13111026
8	0.46	Sí	13.67637609
9	0.82	Sí	7.672113415
10	0.69	Sí	9.117584058
	0.558	7	12.47001317

Dilución 1.:10,000			
No. de grillo	Peso (g)	Sobrevivencia (Si/No)	
1	0.2	Sí	3.1455665
2	0.38	Sí	1.655561316
3	0.35	Sí	1.797466571
4	0.54	Sí	1.16502463
5	0.43	Sí	1.463054186
6	0.3	No	2.097044333
7	0.56	Sí	1.123416607
8	0.47	Sí	1.338538936
9	0.43	No	1.463054186
10	0.54	Sí	1.16502463
	0.42	8	1.64137519

Se realizaron los mismos cálculos (Anexo 1-2) para determinar las dosis exactas inoculadas por peso de los grillos (g) para la muestra de veneno de serpientes adultas.

Cuadro 17. Dosis de veneno inyectadas en grillos y número de muertes según la dilución para veneno de serpientes adultas.

Diluciones	Dosis µg/g	Número de grillos muertos
0.1	1399.843648	9
0.01	190.4627299	8
0.001	13.60484664	7
0.0001	1.440358362	4

Cuadro 18. Dosis de veneno inyectadas en grillos y número de muertes según la dilución para veneno de serpientes juveniles.

Diluciones (x)	Dosis µg/g	Número de grillos muertos
0.1	1606.462032	10
0.01	171.6371065	7
0.001	12.47001317	3
0.0001	1.64137519	2

```

#Script de prueba Juvenil
library("HelpersMG")
data<-data.frame(Doses=c(1606, 171, 12, 1),
Alive=c(0,3,7,8),
Dead=c(10,7,3,2))
LD50_logisric<-LD50(data,equation = "logistic")
predict(LD50_logisric,doses=c(106))
plot(LD50_logisric)

#Script de prueba Adulta
library("HelpersMG")
data<-data.frame(Doses=c(1399, 190, 13, 1),
Alive=c(1,2,3,6),
Dead=c(9,8,7,4))
LD50_logisric<-LD50(data,equation = "logistic")
predict(LD50_logisric,doses=c(13))
plot(LD50_logisric)

```

Anexo 3. *Script* utilizado para la obtención de la DL₅₀ en veneno de juveniles. Se utilizó el paquete “HelpersMG” y el modelo “logistic”. Se usó el mismo Script para calcular la DL₅₀ en el veneno de serpientes adultas.



Figura 43. Bioensayo de cuantificación de proteínas Bradford. “A.” Equipo y material para bioensayo. “B.” Preparación de solución madre a partir de BSA para soluciones estándar. “C.” Preparación de diluciones de veneno: 1:100 y 1:200. “D.” Mezcla de diluciones (60 μ L) con reactivo de Bradford (940 μ L) previo a lectura en espectrofotómetro.

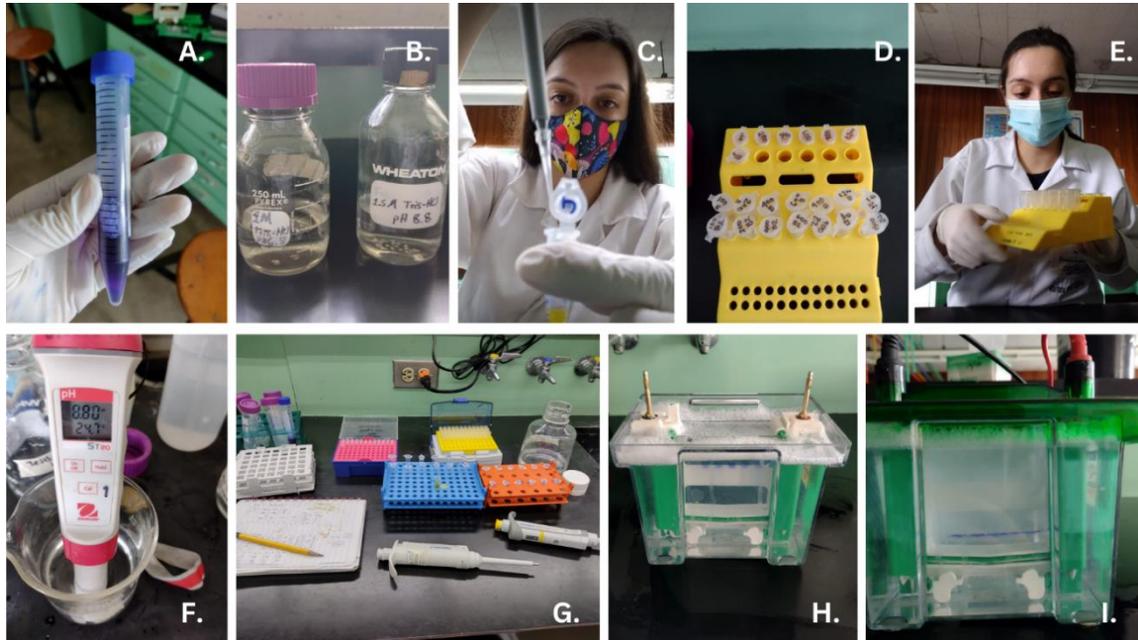


Figura 44. Metodología y trabajo de laboratorio para el bioensayo de SDS-PAGE. “A.” Preparación de Sample Buffer. “B.” Preparación de soluciones Tris-HCl pH 6.8 y 8.8. “C.” Manipulación de muestra de veneno de *M. occiduus* juvenil. “D.” y “E.” Preparación de diluciones de muestras de veneno. “F.” Ajuste de pH de las soluciones Tris-HCl. “G.” Material de trabajo para ejecución de bioensayo SDS-PAGE. “H.” Carga de muestras y de Running Buffer en la cámara de corrida. “I.” Muestras de veneno corriendo en la cámara de SDS-PAGE.

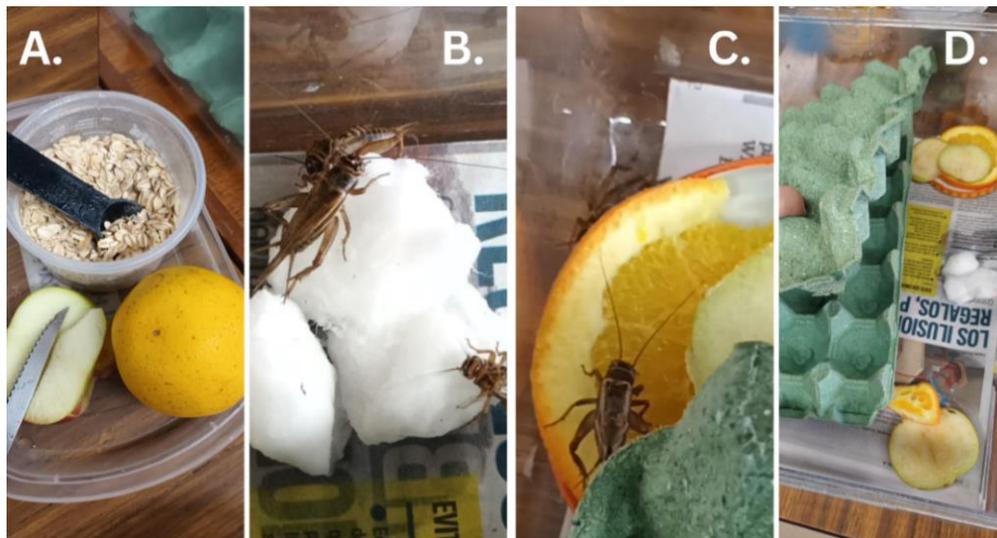


Figura 45. Provisiones para los grillos durante la etapa experimental. “A.” Avena, manzana y naranja como parte del alimento de los grillos. “B.” Algodones mojados como recurso de agua. “C.” Grillo alimentándose de naranja. “D.” Limpieza y cambio de material del recinto de los grillos.



Figura 46. Método de descarte para los materiales desechables con contacto al veneno o diluciones. “A.” Bolsa de Ecotermo® donde fueron descartados todos los materiales. “B.” Material contaminado tratado con etanol 90% y desechado en sus respectivos envases. Todo descarte estuvo rotulado con el tipo de contaminante, tipo de desecho, tratamiento y el contacto en caso de dudas del desecho (riv18403@uvg.edu.gt – Mariana Rivas Gálvez).



Figura 47. Metodología para pesar a los grillos en el bioensayo de DL_{50} . Se colocó un recipiente plástico sobre la pesa para evitar que el insecto escapara. El peso de cada individuo fue registrado en gramos (g) en la plataforma virtual *Microsoft Excel*®. Se usó una pesa marca *Ohaus*® modelo Scout-Pro de hasta 200 g.

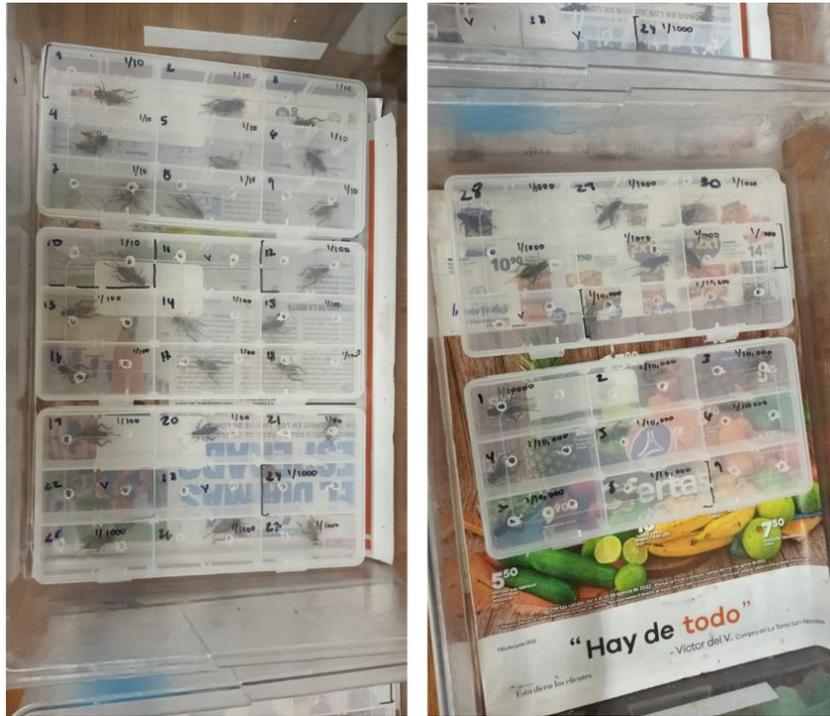


Figura 48. Grupo de grillos post-inoculación de tratamientos en cajas experimentales, rotuladas con el número de grillo y el tipo de tratamiento inyectado. Las cajas fueron colocadas en un lugar ventilado y fresco, de modo que quedaran descubiertas para la circulación del aire hacia dentro de las celdas por los hoyuelos de las tapaderas.



Figura 49. Visita al Zoológico la Aurora para la extracción de veneno de *M. occiduus*.

**Comité de Ética, para el Uso y Cuidado Animal de la Universidad del Valle de Guatemala
CEUCA – UVG**

Investigador Principal: Mariana Rivas Gálvez (tesista), Daniel Ariano (asesor)

Edificio y oficina: Departamento de Biología edificio C (UVG)

E-Mail: riv18403@uvg.edu.gt, dariano@uvg.edu.gt

Número de propuesta: I – 2022 (4)

Guatemala, 8 de julio 2022.

Estimado(s) investigador(es),

Por este medio se hace constar que la propuesta de investigación titulada: "Caracterización toxinológica del veneno de la serpiente mano de piedra (*Metlapilcoatlus occiduus*: Viperidae) y su variación ontológica", ha sido evaluada por miembros del comité de Ética, para el Uso y Cuidado Animal de la Universidad Del Valle de Guatemala (CEUCA – UVG).

Se ha realizado una revisión del protocolo con el fin de asegurar el cuidado y uso ético a los animales que serán utilizados para cumplir con los propósitos de la investigación. Se ha determinado que se cumple con los requisitos necesarios, así como también se ha cumplido con los procedimientos y lineamientos descritos por el comité.

Por este medio se le informa que se autoriza realizar las prácticas con animales tal y como se describen en el protocolo final sometido al CEUCA UVG, por un período de un año a partir de la fecha de la presente carta. Se le solicita que, si hubiese necesidad de hacer cualquier otra modificación a lo descrito en la propuesta, se comunique de nuevo con el comité para que dichas enmiendas sean evaluadas de manera que se pueda garantizar que se cumple a cabalidad con los lineamientos del CEUCA-UVG. Asimismo, rogamos que, al finalizar su trabajo de investigación, se comparta con el comité los resultados o publicaciones derivadas de la investigación.

Sin otro particular quedo a sus órdenes,



MV Vanessa Granados B

Médico Veterinario Colegiado 997

CEUCA - UVG Comité de Ética, Uso y Cuidado Animal Universidad del Valle de Guatemala.

Anexo 4. Carta de autorización para el presente trabajo del Comité de Bioética UVG para trabajar extracciones de veneno de *M.occiduus*.

Anexo 5. Recomendaciones para bioensayo de SDS-PAGE

- A.** Para geles de SDS PAGE, es recomendable diluir más el veneno de *M.occiduus* juvenil para evitar que se formen manchas en el gel y no se aprecien las bandas de proteína. Se sugiere diluir la muestra 1:30 y/o 1:45, siendo el volumen mayor agua UP.
- B.** Es posible aumentar la concentración de solución SDS para promover una mejor separación de las bandas proteicas en el gel.
- C.** Si se necesita que el gel (Resolving o Stacking) polimerice de manera rápida, se puede aumentar la cantidad de TEMED hasta 20 μ L. De igual manera, puede aumentarse la concentración de APS de 10% a 20%. Evitar aumentar los valores de ambos reactivos, escoger incrementar las medidas de uno solo. No se debe sobrepasar de dicho volumen (TEMED) y porcentaje (APS) para evitar que haya una “sobre-gelificación” y que las bandas ya no migren por el gel.
- D.** Esperar el tiempo indicado por el protocolo para la polimerización del Resolving Gel. De lo contrario, al colocar el Stacking Gel, se mezclarán entre sí y las bandas no migrarán.
- E.** Cargar los pozos del gel alternados, de manera que un pozo quede con muestra y otro no. Esto evitará que las muestras se mezclen entre sí y se pierda la pureza de esta.
- F.** Debe evitarse cargar la escalera molecular en los pozos de la esquina. En ocasiones, esta tiende a doblarse o su contenido se pasa al siguiente espacio (pozo) y ya no se forman las bandas de esta.
- G.** Si el *Sample Buffer* presenta un color amarillo, indica que el pH del reactivo no está ajustado. Agregar solución Tris-HCL pH 6.8 para llevar al pH adecuado, esto automáticamente cambiará el color a morado-purpura.
- H.** Ajustar el pH del Running Buffer a 8 (básico).
- I.** Si las bandas salen muy teñidas a pesar de haber diluido las muestras en más volumen de solvente, se debe disminuir la cantidad del reactivo de azul de Coomassie. También se puede optar por agregar menos cantidad de mercaptoetanol en el *Sample Buffer*

- J.** La solución de distinción debe estar compuesta por ácido acético glacial, metanol y agua. Con otros componentes, puede no alcanzarse una buena limpieza del exceso de colorante.
- K.** No apagar, pausar o aumentar el tiempo de corrida continuamente la fuente de poder a la cual está conectada la cámara de gel SDS-PAGE (a menos que sea necesario). Es recomendable esperar a que esta termine el periodo de tiempo programado, y luego volver a correr el gel si las bandas no bajaron en su totalidad. De lo contrario, desconectar, pausar o apagar el proceso puede alterar la forma de las proteínas y doblar la dirección de estas.
- L.** Tratar de mantener los periodos de 35 a 90 minutos de corrida y 100-190 volteos como máximo para que la integridad de las proteínas y las bandas se conserve y no salgan onduladas, alargadas, barridas, etc.
- M.** Recordar que el voltaje y amperaje no pueden ajustarse al mismo tiempo, se debe escoger un parámetro para la corrida de geles.