



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Síntesis de alfa neurotoxinas como antígenos universales
contra la mordedura de elápidos

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Guillermo de la Rosa Hernández

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Gerardo Corzo Burguete.
Instituto de Biotecnología, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Nina Pastor Colón
CIDC, UAEM

Dr. Alejandro Alagón Cano
Instituto de Biotecnología, UNAM.

Cuernavaca, Morelos. Junio, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“Las mordeduras más peligrosas son las del calumniador entre los animales salvajes
y las del adulator entre los animales domésticos.”

-Diógenes de Sinope (412-323 a.C).

Agradecimientos

El fruto de la presente tesis es el resultado de un trabajo constante que involucró el apoyo económico, intelectual y el técnico de muchas personas e instituciones.

Agradezco a la UNAM y a su Instituto de Biotecnología (IBT); a los proyectos DGAPA-UNAM No. IN203118 y DGAPA PAPIIT No. IN207218; al CONACyT por el apoyo económico a través del proyecto SEP-CONACyT No. 240616 y por la beca para estudios de doctorado No. 367094; y al Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica por todas las facilidades otorgadas.

Agradezco al Dr. Gerardo Corzo Burguete la impetuosa dirección, la asesoría y la tutoría del presente proyecto de doctorado; además de reconocer la libertad y confianza que depositó en mí a través del respeto. Agradezco al Dr. Alejandro Alagón Cano tanto su valiosa tutoría como también su función de guía crítica en el planteamiento y el desarrollo del trabajo experimental de la presente tesis. De igual manera, reconozco y agradezco la tutoría, la asesoría académica y el profundo interés brindado por la Dra. Nina Pastor Colón al proyecto de doctorado.

Agradezco al comité evaluador y al jurado del examen de doctorado integrado por: Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos, Dra. Martha Pedraza Escalona, Dr. Ismael Secundino Velzaquez, Dra. Viviana Valadez Graham y Dr. Humberto Lanz Mendoza. De igual manera, reconozco su esfuerzo por enriquecer el trabajo escrito, por las críticas pertinentes y por el apoyo académico brindado.

Agradezco el apoyo técnico otorgado por la M en C Herlinda Catalina Clement Carretero, Dr. Fernando Zamudio Zuñiga, M en C Alejandro Olvera Rodríguez y al Biol. Felipe Olvera Rodríguez. Igualmente a la Ing. Verónica Albiter Hernández y Mario A. Caro Bermúdez de la Unidad de Escalamiento y Planta Piloto, así como a la M.V.Z M. Elena Elizabeth Mata Moreno de la Unidad de Bioterio; al M.A. Mario Trejo Loyo y Mtro. Martín Patiño Vera de la Secretaría de Vinculación. Por último, reconozco y agradezco la enorme ayuda y soporte técnico proporcionado por María del Carmen Martínez Segura, Angélica Linares Labastida y Ricardo Mondragón Cortés; y al Ing. Jalil Saab H., Lic. J. Antonio Bolaños y Gloria Villa Herrera de la secretaría académica del IBT.

Finalmente, agradezco a todos los integrantes del grupo de trabajo Corzo-Alagón y al personal del Rancho Ojo de Agua (Puebla); y a mis seres amados, por ayudarme a crear un ambiente interno de armonía, que sirvió de vehículo para salir de la cenogosa desesperanza hacia el campo vívido y diáfano del amor al conocimiento.

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE GRÁFICAS	8
1. RESUMEN	9
2. INTRODUCCIÓN	10
2.1 FAMILIA DE LAS TOXINAS DE TRES DEDOS	12
2.1.1 <i>Funciones</i>	12
2.1.2 <i>Otras funciones</i>	23
2.2 ANTIVENENOS	24
2.3 MORDEDURA DE SERPIENTE Y USO DE ANTIVENENOS	28
2.4 ENVENENAMIENTO POR ELÁPIDOS.....	31
2.5 PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN <i>E. COLI</i>	35
3. JUSTIFICACIÓN	40
4. HIPÓTESIS	42
5. OBJETIVOS	43
5.1 OBJETIVOS GENERALES	43
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	43
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	44
7. MATERIALES Y MÉTODOS	45
7.1 OBTENCIÓN DE SECUENCIAS PRIMARIAS	45
7.2 ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS	46
7.3 CONSTRUCCIÓN DE GENES	46
7.4 SÍNTESIS DE GENES	46
7.5 SÍNTESIS QUÍMICA	50
7.6 <i>E. COLI</i> , VECTORES Y ENZIMAS	50
7.7 CONSTRUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL VECTOR	51
7.8 TRANSFORMACIÓN	51
7.9 MEDIOS DE CULTIVO	52
7.10 CONDICIONES DE SELECCIÓN Y EXPRESIÓN	52
7.11 PROTEÍNA SOLUBLE, CUERPOS DE INCLUSIÓN Y PURIFICACIÓN.....	53
7.12 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS E INMUNODETECCIÓN.....	53
7.13 DOSIS LETAL MEDIA	54
7.14 ESQUEMAS DE INMUNIZACIÓN	54
7.15 ENSAYO INMUNOADSORBENTE ACOPLADO A ENZIMA (ELISA).....	56
7.16 EFECTIVIDAD DE LOS SUEROS	57
8 RESULTADOS	59
8.1 ALFA NEUROTOXINAS DE IMPORTANCIA MÉDICA	59
8.2 TOXINAS CON SECUENCIA CONSENSO	59
8.3 α -NEUROTOXINAS DE CADENA LARGA Y PÉPTIDOS CONSENSO.....	62
8.4 α -NEUROTOXINAS DE CADENA CORTA, <i>ScNTX</i>	81
9 DISCUSIÓN	93
9.1 PARTICULARIDADES DE LAS TOXINAS CONSENSO <i>Ntx1</i> , <i>Ntx2</i> Y <i>LcNtx</i>	94
9.2 PÉPTIDOS SINTÉTICOS	95
9.3 TOXINA CONSENSO DE CADENA CORTA: <i>ScNTX</i>	97

9.4	INMUNÓGENO RECOMBINANTE: <i>ScNTX</i>	99
9.5	ANTIVENENO EXPERIMENTAL	101
10	CONCLUSIONES	107
11	BIBLIOGRAFÍA	108
12	MATERIAL SUPLEMENTARIO	122
13	GLOSARIO	132

Índice de figuras

FIGURA 1. ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES DE TOXINAS DE TRES DEDOS	19
FIGURA 2. ESTRUCTURA DEL RECEPTOR DE ACETIL COLINA.....	20
FIGURA 3. RECEPTOR DE ACETIL COLINA Y ALFA-COBRATOXINA	21
FIGURA 4. SUSTANCIAS ACTIVAS DE LOS ANTIVENENOS	26
FIGURA 5. ESQUEMA DE LA CONSTRUCCIÓN PLASMIDO/TOXINA	47
FIGURA 6. ALINEAMIENTO DE ALFA NEUROTOXINAS DE CADENA LARGA	60
FIGURA 7. ALINEAMIENTO DE ALFA NEUROTOXINAS DE CADENA CORTA	61
FIGURA 8. NTX1 EN M15.....	63
FIGURA 9. NTX1 EN M15: EFECTO DE LA TEMPERATURA	64
FIGURA 10. NTX1: FRACCION SOLUBLE E INSOLUBLE.....	65
FIGURA 11. PURIFICACIÓN DE LA NTX1.....	66
FIGURA 12. NTX2: TAMIZADO DE EXPRESIÓN EN ORIGAMI.	67
FIGURA 13. NTX2: EFECTO DEL INDUCTOR	68
FIGURA 14. NTX2: INMUNODETECCIÓN.	69
FIGURA 15. NTX2: EXPRESIÓN EN BL21	70
FIGURA 16. NTX2: INMUNODETECCIÓN EN BL21	71
FIGURA 17. NTX2: CUERPOS DE INCLUSIÓN Y PROTEÍNA SOLUBLE.	71
FIGURA 18. LcNTX EN ORIGAMI. SDS-PAGE 15%.....	72
FIGURA 19. LcNTX: CINÉTICA DE EXPRESIÓN	73
FIGURA 20. LcNTX: CUERPOS DE INCLUSIÓN.	73
FIGURA 21. LcNTX: RP-HPLC.....	74
FIGURA 22. LcNTX: SHUFFLE T7	75
FIGURA 23. LcP1: PURIFICACIÓN.....	76
FIGURA 24. LcP1. RP-HPLC.....	76
FIGURA 25. LcP2: PURIFICACIÓN.....	77
FIGURA 26. LcP2. RP-HPLC.....	77
FIGURA 27. ScNTX: TAMIZADO DE EXPRESIÓN.....	81
FIGURA 28. ScNTX: INMUNODETECCIÓN.....	81
FIGURA 29. ScNTX: FRACCIÓN SOLUBLE.....	82
FIGURA 30. ScNTX: CUERPOS DE INCLUSIÓN.....	82
FIGURA 31. ScNTX: MEJORAMIENTO DE LA EXPRESIÓN	83
FIGURA 32. ScNTX: CUERPOS DE INCLUSIÓN SOLUBILIZADOS.	83
FIGURA 33. ScNTX: RP-HPLC.....	84
FIGURA 34. CONEJO ANTI-ScNTX: REACTIVIDAD..	86

FIGURAS COMPLEMENTARIAS.

FIGURA 35. GÉNERO MICRURUS.....	122
FIGURA 36. GÉNERO DENDROASPIS.....	123
FIGURA 37. NAJAS AFRICÁNAS (ESCUPIDORAS).....	124
FIGURA 38. NAJAS AFRICÁNAS (ESCUPIDORAS)	125
FIGURA 39. NAJA HAJE	126
FIGURA 40. NAJA Y WALTERINNESIA.....	127
FIGURA 41. NAJAS ASIÁTICAS.....	128
FIGURA 42. OPHIOPHAGUS HANNAH.....	129

Índice de tablas

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS DE LAS ALFA-NEUROTOXINAS.....	16
TABLA 2. ANTIVENENOS COMERCIALES CONTRA ELÁPIDOS.....	27
TABLA 3. CEPAS DE ESCHERICHIA COLI MÁS USADAS.....	38
TABLA 4. NEUROTOXINAS DE CADENA LARGA Y PÉPTIDOS DERIVADOS	60
TABLA 5. NEUROTOXINAS DE CADENA CORTA Y CONSENSO DERIVADO.....	61
TABLA 6. ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN DE CONEJOS CON LCP1 Y LCP2	55
TABLA 7. ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN DE CONEJOS CON LA ScNTX.....	55
TABLA 8. ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN DE CABALLOS CON LA ScNTX.....	56
TABLA 9. ScNTX: EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA.....	84
TABLA 10. EFECTIVIDAD DE LOS SUEROS DE CONEJO ANTI-ScNTX	88
TABLA 11. EFECTIVIDAD DE LOS SUEROS DE CABALLO ANTI-ScNTX	90
TABLA 12. EFECTIVIDAD DEL ANTIVENENO EXPERIMENTAL.....	92

Índice de gráficas

GRÁFICA 1. EVOLUCIÓN DE LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS DE CONEJO CONTRA LCP1	78
GRÁFICA 2. EVOLUCIÓN DE LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS DE CONEJO CONTRA LCP2..	78
GRÁFICA 3. ANTI-LCP1 VS N. HAJE.....	79
GRÁFICA 5. ANTI-LCP1 VS D. POLYLEPIS.	GRÁFICA 6. ANTI-LCP1 VS O. HANNAH.80
GRÁFICA 7. ANTI-LCP2 VS N. HAJE.	GRÁFICA 8. ANTI-LCP2 VS D. POLYLEPIS.80
GRÁFICA 9. ANTI-LCP2 VS O. HANNAH.....	80
GRÁFICA 10. ScNTX: DL ₅₀	85
GRÁFICA 11. TÍTULOS DE ANTICUERPOS DE CONEJO ANTI-ScNTX.	86
GRÁFICA 12. ANTI-ScNTX VS ScNTX.	GRÁFICA13. ANTI-ScNTX VS MLATA187
GRÁFICA 14. RECONOCIMIENTO IN VITRO DE α -NEUROTOXINAS EN VENENOS DE ELÁPIDOS..	87
GRÁFICA 15. ScNTX: TÍTULOS DE ANTICUERPOS DE CABALLO.....	89

1. Resumen

Los antivenenos son el pilar principal en la terapia del envenenamiento por mordeduras de serpientes. En los venenos de elápidos hay toxinas, como las alfa neurotoxinas tanto de cadena larga como de cadena corta, que son bastante abundantes y que juegan un papel crítico en el proceso de envenenamiento, pero que son pobremente neutralizadas por los antivenenos actuales.

El objetivo de la presente tesis fue el diseño de alfa neurotoxinas de secuencia consenso con mejores capacidades inmunogénicas para la elaboración de un antiveneno universal contra la mordedura de elápidos. Las secuencias consenso se obtuvieron con base en múltiples alineamientos de secuencias de alfa neurotoxinas. Como resultado se generaron tres secuencias consenso de alfa neurotoxinas de cadena larga nombradas *NTx1*, *Ntx2* y *LcNtx*, y de éstas se obtuvieron dos péptidos (*LcP1* y *LcP2*), los cuales se sintetizaron químicamente; y una secuencia consenso de cadena corta denominada *ScNtx*.

Sólo los péptidos sintéticos y la *ScNtx* se emplearon como inmunógenos. Los análisis *in vitro* e *in vivo* revelaron que los sueros hiperinmunes anti-*LcP1* y anti-*LcP2* tuvieron la capacidad de reconocer las alfa neurotoxinas en los venenos de diferentes especies de elápidos, pero no los neutralizaron. Los sueros anti-*ScNtx*, por su parte, tuvieron la capacidad de reconocer y neutralizar el efecto letal de alfa neurotoxinas puras y, además, de venenos de serpiente de los géneros *Dendroaspis* (África), *Micrurus* (América), *Naja* (África y Asia), *Ophiophagus* (Asia) y *Walterinnesia* (Medio Oriente).

Los resultados obtenidos han generado nuevo conocimiento, principalmente, sobre los campos de la inmunología y toxicología. Por una parte, muestran la verosimilitud de usar proteínas recombinantes sintéticas con secuencias consenso como inmunógenos universales; y ayudan a develar el papel de las neurotoxinas de tipo I y II en el desarrollo del envenenamiento. Finalmente, el uso de inmunógenos recombinantes con secuencias consenso, como la *ScNtx*, es un enfoque innovador en el diseño de inmunógenos para desarrollar antivenenos mejor dirigidos, de amplio espectro, más eficaces, y como consecuencia, con alto valor terapéutico.

2. Introducción

El veneno de las serpientes venenosas es una mezcla compleja de moléculas farmacológicamente activas. Su estudio se ha enfocado en tratar de entender, determinar y elucidar su mecanismo de acción. Las toxinas más abundantes y/o letales de los venenos han sido el blanco principal de dichos estudios; de manera particular, encontrar la manera y las vías adecuadas para neutralizar su toxicidad y efectos adversos ha sido el campo de estudio mejor abordado. En la actualidad, muchas de las toxinas han ayudado en el desarrollo de herramientas específicas de investigación que han sido útiles para entender y dilucidar procesos fisiológicos, tanto a nivel celular como molecular. También, estudios vanguardistas visualizan el desarrollo de potenciales fármacos basados en la estructura y función de las toxinas del veneno de serpientes (Kini and Doley, 2010).

La información que se ha generado sobre los venenos de serpientes es vasta. Hasta la fecha, las toxinas descritas para dichos venenos se han agrupado en superfamilias de proteínas. La clasificación viene gobernada no solo por su actividad biológica, sino también por su alta homología en secuencia y estructura. Es decir, las proteínas dentro de cada familia comparten una similitud sobresaliente en sus estructuras primarias, secundarias y terciarias. No obstante, las toxinas dentro de cada superfamilia, al tiempo que comparten residuos de amino ácidos y conformaciones espaciales, pueden diferir entre si en sus efectos farmacológicos y/o biológicos, lo cual es atribuible a cambios puntuales en posiciones específicas: tal es caso de las toxinas de tres dedos, 3FTxs y su amplio repertorio farmacológico (Kini, 2002).

La disfunción neurológica causada por las toxinas de tres dedos, principalmente por las alfa neurotoxinas (α -neurotoxinas), es un factor de riesgo para el sector salud público en muchas partes del mundo. Estas toxinas actúan en la placa neuromuscular alterando la comunicación nervio-músculo, ya que impiden que el neurotransmisor acetil colina pueda ejercer su acción. En términos médicos, la manifestación clínica más importante es la parálisis muscular, la cual se manifiesta en diferentes grados, como: paraplejia y cuadriplejia; por lo tanto, cuando el grado de envenenamiento es alto y los músculos importantes para la respiración como lo son los intercostales y el diafragma se ve afectan, el riesgo de muerte es inminente (Kularatne and Senanayake, 2014).

El veneno de las serpientes de la familia *Elapidae* son la fuente principal de las α -neurotoxinas (Tasoulis and Isbister, 2017). Como ejemplo tenemos a las cobras (*Naja sp.*), mambas (*Dendroaspis sp.*), taipanes (*Oxyuranus sp.*) y serpientes de coral (*Micrurus sp.*), por mencionar algunos géneros de esta familia. Muchos de estos ofidios tienen una distribución geográfica que se yuxtapone con las zonas más pobladas del orbe terrestre, particularmente a nivel ecuatorial como la zona del Sureste asiático, y otras regiones

remotas del África Subsahariana. Su distribución y el sector socio-económico afectado, junto con la carencia de antídotos (antivenenos) y la pobre atención médica básica, hacen de las serpientes venenosas y particularmente de los elápidos un riesgo latente para la salud humana (Stock et al., 2007).

Los antivenenos juegan el papel central en el tratamiento del envenenamiento por mordedura de serpiente. Son el único fármaco considerado como eficaz para neutralizar y, en algunos casos, revertir el curso del envenenamiento (Arnold, 2016). Hasta la fecha, se han generado antivenenos contra todos los venenos de las serpientes consideradas por la OMS como de alta importancia médica, dada su morbilidad y mortalidad que generan (<http://apps.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms/database/>). No obstante, la efectividad de muchos de estos antivenenos es baja, principalmente la de aquéllos diseñados para tratar los venenos con actividades neurotóxicas, como el de los elápidos, por ejemplo (Calvete, 2013; Laustsen et al., 2015a). Dentro de este contexto, un antiveneno poco efectivo complica el tratamiento: es necesario el uso de un mayor número de viales, lo cual tiene repercusiones en todos los niveles, desde los referentes a los económicos y técnicos, hasta en la salud del paciente, ya que el riesgo de una reacción adversa hacia el antiveneno aumenta de manera directa con la cantidad de viales administrados (Boyer et al., 2013).

En resumen, las toxinas de la superfamilia de tres dedos son un blanco importante en la generación, la producción y el mejoramiento de los antivenenos. Las α -neurotoxinas, particularmente, son pobremente reconocidas y sus efectos tóxicos débilmente neutralizados. Cualquier estudio enfocado en el mejoramiento de antivenenos tendrá como meta principal neutralizar de manera eficaz su acción tóxica y letal. En el presente trabajo se describe y se detalla el enfoque y las vías que seguimos para el desarrollo de un antiveneno experimental adecuado para tratar envenenamientos cuyo efecto protagónico es la neurotoxicidad dada por las α -neurotoxinas. Finalmente, nuestra contribución abre un nuevo sub-campo de estudio, el cual considera el diseño racional de α -neurotoxinas, o cualquier otra toxina de importancia, que comprenden regiones altamente conservadas (implicadas en su actividad) y mejores capacidades inmunogénicas. Los resultados muestran que es posible desarrollar inmunógenos que ayudan a generar inmunoglobulinas de origen animal, eficaces y de amplio espectro para el tratamiento de envenenamientos causados por mordedura de elápidos a nivel mundial

2.1 Familia de las toxinas de tres dedos

Las toxinas de tres dedos o 3FTxs (“three-finger toxins”), son una superfamilia de proteínas que tienen una gran similitud estructural y una alta identidad en secuencia (Kozminsky-Atias and Zilberberg, 2012). Esencialmente, están conformadas por una región globular altamente condensada y unida por cuatro puentes disulfuro (“*core*”) –sin estructura secundaria reportada-, y otra región que contiene tres bucles (“*loops*”) estabilizados por 5 hojas beta anti paralelas (“antiparallel β -sheet”) (Utkin, 2013). Las posiciones de las cisteínas, que dan lugar a la formación de los puentes disulfuro, y algunos aminoácidos dentro de la región del “*core*” y de la región de los “*loops*”, están conservados en prácticamente todos los miembros; además, algunas 3FTxs presentan un quinto puente disulfuro en alguno de los tres bucles. En términos de secuencia primaria, se sabe que mutaciones en zonas específicas, principalmente fuera de la región del *core*, tienen como consecuencia alteraciones en sus actividades biológicas, otorgándoles nuevas funciones o abrogando su actividad nativa, igualmente, influyen en la afinidad por su receptor, y en su mecanismo de acción (Kini, 2011). Interesantemente, dado que mutaciones en sitios específicos, principalmente en la zona de los *loops*, no altera su estructura (Ricciardi, 2000), las 3FTxs se han propuesto como templados para el diseño de nuevas moléculas en el campo de la ingeniería de proteínas, en el desarrollo posibles productos terapéuticos o como herramientas en la investigación científica (Fruchart-Gaillard et al., 2012; Gilquin et al., 2003).

2.1.1 Funciones

Las toxinas de tres dedos pueden ejercer un amplio espectro de funciones. La cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear, junto con ensayos farmacológicos y bioquímicos, nos han llevado a comprender con mayor detalle la relación que existe entre ellas, las bases que rigen su función y las propiedades físico-químicas que gobiernan su estabilidad estructural. En la **Figura 1** se muestra la estructura canónica de la superfamilia y los miembros que la componen.

A. Bloqueadores de canales de calcio

Toxinas como la FS2, asilada del veneno de *Dendroaspis polylepis*, exhiben una alta especificidad por canales de calcio tipo L (“L-type calcium channel”), a los cuales bloquea; por tanto, inhiben la contracción del músculo liso y afecta ciertas funciones cardíacas. La **Figura 1A** representa uno de muchos trabajos de difracción de rayos X. Algunos de ellos con cristales de la FS2 unida a su blanco, nos deja en claro que, de los 60 amino ácidos que contiene, sólo la región involucrada en la interacción toxina-receptor está inmersa en el tercer loop (Albrand et al., 1995).

B. Citotoxinas/cardiotoxinas.

Por su parte, las citotoxinas, aisladas principalmente del veneno de serpientes del género *Naja*, producen daños cruciales a diferentes tipos celulares como a los eritrocitos, a las células musculares, a las cardíacas y a las cancerígenas. El mecanismo de acción, así como sus receptores, no están completamente elucidados; sin embargo, existen fuertes indicios de que dichas toxinas atacan la membrana celular (PDB-ID: 1TGX) dando como resultado su lisis y muerte. De sus 60 aminoácidos, los que componen la región del primer *loop* están implicados en su función, aunque algunos residuos cargados, así como algunos hidrofóbicos en posiciones clave, que están distribuidos en los tres bucles, son igualmente importantes para su actividad (Bilwes et al., 1994; Kini and Doley, 2010; Konshina et al., 2006; Wang et al., 2006) (**Figura 1B**).

C. Inhibidores de acetilcolinesterasas

Se han descrito toxinas con la capacidad de disminuir la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa (enzima que hidroliza al neurotransmisor acetilcolina) de forma reversible, lo que provoca la acumulación del neurotransmisor en la hendidura pre-sináptica. El aumento de acetilcolina en la placa neuromuscular provoca fasciculaciones musculares o crispamientos espasmódicos de los músculos. Es por ello que en la literatura, se les llama a dichas toxinas como *fasciculinas* (**Figura 1C**) (Marchot et al., 1998). Estas toxinas 61 residuos de aminoácidos, de los cuales, según las estructuras cristalográficas, los presentes en el primer *loop* y parte del segundo, son funcionalmente importantes para la interacción toxina-enzima (Campbell and Lamar, 2004; Waqar and Batool, 2015). Hasta la fecha, sólo se han encontrado en el veneno de serpientes del género *Dendroaspis* (Lauridsen et al., 2016).

D. Bloqueadores de receptores β -adrenérgicos.

Un hallazgo muy importante se dio con una toxina aislada del veneno de *Ophiophagus hannah* (“*King cobra o cobra real*”) (CTX; número de acceso: AAR10440). Su secuencia es similar (~50%) a las secuencias reportadas para las citotoxinas/cardiotoxinas canónicas (**Figura 1D**), por lo que se consideró como citotoxina; sin embargo, en estudios posteriores se demostró que carece de actividad hemolítica y anticoagulante (actividades atribuidas a las citotoxinas/cardiotoxinas). De modo interesante, en preparaciones *in vitro*, la CTX mostró una gran afinidad por los receptores adrenérgicos $\beta_1 - \beta_2$. Además, en experimentos *in vivo* se demostró que genera cronotropismo negativo de una manera dosis dependiente, lo que confirmó su acción β -bloqueadora (Rajagopalan et al., 2007). También, se demostró que esta toxina es menos potente que las citotoxinas/cardiotoxinas y otras toxinas de tres dedos. Hasta la fecha no

existen estudios con otras toxinas de secuencia similar que ya han sido reportadas para el propio veneno de *O. hannah*, ni para otras toxinas provenientes de otros géneros de elápidos. No obstante, se intuye por similitud de secuencia que, teniendo la misma longitud (63 aminoácidos) y sólo uno o dos cambios puntuales, dichas toxinas tendrán la misma función β -bloqueadora (Lauridsen et al., 2016).

E. Toxinas muscarínicas

Las toxinas muscarínicas, como la mostrada en la **Figura 1F**, es uno de los grupos de toxinas de tres dedos más ampliamente estudiadas hasta la fecha. Como su nombre lo indica, este grupo de proteínas reconocen a los receptores muscarínicos y los inhiben. Los receptores de acetil colina muscarínicos están implicados en la modulación de procesos fisiológicos esenciales como: la sincronización del ritmo cardiaco, la vasodilatación, comunicación en el sistema nervioso central, la activación de glándulas endócrinas y exocrinas, el aprendizaje, la visión, entre otras (Fuenzalida et al., 2016; Groleau et al., 2015). En términos generales, las toxinas muscarínicas forman parte de un grupo muy pequeño de toxinas que tienen como blancos receptores acoplados a proteínas G. Ello las hace particularmente atractivas para el desarrollo de nuevos fármacos que ayuden a controlar la modulación por acetilcolina en procesos fisiológicos –como los antes mencionados- en condiciones patológicas. Las toxinas descritas hasta el momento contienen entre 65 y 66 residuos de aminoácidos. Las más estudiadas las han aislado del veneno de serpientes del género *Dendroaspis*. Son similares en secuencia a las toxinas β -adrenérgicas; sin embargo, su acción es diferente. Las toxinas muscarínicas son inhibidores alostéricos del receptor de acetilcolina muscarínico con afinidades nano y micromolares (Servent et al., 2011). Como información igualmente relevante, es vital subrayar su alta selectividad, ya que algunas toxinas como la MT1 son capaces de discriminar entre subtipos de receptores y ejercer funciones opuestas. Por ejemplo, la MT1 antagoniza al subtipo M4, al tiempo que funciona como agonista del subtipo M1 (Sanchez et al., 2009). Estudios como el realizado con la toxina MT7, que antagoniza de manera alostérica al subtipo M1, han brindado información importante sobre los aminoácidos importantes para la interacción e inhibición del receptor. Por ejemplo, se sabe que el Trp10 y la Arg52, presentes en el primer y tercer *loop*, respectivamente, actúan en sincronía con el Tyr36 del segundo *loop* para unirse específicamente al receptor, y adicionalmente la Arg34 y Met35, en la misma región, son determinantes para estabilizar dicha interacción (Fruchart-Gaillard et al., 2012, 2008).

F. α -neurotoxinas

Las α -neurotoxinas tienen dos características fundamentales: por una parte, poseen una alta afinidad y especificidad por ciertos subtipos del receptor de acetilcolina muscarínico (Nirthanan and Gwee, 2004); y por otra, son las más abundantes y las más letales de todos los miembros de las 3FTx (Lauridsen et al., 2017). Son también referidas en la literatura como toxinas curare-miméticas, ya que tienen el mismo efecto que el alcaloide curare (Antil et al., 1999). Con respecto a su longitud, dichas toxinas contienen entre 60 y 75 residuos de amino ácidos y, al igual que todos los miembros de dicha superfamilia, presentan un núcleo hidrofóbico que está consolidado por cuatro puentes disulfuro, del cual protruyen tres péptidos (“*loops*”) estabilizados por cinco estructuras beta antiparalelas (Barber et al., 2013).

Las α -neurotoxinas se clasifican con base en su secuencia primaria y el número de residuos de cisteínas que presentan. Actualmente, se reconocen en la literatura tres tipos: α -neurotoxinas de cadena corta (Tipo I), α -neurotoxinas de cadena larga (Tipo II) (**Figura 1H**) y α -neurotoxinas no convencionales (Sunagar et al., 2013).

Las α -neurotoxinas post sinápticas de tipo I, como la mostrada en la **Figura 1G**, también referidas como de cadena corta, consisten de una cadena polipeptídica que contiene entre 60 y 62 amino ácidos; ocho residuos de cisteína y una masa molecular que oscila de entre 6-7 kDa (Teixeira-Clerc et al., 2002). Un rasgo importante que las ha definido es su capacidad de abrogar la comunicación nervio-músculo mediada por el neurotransmisor acetilcolina sobre los subtipos musculares de los receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChRs) con un grado de reversibilidad variable, como puede observarse en los datos presentados en la **Tabla 1** (Teixeira-Clerc et al., 2002). Es importante mencionar que los subtipos de neurotransmisores más usados en su mayoría provienen de anguilas o rayas eléctricas, particularmente del género *Torpedo*, que se han clonados y expresado en células especializadas como HEK. Muchos estudios sugieren que debido a la alta identidad en secuencia entre los receptores *Torpedo* y de humano, los resultados generados con los primeros pueden ser atribuibles, por extensión, a los últimos. Es por ello que existen una vasta cantidad de trabajos realizados con receptores de anguila, cuyas constantes de asociación-disociación se cree que son las mismas que se pueden obtener trabajando con receptores de humano (Servent et al., 1997) -dichos valores son los únicos que actualmente están disponibles en la literatura especializada y que se listan en la **Tabla 1**.

Las neurotoxinas de cadena larga, por otro lado, contienen entre 66 y 75 residuos de aminoácidos. Tienen una masa molecular que varía de entre 7 y 9 kDa, y contienen cinco puentes disulfuro; cuatro de los cuales están en las mismas -o cercanas- posiciones

que en las α -neurotoxinas de cadena corta, y un quinto puente disulfuro en la punta del “loop” 2, representado en la **Figura 1H**. Al igual que las de cadena corta, las α -neurotoxinas de cadena larga se unen con alta afinidad (K_d aproximada de $10^{-9} - 10^{-11}$ M) al nAChR ($\alpha 1$) $_2$ $\beta 1$ γ δ muscular *Torpedo*. Adicionalmente, tienen un quinto puente disulfuro –presente en la punta *loop* II- que le otorga nuevas propiedades farmacológicas: una alta selectividad por el nAChR ($\alpha 7$) $_2$ $\beta 1$ -3 γ/ϵ δ neuronal, con una constante de disociación de 10^{-8} – 10^{-9} M. La configuración del receptor de acetil colina antes mencionada es la que más se ha usado; no obstante, gracias a muchos estudios realizados con toxinas de cadena larga, y diferentes subtipos de receptores, se sabe que la región que va de la cuarta a la quinta Cisteína (quinto puente disulfuro) es la que le confiere la capacidad de antagonizar no solo al receptor ($\alpha 7$) $_2$ $\beta 1$ -3 γ/ϵ δ , sino además a otros subtipos neuronales tales como: $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$; $\beta 1$, $\beta 3$; γ ó ϵ , en cualquiera de sus combinaciones (**Tabla 1**), (Antil-Delbeke et al., 2000; Servent et al., 1997).

Tabla 1. Características de las alfa-neurotoxinas. Características químicas y biológicas de neurotoxinas de cadena corta y larga.

	Características estructurales	Blanco molecular	Otros blancos	Fuente
Neurotoxinas de cadena corta	Monómero de entre 60-62 amino ácidos con cuatro puentes disulfuro altamente conservados	Receptor muscular o <i>Torpedo</i> ($\alpha 1$) $_2$ $\beta 1$ γ δ (K_d aproximada de 10^{-9} a 10^{-11} M) ¹ .		Elápidos. Ejemplos típicos incluyen la erabutoxina-a (<i>Laticauda semifasciata</i>) y toxina-a (<i>Naja nigricolis</i>).
Neurotoxinas de cadena larga	Monómero de entre 66-75 amino ácidos con cuatro puentes disulfuro altamente conservados y un quinto en el extremo del <i>loop</i> II.	Alta afinidad al receptor muscular o <i>Torpedo</i> ($\alpha 1$) $_2$ $\beta 1$ γ δ (K_d aproximada de 10^{-9} a 10^{-11} M) ¹ .	Antagonista del receptor $\alpha 7$ neuronal (K_d aproximada de 10^{-8} a 10^{-9} M) ¹ .	Aisladas del veneno de elápidos y colúbridos. Ejemplos típicos incluyen la α -bungarotoxina (<i>Bungarus multicinctus</i>) y la α -cobratoxina (<i>Naja kaouthia</i>)

Tabla tomada y modificada de Barber et al., (2013)

1) α -neurotoxinas, receptor de acetil colina y mecanismo de acción.

Para entender con mayor claridad el mecanismo por el cual las α -neurotoxinas ejercen su función, es importante conocer la estructura de su blanco y el papel que juega en la comunicación neuromuscular. Previamente, hemos hecho mención a dos tipos de receptores de acetilcolina muscarínicos: muscular y neuronal. En las revisiones actuales es de esa manera en el que generalmente se les refiere; es por ello que consideramos importante para el presente trabajo detallar las diferencias que existen entre ellos, su localización a nivel sistémico y su función.

Brevemente: los receptores de acetilcolina son pentámeros cuya estequiometría es $(\alpha)_2\beta\gamma\epsilon\delta$, su masa molecular oscila los 290 kDa. Se han clonado, expresado y su estructura se ha podido elucidar: en la **Figura 2** se encuentra la representación de su estructura (Unwin, 2005). Se sabe que se encuentran altamente distribuidos en la membrana de las células postsinápticas en la unión neuromuscular, donde orquestan la comunicación de la terminación nerviosa con el músculo esquelético. Los receptores de tipo muscular, como lo son los de la raya eléctrica *Torpedo*, contienen dos subunidades alfa 1 ($(\alpha 1)_2$), una subunidad beta 1 ($\beta 1$), una γ ó ϵ , si es del tipo embrionario o adulto, respectivamente; y finalmente una delta (δ). En el caso del receptor de tipo neuronal, se distingue del anterior por lo siguiente: las dos subunidades alfa pueden ser del subtipo alfa 2 al alfa 10 $(\alpha 1-10)_2$ y una subunidad beta 2, 3 o 4 ($\beta 2-4$). Así, la configuración $(\alpha 7)_2\beta 2\gamma\delta$ sería un ejemplo claro de un receptor neuronal (Nirthanan and Gwee, 2004).

En condiciones normales, el neurotransmisor acetilcolina se libera del botón pre-sináptico hacia la hendidura sináptica de la terminal nerviosa. Una vez en el espacio sináptico, dos moléculas de acetilcolina se unen a su receptor (receptor de acetil colina) localizado en la membrana post sináptica del músculo esquelético en la placa neuromotora como se ilustra en la **Figura 3A**. Posteriormente, el receptor, un canal, pasa del estado de reposo al estado abierto, favoreciendo el incremento en la permeabilidad de cationes en la membrana sináptica. Finalmente, la despolarización de la membrana neuromotora conlleva, eventualmente, a la contracción muscular (Hodgson and Wickramaratna, 2002).

La manera en que las α -neurotoxinas interactúan con su receptor ha sido objeto de estudio por décadas; sin embargo, fue hasta hace poco que Lesovoy y colaboradores demostraron que antes de unirse a su blanco, las α -neurotoxinas, en este caso la *NTII* de *Naja oxiana*, se unen a la bicapa lipídica. Además, en el mismo trabajo, se demuestra que la toxina interactúa de manera favorable con los lípidos de membrana, particularmente con las cabezas de fosfatidilserina. Como resultado de esa interacción, se producen enlaces de hidrógeno entre las cabezas polares de la bicapa lipídica y aminoácidos cargados de la *NTXII*, lo cual facilita el transporte de la toxina sobre la superficie de la membrana, y promueve la interacción de la punta del *loop II* con el receptor de acetilcolina. El estudio anterior demostró la importancia que tienen los lípidos de membrana en la interacción toxina-receptor, y aporta más elementos para reforzar el concepto de “catálisis de membrana” o “*Membrane-compartment mechanism* que pudiera ser útil para describir el comportamiento de toxinas que carecen de actividad enzimática (Dubovskii et al., 2005; Lesovoy et al., 2009). Finalmente, una vez unidas al receptor de acetil colina, las α -neurotoxinas ejercen su efecto impidiendo la unión de la acetilcolina al receptor, así como favoreciendo su estado de reposo y evitando la apertura del canal al que están asociados (Nasiripourdori et al., 2009).

Cabe resaltar que las α -neurotoxinas han sido una herramienta muy empleada para estudiar tanto a las toxinas como a los receptores. Uno de los campos más atractivos para los toxicólogos ha sido el tratar de elucidar con detalle los eventos que subyacen en la interacción α -neurotoxina-receptor; así como los aminoácidos implicados en la asociación entre ambas moléculas. En la presente tesis mencionaremos un par de estudios que consideramos más consistentes y cuyos resultados arroja luz sobre dicho evento. Por una parte, gracias al trabajo de Antil-Delbeke y colaboradores, sabemos que los aminoácidos: Trp-25, Asp-27, Phe-29, Arg-33, Arg-36 y Phe-65 de la α -cobratoxina (Neurotoxina del Tipo II), son importantes para reconocer a los dos sub-tipos de receptores de acetilcolina nicotínicos: *Torpedo* y α -7 (Antil et al., 1999). También se sabe que los aminoácidos Ala-28, Lys-35, Cys-26 y Cys-30, son indispensables solamente para el reconocimiento del subtipo neuronal α -7. Asimismo, únicamente los aminoácidos Lys-23 y Lys-49 están involucrados en la unión de la cobratoxina con el receptor muscular *Torpedo*. Interesantemente, gracias a la continuación de dicho estudio se ha podido llegar a la conclusión que tanto la Arg-33 de la cobratoxina como la Tyr-187 y Pro-193 del receptor α -7 están íntimamente involucrados en el bloqueo del efecto colinérgico (Antil-Delbeke et al., 2000)

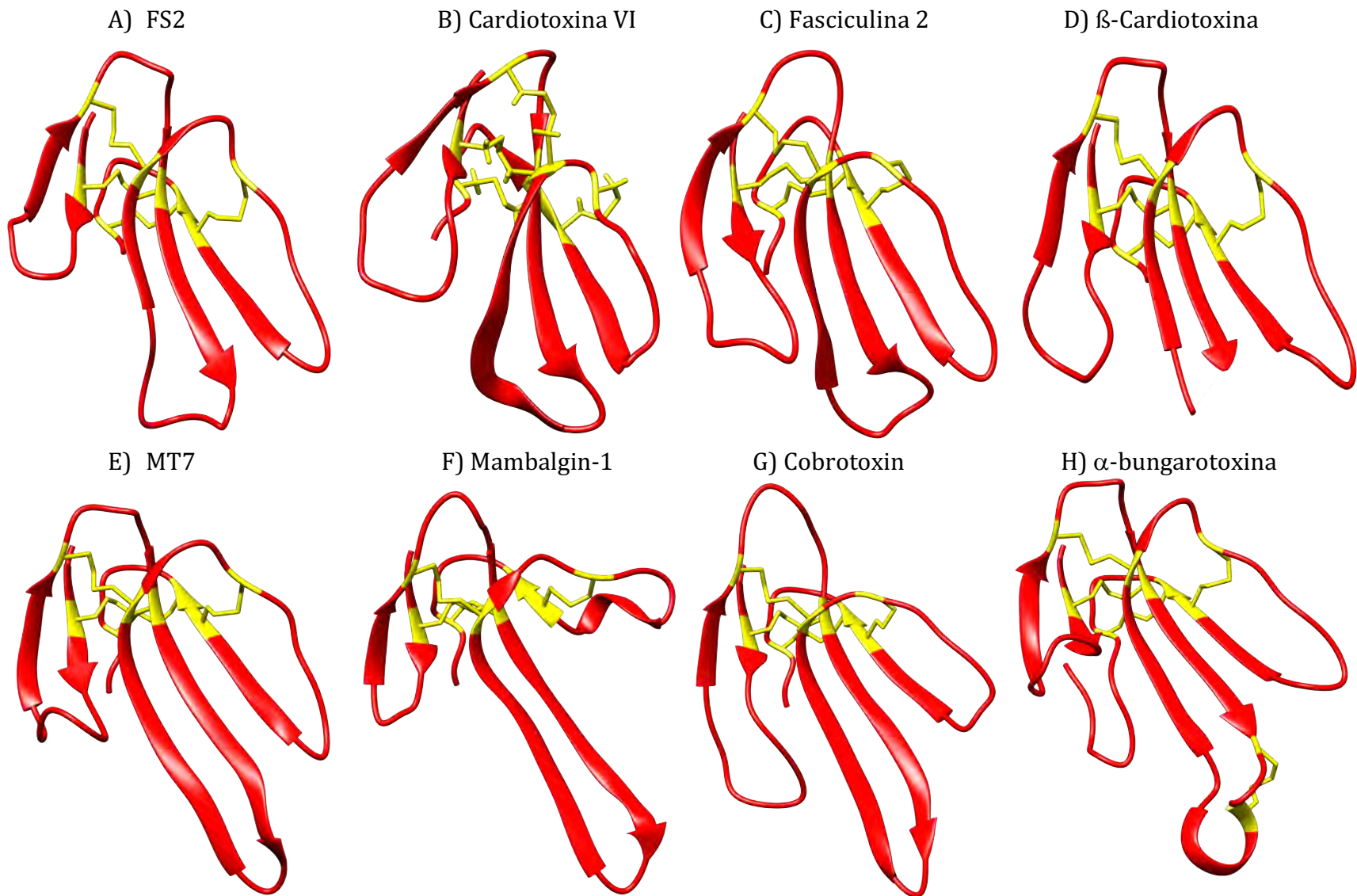
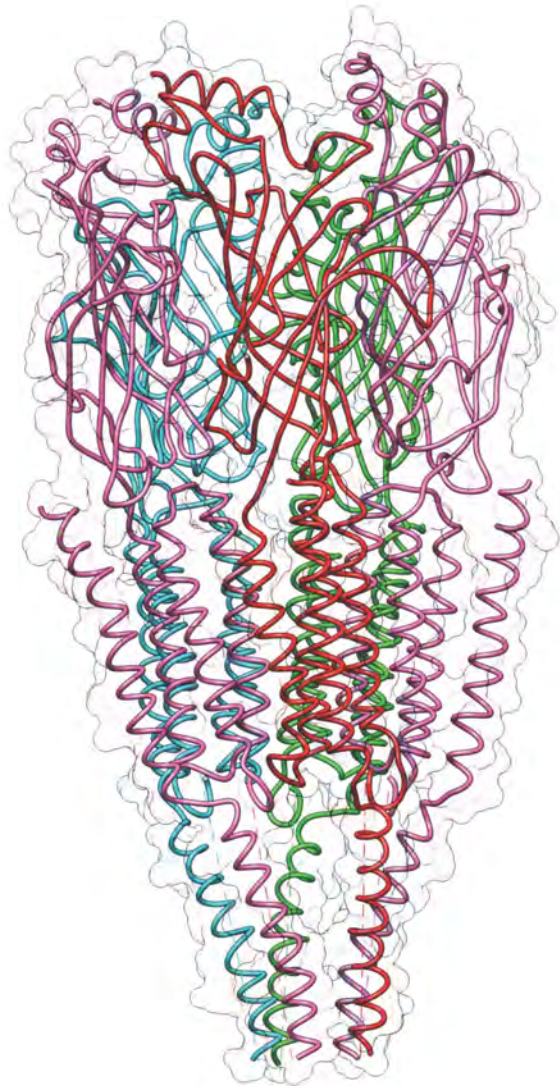


FIGURA 1 Estructuras tridimensionales de toxinas de tres dedos

ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES DE TOXINAS DE TRES DEDOS (ROJO) DONDE SE MUESTRA EL PATRÓN DE PUENTES DISULFURO (AMARILLO). **A)** FS2, PDB-ID: 1TFS: BLOQUEADOR DE CANALES DE CALCIO TIPO-L. **B)** CARDIOTOXINA VI, PDB-ID:1UG4: CITOTOXICIDAD. **C)** FASCICULINA 2, PDB-ID: 4BDT (CADENA B): INHIBIDOR DE ACETILCOLINESTERASA. **D)** β-CARDIOTOXINA (CTX27), PDB-ID:3PLC: BLOQUEADOR DE RECEPTORES β-ADRENÉRGICOS. **E)** MT7, PDB-ID: 2VLW: INHIBIDOR ALOSTÉRICO DEL RECEPTOR DE ACETILCOLINA MUSCARÍNICO M1. **F)** MAMBALGIN-1, PDB-ID: 5DZ5: ANALGESIA POR MEDIO DE LA INHIBICIÓN DE CANALES IÓNICOS TIPO “ACID-SENSING”. **G)** COBRATOXIN, PDB-ID: 1V6P: EFECTO CURARE-MIMÉTICO SOBRE RECEPTORES MUSCULARES DE ACETILCOLINA (α1). **H)** α-BUNGAROTOXINA. PDB:4HQP.F: EFECTO CURARE-MIMÉTICO SOBRE NACHR (α7) NEURONALES Y MUSCULARES (α1)

A)



B)

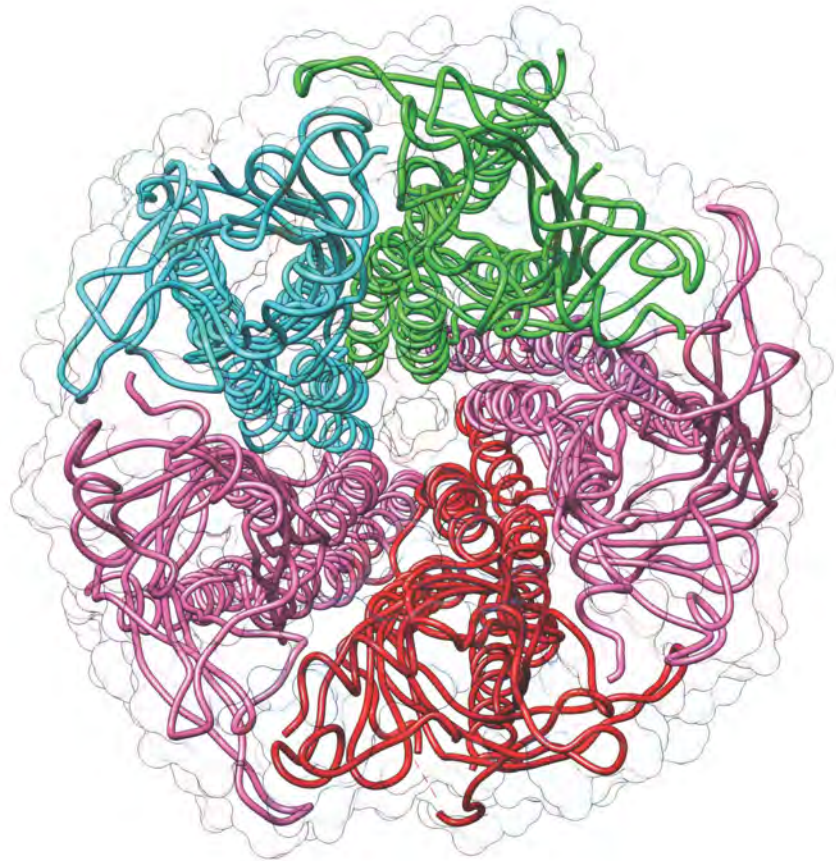
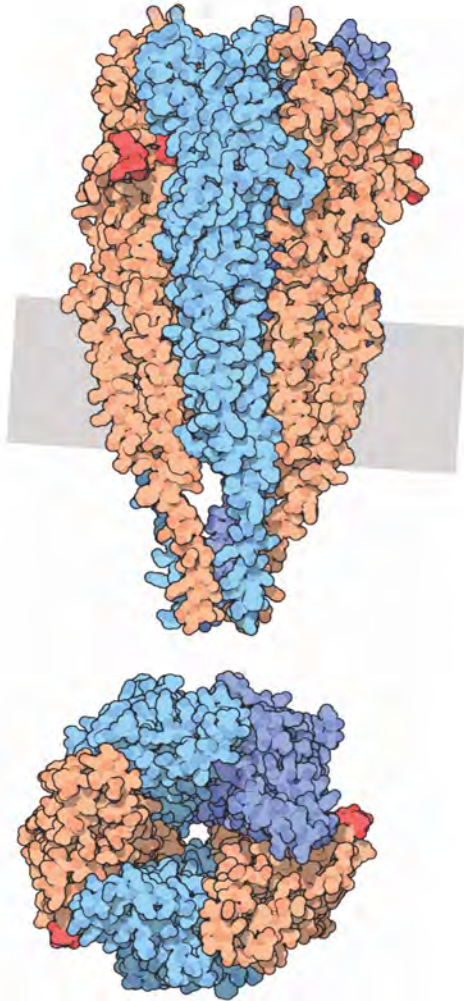


FIGURA 2 Estructura del receptor de acetil colina

ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES DEL RECEPTOR DE ACETIL COLINA *TORPEDO*. **A)** EL HETEROPENTÁMERO CONTIENE DOS SUBUNIDADES ALFA (ROSA), UNA BETA (ROJO), UNA GAMMA (MAGENTA) Y UNA DELTA (VERDE). PDB-ID: 2BG9. **B)** ROTACIÓN DE 90° SOBRE EL EJE Y DE A)

A)



B)



FIGURA 3 Receptor de Acetil Colina y alfa-cobratoxina

ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES DEL RECEPTOR DE ACETILCOLINA *TORPEDO* Y DE LA PROTEÍNA QUE UNE ACETILCOLINA DE *LYMNAEA STAGNALIS* EN COMPLEJO CON LA ALFA-COBRATOXINA. **A)** VISTA TRANSVERSAL DEL RECEPTOR DE ACETILCOLINA EN DONDE SE MUESTRA LOS SITIOS DE UNIÓN AL RECEPTOR (ROJO). **B)** CINCO ESTRUCTURAS DE ALFA COBRATOXINA (ROJO) SE UNEN A UNA PROTEÍNA QUE ES SIMILAR A LA PARTE EXTRACELULAR DEL RECEPTOR DE ACETILCOLINA (PDB-ID: 1Y15).

Por otra parte, desde la perspectiva del receptor, se sabe que los dos sitios de unión a la acetilcolina se encuentran entre las subunidades α - γ , y α - δ , señalados en la **Figura 3A**. De la misma manera, se conocen con certeza los aminoácidos o regiones implicados en el reconocimiento del neurotransmisor, los cuales son: para la subunidad alfa, la Tyr93, la región de la Tyr149 a la Gly153 y de la His186 al Asp200. En el caso de las subunidades γ y δ son: Lys34, y las regiones del Trp55 al Gln59, y de la Phe172 al Glu176. Tomando esto en cuenta, Osaka realizó un estudio minucioso del receptor empleando una α -neurotoxina de *Naja mossambica mossambica*. Demostró, por ejemplo, que mutaciones en el loop II de la toxina (Lys27, Arg33, Arg35) disminuyen la energía de unión al receptor, al tiempo que cambios en el loop I y II no tienen efectos significativos en dicho parámetro. Igualmente, demostró que los aminoácidos Trp55, Leu119, Asp174 y Glu176 de la subunidad γ del receptor están involucrados en la afinidad por la toxina. En dicho estudio se concluye que la unión toxina-receptor se lleva a cabo a través de la unión de los siguientes aminoácidos: Arg33 con la Leu119; Lys27 con la Glu176 y Arg35 con el Trp55. No obstante, también se tienen fuertes indicios de que existen otros componentes tanto del receptor -como la Asp174- como de la toxina que coadyuvan estabilizando la unión (Osaka et al., 2000).

Los estudios de cristalografía de rayos X de α -neurotoxinas asociadas al receptor han enriquecido nuestro acervo, ya que han aportado detalles precisos del complejo toxina-receptor. Gracias a ellos, actualmente se sabe que la subunidad alfa del receptor puede, por sí sola, unir acetilcolina. Por ejemplo, un homopentámero de la subunidad alfa (que une acetilcolina y cuya estructura es homóloga con la región extracelular del receptor neuronal α -7), aislado de *Lymnaea stagnalis*, tiene la capacidad de unir cinco moléculas de acetilcolina. En presencia de la α -cobratoxina, el homopentámero pierde la capacidad de unir al neurotransmisor gracias al impedimento estérico generado por la toxina en cada uno de los sitios de unión (Bourne et al., 2005b). En la **Figura 3B** se describe de manera gráfica lo anterior.

Generalmente, las neurotoxinas de cadena corta se asocian y disocian entre siete y nueve veces más rápido, respectivamente, al receptor de acetilcolina comparadas con las neurotoxinas de cadena larga (**Tabla 1**). Debido a estas observaciones se considera que tales diferencias podrían jugar un papel fundamental en el grado de reversibilidad/irreversibilidad de éstas en los cuadros de envenenamiento. Las α -neurotoxinas de cadena corta se han considerado por muchos años como las más tóxicas; no obstante, a lo largo de las décadas se han descrito α -neurotoxinas de cadena larga con toxicidades tan potentes como las reportadas para las alfa neurotoxinas del tipo I. Por ejemplo, se sabe que serpientes con alta morbilidad como *Dendroaspis angusticeps*, *Dendroaspis polylepis*, *Ophiophagus hannah* y *Naja kaouthia*, por mencionar algunas, contienen en su veneno un arsenal de toxinas de tres dedos, dentro de las que destacan

tanto neurotoxinas de cadena corta como de cadena larga con toxicidades similares (Laustsen et al., 2015c; Vonk et al., 2013).

En conclusión, el efecto curare-mimético y su alta potencia letal, ha hecho de las α -neurotoxinas uno de los principales objetos de estudio desde finales de la década de los 60s. Dicho esfuerzo ha desvelado los mecanismos que rigen su función y su alta selectividad. Gracias a ellas se caracterizó farmacológicamente el receptor de acetilcolina, por ejemplo (Changeux et al., 1970). Además, con el paso de los años se han podido secuenciar, clonar y expresar, un buen número de ellas, lo que ha permitido que en portales como el “Protein Data Bank PDB” (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) se puedan encontrar decenas de estructuras resueltas, tanto por resonancia magnética nuclear (MNR) como por cristalografía de rayos X. Gracias a éstos, y otros estudios complementarios, finalmente se ha corroborado que las α -neurotoxinas son los componentes más tóxicos en el veneno de la mayoría de elápidos de importancia médica, lo que las hace atractivas en la producción o mejoramiento de antivenenos contra elápidos (Sintiprungrat et al., 2016).

2.1.2 Otras funciones

Existen trabajos en donde se han descrito toxinas de tres dedos con propiedades farmacológicas nuevas. Gracias a ellos, se sabe que dentro del repertorio de actividades biológicas, algunas toxinas de tres dedos exhiben propiedades analgésicas, como la “*mambalgin*” (Mourier et al., 2016; Pu et al., 1995) cuya estructura puede visualizarse en la **Figura 1F**. Actividades anti plaquetarias, como la *angustatin* (Oyama and Takahashi, 2015), activadoras de canales de sodio $\text{Na}_v1.4$, como la “*calliotoxin*” (Yang et al., 2016) y con actividad α -neurotoxina o curare-mimética no canónicas -de las cuales se hablará con más detalle a continuación.

Con el apoyo de las herramientas tecnológicas y científicas actuales, particularmente de la bioinformática, venómica y antivenómica (Gutiérrez et al., 2009), es posible generar y analizar información de manera masiva sobre cualquier especie, organismo, tejido o secreción biológica -como los venenos-, por mencionar algunos. No obstante, la caracterización biológica sigue siendo el paso crucial para poder describir con precisión cualquier molécula, tales como proteínas, péptidos o algún metabolito. En las bases de datos como la albergada por el NCBI (*National Center For Biotechnology Information*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) existen cientos de secuencias de amino ácidos reportadas de toxinas de tres dedos, las cuales muy pocas se han obtenido a partir de estudios proteómicos o bioquímicos: la mayoría se han deducido a partir de estudios transcriptómicos y genómicos. La función putativa que se les ha asignado es por identidad de secuencia con otras proteínas de función conocida (Dufton, 1984). Lo anterior puede generar una serie de problemas que dan como resultado toxinas no

exploradas *de facto*, y estimando de manera errónea sus propiedades tóxicas, bioquímicas y farmacológicas. Un ejemplo de lo mencionado anteriormente es la haditoxina (*haditoxin*; PDB-ID: 3HH7), cuya secuencia es similar a la de las alfa neurotoxinas de cadena corta, que se infirió (dada su secuencia) sólo podría antagonizar al receptor muscular de acetilcolina; sin embargo, en estudios posteriores más detallados, se demostró que dicha toxina forma dímeros no covalentes, y que además puede, de esta manera, antagonizar al receptor de acetilcolina neuronal (propiedad sólo atribuida a las alfa neurotoxinas de cadena larga). El estudio antes mencionado revela también, por vez primera, a una alfa neurotoxina de cadena corta con nuevas capacidades farmacológicas (Roy et al., 2010), ya que no se habían descrito homodímeros para estas toxinas, y nos demuestra, por otra parte, que deducir la función de una proteína a partir de su secuencia puede llevarnos a supuestos erróneos.

En resumen, la vasta mayoría de toxinas de tres dedos reportadas, ya sea deducidas por identidad de secuencia, o aisladas de los venenos, carecen de un estudio sistemático sobre sus propiedades biológicas. Además, su caracterización comúnmente incluye modelos animales, en donde ratones y conejos son los que más se emplean: se cree que es pertinente describirlas bajo un contexto que incluya presas naturales como otros ofidios, por ejemplo, con el fin de caracterizarlas de una manera más cercana a su papel biológico dentro de los venenos. Por lo tanto, es muy probable que en el futuro sean descritas nuevas funciones para esta superfamilia de proteínas.

2.2 Antivenenos

Esencialmente, los antivenenos están compuestos de inmunoglobulinas provenientes del suero de animales previamente inmunizados a un veneno, o a una mezcla de venenos. La base de su desarrollo se fundó con los trabajos realizados por von Behring y Kitasato (1890). Ellos describieron que elementos de la sangre, libre de componentes celulares, podían ayudar a curar y/o evitar la sintomatología causada por bacterias tetánicas y diftéricas. Además, demostraron que aquellos elementos del suero (ellos no conocían los anticuerpos) eran altamente específicos. Con tales resultados, se logró aplicar suero de animales previamente inmunizados a enfermos de tétanos para atacar esta enfermedad (inmunización pasiva); y se abrió la posibilidad de prevenir tales enfermedades mediante la inducción de la producción de anticuerpos en un hospedero (vacunación o inmunización activa) (Von Behring and Kitasato, 1890).

Contemporáneos a los trabajos de von Behring y Kitasato (1890) fueron los realizados por Henry Sewall. Él inmunizaba aves con dosis sub-letales de veneno de serpientes de cascabel, y demostró que dichos animales, después de meses bajo inmunizaciones constantes, podían soportar dosis letales de veneno sin presentar ningún

síntoma (Sewall, 1887). Albert Calmette (1884), por su parte, tomando en consideración los trabajos de Behring y Kitasato (1890), y dada la alta incidencia de mordeduras de cobra en Vietnam (lugar en donde él vivió y fundó el “*Vaccine Institute of VietNam*”), tuvo la facilidad de reproducir los trabajos de sus coetáneos; en su caso, los realizó tomando como base el macerado de glándulas de veneno de *Naja kaouthia* (Calmette, 1894). En paralelo, Césaire Phisalix y Gabriel Bertrand, también publicaron el efecto protector de un antisuero contra vipéridos; además, proponen el uso de veneno detoxificado por calor como solución a venenos altamente tóxicos que generaban problemas de salud crónicos a los animales productores (Phisalix and Bertrand, 1894). El gran éxito de Calmette, a diferencia de sus colegas contemporáneos, fue el uso de diferentes modelos animales para generar antisueros (Calmette, 1896), lo que lo llevó finalmente a emplear animales superiores como burros, y posteriormente caballos en donde generó un antisuero contra cobras. Así, en 1897 se aplicaron por primera vez en humano los sueros de caballo, y fue con tal evento que en ese año nació, oficialmente, la inmunoterapia para tratar envenenados por mordedura de serpiente (Calmette, 1897). Siguiendo el ejemplo de Albert Calmette, Vital Brazil fue capaz, por su parte, de atacar el problema en Brasil, en donde se reportaban al menos 3,000 muertes por mordeduras anualmente. Además de esto, una de las grandes contribuciones de V. Brazil fue el análisis minucioso de los venenos, y la estandarización de los procesos de manufactura de antivenenos a gran escala (Hawgood, 1992), la cual ha seguido sin mayores cambios hasta nuestros días.

A más de cien años de aquellos experimentos pioneros, sabemos que la aplicación del antiveneno específico es la única terapia comprobada como eficaz para tratar los casos de envenenamiento por animales ponzoñosos. En sus inicios, se consideraba la administración del suero crudo, lo cual generaba reacciones adversas como la llamada enfermedad del suero (Boyer et al., 2013). Desde entonces, han existido diferentes generaciones de antivenenos; los que se producen actualmente siguen siendo obtenidos a partir del suero de animales hiperinmunizados –generalmente equinos– de donde se obtienen las inmunoglobulinas. El inmunógeno puede ser un solo veneno o mezclas de venenos para producir antivenenos monovalentes o polivalentes, respectivamente. Una vez purificadas del suero, las inmunoglobulinas pueden usarse completas o someterse a digestión enzimática para obtener: con pepsina fragmentos F(ab')₂ (Silanes et al., 2002) y con papaína para fragmentos Fab, como se muestra en la **Figura 4**. En la **Tabla 2** se enlistan antivenenos monovalentes y polivalentes contra elápidos, cuya sustancia activa deriva de inmunoglobulinas.

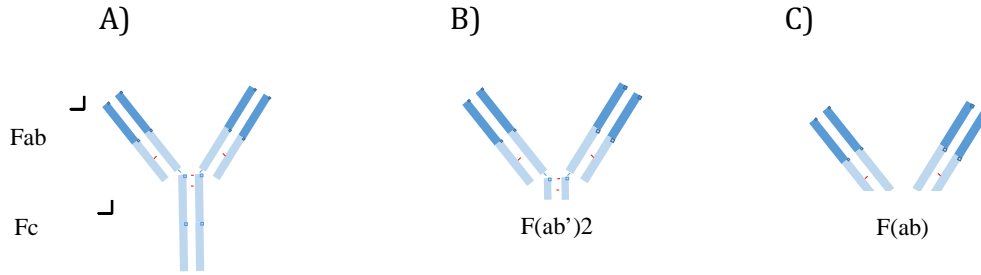


FIGURA 4 Sustancias activas de los antivenenos

REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS TRES SUSTANCIAS ACTIVAS DE LOS ANTIVENENOS COMERCIALES. **A)** LAS INMUNOGLOBULINAS COMPLETAS PURIFICADAS DEL SUERO MEDIANTE PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS, YA SEA POR SULFATO DE AMONIO O ACIDO CAPRÍLICO. **B)** SE OBTIENEN FRAGMENTOS F(ab')₂ (DIVALENTES) CON PEPSINA O, **C)** FRAGMENTOS FAB (MONOVALENTES) CON PAPAÍNA.

Las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas de cada una de esas moléculas mostradas en la **Figura 4** son diferentes, puesto que dependen íntimamente de la masa molecular de la sustancia activa: en general, los fragmentos F(ab')₂ (100 kDa) y Fab (50 kDa) tienen mayor volumen de distribución que las inmunoglobulinas completas (150 kDa). Los fragmentos Fab tienen menor tiempo de residencia que los F(ab')₂ y las IgG completas, ya que difunden más rápido al fluido intersticial. Las implicaciones farmacodinámicas son relevantes, ya que existen venenos que están compuestos por moléculas de gran masa molecular (mayor a 30 kDa) cuya difusión del sitio de la mordedura (subcutánea o intramuscular) al torrente sanguíneo será más lento que el tiempo de vida media de los Fab en sangre, dando como consecuencia cuadros recurrentes de envenenamiento (Vázquez et al., 2010) y en cuyos casos se requiere la aplicación constante de antiveneno por periodos más prolongados. Es por ello que uno de los factores esenciales en el diseño de nuevos antivenenos tiene que contemplar las propiedades farmacocinéticas del veneno para poder decidir de manera racional el tipo de antiveneno que se desee generar (Gutiérrez et al., 2011).

Una vez generado el antiveneno, se debe probar su efectividad. Típicamente, se evalúa la capacidad del antiveneno de neutralizar los efectos letales del veneno contra el que fue diseñado (neutralización específica). Para ello, se determina la dosis efectiva media (la DE₅₀ es la cantidad de antiveneno necesario para rescatar a la mitad de la población) retándolos con al menos tres dosis letales medias (la DL₅₀ es la cantidad de veneno necesaria para matar a la mitad de la población), aunque cinco dosis letales medias es la cantidad de veneno óptima y recomendada por algunos ministerios de salud (WHO, 1981). Por recomendación de la Organización Mundial de la Salud, los ensayos de ED₅₀ se deben realizar en ratones y se deben seguir, esencialmente, los siguientes pasos: incubar una cantidad constante de veneno con volúmenes variables de antiveneno y ser aplicarlos por vía intravenosa. Finalmente, la DE₅₀ se expresa en mg de veneno o número de DL₅₀ capaces de ser neutralizadas por mL de antiveneno. Así, en el prospecto

se indica el tipo de veneno o los venenos que es capaz de neutralizar de manera específica, así como la cantidad de veneno neutralizada por vial de antiveneno.

Tabla 2. Antivenenos comerciales contra elápidos

Antiveneno (país)	Origen (Sustancia activa)	Neutraliza el veneno de:	Más información:
Polivalente Coralmyn (México)	Equino [F(ab') ₂]	<i>Micrurus sp.</i> norteamericanas	www.bioclon.com.mx
Polivalente SAVP (Sudafrica)	Equino [F(ab') ₂]	<i>Dendroaspis sp.</i> <i>Naja sp.</i>	www.savp.co.za
Polivalente ASVS (India)	Equino [IgG]	<i>Naja Naja</i> <i>Bungarus caeruleus</i>	www.bharatserums.com
Black snake antivenom CSL (Australia)	Equino [IgG y F(ab') ₂]	<i>Pseudechis australis</i> <i>Pseudechis sp.</i>	www.csl.com.au/home
Suero Anti-coral (Costa Rica)	Equino [IgG]	<i>Micrurus nigrocinctus</i> <i>Micrurus fulvius</i>	www.icp.ucr.ac.cr/index.php
King Cobra Antivenin (Tailandia)	Mula [IgG y F(ab') ₂]	<i>Ophiophagus hannah</i>	www.english.redcross.or.th/home
Antiveneno divalente Naja/walterinnesia (Arabia Saudita)	Equino [F(ab') ₂]	<i>Naja haje arabicus</i> <i>Walterinnesia aegyptia</i>	www.antivenom-center.com
Combipack PAN AFRICA (India)	Equino [F(ab') ₂]	<i>Naja haje</i> <i>Naja melanoleuca</i> <i>Naja nigricolis</i> <i>Dendroaspis polylepis</i> <i>Dendroaspis viridis</i>	www.premiumserums.com
ASNA C (INDIA)	Equino [IgG]	<i>Naja haje</i> <i>Naja melanoleuca</i> <i>Naja nigricolis</i> <i>Naja nivea</i> <i>Dendroaspis polylepis</i> <i>Dendroaspis jamesonii</i> <i>Dendroaspis angusticeps</i>	www.bharatserums.com
INOSERP PAN AFRICA (España)	Equino [F(ab') ₂]	<i>Naja sp.</i> <i>Dendroaspis sp.</i>	www.inosanbiopharma.com

En suma, los antivenenos provienen del suero de animales hiperinmunizados con un veneno para producir antivenenos monovalentes, o una mezcla de venenos para producir polivalentes: todos policlonales. Cualquier tipo de antiveneno está compuesto de inmunoglobulinas o sus fragmentos, Fab o F(ab')₂. Desde los producidos por Calmette (1984) hasta los antivenenos actuales, han existido mejoras en términos de seguridad y efectividad: los últimos son productos muy seguros, mientras que los primeros consistían en el suero crudo del animal inmunizado, los últimos son anticuerpos purificados y, en su caso, digeridos con pepsina o papaína, cuya composición minimiza las reacciones secundarias o problemas relacionados con la infusión de proteínas exógenas. También son productos libres de patógenos, ya que pasan por procesos en donde se enfocan en la remoción de equinovirus, bacterias y otros componentes pirogénicos propios del animal productor (WHO, 2017). Además, dado el mejoramiento en términos de efectividad, producto de las buenas prácticas en la manufactura de muchos antivenenos y el uso racional de los inmunógenos, la cantidad de proteína administrada en forma de inmunoglobulinas completas o sus fragmentos a pacientes envenenados, cada día es menor.

2.3 Mordedura de serpiente y uso de antivenenos

El envenenamiento por mordedura de serpiente es una enfermedad devastadora - especialmente en zonas rurales de países subdesarrollados. Su importancia se ha ignorado grandemente por el sector político, económico, y, lamentablemente, por la ciencia médica (Gutiérrez et al., 2006). La OMS reconoce al envenenamiento por mordeduras de serpiente como una enfermedad tropical y la cataloga como “*Neglected Tropical disease*”: lo que evidencia el grado de abandono que se tiene (www.who.int/en/). También, la OMS la considera una enfermedad ocupacional, ya que el sector de la población con mayor riesgo es aquel cuya actividad está relacionada con la agricultura y ganadería (Warrell, 2010). Afortunadamente, se han tomado acciones entre expertos toxicólogos, epidemiólogos y organizaciones públicas y privadas, que han ayudado a generar información útil en el tratamiento pre-hospitalario de pacientes en comunidades rurales, donde existe una escasez tanto de recurso humano como de antivenenos (Warrell, 1999). En el 2017 se reconoció que el envenenamiento por mordedura de serpiente es la enfermedad tropical con mayor desatención y reconoció a los antivenenos como fármacos esenciales: <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>.

Los datos epidemiológicos en términos de morbilidad y mortalidad concernientes a las mordeduras de serpientes no son exactos. Se ha hecho un enorme esfuerzo en tratar de entender la dimensión del problema; no obstante, debido a múltiples factores tales como: carencia de datos confiables, identificación errónea del animal venenoso, inasistencia de los envenenados a los centros de salud debido al uso de remedios caseros,

e incluso la falta de centros de salud, todos han redundado en una serie de cifras que, además de generar incertidumbre, nos han brindado una idea errónea de la situación real (Chippaux, 2011; Stock et al., 2007). Tomando en cuenta los factores anteriormente descritos y aplicando nuevas herramientas de análisis y de extrapolación de datos, se ha tenido ahora una mejor idea de la dimensión del problema. Las cifras más aceptadas actualmente son las publicadas por Kasturiratne y colaboradores en el 2008 (revisada por Chippaux en el 2011): 421,000 envenenados que dan pie a 20,000 muertes anualmente; estimando que la cifra puede ser hasta de 1.8 millones de envenenados y 94,000 muertes en el mismo periodo. Finalmente, se estiman hasta 5.5 millones de mordeduras y hasta 2 millones de envenenamientos (Kasturiratne et al., 2008). Ahora, tomando en consideración que una persona envenenada requiere al menos tres viales de antiveneno, la demanda anual sería de un poco más de 5 millones de viales (Williams et al., 2011).

Los venenos de serpiente contienen una colección de toxinas que ejercen diferentes funciones. Desde una perspectiva holística, todas ellas trabajan de manera conjunta para generar los cuadros de envenenamiento (Gutiérrez et al., 2016). Cualquier persona mordida debe ser tratada con prontitud, ya que el veneno puede dejarle no sólo lesiones permanentes, del tipo físicas o psicológicas, sino que además puede provocarle la muerte. Sabemos que la única vía científicamente comprobada para neutralizar la actividad tóxica de los componentes del veneno y evitar y/o revertir el envenenamiento, es mediante la administración de un antiveneno específico (Boyer et al., 2009). En la actualidad, en muchos laboratorios de investigación de América, África, Asia y Oceanía se desarrollan antivenenos: algunos con bajas potencias de neutralización y algunos otros muy efectivos (Williams et al., 2011). No obstante, como se mencionó previamente, la cantidad de dosis producidas son aún insuficientes para tratar el número, aún más elevado, de mordeduras. Aunado a esta escases, en países pobres, por ejemplo, el costo del tratamiento parece ser un problema aún más grave, ya que sobrepasa por mucho el ingreso promedio anual de cualquier familia. Afortunadamente, se han tomado medidas para atacar tanto el problema de producción/distribución como el concerniente al costo del tratamiento (Hamza et al., 2016); sin embargo, aún falta tiempo para poder observar el resultado de dicho esfuerzo.

En los países con mayor incidencia, por lo regular, no cuentan con los recursos financieros e intelectuales para almacenar, distribuir o facilitar el desarrollo de antivenenos. Idealmente, los antivenenos deben emplearse de manera específica, es decir, para tratar los envenenamientos causados por la mordedura de serpiente contra la que fue diseñado (antivenenos monovalentes o mono-específicos). No obstante, debido a dicha escases de recursos, se ha resuelto el problema mediante el uso de antivenenos de manera heteróloga; es decir, usar un antiveneno monovalente para neutralizar el veneno de una especie para la cual no fue diseñado, o usar un antiveneno polivalente para neutralizar el

veneno de una especie cuyo veneno no estuvo contemplado en la mezcla inmunogénica. Ello es posible gracias a la para-especificidad o reactividad cruzada que los antivenenos han mostrado: está bien documentado que son clínicamente efectivos en neutralizar venenos que generan patologías similares (Tan et al., 2015b). En general, los venenos que pertenecen a un mismo género de serpientes son, frecuentemente, los que mejor se neutralizan (de Roodt et al., 2004); sin embargo, se ha demostrado que ciertos antivenenos son igualmente efectivos neutralizando de manera para-específica el veneno de serpientes de diferente género, y que además se encuentran en diferentes continentes (Kornhauser et al., 2013). Los trabajos de reactividad cruzada se remontan a los estudios realizados por Minton en 1967. En sus trabajos, él examinó el efecto de dieciocho antivenenos de elápidos través de una serie de DE₅₀ (Dosis Efectiva media) en ratones, y encontró que fueron capaces de neutralizar de manera específica el veneno de elápidos australianos; sorprendentemente, también neutralizaron de manera para-específica los venenos de varias serpientes asiáticas y, a altas dosis, el de algunas cobras africanas (Minton, 1967). Es por ello que en el sur de Asia, por ejemplo, es común usar antivenenos de forma heteróloga que se producen con el veneno de serpientes australianas (Gowtham et al., 2014; Warrell, 1999). Es importante mencionar que no existen estudios formales que nos ayuden a predecir la reactividad cruzada que pueden tener los antivenenos. Las variaciones en la composición del veneno responden a cuestiones ontogenéticas y geográficas, y pueden ser detectadas hasta niveles taxonómicos de sub-especie. Por ello, resulta difícil hacer predicciones sobre la reactividad cruzada, confinando la cobertura de los antivenenos a los resultados obtenidos en pruebas con animales (Gowtham et al., 2014; Ramos et al., 2017).

Para dar sustento a la exportación/importación de antivenenos en países (principalmente pobres) se han intensificado las pruebas de neutralización cruzada de los antivenenos (Ramos et al., 2017). Por ejemplo, se demostró que el antiveneno mono específico BSAV, de CSL Ltd, usado en la clínica para tratar mordeduras de la llamada serpiente café australiana (Brown Snake: *Pseudonaja sp.*), neutraliza los efectos pro coagulantes de la serpiente tigre (Tiger Snake: *Notechis sp.*). Recíprocamente, el “anti-tiger snake” TSAV neutralizó de manera importante el efecto letal de la “Brown snake” (O’Leary et al., 2007). Este estudio promovió una serie de experimentos en donde se exploró la reactividad cruzada entre el veneno de la serpiente australiana (*Notechis scutatus*) y el de la cobra egipcia (*Naja haje*) con sus respectivos antivenenos. Los resultados demostraron que existe neutralización cruzada entre diferentes serpientes geográficamente aisladas; promovió la clasificación de venenos en base a grupos inmunogénicos y, finalmente, se propuso la aplicación del TSAV en países pobres donde *Naja haje* se distribuye, ya que el antiveneno heterólogo resultó ser mejor y más económico que el específico (Kornhauser et al., 2013). Actualmente, nuestro grupo de investigación ha propuesto la existencia de dos grupos antigénicos dentro de las

serpientes de coral norteamericanas, ya que el antisuero generado con una alfa neurotoxina (MlatA1) proveniente de la especie *Micrurus laticorallus*, reconoce, mediante inmunodetección, sólo algunas neurotoxinas de otras serpientes del mismo género, a pesar de que todas los venenos analizados contienen alfa neurotoxinas (Carbajal-Saucedo et al., 2013). Finalmente, dado que es común el uso de antivenenos de manera para-específica, cada día existen más estudios en donde se exploran sus espectros de neutralización y se proponen, dada la distribución de especies determinadas, su uso en países en donde la demanda es grande y no existen los antivenenos con la eficacia y calidad deseada (Chippaux, 2010).

En suma, a pesar de que las mordeduras de serpientes venenosas se consideran una emergencia médica, existen múltiples factores han contribuido al desabasto de antivenenos a nivel mundial (Chippaux et al., 2015). Esta descrito que los daños permanentes que provocan los envenenamientos generan un impacto en la economía local en países pobres de África, Asia y América del sur, principalmente, ya que la población más afectada son los jóvenes involucrados en actividades agrícolas, y que además son, en su mayoría, el sustento de sus familias. Se piensa que la carencia de datos epidemiológicos precisos ha contribuido a mantener fuera de las agendas y del presupuesto público el apoyo para el desarrollo de antivenenos locales, y que, además, la misma ausencia de datos no describe la dimensión del mercado, por lo que no ha sido atractivo para la industria farmacéuticas. Una solución mediática ha sido el uso de antivenenos polivalentes o monovalentes para neutralizar de manera para-específica los envenenamientos en regiones pobres. No obstante su eficacia comprobada, en muchos lugares su uso no ha sido aprobado por las secretarías de salud correspondientes (Chippaux, 2010). Dada la importancia que tiene el uso de antivenenos y su escasas, cada día será esencial, por un lado, describir su para-especificidad y por otro, diseñar de manera racional antivenenos que se basen en inmunógenos que permitan desarrollar productos de amplio espectro, efectivos, asequibles, pero sobretodo, con alto valor terapéutico (Calvete, 2011; Hamza et al., 2016), dígase, más eficaz.

2.4 Envenenamiento por Elápidos

Se han descrito hasta el momento 250 especies de serpientes que pertenecen a la familia de los elápidos. En nuestro continente se distribuyen desde el sureste de los Estados Unidos, pasando por México, Centro América, hasta América del Sur; están prácticamente en toda África, Australia y gran parte de Asia (Campbell and Lamar, 2004)

Existen géneros de elápidos que son de gran importancia médica debido a la alta morbilidad y mortalidad que generan, ello debido a su distribución, la potencia de sus venenos y la severidad de sus envenenamientos. La OMS los clasifica como categoría 1;

es decir, cuya mordedura es de alta importancia médica. En América, el género representativo es *Micrurus*; en África: *Naja* y *Dendroaspis*; en Asia y Oceanía: *Naja*, *Acanthophis*, *Bungarus*, *Ophiophagus*, *Notechis* y *Oxyuranus*.

En América, los envenenamientos por elápidos son menos comunes que los reportados para vipéridos (2-4 %) (Lomonte et al., 2016); sin embargo, algunas regiones de África, Asia y Oceanía las fatalidades por elápidos superan en número a la de los vipéridos. Las muertes por envenenamiento de elápidos se atribuyen principalmente a la debilidad neuromuscular progresiva con afección respiratoria (Parker-Cote et al., 2015). También se han descrito otra variedad de manifestaciones sistémicas en pacientes mordidos por diferentes especies de elápidos; por ejemplo, algunos venenos de *Micrurus* y *Najas* pueden inducir necrosis y otras lesiones locales (Gutiérrez and Lomonte, 2013). A pesar de las diferentes manifestaciones clínicas debido a los envenenamientos por elápidos, el principal rasgo es la neurotoxicidad dada por el bloqueo de la neurotransmisión en la placa neuromotora a nivel pre-sináptico y/o post-sináptico, generado por neurotoxinas que actúan a esos niveles (Warrell, 2010).

Las neurotoxinas pre-sinápticas se unen a la terminal nerviosa. Por ejemplo, la β -bungarotoxina tiene como blanco el botón pre-sináptico en donde genera una disminución de las vesículas que contienen acetilcolina, seguido de un daño irreversible de este sitio (Dixon and Harris, 1999). En detalle, sabemos que dicha toxina causa, en primera instancia, una liberación descontrolada del neurotransmisor y una depleción de las vesículas que contienen acetilcolina, además, se puede observar un daño directo en las mitocondrias que repercute en un aumento en la concentración de calcio intracelular (Rigoni, 2004; Sribar et al., 2014). La acetilcolina se libera por la vía del complejo de secreción SNARE (“*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment Receptor*”) el cual, con el calcio como segundo mensajero, facilita la fusión de las vesículas con la membrana del botón terminal (Davletov and Montecucco, 2010). La toxina unida, de manera irreversible, genera daño físico a la neurona pre-sináptica. Clínicamente, la recuperación del envenenado depende exclusivamente de la regeneración de la terminal nerviosa que se traduce en la formación de nuevas uniones neuromusculares (Rowan, 2001). Por lo tanto, pacientes con fallo respiratorio, debido a una beta-neurotoxicidad, requerirán asistencia respiratoria por periodos prolongados hasta que la respiración involuntaria se restablezca (Harris, 2004). Se sabe que los antivenenos, cuando se unen a las β -neurotoxinas, previenen la unión de estas a su sitio blanco (neutralización), y así evitan el daño; no obstante, no tienen efecto terapéutico sobre los botones pre-sinápticos lesionados, puesto que estos quedan destruidos (Dixon and Harris, 1999). Paradójicamente, en las regiones donde comúnmente ocurren estos envenenamientos carecen del equipo e instalaciones apropiadas para asistir a pacientes por medio de

respiradores artificiales, y que, además, la disponibilidad de antivenenos es pobre o nula (Harris, 2004; Warrell, 1999).

La parálisis flácida generada por la acción de toxinas post-sinápticas, como las α -neurotoxinas, es causado por la inhibición de los receptores de acetilcolina. El efecto de las α -neurotoxinas es similar al del curare, o sus derivados como la d-tubocurarina, pancuronium o atracurium, por lo que también son conocidas como toxinas curare-miméticas (Bowman, 2006). Gracias a las α -neurotoxinas, los músculos pierden la capacidad de responder a estímulos eléctricos y a cantidades fisiológicas del neurotransmisor (el mecanismo de acción ya se ha descrito previamente en la sección *α -neurotoxinas* de la presente tesis). Clínicamente, generan un bloqueo del tipo no-despolarizante, es decir, se unen de manera reversible al receptor de acetil colina. La reversibilidad se expresa como un bloqueo competitivo que puede revertirse por un incremento en la concentración de acetilcolina. Para ello, en la práctica se han sugerido como tratamiento de soporte inhibidores de la acetilcolinesterasa (enzima que hidroliza a la acetilcolina) o parasimpaticomiméticos como: edrofonio, neostigmina, piridostigmina, que ayudan a aumentar la biodisponibilidad de la acetilcolina en la hendidura sináptica (Bomb et al., 1996; Watt et al., 1986). No obstante, también se sabe que los receptores sufren cierto daño una vez bloqueados, ya que existe alteraciones en su dinámica, quedan también desensibilizados, y el canal asociado a ellos, bloqueado (Shear and Martyn, 2016).

Existen otro tipo de acciones neurotóxicas que no implican a los receptores de acetilcolina. Por ejemplo, las toxinas llamadas fasciculinas, descritas principalmente para el género *Dendroaspis*, bloquean a la acetilcolinesterasa, con ello el aumento del neurotransmisor genera fasciculaciones o pequeñas contracciones involuntarias de los músculos abastecidos por las fibras nerviosas afectadas (Waqar and Batool, 2015). Otras toxinas son las llamadas dendrotoxinas, que generan un bloqueo neuromuscular despolarizante mediante la unión a canales de potasio a nivel pre-sináptico, que coadyuva con el calcio para facilitar la liberación de la acetil colina (Tsetlin, 1999).

Los registros y casos detallados en donde se describen el desarrollo del envenenamiento, las manifestaciones neurofisiológicas y los efectos clínicos causados por elápidos, son claros (Shear and Martyn, 2016). En ellos queda de manifiesto que existe una variación debido a factores que incluyen tanto a la especie que causó el envenenamiento como al estado físico de la persona afectada. Ranawaka y colaboradores, en el 2013, hacen una revisión de los reportes y casos clínicos que más luz han arrojado para entender mejor la neurotoxicidad causada por mordeduras de elápidos. Nos brindan datos que subrayan las manifestaciones clínicas más importantes y que son comunes en la mayoría de casos. Apuntan, por ejemplo, que la ptosis se presenta hasta en el 93 % de los

pacientes reportados; debilidad de los músculos extra oculares hasta en un 82 %; y debilidad de los músculos respiratorios hasta en un 87 % (Ranawaka et al., 2013). No ha existido uniformidad en la manera de coleccionar los datos, por ello, no queda claro si las fatalidades reportadas en dicha revisión se debieron a la manifestación clínica más importante como la parálisis respiratoria o se debieron a complicaciones en el manejo del paciente (Ariaratnam et al., 2008; Bawaskar and Bawaskar, 2015; Silva et al., 2016b). Para ejemplificar: en un estudio donde se registraron las manifestaciones clínicas de 60 pacientes envenenados por *Bungarus multicinctus* destacan la ptosis, midriasis y parálisis de las extremidades como rasgos principales del envenenamiento. En dicho estudio, manifiestan que en ningún caso se aplicó antiveneno y que el 87 % requirió ventilación asistida por 8 días en promedio. La duración de la estancia fue de alrededor de 12 días y la mortalidad fue del 7 % (Hung et al., 2009).

Se ha documentado que existen variaciones en los síntomas producidos por mordedura de serpientes del mismo género. Por una parte, dichas variaciones pueden deberse a la respuesta propia del individuo envenenado debido a su estado de salud, edad, peso, entre otros. Por otro lado, desde la perspectiva de la serpiente, la composición de su veneno puede variar con respecto a la estación del año, disponibilidad de alimento, tipo de dieta, sexo, edad, etc. Por ejemplo, existen cobras que causan una mínima inflamación en el lugar de la mordedura y una alta actividad neurotóxica, como el caso de *Naja philippinensis* (Watt et al., 1987); en contraste, cuando dicha *Naja* es juvenil su mordedura es altamente edematizante y levemente neurotóxica, lo cual difiere con lo reportado para otras cobras como *Naja nigricollis*, que no generan edema pero sí daños locales y neurotoxicidad. Los envenenamientos por este último ofidio son fácilmente identificables pero difícilmente tratables por la complejidad del veneno (Reid, 1964) y su alta variabilidad dada, principalmente, por factores geográficos (Petras et al., 2011). Por último citaremos el caso de los *Micrurus* (corales) en Brazil, que provocan envenenamientos donde el factor común es la parestesia, ptosis, dolor en el sitio de la mordedura, y cuyo cuadro clínico más importante es la neurotoxicidad causada por α -neurotoxinas (Bucarechi et al., 2016). En contraste, las corales de norte américa, provocan neurotoxicidad que se sugiere puede estar gobernada, principalmente, por fosfolipasas neurotóxicas (PLA₂) (Gutiérrez and Lomonte, 2013; Sanz et al., 2016), que para el caso de *Micrurus fulvius* (Florida, EU) es ya un hecho bien demostrado (Vergara et al., 2014).

En conclusión, la OMS reconoce a los géneros *Micrurus*, *Naja*, *Dendroaspis*, *Acanthophis*, *Bungarus*, *Notechis* y *Oxyuranus* como de gran importancia médica a nivel mundial. Sus venenos son mezclas de toxinas que ejercen diversos efectos (Sintiprungrat et al., 2016). Un rasgo en común al envenenamiento causado por estas serpientes es la neurotoxicidad (Lee et al., 1977). A pesar de que puede haber variaciones en la

composición proteica de los venenos, debido a cuestiones geográficas, variaciones intra e inter-especie, al igual que ontogénicas, queda claro que las manifestaciones clínicas comunes son la ptosis, midriasis, y en casos de envenenamiento severo, parálisis respiratoria (Prasarnpun et al., 2005). Si bien puede existir un beneficio terapéutico mediante el uso de medicamento de soporte y respiración asistida (Bomb et al., 1996; Watt et al., 1986), la única vía específica para tratar la neurotoxicidad causada por elápidos es el uso de antivenenos específicos (Gutiérrez et al., 2011; Warrell et al., 1983). Además, queda claro que la aplicación oportuna del antiveneno específico es importante (CS and LS, 1987; de Roodt et al., 2004; Warrell et al., 1983), ya que en los pacientes que presentan cuadros de envenenamiento severo, en donde manifiestan parálisis respiratoria, y están siendo asistidos por medio de respiradores artificiales, la efectividad de los antivenenos no ha quedado plenamente demostrada (Hung et al., 2009; Kularatne, 2002; Laloo et al., 1995; Silva et al., 2016b).

2.5 Producción de proteínas recombinantes en *E. coli*

Con el nacimiento de la biología molecular y el desarrollo de vectores de clonación, se comenzó a explorar la producción de proteínas recombinantes en organismos heterólogos. Los datos disponibles en los servidores actuales como el *PUBMED*, *UNIPROT*, *PDB*, etc., han facilitado la obtención de secuencias útiles para la clonación y expresión de proteínas. Actualmente, *Escherichia coli* BL21, *E. coli* K12, y sus cepas derivadas, son los organismos más usados para expresar heterológamente proteínas. Igualmente importantes han sido las especies *Bacillus brevis*, *Bacillus megaterium*, *Caulobacter crescentus*, levaduras, plantas, células de insecto y virus en la producción de proteínas recombinantes; sin embargo, en contraste con *E. coli*, dichos sistemas no son los más empleados, debido, principalmente, por razones técnicas y presupuestales (Terpe, 2006).

Debido al costo-beneficio y la relativa sencillez de manejo en comparación con otras células de organismos superiores, *E. coli* ha representado el sistema óptimo de producción de proteínas recombinantes en la industria biotecnológica y farmacéutica. El uso racional de cepas, junto con el adecuado vector de clonación, han permitido la producción controlada y reproducible de muchas proteínas recombinantes (Lebendiker and Danieli, 2014); no obstante, existen muchos trabajos en donde ejemplifican y hacen evidente que la expresión de ciertas proteínas, por ejemplo, de alto masa molecular, proteínas transmembranales, receptores, aquellas que son ricas en puentes disulfuro o con modificaciones postraduccionales, aún representa un reto en dicho sistema (Hochkoeppler, 2013).

E. coli es una bacteria Gram-negativa provista naturalmente de dos operones finamente regulables, *Lac* y *AraBA*. De hecho, los primeros promotores, operadores, reguladores de la traducción y de la transcripción, se identificaron y caracterizaron usando a *E. coli* como modelo (Oehler, 2009), lo cual ha permitido utilizar toda la maquinaria genómica de este organismo a favor de la biotecnología. Por ejemplo, ha ayudado a sobre expresar genes con el fin de producir proteínas de gran interés farmacéutico como la insulina (Vajo et al., 2001) y diversos interferones (Langer and Pestka, 1984), por mencionar algunos. Los rendimientos, por un lado, se han mejorado gracias al diseño de plásmidos que permiten expresar de manera más controlada genes de interés (Friehs, 2004). Y, por otro lado, el diseño genético de cepas especializadas, ha permitido la obtención de proteínas difíciles de expresar en las cepas canónicas (Smolke and Keasling, 2002).

E. coli es la bacteria más conocida y usada en los laboratorios de investigación. Se han desarrollado cepas que ayudan a contender con problemas particulares en la producción a mediana y gran escala de proteínas recombinantes, como las que se enlistan en la **Tabla 3**: de ellas un ejemplo claro son BL21-DE3 y BL21-AI, por citar algunas. También, gracias al trabajo realizado por Studier y Moffatt (1986), en donde demostraron que incorporando genes de fagos al DNA cromosomal de *E. coli*, se podía aumentar la transcripción de prácticamente cualquier gen (Studier and Moffatt, 1986). Por ello, actualmente se cuenta con cepas que son capaces de expresar la RNA polimerasa del fago T7, la cual reconoce de manera específica promotores que están deliberadamente insertos en vectores de expresión comerciales (vectores de la serie pET, pQE-30, por ejemplo) que trabajan en sinergia para optimizar la obtención de proteínas bien plegadas, facilitar su localización, regular la sobre-expresión, incrementar su solubilidad y purificación, y eventualmente dirigirlas selectivamente al periplasma, si así se deseara (Terpe, 2006).

Una desventaja ligada a la sobreexpresión en el citoplasma es la agregación de proteínas recombinantes en forma de cuerpos de inclusión. Esencialmente, los agregados están compuestos de la proteína recombinante en diferentes conformaciones: proteína nativa y proteína en diferentes estados estructuralmente alterados. Este fenómeno es un proceso complejo que involucra diferentes mecanismos y pasos. Brevemente: los agregados son inducidos por una pequeña cantidad de proteína que forman un centro de nucleación; el centro forma un pequeño agregado soluble que a su vez genera un foco de nucleación; el foco de nucleación, por su parte, genera grandes agregados insolubles, mejor conocidos como cuerpos de inclusión (Lebediker and Danieli, 2014).

Las propiedades intrínsecas de ciertas proteínas las hacen proclives de agregarse cuando se expresan en *E. coli*. Un ejemplo claro de ellas son las denominadas “proteínas desordenadas” y las “proteínas con regiones intrínsecamente desordenadas”. Dichas

proteínas carecen de una estructura terciaria estable, por lo que su conformación -flexible y dinámica- las tiende a agregar. Sin embargo, no sólo estas propiedades intrínsecas de las proteínas son las responsables de la formación de cuerpos de inclusión en la expresión heteróloga. Existen diversos factores involucrados en el proceso. Por mencionar algunos, a nivel de expresión: la incapacidad de proteínas eucariotas de ser procesadas por la maquinaria bacteriana; la ausencia de chaperonas adecuadas y modificaciones post-traduccionales; y la ausencia de compartimentalización celular también es un factor reportado. A nivel de purificación: las condiciones fisicoquímicas que interactúan con la proteína, tales como su concentración y la fuerza iónica del medio en el que se encuentre. Como se mencionó previamente, se han desarrollado numerosas estrategias para contender con la agregación de proteínas heterólogas, tales como: uso de promotores altamente regulables y el uso de proteínas de fusión que aumenta la solubilidad de la proteína de interés (Georgiou and Segatori, 2005).

Trabajar con proteínas obtenidas a partir de cuerpos de inclusión no es una tarea fácil. Por ello, se ha avanzado en optimizar los pasos con el fin de obtener proteínas solubles. En general, el primer paso para la obtención de proteína soluble es la clonación del gen en un vector de expresión que contiene un promotor muy regulable. Esta es una forma de control que no solo permite la producción de la proteína de interés bajo condiciones reguladas, sino que también permite el escalamiento y la reproducibilidad del experimento. Como consecuencia, los vectores que contienen promotores con un sistema alto de regulación, como el promotor T7, son los que más se usan, y en menor medida los que están regulados con los promotores *araC* (inducido por arabinosa) y *cspA* (inducidos por temperatura menores a 15 °C) (Georgiou and Segatori, 2005; Guzman et al., 1995). Finalmente, existen otros promotores más sensibles que permiten sobre-producir la proteína de interés, con el riesgo adjunto de promover la formación de cuerpos de inclusión. Con la finalidad de evitar este escenario, una estrategia es usar promotores débiles, lo que permite la acumulación lenta de proteína correctamente plegada; incluso, existen reportes en donde la expresión basal (sin inductor) es la condición óptima para la obtención de ciertas proteínas en su forma soluble (Balzer et al., 2013).

La expresión de proteínas ricas en puentes disulfuro representa un reto. No obstante, como se ha mencionado anteriormente, se cuenta con estrategias para contender con este problema, tales como: secuencias que facilitan el tráfico de proteínas al espacio periplásmico (el cual tiene un potencial redox diferente del citoplasmático y de ésta manera promueve la formación de puentes disulfuro); y cepas con mutaciones específicas en genes como *trxB* (Tioredoxina reductasa) y *gor* (Glutación reductasa) que disminuyen las vías de reducción de proteínas, lo que favorece la formación de puentes disulfuro en el citoplasma: dichas cepas, como las enlistadas en la **Tabla 3**, se encuentran comercialmente disponibles bajo el nombre de ORIGAMI™ o SHuffle® T7. A pesar de estas mejoras y la amplia gama de cepas disponibles, los rendimientos reportados de

proteínas solubles son bajas, especialmente bajo condiciones de sobre-expresión (Berndt et al., 2008). Actualmente, diversos grupos de investigación recomiendan hacer un tamizado de expresión usando diferentes cepas celulares. Por ejemplo, es claro que el perfil de expresión que arroja BL21 y K12 son diferentes, aun cuando se trate de la misma proteína. Es por ello que en un proceso exhaustivo de producción formal, es necesario explorar dichas cepas y sus derivados (Lebediker and Danieli, 2014).

Tabla 3. Cepas de Escherichia coli más usadas

Cepa de <i>E. coli</i>	Derivado	Rasgos particulares
AD494	K-12	Mutante <i>trxB</i> ; facilita la formación de puentes disulfuro en el citoplasma
BL21	B834	Deficiente en las proteasas <i>lon</i> y <i>ompT</i>
BL21 <i>trxB</i>	BL21	Mutante <i>trxB</i> ; facilita la formación de puentes disulfuro en el citoplasma; Deficiente en las proteasas <i>lon</i> y <i>ompT</i>
BL21 CodonPlus-RIL	BL21	Permite la expresión de proteínas de eucariontes que contienen codones que no son usados de manera regular por <i>E. coli</i> ; Deficiente en las proteasas <i>lon</i> y <i>ompT</i>
BLR	BL21	Mutante en <i>RecA</i>
B834	Cepa B	Met auxotrofa; soporta ³⁵ S-Met
C41	BL21	Diseñada para la expresión de proteínas de membrana
C43	BL21	Doble mutante diseñada para la expresión de proteínas de membrana
HMS174	K-12	Mutante en <i>RecA</i> ; resistente a Rifampicina
JM 83	K-12	Usada para la expresión de proteínas de secreción hacia el periplasma
Origami	k-12	Mutante en <i>trxB/gor</i> ; facilita la formación de puentes disulfuro en el citoplasma
Origami B	BL21	Mutante en <i>trxB/gor</i> ; facilita la formación de puentes disulfuro en el citoplasma; Deficiente en las proteasas <i>lon</i> y <i>ompT</i>
Rosetta	BL21	Permite la expresión de proteínas de eucariontes que contienen codones raros para <i>E. coli</i> ; Deficiente en las proteasas <i>lon</i> y <i>ompT</i>
Rosetta-gami	BL21	Permite la expresión de proteínas de eucariontes que contienen codones raros para <i>E. coli</i> ; Deficiente en las proteasas <i>lon</i> y <i>ompT</i> ; facilita la formación de puentes disulfuro en el citoplasma
XL1-Blue	BL21	Mutante en <i>RecA</i> y <i>hdsR</i>

La mayoría de las cepas están también disponibles como DE3, AI y pLysS (para proteínas de difícil expresión)

La producción de toxinas recombinantes provenientes de animales ha sido un reto. Particularmente, en el caso de las toxinas de tres dedos (ricas en puentes disulfuro), la técnica más usada es aquella que ha requerido el uso de proteínas de fusión (Liukmanova et al., 2010). Dicha técnica tiene la tasa más alta en el mejoramiento de la solubilidad de proteínas blanco expresadas en *E. coli*. Esencialmente, los genes de estas proteínas están unidos a los de las proteínas de interés a través de una secuencia que codifica para un sitio de reconocimiento de una determinada proteasa (Factor Xa, TEV, SUMO, PreScission®, por mencionar las más usadas), que permite escindir la proteína de fusión de la de interés. Las proteínas híbridas que se han usado para expresar y mejorar la solubilidad de toxinas de tres dedos se conocen como: STII (Lyukmanova et al., 2007), TRX (Naimuddin et al., 2011; Wang et al., 2002), GST (Li et al., 2006) y dominio ZZ (Maïga et al., 2013).

En conclusión, *Escherichia coli* BL21 y *E. coli* K12, y sus cepas derivadas, son el sistema biológico más conocido y usado en los laboratorios de investigación para producir proteínas recombinantes con fines académicos e industriales (Terpe, 2006). El uso racional de cepas genóticamente compatibles con la proteína de interés y el adecuado vector de expresión, son herramientas útiles para la obtención de productos fisicoquímicamente estables y con capacidades bioquímicas comparables con aquellas obtenidas de su fuente natural (Lebendiker and Danieli, 2014). Por lo tanto, la expresión recombinante de toxinas de serpiente ricas en puentes disulfuro, por ejemplo, deberá considerar las cepas bacterianas con una carga genética que coadyuve con factores físicos y moleculares para su correcto plegamiento.

3. Justificación

Los venenos ofídicos son mezclas complejas de moléculas farmacológicamente activas. En ellos se han descrito péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos, aminas, y otras moléculas de bajo masa molecular (Calvete, 2013). Particularmente, los venenos de las serpientes de la familia *Elapidae* son ricos en las denominadas toxinas de tres dedos: fasciculinas, alfa (α), beta y gamma neurotoxinas, cardiotoxinas/citotoxinas, calsceptinas y toxinas muscarínicas, son ejemplos de ellas (Laustsen et al., 2015a; Pyron and Burbrink, 2012; Vonk et al., 2013).

Los reportes sugieren que las α -neurotoxinas son las protagonistas del proceso de envenenamiento causados por elápidos. De los venenos de estas serpientes analizados hasta la fecha, se ha encontrado que tanto las α -neurotoxinas de cadena corta como las de cadena larga son las responsables primordiales de la parálisis respiratoria que puede llevar a la muerte. Interesantemente, la concentración de dichas toxinas varía según la especie. En algunos casos, las α -neurotoxinas de cadena corta como la Nk2a de *Naja kaouthia* (DL_{50} 0.1 mg/kg = al 77 % de la letalidad del veneno completo) representan hasta el 30 % del peso seco del veneno (Laustsen et al., 2015a), y en algunos otros se encuentran en concentraciones tan bajas que pueden llegar a representar hasta el 1% del veneno total (Laustsen et al., 2015c). A pesar de su concentración relativa, todas son altamente letales, y en muchos casos la letalidad de los venenos completos depende exclusivamente de ellas (Barber et al., 2013).

Los cuadros de envenenamiento por elápidos son, en su vasta mayoría, neurotóxicos: actividad que puede finalizar con la muerte de la víctima debido a una parálisis muscular y un arresto respiratorio (Ranawaka et al., 2013). Si bien puede existir un beneficio terapéutico mediante el uso de medicamento de soporte y respiración asistida (Bomb et al., 1996; Watt et al., 1986), la única vía para tratar la neurotoxicidad causada por elápidos, es el uso de antivenenos específicos (Gutiérrez et al., 2011; Warrell et al., 1983). Tales antivenenos (**Tabla 2**) pueden, en ciertos casos, neutralizar de manera específica y para-específica la evolución del envenenamiento. Sabemos que lo anterior es posible gracias a diversos factores: el más destacable es debido al alto porcentaje de similitud en secuencia que exhiben las toxinas de tres dedos entre ellas, particularmente las α -neurotoxinas (Reeks et al., 2015).

Tanto la industria farmacéutica como los laboratorios de investigación encargados del diseño, comercialización y distribución de antivenenos contra elápidos, han reportado que la producción de los antivenenos contra venenos neurotóxicos representa un reto. Los problemas a superar hasta la fecha los podemos resumir en dos ramas: 1) Escases de materia prima para la producción de antivenenos; es decir, dificultad para obtener

venenos o mezclas de veneno que sirvan como inmunógenos eficaces para la obtención de un producto efectivo y de amplio espectro (Williams et al., 2011); 2) Baja inmunogenicidad de los venenos: no obstante su concentración relativa, se ha determinado de manera directa que las α -neurotoxinas no son capaces de activar la respuesta inmune en los animales productores (Fruchart-Gaillard et al., 2012; Laustsen et al., 2015a), lo cual repercute en productos poco efectivos; como consecuencia, es necesario aplicar cantidades elevadas de viales para tratar los envenenamientos; sin embargo, aumentar la concentración de inmunoglobulinas –o sus fragmentos- terapéuticas conlleva un problema serio de salud, ya que la concentración de proteína exógena administrada en forma de anticuerpos o sus fragmentos (Boyer et al., 2013), y las reacciones secundarias que potencialmente se pueden desencadenar en el paciente (Vongphoumy et al., 2016) son directamente proporcionales.

Por lo tanto, la alta letalidad de las α -neurotoxinas, el papel protagónico que juegan en el envenenamiento, y la dificultad de aislarlas del veneno –apoyado por la gran similitud en secuencia entre ellas-y su baja inmunogenicidad, nos ha llevado a proponer la síntesis de neurotoxinas consenso, con mejores capacidades inmunogénicas, que nos permitan generar antisueros efectivos con la capacidad de neutralizar el efecto clínico y letal de un amplio espectro de α -neurotoxinas del veneno de elápidos.

Si bien se han estudiado de manera exhaustiva a las α -neurotoxinas, ningún estudio hasta el momento se ha enfocado en su diseño y uso como inmunógenos para el desarrollo de antivenenos. De manera novedosa, el presente trabajo se enfoca en la síntesis de alfa neurotoxinas con secuencia consenso, lo cual tiene como finalidad optimizar los antivenenos actuales ó producir nuevos antivenenos de amplio espectro contra elápidos de importancia médica.

4. Hipótesis

Las α -neurotoxinas con secuencias consenso, tanto de cadena corta como de cadena larga, así como sus regiones funcionales “-loops-”, generados *in vitro* y expresados de manera recombinante, al ser usados como inmunógenos, permitirán generar antivenenos con capacidades neutralizantes de la neurotoxicidad del veneno de las especies de elápidos de importancia médica.

5. Objetivos

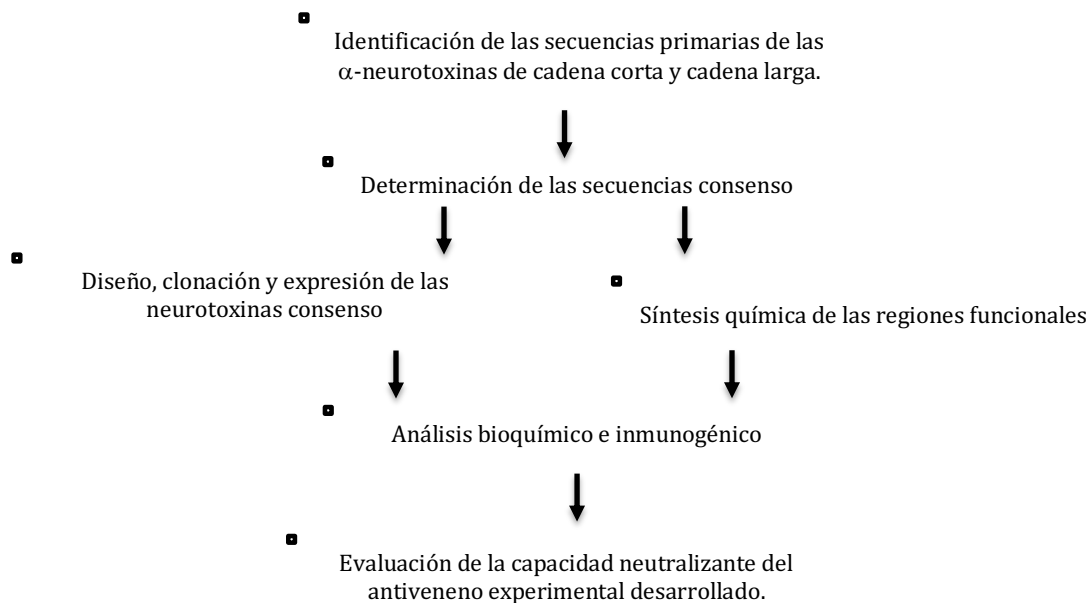
5.1 Objetivos generales

Expresar de manera recombinante α -neurotoxinas consenso, tanto de cadena corta como de cadena larga, así como sintetizar químicamente sus regiones funcionales denominadas *loops*; y emplearlos como inmunógenos para el desarrollo de un antiveneno experimental contra el veneno de elápidos.

5.2 Objetivos particulares

- Determinar las secuencias consenso de las α -neurotoxinas de cadena corta y de cadena larga de importancia médica.
- Expresar de manera recombinante las α -neurotoxinas consenso.
- Sintetizar de manera química los polipéptidos correspondientes a las regiones funcionales de las α -neurotoxinas de cadena larga consenso: *loop II*.
- Determinar la dosis letal media (DL_{50}) de cada α -neurotoxina consenso expresada.
- Evaluar como inmunógenos las α -neurotoxinas consenso y sus regiones funcionales.
- Determinar la efectividad de los sueros anti-toxinas consenso contra α -neurotoxinas asiladas y venenos completos mediante ensayos de dosis efectiva media (DL_{50}).

6. Estrategia experimental



La estrategia experimental para este trabajo comprende cuatro fases:

1) Identificación de todas las secuencias de α -neurotoxinas reportadas en la literatura. Particularmente, aquellas que correspondan con las provenientes del veneno de los elápidos de importancia médica; y que, además, tengan la letalidad más alta.

2) Determinar las secuencias consenso, tanto de α -neurotoxinas de cadena corta como de cadena larga mediante múltiples alineamientos. Dichas secuencias comprenderán el andamiaje canónico para este tipo de toxinas: arreglo de cisteínas (ocho para las de cadena corta y diez para las de cadena larga) y regiones conservadas; así como aminoácidos reportados como funcionales (**ver sección 2**). También, esta fase comprende la identificación de la región polipeptídica más conservada de las secuencias consenso de cadena larga denominada *loop II*.

3) Expresión heteróloga de las α -neurotoxinas consenso, y síntesis química de la región consenso denominado *loop II* (**ver sección 2**). Por una parte, las secuencias consenso de amino ácidos se traducirán para generar la secuencia nucleotídica correspondiente (traducción reversa). Dicha secuencia se ensamblará a partir de oligos sobrelapantes usando la técnica de PCR (**proceso detallado en Materiales y Métodos**). Posteriormente, los genes que codifican para las toxinas consenso serán expresadas en *E.*

coli. Por otro lado, los polipéptidos consenso correspondientes al *loop II* serán sintetizados de manera química.

4) Análisis bioquímico de las α -neurotoxinas consenso y las regiones funcionales denominadas *loops II*: letalidad e inmunogenicidad de los polipéptidos.

5) Se empleará una toxina consenso para el desarrollo de un antiveneno experimental en equinos, el cual será evaluado para determinar su efectividad en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

7. Materiales y Métodos

7.1 Obtención de secuencias primarias

En primera instancia, se realizó una búsqueda de todas las α -neurotoxinas reportadas en la literatura. Para cumplir con dicho objetivo, se ha hecho uso de la base de datos del “NCBI” y de “UniProt”. En estos sitios se identifican las secuencias primarias de las α -neurotoxinas de cadena corta y de cadena larga que han sido descritas para el veneno de elápidos de importancia médica a nivel mundial, particularmente de los géneros: *Micrurus*, *Naja*, *Dendroaspis*, *Acanthophis*, *Walterinnesia*, *Bungarus*, *Notechis* y *Oxyuranus*.

Primeramente, se obtienen las secuencias en las bases de datos a través de palabras clave como: “*three-finger toxins*”, “*long-chain neurotoxins*”, “*short-chain neurotoxins*”, “*alpha neurotoxins*”, “*nicotinic receptors*”, “*postsynaptic neurotoxins*”, “*curare-mimetic toxins*”, “*snake neurotoxins*”. Posteriormente, cada secuencia colectada la analizamos en dos pasos de análisis: primero, identificamos las secuencias de neurotoxinas cuya letalidad se conozcan; y segundo, usamos como template dicha secuencia y realizamos una búsqueda en la mismas bases de datos de secuencias que compartan regiones o sean similares, por medio de *BLAST*® (*Basic Local Alignment Search Tool*) como herramienta (Altschul et al., 1997). Los resultados arrojaron una serie de secuencias con información adjunta, la cual es comparada en términos de letalidad y secuencia. Sólo aquellas secuencias que se identificaron a partir de un análisis proteómico (veneno) del veneno de serpientes de los géneros ya mencionados, y cuya dosis letal media sea alta (en comparación con todas las analizadas), se tomaron en cuenta para el presente estudio, mismas que se enlistan en las **Tablas 7 y 8**.

7.2 Alineamiento de secuencias

Una vez seleccionadas las secuencias de interés se alinearon y se identificó una secuencia consenso utilizando el programa *Jalview* como plataforma, y los algoritmos del servidor *Tcoffee* (Waterhouse et al., 2009). En este estudio decidimos racionalizar las secuencias consenso propuestas: en primera instancia, se verificó la presencia de residuos de aminoácidos clave (arreglo de cisteínas, por ejemplo); posteriormente, en las posiciones con mayor variabilidad, decidimos utilizar los aminoácidos que, dadas sus propiedades fisicoquímicas y su ocurrencia en epítopes (experimentalmente determinados), aumentarán la inmunogenicidad de las secuencias consenso, todo con base en el método reportado y el índice de Kolaskar y Tongaonkar (Kolaskar and Tongaonkar, 1990), y algunas otras bases de datos (Flower, 2013; Ponomarenko and Bourne, 2007).

7.3 Construcción de genes.

La secuencia de amino ácidos de las neurotoxinas consenso se tradujo de manera reversa para obtener una secuencia de ADN. La herramienta usada fue el programa Oligo® 7.6 de Molecular Biology Insights, Inc. La secuencia de ADN generada contiene codones usados en eucariontes, particularmente en humanos, por ello, como paso subsecuente, se adaptaron para el sistema procarionte tomando en cuenta el uso preferencial de codones de *E. coli Origami k-12*, el cual se consultó en la base de datos de Kazusa (www.kazusa.or.jp/codon/E.html) y que reúne, a su vez, el uso de codones depositados en el GenBank del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

7.4 Síntesis de genes

Una vez obtenida la secuencia nucleotídica de las neurotoxinas consenso, se incluyen en el extremo 5' la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *BamHI* (GS) (**GGATCC**) y la región que codifica para el sitio de reconocimiento y corte por el factor *FXa* (IEGR) (**ATCGAGGGAAGG**). También, en el extremo 3' se incluyen dos codones de paro *STOP STOP* (**TAGTAA**) seguido del sitio de reconocimiento de *PstI* (**CTGCAG**). Las secuencias *BamHI* y *PstI* son deliberadamente insertadas ya que serán usadas para clonar en el vector de expresión pQE-30. Finalmente, las secuencias completas de los genes a sintetizar tendrán la siguiente topología:

BamHI-FXa-GEN CONSENSO-STOP-STOP-PstI

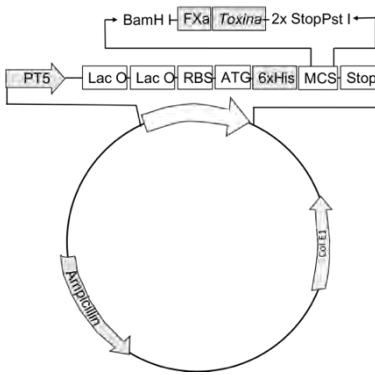
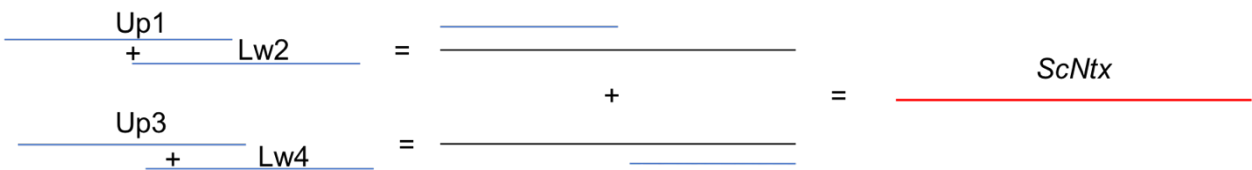


FIGURA 5. Esquema de la construcción plásmido/Toxina

En el presente trabajo, las secuencias consenso correspondientes a las α -neurotoxinas de cadena larga se denominaron *Ntx1*, *Ntx2* y *LcNtx*; y *ScNtx* para la α -neurotoxina consenso de cadena corta. Para cada caso, se sintetizaron oligos sobrelapantes que fueron amplificados para construir el gen completo por medio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Para todos los casos se utilizó la enzima “*Taq* DNA polymerase” (Invitrogen) y en algunos otros, como en el caso de la *Ntx2*, la enzima “*Hot-start Taq polymerase*”. En términos generales: las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 50 μ L con 100 μ M de dNTP’s, 20 pM de oligonucleótidos y de 1 a 1.5 mM de Mg^{2+} . Las reacciones se realizaron en un Termociclador Perkin Elmer 9600. Los ciclos de amplificación del ADN fueron diferentes para cada caso, esto con base en la temperatura de desnaturalización (T_m) de los oligonucleótidos empleados y el tamaño de los fragmentos a amplificar, las condiciones estándar con la enzima *Taq* fueron: 1 ciclo de desnaturalización de 30 s a 94°C -10 min a 95 °C para el caso de la *Hot-start*-, 30 ciclos de desnaturalización de 15 s a 94 °C, alineamiento de 40s a 55 °C, y extensión de 40 s a 72°C, y 1 ciclo de extensión final de 5 min a 72°C. Todos los fragmentos se verificaron en geles de agarosa.

En la siguiente imagen se esquematiza la construcción del gen sintético, tal y como se describió, y se toma como ejemplo el *ScNtx*. Los extremos complementarios ayudan a generar megainiciadores o *Megaprimers*. Después, esos *Megaprimers* que tienen, también, extremos complementarios entre ellos se emplean en una tercera PCR para obtener el gen completo *ScNtx*.



α -neurotoxina de cadena larga *Ntx1*:

IV \square CHTTATSP \square ISSVT \square PPGENL \square CYTKTW \square DAF \square SSRGKVVELG \square CAAT \square PKVKPYEEVK \square STDK \square NPFPKRPRRP

Se traduce en ADN para dar la siguiente secuencia:

5' ATT GTG TGT CAT ACC ACC GCG ACC AGC CCG ATT AGC AGC GTG ACC TGT CCG CCG GGC
GAA AAC CTG TGC TAT ACC AAA ACC TGG TGT GAT GCG TTT TGC AGC AGC CGC GGC AAA GTG
GTG GAA CTG GGC TGT GCG GCG ACC TGC CCG AAA GTG AAA CCG TAT GAA GAA GTG AAA TGT
TGT AGC ACC GAT AAA TGT AAC CCG TTT CCG AAA CGC CCG CGC CGC CCG 3'

Secuencia con los sitios BamHI + Fxa + STOP STOP + PstI

5' GGA TCC ATC GAG GGA AGG ATT GTG TGT CAT ACC ACC GCG ACC AGC CCG ATT AGC AGC
GTG ACC TGT CCG CCG GGC GAA AAC CTG TGT TAT ACC AAA ACC TGG TGT GAT GCG TTT TGC
AGC AGC CGC GGC AAA GTG GTG GAA CTG GGC TGT GCG GCG ACC TGT CCG AAA GTG AAA CCG
TAT GAA GAA GTG AAA TGC TGC AGC ACC GAT AAA TGT AAC CCG TTT CCG AAA CGC CCG CGC
CGC CCG TAG TAA 3'

Oligos sobrelapantes sintetizados:

Nombre	Secuencia (5' - 3')
Ntx1 -Up1	GGATCCATCGAGGGAAGGATTGTGTGTCATACCACCGCGACCAGCCCGATTAGCAGCGTGACCTGTCCGCCGGGCGA AAACCTGTGT
Ntx1 -Lw2	AGGTTTTGGTATAACACAGTTTTTCGCCCGCGGACAGGTCACGCTGCTAATCGGGCTGG
Ntx1 -Up3	CCTGGTGTGATGCGTTTTGCAGCAGCCCGGCAAAGTGGTGGAAGTGGGCTGTGCGGCGA
Ntx1 -Lw4	CAGCATTTCACTTCTTCATACGGTTTTCACTTTCCGACAGGTCGCCGCACAGCCAGTTCC
Ntx1 -Up5	TATGAAGAAGTAAAATGCTGCAGCACCGATAAATGTAAC
Ntx1 -Up6	TTACTACGGGCGGCGCGGGCGTTTTCGAAACGGGTTACATTT

α -neurotoxina de cadena larga *Ntx2*:

IV \square LDLGYTLV \square CYKTYSSSPDTSQT \square PPGENV \square CYTKTW \square DAF \square SSRGKVVELG \square CAAT \square PSVKPGVEVK \square STDKANPFP
KRKPRRPP

Se traduce en ADN para dar la siguiente secuencia:

5' ATT GTG TGC CTG GAT TTA GGC TAT ACC CTG GTC TGT TAC AAA ACG TAT AGC AGT TCG
CCG GAC ACC AGC CAG ACG TGC CCG CCT GGC GAA AAC GTG TGT TAT ACC AAG ACG TGG TGC
GAT GCG TTT TGT TCG AGC CGC GGC AAA GTC GTG GAG CTG GGT TGC GCC GCG ACC TGT CCG
TCG GTG AAA CCT GGC GTT GAA GTC AAG TGC TGT AGC ACG GAC AAA TGC AAC CCA TTC CCG
AAG CGT AAA CCC CGC CGT CCT CCG 3'

Secuencia con los sitios BamHI + Fxa + STOP STOP + PstI

5'GGA TCC ATC GAG GGA CGC ATT GTG TGC CTG GAT TTA GGC TAT ACC CTG GTC TGT TAC
 AAA ACG TAT AGC AGT TCG CCG GAC ACC AGC CAG ACG TGC CCG CCT GGC GAA AAC GTG TGT
 TAT ACC AAG ACG TGG TGC GAT GCG TTT TGT TCG AGC CGC GGC AAA GTC GTG GAG CTG GGT
 TGC GCC GCG ACC TGT CCG TCG GTG AAA CCT GGC GTT GAA GTC AAG TGC TGT AGC ACG GAC
 AAA TGC AAC CCA TTC CCG AAG CGT AAA CCC CGC CGT CCT CCG TAA TAG CTG CAG 3'

Oligos sobrelapantes sintetizados:

Nombre	Secuencia (5' – 3')
Ntx2 -Up1	GGATCCATCGAGGGACGCATTGTGTGCTGGATTTAGGCTATACCCTGGTCTGTTACAAAACGT
Ntx2 -Lw2	CCAGGCGGGCACGTCTGGCTGGTGTCCGGCGAACTGCTATACGTTTTGTAACAGACCAGGGT
Ntx2 -Up3	GACGTGCCCGCTGGCGAAAACGTGTGTTATACCAAGACGTGGTGCATGCGTTTTGTTCGAGCC
Ntx2 -Lw4	CACCGACGGACAGGTGCGGCGCAACCCAGCTCCACGACTTTGCCGCGGCTCGAACAAAACGCATCG
Ntx2 -Up5	GCGACCTGTCCGTCGGTGAACCTGGCGTTGAAGTCAAGTGTGTAGCACGGACAAATGC
Ntx2 -Up6	CTGCAGCTATTACGGAGGACGGCGGGGTTACGCTTCGGGAATGGGTTGCATTTGTCCTGCTACAGC

α -neurotoxina de cadena larga *LcNtxI*:

II¹CY²TP³NP⁴VPI⁵QS⁶QT⁷PP⁸GEN⁹LC¹⁰Y¹¹TK¹²TW¹³DA¹⁴FC¹⁵SS¹⁶RG¹⁷KR¹⁸VEL¹⁹GC²⁰AA²¹T²²PK²³V²⁴K²⁵PG²⁶VE²⁷IK²⁸CC²⁹STD³⁰K³¹C³²N³³

Se traduce en ADN para dar la siguiente secuencia:

5' ATT ATC TGC TAT ACC ACG CCG AAC GTG CCG ATT CAG AGC CAG ACC TGC CCG CCG GGC
 GAA AAC CTG TGC TAT ACC AAA ACC TGG TGC GAT GCG TTT TGC AGC AGC CGC GGC AAA CGC
 GTG GAA CTG GGC TGC GCG GCG ACC TGC CCG AAA GTG AAA CCG GGC GTG GAA ATT AAA TGC
 TGC AGC ACC GAT AAA TGC AAC 3'

Secuencia con los sitios BamHI + Fxa + STOP STOP + PstI

5' GAG GGA TCC ATC GAG GGA CGC ATT ATC TGC TAT ACC ACG CCG AAC GTG CCG ATT CAG
 AGC CAG ACC TGC CCG CCG GGC GAA AAC CTG TGC TAT ACC AAA ACC TGG TGC GAT GCG TTT
 TGC AGC AGC CGC GGC AAA CGC GTG GAA CTG GGC TGC GCG GCG ACC TGC CCG AAA GTG AAA
 CCG GGC GTG GAA ATT AAA TGC TGC AGC ACC GAT AAA TGC AAC TAA TAG CTG CAG 3'

Oligos sobrelapantes sintetizados:

Nombre	Secuencia (5' – 3')
LcNtx -Up1	GAGGGATCCATCGAGGGACGCATTATCTGCTATACCACGCCGAACGTGCCTATT
LcNtx -Lw2	GCACAGATTTTCGCCAGGCGGACAGGTTTGCTCTGAATAGGCACGTTTCGGCGTG
LcNtx -Up3	GCCTGGCGAAAATCTGTGCTACACGAAAACCTGGTGTGATGCGTTTTGCAGTAG
LcNtx -Lw4	CGTCGCGGCACAGCCCAGCTCAACACGCTTACCGCGGCTACTGCAAAAACGCATC
LcNtx -Up5	CTGGGCTGTCCGCGACGTGCCCGAAAGTGAAGCCTGGTGTGAAATCAAATGTTGCTCG
LcNtx -Up6	CTCCTGCAGCTATTAGTTACACTTGTGCGGTGCGAGCAACATTTGATTTCAACACC

α -neurotoxina de cadena corta ScNtx:

MIYNYNQSSQPPTTKTSETS~~Y~~KKTRDHRGTIIERG~~GG~~CPKVKPGIKLH~~CC~~RTDK~~NN~~

Se traduce en ADN para dar la siguiente secuencia:

5' ATG ATA TGT TAC AAC CAA CAG TCA TCG CAA CCT CCA ACC ACT AAG ACT TGT TCA GAA
ACG AGC TGC TAT AAA AAG ACT TGG CGT GAT CAC CGT GGA ACC ATA ATC GAA AGA GGA TGT
GGT TGC CCT AAG GTG AAG CCC GGT ATT AAA CTT CAC TGT TGC CGC ACG GAC AAA TGC AAC
AAT 3'

Secuencia con los sitios BamHI + Fxa + toxina + STOP STOP + PstI

5' GGA TCC ATC GAG GGA AGG ATG ATA TGT TAC AAC CAA CAG TCA TCG CAA CCT CCA ACC
ACT AAG ACT TGT TCA GAA ACG AGC TGC TAT AAA AAG ACT TGG CGT GAT CAC CGT GGA ACC
ATA ATC GAA AGA GGA TGT GGT TGC CCT AAG GTG AAG CCC GGT ATT AAA CTT CAC TGT TGC
CGC ACG GAC AAA TGC AAC AAT TAG TAA CTG CAG 3'

Oligos sobrelapantes a sintetizar:

Nombre	Secuencia (5' - 3')
ScNtx -Up1	GAGGGATCCATCGAGGGAAGGATTATCTGCTATACCACTCCGAATGTTCCAATTCAGAGCCAAACTTGTC
ScNtx -Lw2	TGAACTTGTTTTACGTAGTGTGGTTCAAATCATATTGTTCCAAAAGTGGACCGCTGTCAAACCGAGACT
ScNtx -Up3	TGTGATGCATTTTGTTC AAGTCGTGGTAAGAGAGTTGAACTTGGCTGTGCAGCCACTTGCCTAAAGTTA
ScNtx -Lw4	TCCTGCAGTTACTAGTTACACTTATCGGTGCTGCAACATTTAATTCAACACCTGGCTTAACCTTAGGGCAAGTGG

Finalmente, los genes ensamblados *Ntx1*, *Ntx2*, *LcNtx* y *ScNtx* se clonaron en el vector de expresión pQE30, tal y como se esquematiza en la **Figura 5**.

7.5 Síntesis química

Los péptidos empleados en la presente tesis se sintetizaron químicamente por la empresa ChinaPeptides (ChinaPeptides Co., LTD. Shanghai, China), la cual emplea la síntesis de péptidos en fase sólida sobre resina Wang como soporte sólido y 9-fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc) como grupo protector de los aminoácidos (Gao et al., 2013). Los péptidos denominados *LcP1* y *LcP2* se adquirieron en forma cruda y posteriormente se purificaron en el laboratorio por cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC).

7.6 *E. coli*, vectores y enzimas.

Las cepas de *E. coli* que se usaron en el presente estudio fueron: BL21, XL1-BLUE, M15 y ORIGAMI. Como vector de expresión se utilizó pQE30 (Quiagen). La

Taq Polimerasa, T4 ligasa, Factor Xa y todas las enzimas de restricción se adquirieron de New England Biolabs.

7.7 Construcción y purificación del vector

Tanto el inserto que codifica para cada toxina consenso como el vector pQE30, se digirieron con las enzimas de restricción BamHI y PstI a 37 °C durante toda la noche. Los productos de digestión se purificaron por medio de una columna QIAquick, para después ligarlos en volúmenes de 20 µl con T4 ligasa, siempre en una relación 1:10 inserto-vector. Para todos los pasos, se verificaron los productos por medio de geles de agarosa, y las secuencias se verificaron por medio de secuenciación Sanger en la unidad de secuenciación de ADN del instituto de biotecnología de la UNAM.

Cuando se requirió, el vector pQE30-Neurotoxina, previamente incorporado en *E. coli*, se extrajo a partir de cultivos de 5 mL incubados durante toda la noche a 37°C y 250 rpm en medio LB y antibióticos. Las células se colectaron por centrifugación por 1 min a 14,000 rpm y se resuspendieron en 1 mL de solución SET (sacarosa 20%, 50 mM de Tris-HCl pH 7.6 y 50 mM de EDTA) para ser lavadas. Se centrifugaron y resuspendieron en 150 µL de la misma solución. Posteriormente, se adicionaron 10 µL de RNAsa (10 mg/mL) y 350 µL de SDS (2%)/NaOH (0.4 M) en relación volumétrica 50:50, se mezcló por inversión e incubó en un baño de hielo por 10 minutos. Se agregaron 250 µL de 3 M de acetato de sodio pH 4.8 y se mezcló -antes de incubar- en hielo por 30 minutos. Se centrifugó 10 minutos y el sobrenadante (SN) se transfirió a un tubo estéril; para precipitar se agregó un volumen de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó por 5 minutos a 14,000 rpm. La pastilla se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 30 µL de agua. El ADN plasmídico de *E. coli* para secuenciación se extrajo con el Plasmid Mini Kit (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del proveedor.

7.8 Transformación

En todas las transformaciones que se presentan en esta tesis se usaron células quimio-competentes con el siguiente protocolo: 100 µl de células ($O.D_{600nm} = 0.6$) y de entre 1 y 3 µL de la reacción de ligación, se incubaron por 30 min a 4 °C (en hielo), seguido de 30 segundos a 42 °C (choque térmico), y después 5 minutos en hielo. Finalmente, la reacción se incubó a 37 °C por 1 hora con 250 µL de medio SOC (SOC médium, Sigma). Se plaquearon 50 µL en cajas Petri con Agar-LB, kanamicina y ampicilina. Las cajas Petri se incubaron a 37°C de 8 a 12 h. Las colonias observables son aquellas que incorporaron el vector pQE30-Neurotoxina (pQE30-NTX) puesto que son las únicas capaces de crecer en un medio con ampicilina.

7.9 Medios de cultivo

Se utilizaron cuatro medios de cultivo:

- 1) **Medio mínimo:** Yeast extract 3 %, glucosa 0.5 %, $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ 0.35 %.
- 2) **LB:** Tryptona 1 %, yeast extract 0.5 %, NaCl 0.5 %.
- 3) **MLB:** Tryptona 2 %, yeast extract 3 %, NaCl 2.1 %, glucosa 0.5 %, $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ 0.35 %, KH_2HPO_4 0.35 %, K_2HPO_4 0.5 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.7 %.
- 4) **MmLB:** Peptona 2 %, yeast extract 3 %, NaCl 2.1 %, glucosa 0.5 %, $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ 0.35 %, KH_2HPO_4 0.35 %, K_2HPO_4 0.5 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.7 %.

Dado que el vector pQE30 contiene el marcador de selección que le confiere resistencia a ampicilina, siempre se empleó el antibiótico a una concentración de 200 μg por mL de medio, y adicionalmente Kanamicina para los cultivos con ORIGAMI® y SHuffleT7, ya que dichas cepas son resistentes a ella.

7.10 Condiciones de selección y expresión

Las colonias positivas pQE30-NTX se seleccionaron y crecieron en cultivos de 3 mL de medio LB con kanamicina, ampicilina y 1mM de IPTG por 6 hrs a 37 °C. Se tomó 1 mL de cada muestra y se centrifugó por 5 min a 14,000 rpm. La pastilla se resuspendió y se analizó a través de electroforesis en geles de poli acrilamida-SDS en condiciones reductoras (**Ver electroforesis de proteínas**). Las colonias cuyo patrón electroforético mostró sobre expresión de la proteína esperada (identificada en relación con los marcadores de peso molecular y por inmunodetección), se asignaron dentro de las colonias candidatas para la producción de proteína recombinante en cultivos mayores a 50 mL.

Las colonias seleccionadas se crecieron en cultivos de 50 mL y, posteriormente, en cultivos de 500 mL de medio mínimo, LB, MLB y MmLB, todas a 37°C y con una agitación de 250 rpm. Después de crecer hasta una DO cercana a 0.6, medida a 600 nm, se indujo la expresión con IPTG a una concentración final de 0.1 mM. Para cada cepa y medio de cultivo, se probaron diferentes temperaturas de inducción, las cuales fueron: 37, 25, 20 y 16 °C. También, el tiempo de inducción fue de 24 h; y únicamente 12 h para el caso de ORIGAMI® y SHuffleT7. Posterior al crecimiento y finalizada la inducción, las células se cosecharon mediante centrifugación a 5000 x g por 20 min. Una vez descartado el sobrenadante, las células se resuspendieron en el Buffer de lisis BugBuster® (Novagen®) con lisosima y benzonasa (según las recomendaciones de uso) y se mantiene en agitación constante por 30 min a temperatura ambiente. La muestra se centrifuga a 20,

000 g x 25 min, el sobrenadante (fracción soluble) y la pastilla (cuerpos de inclusión) se almacenó a -60°C hasta su uso.

7.11 Proteína soluble, cuerpos de inclusión y purificación.

Las toxinas consenso recombinantes se purificaron por afinidad haciendo pasar la fracción soluble por una columna de Ni-NTA agarosa (QIAGEN). La proteína unida a la fase sólida se escindió de ella con 400 mM de Imidazol en PBS. Se colectaron fracciones de 1 mL, se analizaron por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).

Se aplicaron dos metodologías para obtener la proteína recombinante a partir de los cuerpos de inclusión: Sarcocil y GnCl 6 M. Para el caso de sarcocil, se siguió lo sugerido por Peternel y colaboradores (Peternel et al., 2008). Con respecto al método de GnCl 6 M, fue el siguiente: la pastilla se lavó tres veces con 20 mL de Tris 20 mM, pH 8 y posteriormente se trató con 15 mL de una solución desnaturizante de Tris 50 mM, 6 M de cloruro de guanidina a pH 8 para extraer la proteína -se resuspende hasta observar una solución homogénea-. Posteriormente, se centrifuga a 2,000 g x 1 h. Los sobrenadantes obtenidos por sarcocil y GnCl 6 M se pasaron por una columna de Ni-NTA agarosa y las proteínas se desprendieron de la columna con 400 mM de Imidazol en el buffer correspondiente. Las fracciones colectadas se colectaron y analizaron en geles de SDS-PAGE.

Finalmente, se realizó la re-purificación por rpHPLC, usando como solvente A 0.1% TFA en H_2O y solvente B 0.1% TFA en acetonitrilo. Las neurotoxinas obtenidas se separaron en una columna C18 (4.1 x 250 mm) con un gradiente de 10 a 60% de solvente B en un lapso de 60 min.

7.12 Electroforesis de proteínas e inmunodetección.

La separación de proteínas se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 12 y 15 % en presencia de SDS (Dodecilsulfato de sodio), tal como fue sugerido por Laemmli en 1970. En suma, la polimerización de la acrilamida con la bis-acrilamida (Biorad) fue catalizada por el TEMED (1,2-bis (dimetilamino)-etano) y PSA (Persulfato de amonio). Para todos los casos, se determinó de manera cualitativa la sobreproducción de las neurotoxinas consenso mediante geles al 15% en condiciones reductoras (hervidas 5 min, 10% glicerol + 2.5% SDS + 50 mM Tris-HCl pH. 6.8 + 5% 2-mercaptoetanol + 0.002% Azul Bromofenol) (Laemmli, 1970). Las corridas se llevaron a cabo a voltaje constante (120 mV). La tinción de los geles fue con azul Brillante de Coomassie G250 (50% metanol + 10% ácido acético + 0.2% Azul de Coomassie G250) durante una hora, y

se destiñeron con una solución al 10% de ácido acético y 10 % de metanol durante una hora en agitación constante.

Las proteínas separadas en un gel desnaturante de poliacrilamida SDS se transfirieron eléctricamente a una membrana de nitrocelulosa o de fibra de vidrio (immobilon de Millipore), típicamente por 1 h a 400 mV. Se comprobó la cantidad de proteína transferida a las membranas mediante tinción reversible con Ponceau S (0.1% en ácido acético 1%). La detección se hizo con anticuerpos primarios comerciales contra His-tag (Anti-His₆ peroxidase, Roche) o con suero experimentales anti-neurotoxinas consenso, comúnmente en una dilución 1:1000 por 1 h a temperatura ambiente, o toda la noche a 4 °C. Las bandas positivas en las membranas se detectaron por quimioluminiscencia (ECL western blotting análisis system RPN2109 de Amersham) o por colorimetría después de incubar por 1 h dichas membranas con un anticuerpo secundario unido a peroxidasa de nabo, en una dilución 1:4000. El instrumental, equipo y reactivos fueron de Bio-Rad (California, E.U.) y los anticuerpos de Roche y ZYMED.

7.13 Dosis letal media

La dosis letal media (DL₅₀) se define como la dosis de cualquier sustancia capaz de provocar la muerte del 50 % de la población de individuos: en el presente trabajo, se definió como aquella dosis, ya sea de veneno o toxina, que provoca la muerte del 50 % de una población de ratones. Para poder determinar la DL₅₀, se inocularon grupos de 5 ratones (cepa CD1) con un peso de entre 18 y 20 g por vía endovenosa. El método consta en probar diferentes concentraciones de veneno disuelto en NaCl 0.15 M a un volumen final de 0.5 mL. A las 24 horas posteriores a la inoculación, se determinó el porcentaje de sobrevivientes en cada nivel de dosis; la dosis letal media se calculó por medio del análisis de los datos regresión no lineal a través de una curva sigmoide dosis-respuesta con la ayuda del programa Prism (versión 4) de Graphpad (San Diego, CA) y es expresada en µg/ratón o mg/kg.

7.14 Esquemas de inmunización

Con la finalidad de evaluar la capacidad inmunogénica de la ScNtx y los péptidos LcP1 y LcP2, se emplearon grupos de conejos Nueva Zelanda blancos. Se tomaron muestras de sangre de manera periódica y al final del esquema de inmunización los conejos se sangraron a blanco. Para el caso de la ScNtx, se empleó un grupo de tres caballos criollos de 400 kg de peso. Las muestras de sangre se tomaron de manera periódica cada 14 días.

Se emplearon 100 µg de cada péptido sintético, tanto de LcP1 y LcP2, en todas las inmunizaciones como se muestra en la **Tabla 6**. Para el caso de la *ScNtx*, las inmunizaciones se realizaron de una manera dosis-creciente (típicamente comenzando con 3 veces la dosis letal media), como se en lista la **Tabla 7**. Además, tanto los péptidos sintéticos como la neurotoxina consenso, resuspendidas en PBS, se aplicaron con los siguientes adyuvantes: Alumina o Alum (Imject® Alum, Thermo Scientific), adyuvante completo (CFA) e incompleto de Freud (IFA) (Rockland). Las inmunizaciones se realizaron de manera subcutánea y en múltiples sitios (200 µL/sitio) (Sriprapat et al., 2003). El volumen inoculado siempre fue de 1 mL/conejo, el cual incluye la dosis de proteína correspondiente con una proporción 1:1 PBS/adyuvante.

Tabla 4. Esquema de inmunización de conejos con LcP1 y LcP2

No. Inmunización	Día	No. Conejos	Péptido (µg/conejo)	PBS (mL)	Adyuvante (tipo)
1	0	2	100	1	CFA
2	7	2	100	1	IFA
3	14	2	100	1	ALUM
4	21	2	100	1	IFA
5	28	2	100	1	-
6	35	2	100	1	ALUM
7	42	2	100	1	IFA
8	49	2	100	1	-
9	63	2	100	1	ALUM
10	77	2	100	1	IFA
11	91	2	100	1	-
Sangría	105	2			

CFA= Adyuvante completo de Freud; IFA= Adyuvante incompleto de Freud

Tabla 5. Esquema de inmunización de conejos con la ScNtx.

No. Inmunización	Día	No. Conejos	Toxina (µg/conejo)	PBS (mL)	Adyuvante (tipo)
1	0	3	10	1	CFA
2	7	3	10	1	IFA
3	14	3	10	1	ALUM
4	21	3	25	1	IFA
5	28	3	50	1	-
6	35	3	100	1	ALUM
7	42	3	100	1	IFA
8	49	3	200	1	-
9	63	3	200	1	ALUM
10	77	3	400	1	IFA
11	91	3	400	1	-
Sangría	105	3			

CFA= Adyuvante completo de Freud; IFA= Adyuvante incompleto de Freud

El esquema de inmunización de caballos donde se emplea como inmunógeno la *ScNtx*, y que se detalla en la **Tabla 8**, consistió en los siguiente: la primera inmunización se realizó de manera intradérmica con IFA con una proporción PBS-adyuvante 1:4 y distribuidos en 10 sitios; las subsecuentes por vía subcutánea distribuidos en 4 sitios, y con una proporción PBS-adyuvante que se detalla en la tabla 9. El volumen inyectado a cada caballo típicamente es de 1 mL y en algunos casos no mayor a 1.5 mL.

Tabla 6. Esquema de inmunización de caballos con la ScNtx.

No. Inmunización	No. Día	No. Caballos	Toxina (µg/caballo)	PBS: adyuvante	Adyuvante (tipo)
1	0	3	5	1:4	IFA
2	14	3	5	6:1	ALUM
3	28	3	10	1:2	IFA
4	42	3	20	5:1	ALUM
5	56	3	40	1:2	IFA
6	70	3	80	2:1	ALUM
7	84	3	150	1:0	-
8	98	3	300	0:1	IFA
9	112	3	300	2:1	ALUM
10	126	3	500	1:0	-
11	140	3	500	1:2	IFA
	147				
12	196		1000	-	-
	205				

CFA= Adyuvante completo de Freud; IFA= Adyuvante incompleto de Freud

Es importante mencionar que todos los animales empleados en la presente tesis se mantuvieron y se trataron de acuerdo a los lineamientos dictados por el comité de bioética del instituto biotecnología de la UNAM. Para mayor detalle visitar la siguiente:

<http://ibt.unam.mx/computo/pdfs/ReglamentoComiteBioeteicaAprobadoCI.pdf>

7.15 Ensayo inmunoabsorbente acoplado a enzima (ELISA)

La prueba inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) es una técnica cuya sensibilidad la hace imprescindible en la determinación de los títulos de anticuerpos. La técnica se basa en la interacción antígeno-anticuerpo, la cual se detecta por un conjugado compuesto de un anticuerpo unido covalentemente a una enzima que permite generar una señal colorida. Los títulos se definieron como la dilución del suero hiperinmune en la cual se encuentra la mitad de la absorbancia máxima (Vázquez et al., 2010).

El protocolo de la prueba de ELISA que se empleó en el presente trabajo consistió en:

- Se sensibilizaron placas de 96 pozos para ELISA (NUNCTTM) con una solución de antígeno (péptidos, toxinas o venenos) a una concentración de 1 µg/mL disuelta en 100 mM carbonato/bicarbonato pH 9.5. Por cada pozo se colocaron 100 µL hasta la columna 12. La placa se incubó 2 horas a 37 °C, ó bien toda la noche a 4 °C.
- Concluida la incubación, la placa se lavó tres veces con 250 µL de buffer de lavado (50 mM Tris/HCL pH 8 + 150mM NaCl + 0.05% Tween 20). Este proceso se repitió entre cada paso a lo largo del protocolo.
- Se bloquearon los sitios en donde pudiese haber uniones inespecíficas incubando con 200 µL de solución de bloqueo (50 mM Tris/HCl pH 8 + 5 mg/mL gelatina + 0.2 % Tween 20) por 2 horas a 37 °C.
- Se hicieron diluciones seriadas de los sueros empezando con diluciones 1:30. En cada pozo se adicionaron 100 µL de la solución de reacción para ELISA (50mM Tris/HCl pH. 8 + 0.5 M NaCl + 1mg/mL gelatina + 0.05% Tween 20) y se realizaron diluciones seriadas 1:3 hasta la columna 11 dejando la columna 12 como control negativo. Se incubó 1 hora a 37 °C.
- Se incubó el segundo anticuerpo: un anti-conejo conjugado a la enzima peroxidasa diluido 1:1000 en solución de reacción para ELISA. Se colocaron 100 µL/pozo y se incubó una hora a temperatura ambiente.
- La reacción se reveló con 100 µL/pozo de sustrato ABTS (Di- amonio 2,2'-Azino-bis-[3-etilbenzoliazo-lino-6 sulfonato]), incubándose por 10 minutos a temperatura ambiente. Al final, la reacción se detuvo con 100 µL de SDS 10%, quedando a una concentración final de SDS al 5 %. Se procedió a leer la placa en un lector de ELISA (Marca TECAN línea SUNRISE) a una longitud de onda de 405 nm.

Para determinar los títulos de las lecturas obtenidas, las curvas sigmoideas se generaron con el programa Prisma 6 (GraphPad Software, La Jolla California, E.U.). El punto de inflexión se calculó ajustando los datos experimentales para cada toxina o antisuero por regresión no lineal de las curvas .

7.16 Efectividad de los sueros

Los sueros de los animales inmunizados, en donde se emplearon los inmunógenos diseñados, se evaluaron tanto por su habilidad para atenuar los efectos tóxicos, retardar el tiempo de muerte y para neutralizar el efecto letal de α -neurotoxinas y algunos venenos completos. Para todos los casos, los ensayos consisten en incubar por 30 min a 37 °C una mezcla que incluye 3 x DL₅₀ del veneno o toxina con cantidades variadas del antisuero, e inyectarlas vía endovenosa a grupos de 5 ratones de la cepa y peso previamente descritos.

El volumen final inyectado siempre fue de 500 μL /ratón. Por un lapso de 24 h se observó y registró el número de muertes y los datos se analizaron por el método descrito de Kaplan-Meier (Kaplan and Meier, 1958). Además, en algunos casos se describió la efectividad de los sueros a través de la determinación de la dosis efectiva media (DE_{50}), la cual es el volumen de antiveneno que evita la muerte del 50 % de la población de ratones. Para este ensayo se registra el porcentaje de sobrevivida por grupo a las 48 horas después de la inyección. La DE_{50} se expresa en μL de antisuero. En todos los casos los controles incluyen: 3 x DL_{50} del veneno o toxina sin suero o anticuerpos; 3 x DL_{50} del veneno o toxina más suero o anticuerpos pre-inmunes.

8 RESULTADOS

8.1 Alfa neurotoxinas de importancia médica.

Las secuencias proteicas depositadas en la base de datos del *NCBI* y *UniProt* relacionadas con las alfa neurotoxinas, se analizaron y cotejaron con aquéllas provenientes de las serpientes que, según la OMS, son importantes en términos de salud pública, denominadas: “*Highest medical importance*”, y que puede ser consultada en: <http://apps.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms/database/>. Además, se analizó también en detalle la caracterización bioquímica de cada una de las alfa neurotoxinas, ello con el fin de poder confirmar que se trata de un polipéptido aislado del veneno y no una secuencia deducida a partir de estudios ajenos a los proteómicos. Como resultado, se identificaron 20 secuencias de alfa neurotoxinas: 8 de cadena larga en listadas en la **Tabla 4**, y 12 de cadena corta en la **Tabla 5**. Las toxinas de cadena larga contienen entre 71 y 79 residuos de amino ácidos; a su vez, las de cadena corta, de entre 56 y 62. Además de esto, la DL_{50} de cada una de ellas las coloca como las toxinas de serpiente con la letalidad más alta (Barber et al., 2013), con dosis que van de 0.03 mg/kg (0.6 μ g/ratón) a 0.9 mg/kg (18 μ g/ratón), determinadas por diferentes vías como la endovenosa, subcutánea e intraperitoneal.

8.2 Toxinas con secuencia consenso.

Las secuencias consenso se determinaron mediante un alineamiento múltiple de secuencias de las α -neurotoxinas de importancia médica; como resultado, se obtuvo una secuencia sugerida por los algoritmos empleados, denominada *consensus*, la cual se tomó como base para generar las toxinas consenso de cadena larga *Ntx1*, *Ntx2* y *LcNtx*, sus péptidos derivados aquí denominados *LcP1* y *LcP2*; y la α -neurotoxina de cadena corta, *ScNtx*.

El alineamiento de 8 secuencias de alfa neurotoxinas de cadena larga generó una que denominamos *consensus*, que se muestra en la **Figura 6**, de 84 amino ácidos, de los cuales 10 son indeterminados. Primeramente, nuestras secuencias consenso *Ntx1*, *Ntx2* y *LcNtx*, tienen en aquéllas posiciones indeterminadas los aminoácidos con mayor recurrencia; y en ciertos casos, en posiciones específicas, en donde existe un amino ácido propuesto *consensus*, deliberadamente optamos por cambiarlos en razón de su prevalencia, tamaño, carga e inmunogenicidad, pero nunca cambiando de naturaleza (ej. polar a no polar). Así, en la **Tabla 4** se presentan las tres neurotoxinas consenso de cadena larga que se generaron: la *Ntx1* tiene una secuencia de 75 amino ácidos, 16 de ellos se determinaron con base en las razones previamente expuesta; la *Ntx2*, 84 amino ácidos, 22 de los cuales difieren de la *consensus*; finalmente, la *LcNtx* contiene 66 amino

ácidos y 9 residuos que no forman parte de la secuencia *consensus*. Además, se ilustra la región con menor variabilidad de donde se obtuvieron los dos péptidos consenso a sintetizar: LcP1 y LcP2. En la **Figura 6** y **Tabla 7** se puede observar con detalle lo mencionado.

FIGURA 6 Alineamiento de alfa neurotoxinas de cadena larga

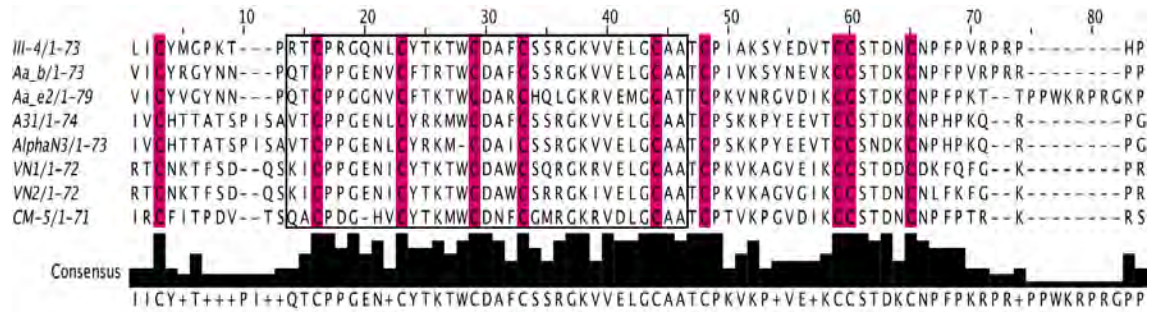


Tabla 7. Neurotoxinas de cadena larga y péptidos derivados

Toxina	Secuencia aminoacídica	DLso ^b	# Acceso
III-4	LIICYMGPKT---PRTCPRGQNLCTYK TWCDAFCSRRGKVVVLELGC AATCPIAKSYEDVTCCS TDN CNPFVPRPR-----HP	0.12 (IV)	P01384
Aa2b	VIICYRGYNN---PQTCPGGENVCFTRTWCDAFCSRRGKVVVLELGC AATCPIVKSYNEVKCCS TDK CNPFVPRPR-----PP	0.13 (IM)	P01385
Aa2e	VICYVGYNN---PQTCPGGENVCFTRTWCDARCHQLGKRVEMGC AATCPKVNRRGVDIKCCS TDK CNPFPKT---TPPWKRPRGKP	0.2 (IP)	P0DKW9
A31	IVCHTTATSPISAVTCTPPGENLCYRKMCDAFCSRRGKVVVLELGC AATCPKVKAGVEIKCCS TDK CNPHPKQ---R-----PG	0.23 (IP)	P60615
N3	IVCHTTATSPISAVTCTPPGENLCYRKM---DAICSSRGKVVVLELGC AATCPKVKAGVEIKCCS TDK CNPHPKQ---R-----PG	0.16 (IV)	P85140
Dpp2b	RTCNKTFSD--QSKICPPGENICYTK TWCDAWCSRRGKIVELGCAATCPKVKAGVGIKCCS TDN CNLFKFG--K-----PR	0.4 (SC)	P25667
Dpp2a	RTCNKTFSD--QSKICPPGENICYTK TWCDAWCSRRGKIVELGCAATCPKVKAGVGIKCCS TDN CNLFKFG--K-----PR	0.12 (SC)	P01396
CM-5	IRCFITPDV--TSQA CPDG-HVYTKMWCDNF CGMRGKRVDLGC AATCP TVKPGVDIKCCS TDN CNPFVPRPR-----RS	0.11 (IV)	P25674
Consensus	IICY+T+++PI++QTCPGGEN+CYTKTWCDAFCSRRGKVVVLELGC AATCPKVKP+VE+KCCSTDKCNPFVPRPR+PPWKRPRGPP		
Lcp1	NVCYTKTWCDAFCSRRGKVVVLELGC AAT		
Lcp2	QTCPGGENVAYTKTWCDAFCSRRGKVVVLELGC AAT		
LcNtx	IICYTTFNVPISQVTCPPGENLCYTK TWCDAFCSRRGKVVVLELGC AATCPKVKP GVEIKCCS TDK CN		
Ntx1	IVCHTTATSPISVTCPPGENICYTK TWCDAFCSRRGKVVVLELGC AATCPKVKP YEEVKCCS TDK CNPFVPRPR		
Ntx2	IVCLDLGYTLVICYKTYSSPDTSTQCCTPPGENVCTYTK TWCDAFCSRRGKVVVLELGC AATCPKVKP GVEIKCCS TDK CNPFVPRPR		

^bIM=Intramuscular; IP= Intraperitoneal; SC= Subcutáneo;IV= Endovenoso

Para el caso de la neurotoxina consenso de cadena corta *ScNtx*, su obtención fue como en el caso anterior: por medio de un alineamiento de secuencias de alfa neurotoxinas de cadena corta, se obtuvo una secuencia denominada *consensus*, la cual tiene 5 indeterminaciones y 62 amino ácidos señalados en la **Figura 7**. Para cada indeterminación, se utilizó el amino ácido más recurrente; que tuviera propiedades químicas similares y que, a su vez, tuvieran un mayor grado de inmunogenicidad. Como resultado, la secuencia *ScNtx* contiene 60 aminoácidos: en relación a la *consensus*, carece de dos residuos y contiene 5 aminoácidos que ocupan las posiciones indeterminadas de la *consensus*. Lo anterior se puede observar con detalle en la **Tabla 8**.

FIGURA 7 Alineamiento de alfa neurotoxinas de cadena corta

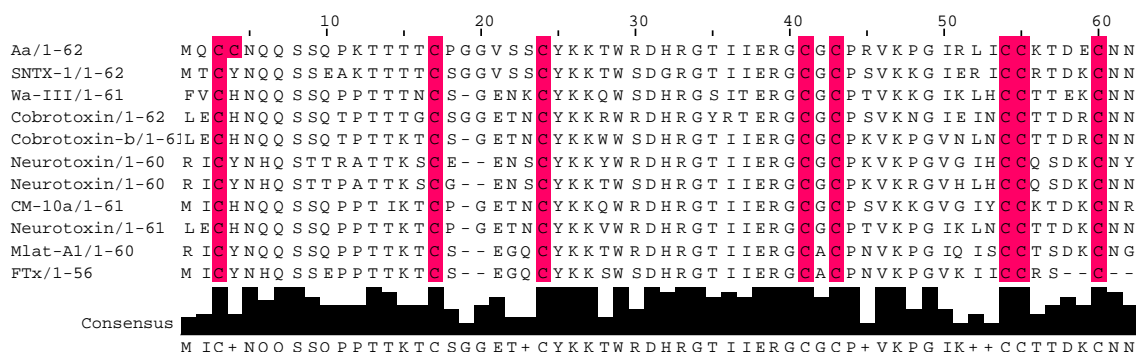


Tabla 8. Neurotoxinas de cadena corta y consenso derivado

Toxina	Secuencia aminoacídica	DL ₅₀ ^b	#
Aa	MQCCNQQS SQPKTTTTCPGGVSSCYKKTWRDHRGT I IERGGCPRVKPGIRLI CCTDECNN	1.6	P01434
SNTX-1	MTCYNQQS SEAKTTTTCSGGVSSCYKKTWSDGRGT I IERGGCP SVKKGIERI CCTDKCNN	1.2	Q45Z11
Wa-III	FVCHNQQS SQPPTTTCSSGGENKCYKQWSDHRGSI TERGGCPTVKKGIK LHCCTTEKCNN	19	C1IC47
CBT	LECHNQQS SQTPTTTGCSGGETNCCYKRWDRHRGYR TERGGCPSVKNGIE IN CCTTDRCNN	1.8	P60770
CBT-b	LECHNQQS SQTPTTKTCS-GETNCCYKKWSDHRGT I IERGGCPKVKPGVNLN CCTTDRCNN	3.6	P80958
Short n. 1	RICYNHQS TTRATTKSCE--ENSCYKKYWRDHRGT I IERGGCPKVKPGVG IHCCTSDKCNN	1.8	P01416
N. 4.11.3	RICYNHQS TTPATTKSCG--ENSCYKKTWSDHRGT I IERGGCPKVKR GVHLHCCTSDKCNN	1.6	P01418
CM-10a	MICHNQQS SQPPTIKTCP-GETNCCYKQWRDHRGT I IERGGCP SVKKGVIYCCCTDKCNN	1.6	P25675
N. alpha	LECHNQQS SQPPTTKTCP-GETNCCYKQWRDHRGT I IERGGCPTVKKGIK LNCCTTDKCNN	0.7	P01426
MlatA1	RICYNQQS SQPPTTKTCS--EGQCYKKTWRDHRGT I IERGGACP NVKPGIQ IS CCTSDKCNN	1.2	K9MCH1
FTx I	MICYNHQS SEPTTKTCS--EGQCYKKSWS DHRGT I IERGGACP NVKPGVK IICCRS--C--	5 (IV)	P86420
Consensus	MIC+NQQSSSQPPTTKTCSGGET+CYKKTWRDHRGT I IERGGCP+VKPGIK++CCTTDKCNN		
<i>ScNtx</i>	MICYNQQS SQPPTTKTCS--ETS CYKKTWRDHRGT I IERGGCPKVKPGIK LHCCTDKCNN	3.8	

De acuerdo al método de Kolaskar y Tongaonkar (Kolaskar and Tongaonkar, 1990) se determinó que las toxinas consenso contienen importantes determinantes antigénicos, los cuales son:

Ntx1 contiene 3 determinantes antigénicos:

IVCHTTATSPISSVTCPPGENLCYTKTWCDAFCSSRGKVVELGCAATCPKVKPYEEVKCCSTDKCNPFKRRPP

Ntx2 contiene 3 determinantes antigénicos:

IVCLDLGYTLVCYKTYSSPDTSQTCPPGENVCYTKTWCDAFCSSRGKVVELGCAATCPSVKPGVEVKCCSTDKANFPF
KRKRRPP

LcNtx contiene 4 determinantes antigénicos:

IIICYTTPNVPIQSQTCPGENLCYTKTWCDAFCSSRGKRVELGCAATCPKVKPGVEIKCCSTDKCN

ScNtx contiene 2 determinantes antigénicos:

MICYNQSSQPPTTKTCSSETSCKKKTWRDHRGTIIERGCPCPKVKPGIKLHCCRTDKCNN

8.3 α -neurotoxinas de cadena larga y péptidos consenso

Una vez que se ensambló el gen y se corroboró su identidad mediante secuenciación, se procedió a ligarlo en el vector de expresión pQE30; así mismo, el vector *pQE30-Toxina* se secuenció para verificar su secuencia. Éste se usó para transformar células X11-blue, M15, BL21 y Origami®. A continuación, se muestran los resultados más representativos de experimentos realizados por triplicado:

A. *Ntx1*

Células M15 se transformaron con el vector pQE30-*Ntx1*, las colonias capaces de crecer en el medio de selección se usaron para realizar pruebas de expresión. Como primer acercamiento, se evaluó la temperatura y concentración del inductor IPTG. Primeramente, se decidió mantener las células a una temperatura constante de 30 °C, después, se evaluó la cantidad de inductor necesario para expresar la *Ntx1* en células M15 (banda esperada ~10 kDa), ya que en un tamizado anterior observamos que el crecimiento de las células se veía comprometido al tiempo que aumentábamos las concentraciones del Inductor (IPTG). Debido a esto, se decidieron utilizar concentraciones variables de IPTG, todas menores a las reportadas como óptimas (concentraciones menores a 0.1 mM IPTG), y probar su efecto en la producción de la *Ntx1* (**Figura 8**).

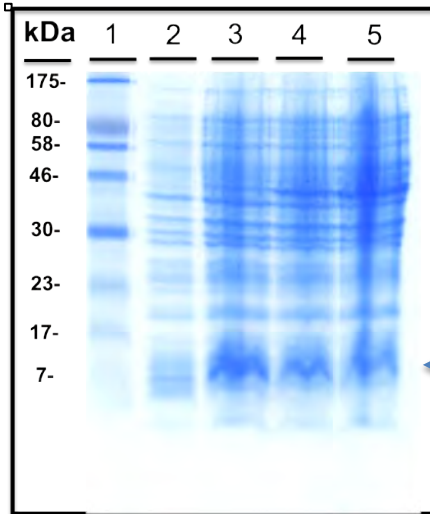


FIGURA 8. *Ntx1* en M15. SDS-PAGE al 15%. Carril 1.- Marcador de masa molecular. Carril 2.- 0.05 mM IPTG. Carril 3.- 0.025 mM IPTG. Carril 4.- 0.0125 mM IPTG. Carril 5.- No IPTG.

Como resultado, observamos que una concentración de 0.025 mM de IPTG fue la óptima para el crecimiento de las células (**carril 3, Figura 8**) y para la producción de la toxina, ya que concentraciones mayores del inductor no afectan la producción de la *Ntx1*.

Una vez que se determinó que la concentración de inductor 0.025 mM representa la concentración de inductor a la cual el crecimiento de las células M15 no estuvo comprometido, decidimos evaluar la temperatura. De acuerdo a lo reportado, las temperaturas que han generado buenos rendimientos son: 37 °C, 30 °C y 16 °C.

Existen una serie de reportes en donde indican que la temperatura influye directamente sobre la producción de la proteína de interés en su forma soluble, y que, por lo tanto, la cantidad de proteína que se agrega en forma de cuerpos de inclusión aumenta. Nuestros resultados son congruentes con los reportados puesto que la producción de la toxina *Ntx1* (~10 kDa) se ve favorecida conforme la temperatura de inducción fue mayor. En los carriles 5 y 7 de la **Figura 9** se indica que a 37 °C la producción general de proteína aumenta, de la misma manera que aumenta la producción de la *Ntx1*, tal como es indicado por las flechas.

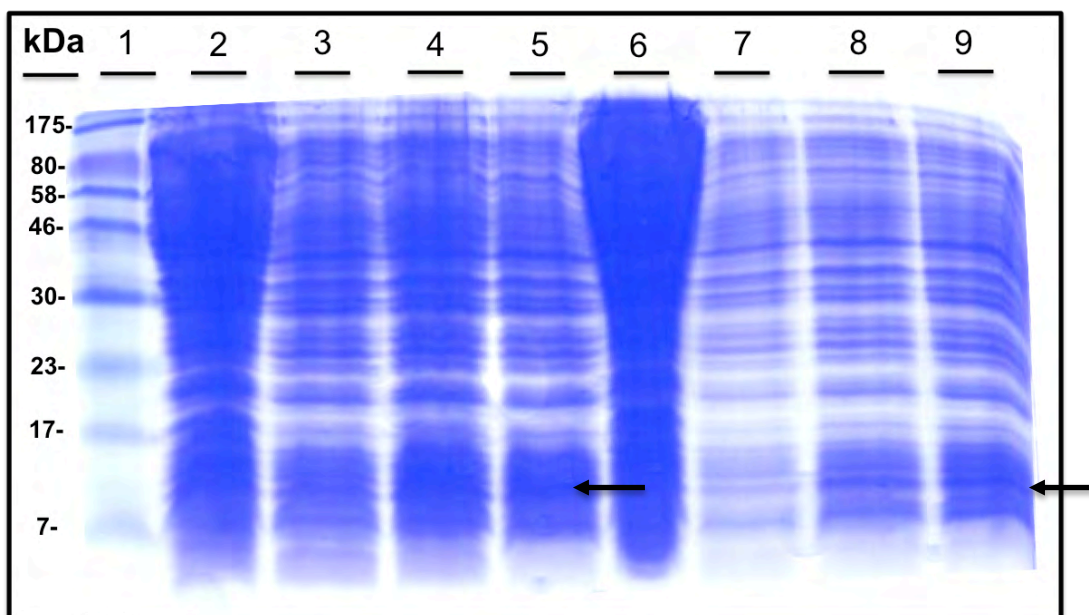


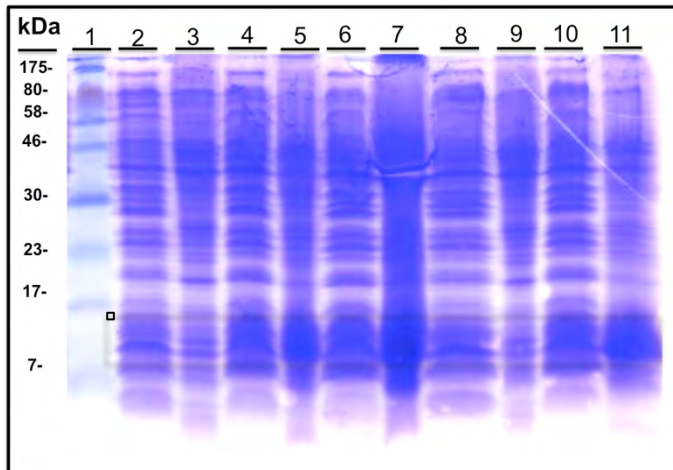
FIGURA 9. *Ntx1* en M15: efecto de la temperatura. SDS-PAGE AL 15%. Carril 1.- Marcador de masa molecular. Carril 2.- Clona 6 sin inducir (control). Carril 3.- Clona 6 a 16 °C. Carril 4.- Clona 6 a 30 °C. Carril 5.- Clona 6 a 37 °C. Carril 6.- Clona 8 sin inducir (control). Carril 7.- Clona 8 a 16 °C. Carril 8.- Clona 8 a 30 °C. Carril 9.- Clona 8 a 37 °C.

Finalmente, como hemos mencionado, la temperatura es un factor muy importante en la producción de proteínas recombinantes. Los resultados obtenidos indican que a temperaturas menores de 30 °C la cantidad de proteína producida disminuye. Sin embargo, como se indicó en la parte introductoria del presente trabajo, la expresión recombinante de proteínas a temperaturas superiores a los 30 °C y la sobreproducción/sobreexpresión, vienen acompañadas de anomalías en el plegamiento (**Figura 10B**). Es por ello que decidimos determinar el efecto de la temperatura en la producción de proteína soluble –bien plegada- o en forma de cuerpos de inclusión –anormalmente plegada-. Tomando en cuenta lo mencionado, se decidió explorar la capacidad de las células M15 de producir proteína soluble. Para ello, buscamos la banda esperada (~10 kDa) en las fracciones solubles, y también en los cuerpos de inclusión. Los cultivos fueron de 500 mL en donde se utilizaron 0.025mM de IPTG y temperaturas de 37, 30 y 16 °C.

Los resultados obtenidos son consistentes con lo recién mencionado, ya que se observa que la intensidad de la banda esperada (~10 kDa) en la **Figura 10A**, disminuye en las fracciones solubles cuando la temperatura aumenta. Por otra parte, la banda de las fracciones que corresponde a los cuerpos de inclusión aumenta cuando aumentamos la temperatura, lo cual indica que la *Ntx1* a temperaturas superiores a 16 °C se encuentra en cuerpos de inclusión.

Así, la temperatura que consideramos óptima para tener la mayor cantidad de *NtxI* soluble es 16 °C. Es importante establecer las condiciones convenientes de producción, ya que tener la proteína soluble (bien plegada) nos permitirá evaluarla con precisión, y poder, finalmente, describir sus propiedades bioquímicas.

A)



B)

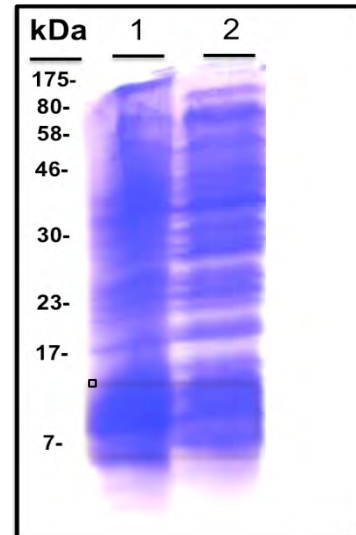


FIGURA 10. *NtxI*: fracción soluble e insoluble. SDS-PAGE al 15% de la fracción soluble (SN) e insoluble (IB) de cultivos M15 expresando la *NtxI* a diferentes temperaturas. Condiciones reductoras. M15; 0.025 mM IPTG; 500 mL de medio. Se probaron 2 clonas. Gel A) Carril 1.- Marcador de masa molecular; Carril 2.- SN, Clona 6 a 16 °C; Carril 3.- IB, Clona 6 a 16 °C; Carril 4.- SN, Clona 6 a 30 °C; Carril 5.- IB, Clona 6 a 30 °C; Carril 6.- SN, Clona 6 a 37 °C; Carril 7.- IB, Clona 6 a 37 °C; Carril 8.- SN, Clona 8 a 16 °C; Carril 9.- IB, Clona 8 a 16 °C; Carril 10.- SN, Clona 8 a 30 °C; Carril 11.- IB, Clona 8 a 30 °C. B) Carril 1.- IB, Clona 8 a 37 °C; Carril 2.- SN, Clona 8 a 37 °C.

Recordemos que la *NtxI* contiene una secuencia en el N-terminal que permite su purificación mediante una columna de afinidad (His-Tag/ Ni²⁺). Se repitieron los ensayos anteriores bajo las condiciones en las que se obtuvo la *NtxI* de forma soluble. Dicha fracción se pasó por una columna de afinidad que contiene Ni²⁺ (se hizo recircular la fracción al menos tres veces). Posteriormente, se realizó un lavado con 5 volúmenes de una solución de PBS pH 8 25 mM Imidazol. Finalmente, como se describe en *Material y Métodos*, se utilizó volúmenes de 1 mL de una solución de PBS pH 8 250 mM Imidazol para escindir la proteína unida a la fase sólida de la columna. Se colectaron dichas fracciones y se analizaron por electroforesis. Los datos obtenidos revelan que la cepa M15, transformada con el vector pQE-30, crecida e inducida a 16 °C con una concentración de inductor de 0.025 mM, produce la *NtxI* tanto de manera soluble como insoluble, como se ve en los carriles 4 y 5 de la **Figura 11**; sin embargo, la cantidad producida es tan baja que no puede ser visualizada en SDS-PAGE. El experimento anterior se repitió tres veces, todos en cultivos de 500 mL e incluso de 1 L, y se determinó que M15 no sobre expresa la *NtxI*. También, se pudo determinar que la

proteína expresada en forma soluble o cuerpos de inclusión, dada su baja producción, se pierde en el proceso de purificación por lo que no es posible visualizarla en los carriles 6-9 de la **Figura 11**. Por lo anterior, M15, bajo las condiciones analizadas, no es una opción viable para la producción y obtención de la *Ntx1*.

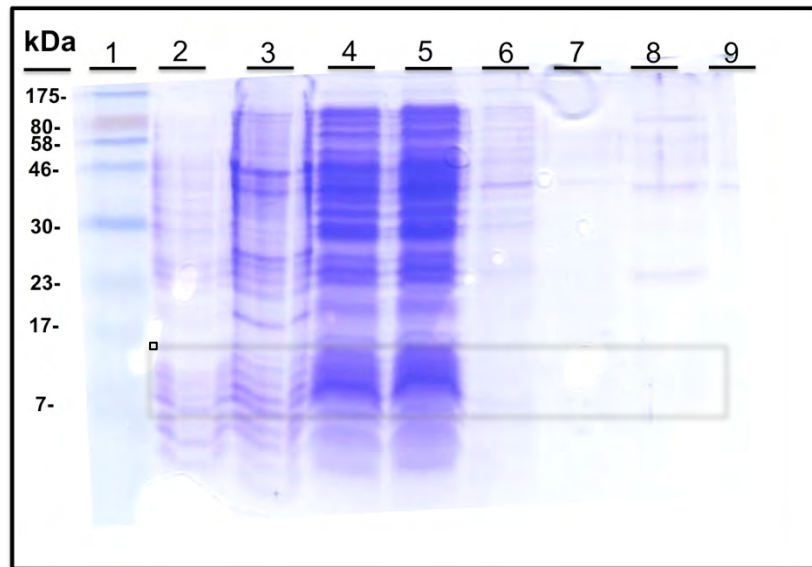


FIGURA 11. Purificación de la *Ntx1*. **SDS-PAGE al 15% en condiciones reductoras. M15; 0.025 mM IPTG. 500 mL medio. Carril 1.-** Marcador de masa molecular.; **Carril 2.-** Sobrenadante de células sin inducir; **Carril 3.-** fracción insoluble de las células sin inducir; **Carril 4.-** Células inducidas, SN; **Carril 5.-** Células inducidas, peller; **Carril 6.-** Fracción 1; **Carril 7.-** Fracción 2; **Carril 8.-** Fracción 3; **Carril 9.-** Fracción 4.

Finalmente, el vector de expresión *pQE30-Ntx1* purificado a partir de las células M15, se usó para transformar células de las cepas Origami, XL1-BLUE y BL21: los resultados fueron similares a los obtenidos con la cepa M15 (datos no mostrados), por lo que concluimos que es posible expresar la *Ntx1*; sin embargo, la concentración de proteína es tan baja que no es posible obtenerla al final de los procesos de purificación.

B. *Ntx2*

El protocolo de clonación y expresión para la *Ntx2* fue igual al que se usó para la *Ntx1*. Resumiendo: Usamos el vector de expresión *pQE30-Ntx2* para transformar células quimiocompetentes Origami® y BL21.

Para el caso de Origami® la eficiencia de transformación fue mayor que lo observado con las otras cepas, por ello se seleccionaron la mayor cantidad de colonias posibles y se crecieron por 12 horas a 37 °C, y se indujeron con una concentración de 1mM de IPTG. Se realizaron geles de poliacrilamida SDS al 15% para poder identificar la colonia que mejor expresaba la *Ntx2* (banda esperada ~8.8 kDa).

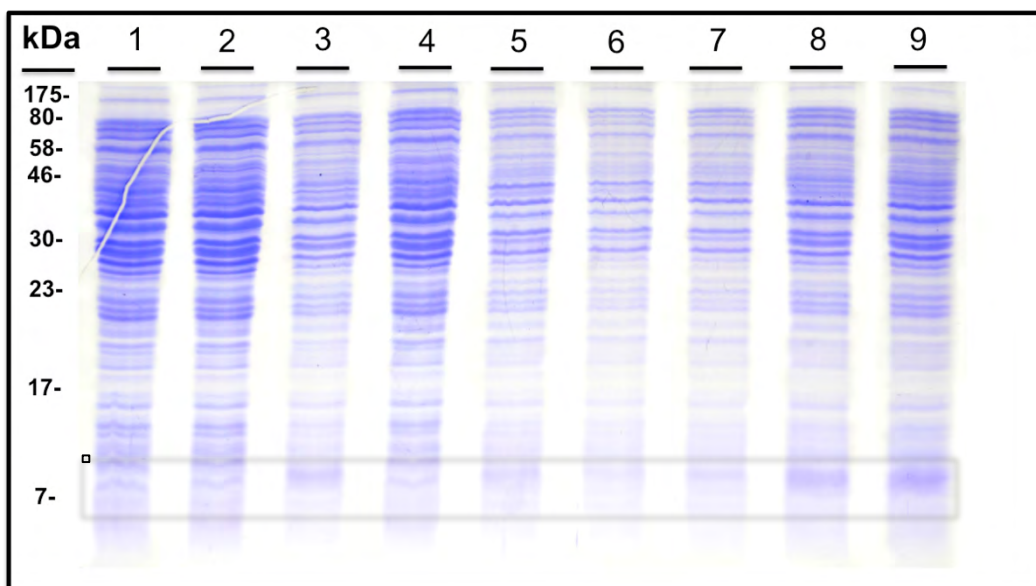


FIGURA 12. *Ntx2*: tamizado de expresión en Origami. Carriles 1-9- Colonias 1-9.

Con base en lo observado en la **Figura 12**, las colonias 3, 5, 7, 8 y 9 producen la banda esperada de 8.8 kDa; sin embargo, la colonia 9 fue la que expresó en mayor cantidad la *Ntx2*. En seguida, siguiendo con los protocolos y recomendaciones indicadas en la literatura (Hochkoepler, 2013), decidimos hacer pruebas de expresión de la colonia 9 bajo tres concentraciones diferentes del inductor IPTG (0.1, 0.5 y 1 mM). El experimento nos permite evaluar la cantidad mínima del inductor que desencadena la expresión de la *Ntx2* sin afectar la biomasa, ya que en experimentos con cepas como M15, XL1-Blue y BL21, pudimos constatar que concentraciones superiores a 0.1 mM de IPTG inhiben el crecimiento de las células, lo que pudiese traducirse en una menor cantidad de proteína expresada para un volumen de cultivo dado.

Tomando en cuenta los resultados anteriores con la *NTxI*, las pruebas de expresión corrieron a una temperatura de 37 °C por 12 h, ya que es la temperatura y tiempo óptimos para la expresión de la proteína recombinante, todos en cultivos de 500 mL. Así, el experimento nos permitió evaluar la expresión de la proteína con relación a la concentración del inductor bajo condiciones óptimas de crecimiento. Los resultados de dicho experimento fueron evaluados cualitativamente por medio de geles de poliacrilamida. De igual manera, ya que nuestra proteína contiene una secuencia de 6 histidinas (6xHis Tag), fuimos capaces de evaluar su producción mediante ensayos de inmunodetección, usando como herramienta un anticuerpo anti-hisTag. Lo anterior se puede visualizar en la **Figura 13**.

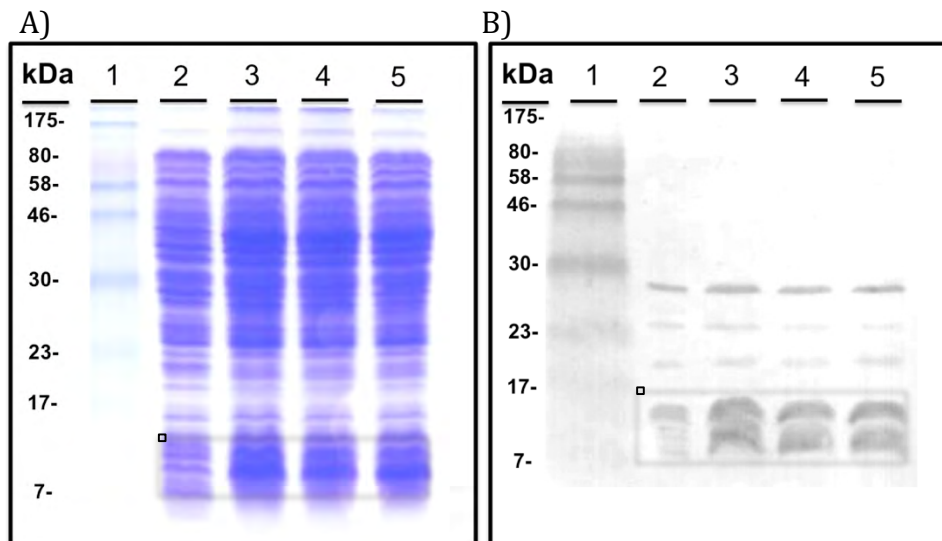


FIGURA 13. *Ntx2*: efecto del inductor. SDS-PAGE al 15%. Expresión de *Ntx2* bajo diferentes concentraciones de IPTG. Condiciones reductoras. A) Carril 1.- Marcador de masa molecular.; Carril 2.- Células sin inducir, control; Carril 3.- Células inducidas, 0.1mM IPTG; Carril 4.- Células inducidas, 0.5 mM IPTG; Carril 5.- Células inducidas, 1 mM IPTG. B) Western blot 1. IgG Rabbit anti-His. Carril 1.- Marcador de masa molecular.; Carril 2.- Células sin inducir, control; Carril 3.- Células inducidas, 0.1mM IPTG; Carril 4.- Células inducidas, 0.5 mM IPTG; Carril 5.- Células inducidas, 1 mM IPTG

En la **Figura 13A** se observa que la *Ntx2* se expresó bajo las diferentes concentraciones de IPTG; también, se pudo corroborar lo anterior mediante un anticuerpo que reconoce el His-Tag. Bajo el mismo método, es claro que la *Ntx2* puede formar multímeros cuya asociación no se ve afectada bajo las condiciones reductoras, como se ve en la **Figura 13B**. También, se determinó de manera cualitativa una expresión basal, y además diferencial tanto en el gel como en la inmunodetección de una banda con un masa aparente de entre 8.8 kDa, que corresponde a la proteína de interés. Es relevante mencionar que nuestros resultados demuestran que la concentración del inductor bajo las condiciones del experimento no influyó en la expresión de la *NTx2*. De igual modo, es importante recalcar que trabajos citados previamente proponen que, una vez probadas diferentes concentraciones de inductor, es altamente recomendable utilizar la concentración mínima que exprese la proteína en concentraciones útiles para el investigador, ello porque una sobre producción podría promover la formación de agregados insolubles (Lebendiker and Danieli, 2014). Por dicha razón, a partir de este experimento se concluyó que 0.1 mM de IPTG fue la concentración de inductor adecuada para nuestros fines.

El paso siguiente fue expresar la *Ntx2* bajo las condiciones determinadas como óptimas para su producción de manera soluble. Por lo tanto, al igual que en los experimentos con la *Ntx1*, la colonia 9 fue crecida a 37 °C hasta que alcanzó una densidad óptica cercana a 0.6 medida a 600 nm (O.D 600 nm = ~0.6). Una vez alcanzada dicha densidad, se llevó a cabo la inducción con 0.1 mM de IPTG a 16 °C por 24 h, siempre en cultivos de 1 litro. Al término de la inducción, las células se cosecharon y se

procesaron de la misma forma que fue descrita en la sección de *Material y Métodos*. De esta manera se pudo obtener el sobrenadante (proteína soluble) y los cuerpos de inclusión. Resumiendo: se hizo circular tres veces la fracción soluble por una columna de Ni^{2+} . Seguido de ello, se usaron cinco volúmenes de una solución de PBS pH 8 25 mM Imidazol para escindir la proteína unida de manera inespecífica a la fase sólida de la columna. Finalmente, se utilizaron volúmenes de 1 mL de PBS pH 8, 250 mM Imidazol para separar completamente la proteína de interés. Y se colectaron dichas fracciones y se analizaron por inmunodetección.

Nuestros resultados revelan que Origami®, transformada con el vector *pQE30-Ntx2*, crecida e inducida a 16 °C con una concentración de inductor de 0.1mM, produce la *Ntx2* tanto de manera soluble como insoluble. Primeramente, la cepa Origami®, en ausencia del vector *pQE-30-Ntx2*, no es capaz de producir proteínas que sean detectadas mediante un anticuerpo IgG anti His como se observa en la **Figura 14**. Por el contrario, una vez en presencia del inductor, las células transformadas expresan la *Ntx2* (**Figura 14, carril 3**), la cual -en su mayoría- se va a cuerpos de inclusión (**Figura 14, carril 4**) y una pequeña fracción se mantiene como proteína soluble (**Figura 14, carril 5**) que puede ser escindida de la columna de Ni^{2+} con 250 mM de Imidazol (**Figura 14, carril 6**).

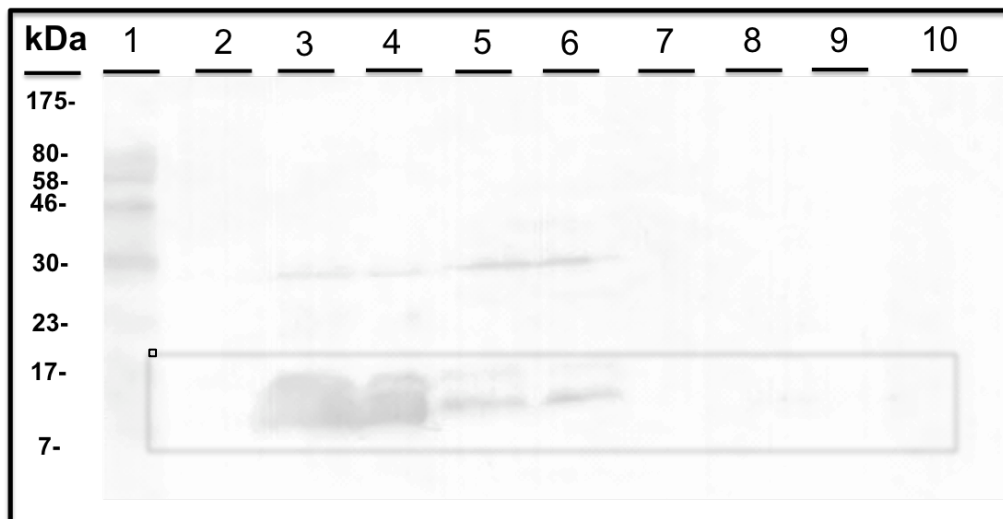


FIGURA 14. *Ntx2*: Inmunodetección. **IgG Rabbit anti-His Carril 1.-** Marcador de masa molecular.; **Carril 2.-** Células sin *pQE-30*; **Carril 3.-** Células inducidas; **Carril 4.-** IB, células inducidas; **Carril 5.-** SN, Células inducidas, SN; **Carril 6.-** Fracción 1; **Carril 7.-** Fracción 2; **Carril 8.-** Fracción 3; **Carril 9.-** Fracción 4; **Carril 10.-** Fracción 5. **Anticuerpo: IgG Rabbit anti-His.**

La cantidad de *Ntx2* obtenida de la fracción soluble es insuficiente para realizar ensayos de actividad. Por ello, se evaluó su producción en otras cepas, como, por ejemplo, BL21:

Una vez transformadas, las colonias *BL21/pQE30-Ntx2* positivas se crecieron de manera independiente por 12 horas a 37 °C en 3 mL de medio, con una concentración de IPTG de 1 mM. Posteriormente, con la finalidad de identificar la colonia con mejor expresión (banda esperada ~8.8 kDa), se tomó 1 mL de medio de cada muestra, los cuales se analizaron en geles de poliacrilamida SDS al 15% y por inmunodetección, los cuales corresponden a la **Figura 15** y **16**, respectivamente. De acuerdo con lo observado en la **Figura 15**, la cepa BL21 expresa la proteína de interés, no obstante, consideramos que las colonias 12 y 15 generan una proteína identificada por encima del marcador de masa molecular de 7 kDa, que da una mayor intensidad en el ensayo de inmunodetección de la **Figura 16**. Además, según las características genotípicas de la cepa, BL21 tiene la capacidad de expresar proteínas ricas en puentes disulfuro de forma soluble bajo promotores débiles, como el T5 que utiliza pQE30. Por ello, decidimos evaluar la expresión de la *Ntx2* tanto en su forma soluble como en cuerpos de inclusión. Para ello se emplearon las colonias 11 y 15 y cultivos de 1 L bajo condiciones favorables para su expresión de forma soluble. La **Figura 17** nos muestra que, a pesar de lo argumentado previamente, la *Ntx2* se expresa favorablemente en forma de cuerpos de inclusión.

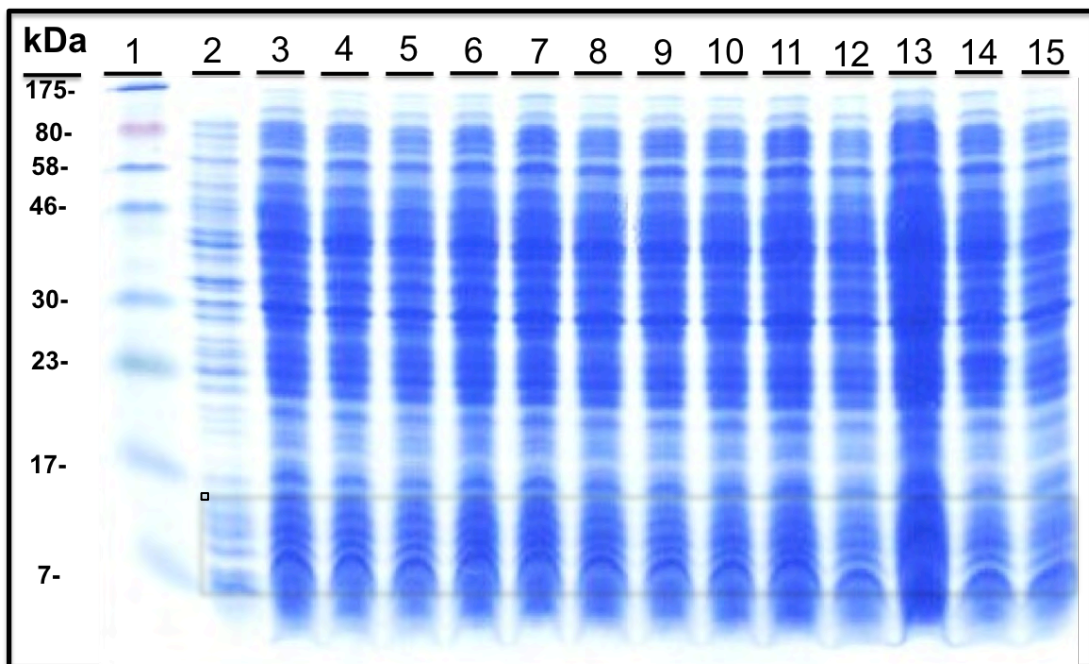


Figura 15. Ntx2: expresión en BL21 SDS-PAGE 15%. Tamizado de diferentes colonias transformadas con el pQE-30Ntx2. Condiciones reductoras.. Carril 1.- Marcador de masa molecular; Carriles 2-15.- Colonias 2-15.

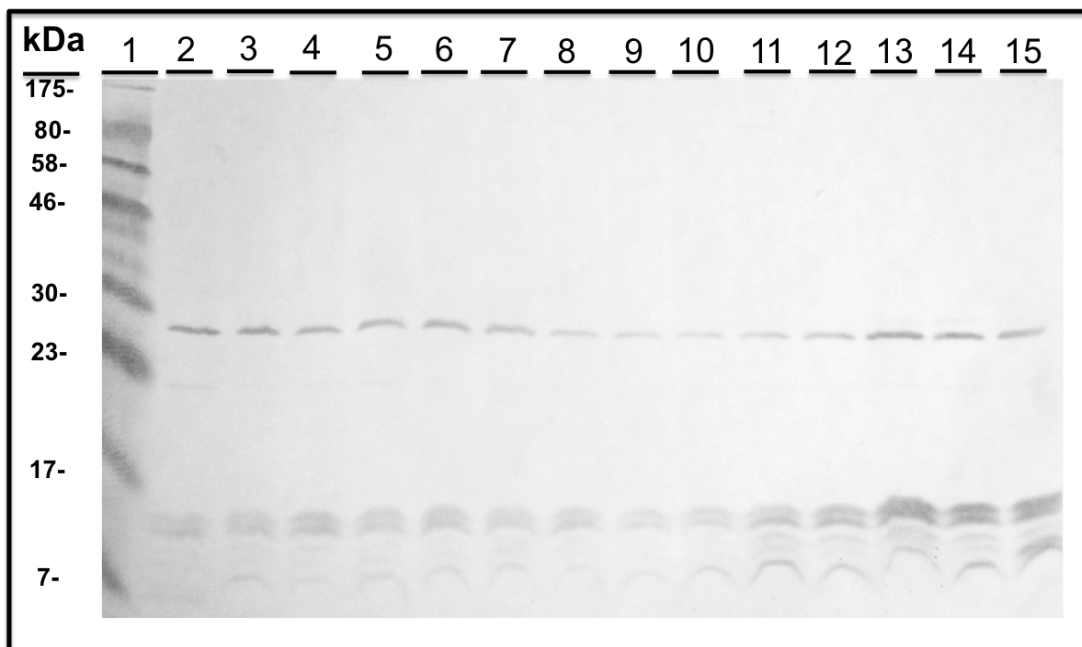


FIGURA 16. *Ntx2*: inmunodetección en BL21. **Expresión de la *Ntx2* en diferentes colonias de BL21. IgG Rabbit anti-His. Carril 1.- Marcador de masa molecular Carriles 2-15 - Colonias 2-15**

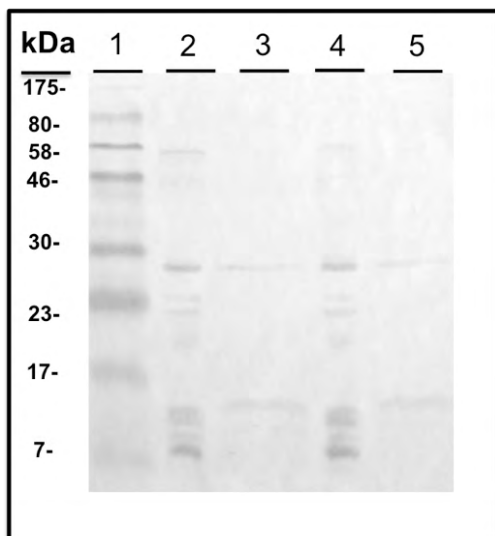


FIGURA 17. *Ntx2*: cuerpos de inclusión y proteína soluble. **Inmunodetección de la *Ntx2* en cuerpos de inclusión (IB) y proteína soluble (SN). Carril 1.- Marcador de masa molecular; Carril 2.- IB, colonia 12 Carril 3.- Colonia 12, SN; Carril 4.- Colonia 15, pastilla; Carril 5.- Colonia 15, SN.**

En conclusión, al igual que para el caso de ORIGAMI®, XL1-blue y M15, la expresión de la *Ntx2* en BL21 es baja. Además, de acuerdo al ensayo de inmunodetección correspondiente a la **Figura 17**, la mayoría de la proteína expresada se encuentra en forma de cuerpos de inclusión. Es posible manejar dichos agregados para obtener de ahí proteína útil; sin embargo, la cantidad de material que se requiere es por mucho mayor (Pernel et al., 2008) a lo que cualitativamente podemos observar.

C. *LcNtx*

Con base a la experiencia generada en el presente trabajo, la línea celular que se decidió utilizar para las pruebas de expresión fue *E coli* Origami®. El protocolo de clonación y expresión para la *LcNtx* fue el mismo que el descrito en *materiales y métodos*. Resumiendo: usamos el vector de expresión *pQE30-LcNtx* para transformar las células quimiocompetentes Origami®.

Una vez transformadas, las colonias *Origami/pQE30-LcNtx* positivas se crecieron de manera independiente por 12 horas a 37 °C en 3 mL de medio LB, con una concentración de IPTG de 1 mM. Posteriormente, para el tamizado de expresión (banda esperada ~8.8 kDa), se tomó 1 mL de medio de cada muestra y se analizaron en geles de poliacrilamida SDS al 15% en condiciones reductoras.

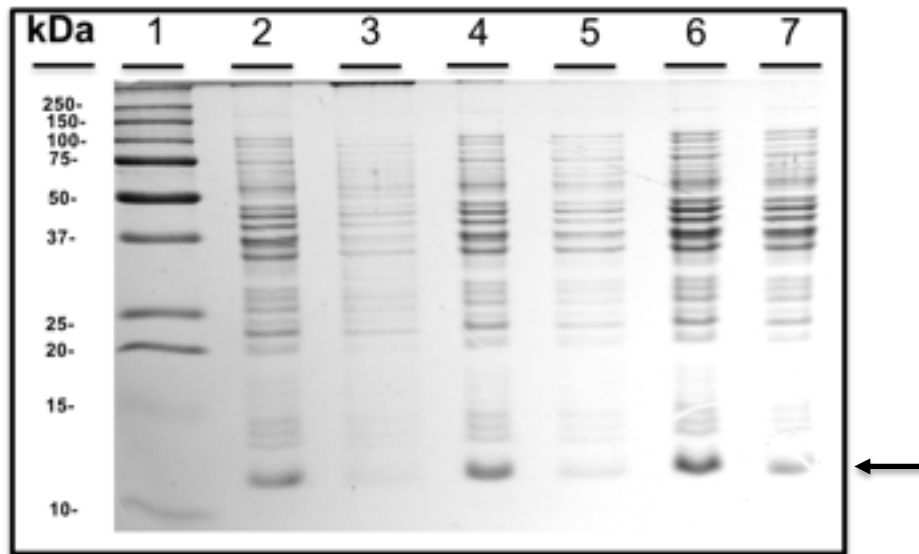


FIGURA 18. *LcNtx* en Origami. SDS-PAGE 15%. Tamizado de dieferentes colonias transformadas con el *pQE-30-LcNtx* en condiciones reductoras. ORIGAMI mM IPTG; 37 °C. Carril 1.- Marcador de masa molecular Carriles 2-7.- Colonias 2-7. La flecha indica la banda esperada.

De acuerdo con lo observado en la **Figura 18**, consideramos que la colonia 5, correspondiente al carril 6, era la candidata para realizar pruebas de expresión en cultivos de volúmenes superiores. Así, dicha colonia se evaluó bajo las condiciones que se han considerado propicias para obtener la proteína de forma soluble. Además, también se evaluó el tiempo de inducción como un parámetro adicional: 12 y 24 h. Los pasos fueron los siguientes: las células se crecieron en 500 mL del medio de cultivo MLB a 37 °C hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento ($O.D_{600\text{ nm}} = 0.6$). Posteriormente, la expresión se llevó a cabo a 16 °C con 0.1 mM IPTG. Se tomaron muestras a las 12 y 24 h post-inducción. Cada muestra fue evaluada de manera cualitativa por medio de geles de poliacrilamida SDS al 15% en condiciones reductoras. Se analizaron los cuerpos de

inclusión, así como la fracción soluble. La banda esperada (~8.8 kDa) que corresponde a la neurotoxina consenso de cadena larga *LcNtx* fue abundante en ambas fracciones a 12 y 24 h; no obstante, como se puede observar en la **Figura 19**, la cantidad de proteína observada fue mayor a 24 h en su forma de cuerpos de inclusión (carril 9).

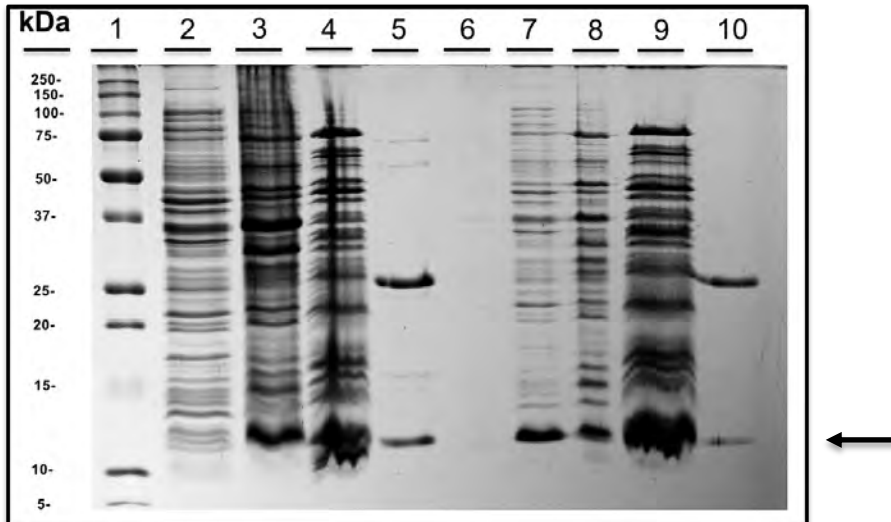


FIGURA 19. *LcNtx*: cinética de expresión. **SDS-PAGE 15%.** **Cinética de expresión de la *LcNtx* a 12 y 24 h. Condiciones reductoras. ORIGAMI 0.1 mM IPTG 16 °C. 500 mL medio.** Carril 1.- Marcador de masa molecular.; Carril 2.- Células sin inducir; Carril 3.- fracción soluble de las células a 12 h; Carril 4.- Cuerpos de inclusión 12 h; Carril 5.- Fracción soluble purificada por afinidad a Ni^{+2} ; Carril 6.- Vacío; Carril 7.- Lisado total de células a 24 h; Carril 8.- Fracción soluble de las células a 24 h; Carril 9.- Cuerpos de inclusión a 24 h; Carril 10.- Fracción soluble purificada por afinidad a Ni^{+}

Los cuerpos de inclusión recuperados a 24 h, se trataron con el detergente *sarcosil*, siguiendo el protocolo que se describe en *Material y Métodos* (Peternel et al., 2008), y la fracción soluble se purificó con una columna de afinidad (**Figura 20**).

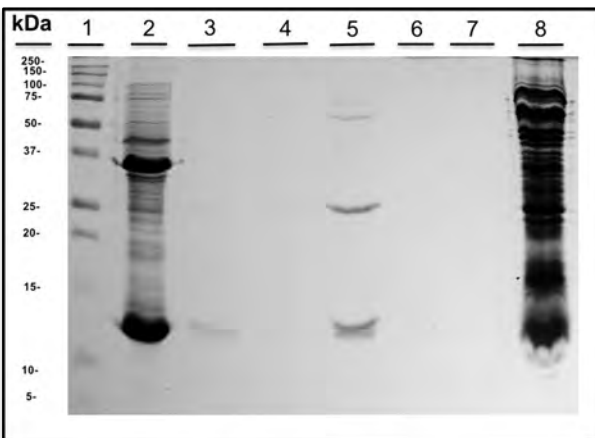


FIGURA 20. *LcNtx*: cuerpos de inclusión. **SDS-PAGE 15%.** **Cuerpos de inclusión solubilizados. Condiciones reductoras.** Carril 1.- Marcador de masa molecular.; Carril 2.- Cuerpos de inclusión lavados; Carriles 3-7.- fracción soluble escindida de una columna de afinidad a Ni^{+2} ; Carril 8.- Efluente cuerpos de inclusión.

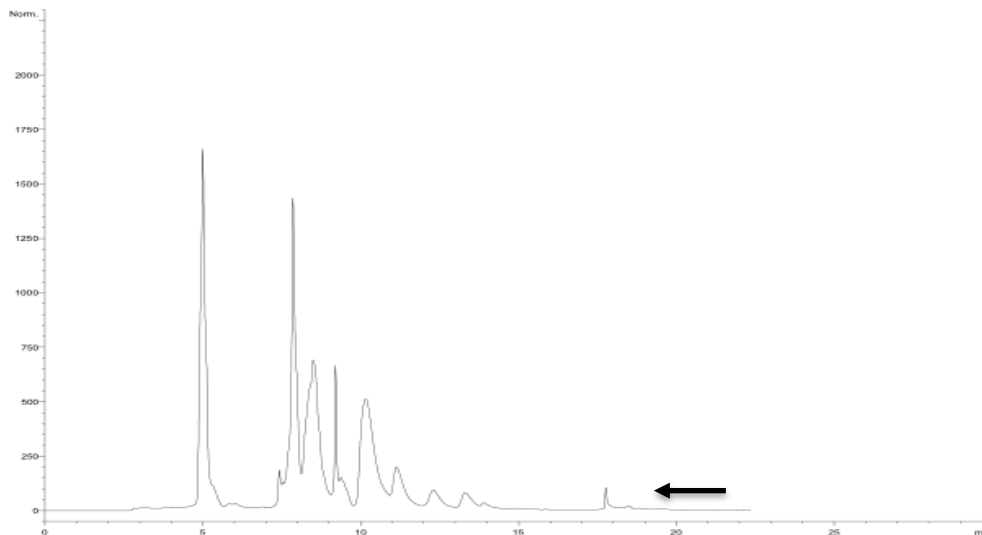


FIGURA 21. *LcNtx*: RP-HPLC. **Perfil cromatográfico de la fracción soluble *LcNtx***. La flecha indica la fracción que corresponde a la toxina *LcNtx*

La producción de la *LcNtx*, que se recuperó de la fracción soluble a 12 y 24 h, y que se purificó por RP-HPLC no ha sido mayor a 50 $\mu\text{g}/500\text{ mL}$ de cultivo. Además, la proteína no ha sido tóxica en ratones en dosis de hasta 10 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ (con una flecha se indica en la **Figura 21** la muestra probada).

Es importante hacer mención que es posible mejorar y escalar el bioproceso con la finalidad de obtener la mayor cantidad de proteína en su forma soluble; sin embargo, un método que permite economizar recursos y ahorrar tiempo es el uso de otras líneas celulares. Por ejemplo, nuestra construcción genética *pQE30-LcNtx* se usó para transformar células de *E. coli sHuffle®* T7, la cual es una cepa K12 que expresa de manera constitutiva genes cromosomales que codifican para proteínas chaperonas implicadas en el proceso redox de la célula. Brevemente, la cepa SHuffle T7, dentro de sus características más sobresalientes, se encuentran, por un lado, la depleción de genes que codifican para proteasas responsables de la degradación de proteínas mal plegadas; por otro lado, la expresión a nivel de citoplasmático de enzimas del sistema *Dsb* involucradas en la formación de puentes disulfuro en el periplasma (vía oxidativa) y su correcto plegamiento (*DsbC*). Todo esto nos llevó a considerar dicha cepa como un sistema atractivo para expresar la *LcNtx* rica en puentes disulfuro.

Las células se transformaron, y mediante una doble selección se colectaron aquéllas capaces de crecer en un medio con kanamicina y ampicilina (resistencia propia de la cepa y resistencia brindada por el vector de expresión, respectivamente). En el tamizado de expresión, analizado en la **Figura 22**, se observa que todas las colonias seleccionadas incorporaron la construcción genética, lo cual comprueba la homogeneidad de nuestro material genético (construcción *pQE30-LcNtx*) y la facilidad por parte de las células de retener el material incorporado. De la misma manera, se realizaron ensayos de

expresión bajo condiciones previamente establecidas (ver más adelante el caso de la toxina de cadena corta *ScNtx*) como óptimas para la expresión de proteínas ricas en puentes disulfuro: 16 °C por 12 horas, cultivo de 50 mL de cultivo tipo LB.

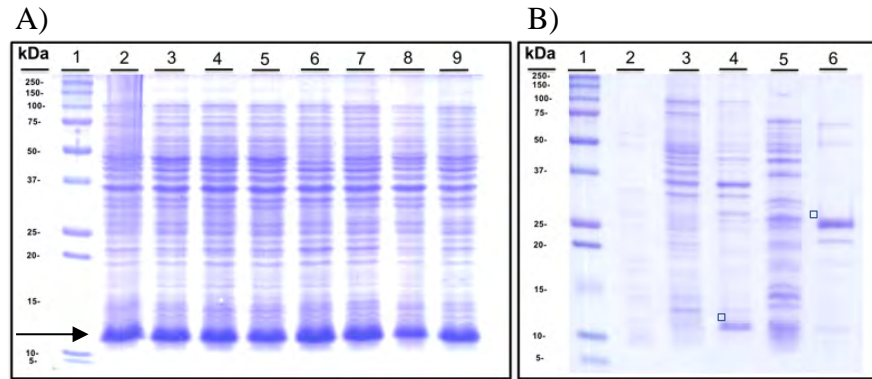


FIGURA 22. *LcNtx*: *SHuffle* T7. SDS-PAGE 12.5% en condiciones reductoras. **A)** Carril 1- marcador de masa molecular (MWM), carriles 2 – 9, tamizado de expresión de 9 colonias *E. coli SHuffle* T7 transformadas con la construcción pQE30-*LcNtx*; la flecha indica la banda proteica esperada **B)** Expresión de la *LcNtx*; carril 1- marcador de masa; carril 2. Impurezas; carril 3.- lisado total de células sin inducir; carril 4, fracción soluble de células inducidas; carril 5, fracción insoluble de células inducidas; carril 6, fracción purificada por columna de níquel agarosa. En recuadro se indica la presencia de la proteína esperada en forma monomérica y dimérica (comprobado por western blot).

La *LcNtx* que se purificó por cromatografía de afinidad, se sometió a un segundo paso de purificación: RP-HPLC. La identidad de la *LcNtx* se corroboró por espectrometría de masas (8,912 Da). No obstante, aún falta por mejorar y escalar el bioproceso, ya que la proteína obtenida hasta el momento (~50µg/L) no es suficiente para realizar su evaluación biológica (letalidad) ni inmunogénica. Para ello debe tomarse las cepas *Origami* y *SHuffle* T7, transformadas con la construcción pQE30-*LcNtx*, y someterse a condiciones de sobre expresión, ya que a pesar de que generan un rendimiento bajo, la proteína se encuentra soluble. El mejoramiento consistirá en someter dichas líneas celulares a las condiciones, definidas en el presente trabajo, de sobre expresión: el medio de cultivo MLB (Ver caso *ScNtx*) en volúmenes de 1 L. Para el caso de *SHuffle* T7 los ensayos deben realizarse en medios frescos que no involucren almacenamiento celular, ya que pudimos determinar que esto afecta la producción de proteína (datos no mostrados). Una vez expresada, la *LcNtx* podrá ser evaluada *in vivo* mediante su capacidad letal y, además, *in vitro* por su habilidad de reconocer a receptores nicotínicos de acetilcolina del tipo neuronal y muscular. Esto último en ensayos electrofisiológicos que emplean ovocitos de rana (*Xenopus laevis*) transfectadas con mensajeros (ARN) codificantes de los subtipos de canales mencionados (Carbajal-Saucedo et al., 2013).

D. Péptidos consenso LcP1 y LcP2

Una vez adquiridos, los péptidos denominados *LcP1* y *LcP2* fueron analizados y purificados por HPLC de fase reversa, en un gradiente de 0-60 % de acetonitrilo en una columna semi-preparativa C8, tal como se describe en *Material y Métodos*. Todas las fracciones se colectaron y se determinó la masa molecular de cada una de ellas. Se determinó que las mayoritarias, mostradas en las **Figuras 23** y **25**, representan a *LcP1* y *LcP2* con masas de 2812 Da y 3492 Da, respectivamente. Los péptidos fueron re-purificados en una columna analítica C18 bajo las mismas condiciones. Ver las **Figuras 24** y **26**.

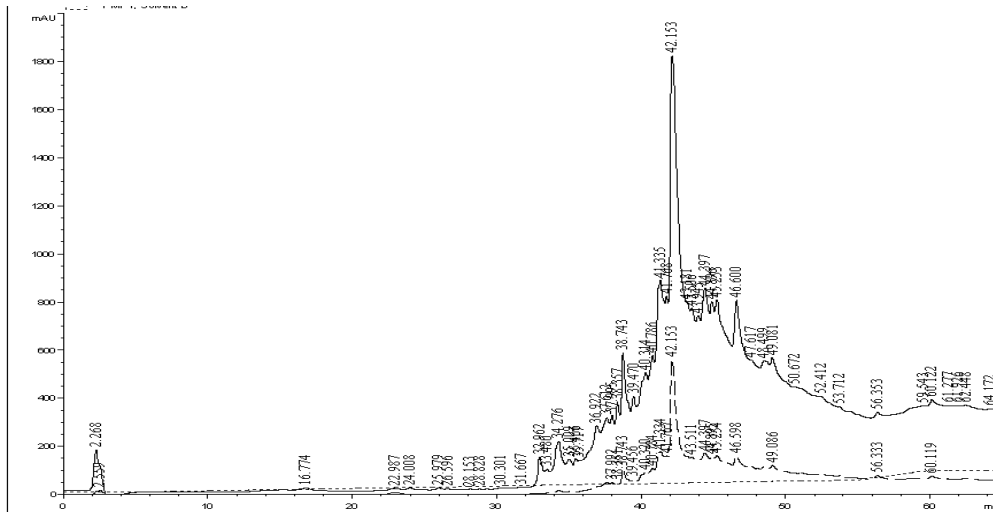


FIGURA 23. *LcP1*: purificación.RP-HPLC, perfil cromatográfico del producto de la síntesis del *LcP1*. Se señala la fracción que corresponde al *LcP1* (2812 Da): **NVCYTKTWCDAFCSSRGKVVELGCA**

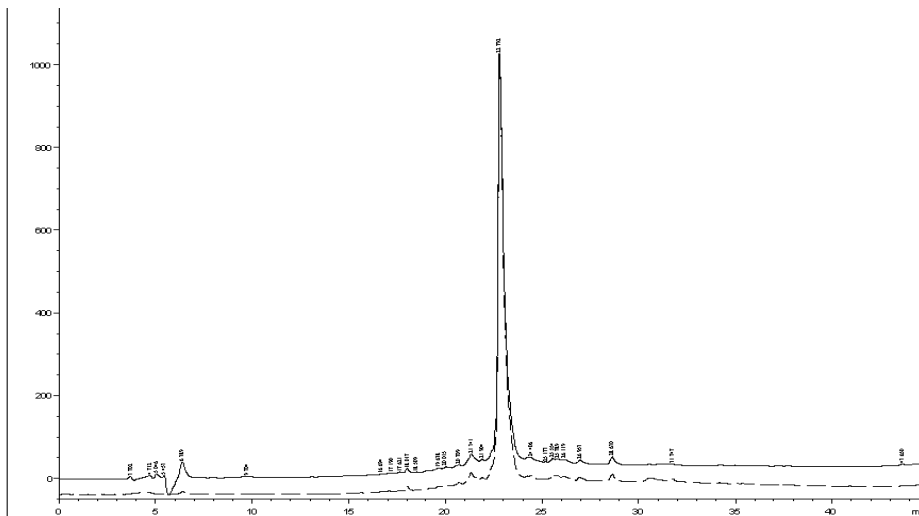


FIGURA 24. *LcP1*. RP-HPLC. Perfil cromatográfico del *LcP1*. *LcP1*

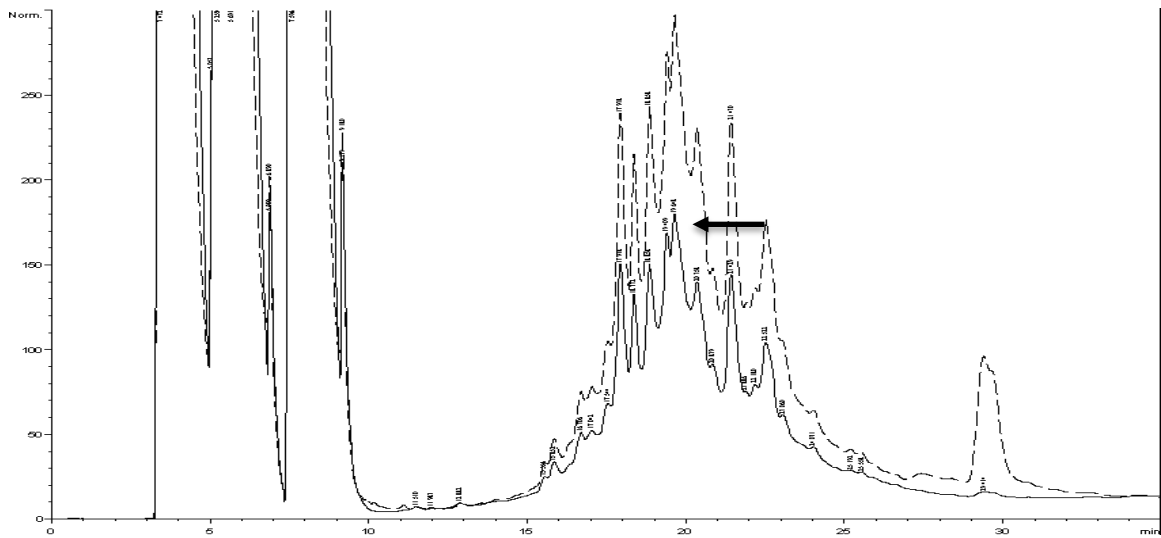


FIGURA 25. LcP2: purificación. RP-HPLC. Perfil cromatográfico del producto de la síntesis del LcP2. Se indica la fracción LcP2 (3492 Da): QTCPPGENVAYTKTWCDAFCSSRGKVVELGCAA.

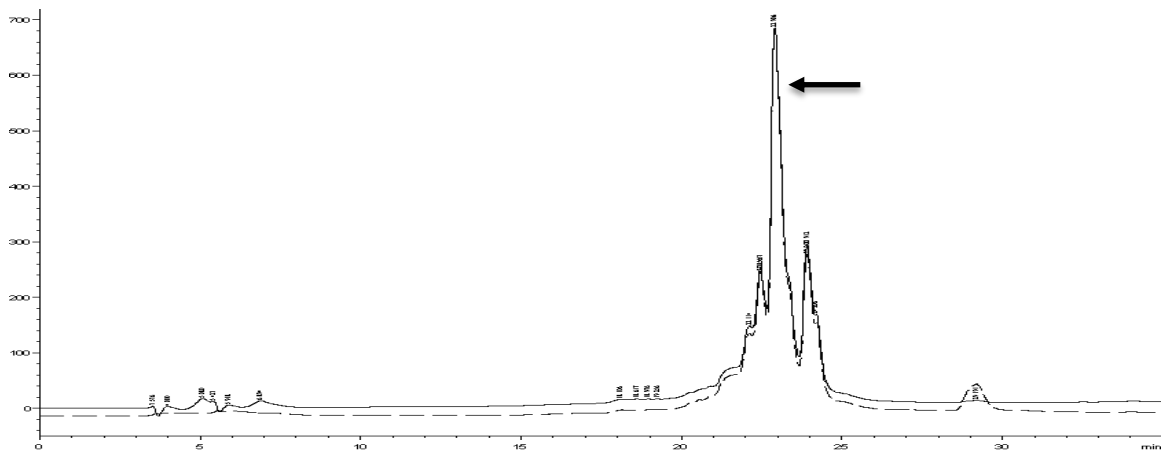
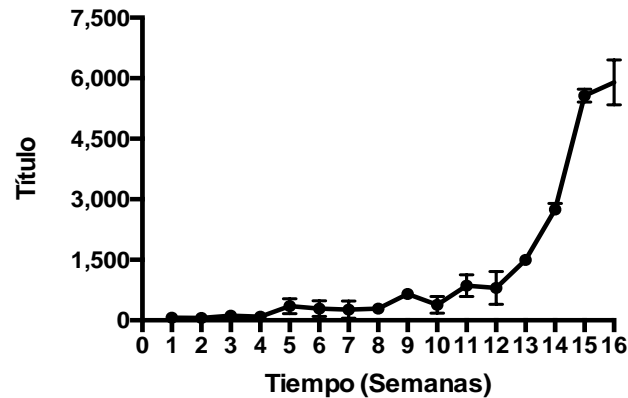


FIGURA 26. LcP2. RP-HPLC. Perfil cromatográfico del LcP2. Se indica la fracción colectada que corresponde al péptido LcP2

1.1 LcP1 y LcP2 como inmunógenos

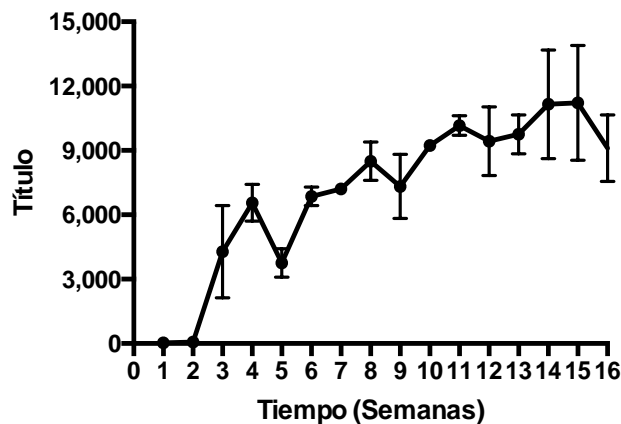
Los péptidos purificados se usaron para inmunizar conejos. Se diseñó un esquema de inmunización (**Tabla 7**) que contempló el uso alterno de adyuvantes y dosis constantes de cada péptido. Al termino del esquema, se determinó la capacidad de los sueros de reconocer de manera específica a los péptidos homólogos en pruebas de ELISA.

El péptido denominado *LcP1* tuvo la capacidad de evocar la respuesta inmune humoral en conejos. A lo largo del esquema de inmunización, la respuesta medida como la producción de anticuerpos específicos anti-*LcP1* incrementó (**gráfica 1**). El aumento sustancial de títulos comenzó a partir de la tercera semana y se mantuvo hasta la semana 12, en donde hubo aumento exponencial hasta el término del esquema.



Gráfica 1. Evolución de los títulos de anticuerpos de conejo contra *LcP1*. Títulos promedio de las diferentes sangrías (1-16) de conejos inmunizados con *LcP1*.

LcP2 por su parte, comparado con *LcP1*, es más efectivo como inmunógeno. La producción de anticuerpos específicos se presentó de tal forma que pudo detectarse en el inmunoensayo diseñado a partir de la semana 3, que siguió con la misma tendencia hasta la semana 14 como se muestra en la **gráfica 2**.



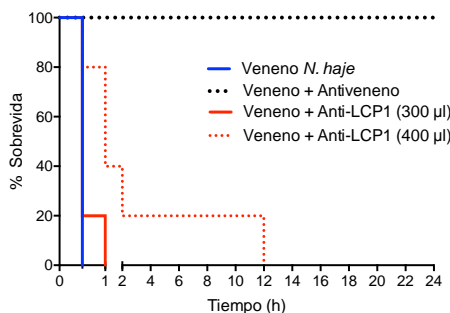
Gráfica 2. Evolución de los títulos de anticuerpos de conejo contra *LcP2*. Títulos promedio de las diferentes sangrías (1-16) de conejos inmunizados con *LcP2*.

Los péptidos sintéticos *LcP1* y *LcP2* fueron inmunogénicos. Los sueros anti-*LcP1* y anti-*LcP2* tuvieron la capacidad de reconocer a los péptidos homólogos en ensayos *in vitro*. Es importante evaluar la efectividad los antisueros.

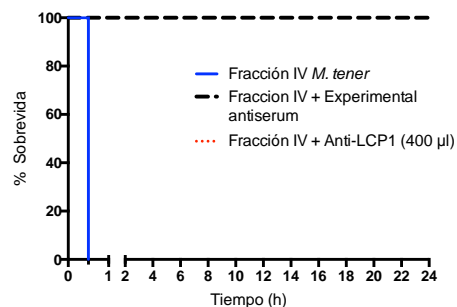
1.2 Efectividad de los sueros anti-*LcP1* y *LcP2*

Se evaluó la capacidad de los sueros Anti-*LcP1* y Anti-*LcP2* de reconocer y neutralizar los efectos tóxicos y letales de tres venenos de elápidos. Como es descrito en *Material y Métodos*: volúmenes variables de antisuero de la última fecha son incubados con la cantidad de veneno correspondiente a $3xDL_{50}$. Para ello, fue necesario determinar la DL_{50} de los venenos empleados. El resultado fue: *Naja haje* (4.1 $\mu\text{g}/\text{ratón}$), *Dendroaspis polylepis* (5.3 $\mu\text{g}/\text{ratón}$), *Ophiophagus hannah* (11.5 $\mu\text{g}/\text{ratón}$) y 14 μg de la fracción VI del veneno de *Micrurus tener* (correspondiente a una alfa neurotoxina de cadena corta, *MlatA1* y algunas otras moléculas de naturaleza proteica (Carbajal-Saucedo et al., 2013). Los sueros de los conejos anti-*LcP1* se mezclaron e incubaron por separado con $3xDL_{50}$ de veneno: *Naja haje* (12.3 μg), *D. polylepis* (15.9 μg), *O. hannah* (34 μg) y 42 μg de la fracción VI. Se probaron 100, 200, 300 y 400 μL del antisuero para cada veneno. De igual manera, en el caso de los sueros anti-*LCP2*, se mezclaron e incubaron 100, 200, 300 y 400 μL con las $3xDL_{50}$ correspondientes a cada veneno. Como control positivo se utilizó el antiveneno correspondiente para cada veneno: INOSERP MENA, INOSERP, INDU y Coralmyn, respectivamente. Se registró el porcentaje de sobrevida a los 30 min, y a las 1, 2, 12 y 24 h post-aplicación. Es importante señalar que el volumen máximo de suero pre-inmune (400 μL) no tuvo efecto sobre la letalidad de ningún veneno o fracción empleada (control negativo).

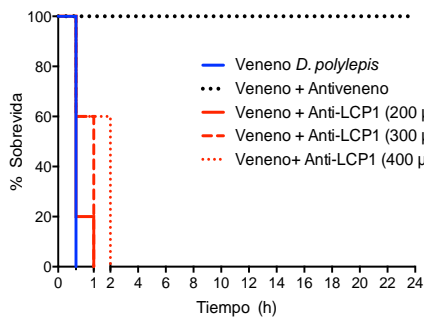
Los resultados señalan que el suero anti-*LcP1* no es tan efectivo como los antivenenos comerciales, ya que utilizando la dosis máxima de antisuero (400 μL) no se obtuvo el 100 % de sobrevida. Mientras que, para todos los casos, menos de 100 μL del antiveneno fueron suficientes para prevenir la muerte del grupo control. Sin embargo, es importante señalar que para *Naja haje* y *D. polylepis*, sí se encontró protección parcial contra el veneno; es decir, que se pudo prolongar la sobrevivencia más allá de los 30 min, pero no más de las 12 h (**Gráficas 3 y 5**). El efecto protector fue más evidente para el caso de *Ophiophagus hannah* en donde hubo protección y sobrevida del 40% de los individuos hasta el final del experimento (**Gráfica 2**). Interesantemente, el suero no neutraliza el efecto letal de la alfa neurotoxina de cadena corta *MlatA1* (**Gráfica 4**).



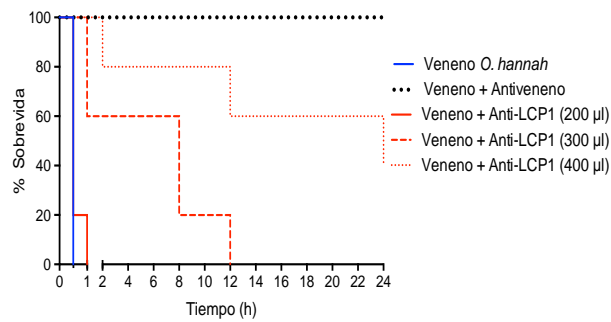
Gráfica 3. Anti-*Lcp1* vs *N. haje*.



Gráfica 4. Anti-*Lcp1* vs Fracción IV

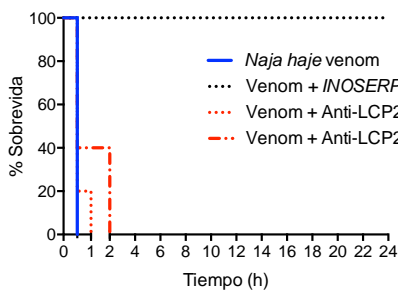


Gráfica 5. Anti-LcP1 vs *D. polylepis*.

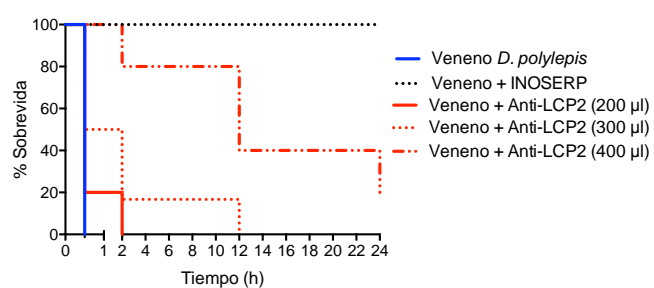


Gráfica 6. Anti-LcP1 vs *O. hannah*.

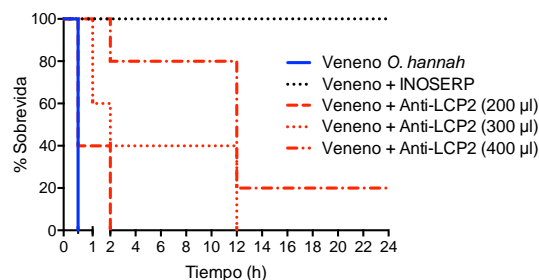
El suero *Anti-LcP2*, por su parte, cuando es comparado con el *Anti-LcP1*, es menos efectivo neutralizando el veneno de *Naja haje*, ya que la dosis máxima de antisuero LcP2 (400 µL) previene la muerte del 40 % de la población a los 30 min pero no más allá de las 2 h (**Gráfica 7**). También, tienen un efecto positivo retardando la toxicidad del veneno de *D. polylepis*, el cual se presenta de forma terapéutica de manera dosis-dependiente a partir de 200 µL, ya que la dosis máxima puede prolongar la vida de más de la mitad de la población por más de 2 h y evitar la muerte al 20% hasta terminado el ensayo (**Gráfica 8**). Asimismo, el efecto protector del suero puede observarse para el caso del veneno de *O. hannah*, ya que posterga la muerte en una manera dosis-dependiente, de tal manera que la dosis máxima de antisuero evita la muerte del 20 % de la población experimental (**Gráfica 9**).



Gráfica 7. Anti-LcP2 vs *N. haje*.



Gráfica 8. Anti-LcP2 vs *D. polylepis*.



Gráfica 9. Anti-lcP2 vs *O. hannah*.

8.4 α -neurotoxinas de cadena corta, *ScNtx*

El gen *ScNtx*, una vez ensamblado en el vector de expresión pQE30, se secuenció para corroborar su identidad. La construcción génica pQE30-*ScNtx* se usó para transformar células quimio-competentes *E. coli* cepa Origami®. Las células se seleccionaron por su resistencia a kanamicina y ampicilina (marcador de selección). Se realizó una prueba de expresión de las colonias que incorporaron el gen y se identificó que todas las células expresan la toxina consenso, ya que cualitativamente se identifica la sobre expresión de una proteína con masa molecular aparente que corresponde con el esperado para la *ScNtx*, y que se resalta en la **Figura 27**; así mismo, comprobamos su identidad mediante un anticuerpo Anti-His en un ensayo de inmunodetección, correspondiente a la **Figura 28**.

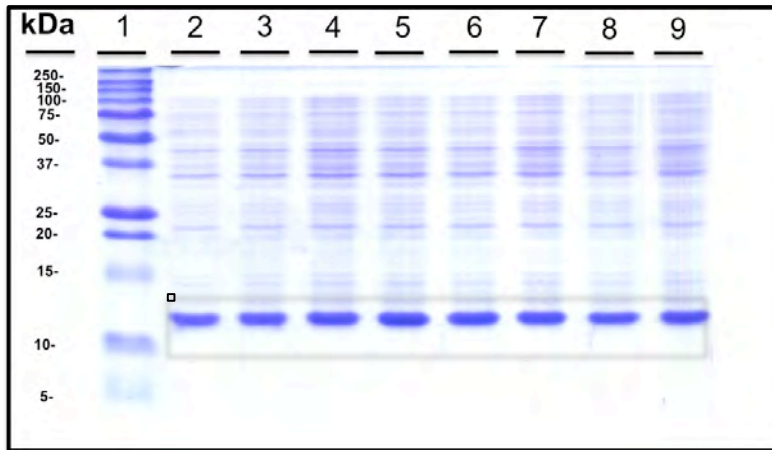


FIGURA 27. *ScNtx*: tamizado de expresión. **SDS-PAGE 15%.** Tamizado de diferentes colonias de Origami® transformadas con el pQE-*ScNtx*. Condiciones reductoras. 1 mM IPTG 37 °C. Carriles 2-9.- Colonias 1-8.

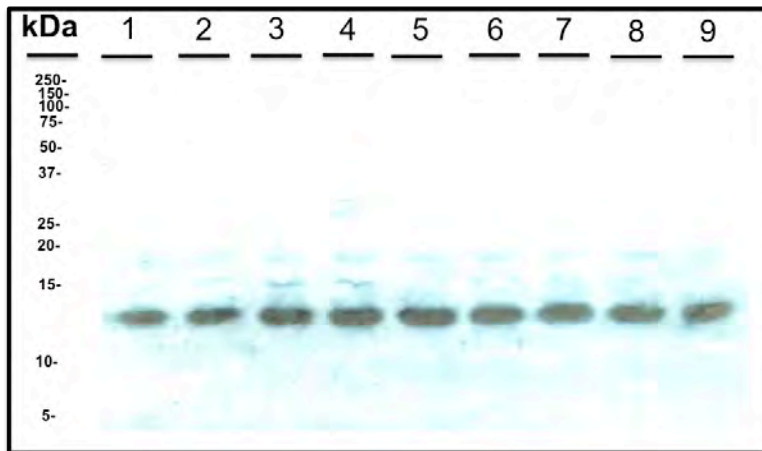


FIGURA 28. *ScNtx*: inmunodetección. **Identificación de la ScNtx mediante un IgG Conejot anti-His.** Carril 1.- Colonias 1-9.

Todas las colonias crecidas en el medio de selección sobre-expresan la proteína *ScNtx*. Ahora, con la finalidad de evaluar el estado estructurado de la *ScNtx*, se procedió a analizar su presencia en la fracción soluble o en cuerpos de inclusión del lisado celular. Para ello, las células se crecieron, se indujeron y se cosecharon en las condiciones descritas en la literatura como óptimas para su expresión de manera soluble: 0.1mM IPTG a 16 °C por 24 h. Los resultados indican que la proteína, bajo dichas condiciones, se expresó tanto de manera soluble (ver la **Figura 29**) como en forma de cuerpos de inclusión (ver la **Figura 30**), siendo ésta última la más favorecida, como se puede concluir del análisis de las **Figuras 31 y 32**.

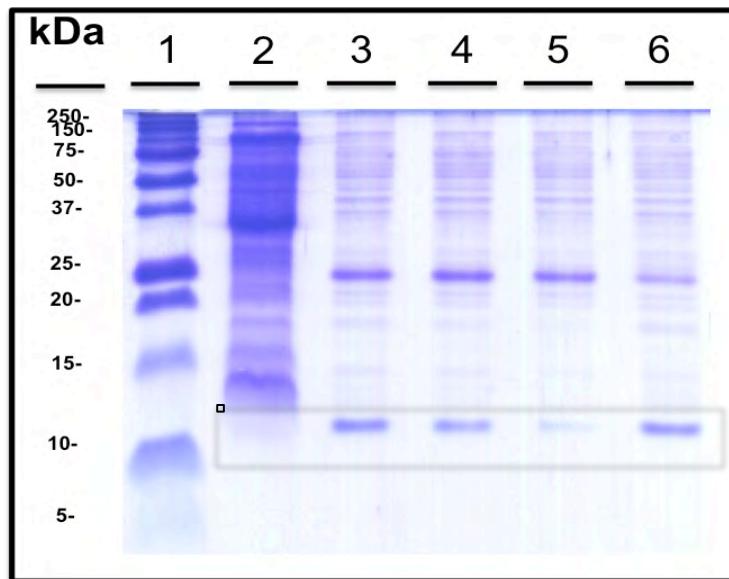


FIGURA 29. *ScNtx*: fracción soluble. **SDS-PAGE 15%.** Fracción soluble de la *ScNtx* purificada por afinidad a Ni^{2+} . Condiciones reductoras. *Origami*®. 0.1 mM IPTG 16 °C. Carril 1.- Marcador de masa molecular.; Carril 2.- Células sin inducir, control; Carril 3.- Fracción soluble 1; Carril 4.- Fracción soluble 2; Carril 5.- Fracción soluble 3; Carril 6.- Fracción soluble 7.

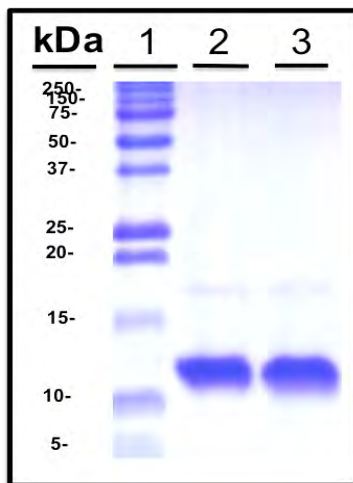


FIGURA 30. *ScNtx*: cuerpos de inclusión. **SDS-PAGE 15%.** Cuerpos de inclusión tratados con 6 M *GndCl*. *ScNtx* purificada por afinidad a Ni^{2+} . Condiciones reductoras. *Origami*®. 0.1 mM IPTG 16 °C. Carril 1.- Marcador de masa molecular.; Carril 2.- Fracción 1 Carril 3.- Fracción 2.

La producción de la *ScNtx* soluble pudo mejorarse al reducir el tiempo de inducción, de 24 h a 12 h, y disminuir la temperatura, de 37 a 16 °C. Lo anterior lo afirmamos al comparar los resultados de las **Figura 31** y **32**, en donde se percibe de manera cualitativa que la cantidad de proteína en forma de cuerpos de inclusión disminuyó al tiempo que aumentó en su forma soluble.

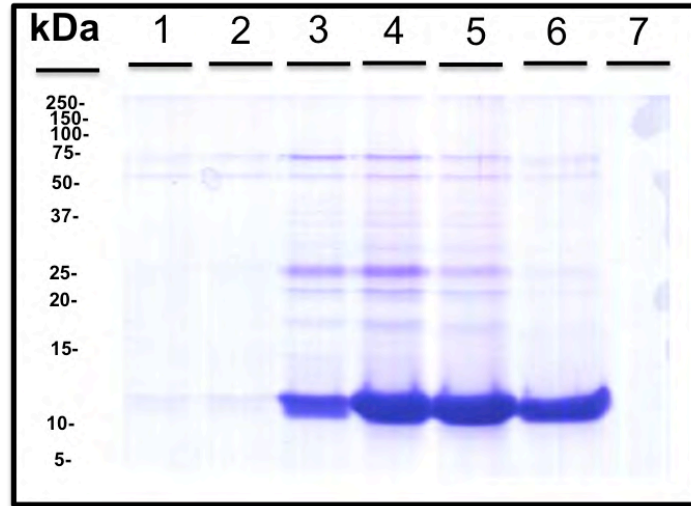


FIGURA 31. *ScNtx*: mejoramiento de la expresión. SDS-PAGE 15%. Fracción soluble de la *ScNtx* purificada por afinidad a Ni^{2+} . Condiciones reductoras. Origami®, 0.1 mM IPTG 16 °C. Carril 1.- Marcador de masa molecular.; Carril 2.- Células sin inducir, control; Carril 3.- Fracción soluble 1; Carril 4.- Fracción soluble 2; Carril 5.- Fracción soluble 3; Carril 6.- Fracción soluble 7. Carril 7.- Fracción soluble 8.

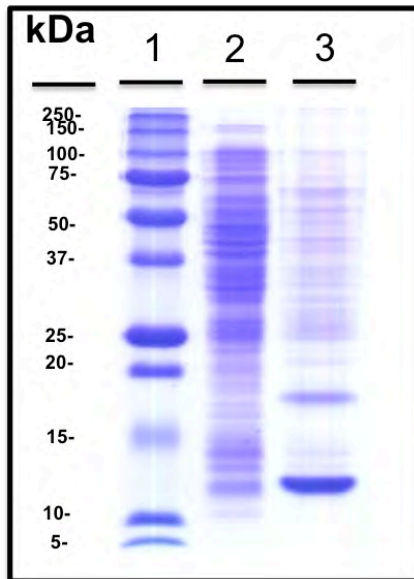


FIGURA 32. *ScNtx*: cuerpos de inclusión solubilizados. SDS-PAGE 15%. Cuerpos de inclusión tratados con 6 M GndCl. *ScNtx* purificada por afinidad a Ni^{2+} . Condiciones reductoras. Origami®, 0.1 mM IPTG 16 °C. Carril 1.- Marcador de masa molecular.; Carril 2.- Células sin inducir; Carril 3.- Fracción 1.

La *ScNtx* soluble, purificada mediante una columna de afinidad, se sometió a un segundo paso de purificación: RP-HPLC. Para ello se empleó una columna C-18 con un gradiente de agua-acetonitrilo (en TFA 0.1 %) de 10-60 % en 60 min. El cromatograma,

que corresponde a la **Figura 33**, presenta una fracción mayoritaria, la cual se colectó y analizó por espectrometría de masas para determinar y corroborar la masa molecular de la *ScNtx*, la cual es de 8681 Da, que corresponde a la proteína en estado oxidado.

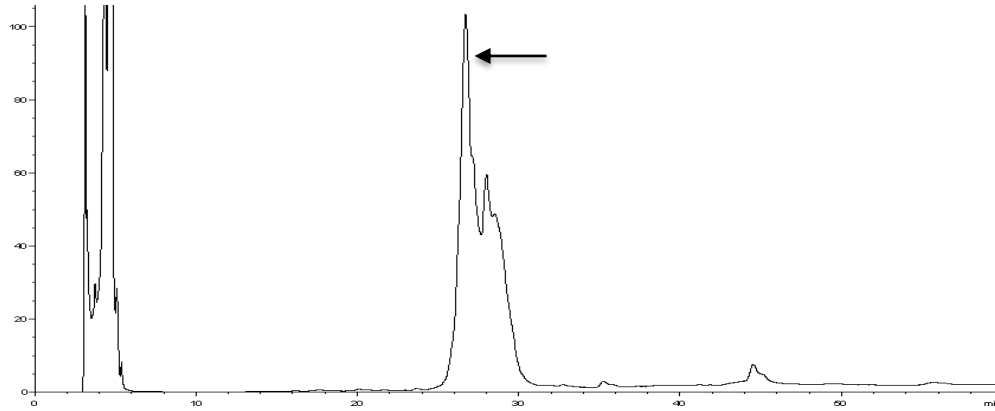


FIGURA 33. *ScNtx*: RP-HPLC. Se indica la fracción colectada cuya masa molecular corresponde a la *ScNtx* oxidada.

Los resultados demuestran que es posible generar la *ScNtx* de manera soluble. En la siguiente tabla se muestra la cantidad de proteína promedio obtenida por litro de cultivo. Dichos valores revelan que es posible obtener 2.8 mg de proteína cuando el tiempo de inducción es de 12 h, y 54 µg cuando es de 24 h, ya que en ese periodo se agregan en forma de cuerpos de inclusión.

Tabla 9. ScNtx: Efecto del medio de cultivo sobre la producción de proteína.

Medio de cultivo	Tiempo de inducción (hr)	Proteína soluble (µg/L)	Proteína cuerpos de inclusión (µg/L)
MLB (-Tryptona)/+Peptona	24	54 ± 15	2682 ± 40 (G)
	12	2837 ± 89	-

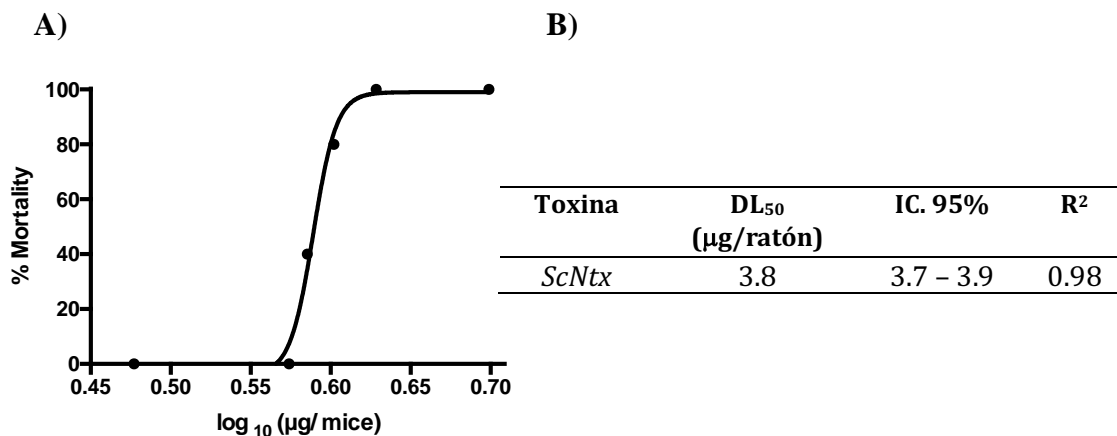
n= 3; proteína purificada por RP-HPLC.
Cultivos de 1 L en todos los casos. Origami.
G= GndCl6 M.

Es importante señalar que la obtención de tales cantidades de proteína soluble es en parte gracias al uso del medio **MLB (ver medios de cultivo en materiales y métodos)**, ya que al usar otros medios de cultivos la producción de proteína en general disminuye en varios ordenes de magnitud. De acuerdo a la literatura, el **MLB** puede contribuir a la acumulación de osmolitos dentro de la célula, los cuales ayudarían a estabilizar las proteínas a través de interacciones iónicas (apantallamiento), impidiendo la

agregación fruto de las interacciones hidrofóbicas intermoleculares (Sleator and Hill, 2002).

A. *ScNtx*: actividad biológica

Con la finalidad de poder evaluar la letalidad de la *ScNtx* se determinó la dosis letal media de la toxina. El ensayo fue tal como se describe en la sección dosis letales en materiales y métodos. El resultado indica que a *ScNtx* es tóxica y tiene una dosis letal media de 3.8 µg/ratón (0.19 mg/kg) (**gráfica 10**).

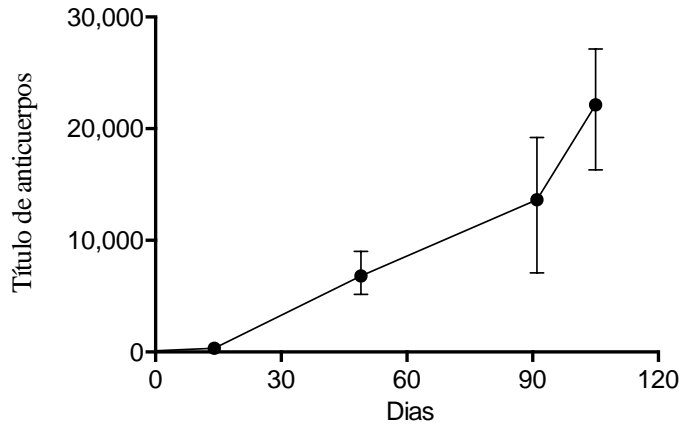


Gráfica 10. *ScNtx*: DL₅₀. **Determinación de la DL₅₀ de la *ScNtx*.** **A)** Ajuste sigmoideo dosis-respuesta de la dosis de veneno (log µg/ratón) contra el porcentaje de mortalidad. **B)** DL₅₀ (µg/ratón) con su respectivo intervalo de confianza y R².

B. *ScNtx*: inmunogenicidad en conejos

1.1 *ScNtx* como inmunógeno

La *ScNtx* se usó y evaluó como inmunógeno; se inoculó vía intradérmica a un grupo de 3 conejos Nueva Zelanda blancos. El esquema de inmunización descrito en la **Tabla 7**, contempló dosis crecientes del inmunógeno en coadministración con diferentes adyuvantes. Durante el periodo de aplicación de la *ScNtx*, se colectaron muestras de suero. Al final, los conejos se sangraron a blanco y se determinó la reactividad de la mezcla Anti-*ScNtx* hacia la *ScNtx*. Finalmente, los resultados indican que la *ScNtx* es inmunogénica: a partir de la primera semana la respuesta inmune de los animales se perfiló hacia la producción de anticuerpos específicos contra la toxina. La respuesta incrementó hasta llegar a un título promedio de 22,000. En la **Gráfica 11** se aprecia la evolución de la respuesta en términos de títulos de anticuerpos hacia el inmunógeno



Gráfica 11. Títulos de anticuerpos de conejo anti-ScNtx. **Evolución de los títulos de anticuerpos de conejo contra la ScNtx.** Títulos promedio de las diferentes sangrías de conejos inmunizados con la ScNtx mediante el reconocimiento específico del antisuero por la toxina. (n=3).

1.2 Efectividad del antisuero y reactividad cruzada.

El ensayo de ELISA, en donde se evalúa el reconocimiento *in vitro* de la ScNtx, indica que es posible dirigir la respuesta inmune humoral hacia una toxina de tres dedos. De igual manera, el mismo hecho pudo ser evaluado mediante otro método, por ejemplo, el suero colectado después de la octava inmunización tuvo la capacidad de reconocer de manera para-específica toxinas de tres dedos de los venenos de *Naja pallida*, *Dendroaspis polylepis* y *Dendroaspis viridis* como lo demostramos en la **Figura 34** mediante un ensayo de inmunodetección de toxina de tres dedos dentro del veneno de elápidos.

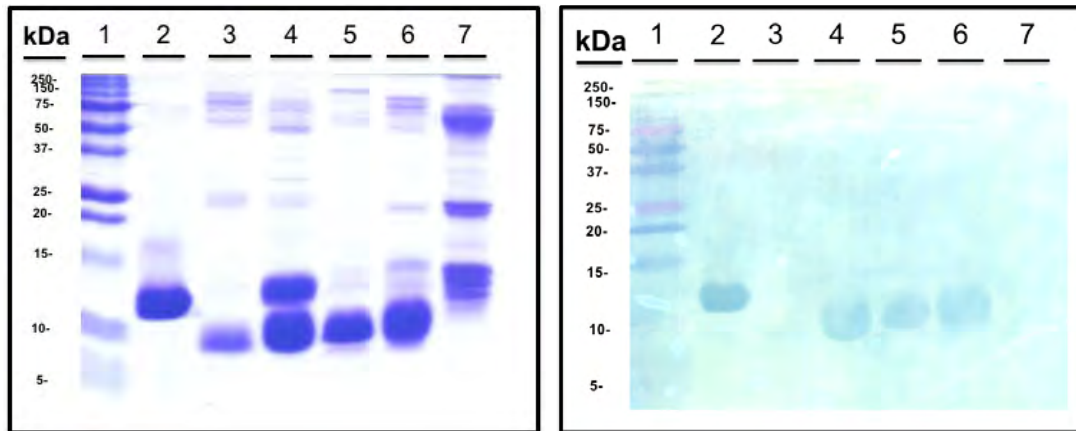
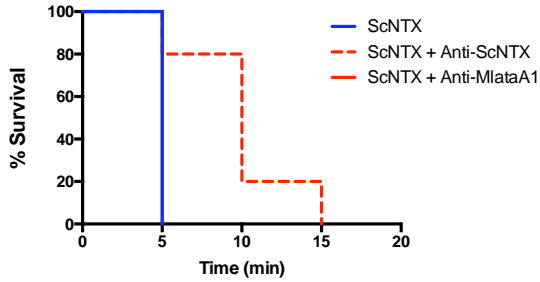
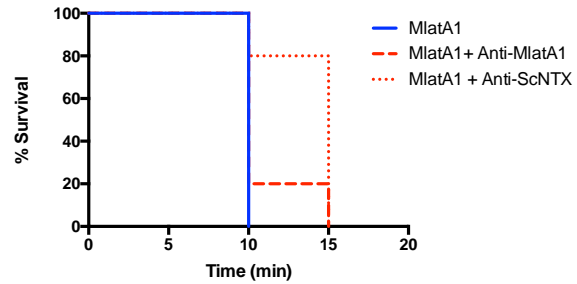


FIGURA 34. Conejo Anti-ScNtx: reactividad. **Pérfiles electroforéticos de la toxina ScNtx y venenos de serpientes.** 10 µg/carril. Condiciones reductoras. Carril 1.- MWM; Carril 2.- ScNtx; Carril 3.- Naja haje; Carril 4.- Naja pallida; Carril 5.- Dendroaspis polylepis; Carril 6.- Dendroaspis viridis; Carril 7.- Echis ocellatus (control; vipérido sin toxinas de tres dedos). **Western blot 6.** Suero anti-ScNtx. Carril 1.- Marcador de masa molecular.; Carril 2.- ScNtx; Carril 3.- Naja haje; Carril 4.- Naja pallida; Carril 5.- Dendroaspis polylepis; Carril 6.- Dendroaspis viridis; Carril 7.- Echis ocellatus (control; vipérido sin toxinas de tres dedos).

El antisuero *ScNtx* de los 3 conejos se mezcló en volúmenes iguales (“*Pooled*”) y se usó para realizar ensayos de neutralización. Posteriormente, decidimos utilizar el volumen máximo de suero (400 μ L) para ser incubarlo con 3 dosis letales medias de la toxina *ScNtx* (11.4 μ g/ratón) (**Gráfica 12**). También, como referencia utilizamos las toxinas *MlatA1* y *rD.H.* (toxinas de cadena corta con más del 80 % de homología en secuencia).

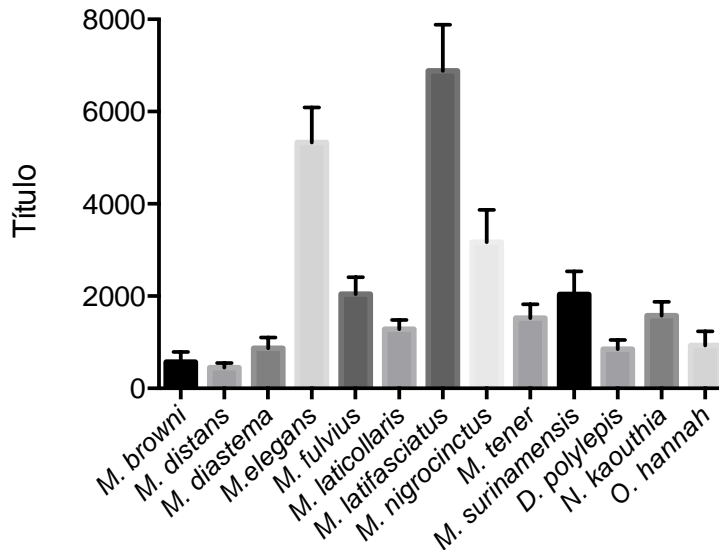


Gráfica 12. Anti-ScNtx vs ScNtx.



Gráfica 13. Anti-ScNtx vs MlatA1

Los resultados indican que los anticuerpos producidos contra la *ScNtx* son capaces de reconocer de manera específica a la neurotoxina consenso y algunas otras provenientes de elápidos africanos, como lo demostramos en la **Figura 14**; sin embargo, para el caso de la toxina de secuencia consenso, dicho reconocimiento no fue suficiente para neutralizarla de manera total. Como se muestra en las **gráficas 12 y 13**, existe retraso en el tiempo de muerte, lo que podemos entenderlo como atenuación del efecto tóxico tanto de la *ScNtx* como de la *MlatA1* pero no una inhibición de su letalidad.



Gráfica 14. Reconocimiento in vitro de α -neurotoxinas en venenos de elápidos. El suero de conejo anti-ScNtx tiene la capacidad de reconocer, mediante ensayos de ELISA, α -neurotoxinas presentes en el veneno de elápidos de los generos *Micrurus*, *Dendroaspis*, *Naja* y *Ophiophagus*.

Es imperativo recalcar que la mezcla de los sueros de conejo *anti-ScNtx* tiene la capacidad de reconocer *in vitro* α -neurotoxinas presentes en el veneno de serpientes del genero *Micrurus*, *Naja*, *Dendroaspis* y *Ophiophagus*. Dicha propiedad demuestra la universalidad del inmunógeno, ya que dichas serpientes tienen una distribución amplia: desde *Micrurus fulvius* (America del Norte) hasta *M. surinamensis* (America del Sur); igualmente, reconoce α -neurotoxinas en serpientes africanas (*Dendroaspis polylepsis*) y asiaticas (*Naja kaouthia* y *Ophiophagus hannah*) (**Gráfica 14**). Es igualmente importante mencionar que existen α -neurotoxinas que son exclusivas de ciertos géneros; por ejemplo, la secuencia *MlatAI* sólo ha sido descrita para el género *micrurus*, por lo tanto, nuestros resultados sugieren fuertemente que el *anti-ScNtx* puede reconocer una amplia variedad de neurotoxinas de elápidos.

Otro de los objetivos del trabajo fue evaluar la capacidad neutralizante del suero de conejo *anti-ScNtx* hacia la toxina consenso *ScNtx* (neutralización específica) y la neutralización para-específica hacia las recombinantes *MlatAI* (α -neurotoxina de cadena corta descrita para *Micrurus laticollaris*) y *rD.H* (α -neurotoxina de *micrurus diastema*). De igual manera, se tiene antisueros específicos contra dichas toxinas, con lo cual se evaluó la capacidad de éstos para neutralizar a la *ScNtx*. El suero *anti-MlatAI*, por su parte, tuvo un ligero efecto atenuante sobre la *ScNtx*; igualmente, el suero *Anti-ScNtx* produjo el mismo efecto hacia la *MlatAI* (**Gráfica 12 y 13**). El suero *anti-rD.H* tuvo efecto sobre la toxicidad de la *ScNtx*, pero a concentraciones muy altas (**ver tabla 10**). No obstante, los sueros individuales de los conejos *anti-ScNtx* sí pudieron reconocer a la toxina *rD.H* y además efectivamente neutralizarla. A continuación, en la **tabla 10** se muestran los valores de las dosis efectivas media (DE₅₀) determinadas.

Tabla 10. Efectividad de los sueros de conejo anti-ScNtx

Toxina	DE ₅₀ suero conejo 1 μL/ratón (IC 95 %)	DE ₅₀ suero conejo 2 μL/ratón (IC 95 %)	DE ₅₀ suero conejo 3 μL/ratón (IC 95 %)
<i>ScNtx</i>	440 (430 – 450)	NN	NN
<i>MlatAI</i>	NN	NN	NN
<i>rD.H</i>	346 (320-350)	264 (250-275)	342 (335-350)

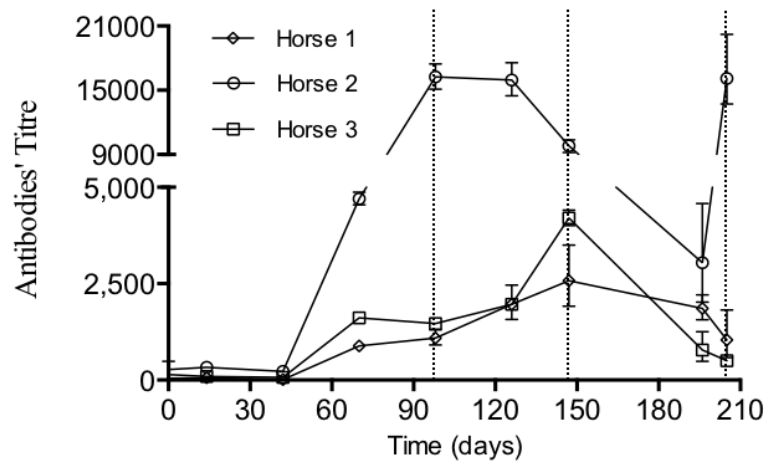
Nota importante: La dosis efectiva del suero de conejo *anti-rD.H* contra la *rD.H* es de 330 μL/ratón, y de 440 μL/ratón contra la *ScNtx*.

NN= No neutraliza con 450 μL/ratón.

C. ScNtx: inmunogenicidad en caballos

La neurotoxina recombinante consenso de cadena corta *ScNtx*, se empleó como inmunógeno en un esquema de inmunización que involucró un grupo de tres equinos (n=3). En la **Tabla 8** se describe el esquema de inmunización, el cual indica la cantidad de toxina por individuo, el tipo de adyuvante empleado, y el número de inmunizaciones.

Posteriormente, para poder evaluar la respuesta humoral de los caballos hacia el inmunógeno, se tituló el suero de los caballos inmunizados. Para ello, por medio de ensayos tipo ELISA, se determinó el título de anticuerpos específicos contra el inmunógeno en 8 muestras colectadas a lo largo de 210 días. La evolución de la respuesta se señala en la **gráfica 15**.



Gráfica 15. *ScNtx*: títulos de anticuerpos de caballo. **Evolución de los títulos de anticuerpos de caballo contra la ScNtx.** Títulos de las diferentes sangrías de caballos inmunizados con la *ScNtx* mediante el reconocimiento específico del antisuero por la toxina. Las líneas punteadas corresponden a las muestras de los días 98, 145 y 205 que fueron empleadas para los ensayos de neutralización.

La toxina *ScNtx* fue inmunogénica. Los caballos respondieron de manera positiva a las inmunizaciones; sin embargo, un individuo respondió de mejor manera que el resto de los integrantes del grupo (**Grafica 15 Horse 2**). El resultado es congruente con lo observado previamente en el laboratorio y lo comentado en ciertas publicaciones científicas (Xu et al., 2017), en donde existe una variación intrínseca al sistema biológico que promueve una mejor respuesta en algunos individuos; sin embargo, aún no existe en la literatura algún reporte que nos ayude a explicar de manera contundente la causa de dicho fenómeno.

1.1 Efectividad del suero de caballo

El objetivo primordial del presente trabajo consistió en evaluar los sueros de caballo generados contra la *ScNtx* y determinar su mejoramiento en términos de potencia neutralizante contra el inmunógeno y contra otras α -neurotoxinas de cadena corta. Para ello, se emplearon los sueros, señalados en la **Gráfica 15**, correspondientes a los días 98, 147 y 205 de cada caballo. Las toxinas de reto fueron la *ScNtx* ($DL_{50} = 3.9 \mu\text{g/ratón}$), *MlatA1* ($DL_{50} = 19 \mu\text{g/ratón}$), *rD.H* ($DL_{50} = 3 \mu\text{g/ratón}$) y *P01424* ($DL_{50} = 1.2 \mu\text{g/ratón}$). Se usaron dosis variantes de suero y el equivalente a tres dosis letales media de cada toxina.

Tabla 11. Efectividad de los sueros de caballo anti-*ScNtx*

Toxina	DE ₅₀ caballo 1 anti- <i>ScNtx</i> , $\mu\text{L/ratón}$ (IC 95%)		
	Día 98	Día 147	Día 205
<i>ScNtx</i>	420 (390 - 450)	390 (385 - 405)	355(335 - 365)
<i>MlatA1</i>	Sin efecto	420 (400 - 440)	380 (360 - 400)
<i>rD.H</i>	Sin efecto	364 (344 -384)	342 (322 - 362)

Toxina	DE ₅₀ caballo 2 anti- <i>ScNtx</i> , $\mu\text{L/ratón}$ (IC 95%)		
	Día 98	Día 147	Día 205
<i>ScNtx</i>	350 (335 - 365)	85 (80 - 90)	95(80 - 110)
<i>MlatA1</i>	400 (380 - 420)	115 (100 - 130)	140 (120 - 160)
<i>rD.H</i>	320 (295 - 330)	76 (70 - 80)	86 (76 -86)
<i>P01424</i>	No determinado	120 (110 - 130)	152 (140 - 180)

Toxina	DE ₅₀ caballo 3 anti- <i>ScNtx</i> , $\mu\text{L/ratón}$ (IC 95%)		
	Día 98	Día 147	Día 205
<i>ScNtx</i>	425 (410 - 440)	314 (310 - 320)	293 (273 - 313)
<i>MlatA1</i>	Sin efecto	345 (330 - 350)	380 (360 - 400)
<i>rD.H</i>	420 (395 - 430)	345 (260 - 290)	375 (75 -85)

Los sueros de los caballos tuvieron la capacidad de neutralizar la letalidad de las α -neurotoxinas empleadas; de manera específica a la *ScNtx* y de manera para específica a la *rD.H* (83% similitud en secuencia con la *ScNtx*) y *MlatA1* (80 % similitud). En todos los casos, la efectividad de los sueros mejoró conforme al tiempo; es decir, el suero del día 205 tuvo una mejor potencia neutralizante que el del día 98. También, se observa una correlación entre el título de anticuerpos y la potencia neutralizante de los sueros. Basta con observar el caso del caballo 2, el cual presenta un mayor título de anticuerpos, neutraliza de mejor manera a las neurotoxinas que el caballo 3, y éste, a su vez, mejor que el caballo 1 (comparar **Gráfico 15** y los datos de la **Tabla 11**). Aquí es importante hacer mención que, tomando como argumento que el caballo 2 presentó la mejor potencia

neutralizante, se decidió determinar sus propiedades terapéuticas sobre una α -neurotoxina aislada del veneno de *Naja melanoleuca*, referida como *P01424*. Interesantemente, las muestras empleadas, de los días 147 y 205, pudieron neutralizar el efecto letal de la *P01424* (80 % de similitud en secuencia con la *ScNtx*). En ningún caso, para dosis superiores a la DE, los ratones mostraron cuadros de neurotoxicidad. Podemos concluir que la neutralización ocurrió de manera satisfactoria; es decir, no hubo cuadros clínicos que sugirieran una neutralización parcial. Además, los controles (veneno incubado con 400 μ L de suero no inmune o pre-inmune), por su parte, sugieren que el reconocimiento y neutralización es específico, ya que dicho grupo desarrolla el cuadro clínico típico y los ratones murieron por paro respiratorio.

2.1 Antiveneno experimental

Debido a que la mayoría de los antivenenos disponibles en el mercado se basan en anticuerpos purificados o fragmentos de los mismos, decidimos emplear los sueros del **caballo 2** de los días 147 y 205, que presentaron las mejores potencias de neutralización y los títulos más altos, para producir un antiveneno experimental basado en anticuerpos provenientes del suero fraccionado, de acuerdo con procedimientos estandarizados, mediante ácido caprílico (Rojas et al., 1994). Al finalizar, se obtuvo una solución de inmunoglobulinas de caballo que contenía 47 mg/mL de proteína. Posteriormente, la potencia de neutralización de estas inmunoglobulinas se evaluó frente a las α -neurotoxinas ya mencionadas y una batería de venenos de elápidos que incluyen serpientes de América, Asia, África y oriente medio. Primeramente, se determinó la dosis letal media (DL_{50}) de cada veneno, la cual se enlista en la primera columna de la **Tabla 12**; posteriormente, se emplearon 3 DL_{50} , y en algunos casos 5 DL_{50} y volúmenes variables de antiveneno (Ver **7.17 efectividad de los sueros**) para determinar la dosis efectiva media, que se describe en μ L y se indica en la segunda columna de la **Tabla 12**. Adicionalmente, la efectividad del antiveneno también se expresa como miligramos de α -neurotoxina o veneno, y números de LD_{50} neutralizados por 1 mL de antiveneno. Dicha información se muestra dentro de la tercera y cuarta columna, respectivamente, de la **Tabla 12**.

El antiveneno experimental fue efectivo neutralizando de manera específica a la *ScNtx* ($DE_{50}=49.1 \mu$ L/ratón); y de manera para-específica a las α -neurotoxinas recombinantes *MlatA1* ($DE_{50}=45.4 \mu$ L/ratón) y *r.D.H* ($DE_{50}=45.4 \mu$ L/ratón). Además, la α -neurotoxina aislada *P01424*, la cual determinamos tiene la DL_{50} más baja reportada en la literatura ($DL_{50}= 1.2 \mu$ g/ratón), también pudo ser efectivamente neutralizada por el antiveneno experimental ($DE_{50}=45.4 \mu$ L/ratón). Igualmente, el antiveneno tuvo efecto positivo sobre la neutralización de la letalidad causada por el veneno completo de serpientes con venenos neurotóxicos (**Tabla 12**). No obstante, el antiveneno experimental

no tuvo efecto sobre algunas serpientes del género *Micrurus* (corales), *Naja* y *Dendroaspis*. El resultado indica que existen otros componentes tóxicos en aquellos venenos que son, además de las α -neurotoxinas, protagonistas en los cuadros de envenenamiento que llevan a la muerte de los animales experimentales.

Tabla 12. Efectividad del antiveneno experimental. Dosis letal (DL_{50}) de α -neurotoxinas y venenos de elápidos y Dosis efectiva media (DE_{50}) del antiveneno experimental.

α -neurotoxina/veneno	DL_{50} in μ g/ratón (95 % IC)	AV DE_{50} in μ L/ratón (95 % IC)	mg toxina o veneno / ml AV	DL_{50} de toxina o veneno / ml AV
α-neurotoxina				
<i>ScNtx</i>	3.9 (3.8 - 3.9)	49.1 (47.8-50.4)	0.23	61.1
<i>MlatA1</i>	19 (18 - 20)	45.4 (44.1-46.8)	1.25	66.1
<i>r.D.H</i>	3 (2.8 - 3.2)	31.7 (31.7-31.8)	0.28	94.6
<i>P01424</i> †	1.2 (1.1-1.3)	34.3 (33.7-34.9)	0.17	145.7
Veneno				
<i>Micrurus browni</i>	3.8 (3.5 - 4.1)	NN	-	-
<i>Micrurus diastema</i>	6 (5.5 - 6.5)	191.5 (188.7-194.3)	0.09	15.6
<i>Micrurus distans</i>	12 (10 -14)	NN	-	-
<i>Micrurus fulvius</i>	4 (3.8 - 4.2)	NN	-	-
<i>Micrurus laticollaris</i>	10 (9.1-11.4)	171.1 (166.0-175.0)	0.17	17.5
<i>Micrurus nigrocinctus</i>	7 (5 - 9)	56.5 (54.8 – 58.1)	0.37	53.1
<i>Micrurus surinamensis</i>	10 (9.5-10.5)	51.2 (49.7- 52.7)	0.58	58.6
<i>Micrurus tener tener</i>	15 (13 - 17)	NN	-	-
<i>Dendroaspis angusticeps</i>	17 (16-18)	178 (171.3-185.4)	0.28	16.8
<i>Dendroaspis polylepis</i>	5.3 (5 - 5.5)	149.1 (141.2-157.3)	0.01	20.1
<i>Dendroaspis viridis</i>	12 (11.9 - 12.2)	NN	-	-
<i>Naja atra</i>	8 (7.7 - 8.2)	37.5 (35.5-39.5)	0.64	80
<i>Naja haje</i> †	0.9 (0.8 - 1)	77.4 (76.6-78.2)	0.05	64.6
<i>Naja kaouthia</i>	3.9 (3.7 - 4.2)	50.0 (47.0-53.0)	0.23	60
<i>Naja melanoleuca</i>	6.5 (6.4 - 6.6)	72.3 (69.9-74.7)	0.27	41.5
<i>Naja mossambica</i>	22.7 (19.5 - 25.8)	NN	-	-
<i>Naja naja naja</i>	9.4 (9.3 – 9.6)	65.5 (63.1-67.7)	0.43	45.8
<i>Naja nigricollis</i>	18 (17 -19)	NN	-	-
<i>Naja nivea</i>	8.2 (8 - 8.4)	25 (20 – 30)	0.9	120
<i>Naja nubiae</i>	8.3 (8.1-8.4)	173.7 (169.1-178.4)	0.14	17.27
<i>Naja pallida</i>	17 (17.8 - 17.2)	NN	-	-
<i>Ophiophagus hannah</i>	11.5 (10.9 - 12.2)	47.9 (44.1-52.1)	0.72	62.6
<i>Pelamis platura</i>	*3.9 (0.8 - 6.4)	40 - 66	no menos de 0.17	no menos de 45.4
<i>Walterinnesia aegyptia</i>	4.9 (3.9 - 5.8)	55.7 (53.1-58.5)	0.26	53.8

Intervalos de confianza (IC) en paréntesis; *valor determinado por Lomonte et al. (2014); NN= no neutraliza con 200 μ L (100 % mortalidad); † 5 LD_{50} fueron empleadas para la DE_{50}

9 Discusión

Los venenos de serpientes representan una fuente importante de moléculas farmacológicamente activas (Aird et al., 2016). Dichas moléculas, principalmente las de naturaleza proteica, se han clasificado dentro de familias de proteínas (Gilquin et al., 2003). La familia de las toxinas de tres dedos, por ejemplo, es una de las familias proteicas más comunes en el veneno de elápidos. Las α -neurotoxinas, tanto de cadena corta como de cadena larga son, a su vez, las que exhiben la mayor letalidad (Laustsen et al., 2015b). Por lo tanto, el acervo bibliográfico existente en las bases de datos especializadas, dígase *UniProt*, concerniente a las α -neurotoxinas es superado sólo por las fosfolipasas A2. *UniProt* alberga alrededor de 500 secuencias, algunas de ellas contienen información adicional que nos brindan información esencial con relación a cerca de su estructura y función (Barber et al., 2013; Kini and Doley, 2010; Kozminsky-Atias and Zilberberg, 2012; Roy et al., 2010; Utkin, 2013). No obstante el gran número de secuencias reportadas, existe un número muy reducido de toxinas completamente caracterizadas; como consecuencia, es posible que muchas de ellas tengan actividades aún no descritas (ver **2.1.2 otras funciones**). Es por ello que el filtro de búsqueda empleado en el presente trabajo contempló discriminar las secuencias de aquellas toxinas cuya evidencia proteómica fue nula, es decir, α -neurotoxinas deducidas por secuencia de ADN o ARN. También, pudimos discriminar toxinas asiladas de venenos de serpientes con baja morbilidad, y disponer de aquellas provenientes de serpientes de importancia médica. Por lo tanto, de todas las secuencias analizadas, sólo 20 fueron las que completamente cubrieron los requisitos: 8 de cadena larga y 12 de cadena corta, con dosis letales medias en un rango de entre 0.3 a 0.9 mg/kg, enlistadas en las **Tablas 7 y 8**.

Las α -neurotoxinas de cadena larga empleadas para obtener las toxinas consenso, contienen entre 71 y 79 residuos de aminoácidos. En la **Figura 6** se muestran las secuencias empleadas, y en la **Tabla 7** las obtenidas del alineamiento de las 8 toxinas de cadena larga seleccionadas. Comenzaremos con señalar, primeramente, que en las regiones con indeterminaciones decidimos emplear el método semi-empírico de Kolaskar, el cual sugiere los aminoácidos con mejor inmunogenicidad (Kolaskar and Tongaonkar, 1990). En segundo lugar, se respetaron las regiones más conservadas, y en los sitios con indeterminaciones, siempre se emplearon los aminoácidos con mayor ocurrencia en esa posición; por ejemplo, con base a lo reportado (Sunagar et al., 2013), identificamos la región que va de la segunda a la sexta cisteína, la cual es la más conservada dentro de las toxinas de cadena larga, y un par de aminoácidos anteriores y posteriores a esta región. Así, la *Ntx1* y *LcNtx* contienen la misma secuencia; mientras que dicha región, en la *Ntx2*, está presente de la tercera a la séptima cisteína (**Figura 6**). En dicha región, la secuencia presenta una indeterminación, en la cual deliberadamente empleamos leucina para las *Ntx1* y *LcNtx*, y valina para la *Ntx2*: la leucina es ligeramente

más inmunogénica que la valina (Kolaskar and Tongaonkar, 1990). Además, todas nuestras toxinas contienen los aminoácidos que han sido reportados como esenciales para su función; por ejemplo, la arginina 36 (R36) (Samson et al., 2002), el triptófano que precede a la cuarta cisteína, lisinas cercanas a la posición 26 y 38, y alanina después de la sexta cisteína (Kim and Tamiya, 1981).

9.1 Particularidades de las toxinas consenso *Ntx1*, *Ntx2* y *LcNtx*

La *Ntx1* tiene una secuencia de 76 aminoácidos. Se generó seleccionando los aminoácidos más inmunogénicos para ocupar las indeterminaciones presentes en la secuencia denominada *consensus*; asimismo, en posiciones clave se sustituyeron los aminoácidos *consensus* por V2, H4, V14, Y54 y E55, con base en el argumento planteado por Kolaskar y Flower, en donde demuestran que en la mayoría de casos esos aminoácidos, cuando están cercanos a cisteínas, lisinas e isoleucinas, pueden dirigir la respuesta inmune a esos sitios (Flower, 2013).

Con el fin de tener una proteína que tuviera todas las regiones, no sólo de las α -neurotoxinas de cadena larga, pero también de algunas otras reportadas para la familia de toxinas de tres dedos, generamos la secuencia *Ntx2*. Por consiguiente, su secuencia es la que más difiere con respecto a la *Ntx1* y *LcNtx*, ya que contiene 87 residuos de aminoácidos: los primeros diez son comunes a todas las toxinas de tres dedos descritas (ver **2.1 familia de las toxinas de tres dedos**), es por ello que a partir de la valina 11, su secuencia concuerda con la valina 2 de la *NTX1*; adicionalmente, la parte carboxilo terminal comprende toda la secuencia *consensus* propuesta.

La *LcNtx*, por su parte, abarca la secuencia *consensus* y, en aquellos sitios indeterminados, los aminoácidos con mayor presencia que cumplen con los criterios del método ya mencionado. Por otra parte, está reportado que la región amino terminal en las α -neurotoxinas de cadena larga se relaciona (en secuencia) con un grupo de toxina denominadas “débiles” (Nirthanan et al., 2003), y que dicha región (más allá de la última cisteína, C65) puede ser sitio de modificaciones postraduccionales (Roy et al., 2010) que regulan su toxicidad. Otros reportes sugieren que esa región se perderá en el proceso de evolución (Li et al., 2006). También, existen otros reportes en donde se ha demostrado plenamente que la región carboxilo terminal de las α -neurotoxinas de cadena larga no tiene ningún papel importante en la unión al receptor (Bourne et al., 2005b; Fruchart-Gaillard et al., 2012); por ello, en el estudio y diseño de la *LcNtx* decidimos prescindir de la región que sigue de la asparagina 66 (N66) (**Tabla 7**).

Las toxinas *Ntx1*, *NtxII* y *LcNtx* pudieron expresarse en *E. coli*; aun así, la cantidad de proteína que se obtuvo fue pobre. Las cepas M15, BL21, XL1 BLUE y

Origami y SHuffle T7, presentan un perfil de expresión similar: baja expresión en su forma soluble y agregación de la proteína en forma de cuerpos de inclusión. Los métodos reportados en la literatura para la obtención, purificación y plegamiento de proteínas a partir de cuerpos de inclusión (Berndt et al., 2008; Gao et al., 2013; Lyukmanova et al., 2007; Peternel and Komel, 2011; Peternel et al., 2008) requieren cantidades de material por encima de lo que hemos producido hasta el momento, por ello no se han podido emplear hasta la escritura formal de esta tesis. No obstante, como perspectiva, una estrategia viable será probar algunos otros vectores de expresión (Terpe, 2006; Wang et al., 2002), otros sistemas biológicos (Lebendiker and Danieli, 2014) o emplear herramientas alternas (Fruchart-Gaillard et al., 2012; Naimuddin et al., 2011) que nos permita obtener las *Ntx1* y *Ntx2* en cantidades suficientes para estudiarlas y caracterizarlas plenamente. La toxina *LcNtx*, por su parte, se expresa en mayor concentración que sus homólogas consenso en Origami y SHuffle T7; por lo tanto, será posible, primeramente, emplear metodologías que nos permitan mejorar y escalar el bioproceso (Ren et al., 2016); y, en segundo término, una vez conseguida la sobre expresión, será factible emplear la metodología previamente descrita para extraer proteína funcional de cuerpos de inclusión, y poder así estudiar sus propiedades bioquímicas, farmacológicas e inmunogénicas.

9.2 Péptidos sintéticos

Las regiones más conservadas de las α -neurotoxinas de cadena larga que sintetizamos y denominamos como *LcP1* y *LcP2*, tuvieron la capacidad de generar anticuerpos en conejo. Los péptidos dirigieron la respuesta inmune adaptativa de los animales: según la literatura, en primer lugar, por el sistema principal histocompatibilidad de la células presentadoras de antígeno y, posteriormente, mediante las retroalimentación de células B de memoria-plasmáticas (Korber et al., 2006). De acuerdo al tamaño de nuestros péptidos, el sistema principal de histocompatibilidad clase II fue el que jugó el papel central en la presentación de los antígenos (Doytchinova et al., 2004), y las células B de memoria las encargadas de producir, a lo largo del esquema de inmunización, anticuerpos con un aumento en su afinidad. Lo anterior fue comprobado por la producción en conejos de anticuerpos específicos que fueron detectados a partir de la segunda semana (**Grafica 1 y 2**). Nuestros resultados mostrados en la presente tesis son congruentes con lo reportado en la literatura, en donde se establece que la respuesta inmune humoral se incrementa considerablemente, y de manera específica, a partir de la segunda semana hacia un antígeno determinado (Sage and Sharpe, 2016).

El suero no tuvo efecto terapéutico contra la fracción IV de *Micrurus tener* (**Grafica 4**), lo cual es comprensible ya que los péptidos *LcP1* y *LcP2* provienen de un consenso de secuencias de toxinas de cadena larga, y la fracción IV contiene una α -

neurotoxina de cadena corta (calderón-corona, datos no publicados). Lo cual indica que no existe reactividad cruzada entre las toxinas de cadena corta con las de cadena larga en el tenor de las secuencias *LcP1* y *LcP2*, en ensayos de neutralización de la letalidad.

El veneno de *Naja haje* contiene componentes enzimáticos y una amplia gama de 3FTXs. Citotoxinas, cardiotoxinas y otras toxinas de cadena corta son los péptidos más abundantes (Kornhauser et al., 2013; Malih et al., 2014). En algunas subespecies de *Naja haje*, la complejidad de la composición del veneno explica ciertas manifestaciones clínicas, como la miotoxicidad (Mebs, 1986) y la neurotoxicidad (Karam et al., 2015). Los sueros producidos contra la región más conservada en las α -neurotoxinas de cadena larga anulan el efecto tóxico de este tipo de neurotoxinas, pero resultan parcialmente efectivas, principalmente por la acción de otros componentes como PLA2, neurotoxinas tipo I y cardiotoxinas (**Grafica 3 y 7**) (Malih et al., 2014). Por lo tanto, nuestros resultados indican que la letalidad del veneno de *Naja haje* es impulsada en menor medida por las α -neurotoxinas de cadena larga, permitiendo a los otros componentes ejercer su función. Cabe señalar que el antiveneno comercial específico es desarrollado a partir del veneno completo de esta especie. Por tanto, los estudios encaminados al desarrollo de un antiveneno con base en toxinas recombinantes contra *N. haje*, deberán centrarse en otras proteínas clave, ya sean únicas o múltiples; por ejemplo, en las α -neurotoxinas de cadena corta.

El veneno de *Dendroaspis polylepis*, por su parte, produce neurotoxicidad aguda. Se sabe que su veneno es rico en toxinas con actividad sobre canales iónicos de potasio Kv, de calcio Cav de tipo L, canales iónicos ácido-sensibles (ASIC) (Mourier et al., 2016; Salinas et al., 2014) y receptores colinérgicos (Fruchart-Gaillard et al., 2012); sin embargo, sólo los miembros de la familia de toxinas de tres dedos como las tipo Kunitz (dendrotoxinas), las elapidotoxinas y las α -neurotoxinas, debido a su abundancia y alta toxicidad, respectivamente, son los principales blancos para el desarrollo de un antiveneno efectivo. Los péptidos consenso, *LcP1* y *LcP2*, comparten una alta identidad con la región funcional de las elapidotoxinas (por ejemplo: P01379, ~ 80%) descritas para el veneno de *D. polylepis*. El reconocimiento de este tipo de toxinas por el *anti-LcP1* demostró ser menos eficaz que el *anti-LcP2*, como puede verse en las **Gráficas 5 y 8**. Laustsen y colaboradores han sugerido que la toxicidad de las elapidotoxinas pueden jugar un papel crucial en la letalidad del veneno de *D. polylepis*; como consecuencia, la neutralización parcial de estas toxinas por nuestros antisueros produce una actividad letal remanente de un veneno libre de elapidotoxinas que probablemente dejaría a la neurotoxina 1 (P01416: neurotoxina de cadena corta) -demostrada ser el componente más tóxico de este veneno (Laustsen et al., 2015c),- llevar a cabo el proceso de envenenamiento. Por lo tanto, un suero anti-neurotoxina 1, combinado con nuestro *anti-LcP2*, podría dar como resultado un antisuero altamente efectivo.

La cobra real (*Ophiophagus hannah*) es una de las serpientes venenosas mejor caracterizadas debido a su amplia distribución en muchos países de Asia, especialmente en aquellas regiones altamente pobladas (Vonk et al., 2013). Los estudios transcriptómicos y proteómicos relacionados a la composición de su veneno, postulan a las 3FTX como la familia de toxinas con mayor tasa de traducción (Petras et al., 2015). Primeramente, las α -neurotoxinas de cadena larga son las mejores representantes de la familia, seguidas por las α -neurotoxinas de cadena corta y las neurotoxinas débiles (Tan et al., 2015a). Los péptidos *LcP1* y *LcP2* contienen una secuencia homóloga situada en la región más conservada de la α -neurotoxina de cadena larga más abundante, OH-55 (Q53B58) y sus proteoformas (Melani et al., 2016). Por lo tanto, los anticuerpos generados contra esta región logran eliminar el papel letal de esta toxina de una manera dosis dependiente, ya que según se observa en las **Gráficas 6 y 9**, la sobrevivencia es directamente proporcional al volumen de antisuero empleado. No obstante, la evidencia proteómica sugiere que otros miembros de la familia 3FTx pueden estar desempeñando un papel funcional en el envenenamiento: principalmente α -neurotoxinas de cadena corta, toxinas muscarínicas, citotoxinas / cardiotoxinas. Además, otras actividades como las enzimáticas ejercidas por las PLA2 y metaloproteinasas Zn^{+2} dependientes, también pueden ser protagónicas en el proceso de envenenamiento (Gutiérrez et al., 2016).

9.3 Toxina consenso de cadena corta: *ScNtx*.

Las α -neurotoxinas de cadena corta más tóxicas descritas para los venenos de las serpientes de importancia médica (**Figura 7**), sirvieron como modelo para el diseño de la α -neurotoxina de secuencia consenso denominada *ScNtx* (**Tabla 8**). Como antecedente, en términos de estabilidad, las α -neurotoxinas de cadena corta contienen 4 puentes disulfuro, típicamente formados por las Cys3–Cys24, Cys17–Cys41, Cys43–Cys54 y Cys55–Cys60. En consecuencia, y además, tomando en cuenta la información descrita en la sección de **Introducción**, la toxina *ScNtx* incluye un arreglo similar de residuos de Cys, como rasgo estructural, que ayuda a compactar la región “core”. Considerando que prescindimos de dos amino ácidos entre la región que va de la Cys² a la Cys³, la *ScNtx* presenta el siguiente arreglo: Cys3–Cys22, Cys17–Cys39, Cys41–Cys52 y Cys53–Cys58. Dejando en el “core” las secuencias : SETS, CGC y RTDK, que le otorgan dos cargas negativas a esta región. Por otra parte, a la luz de la evidencia, se ha demostrado que la actividad curare-mimética de las α -neurotoxinas de cadena corta está fuertemente influenciada por la presencia de amino ácidos cargados en la región de los “loops”. Por ejemplo, se sabe que la presencia de las Lisinas 26/27 y 47, junto con la Arginina 33 son cruciales en la interacción con el nAChR; cuando se han mutado dichos amino ácidos (R33K/Q/E y K22E, K27E ó K47/E), la capacidad de las mutantes de interactuar con el

receptor disminuye de manera crítica (Antil et al., 1999; Pillet et al., 1993; Rosenthal et al., 1999; Samson et al., 2002), lo que repercute en cambios importantes en sus constantes de afinidad (Lesovoy et al., 2009). Por lo tanto, con respecto a la *ScNtx*, la región que corresponde al *loop I* contiene 13 residuos de amino ácidos (YNQQSSQPPTTKT), que incluye el residuo -positivamente cargado- K15; el *loop II* contiene una secuencia de 16 amino ácidos (YKKTWRDHRGTIIERG), que alberga tanto los residuos positivos K24, K25, R28, R31, R37, H30, como los negativos D29 y E36; finalmente, el *loop III* contiene 10 residuos (PKVKPGIKLH) que incluyen a los amino ácidos positivos K43, K45, K49 y H51. Es importante hacer mención el papel fundamental de la R33 (R31 en la *ScNtx*), cuyo grupo funcional es el que mimetiza el efecto del neurotransmisor acetil colina, y que ayuda a unirse al receptor y a sus subunidades (Arias, 1997), tal como se describió previamente en ***α-neurotoxinas, receptor de acetil colina y mecanismo de acción***, y que puede ser consultado en mayor detalle con el número de acceso 1Y15 en el PDB (Bourne et al., 2005a; Osaka et al., 2000; Samson et al., 2002).

Uno de las vías más avanzadas y asequibles para la producción de α -neurotoxinas provenientes de elápidos ha sido a través de la expresión heteróloga en *E. coli*. No obstante, el número de α -neurotoxinas expresadas ha sido limitado debido a su masa molecular, estructura y alto contenido de puentes disulfuro, lo que las hace propicias para agregarse en forma de cuerpos de inclusión, lo que a su vez, requiere pasos adicionales de purificación y plegamiento (Clement et al., 2016; Liukmanova et al., 2010). Estos problemas han obstaculizado su evaluación en sistemas *in vitro* e *in vivo*. En el presente trabajo hemos demostrado que la *ScNtx*, bajo cepas específicas de *E. coli* y condiciones bien establecidas y controladas, como la temperatura de inducción y el medio de cultivo MM (**Tabla 9**), se expresa de manera exitosa y bien plegada, lo cual es consistente entre su forma soluble, estructura secundaria y actividad biológica. Particularmente, la *ScNtx* presenta la estructura secundaria canónica descrita para las α -neurotoxinas: cinco hojas beta antiparalelas presentes en los tres *loops*. Los resultados de discoisismo circular en donde se comparan el espectro de absorción de la α -neurotoxina P01424 con el de la *ScNtx* demuestran lo anterior (de la Rosa et al., 2018); además, cuando es purificada mediante HPLC de fase reversa, la toxina de secuencia consenso tiene el mismo tiempo de retención que otras toxinas de cadena corta, así, se demuestra que tiene características estructurales e hidrofóbicas similares.

La toxina *ScNtx* es biológicamente activa y, como consecuencia, tóxica cuando es inyectada a ratones (3.8 $\mu\text{g}/\text{ratón}$), lo que provoca los síntomas característicos de los venenos neurotóxicos: parálisis en las extremidades y dificultades respiratorias previas a la muerte. Como se argumentó con anterioridad, mutaciones en la región del *loop II* alteran el efecto curare-mimético y la letalidad de las α -neurotoxinas estudiadas. Por lo

tanto, el efecto biológico de la *ScNtx* demuestra que contiene en su secuencia los residuos de amino ácidos importantes y la conformación espacial correcta para unirse apropiadamente al receptor muscular de acetyl colina muscular, nAChR, y antagonizarlo (Rosenthal et al., 1999; Teixeira-Clerc et al., 2002). Por lo tanto, podemos concluir que la correcta union de la *ScNtx* al receptor genera alteraciones en su fisiología que finalizan con la correcta comunicación nervio-músculo, lo que provoca debilidad muscular en los ratones, los cuales, con dosis letales, mueren debido un fallo respiratorio.

9.4 Inmunógeno recombinante: *ScNtx*

Uno de los objetivos cardinales del presente trabajo, fue determinar las propiedades inmunogénicas de la *ScNtx*. Para ello, la toxina consenso fue empleada como inmunógeno en un esquema de inmunización que empleó un grupo de 3 conejos. De acuerdo a nuestros resultados, podemos concluir que la *ScNtx* tuvo la capacidad de inducir la respuesta inmune del grupo experimental. Dicho fenómeno pudo ser determinado como títulos de anticuerpos específicos. Como puede observarse en la **Gráfica 11**, la respuesta contra el antígeno incrementó como respuesta a las dosis de *ScNtx* a lo largo del esquema de inmunización. Estimamos que dicha respuesta hacia la *ScNtx*, se debió a sus propiedades bioquímicas, a las dosis crecientes de la toxina y el uso de adyuvantes (Aimanianda et al., 2009), que comprometieron la respuesta inmune de los animales con la producción de anticuerpos específicos.

El suero colectado antes de la última inmunización, y usado para realizar ensayos de inmunodetección, fue capaz de reconocer la *ScNtx*, al igual que a otras α -neurotoxinas de cadena corta presentes el veneno de *Naja pallida*, *Dendroaspis polylepis* y *Dendroaspis viridis*: el reconocimiento fue específico, ya que no hubo detección de otros componente proteicos de masas moleculares mayores a los 15 kDa; de igual forma, el veneno de *Echis ocellatus*, que carece de toxinas de tres dedos y usado como control, no generó ninguna señal (**Figura 34**). Además, en ensayos tipo ELISA, como puede verse en la **Gráfica 14**, se pudo determinar que existe reconocimiento hacia α -neurotoxinas presentes en el veneno de una gran variedad de elápidos. Lo que apoya el concepto de la generación de una respuesta amplia hacia α -neurotoxinas presentes en el veneno de serpientes no relacionadas geográficamente.

La mezcla de los sueros de conejo *Anti-ScNtx* pudo reconocer de manera específica al inmunógeno; sin embargo, no fue capaz de neutralizar su efecto letal, pero sí atenuarlo; otro antisuero generado contra la *MlatAI* no es capaz de neutralizar ni atenuar a la *ScNtx*. Por otro lado, el suero *Anti-rD.H* es efectivo neutralizando a la toxina *ScNtx* con una dosis efectiva de 440 μ L/ratón; pero, también el suero de conejo *Anti-ScNtx* neutraliza efectivamente los efectos letales de la *rD.H*, con una mejor potencia (260

$\mu\text{L}/\text{ratón}$) que el antisuero específico *Anti-rD.H* ($330 \mu\text{L}/\text{ratón}$). Es importante hacer mención que los sueros individuales de los conejos, como puede verse en la **Tabla 10**, presentan una potencia neutralizante variable. Por ejemplo, el conejo 1 fue el único que generó una respuesta neutralizante hacia el inmunógeno *ScNtx*; y el conejo 2 tuvo la mejor potencia neutralizante con respecto a la toxina *rD.H*. De acuerdo a algunos reportes publicados en la literatura especializada, y a los trabajos realizados en nuestro laboratorio de investigación, la neutralización de venenos y toxinas provenientes de elápidos usando sueros específicos de conejo, sugieren que el modelo animal (conejo) produce una pobre respuesta neutralizante, puesto que la cantidad de reportes en donde muestren neutralización con ese tipo de sueros es casi nula (Gowtham et al., 2014; Kornhauser et al., 2013). Es importante hacer mención que en aquéllos trabajos en donde se prueban toxinas o venenos completos de elápidos, y se genera una respuesta positiva hacia ellos -en términos de producción de anticuerpos, como en nuestro caso-, no reportan ensayos de neutralización (Carbajal-Saucedo et al., 2013; Isbister et al., 2010). Por ejemplo, recientemente, en un estudio que involucró a múltiples especies de serpientes del género *Micrurus*, se demostró que los venenos pueden generar una respuesta inmune positiva en ratones, conejos y caballos; no obstante, sólo muestran resultados de neutralización con sueros de origen equino (Tanaka et al., 2016). Lo anterior, hace suponer que encontraron el mismo efecto que nosotros: atenuación de los venenos por el suero de conejo mas no neutralización de la actividad letal. Es por ello que, la evaluación más importante para determinar la efectividad de un inmunógeno para la producción de antivenenos contra elápidos deberán realizarse en equinos.

Dicho lo anterior, la *ScNtx* se empleó para la generación de sueros hiper-inmunes en equinos. En la **Gráfica 15** se puede apreciar que la respuesta de anticuerpos específicos aumentó a lo largo del esquema de inmunización. También, se puede observar que la respuesta de cada animal fue distinta -la variación individual ha sido mencionada en muy pocos estudios, pero sí observada frecuentemente en nuestro grupo de investigación (de la Rosa et al., 2012). No sólo se determinaron los títulos de anticuerpos, sino además la maduración de la respuesta a lo largo del tiempo. Para ello, las muestras de los días 98, 145 y 205 fueron utilizadas para determinar su eficacia frente a tres α -neurotoxinas: *MlatA1*, *rD.H* y *P01416*. En términos globales, la dosis efectiva media (entendida como la eficacia del antisuero de neutralizar el efecto letal de $3xLD_{50}$) mejoró con el paso del tiempo; es decir, los sueros de los días 205 y 147, fueron mejores y más efectivos que los del día 98 para cada animal. Particularmente, para el caso del caballo 2, que tuvo una respuesta mayor de anticuerpos, se pudo constatar que existe una maduración de la respuesta humoral, ya que la relación entre el título y su eficacia no fue directamente proporcional. Dicho de otra forma, la potencia neutralizante mejoró en promedio 4 veces del día 98 al 147, a pesar que la última fecha presenta un título de anticuerpos menor. Esta observación es apoyada en el hecho de que la respuesta inmune

basada en anticuerpos va siendo cada vez menor, mientras que la afinidad y, en su caso, la potencia neutralizante va aumentando (Richard et al., 2013).

9.5 Antiveneno experimental

Con base en el suero del caballo 2, el cual presentó la mejor potencia neutralizante, se desarrolló un antiveneno experimental (AVE). Para ello, se purificaron las inmunoglobulinas de las muestras de los días 147 y 205, mediante un método ya estandarizado para precipitar proteínas séricas y mantener la fracción de inmunoglobulinas en solución (Rojas et al., 1994). Finalmente, es importante mencionar que el contenido proteico de nuestro AVE fue de 50 mg/ml, el cual es una solución de inmunoglobulinas completas, principalmente del tipo IgG.

El primer objetivo fue determinar la potencia neutralizante del AVE frente a las α -neurotoxinas purificadas ya descritas en la presente tesis. Primeramente, el inmunógeno *ScNtx* fue neutralizado de manera específica, con una $DE_{50} = 49.1 \mu\text{L}/\text{ratón}$, lo que se traduce en 230 μg de *ScNtx* neutralizados por 1 mL de AVE. Para el caso de la *MlatAI* 45.1 $\mu\text{L}/\text{ratón}$ (1.2 mg/ mL AVE); *r.D.H* 31.7 $\mu\text{L}/\text{ratón}$ ó 280 μg de toxina neutralizada por 1 mL de AVE; y finalmente, la DE_{50} para la toxina *P01424* fue de 34.3 $\mu\text{L}/\text{ratón}$ (170 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AVE). Los valores descritos indican que existen epítopes que están compartidos dentro de las 4 toxinas empleadas, y que además, de acuerdo a la literatura, se encuentra en la región que corresponde al Loop II (Engmark et al., 2017), el cual está altamente conservado en las 4 toxinas empleadas. En la **Tabla 12** se encuentran estos valores y los correspondientes a los venenos neurotóxicos de serpientes del género *Micrurus*, *Dendroaspis*, *Naja*, *Ophiophagus*, *Pelamis* y *Walterinnesia*. A continuación, se discuten dichos resultados.

Gracias a una diversidad de estudios sobre la composición de los venenos, proteómicos principalmente, sabemos que existen familias proteicas que se expresan de manera diferencial en especies de serpientes del mismo género. Para el caso de las serpientes de coral – género *Micrurus*–, está bien establecido que existen dos familias principales de toxinas, PLA_2 y 3FTXs, que se expresan de manera distinta en especies de Norte América, Centro América y América del sur (ver **Figura 35**)(Sanz et al., 2016). Por ejemplo, se ha determinado que los venenos de *Micrurus fulvius* (Florida) y *Micrurus tener* (Texas) presentan predominantemente componentes de PLA_2 y en segundo lugar 3FTXs. Además, existen estudios en donde se demuestra que el principal componente causante del envenenamiento para el caso de *M. fulvius* es PLA_2 (Vergara et al., 2014). Cuando los venenos *M. fulvius* y *M. tener* fueron usados para evaluar nuestro antiveneno experimental -el cual es altamente efectivo contra α -neurotoxinas-, no hubo efecto terapéutico alguno. Lo mismo sucedió para *M. browni*, y *M. distans*; por otra parte, los

venenos de *M. laticorallis* ($DE_{50}= 171 \mu\text{L}/\text{ratón}$) y *M. diastema* ($191.5 \mu\text{L}/\text{ratón}$), sí fueron neutralizados, aunque la dosis de AVE fueron altas; no obstante, 170 y 90 μg de cada veneno, respectivamente, son neutralizado por 1 mL de AVE. Lo que indica que existe un componente de α -neurotoxinas en estos últimos venenos que sí contribuye al desarrollo del cuadro clínico y letalidad, tal y como se había sugerido en algunos estudios enfocados en el mejoramiento de antivenenos contra corales norteamericanos (Carbajal-Saucedo et al., 2013). Interesantemente, de acuerdo a estudios detallados sobre la composición proteica del veneno de *M. nigricinctus* (Centro América), podemos observar que es muy parecida a la de *M. fulvius*: predominantemente PLA_2 . Sin embargo, nuestro AVE neutraliza la letalidad de este veneno de manera efectiva y eficaz, con una $DE_{50}= 56.6 \mu\text{L}/\text{ratón}$ ($350 \mu\text{g}$ de veneno neutralizado por 1 mL de AVE), comparada con algunos AV comerciales en donde existe un rango que va de 60 hasta $123 \mu\text{L}/\text{ratón}$ (de Roodt et al., 2004). Debido a esto, inferimos que a pesar de que el componente PLA_2 es expresado predominantemente en el veneno de *M. nigricinctus*, el componente α -neurotoxina es altamente relevante. Es importante señalar que la α -neurotoxina que se expresa mayoritariamente, la P80548, que presenta una identidad del 81 % con respecto a la *ScNtx*, puede ser el blanco principal de nuestro AVE y el agente más tóxico en *M. nigricinctus* (Fernández et al., 2011). Ahora, por otro lado, *M. surinamensis*, la cual es la *Micrurus* más austral que probamos, contiene en su veneno principalmente 3FTx y carece de actividad PLA_2 (Lomonte et al., 2016). En relación directa con esto y, el argumento presentado en la justificación de la presente tesis, el veneno de *M. surinamensis* es de los más pobremente neutralizados por los antivenenos disponibles en el mercado (Tanaka et al., 2010). Este veneno es rico en α -neurotoxinas de cadena corta (para más detalle, el autor recomienda revisar a: Olamendi-Portugal et al., 2008) que presentan gran homología en secuencia con la *ScNtx*; como consecuencia, el AVE es altamente efectivo para neutralizar sus efectos letales ($DE_{50}= 51.62 \mu\text{L}/\text{ratón}$; $580 \mu\text{g}/\text{mL}$ AVE) comparado con algunos datos, en donde incluso antivenenos diseñados para corales de sur america son incapaces de neutralizarlo (de Roodt et al., 2004). Finalmente, otro veneno rico en 3FTx (~50 %) y PLA_2 (~33 %) (Lomonte et al., 2014) que fue efectivamente neutralizado por nuestro AVE, es el perteneciente a la serpiente marina *Pelamis platura*. Debido a la poca disponibilidad de material no fuimos capaces de obtener la ED_{50} ; sin embargo, pudimos determinar los valores que evocan el 0 ($40 \mu\text{L}/\text{ratón}$) y 100 % ($66 \mu\text{L}/\text{ratón}$) de sobrevivencia, lo cual nos hace afirmar que es plenamente neutralizado. La pelamitoxina (α -neurotoxina más abundante y letal; ID: P62388) y proteoformas de ella, debido a su alta identidad con la *ScNtx*, nos permite postularlos como los blancos hacia el cual están actuando los anticuerpos *anti-ScNtx*.

El género *Naja* (cobras) es uno de los más diversos y con mayor distribución geográfica. En las **Figuras 37-41** mostramos la distribución de las especies de cobras empleadas en la presente tesis. Así como varía su hábitat, igualmente diverso es la

composicion de su veneno a nivel inter e intra especie (Panagides et al., 2017). No obstante, se han reportado familias proteicas que se encuentran plenamente distribuidas en el género: 3FTx, PLA₂ metaloproteásas de veneno de serpiente (SVMPs), proteínas de secreción ricas en cisteina (CRISP), oxidasas de L-amino ácidos (LAAO) (Claramente ilustrado por Tasoulis and Isbister, 2017). En terminos globales, como era de esperarse, nuestro AVe fue efectivo neutralizando aquéllos venenos ricos en 3FTx y cuya concentración de α -neurotoxinas tipo I es importante. Está descrito, por ejemplo, que las serpientes pertenecientes al grupo de las conocidas como *Najas* escupidoras o cobras escupidoras presentan un arsenal de toxinas muy amplio, dentro del cual destaca la superfamilia de 3FTx, PLA₂ y SVMPs, principalmente; y que generan cuadros clínicos neurotóxicos acompañados, en la mayoría de casos, por lesiones locales importantes (Calvete et al., 2014). Esto apoya nuestras observaciones, ya que el AVe no tuvo ningún efecto terapéutico sobre el veneno de las cobras escupidoras *Naja nigricollis*, *N. pallida* y *N. mossambica*; sin embargo, sí para *N. nubiae* (DE₅₀= 173 μ L/ratón; 140 μ g/mL AVe). Para el primer grupo de venenos, a pesar de que estan compuestos principalmente de 3FTXs, las toxinas predominantes de su veneno son cytotoxinas/cardiotoxinas (Dubovskii and Utkin, 2014; Torres et al., 2003), seguidos por PLA₂ y SVMPs, lo cual explica la inocuidad de nuestro AVe sobre ellos y correlaciona con los cuadros clinicos reportados, en donde el envenenamiento causa daño local y hemorragias. Por otro lado, el veneno *N. nubiae* presenta, además de los componentes antes mencionados, un componente predominante de α -neurotoxina de cadena corta (para mas detalle ver: Petras et al., 2011), el cual al ser neutralizado nos muestra su papel en la letalidad global del veneno. Además, cuando comparamos las DL₅₀s de los 4 venenos, observamos que *N. nubiae* es por mucho el más letal (DL₅₀=8.3 μ g/ratón), inclusive comparable con el grupo de las Cobras no-escupidoras. Esto corrobora el papel de las α -neurotoxinas en la potencia de los venenos.

Las cobras que pertenecen al grupo de las no-escupidoras, por su parte, son más letales y además, mejor neutralizadas por el AVe. El veneno de la cobra egipcia, *Naja haje*, a pesar de tener componentes componentes tóxicos como el *Cobra Venom Factor* (CVF), toxinas muscarínicas, PLA₂ miotóxicas, cardiotoxinas/citotoxinas y SVMPs, el grupo de las α -neurotoxinas (tipo I y II) parece ser el más importante debido a su relacion abundancia-toxicidad (Kock et al., 2004; Konshina et al., 2006; Malih et al., 2014; Mebs, 1986). Además, se ha observado una estrecha relación entre los componentes descritos y sus efectos farmacológicos en pacientes envenenados: inflamación local, miotoxicidad y neurotoxicidad aguda (Warrell et al., 1976). Por una parte, el repertorio de α -neurotoxinas de este veneno puede estar relacionado a su alta toxicidad (DL₅₀=0.9 μ g/ratón) y, por otro, a la capacidad del AVe de neutralizarlo, habiendose determinado una DE₅₀= 77.4 μ L/ratón, equivalente a 58 μ g de veneno neutralizado por 1 mL de AVe. Otro veneno igualmente complejo y altamente letal (DL₅₀= 6.5 μ g/ratón), que ha sido

empleado, junto con el de *Naja haje*, para el desarrollo de antivenenos polyvalentes, es el de *Naja melanoleuca* (Ramos-Cerrillo et al., 2008). Este veneno fue efectivamente neutralizado por el AVe ($DE_{50} = 72.3 \mu\text{L}/\text{ratón}$; $270 \mu\text{g}/\text{mL AVe}$). Sabemos que es rico en 3FTXs (57.1 %) y PLA₂ (12.9%) (Lauridsen et al., 2017); sin embargo, dentro del grupo de las 3FTXs, existen componentes del tipo α -neurotoxina, como la P01424 ($DL_{50} = 0.9 \mu\text{g}/\text{ratón}$), que influyen enormemente en su letalidad y que son efectivamente reconocidos por los anticuerpos *anti-ScNtx*. Otro veneno rico en 3FTXs (63.8%) es el de *Naja naja* (India) (Dutta et al., 2017). A pesar de las variaciones importantes en su composición debido a condiciones geográficas (Shashidharamurthy et al., 2002), el veneno contiene moléculas y actividades enzimáticas comunes -intra especie- que han sido relacionadas directamente con los cuadros clínicos en situaciones de envenenamiento: miotoxicidad, necrosis, hipotensión y daños locales en el sitio de la mordedura (Choudhury et al., 2017; Gutiérrez et al., 2016; Kini, 2006). No obstante, la neurotoxicidad severa es el principal y más importante de ellos (Sintiprungrat et al., 2016), por lo tanto, cuando los agentes protagónicos -llámese α -neurotoxinas tipo I, principalmente- son neutralizado por el AVe, se logra tener un efecto terapéutico importante ($DE_{50} = 65.5 \mu\text{L}/\text{ratón}$; $430 \mu\text{g}/\text{mL AVe}$). Otro veneno altamente neurotóxico, cuya composición es predominantemente 3FTx (56-78%), es el de la cobra asiática *Naja kaouthia* (Tasoulis and Isbister, 2017). A pesar de tener un componente proteico importante de PLA₂ y generar destrucción local del tejido, los resultados indican que su letalidad está dirigida principalmente por α -neurotoxinas del tipo II (por ejemplo, la toxina P01391) y el repertorio de citotoxinas (Feofanov et al., 2004; Laustsen et al., 2015a). Debido al hecho de que son muy abundantes y altamente letales, se han propuesto que estos dos componentes pudieran ser los blancos terapéuticos ideales para el desarrollo de antivenenos (Tan et al., 2016). Sin embargo, en el presente trabajo demostramos que nuestro AVe dirigido contra α -neurotoxinas de cadena corta (como la α -cobratoxin), puede ser un inmunógeno altamente efectivo contra la letalidad de este veneno ($DE_{50} = 50 \mu\text{L}/\text{ratón}$; $230 \mu\text{g}/\text{mL AVe}$). Además, dichos resultados promueven un estudio más detallado sobre la capacidad de nuestro AVe de reaccionar de manera para-específica (reactividad cruzada) con las α -neurotoxinas de cadena larga y algunas citotoxinas. Por ejemplo, las mejores potencias de neutralización fueron obtenidas usando de reto el veneno de *Naja atra* y *Naja nivea*, que contienen predominantemente citotoxinas/cardiotoxinas (Kao et al., 2010, 2012; Kfir et al., 1985), α -neurotoxinas tipo I, y en segundo plano PLA₂. Al igual que con *N. kaouthia*, el AVe anti- α -neurotoxina tipo I fue capaz de neutralizar el efecto lethal del *N. atra* (3FTx 84 %), con una $DE_{50} = 37.5 \mu\text{L}/\text{ratón}$ que equivale a neutralizar $640 \mu\text{g}/\text{mL AVe}$. Se han descrito actividades importantes para este veneno como citotoxicidad/cardiotoxicidad, inclusive las cardiotoxinas aisladas de él, como las del grupo CTXs, han servido de modelo para entender mejor su estructura (Kao et al., 2010; Ling et al., 1996). Así mismo, había sido postulado que las α -neurotoxinas de cadena corta (por ejemplo, atratoxinas) y toxinas

muscarínicas también podría ser importantes en el desarrollo del cuadro clínico causado por el su envenenamiento (Shan et al., 2016). De la misma forma, el veneno de *N. nivea* presenta actividades cardiotoxicas y miotóxica importantes, entre otras (Botes and Viljoen, 1976; Hokama et al., 1976; Mebs, 1986). Sin embargo, de acuerdo a los cuadros clínicos reportados, la parálisis neuromuscular severa sugiere que componentes las actividades curare-miméticas son las trasendentales (Loots et al., 1973). Por lo tanto, cuando estas actividades son abolidas por los anticuerpos de nuestro AVE con una $DE_{50} = 25.0 \mu\text{L}/\text{ratón}$ ($900 \mu\text{g}/\text{mL}$ AVE), nos revela el papel de las α -neurotoxinas versus los otros componentes descritos.

Las serpientes del género *Dendroaspis* tienen una enorme distribución en el continente africano, como se muestra en **Figura 36**. Estas serpientes son popularmente conocidas como mambas, y contienen en su veneno una gran diversidad de toxinas actuando en todos los niveles en la comunicación neuromuscular (Petras et al., 2016). En términos globales, el envenenamiento causado por la mordedura de estas serpientes produce neurotoxicidad aguda sin daños locales reportados (Ranawaka et al., 2013). Se sabe que su veneno es rico en toxinas con actividad sobre canales iónicos de potasio Kv, de calcio Cav de tipo L, canales iónicos ácido-sensibles (ASIC) (Diochot et al., 2016; Mourier et al., 2016; Salinas et al., 2014), receptores colinérgicos (Fruchart-Gaillard et al., 2012) y contiene, además, inhibidores de la agregación plaquetaria (Oyama and Takahashi, 2015); sin embargo, se ha dado mucho énfasis en la toxicidad que pueden generar la gran variedad de miembros de las 3FTXs, principalmente las muscarínicas, fasciculinas, α -neurotoxinas, y otras toxinas como las tipo Kunitz (dendrotoxinas) y las elapidotoxinas (Blanchet et al., 2014; Rodríguez-Ithurralde et al., 1983)(Servent et al., 2011). Esta gran diversidad de moléculas de acción rápida presentan un perfil farmacológico que culmina con la muerte. A pesar de tener α -neurotoxinas altamente letales, existen cada vez más datos que apoyan la acción sinérgica de toda la gama de neurotoxinas reportadas, y bajo el panorama de un anti- α -neurotoxinas, y dado que el efecto terapéutico es bajo para *D. angusticeps* ($DE_{50} = 178 \mu\text{L}/\text{ratón}$; $280 \mu\text{g}/\text{mL}$ AVE), *D. polylepis* ($DE_{50} = 149 \mu\text{L}/\text{ratón}$; $106.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ AVE) y nulo para *D. viridis*, podemos sugerir que la acción letal del veneno se debe al trabajo en conjunto de todos los demás componentes. Así, el desarrollo de un antiveneno altamente efectivo deberá tomar en cuenta el posible sinergismo de las toxinas presentes del veneno (Lauridsen et al., 2016).

La cobra real (*Ophiophagus hannah*) es una de las especies mejor estudiadas y mayormente distribuidas en el continente asiático (**Figura 42**). Sabemos que su veneno contiene múltiples toxinas, y que los componentes principales, al igual que muchos elápidos, recaen en la superfamilia de las 3FTXs (Vonk et al., 2013); no obstante, debido a ciertas manifestaciones clínicas sabemos que también toxinas como LAAO, SVMPs y PLA_2 causan estragos, aunque en menor medida (Tin-Myint et al., 1991). Dentro del

amplio repertorio de las 3FTxs, las α -neurotoxinas de cadena larga juegan un papel muy importante (Petras et al., 2015), ya que la inmunoterapia dirigida contra este tipo de toxinas ha demostrado ser eficaz atenuando los efectos tóxicos del veneno completo (Danpaiboon et al., 2014; de la Rosa et al., 2017); sin embargo, otros componentes, a pesar de ser menos abundantes, como las α -neurotoxinas de cadena corta, parecen ser igualmente relevantes para la letalidad del veneno (Gowtham et al., 2014; Silva et al., 2016a). Como ejemplo, nuestro trabajo confirma esta observación, ya que demostramos que la letalidad del veneno de *Ophiphagus hannah* puede ser abolida por un antiveneno generado contra una α -neurotoxina de cadena corta de secuencia consenso, con una DE_{50} de 47.9 μ L/ ratón.

El envenenamiento por la mordedura de *Walterinnesia aegyptia* (*black snake*) causa parálisis muscular y la muerte debido a paro respiratorio (Ismail et al., 1998). Su veneno carece de actividad cardiotoxica/citotóxica (Samejima et al., 1997); y es muy activo a nivel postsináptico. Las toxinas más abundantes descritas para este veneno son las α -neurotoxinas de cadena corta, PLA_2 e inhibidores de proteasas tipo Kunitz (Simon and Bdolah, 1980; Tsai et al., 2008). No obstante, solo las primeras han sido tomando en consideración, debido a su abundancia y toxicidad, como blanco para el desarrollo de un antiveneno. Por ejemplo, la toxina T_{III} (α -neurotoxina de cadea corta), la cual es el componente mayoritario en el veneno (Lee et al., 1976), se ha empleado como inmunógeno para el desarrollo de un antiveneno (Ismail et al., 2007), resultando en un producto altamente neutralizante de su letalidad -50 DL_{50}/mL Av. Comparando esto, nuestro AVe tiene una potencia similar, ya que neutraliza 53 DL_{50}/mL Av: lo cual confirma, desde la perspectiva de nuestra *ScNtx*, que la letalidad del veneno de esta especie viene gobernada por sus componentes principales, dígase α -neurotoxinas de cadena corta.

10 Conclusiones

Se concibieron 4 neurotoxinas de secuencia consenso: 3 de cadena larga y una de cadena corta. La expresión de las neurotoxinas de cadena larga *Ntx1*, *Ntx2* y *LcNtx*, bajo las condiciones evaluadas, es muy baja y en forma de cuerpos de inclusión; sin embargo, a través de los péptidos sintéticos, *LcP1* y *LcP2*, derivados de la región más conservada de ellas, pudimos evaluar el papel de las neurotoxinas de cadena larga. Los péptidos sintéticos fueron inmunogénicos y generaron anticuerpos capaces de atenuar los efectos letales del veneno de *Ophiophagus hannah* y *Dendroaspis polylepis*; además, nos permitió confirmar los epítopes importantes para la neutralización del efecto letal de las α -neurotoxinas de cadena larga.

Por otro lado, la neurotoxina recombinante de cadena corta *ScNtx*, bajo condiciones bien establecida, se expresa soluble. Es biológicamente activa y tiene una dosis letal media de 3.8 $\mu\text{g}/\text{ratón}$. Cuando es usada como inmunógeno en conejos y en caballos, los antiseros generados son capaces de neutralizar la letalidad de la *ScNtx* al igual que la de otras neurotoxinas de naturaleza homóloga. De forma sobresaliente, el antiveneno experimental basado en esta toxina de secuencia consenso, tiene la capacidad de neutralizar la letalidad de una amplia gama de venenos neurotóxicos, principalmente, aquéllos cuya letalidad se subyace en las α -neurotoxinas de cadena corta.

En conclusión, nuestros resultados arrojan luz, primordialmente, sobre los campos de la inmunología y toxicología. Por una parte, muestran la verosimilitud de usar proteínas recombinantes sintéticas con secuencias consenso como inmunógenos universales; y ayudan a desvelar el papel de las neurotoxinas de tipo I y II en el desarrollo del envenenamiento. Finalmente, el uso de inmunógenos recombinantes con secuencias consenso, como la *ScNtx*, es un enfoque innovador en el diseño de inmunógenos para desarrollar antivenenos mejor dirigidos, de amplio espectro, más eficaces, de calidad farmacológica constante, y como consecuencia, con alto valor terapéutico.

11 Bibliografía

- Aimanianda, V., Haensler, J., Lacroix-Desmazes, S., Kaveri, S. V., Bayry, J., 2009. Novel cellular and molecular mechanisms of induction of immune responses by aluminum adjuvants. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 287–95. doi:10.1016/j.tips.2009.03.005
- Aird, D.S., Villar Briones, A., Roy, C.M., Mikheyev, S.A., 2016. Polyamines as Snake Toxins and Their Probable Pharmacological Functions in Envenomation. *Toxins* . doi:10.3390/toxins8100279
- Albrand, J., Blackledge, M., Pascaud, F., Hollecker, M., Marion, D., 1995. NMR and restrained molecular dynamics study of the three-dimensional solution structure of toxin FS2, a specific blocker of the L-type calcium channel, isolated from black mamba venom. *Biochemistry* 34, 5923–5937. doi:7727450
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PS I-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389–3402. doi:10.1093/nar/25.17.3389
- Antil-Delbeke, S., Gaillard, C., Tamiya, T., Corringier, P.J., Changeux, J.P., Servent, D., Ménez, a, 2000. Molecular determinants by which a long chain toxin from snake venom interacts with the neuronal alpha 7-nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 29594–601. doi:10.1074/jbc.M909746199
- Antil, S., Servent, D., Ménez, A., 1999. Variability among the sites by which curaremimetic toxins bind to Torpedo acetylcholine receptor, as revealed by identification of the functional residues of a-cobratoxin. *J Biol Chem* 49. doi:10.1074/jbc.274.49.34851
- Ariaratnam, C.A., Sheriff, M.H.R., Theakston, R.D.G., Warrell, D.A., 2008. Distinctive epidemiologic and clinical features of common krait (*Bungarus caeruleus*) bites in Sri Lanka. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79, 458–462. doi:79/3/458 [pii]
- Arias, H.R., 1997. Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor. *Brian Res Rev* 25. doi:10.1016/S0165-0173(97)00020-9
- Arnold, B.Y.C., 2016. The snakebite fight 6–8.
- Balzer, S., Kucharova, V., Megerle, J., Lale, R., Brautaset, T., Valla, S., 2013. A comparative analysis of the properties of regulated promoter systems commonly used for recombinant gene expression in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* 12, 26. doi:10.1186/1475-2859-12-26
- Barber, C.M., Isbister, G.K., Hodgson, W.C., 2013. Alpha neurotoxins. *Toxicon* 66, 47–58. doi:10.1016/j.toxicon.2013.01.019
- Bawaskar, H.S., Bawaskar, P.H., 2015. Toxicology symposia – Review Article Snake bite poisoning 20.
- Berndt, C., Lillig, C.H., Holmgren, A., 2008. Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 641–50. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.02.003
- Bilwes, A., Rees, B., Moras, D., Ménez, R., Ménez, A., 1994. X-ray structure at 1.55 Å of toxin gamma, a cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom. Crystal packing reveals a model for insertion into membranes. *J. Mol. Biol.* 239, 122–36. doi:10.1006/jmbi.1994.1357
- Blanchet, G., Collet, G., Mourier, G., Gilles, N., Fruchart-Gaillard, C., Marcon, E., Servent, D., 2014. Polypharmacology profiles and phylogenetic analysis of three-finger toxins from mamba venom: Case of aminergic toxins. *Biochimie* 103, 109–117. doi:https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.04.009
- Bomb, B.S., Roy, S., Kumawat, D.C., Bharjatya, M., 1996. Do we need anti snake venom (ASV) for management of elapid ophitoxaemia. *J. Assoc. Physicians India* 44, 31–33.
- Botes, D.P., Viljoen, C.C., 1976. The amino acid sequence of three non-curaremimetic toxins

- from *Naja nivea* venom. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct.* 446, 1–9. doi:[https://doi.org/10.1016/0005-2795\(76\)90091-X](https://doi.org/10.1016/0005-2795(76)90091-X)
- Bourne, Y., Talley, T., Hansen, S., Taylor, P., Marchot, P., 2005a. Crystal structure of a Cbtx-AChBP complex reveals essential interactions between snake alpha-neurotoxins and nicotinic receptors. *Embo J.* 24, 1512–1522.
- Bourne, Y., Talley, T.T., Hansen, S.B., Taylor, P., Marchot, P., 2005b. Crystal structure of a Cbtx-AChBP complex reveals essential interactions between snake a-neurotoxins and nicotinic receptors. *Euro Mol Biol Org* 24. doi:[10.1038/sj.emboj.7600620](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600620)
- Bowman, W.C., 2006. Neuromuscular block. *Br. J. Pharmacol.* 147 Suppl, S277–S286. doi:[10.1038/sj.bjp.0706404](https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706404)
- Boyer, L., Degan, J., Ruha, A.-M., Mallie, J., Mangin, E., Alagón, A., 2013. Safety of intravenous equine F(ab')₂: insights following clinical trials involving 1534 recipients of scorpion antivenom. *Toxicon* 76, 386–93. doi:[10.1016/j.toxicon.2013.07.017](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.07.017)
- Boyer, L. V., Theodorou, A. a, Berg, R. a, Mallie, J., Chávez-Méndez, A., García-Ubbelohde, W., Hardiman, S., Alagón, A., 2009. Antivenom for Critically Ill Children with Neurotoxicity from Scorpion Stings. *N. Engl. J. Med.* 360, 2090–2098. doi:[10.1056/NEJMoa0808455](https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808455)
- Bucaretschi, F., De Capitani, E.M., Vieira, R.J., Rodrigues, C.K., Zannin, M., Da Silva, N.J., Casais-e-Silva, L.L., Hyslop, S., 2016. Coral snake bites (*Micrurus* spp.) in Brazil: a review of literature reports. *Clin. Toxicol.* 54, 222–234. doi:[10.3109/15563650.2015.1135337](https://doi.org/10.3109/15563650.2015.1135337)
- Calmette, a, 1896. The Treatment of Animals Poisoned with Snake Venom by the Injection of Antivenomous Serum. *Br. Med. J.* 2, 399–400. doi:[10.1136/bmj.2.1859.399](https://doi.org/10.1136/bmj.2.1859.399)
- Calmette, A., 1897. Sur le venin des serpents et sur l'emploi du sérum antivenimeux dans la thérapeutique des morsures venimeuses chez l'homme et chez les animaux ". *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*. 214–237.
- Calmette, A., 1894. Contribution à l'étude du venin des serpents. Immunisation des animaux et traitement de l'envenimation. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*. 275–291. doi:[10.1021/bi970195w](https://doi.org/10.1021/bi970195w)
- Calvete, J., Sanz, L., Pla, D., Lomonte, B., Gutiérrez, J., 2014. Omics Meets Biology: Application to the Design and Preclinical Assessment of Antivenoms. *Toxins (Basel)*. 6, 3388–3405. doi:[10.3390/toxins6123388](https://doi.org/10.3390/toxins6123388)
- Calvete, J.J., 2013. Snake venomomics: from the inventory of toxins to biology. *Toxicon* 75, 44–62. doi:[10.1016/j.toxicon.2013.03.020](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.03.020)
- Calvete, J.J., 2011. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. *Expert Rev. Proteomics* 8, 739–758. doi:[10.1586/epr.11.61](https://doi.org/10.1586/epr.11.61)
- Campbell, J.A., Lamar, W.W., 2004. *The venomous Reptiles of the Western Hemisphere*, Cornell University Presss. Comstock Publishing Associates. doi:[23679855](https://doi.org/10.2367/9855)
- Carbajal-Saucedo, A., López-Vera, E., Bénard-Valle, M., Smith, E.N., Zamudio, F., de Roodt, A.R., Olvera-Rodríguez, A., 2013. Isolation, characterization, cloning and expression of an alpha-neurotoxin from the venom of the Mexican coral snake *Micrurus laticollaris* (Squamata: Elapidae). *Toxicon* 66, 64–74. doi:[10.1016/j.toxicon.2013.02.006](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.02.006)
- Changeux, J.P., Kasai, M., Lee, C.Y., 1970. Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 67, 1241–7. doi:[10.1073/pnas.67.3.1241](https://doi.org/10.1073/pnas.67.3.1241)
- Chippaux, J.-P., 2011. Estimate of the burden of snakebites in sub-Saharan Africa: a meta-analytic approach. *Toxicon* 57, 586–99. doi:[10.1016/j.toxicon.2010.12.022](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.12.022)
- Chippaux, J.-P., 2010. [Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins]. *Biol. Aujourd'hui*. 204, 87–91. doi:[10.1051/jbio/2009043](https://doi.org/10.1051/jbio/2009043)
- Chippaux, J.-P., Massougoudji, A., Diouf, A., Baldé, C.M., Boyer, L. V, 2015. Snake bites and antivenom shortage in Africa. *Lancet* 386, 2252–2253. doi:[10.1016/S0140-](https://doi.org/10.1016/S0140-)

6736(15)01104-6

- Choudhury, M., McCleary, R.J.R., Keshewani, M., Kini, R.M., Velmurugan, D., 2017. Comparison of proteomic profiles of the venoms of two of the 'Big Four' snakes of India, the Indian cobra (*Naja naja*) and the common krait (*Bungarus caeruleus*), and analyses of their toxins. *Toxicon* 135, 33–42. doi:10.1016/j.toxicon.2017.06.005
- Clement, H., Flores, V., De la Rosa, G., Zamudio, F., Alagon, A., Corzo, G., 2016. Heterologous expression, protein folding and antibody recognition of a neurotoxin from the Mexican coral snake *Micrurus laticorallus*. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 22, 25. doi:10.1186/s40409-016-0080-9
- CS, K., LS, V.M., 1987. Envenomation by the eastern coral snake (*micrurus fulvius fulvius*): A study of 39 victims. *JAMA* 258, 1615–1618.
- Danpaiboon, W., Reamtong, O., Sookrung, N., Seesuy, W., Sakolvaree, Y., Thanongsaksrikul, J., Dong-din-on, F., Srimanote, P., Thueng-in, K., Chaicumpa, W., 2014. Ophiophagus hannah Venom: Proteome, Components Bound by *Naja kaouthia* Antivenin and Neutralization by *N. kaouthia* Neurotoxin-Specific Human ScFv. *Toxins (Basel)*. 6, 1526–1558. doi:10.3390/toxins6051526
- Davletov, B., Montecucco, C., 2010. Lipid function at synapses. *Curr. Opin. Neurobiol.* 20, 543–549. doi:10.1016/j.conb.2010.06.008
- de la Rosa, G., Corrales-García, L.L., Rodríguez-Ruiz, X., López-Vera, E., Corzo, G., 2018. Short-chain consensus alpha-neurotoxin: a synthetic 60-mer peptide with generic traits and enhanced immunogenic properties. *Amino Acids*. doi:10.1007/s00726-018-2556-0
- de la Rosa, G., Olvera, C., Alagón, A., Cruz, E., Alagón, A., 2012. 248. Venomous Mixtures, Gamma Irradiation and Antivipmyn Africa®. *Toxicon* 60, 223–224. doi:10.1016/j.toxicon.2012.04.249
- de la Rosa, G., Pastor, N., Alagón, A., Corzo, G., 2017. Synthetic peptide antigens derived from long-chain alpha-neurotoxins: Immunogenicity effect against elapid venoms. *Peptides* 88, 80–86. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2016.12.006
- de Roodt, A.R., Paniagua-Solis, J.F., Dolab, J. a, Estévez-Ramírez, J., Ramos-Cerrillo, B., Litwin, S., Dokmetjian, J.C., Alagón, A., 2004. Effectiveness of two common antivenoms for North, Central, and South American *Micrurus* envenomations. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 42, 171–178. doi:10.1081/clt-120030943
- Diochot, S., Alloui, A., Rodrigues, P., Dauvois, M., Friend, V., Aissouni, Y., Eschaliér, A., Lingueglia, E., Baron, A., 2016. Analgesic effects of mambalgins peptide inhibitors of acid-sensing ion channels in inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 157, 552–559. doi:10.1097/j.pain.0000000000000397
- Dixon, R.W., Harris, J.B., 1999. Nerve terminal damage by β -bungarotoxin. *Am. J. Pathol.* 154, 447–455. doi:10.1016/S0002-9440(10)65291-1
- Doytchinova, I.A., Walshe, V.A., Jones, N.A., Gloster, S.E., Borrow, P., Flower, D.R., 2004. Coupling In Silico and In Vitro Analysis of Peptide-MHC Binding: A Bioinformatic Approach Enabling Prediction of Superbinding Peptides and Anchorless Epitopes. *J. Immunol.* 172, 7495–7502. doi:10.4049/jimmunol.172.12.7495
- Dubovskii, P. V., Lesovoy, D.M., Dubinnyi, M. a, Konshina, A.G., Utkin, Y.N., Efremov, R.G., Arseniev, A.S., 2005. Interaction of three-finger toxins with phospholipid membranes: comparison of S- and P-type cytotoxins. *Biochem. J.* 387, 807–815. doi:10.1042/BJ20041814
- Dubovskii, P. V., Utkin, Y.N., 2014. Cobra Cytotoxins: Structural Organization and Antibacterial Activity. *Acta Naturae* 6, 11–18.
- Dufton, M.J., 1984. Classification of elapid snake neurotoxins and cytotoxins according to chain length: Evolutionary implications. *J. Mol. Evol.* 20, 128–134. doi:10.1007/BF02257373

- Dutta, S., Chanda, A., Kalita, B., Islam, T., Patra, A., Mukherjee, A.K., 2017. Proteomic analysis to unravel the complex venom proteome of eastern India *Naja naja*: Correlation of venom composition with its biochemical and pharmacological properties. *J. Proteomics* 156, 29–39. doi:10.1016/j.jprot.2016.12.018
- Engmark, M., Jespersen, M.C., Lomonte, B., Lund, O., Laustsen, A.H., 2017. High-density peptide microarray exploration of the antibody response in a rabbit immunized with a neurotoxic venom fraction. *Toxicon* 138, 151–158. doi:10.1016/j.toxicon.2017.08.028
- Feofanov, A. V., Sharonov, G. V., Dubinnyi, M.A., Astapova, M. V., Kudelina, I.A., Dubovskii, P. V., Rodionov, D.I., Utkin, Y.N., Arseniev, A.S., 2004. Comparative study of structure and activity of cytotoxins from venom of the cobras *Naja oxiana*, *Naja kaouthia*, and *Naja haje*. *Biochem.* 69, 1148–1157. doi:10.1023/B:BIRY.0000046890.46901.7e
- Fernández, J., Alape-Girón, A., Angulo, Y., Sanz, L., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., Lomonte, B., 2011. Venomic and antivenomic analyses of the Central American coral snake, *Micrurus nigrocinctus* (Elapidae). *J. Proteome Res.* 10, 1816–1827. doi:10.1021/pr101091a
- Flower, D.R., 2013. Designing immunogenic peptides. *Nat. Chem. Biol.* 9, 749–753. doi:10.1038/nchembio.1383
- Friebs, K., 2004. Plasmid copy number and plasmid stability. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 86, 47–82.
- Fruchart-Gaillard, C., Mourier, G., Blanchet, G., Vera, L., Gilles, N., Ménez, R., Marcon, E., Stura, E. a, Servent, D., 2012. Engineering of three-finger fold toxins creates ligands with original pharmacological profiles for muscarinic and adrenergic receptors. *PLoS One* 7, e39166. doi:10.1371/journal.pone.0039166
- Fruchart-Gaillard, C., Mourier, G., Marquer, C., Stura, E., Birdsall, N.J.M., Servent, D., 2008. Different interactions between MT7 toxin and the human muscarinic M1 receptor in its free and N-methylscopolamine-occupied states. *Mol. Pharmacol.* 74, 1554–63. doi:10.1124/mol.108.050773
- Fuenzalida, M., Perez, M.A., Arias, H.R., 2016. Role of Nicotinic and Muscarinic Receptors on Synaptic Plasticity and Neurological Diseases. *Curr. Pharm. Des.*
- Gao, B., Zhangsun, D., Wu, Y., Lin, B., Zhu, X., Luo, S., 2013. Expression, renaturation and biological activity of recombinant conotoxin GeXIVAWT. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 1223–30. doi:10.1007/s00253-012-4287-6
- Georgiou, G., Segatori, L., 2005. Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 538–45. doi:10.1016/j.copbio.2005.07.008
- Gilquin, B., Bourgoin, M., Ménez, R., Le Du, M.-H., Servent, D., Zinn-Justin, S., Ménez, A., 2003. Motions and structural variability within toxins: implication for their use as scaffolds for protein engineering. *Protein Sci.* 12, 266–277. doi:10.1110/ps.0227703
- Gowtham, Y.J., Mahadeswaraswamy, Y.H., Girish, K.S., Kemparaju, K., 2014. Cross-reactivity and neutralization of Indian King cobra (*Ophiophagus hannah*) venom by polyvalent and monovalent antivenoms. *Int. Immunopharmacol.* 21, 148–155. doi:10.1016/j.intimp.2014.04.012
- Groleau, M., Kang, J. Il, Hupp??-Gourgues, F., Vaucher, E., 2015. Distribution and effects of the muscarinic receptor subtypes in the primary visual cortex. *Front. Synaptic Neurosci.* 7, 1–9. doi:10.3389/fnsyn.2015.00010
- Gutiérrez, J., Escalante, T., Rucavado, A., Herrera, C., 2016. Hemorrhage Caused by Snake Venom Metalloproteinases: A Journey of Discovery and Understanding. *Toxins (Basel)*. doi:10.3390/toxins8040093
- Gutiérrez, J.M., León, G., Lomonte, B., Angulo, Y., 2011. Antivenoms for snakebite envenomings. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 10, 369–380.

- doi:10.2174/187152811797200669
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2013. Phospholipases A2: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon* 62, 27–39. doi:10.1016/j.toxicon.2012.09.006
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., León, G., Alape-Girón, A., Flores-Díaz, M., Sanz, L., Angulo, Y., Calvete, J.J., 2009. Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *J. Proteomics* 72, 165–182. doi:10.1016/j.jprot.2009.01.008
- Gutiérrez, J.M., Theakston, R.D.G., Warrell, D. a., 2006. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: The need for a global partnership. *PLoS Med.* 3, 0727–0731. doi:10.1371/journal.pmed.0030150
- Guzman, L.L.M., Belin, D., Carson, M.J., Beckwith, J., LUZ-MARIA GUZMAN MICHAEL J. CARSON, AND JON BECKWITH, D.B., LUZ-MARIA GUZMAN MICHAEL J. CARSON, AND JON BECKWITH, D.B., 1995. Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose PBAD Promoter. *J. Bacteriol.* 177, 4121–4130.
- H.A.REID, 1964. Cobra Bites. *Br. Med. J.* 2, 540–545.
- Hamza, M., Idris, M.A., Maiyaki, M.B., Lamorde, M., Chippaux, J.-P., Warrell, D.A., Kuznik, A., Habib, A.G., 2016. Cost-Effectiveness of Antivenoms for Snakebite Envenoming in 16 Countries in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 10, e0004568.
- Harris, J.B., 2004. Animal poisons and the nervous system: what the neurologist needs to know. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 75, iii40–iii46. doi:10.1136/jnnp.2004.045724
- Hawgood, B.J., 1992. Pioneers of Anti-venomous Serotherapy: Dr Vital Brazil (1865-1950).
- Hochkoepler, A., 2013. Expanding the landscape of recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 35, 1971–1981. doi:10.1007/s10529-013-1396-y
- Hodgson, W.C., Wickramaratna, J.C., 2002. Invited Paper: Animal Toxins of Asia and Australia IN VITRO NEUROMUSCULAR ACTIVITY OF SNAKE VENOMS 807–814.
- Hokama, Y., Iwanaga, S., Tatsuki, T., Suzuki, T., 1976. Snake venom proteinase inhibitors. III. Isolation of five polypeptide inhibitors from the venoms of *Hemachatus haemachatus* (Ringhal's cobra) and *Naja nivea* (Cape cobra) and the complete amino acid sequences of two of them. *J. Biochem.* 79, 559–78.
- Hung, H.T., Höjer, J., Du, N.T., 2009. Clinical features of 60 consecutive ICU-treated patients envenomed by *Bungarus multicinctus*. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 40, 518–524.
- Isbister, G.K., O'Leary, M.A., Hagan, J., Nichols, K., Jacoby, T., Davern, K., Hodgson, W.C., Schneider, J.J., 2010. Cross-neutralisation of Australian brown snake, taipan and death adder venoms by monovalent antibodies. *Vaccine* 28, 798–802. doi:10.1016/j.vaccine.2009.10.055
- Ismail, M., Abd-Elsalam, M.A., Al-Ahaidib, M.S., 1998. Pharmacokinetics of 125I-labelled *Walterinnesia aegyptia* venom and its distribution of the venom and its toxin versus slow absorption and distribution of IGG, F(AB')₂ and F(AB) of the antivenin. *Toxicon* 36, 93–114. doi:10.1016/S0041-0101(97)00062-7
- Ismail, M., Al-Ahaidib, M.S., Abdoon, N., Abd-Elsalam, M.A., 2007. Preparation of a novel antivenom against *Atractaspis* and *Walterinnesia* venoms. *Toxicon* 49, 8–18. doi:10.1016/j.toxicon.2006.08.015
- Kao, P.-H., Lin, S.-R., Chang, L.-S., 2010. Interaction of *Naja naja atra* cardiotoxin 3 with H-trisaccharide modulates its hemolytic activity and membrane-damaging activity. *Toxicon* 55, 1387–1395. doi:10.1016/j.toxicon.2010.02.016
- Kao, P.H., Lin, S.R., Hu, W.P., Chang, L. Sen, 2012. *Naja naja atra* and *Naja nigricollis* cardiotoxins induce fusion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane-mimicking liposomes. *Toxicon* 60, 367–377. doi:10.1016/j.toxicon.2012.04.345

- Kaplan, E.L., Meier, P., 1958. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *J. Am. Stat. Assoc.* 53, 457–481. doi:10.2307/2281868
- Karam, H.M., Shaaban, E.A., Mohamed, A.F., Zaki, H.F., Kenawy, S.A., 2015. New Approach for Improving Production of Naja haje Snake Antivenom. *Int. J. Sci. Res. Publ.* 5, 1–11. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.027
- Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A.R., De Silva, N., Gunawardena, N.K., Pathmeswaran, A., Premaratna, R., Savioli, L., Lalloo, D.G., De Silva, H.J., 2008. The global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med.* 5, 1591–1604. doi:10.1371/journal.pmed.0050218
- Kfir, R., Botes, D.P., Osthoff, G., 1985. PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC FOR NAJA NIVEA CARDIOTOXIN V II I from the Naja and Hemachatus genera of the Elapidae family (SLOTTA and VICK , 1969 ; cardiotoxin peptide chain consists of 60 - 61 amino acids , cross-link. *Toxicon* 23, 135–144.
- Kim, H.S., Tamiya, N., 1981. Isolation, properties and amino acid sequence of a long-chain neurotoxin, *Acanthophis antarcticus* b, from the venom of an Australian snake (the common death adder, *Acanthophis antarcticus*). *Biochem J* 193, 899–906.
- Kini, R.M., 2011. Evolution of three-finger toxins - a versatile mini protein scaffold. *Acta Chim. Slov.* 58, 693–701.
- Kini, R.M., 2006. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. *Biochem. J.* 397, 377 LP-387.
- Kini, R.M., 2002. Invited Paper : Animal Toxins of Asia and Australia MOLECULAR MOULDS WITH MULTIPLE MISSIONS : FUNCTIONAL SITES IN THREE-FINGER TOXINS 815–822.
- Kini, R.M., Doley, R., 2010. Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets. *Toxicon* 56, 855–67. doi:10.1016/j.toxicon.2010.07.010
- Kock, M.A., Hew, B.E., Bammert, H., Fritzing, D.C., Vogel, C.-W., 2004. Structure and function of recombinant cobra venom factor. *J. Biol. Chem.* 279, 30836–43. doi:10.1074/jbc.M403196200
- Kolaskar, a S., Tongaonkar, P.C., 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett.* 276, 172–174.
- Konshina, A.G., Dubovskii, P. V, Efremov, R.G., 2006. Structure and Dynamics of cardiotoxins. *Curr. Protein Pept. Sci.* 13, 570–584. doi:10.2174/138920312803582960
- Korber, B., LaBute, M., Yusim, K., 2006. Immunoinformatics comes of age. *PLoS Comput. Biol.* 2, 0484–0492. doi:10.1371/journal.pcbi.0020071
- Kornhauser, R., Isbister, G.K., O'Leary, M. a, Mirtschin, P., Dunstan, N., Hodgson, W.C., 2013. Cross-Neutralisation of the Neurotoxic Effects of Egyptian Cobra Venom with Commercial Tiger Snake Antivenom. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 112, 138–143. doi:10.1111/j.1742-7843.2012.00925.x
- Kozminsky-Atias, A., Zilberberg, N., 2012. Molding the business end of neurotoxins by diversifying evolution. *FASEB J.* 26, 576–86. doi:10.1096/fj.11-187179
- Kularatne, S.A.M., 2002. Common krait (*Bungarus caeruleus*) bite in Anuradhapura, Sri Lanka: a prospective clinical study, 1996-98. *Postgrad. Med. J.* 78, 276–280. doi:10.1136/pmj.78.919.276
- Kularatne, S.A.M., Senanayake, N., 2014. Venomous snake bites, scorpions, and spiders. *Handb. Clin. Neurol.* 120, 987–1001. doi:10.1016/B978-0-7020-4087-0.00066-8
- Laemmli, U.K., 1970. Nature Publishing Group. Group 227, 680–685. doi:10.1038/227680a0
- Lalloo, D.G., Trevett, A.J., Korinhona, A., Nwokolo, N., Laurenson, I.F., Paul, M., Black, J., Naraqi, S., Mavo, B., Saweri, A., 1995. Snake bites by the Papuan taipan (*Oxyuranus scutellatus canni*): paralysis, hemostatic and electrocardiographic abnormalities, and

- effects of antivenom. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52, 525–531.
- Langer, J.A., Pestka, S., 1984. Purification, bacterial expression, and biological activities of the human interferons. *J. Invest. Dermatol.* 83, 128s–136s.
- Lauridsen, L.P., Laustsen, A.H., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., 2017. Exploring the venom of the forest cobra snake: Toxicovenomics and antivenom profiling of *Naja melanoleuca*. *J. Proteomics* 150, 98–108. doi:10.1016/j.jprot.2016.08.024
- Lauridsen, L.P., Laustsen, A.H., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., 2016. Toxicovenomics and antivenom profiling of the Eastern green mamba snake (*Dendroaspis angusticeps*). *J. Proteomics* 136, 248–61. doi:10.1016/j.jprot.2016.02.003
- Laustsen, A.H., Gutiérrez, J.M., Lohse, B., Rasmussen, A.R., Fernández, J., Milbo, C., Lomonte, B., 2015a. Snake venomomics of monocled cobra (*Naja kaouthia*) and investigation of human IgG response against venom toxins. *Toxicon* 99, 23–35. doi:10.1016/j.toxicon.2015.03.001
- Laustsen, A.H., Lohse, B., Lomonte, B., Engmark, M., Gutiérrez, J.M., 2015b. Selecting key toxins for focused development of elapid snake antivenoms and inhibitors guided by a Toxicity Score. *Toxicon* 104, 43–45. doi:10.1016/j.toxicon.2015.07.334
- Laustsen, A.H., Lomonte, B., Lohse, B., Fernández, J., Gutiérrez, J.M., 2015c. Unveiling the nature of black mamba (*Dendroaspis polylepis*) venom through venomomics and antivenom immunoprofiling: Identification of key toxin targets for antivenom development. *J. Proteomics* 119, 126–142. doi:10.1016/j.jprot.2015.02.002
- Lebendiker, M., Danieli, T., 2014. Production of prone-to-aggregate proteins. *FEBS Lett.* 588, 236–246. doi:10.1016/j.febslet.2013.10.044
- Lee, C., Chen, D., Katz, R.L., 1977. Characteristics of nondepolarizing neuromuscular block: (I) post-junctional block by alpha-bungarotoxin. *Can. Anaesth. Soc. J.* 24, 212–219.
- Lee, C.Y., Chen, Y.M., Mebs, D., 1976. Chromatographic separation of the venom of Egyptian black snake (*Walterinnesia aegyptia*) and pharmacological characterization of its components. *Toxicon* 14, 275–81. doi:10.1016/0041-0101(76)90023-4
- Lesovoy, D.M., Bocharov, E. V., Lyukmanova, E.N., Kosinsky, Y.A., Shulepko, M.A., Dolgikh, D.A., Kirpichnikov, M.P., Efremov, R.G., Arseniev, A.S., 2009. Specific membrane binding of neurotoxin II can facilitate its delivery to acetylcholine receptor. *Biophys. J.* 97, 2089–2097. doi:10.1016/j.bpj.2009.07.037
- Li, J., Zhang, H., Liu, J., Xu, K., 2006. Novel genes encoding six kinds of three-finger toxins in *Ophiophagus hannah* (king cobra) and function characterization of two recombinant long-chain neurotoxins. *Biochem. J.* 398, 233–42. doi:10.1042/BJ20060004
- Ling, X., Guangfen, L., Qingchuan, W., Kehua, L., 1996. Acute and long-term toxicities of Chinese cobra (*Naja naja atra*) venom cytotoxin in experimental animals. *J. Fujian Med. Coll.* 30, 109–113.
- Liukmanova, E.N., Shulepko, M.A., Shenkarev, Z.O., Dolgikh, D.A., Kirpichnikov, M.P., 2010. [The in vitro production of three-finger neurotoxins from snake venoms with a high abundance of disulfide bonds. Problems and their solutions]. *Bioorg. Khim.* 36, 149–158.
- Lomonte, B., Pla, D., Sasa, M., Tsai, W.C., Solórzano, A., Ureña-Díaz, J.M., Fernández-Montes, M.L., Mora-Obando, D., Sanz, L., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., 2014. Two color morphs of the pelagic yellow-bellied sea snake, *Pelamis platura*, from different locations of Costa Rica: Snake venomomics, toxicity, and neutralization by antivenom. *J. Proteomics* 103, 137–152. doi:10.1016/j.jprot.2014.03.034
- Lomonte, B., Rey-Suárez, P., Fernández, J., Sasa, M., Pla, D., Vargas, N., Bénard-Valle, M., Sanz, L., Corrêa-Netto, C., Núñez, V., Alape-Girón, A., Alagón, A., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., 2016. Venoms of *Micrurus* coral snakes: Evolutionary trends in compositional patterns emerging from proteomic analyses. *Toxicon* 122, 7–25.

doi:10.1016/j.toxicon.2016.09.008

- Loots, J.M., Meij, H.S., Meyer, B.J., 1973. Effects of *Naja nivea* venom on nerve, cardiac and skeletal muscle activity of the frog. *Br. J. Pharmacol.* 47, 576–585. doi:10.1111/j.1476-5381.1973.tb08188.x
- Lyukmanova, E.N., Shenkarev, Z.O., Schulga, A.A., Ermolyuk, Y.S., Mordvintsev, D.Y., Utkin, Y.N., Shoulepko, M.A., Hogg, R.C., Bertrand, D., Dolgikh, D.A., Tsetlin, V.I., Kirpichnikov, M.P., 2007. Bacterial expression, NMR, and electrophysiology analysis of chimeric short/long-chain α -neurotoxins acting on neuronal nicotinic receptors. *J. Biol. Chem.* 282, 24784–24791. doi:10.1074/jbc.M611263200
- Maïga, A., Vera, L., Marchetti, C., Lorphelin, A., Bellanger, L., Mourier, G., Servent, D., Gilles, N., Stura, E.A., 2013. Crystallization of recombinant green mamba ρ -Da1a toxin during a lyophilization procedure and its structure determination. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 69, 704–709. doi:10.1107/S1744309113011470
- Malih, I., Ahmad rusmili, M.R., Tee, T.Y., Saile, R., Ghalim, N., Othman, I., 2014. Proteomic analysis of Moroccan cobra *Naja haje legionis* venom using tandem mass spectrometry. *J. Proteomics* 96, 240–52. doi:10.1016/j.jprot.2013.11.012
- Marchot, P., Bourne, Y., Prowse, C.N., Bougis, P.E., Taylor, P., 1998. Inhibition of mouse acetylcholinesterase by fasciculin: Crystal structure of the complex and mutagenesis of fasciculin. *Toxicon* 36, 1613–1622. doi:10.1016/S0041-0101(98)00154-8
- Mebs, D., 1986. Myotoxic activity of phospholipases A2 isolated from cobra venoms: neutralization by polyvalent antivenoms. *Toxicon* 24, 1001–8. doi:10.1016/0041-0101(86)90006-1
- Melani, R.D., Skinner, O.S., Fornelli, L., Domont, G.B., Compton, P.D., Kelleher, N.L., 2016. Mapping Proteoforms and Protein Complexes From King Cobra Venom Using Both Denaturing and Native Top-down Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 15, 2423–2434. doi:10.1074/mcp.M115.056523
- Minton, S.A., 1967. Paraspecific protection by elapid and sea snake antivenins. *Toxicon* 5, 47–55. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(67)90118-3
- Mourier, G., Salinas, M., Kessler, P., Stura, E.A., Leblanc, M., Tepshi, L., Besson, T., Diochot, S., Baron, A., Douguet, D., Lingueglia, E., Servent, D., 2016. Mambalgin-1 Pain-relieving Peptide, Stepwise Solid-phase Synthesis, Crystal Structure, and Functional Domain for Acid-sensing Ion Channel 1a Inhibition. *J. Biol. Chem.* 291, 2616–2629. doi:10.1074/jbc.M115.702373
- Naimuddin, M., Kobayashi, S., Tsutsui, C., Machida, M., Nemoto, N., Sakai, T., Kubo, T., 2011. Directed evolution of a three-finger neurotoxin by using cDNA display yields antagonists as well as agonists of interleukin-6 receptor signaling. *Mol. Brain* 4, 2. doi:10.1186/1756-6606-4-2
- Nasiripourdori, A., Ranjbar, B., Naderi-Manesh, H., 2009. Binding of long-chain alpha-neurotoxin would stabilize the resting state of nAChR: a comparative study with alpha-conotoxin. *Theor. Biol. Med. Model.* 6, 3. doi:10.1186/1742-4682-6-3
- Nirthanan, S., Gopalakrishnakone, P., Gwee, M.C.E., Khoo, H.E., Kini, R.M., 2003. Non-conventional toxins from Elapid venoms. *Toxicon* 41, 397–407. doi:10.1016/S0041-0101(02)00388-4
- Nirthanan, S., Gwee, M.C.E., 2004. Three-finger alpha-neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. *J. Pharmacol. Sci.* 94, 1–17. doi:10.1254/jphs.94.1
- O’Leary, M.A., Schneider, J.J., Krishnan, B.P., Lavis, C., McKendry, A., Ong, L.K., Isbister, G.K., 2007. Cross-neutralisation of Australian brown and tiger snake venoms with commercial antivenoms: Cross-reactivity or antivenom mixtures? *Toxicon* 50, 206–13. doi:10.1016/j.toxicon.2007.03.014

- Oehler, S., 2009. Feedback regulation of Lac repressor expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 191, 5301–5303. doi:10.1128/JB.00427-09
- Olamendi-Portugal, T., Batista, C.V.F., Restano-Cassulini, R., Pando, V., Villa-Hernandez, O., Zavaleta-Martínez-Vargas, A., Salas-Arruz, M.C., De La Vega, R.C.R., Becerril, B., Possani, L.D., 2008. Proteomic analysis of the venom from the fish eating coral snake *Micrurus surinamensis*: Novel toxins, their function and phylogeny. *Proteomics* 8, 1919–1932. doi:10.1002/pmic.200700668
- Osaka, H., Malany, S., Molles, B.E., Sine, S.M., Taylor, P., 2000. Pairwise electrostatic interactions between α -neurotoxins and α , β , and γ subunits of the nicotinic acetylcholine receptor. *J Bio Chem* 275. doi:10.1074/jbc.275.8.5478
- Oyama, E., Takahashi, H., 2015. Purification and characterization of two platelet-aggregation inhibitors, named angustatin and H-toxin TA(2), from the venom of *Dendroaspis angusticeps*. *Toxicon* 93, 61–7. doi:10.1016/j.toxicon.2014.11.002
- Panagides, N., Jackson, T., Ikononopoulou, M., Arbuckle, K., Pretzler, R., Yang, D., Ali, S., Koludarov, I., Dobson, J., Sanker, B., Asselin, A., Santana, R., Hendrikx, I., van der Ploeg, H., Tai-A-Pin, J., van den Bergh, R., Kerkkamp, H., Vonk, F., Naude, A., Strydom, M., Jacobsz, L., Dunstan, N., Jaeger, M., Hodgson, W., Miles, J., Fry, B., 2017. How the Cobra Got Its Flesh-Eating Venom: Cytotoxicity as a Defensive Innovation and Its Co-Evolution with Hooding, Aposematic Marking, and Spitting. *Toxins (Basel)*. 9, 103. doi:10.3390/toxins9030103
- Parker-Cote, J.L., O'Rourke, D.P., Brewer, K.L., Lertpiriyapong, K., Punja, M., Bush, S.P., Miller, S.N., Meggs, W.J., 2015. Efficacy of Trypsin in Treating Coral Snake Envenomation in the Porcine Model. *J. Med. Toxicol.* 11, 430–432. doi:10.1007/s13181-015-0468-x
- Peternel, ??pela, Komel, R., 2011. Active protein aggregates produced in *Escherichia coli*. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 8275–8287. doi:10.3390/ijms12118275
- Peternel, S., Grdadolnik, J., Gaberc-Porekar, V., Komel, R., 2008. Engineering inclusion bodies for non denaturing extraction of functional proteins. *Microb. Cell Fact.* 7, 34. doi:10.1186/1475-2859-7-34
- Petras, D., Heiss, P., Harrison, R.A., Süßmuth, R.D., Calvete, J.J., 2016. Top-down venomomics of the East African green mamba, *Dendroaspis angusticeps*, and the black mamba, *Dendroaspis polylepis*, highlight the complexity of their toxin arsenals. *J. Proteomics* 146, 148–164. doi:10.1016/j.jprot.2016.06.018
- Petras, D., Heiss, P., Süßmuth, R.D., Calvete, J.J., 2015. Venom Proteomics of Indonesian King Cobra, *Ophiophagus hannah*: Integrating Top-Down and Bottom-Up Approaches. *J. Proteome Res.* 14, 2539–2556. doi:10.1021/acs.jproteome.5b00305
- Petras, D., Sanz, L., Segura, A., Herrera, M., Villalta, M., Solano, D., Vargas, M., León, G., Warrell, D.A., Theakston, R.D.G., Harrison, R.A., Durfa, N., Nasidi, A., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., 2011. Snake venomomics of African spitting cobras: toxin composition and assessment of congeneric cross-reactivity of the pan-African EchiTAB-Plus-ICP antivenom by antivenomics and neutralization approaches. *J. Proteome Res.* 10, 1266–80. doi:10.1021/pr101040f
- Phisalix, C., Bertrand, G., 1894. Sur la propriété antitoxique du sang des animaux vaccinés contre le venin de vipère. *Comptes Rendus la Société Biol.* 46, 111–113. doi:10.1016/j.jmb.2004.12.031
- Pillet, L., Tremeau, O., Ducancel, F., Drevet, P., Zinn-justin, S., Pinkasfeld, S., Boulain, J., 1993. Genetic Engineering of Snake Toxins.
- Ponomarenko, J. V, Bourne, P.E., 2007. Antibody-protein interactions: benchmark datasets and prediction tools evaluation. *BMC Struct. Biol.* 7, 64. doi:10.1186/1472-6807-7-64
- Prasarnpun, S., Walsh, J., Awad, S.S., Harris, J.B., 2005. Envenoming bites by kraits: The biological basis of treatment-resistant neuromuscular paralysis. *Brain* 128, 2987–

2996. doi:10.1093/brain/awh642
- Pu, X.C., Wong, P.T.H., Gopalakrishnakone, P.L., 1995. Pergamon NOVEL ANALGESIC TOXIN (HANNALGESIN) FROM VENOM OF KING COBRA (OPHIOPHAGUS HANNAH) 1425-1431 , 1995 . --The pharmacological effects of a purified neurotoxin from king cobra (Ophiophagus hannah) venom were studied . Using the hot-plate test . Science (80-). 33, 1425–1431.
- Pyron, R.A., Burbrink, F.T., 2012. Extinction, ecological opportunity, and the origins of global snake diversity. *Evolution* 66, 163–178. doi:10.1111/j.1558-5646.2011.01437.x
- Rajagopalan, N., Pung, Y.F., Zhu, Y.Z., Wong, P.T.H., Kumar, P.P., Kini, R.M., 2007. Beta-cardiotoxin: a new three-finger toxin from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom with beta-blocker activity. *FASEB J.* 21, 3685–3695. doi:10.1096/fj.07-8658com
- Ramos-Cerrillo, B., de Roodt, A.R., Chippaux, J.P., Olguín, L., Casasola, A., Guzmán, G., Paniagua-Solís, J., Alagón, A., Stock, R.P., 2008. Characterization of a new polyvalent antivenom (Antivipmyn® Africa) against African vipers and elapids. *Toxicon* 52, 881–888. doi:10.1016/j.toxicon.2008.09.002
- Ramos, H.R., Vassão, R.C., de Roodt, A.R., Santos e Silva, E.C., Mirtschin, P., Ho, P.L., Spencer, P.J., 2017. Cross neutralization of coral snake venoms by commercial Australian snake antivenoms. *Clin. Toxicol.* 55, 33–39. doi:10.1080/15563650.2016.1222615
- Ranawaka, U.K., Laloo, D.G., de Silva, H.J., 2013. Neurotoxicity in snakebite--the limits of our knowledge. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2302. doi:10.1371/journal.pntd.0002302
- Reeks, T. a., Fry, B.G., Alewood, P.F., 2015. Privileged frameworks from snake venom. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 1939–1958. doi:10.1007/s00018-015-1844-z
- Ren, G., Ke, N., Berkmen, M., 2016. Use of the SHuffle Strains in Production of Proteins. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 5.26.1-5.26.21. doi:10.1002/cpps.11
- Ricciardi, a., 2000. Do Structural Deviations between Toxins Adopting the Same Fold Reflect Functional Differences? *J. Biol. Chem.* 275, 18302–18310. doi:10.1074/jbc.275.24.18302
- Richard, G., Meyers, A.J., McLean, M.D., Arbabi-Ghahroudi, M., MacKenzie, R., Hall, J.C., 2013. In Vivo Neutralization of ??-Cobratoxin with High-Affinity Llama Single-Domain Antibodies (VHHs) and a VHH-Fc Antibody. *PLoS One* 8, 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0069495
- Rigoni, M., 2004. Snake presynaptic neurotoxins with phospholipase A₂ activity induce punctate swellings of neurites and exocytosis of synaptic vesicles. *J. Cell Sci.* 117, 3561–3570. doi:10.1242/jcs.01218
- Rodríguez-Ithurralde, D., Silveira, R., Barbeito, L., Dajas, F., 1983. Fasciculin, a powerful anticholinesterase polypeptide from *Dendroaspis angusticeps* venom. *Neurochem. Int.* 5, 267–274. doi:https://doi.org/10.1016/0197-0186(83)90028-1
- Rojas, G., Jiménez, J., Gutiérrez, J., 1994. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: Description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon* 32, 351–363. doi:10.1016/0041-0101(94)90087-6
- Rosenthal, J.A., Levandoski, M.M., Chang, B., Potts, J.F., Shi, Q.L., Hawrot, E., 1999. The functional role of positively charged amino acid side chains in α -bungarotoxin revealed by site-directed mutagenesis of a His-tagged recombinant α -bungarotoxin. *Biochemistry* 38, 7847–7855. doi:10.1021/bi990045g
- Rowan, E.G., 2001. What does ??-bungarotoxin do at the neuromuscular junction? *Toxicon* 39, 107–118. doi:10.1016/S0041-0101(00)00159-8
- Roy, A., Zhou, X., Chong, M.Z., D'hoedt, D., Foo, C.S., Rajagopalan, N., Nirthanan, S., Bertrand, D., Sivaraman, J., Kini, R.M., 2010. Structural and Functional Characterization of a Novel Homodimeric Three-finger Neurotoxin from the Venom of *Ophiophagus hannah* (King Cobra). *J. Biol. Chem.* 285, 8302–8315. doi:10.1074/jbc.M109.074161

- Sage, P.T., Sharpe, A.H., 2016. T follicular regulatory cells. *Immunol. Rev.* 271, 246–259. doi:10.1111/imr.12411
- Salinas, M., Besson, T., Delettre, Q., Diochot, S., Boulakirba, S., Douguet, D., Lingueglia, E., 2014. Binding site and inhibitory mechanism of the mambalgin-2 pain-relieving peptide on acid-sensing ion channel 1a. *J. Biol. Chem.* 289, 13363–13373. doi:10.1074/jbc.M114.561076
- Samejima, Y., Aoki-Tomomatsu, Y., Yanagisawa, M., Mebs, D., 1997. Amino acid sequence of two neurotoxins from the venom of the Egyptian black snake (*Walterinnesia aegyptia*). *Toxicon* 35, 151–157. doi:10.1016/S0041-0101(96)00138-9
- Samson, A., Scherf, T., Eisenstein, M., Chill, J., Anglister, J., 2002. The mechanism for acetylcholine receptor inhibition by alpha-neurotoxins and species-specific resistance to alpha-bungarotoxin revealed by NMR. *Neuron* 35. doi:10.1016/S0896-6273(02)00773-0
- Sanchez, G., Alvares, L. de O., Oberholzer, M.V., Genro, B., Quillfeldt, J., da Costa, J.C., Cervenansky, C., Jerusalinsky, D., Kornisiuk, E., 2009. M4 muscarinic receptors are involved in modulation of neurotransmission at synapses of Schaffer collaterals on CA1 hippocampal neurons in rats. *J. Neurosci. Res.* 87, 691–700. doi:10.1002/jnr.21876
- Sanz, L., Pla, D., Pérez, A., Rodríguez, Y., Zavaleta, A., Salas, M., Lomonte, B., Calvete, J., 2016. Venomic Analysis of the Poorly Studied Desert Coral Snake, *Micrurus tschudii tschudii*, Supports the 3FTx/PLA2 Dichotomy across *Micrurus* Venoms. *Toxins (Basel)*. 8, 178. doi:10.3390/toxins8060178
- Servent, D., Blanchet, G., Mourier, G., Marquer, C., Marcon, E., Fruchart-Gaillard, C., 2011. Muscarinic toxins. *Toxicon* 58, 455–463. doi:10.1016/j.toxicon.2011.08.004
- Servent, D., Winckler-Dietrich, V., Hu, H.Y., Kessler, P., Drevet, P., Bertrand, D., Menez, A., 1997. Only snake curaremimetic toxins with a fifth disulfide bond have high affinity for the neuronal alpha7 nicotinic receptor. *J Biol Chem* 272, 24279–24286. doi:10.1074/jbc.272.39.24279
- Sewall, H., 1887. Experiments on the preventive inoculation of rattlesnake venom. *J. Physiol.* 8, 203–210.
- Shan, L.-L., Gao, J.-F., Zhang, Y.-X., Shen, S.-S., He, Y., Wang, J., Ma, X.-M., Ji, X., 2016. Proteomic characterization and comparison of venoms from two elapid snakes (*Bungarus multicinctus* and *Naja atra*) from China. *J. Proteomics* 138, 83–94. doi:10.1016/j.jprot.2016.02.028
- Shashidharamurthy, R., Jagadeesha, D.K., Girish, K.S., Kemparaju, K., 2002. No Title. *Mol. Cell. Biochem.* 229, 93–101. doi:10.1023/A:1017972511272
- Shear, T.D., Martyn, J.A.J., 2016. Physiology and biology of neuromuscular transmission in health and disease. *J. Crit. Care* 24, 5–10. doi:10.1016/j.jcrc.2008.08.002
- Silanes, J., Nava, R., Solis, J., 2002. Pharmaceutical composition of F(ab)2 antibody fragments and a process for the preparation thereof.
- Silva, A., Hodgson, W., Isbister, G., 2016a. Cross-Neutralisation of In Vitro Neurotoxicity of Asian and Australian Snake Neurotoxins and Venoms by Different Antivenoms. *Toxins (Basel)*. 8, 302. doi:10.3390/toxins8100302
- Silva, A., Maduwage, K., Sedgwick, M., Pilapitiya, S., Weerawansa, P., Dahanayaka, N.J., Buckley, N.A., Johnston, C., Siribaddana, S., Isbister, G.K., 2016b. Neuromuscular Effects of Common Krait (*Bungarus caeruleus*) Envenoming in Sri Lanka. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004368. doi:10.1371/journal.pntd.0004368
- Simon, T., Bdoalah, A., 1980. Isolation of phospholipase A from the venom of the desert black snake *Walterinnesia aegyptia*. *Toxicon* 18, 369–373. doi:10.1016/0041-0101(80)90020-3

- Sintiprungrat, K., Watcharatanyatip, K., Senevirathne, W.D.S.T., Chaisuriya, P., Chokchaichamnankit, D., Srisomsap, C., Ratanabanangkoon, K., 2016. A comparative study of venomomics of *Naja naja* from India and Sri Lanka, clinical manifestations and antivenomics of an Indian polyspecific antivenom. *J. Proteomics* 132, 131–43. doi:10.1016/j.jprot.2015.10.007
- Sleator, R.D., Hill, C., 2002. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 49–71. doi:10.1016/S0168-6445(01)00071-7
- Smolke, C.D., Keasling, J.D., 2002. Effect of copy number and mRNA processing and stabilization on transcript and protein levels from an engineered dual-gene operon. *Biotechnol. Bioeng.* 78, 412–424.
- Sribar, J., Oberckal, J., Krizaj, I., 2014. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A2: An update. *Toxicon* 89, 9–16. doi:10.1016/j.toxicon.2014.06.019
- Sriprapat, S., Aeksowan, S., Sapsutthipas, S., Chotwiwatthanakun, C., Suttijitpaisal, P., Pratanaphon, R., Khaw, O., Sitprijia, V., Ratanabanangkoon, K., 2003. The impact of a low dose, low volume, multi-site immunization on the production of therapeutic antivenoms in Thailand. *Toxicon* 41, 57–64. doi:10.1016/S0041-0101(02)00209-X
- Stock, R.P., Massougboji, A., Alagón, A., Chippaux, J.-P., 2007. Bringing antivenoms to Sub-Saharan Africa. *Nat. Biotechnol.* 25, 173–7. doi:10.1038/nbt0207-173
- Studier, F.W., Moffatt, B. a, 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113–130. doi:10.1016/0022-2836(86)90385-2
- Sunagar, K., Jackson, T.N.W., Undheim, E. a B., Ali, S. a., Antunes, A., Fry, B.G., 2013. Three-fingered RAVERS: Rapid Accumulation of Variations in Exposed Residues of snake venom toxins. *Toxins (Basel)*. 5, 2172–2208. doi:10.3390/toxins5112172
- Tan, C.H., Tan, K.Y., Fung, S.Y., Tan, N.H., 2015a. Venom-gland transcriptome and venom proteome of the Malaysian king cobra (*Ophiophagus hannah*). *BMC Genomics* 16, 687. doi:10.1186/s12864-015-1828-2
- Tan, C.H., Tan, N.H., Tan, K.Y., Kwong, K.O., 2015b. Antivenom cross-neutralization of the venoms of *Hydrophis schistosus* and *Hydrophis curtus*, two common sea snakes in Malaysian waters. *Toxins (Basel)*. 7, 572–81. doi:10.3390/toxins7020572
- Tan, K.Y., Tan, C.H., Fung, S.Y., Tan, N.H., 2016. Neutralization of the Principal Toxins from the Venoms of Thai *Naja kaouthia* and Malaysian *Hydrophis schistosus*: Insights into Toxin-Specific Neutralization by Two Different Antivenoms. *Toxins (Basel)*. 8, 86. doi:10.3390/toxins8040086
- Tanaka, G.D., Furtado, M.D.F.D., Portaro, F.C. V, Sant'Anna, O.A., Tambourgi, D. V., 2010. Diversity of *Micrurus* snake species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, 1–12. doi:10.1371/journal.pntd.0000622
- Tanaka, G.D., Sant'Anna, O.A., Marcelino, J.R., Lustoza da Luz, A.C., Teixeira da Rocha, M.M., Tambourgi, D. V, 2016. *Micrurus* snake species: Venom immunogenicity, antiserum cross-reactivity and neutralization potential. *Toxicon* 117, 59–68. doi:10.1016/j.toxicon.2016.03.020
- Tasoulis, T., Isbister, G., 2017. A Review and Database of Snake Venom Proteomes. *Toxins (Basel)*. 9, 290. doi:10.3390/toxins9090290
- Teixeira-Clerc, F., Ménez, A., Kessler, P., 2002. How do short neurotoxins bind to a muscular-type nicotinic acetylcholine receptor? *J. Biol. Chem.* 277, 25741–7. doi:10.1074/jbc.M200534200
- Terpe, K., 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein

- production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 211–22. doi:10.1007/s00253-006-0465-8
- TIN-MYINT, RAI-MRA, MAUNG-CHIT, TUN-PE, DA WARRELL, 1991. Bites by the King Cobra (*Ophiophagus hannah*) in Myanmar: Successful Treatment of Severe Neurotoxic Envenoming. *QJM* 80, 751–762.
- Torres, A.M., Wong, H.Y., Desai, M., Moochhala, S., Kuchel, P.W., Kini, R.M., 2003. Identification of a novel family of proteins in snake venoms. Purification and structural characterization of nawaprin from *Naja nigricollis* snake venom. *J. Biol. Chem.* 278, 40097–40104. doi:10.1074/jbc.M305322200
- Tsai, H.-Y., Wang, Y.M., Tsai, I.-H., 2008. Cloning, characterization and phylogenetic analyses of members of three major venom families from a single specimen of *Walterinnesia aegyptia*. *Toxicon* 51, 1245–54. doi:10.1016/j.toxicon.2008.02.012
- Tsetlin, V., 1999. Snake venom a -neurotoxins and other `three-finger` proteins 286, 281–286.
- Unwin, N., 2005. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J. Mol. Biol.* 346, 967–89. doi:10.1016/j.jmb.2004.12.031
- Utkin, Y.N., 2013. Three-finger toxins, a deadly weapon of elapid venom--milestones of discovery. *Toxicon* 62, 50–5. doi:10.1016/j.toxicon.2012.09.007
- Vajo, Z., Fawcett, J., Duckworth, W.C., 2001. Recombinant DNA Technology in the Treatment of Diabetes: Insulin Analogs. *Endocr. Rev.* 22, 706–717. doi:10.1210/edrv.22.5.0442
- Vázquez, H., Olvera, F., Paniagua-Solís, J., Alagón, a., Sevcik, C., 2010. Pharmacokinetics in rabbits and anti-sphingomyelinase D neutralizing power of Fab, F(ab')₂, IgG and IgG(T) fragments from hyper immune equine plasma. *Int. Immunopharmacol.* 10, 447–454. doi:10.1016/j.intimp.2010.01.005
- Vergara, I., Pedraza-Escalona, M., Paniagua, D., Restano-Cassulini, R., Zamudio, F., Batista, C.V.F., Possani, L.D., Alagón, A., 2014. Eastern coral snake *Micrurus fulvius* venom toxicity in mice is mainly determined by neurotoxic phospholipases A₂. *J. Proteomics* 105, 295–306. doi:10.1016/j.jprot.2014.02.027
- Von Behring, E., Kitasato, S., 1890. Ueber Das Zustandekommen Der Diphtherie-Immunitat Und Der Tetanus-Immunitat Bei Thieren. *Dtsch. medizinische Wochenschrift* 16, 1113–1114. doi:10.1016/0161-5890(91)90033-G
- Vongphoumy, I., Chanthilat, P., Vilayvong, P., Blessmann, J., 2016. Prospective, consecutive case series of 158 snakebite patients treated at Savannakhet provincial hospital, Lao People's Democratic Republic with high incidence of anaphylactic shock to horse derived F(ab')₂ antivenom. *Toxicon* 117, 13–21. doi:10.1016/j.toxicon.2016.03.011
- Vonk, F.J., Casewell, N.R., Henkel, C. V., Heimberg, A.M., Jansen, H.J., McCleary, R.J.R., Kerkkamp, H.M.E., Vos, R.A., Guerreiro, I., Calvete, J.J., Wuster, W., Woods, A.E., Logan, J.M., Harrison, R.A., Castoe, T.A., de Koning, A.P.J., Pollock, D.D., Yandell, M., Calderon, D., Renjifo, C., Currier, R.B., Salgado, D., Pla, D., Sanz, L., Hyder, A.S., Ribeiro, J.M.C., Arntzen, J.W., van den Thillart, G.E.E.J.M., Boetzer, M., Pirovano, W., Dirks, R.P., Spaink, H.P., Duboule, D., McGlenn, E., Kini, R.M., Richardson, M.K., 2013. The king cobra genome reveals dynamic gene evolution and adaptation in the snake venom system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 20651–20656. doi:10.1073/pnas.1314702110
- Wang, C.H., Liu, J.H., Lee, S.C., Hsiao, C.D., Wu, W.G., 2006. Glycosphingolipid-facilitated membrane insertion and internalization of cobra cardiotoxin: The sulfate??cardiotoxin complex structure in a membrane-like environment suggests a lipid-dependent cell-penetrating mechanism for membrane binding polypeptides. *J. Biol. Chem.* 281, 656–667. doi:10.1074/jbc.M507880200
- Wang, Y., Jing, L., Xu, K., 2002. A unique approach for high level expression and production of a recombinant cobra neurotoxin in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 94, 235–244.

doi:10.1016/S0168-1656(01)00429-1

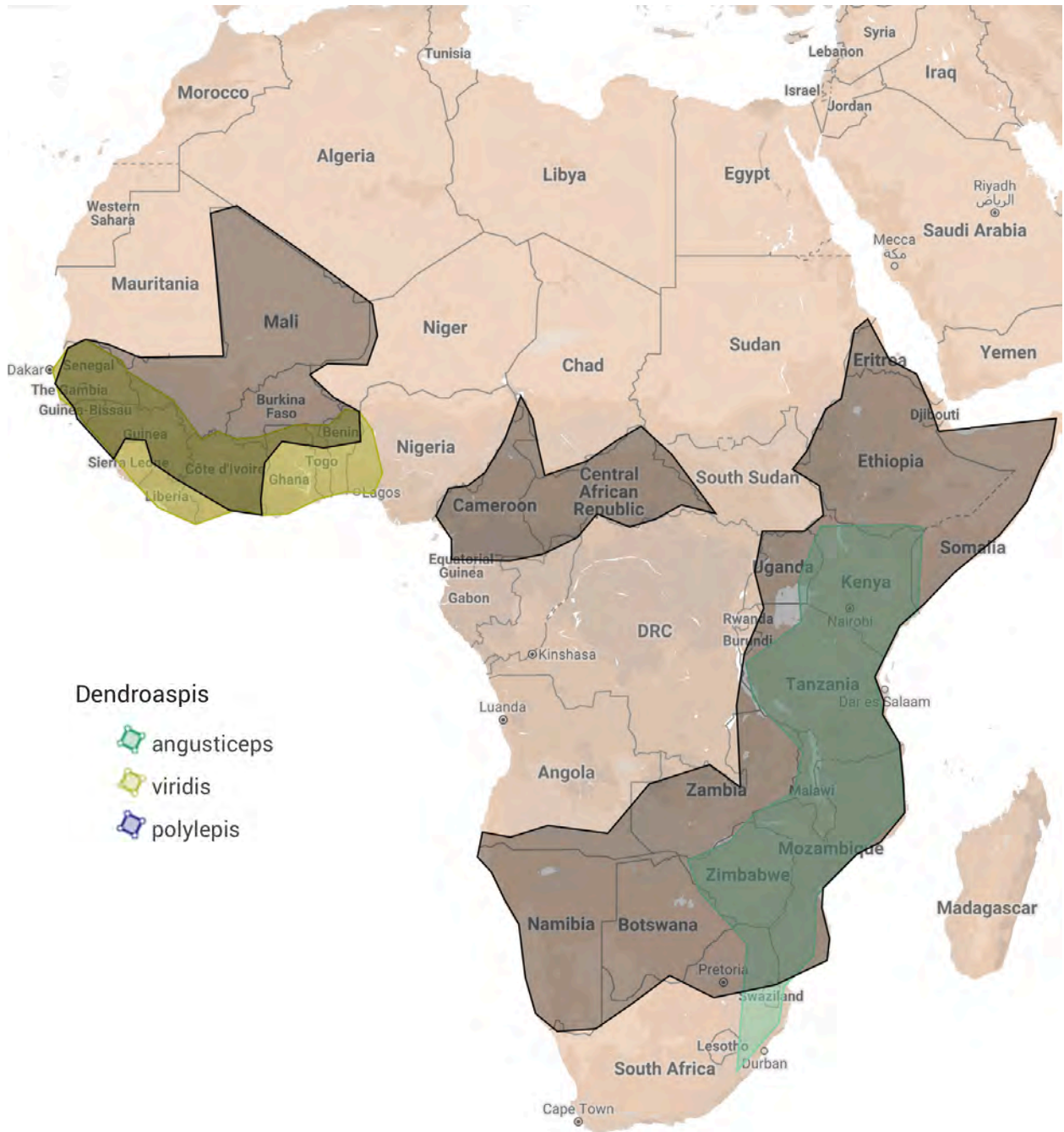
- Waqar, M., Batool, S., 2015. In silico analysis of binding of neurotoxic venom ligands with acetylcholinesterase for therapeutic use in treatment of Alzheimer's disease. *J. Theor. Biol.* 372, 107–117. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2015.02.028
- Warrell, D. a, Loareesuwan, S., White, N.J., Theakston, R.D., Warrell, M.J., Kosakarn, W., Reid, H. a, 1983. Severe neurotoxic envenoming by the Malayan krait *Bungarus candidus* (Linnaeus): response to antivenom and anticholinesterase. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed)*. 286, 678–80. doi:10.1136/bmj.286.6366.678
- Warrell, D.A., 2010. Snake bite. *Lancet* 375, 77–88. doi:10.1016/S0140-6736(09)61754-2
- Warrell, D.A., 1999. WHO/SEARO Guidelines for the clinical management of snake bites in the Southeast Asian region. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 30 Suppl 1, 1–85.
- Warrell, D.A., Barnes, H.J., Piburn, M.F., 1976. Neurotoxic effects of bites by the Egyptian cobra (*Naja haje*) in Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 70, 78–79.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189–1191. doi:10.1093/bioinformatics/btp033
- Watt, G., Padre, L., Tuazon, M.L., Hayes, C.G., 1987. Bites by the Philippine cobra (*Naja naja philippinensis*): an important cause of death among rice farmers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37, 636–639.
- Watt, G., Theakston, R.D.G., Hayes, C.G., Yambao, M.L., Sangalang, R., Ranoa, C.P., Alquizalas, E., Warrell, D.A., 1986. Positive Response to Edrophonium in Patients with Neurotoxic Envenoming by Cobras (*Naja naja philippinensis*). *N. Engl. J. Med.* 315, 1444–1448. doi:10.1056/NEJM198612043152303
- WHO, 1981. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. *WHO Offset Publ.* doi:10.1016/0041-0101(81)90095-7
- WHO, 2017. Annex 5. Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins Replacement of Annex 2 of WHO Technical Report Series, No. 964. *WHO Tech. Rep. Ser.* 197–388.
- Williams, D.J., Gutiérrez, J.-M., Calvete, J.J., Wüster, W., Ratanabanangkoon, K., Paiva, O., Brown, N.I., Casewell, N.R., Harrison, R.A., Rowley, P.D., O'Shea, M., Jensen, S.D., Winkel, K.D., Warrell, D.A., 2011. Ending the drought: New strategies for improving the flow of affordable, effective antivenoms in Asia and Africa. *J. Proteomics* 74, 1735–1767. doi:10.1016/j.jprot.2011.05.027
- Xu, N., Zhao, H.Y., Yin, Y., Shen, S.S., Shan, L.L., Chen, C.X., Zhang, Y.X., Gao, J.F., Ji, X., 2017. Combined venomomics, antivenomics and venom gland transcriptome analysis of the monocoled cobra (*Naja kaouthia*) from China. *J. Proteomics* 159, 19–31. doi:10.1016/j.jprot.2017.02.018
- Yang, D., Deuis, J., Dashevsky, D., Dobson, J., Jackson, T., Brust, A., Xie, B., Koludarov, I., Debono, J., Hendriks, I., Hodgson, W., Josh, P., Nouwens, A., Baillie, G., Bruxner, T., Alewood, P., Lim, K., Frank, N., Vetter, I., Fry, B., 2016. The Snake with the Scorpion's Sting: Novel Three-Finger Toxin Sodium Channel Activators from the Venom of the Long-Glanded Blue Coral Snake (*Calliophis bivirgatus*). *Toxins (Basel)*. 8, 303. doi:10.3390/toxins8100303



12 Material suplementario



35 Serpientes del género *Micrurus*: distribución.



36 Serpientes del género *Dendroaspis*: distribución.



37 *Najas africanas (escupidoras)*: distribución.



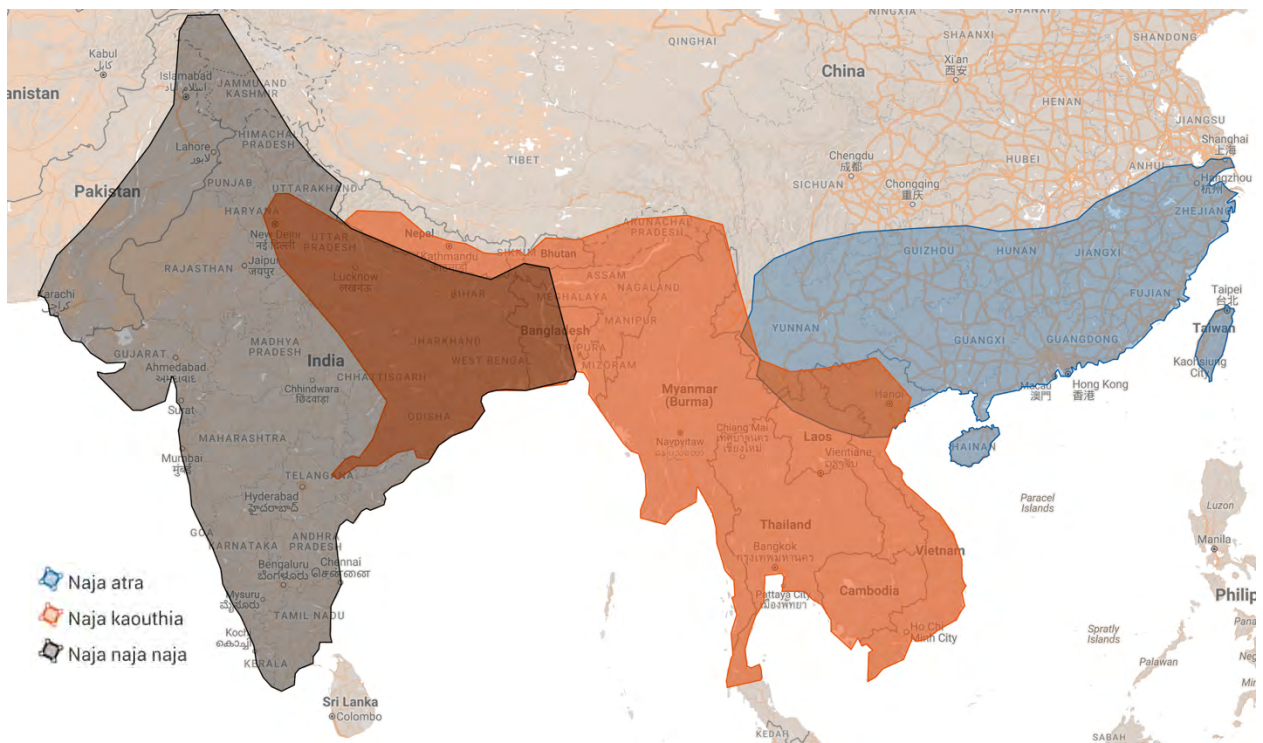
38 *Najas africanas (escupidoras)*: distribución.



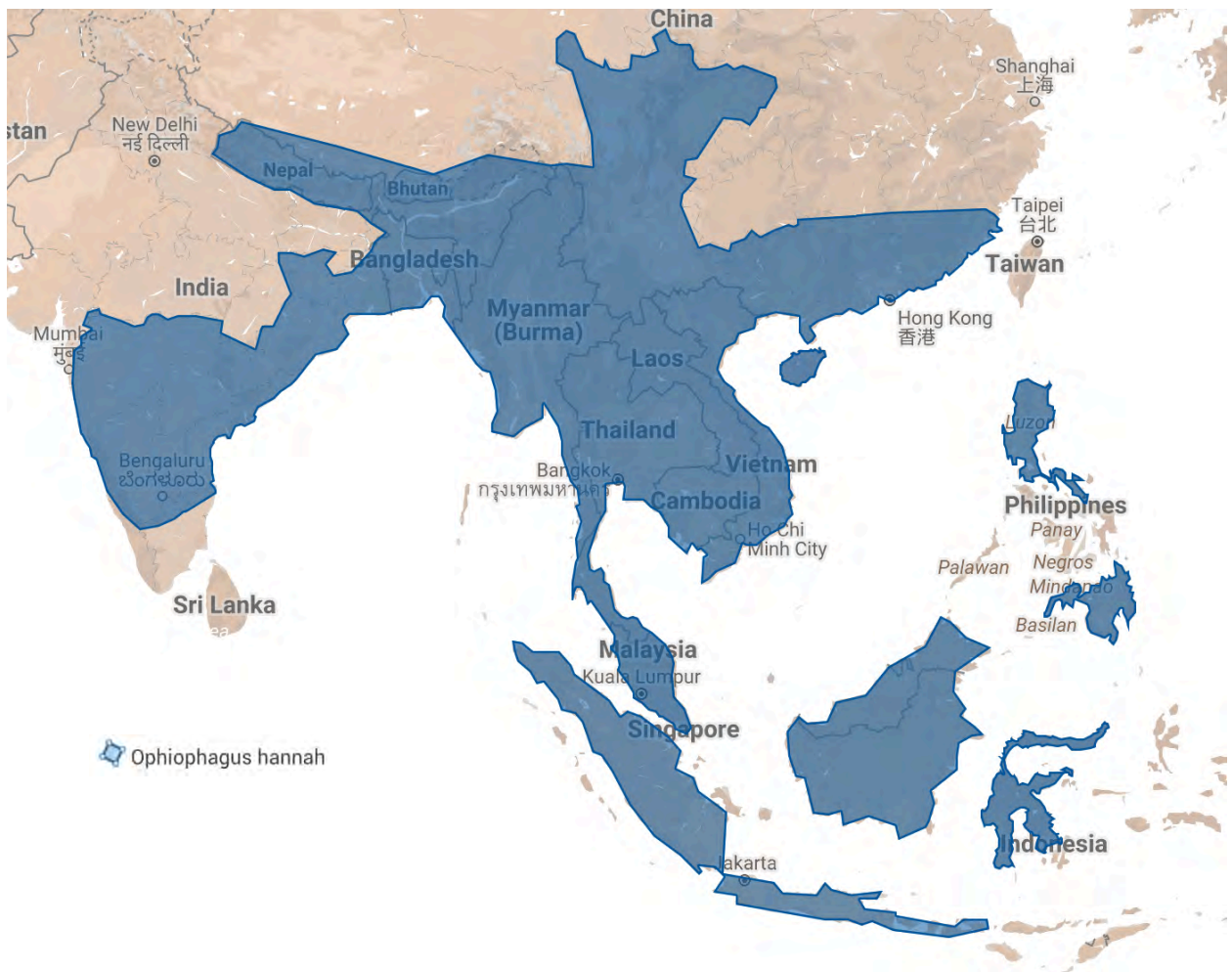
39 *Naja hajje*: distribución.



40 *Naja* y *Walterinnesia*: distribución.



41 Najas asiáticas: distribución



42 *Ophiophagus hannah*: distribución.



Synthetic peptide antigens derived from long-chain alpha-neurotoxins: Immunogenicity effect against elapid venoms



Guillermo de la Rosa^a, Nina Pastor^b, Alejandro Alagón^a, Gerardo Corzo^{a,*}

^a Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca Morelos 61500, Mexico

^b Centro de Investigación en Dinámica Celular, IICBA, UAEM, Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62209, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 October 2016

Received in revised form

12 December 2016

Accepted 13 December 2016

Available online 21 December 2016

Keywords:

Elapid antivenom

Long-chain α -neurotoxins

Snakebites

Three-finger toxins

ABSTRACT

Three-finger toxins (3FTXs), especially α -neurotoxins, are the most poorly neutralized elapid snake toxins by current antivenoms. In this work, the conserved structural similarity and motif arrangements of long-chain α -neurotoxins led us to design peptides with consensus sequences. Eight long-chain α -neurotoxins (also known as Type II) were used to generate a consensus sequence from which two peptides were chemically synthesized, LCP1 and LCP2. Rabbit sera raised against them were able to generate partially-neutralizing antibodies, which delayed mice mortality in neutralization assays against *Naja haje*, *Dendroaspis polylepis* and *Ophiophagus hannah* venoms.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Snake venoms are a rich cocktail of bioactive molecules; among them, proteins and peptides play an essential role in prey hunting and defense against predators. Nonetheless, snakebites are a serious health problem, mainly in rural areas of tropical countries, where antivenom availability represents a big issue [1]. Particularly, proteins found in venoms, which can be nested in super-protein families, such as phospholipases A₂ (PLA₂), snake venom metalloproteinases (SVMP), serine proteinases and three-finger toxins (3FTXs), for instance, are the main toxins responsible for snake envenomation. Concerning elapid venoms, the low immunogenicity of 3FTXs makes generating homogeneous antivenoms difficult [2]. The elapid 3FTXs are peptides with associated non-enzymatic activity, ranging from 60 to 85 amino acids. They contain eight highly conserved cysteine residues that form 4 disulfide bridges that stabilize their hydrophobic core, from which emerge three loops that bear 3–5 antiparallel beta-strands. Besides, some 3FTXs also contain an extra pair of cysteine residues that forms one more disulfide bridge located at one of the loops. 3FTXs encompass many proteins with diverse functions like cytotoxicity

(e.g. cardiotoxins) [3,4] and neurotoxicity (e.g. α -neurotoxins, fasciculins, muscarinic toxins, L-type calcium channel blockers) [5–7]. Snake venom composition from elapids and from their related colubrids show that PLA₂ and 3FTXs are not only the most abundant protein families [8,9], but also, the most toxic ones [10]. There are many reports in the literature that have led us to identify elapid 3FTXs with high toxicity and low immunogenicity when compared to other elapid toxins [11,12]. Among the 3FTXs, the three finger α -neurotoxins play an important role in envenomation as curare mimetic toxins. They bind to the nicotinic acetylcholine receptor (nACR), which prevents the union with the neurotransmitter, favors a resting state of the nACR, and disrupts neurotransmission [13]. Four- and five-disulfide bridge α -neurotoxins have been reported to antagonize muscle and neuronal nACRs, respectively. Interestingly, some long-chain α -neurotoxins (five disulfide bridged) can antagonize a wide variety of subtypes of acetylcholine receptors [14]. It has been demonstrated that the α -neurotoxin loops are crucial for activity, specificity and affinity; for instance, the second loop and the region close to the disulfide bridge at the tip of it, are essential for selectivity [6,15]. Furthermore, α -neurotoxins from elapid venoms are the main target in the antivenom industries. They represent a challenge because many of the current elapid antivenoms have shown low antibody recognition toward these neurotoxins when compared with other antivenoms [10].

In this work, we analyzed eight elapid long-chain α -neurotoxin sequences that were reported to be among the most toxic

* Corresponding author at: Institute of Biotechnology–UNAM, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos, 62210, Mexico.

E-mail address: corzo@ibt.unam.mx (G. Corzo).



Short-chain consensus alpha-neurotoxin: a synthetic 60-mer peptide with generic traits and enhanced immunogenic properties

Guillermo de la Rosa¹ · Ligia L. Corrales-García^{1,2} · Ximena Rodríguez-Ruiz³ · Estuardo López-Vera³ · Gerardo Corzo^{1,4}

Received: 29 January 2018 / Accepted: 13 March 2018
© Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2018

Abstract

The three-fingered toxin family and more precisely short-chain α -neurotoxins (also known as Type I α -neurotoxins) are crucial in defining the elapid envenomation process, but paradoxically, they are barely neutralized by current elapid snake antivenoms. This work has been focused on the primary structural identity among Type I neurotoxins in order to create a consensus short-chain α -neurotoxin with conserved characteristics. A multiple sequence alignment considering the twelve most toxic short-chain α -neurotoxins reported from the venoms of the elapid genera *Acanthophis*, *Oxyuranus*, *Walterinnesia*, *Naja*, *Dendroaspis* and *Micrurus* led us to propose a short-chain consensus α -neurotoxin, here named ScNtx. The synthetic ScNtx gene was de novo constructed and cloned into the expression vector pQE30 containing a 6His-Tag and an FXa proteolytic cleavage region. *Escherichia coli* Origami cells transfected with the pQE30/ScNtx vector expressed the recombinant consensus neurotoxin in a soluble form with a yield of 1.5 mg/L of culture medium. The 60-amino acid residue ScNtx contains canonical structural motifs similar to α -neurotoxins from African elapids and its LD₅₀ of 3.8 μ g/mice is similar to the most toxic short-chain α -neurotoxins reported from elapid venoms. Furthermore, ScNtx was also able to antagonize muscular, but not neuronal, nicotinic acetylcholine receptors (nAChR). Rabbits immunized with ScNtx were able to immune-recognize short-chain α -neurotoxins within whole elapid venoms. Type I neurotoxins are difficult to isolate and purify from natural sources; therefore, the heterologous expression of molecules such ScNtx, bearing crucial motifs and key amino acids, is a step forward to create common immunogens for developing cost-effective antivenoms with a wider spectrum of efficacy, quality and strong therapeutic value.

Keywords Antisera · Elapid · *Micrurus* · α -Neurotoxin · Synthetic gene · Recombinant · Three finger toxins

Handling Editor: M. S. Palma.

✉ Gerardo Corzo
corzo@ibt.unam.mx

- ¹ Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Apartado Postal 510-3, 61500 Cuernavaca, Morelos, Mexico
- ² Departamento de Alimentos, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, Colombia
- ³ Instituto de Ciencias del Mar y Limnología/Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Circuito exterior s/n, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico City, Mexico
- ⁴ Institute of Biotechnology-UNAM, Av. Universidad 2001, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico

Introduction

We can conceive snake venoms as a cornucopia of toxins with striking features that have captivated scientist for more than a century (Sewall 1887). They are useful tools for understanding the molecular mechanisms underlying biological processes (Chang 1999) and also for designing therapeutic agents based on their structure (Reeks et al. 2015) and pharmacological properties (Chan et al. 2016). Venom toxins have been nested in superfamilies of proteins based on their structure, sequence and function. For instance, one of the most widely studied superfamilies in *Elapidae* (Coral snakes, mambas, cobras, kraits) and *Colubridae* venoms, due to its relative abundance and importance, has been the three finger-toxin family (3FTx) (Utkin 2013). As found in many other superfamilies, it has been maintained and tailored throughout evolution as an adaptive trait, conserving

Published online: 06 April 2018

Springer

13 Glosario.

Cuadriplejía: Parálisis conjunta de las cuatro extremidades del cuerpo.

Curare: Veneno extraído de varias especies de plantas que tiene la propiedad de paralizar las placas motoras de los músculos.

Edema: Presencia de un exceso de líquido en algún órgano o tejido del cuerpo que, en ocasiones, puede ofrecer el aspecto de una hinchazón blanda.

Edrofonio: Medicamento que actúa como inhibidor de la colinesterasa.

Elápidio: Familia de ofidios venenosos.

Fármaco: Sustancia que sirve para curar o prevenir una enfermedad, para reducir sus efectos sobre el organismo o para aliviar un dolor físico.

Fasciculaciones: Son pequeñas e involuntarias contracciones musculares, visibles bajo la piel y que no producen movimiento de miembros, debidas a descargas nerviosas espontáneas en grupos de fibras musculares esqueléticas.

Midriasis: Dilatación anormal de la pupila con inmovilidad del iris.

Morbilidad: Proporción de personas que enferman en un sitio y tiempo determinado.

Mortalidad: Tasa de muertes producidas en una población durante un tiempo determinado, en general o por una causa determinada.

Neostigmina: Agente inhibidor de la colinesterasa.

Neuralgia: Dolor intenso de un nervio sensitivo y sus ramificaciones, o la zona por la que se distribuye ese nervio.

Paraplejía: Parálisis de la mitad inferior del cuerpo.

Parasimpaticomiméticos: Es una sustancia sintética o natural que actúa al estimular el sistema nervioso parasimpático. Tienen efectos similares a los producidos por la acetilcolina.

Parestesia: Sensación anormal de los sentidos o de la sensibilidad general que se traduce por una sensación de hormigueo.

Ptoxis: Caída o prolapso de un órgano, una víscera o una parte, debido, a menudo, a una relajación de los medios de sujeción, como en la ptoxis renal, palpebral, gástrica, etcétera.

Terapéutico: Tratamiento que se emplea para la curación de un trastorno o enfermedad. Y parte de la medicina que se ocupa de los medios empleados en el tratamiento de las enfermedades y de la forma de aplicarlos.