



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Instituto de Biotecnología

**PRODUCCIÓN DE CONJUGADOS DE CROTAMINA Y SU EVALUACIÓN COMO
INMUNÓGENOS**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias**

PRESENTA:

IBT Irene María Castillo Pérez

TUTOR PRINCIPAL

**Dr. Alejandro Alagón Cano
Instituto de Biotecnología UNAM**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dra. Leonor Pérez Martínez
Dr. Baltazar Becerril Luján
M. en C. Alejandro Olvera Rodríguez
Instituto de Biotecnología UNAM**

Cuernavaca, Morelos.

Octubre, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



“Lo que caracteriza al hombre de ciencia no es la posesión del conocimiento o de verdades irrefutables, sino la investigación desinteresada de la verdad.”

-Karl Popper



El presente trabajo se realizó en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología UNAM bajo la dirección del Dr. Alejandro Alagón Cano. Se agradece el apoyo financiero recibido a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica DGAPA- PAPIIT IN-207218, Programa de Ingresos Extraordinarios UNAM P10061, Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) 2018, Proyecto CONACYT CB-2013-221343, Proyecto CONACYT 264255 y a la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con CVU 741153.



DEDICATORIA

A mi mamá Ma. Del Socorro Pérez Bautista (QEPD) por su incansable lucha por hacerme una mujer exitosa en todos los aspectos de mi vida y por su amor incondicional, siempre te llevo en mi corazón y en mi pensamiento.

A mi papá Víctor Manuel Castillo Rodríguez y a mi hermano Víctor Manuel Castillo Pérez que siempre me apoyan y me brindan su amor, son un gran ejemplo a seguir.

A mi novio Iván Carranza por enseñarme nuevas formas de ver la vida, por brindarme su amor, apoyo, compañía, por todos las bonitas experiencias que hemos vivido y por motivarme a dar lo mejor de mí cada día.

A mis mejores amigas Nadia Lujambio, Stephanie Jaime y Najla Fuentes que siempre están para escucharme, consolarme y hacerme sonreír cuando más lo he necesitado.

A mis amigos de la maestría Paulina Anaya, David Garcías, Yared Guerrero, Lety Guzmán, Alissa López y Guille Fernández por todas las risas, las experiencias y la comida que compartimos durante estos dos años.

A mis primas Marisol, Sofía y Lulú Hernández quienes son una parte muy importante en mi vida y más que primas son como las hermanas que nunca tuve.



AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Alejandro Alagón Cano por el apoyo brindado para la realización de mi proyecto, por permitirme trabajar en su laboratorio y guiarme en mi crecimiento profesional.

A la Dra. Elizabeth Mata y todo el equipo que labora en el bioterio del Instituto de Biotecnología UNAM, por el apoyo recibido con el cuidado y manejo de los animales de laboratorio empleados en este proyecto.

A los investigadores que formaron parte de mi comité tutorial la Dra. Leonor Pérez, el Dr. Baltazar Becerril y el M. en C. Alejandro Olvera por la asesoría recibida para mejorar este proyecto.

A los investigadores que formaron parte del jurado para el examen profesional Dr. Carlos Arias, Dra. Yvonne Rosenstein, Dr. Fernando Esquivel, Dr. Estuardo López y Dra. Gloria Saab, por sus observaciones y aportes al escrito.

Al M. en C. Alejandro Olvera, Biól. Felipe Olvera, Dra. Melissa Bénard, Dr. Edgar Neri, Biól. Irving Archundia, Dra. Hilda Vázquez y Téc. Ricardo Mondragón por la asesoría técnica y el apoyo en laboratorio para realizar un trabajo de gran calidad. Al Dr. Iván Arenas por sus aportaciones al escrito de tesis.

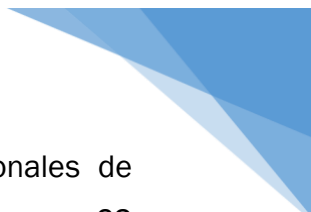
A Angélica Linares por el apoyo administrativo. Al Ing. Jalil Saab, Lic. Antonio Bolaños y Lic. Gloria Villa por el apoyo en trámites y servicios escolares.

A todos mis amigos y compañeros que integran o integraron el laboratorio del Dr. Alagón/Dr. Corzo durante mi maestría, por su valiosa amistad y apoyo tanto personal como profesional: Belem, Melisa, Edgar, Alejandro, Óscar, Luis, Roberto, Mitzi, Irving, Fernando, Andrea, Nicolás, Julia, Hilda, Ricardo, Manuela, Felipe, Angélica, Dayanira, Jesús, Germán, Marco, Samuel, Herlinda, Diana, Damaris, Félix, David, Marcos y Ligia.

CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Serpientes de cascabel de América	1
1.2	Composición de los venenos de serpientes de cascabel	2
1.3	Crotamina	4
1.4	Antivenenos contra venenos de serpientes.....	9
2.	ANTECEDENTES.....	12
2.1	Entrecruzamiento o conjugación de toxinas	12
2.2	Mecanismos de reacción del glutaraldehído y EDC	12
2.3	Producción de conjugados de toxinas y venenos.....	15
3.	JUSTIFICACIÓN.....	20
4.	HIPÓTESIS	21
5.	OBJETIVO GENERAL.....	21
6.	OBJETIVOS PARTICULARES	21
7.	METODOLOGÍA.....	22
7.1	Buffers y soluciones de trabajo	22
7.2	Purificación de crotamina mediante filtración en gel	22
7.3	Entrecruzamiento de crotamina con EDC	24
7.4	Caracterización de los conjugados de crotamina con EDC.	24
7.5	Entrecruzamiento del veneno de <i>C. d. terrificus</i> con glutaraldehído o EDC.....	24
7.6	Caracterización de los conjugados de veneno de <i>C. d. terrificus</i> producidos con glutaraldehído o EDC.....	25
7.7	Toxicidad de los conjugados de veneno de <i>C. d. terrificus</i> producidos con glutaraldehído o EDC.....	26

7.8 Inmunización de conejos con conjugados de veneno de <i>C. d. terrificus</i> producidos con glutaraldehído o EDC.....	26
7.9 Evaluación de la producción de anticuerpos mediante ELISA	28
7.10 Análisis del reconocimiento de los pools de sueros hacia los componentes de venenos de serpientes de cascabel mexicanas mediante Western blot.....	29
7.11 Análisis del reconocimiento de los pools de sueros hacia los epítomos conformacionales o lineales de crotamina	30
7.12 Determinación de la dosis letal media de crotamina y del veneno de <i>C. d. terrificus</i>	31
7.13 Determinación de la potencia neutralizante de los pools de sueros de conejo	31
7.14 Determinación de la potencia neutralizante de los sueros contra 2 y 3 µg de crotamina	32
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
8.1 El veneno de <i>C. d. terrificus</i> contiene seis fracciones principales	33
8.2 El entrecruzador EDC es poco eficiente para producir conjugados de crotamina.	37
8.3 El entrecruzamiento del veneno de <i>C. d. terrificus</i> con glutaraldehído produce conjugados solubles e insolubles de masa molecular alta.	40
8.4 El entrecruzamiento con glutaraldehído reduce la toxicidad del veneno de <i>C. d. terrificus</i>	47
8.5 El entrecruzamiento del veneno de <i>C. d. terrificus</i> con EDC produce conjugados solubles de masa mediana.	48
8.6 El entrecruzamiento con EDC reduce la toxicidad del veneno de <i>C. d. terrificus</i>	51
8.7 La inmunización con veneno de <i>C. d. terrificus</i> o sus conjugados no producen reacciones adversas en conejos.....	52
8.8 La producción de anticuerpos es similar al inmunizar veneno o conjugados del veneno de <i>C. d. terrificus</i>	54
8.9 Los sueros tienen reactividad cruzada hacia el veneno de cascabeles mexicanas.	59



8.10	Los sueros reconocen preferentemente los epítomos conformacionales de crotamina.	63
8.11	La letalidad de la crotamina es menor a la del veneno de <i>C. d. terrificus</i>	64
8.12	Los sueros neutralizan la letalidad del veneno de <i>C. d. terrificus</i> más no la parálisis rígida producida por crotamina.	68
9.	CONCLUSIONES	74
10.	PERSPECTIVAS	75
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
12.	ANEXOS	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de las principales familias de proteínas que componen los venenos de elápidos y vipéridos.....	2
Figura 2. SDS-PAGE al 12% de diferentes venenos de serpientes de cascabel (<i>Crotalus</i>)	3
Figura 3. Estructura terciaria y secuencia primaria de la crotamina de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	5
Figura 4. Alineamiento múltiple de las secuencias de las isoformas de crotamina de diferentes serpientes <i>Crotalus</i>	5
Figura 5. Mecanismos de citotoxicidad de la crotamina	7
Figura 6. Distribución geográfica y número de envenamamientos y muertes ocasionados por serpientes venenosas.....	9
Figura 7. Mecanismo de reacción del entrecruzamiento de proteínas y péptidos con glutaraldehído.....	13
Figura 8. Mecanismo de reacción del entrecruzamiento de péptidos y proteínas con EDC.. ..	14
Figura 9. Diagrama de flujo de la metodología general del proyecto	22
Figura 10. Cromatograma de la purificación de crotamina mediante filtración en gel. 33	
Figura 11. SDS-PAGE al 15% bajo condiciones reductoras de las fracciones obtenidas de la filtración en gel del veneno de <i>C. d. terrificus</i>	34
Figura 13. Análisis del entrecruzamiento de crotamina con EDC mediante SDS-PAGE al 15% bajo condiciones reductoras	37

Figura 14. Perfiles cromatográficos del fraccionamiento del entrecruzamiento de crotamina con EDC a pH 7.2 mediante HPLC en fase reversa	38
Figura 15. Caracterización de conjugados de veneno de <i>C. d. terrificus</i> con altas concentraciones de glutaraldehído	41
Figura 16. Caracterización de conjugados de veneno de <i>C. d. terrificus</i> con bajas concentraciones de glutaraldehído	44
Figura 17. Caracterización de conjugados de veneno de <i>C. d. terrificus</i> con EDC.....	49
Figura 18. Esquema representativo del ELISA indirecto utilizando como antígeno veneno de <i>C. d. terrificus</i>	54
Figura 19. Determinación del título de anticuerpos anti-veneno de <i>C. d. terrificus</i> de conejos inmunizados con los conjugados de veneno con glutaraldehído o EDC	55
Figura 20. Esquema representativo del ELISA indirecto utilizando como antígeno crotamina pura.....	56
Figura 21. Determinación del título de anticuerpos anti-crotamina de conejos inmunizados con los conjugados de veneno con glutaraldehído o EDC.	57
Figura 22. Análisis del reconocimiento de venenos de serpientes <i>Crotalus</i> por los pools de sueros mediante Western blot	60
Figura 23. Análisis del reconocimiento de venenos de serpientes <i>Crotalus</i> por los pools de sueros (en dilución proporcional) mediante Western blot.....	62
Figura 24. Ensayo de reconocimiento de los pools de suero hacia los epítomos de crotamina mediante Slot blot.	64
Figura 25. Determinación de la dosis letal media de crotamina	65
Figura 26. Determinación de la dosis letal media del veneno de <i>C. d. terrificus</i>	67

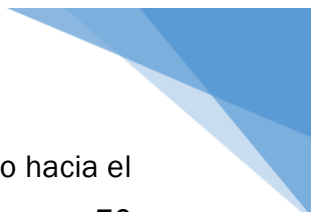


Figura 27. Determinación de la potencia neutralizante de los sueros de conejo hacia el veneno de <i>C. d. terrificus</i>	70
Figura 28. Neutralización de la parálisis rígida producida por crotamina.	71
Figura 29. Determinación de neutralización de la parálisis rígida producida por 2 y 3 μ g de crotamina	72
Figura 30. SDS-PAGE al 15% bajo condiciones reductoras de los conjugados de veneno producidos con A) altas concentraciones de glutaraldehído y B) bajas concentraciones de gutaraldehído	88



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Esquema de inmunización de conejos con los conjugados de veneno de <i>C. d. terrificus</i> con glutaraldehído o EDC.....	27
Tabla 2. Rendimiento de la separación del veneno de <i>C. d. terrificus</i> mediante filtración en gel	35
Tabla 3. Determinación de las proporciones relativas de los componentes de los conjugados del veneno de <i>C. d. terrificus</i> con altas concentraciones de glutaraldehído	42
Tabla 4. Determinación del porcentaje de crotamina entrecruzada en los conjugados del veneno de <i>C. d. terrificus</i> con altas concentraciones de glutaraldehído.....	43
Tabla 5. Determinación de las proporciones relativas de los componentes de los conjugados del veneno de <i>C. d. terrificus</i> con bajas concentraciones de glutaraldehído	45
Tabla 6. Determinación del porcentaje de crotamina entrecruzada en los conjugados del veneno de <i>C. d. terrificus</i> con bajas concentraciones de glutaraldehído.....	46
Tabla 7. Toxicidad y parálisis rígida producida por los conjugados del veneno de <i>C. d. terrificus</i> con glutaraldehído	47
Tabla 8. Determinación de la composición de los conjugados del veneno de <i>C. d. terrificus</i> con EDC	50
Tabla 9. Determinación del porcentaje de crotamina entrecruzada en los conjugados del veneno de <i>C. d. terrificus</i> con EDC.	50
Tabla 10. Toxicidad y parálisis rígida de los conjugados del veneno de <i>C. d. terrificus</i> con EDC.	51

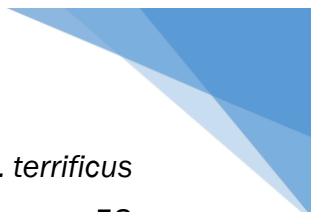




Tabla 11. Título de anticuerpos de los pools de sueros hacia el veneno de <i>C. d. terrificus</i> y hacia crotamina.	58
Tabla 12. Determinación de potencia neutralizante de los pools de sueros contra 3 DL ₅₀ de crotamina	68
Tabla 13. Determinación de potencia neutralizante de los pools de sueros de contra 3 DL ₅₀ del veneno de <i>C. d. terrificus</i>	69

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
Aahl o AahlI	Toxinas del escorpión <i>Androctonus australis hector</i>
ABTS	2,2'azinobis (3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico)
A.D.	Azul de dextrano
ADJU-PHOS	Adyuvante de fosfato de aluminio
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria de Brasil
A _{280nm}	Absorbancia a 280 nanómetros de longitud de onda
BCIP	5-bromo-4-cloro-3'-indolfosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
<i>C. b.</i>	<i>Crotalus basiliscus</i>
<i>C. d. t.</i>	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
<i>C. m.</i>	<i>Crotalus molossus nigrescens</i>
CML	N _ε -carboximetil lisina
CRISP	Proteínas secretoras ricas en cisteína
<i>C. s. c.</i>	<i>Crotalus simus culminatus</i>
<i>C. s. s.</i>	<i>Crotalus simus simus</i>
CTL	Lectinas tipo C
Ctm	Crotamina de <i>C. d. terrificus</i>
Ctx B	Subunidad básica de crotoxina de <i>C. d. terrificus</i>
DE ₅₀	Dosis efectiva media
DL ₅₀	Dosis letal media
DTx	Dendrotoxinas
ε _{1mg/mL}	Coefficiente de extinción de 1 mg/mL de una proteína a 280 nanómetros de longitud de onda
EC ₅₀	Concentración efectiva media



Abreviatura	Significado
EDC o EDAC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
g	Gravedades
GTA	Glutaraldehído
GI, SI y MI	α -Conotoxinas del cono marino <i>Conus geographus</i>
GVI A	ω -Conotoxina del cono marino <i>Conus geographus</i>
HeLa	Línea celular de cáncer cervicouterino aisladas de Henrietta Lacks
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
I.C.	Intervalo de confianza
IFA	Adyuvante incompleto de Freund
IgG	Inmunoglobulina de tipo IgG
kDa	Kilo Daltones
KLH	Hemocianina de la lapa californiana <i>Megathura crenulata</i>
Kv	Canales de potasio dependientes de voltaje
LAO	L-aminoácido oxidasas
Lz.	Lisozima
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
miRNA	Micro ARNs
MMM	Marcador de masa molecular
Myo	Miotoxinas
NBT	Nitroazul de tetrazolio
ND	No determinado
NHS	N-hidroxisuccinimida
NNTRC	Centro Nacional de Investigación en Toxinas Naturales



Abreviatura	Significado
OPSS-PEG-SVA	Orto-piridildisulfuro-polietilenglicol-N-hidroxisuccinimida
Ova.	Ovoalbúmina
pI	Punto isoeléctrico
PLA ₂	Fosfolipasas de tipo A ₂
SC	Vía subcutánea
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
SVMP	Metaloproteasas del veneno de serpientes
SVSP	Serino proteasas del veneno de serpientes
TBS	Tris buffer salino
TFA	Ácido trifluoroacético
UA _{280nm}	Unidades de absorbancia a 280 nanómetros de longitud de onda
WHO	Organización Mundial de la Salud, por sus siglas en inglés
3 FTx	Toxinas de tres dedos




RESUMEN

La crotamina es una miotoxina que se encuentra en el veneno de *Crotalus durissus terrificus* y otras serpientes del género *Crotalus*. Produce mionecrosis y parálisis de las patas traseras de los ratones debido a que bloquea los canales de potasio dependientes de voltaje 1.1-1.3. Varios antivenenos comerciales no reconocen ni neutralizan a la crotamina debido a su baja inmunogenicidad. Con el objetivo de producir anticuerpos neutralizantes contra toxinas poco inmunogénicas, se han propuesto diversas estrategias. Entre ellas, la producción de conjugados de veneno y toxinas consigo mismo o con proteínas acarreadoras mediante entrecruzamiento con glutaraldehído o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), ha resultado ser una estrategia eficiente y de bajo costo.

En este trabajo, se intentó con poco éxito el entrecruzamiento de crotamina pura a partir del veneno de *C. d. terrificus* con EDC. Por otro lado, se produjeron y caracterizaron conjugados del veneno de *C. d. terrificus* con glutaraldehído o EDC. Mientras que los conjugados producidos con glutaraldehído tuvieron un tamaño mayor a 250 kDa y se precipitaron en un 59.0%, los conjugados producidos con EDC tuvieron un tamaño de entre 15 y 25 kDa y fueron solubles. La toxicidad de los conjugados producidos fue menor a la del veneno de *C. d. terrificus* sin entrecruzar.

Cuatro grupos de conejos se inmunizaron de la siguiente manera: el grupo I con veneno de *C. d. terrificus*; grupo II con los conjugados solubles de veneno con glutaraldehído; grupo III con los conjugados insolubles de veneno con glutaraldehído; y grupo IV con los conjugados solubles de veneno con EDC. Para los grupos I, II y III se realizaron diez inmunizaciones y para el grupo IV se realizaron once inmunizaciones.

Los sueros de los conejos del grupo I inmunizados con el veneno de *C. d. terrificus* y los sueros de los conejos del grupo II inmunizados con los conjugados solubles de veneno entrecruzados con glutaraldehído, tuvieron títulos de anticuerpos muy similares contra el veneno de *C. d. terrificus* mediante ensayo inmunoenzimático.



Los conejos del grupo III tuvieron los títulos más bajos y los conejos del grupo IV tuvieron títulos intermedios. Por otra parte, los sueros de los cuatro grupos tuvieron títulos muy similares contra crotamina.

Mediante Western blot, se observó que sólo los pools de los sueros de los grupos II, III y IV reconocieron a la crotamina de *C. d. terrificus* y de las demás especies analizadas. Además, los cuatro pools de sueros fueron capaces de reconocer familias de proteínas del veneno de varias serpientes de cascabel mexicanas compartidas con el veneno de *C. d. terrificus*. Los ensayos de Slot blot con crotamina sin desnaturizar o desnaturizada demostraron que los pools de sueros producidos reconocen preferentemente epítomos conformacionales.

La dosis letal media de la crotamina pura fue de 41 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ (20 g), mientras que la del veneno de *C. d. terrificus* fue de 3.7 $\mu\text{g}/\text{ratón}$. En los ensayos de determinación de potencia neutralizante se observó que ninguno de los sueros de los cuatro grupos fue capaz de neutralizar la letalidad o la parálisis rígida producida por la crotamina pura. Aunque tuvieron una potencia neutralizante hacia la letalidad del veneno de *C. d. terrificus* de 59.5, 70.4, 144.3 y 102.5 $\mu\text{L}/3 \text{ DL}_{50}$ para los grupos I, II, III y IV, respectivamente. Sin embargo, sólo el suero del grupo II neutralizó la parálisis de las patas traseras producida por la crotamina presente en 3 dosis letales media de veneno. No obstante, 100 μL de este pool de suero fueron incapaces de neutralizar la parálisis producida por 2 μg de crotamina por ratón.

El uso de conjugados de veneno de *C. d. terrificus* producidos con glutaraldehído o con EDC como inmunógenos, es una estrategia ineficiente para producir anticuerpos que neutralicen la parálisis producida por crotamina. De hecho, su potencia neutralizante hacia la letalidad del veneno fue menor a la obtenida con la inmunización de veneno de *C. d. terrificus* sin tratamiento.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Serpientes de cascabel de América

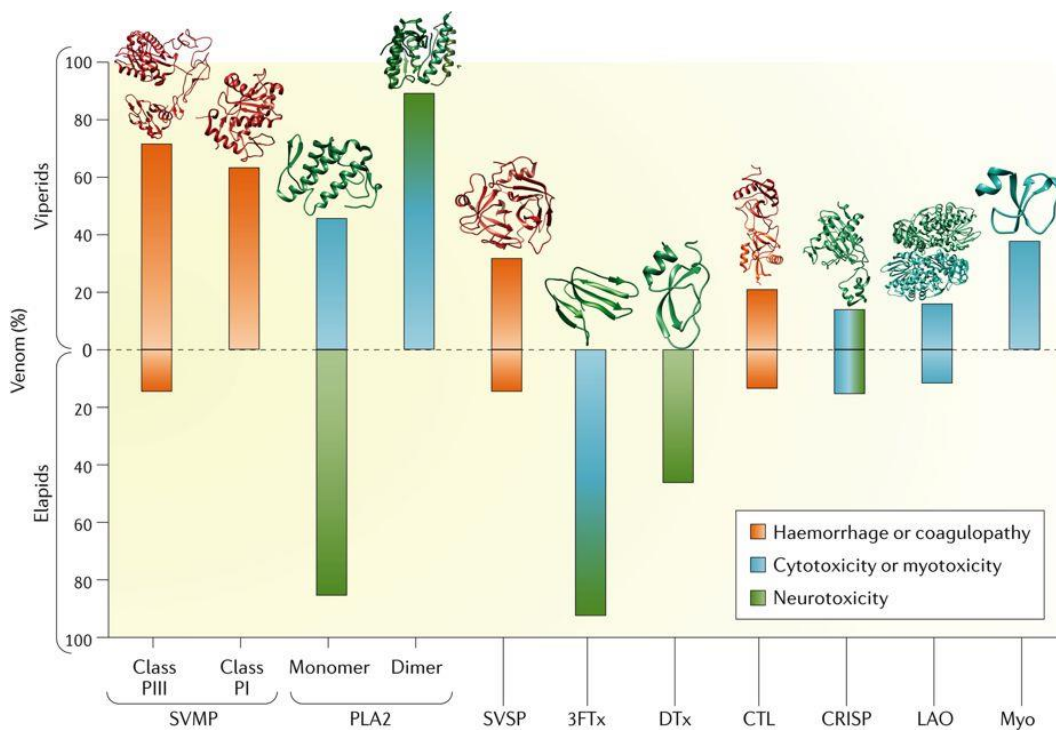
En el reino animal más de 100,000 especies han desarrollado mecanismos para producir veneno con la finalidad de matar, inmovilizar o predigerir a sus presas, defenderse de los depredadores y competir contra otros animales (Calvete, 2017). Entre los organismos venenosos más peligrosos, se encuentran las serpientes que pertenecen a las familias *Elapidae* y *Viperidae*. Entre las serpientes de la familia *Viperidae* distribuidas en el continente americano, destacan los géneros *Agkistrodon*, *Bothrops* y *Crotalus*. Este último género, comprende 47 especies y es uno de los 12 géneros de serpientes que más accidentes ofídicos (causados por la mordedura de serpientes venenosas) ocasionan alrededor del mundo (Uetz et al., 2018; WHO, 2017).

En Norteamérica, las especies de serpientes con mayor relevancia médica son *Crotalus atrox*, *C. oreganus*, *C. simus*, *C. scutulatus*, *C. molossus*, *C. adamanteus*, *C. horridus* y *C. viridis*. Mientras que en el Caribe, Centroamérica y Sudamérica, destacan *C. durissus* y *C. simus*. de acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud (2017). En México destacan *C. scutulatus*, *C. simus*, *C. molossus*, *C. basiliscus*, *C. totonacus*, *C. oreganus*, *C. ruber*, *C. tzabcan* y *C. viridis*. Su distribución en áreas pobladas ocasiona el 40% de los accidentes ofídicos, lo que conlleva niveles significativos de morbilidad y mortalidad (Arnaud-Franco et al., 2018; WHO, 2017).

Las serpientes del género *Crotalus*, también conocidas como serpientes de cascabel, se caracterizan por la presencia de un cascabel o crótalo en el extremo de la cola, el cual utilizan como advertencia cuando se sienten amenazadas (Neri-Castro, et al., 2014; Quan, 2012; Segura et al., 2017). La forma en la que las serpientes de cascabel inoculan su veneno es mediante dientes inoculadores, comúnmente llamados colmillos. Estos dientes se encuentran en la parte anterior de la mandíbula superior y están conectados a las glándulas productoras de veneno (Neri-Castro et al., 2014).

1.2 Composición de los venenos de serpientes de cascabel

El veneno de las serpientes es una mezcla compleja de péptidos y proteínas, si bien también contiene nucleósidos y otros componentes de bajo peso molecular, éstos no son tóxicos para mamíferos. En el veneno de vipéridos las principales familias de proteínas son: metaloproteasas, serinoproteasas, fosfolipasas digestivas y neurotóxicas, L-aminoácido oxidasas, lectinas tipo C, proteínas secretoras ricas en cisteína y miotoxinas (figura 1) (Gutiérrez *et al.*, 2017; Mackessy, 2009; Quan, 2012).



Nature Reviews | Disease Primers

Figura 1. Distribución de las principales familias de proteínas que componen los venenos de elápidos y vipéridos. SVMP: Metaloproteasas; PLA2: Fosfolipasas de tipo A2; SVSP: Serinoproteasas; 3FTx: Toxinas de tres dedos; DTx: Dendrotoxinas; CTL: Lectinas tipo C; CRISP: Proteínas secretoras ricas en cisteína; LAO: L-aminoácido oxidasas; Myo: Miotoxinas. Tomado de Gutiérrez, *et al.* (2017).

En los casos de envenenamiento por mordedura de vipéridos es común observar ptosis, parálisis respiratoria, daño al endotelio vascular, hemorragias, mionecrosis, hipotensión, espasmos, coagulopatías, inflamación, edema, rabdomiólisis, insuficiencia renal aguda, entre otros síntomas. Todos ellos derivados de la composición diversa y compleja de los venenos de las serpientes (Gutiérrez *et al.*, 2017; Warrell, 2010).

La variabilidad en el veneno puede observarse a nivel interespecífico e intraespecífico como se muestra en la figura 2. Debido a esto, el veneno de las serpientes *Crotalus* se ha clasificado en dos grandes grupos. Dentro del grupo I, están las cascabeles como *C. atrox*, *C. simus* y *C. viridis*, que producen un veneno altamente hemorrágico y dañino para los tejidos. Mientras que en el grupo II, se clasifican serpientes como *C. tigris*, *C. scutulatus* y *C. durissus terrificus*, por su veneno altamente neurotóxico y miotóxico (Mackessy, 2009).

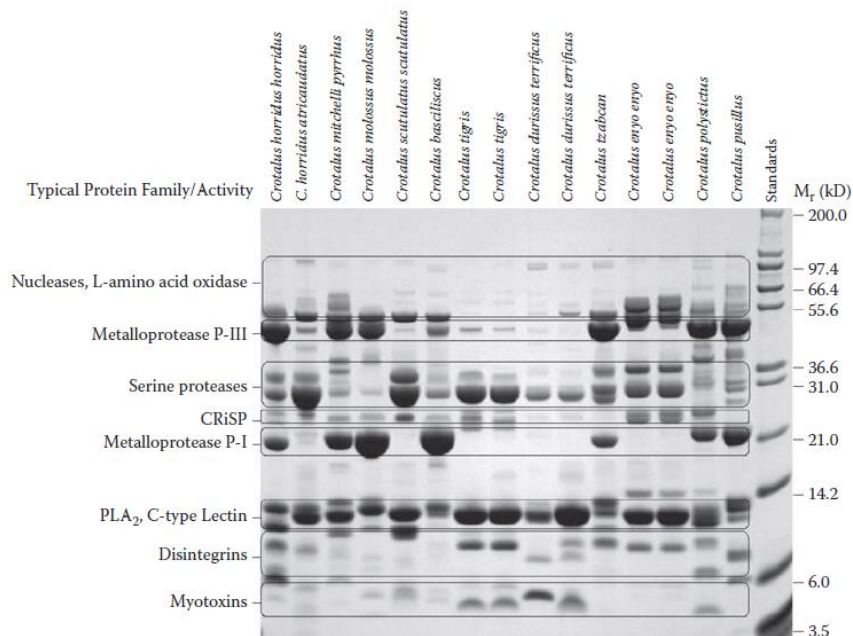



Figura 2. SDS-PAGE al 12% de diferentes venenos de serpientes de cascabel (*Crotalus*). Las proteínas que componen los venenos de las serpientes de este género pertenecen a diferentes familias. Tomado de Mackessy (2009).



Cada una de las familias proteicas que componen los venenos de las serpientes de cascabel tiene un mecanismo de acción diferente. Las L-aminoácido oxidasas actúan en el proceso de desaminación de aminoácidos, lo que puede ocasionar daños celulares e inducir apoptosis. Por su parte, las metaloproteasas son enzimas que hidrolizan proteínas estructurales, principalmente de membranas basales, lo cual ocasiona hemorragias severas y mionecrosis en las víctimas (Mackessy, 2009). Las serinoproteasas con actividad tipo trombina, hidrolizan el fibrinógeno en la sangre, lo cual ocasiona una perturbación de la hemostasis. Por su parte, las fosfolipasas digieren glicerofosfolípidos y provocan inflamación. Algunas son miotóxicas y afectan mayormente al músculo estriado, mientras que otras son neurotóxicas e inhiben la liberación de acetil colina en la unión neuromuscular. Finalmente, las miotoxinas son de naturaleza catiónica y afectan el músculo esquelético (Mackessy, 2009; Neri-Castro *et al.*, 2014).

1.3 Crotamina

Dentro de las miotoxinas, la crotamina, originalmente identificada en el veneno de *C. d. terrificus*, ha sido la más estudiada (Marinovic *et al.*, 2017). La crotamina es una proteína de bajo peso molecular que se compone de 42 aminoácidos y tiene una estructura $\alpha\beta_1\beta_2$ estabilizada por tres puentes disulfuro (figura 3). El arreglo de los puentes disulfuro y su estructura conformacional son similares a los de las β -defensinas humanas (Oguiura *et al.*, 2005; Yount *et al.*, 2009). Once de los aminoácidos que componen a la crotamina son aminoácidos básicos, los cuales le confieren una carga positiva. Además, debido a su bajo peso molecular, es una molécula con baja inmunogenicidad (Kerkis *et al.*, 2014; León *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2011).

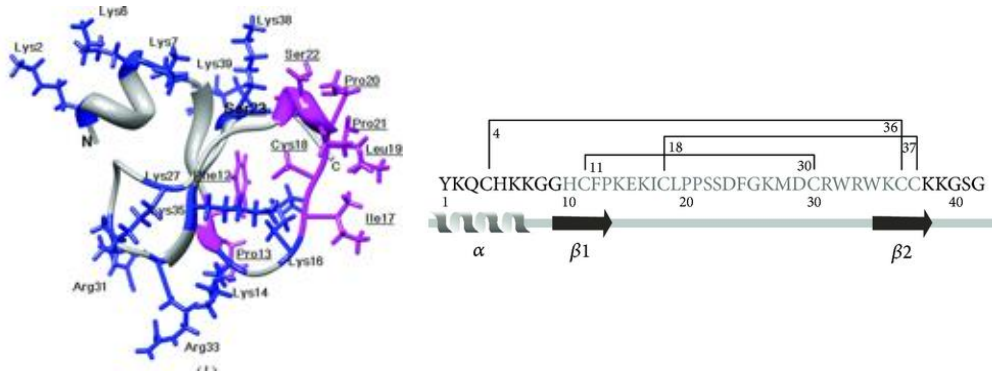



Figura 3. Estructura terciaria y secuencia primaria de la crotamina de *Crotalus durissus terrificus*. Los aminoácidos con carga positiva se encuentran en color azul y los aminoácidos hidrofóbicos en color rosa. El primer puente disulfuro se forma entre los aminoácidos Cys 4 y Cys 36, el segundo entre Cys 11 y Cys 30 y el tercero entre Cys 18 y Cys 37. Modificada de Kerkis, et. al. (2014) y Coronado, et al. (2013).

La dosis letal media (DL₅₀) de crotamina varía dependiendo de la vía de administración y el método de purificación empleados (Oguiura et al., 2005). La crotamina vía intraperitoneal tiene una DL₅₀ de 1.4 a 120 µg/ratón (20 g) (Boni-Mitake, et al., 2001; Giglio, 1975); de 9.2 µg/ratón por vía subcutánea y de 30 a 60 µg/ratón por la vía intravenosa (Brazil et al., 1979; Cheymol et al., 1971). Varias isoformas de crotamina se han reportado en el veneno de diferentes especies del género *Crotalus*, tal y como se muestra en la figura 4 (Marinovic et al., 2017).

<i>Crotalus durissus terrificus</i>	YKQCHKKGGHCFPKEK-ICLPSSDFGKMDCKWKWKCCCKKGSK43
<i>Crotalus durissus cumanensis</i>	YKQCHKKGGHCFPKEVLICIPSSDFGKMDCKWKWKCCCKKS—42
<i>Crotalus odamanteus</i>	YKKCHKKGGHCFPKI V-ICLPSSDFGKMDCKWKWKCCCKKS—41
<i>Crotalus oregonus helleri</i>	YKKCHKKGGHCFPKEK-ICIPSSDFGKMDCKWKWKCCCKKS—41
<i>Crotalus oreganus concolor</i>	YKKCHKKGGHCFPKEK-ICIPSSDFGKMDCKWKWKCCCKKS—41
<i>Crotalus viridis viridis</i>	YKQCHKKGGHCFPKEK-ICIPSSDLGKMDCKWKWKCCCKKGS—42
<i>Crotalus durissus ruruima</i>	YKQCHKKGGHCFPKEK-ICIPSSDFGKMDCKWKWKCCCKKGS—42
	**:*

Figura 4. Alineamiento múltiple de las secuencias de las isoformas de crotamina de diferentes serpientes *Crotalus*. El símbolo * indica los aminoácidos conservados entre las isoformas, en color azul se identifica las lisinas, en rojo las cisteínas y en verde las histidinas. Tomado de Marinovic, et al. (2017).



Algunas de las actividades que se le atribuyen a la crotamina es la actividad antimicrobiana hacia bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, similar al de las β -defensinas humanas (Yamane *et al.*, 2013; Yount *et al.*, 2009). Varios experimentos han demostrado que esta toxina inhibe el crecimiento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y de una cepa de *S. aureus* resistente a meticilina (Batista *et al.*, 2018; Oguiura, *et al.*, 2011; Yamane *et al.*, 2013). Además, la crotamina tiene actividad antifúngica hacia *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, entre otros hongos (Yamane *et al.*, 2013; Yount *et al.*, 2009). La actividad antiparasitaria hacia *Plasmodium falciparum* también se ha reportado para esta toxina (El Chamy Maluf *et al.*, 2016).

Por otra parte, varios autores han demostrado que la crotamina tiene capacidad para interaccionar con células que se dividen activamente en mamíferos (Hayashi *et al.*, 2008; Nascimento *et al.*, 2007, 2012). Esta toxina ha demostrado actividad citotóxica específica hacia tejidos tumorales de ratón *in vivo* y en células tumorales de ratón y de humano *in vitro* (Nascimento *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2011). Derivado de varios estudios, se ha propuesto que la actividad citotóxica de crotamina hacia diferentes tipos celulares es dosis-dependiente e involucra diversos mecanismos. Por ejemplo, concentraciones mayores a 1 μ M, inducen apoptosis en células tumorales pero no en células normales. (Hayashi *et al.*, 2008; Nascimento *et al.*, 2007, 2012; Pereira *et al.*, 2011).

Se ha propuesto que la actividad citotóxica de crotamina comienza con la interacción con membranas cargadas negativamente y la formación de macroporos que comprometen la integridad de la membrana (Costa *et al.*, 2014; Oguiura *et al.*, 2011; Yamane *et al.*, 2013; Yount *et al.*, 2009). Una vez en el interior de la célula, la crotamina provoca la despolarización de la mitocondria y la ruptura de los endosomas, así como de los lisosomas (figura 5). En consecuencia, el incremento de calcio intracelular, la liberación de catepsinas y la activación de las caspasas inducen la muerte celular (Batista *et al.*, 2018; El Chamy Maluf *et al.*, 2016; Hayashi *et al.*, 2008; Nascimento *et al.*, 2007, 2012; Pereira *et al.*, 2011).

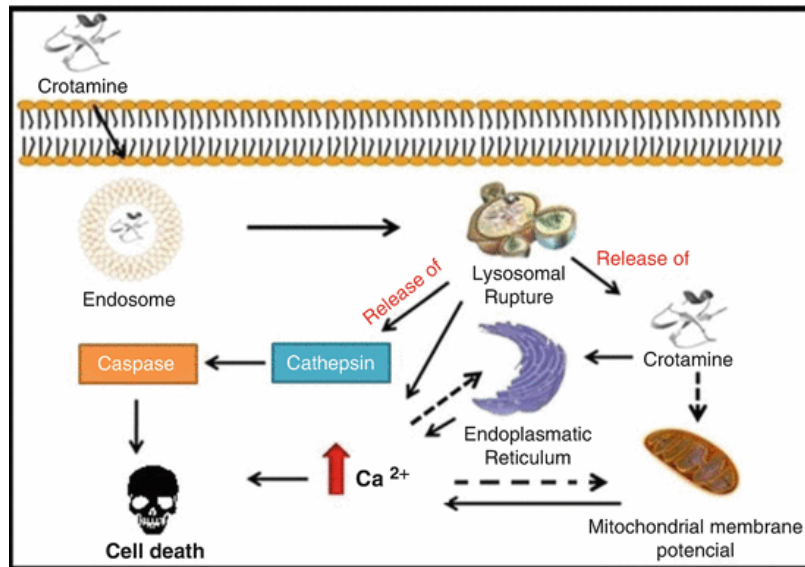
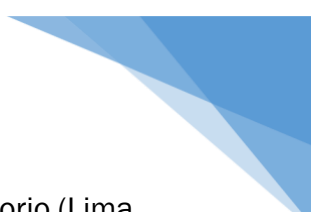


Figura 5. Mecanismos de citotoxicidad de la crotamina. Esta miotoxina interactúa con la membrana citoplasmática para internalizarse en la célula. Ya en el interior de la célula provoca la despolarización de la membrana y la lisis de endosomas y lisosomas. En consecuencia, aumenta la concentración de calcio intracelular, se liberan catepsinas y se activan caspasas que eventualmente, inducen la muerte celular. Tomado de Marinovic, *et al.* (2017).

Ensayos en ratones han demostrado que la crotamina se acumula en hígado, riñones, músculo esquelético, bazo, pulmón, corazón y médula ósea. Además, algunos autores han reportado que se acumula en cerebro, lo cual sugiere que esta toxina pudiera tener la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica (Boni-Mitake *et al.*, 2006; Hayashi *et al.*, 2008; Nascimento *et al.*, 2007). Diferentes hipótesis se han formulado acerca de cómo la crotamina es capaz de interactuar con los diferentes tejidos. Una de las más aceptadas, propone que la crotamina con su carga positiva, interactúa electrostáticamente con los glicosaminoglicanos de carga negativa como el heparán sulfato, ubicados en la membrana celular (Hayashi *et al.*, 2008; Nascimento *et al.*, 2007).

En ratones *in vivo* el efecto más importante es la parálisis rígida de las patas traseras y la necrosis del músculo esquelético (Boni-Mitake *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2018; Rizzi *et al.*, 2007). Además de la parálisis, los signos clínicos que se observan en ratones (20 g) inyectados con 6 µg de crotamina vía intraperitoneal son respiración



agitada y una intoxicación progresiva que ocasiona la muerte por paro respiratorio (Lima *et al.*, 2018; Rizzi *et al.*, 2007). La parálisis que se observa se atribuye al bloqueo de los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) 1.1 , 1.2 y 1.3 (Peigneur *et al.*, 2012). La capacidad de la crotamina para bloquear el canal Kv 1.3 contribuye al efecto citotóxico que tiene hacia células tumorales (Lima *et al.*, 2018; Peigneur *et al.*, 2012).

Simulaciones de acoplamiento molecular realizadas por Yount y colaboradores (2009) sugieren que la crotamina actúa en canales de Kv de la misma manera que la caribdotoxina del escorpión *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, la kaliotoxina del escorpión *Androctonus mauretanicus mauretanicus* y la cobatoxina del escorpión *Centruroides noxius*. Interacción en la que lisinas, tirosinas, argininas y triptófanos tienen un papel importante ya que se encuentran expuestos en la superficie de la crotamina (Peigneur *et al.*, 2012; Yount *et al.*, 2009).

La capacidad de la crotamina para inmovilizar a las presas representa una ventaja muy importante para la alimentación y supervivencia de las serpientes de cascabel (Boldrini-França *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2018; Teixeira-Araújo *et al.*, 2017). Sin embargo, la presencia de la crotamina en el veneno de las serpientes varía de acuerdo a la subespecie, la distribución geográfica y la edad (Calvete *et al.*, 2010; Durban *et al.*, 2017; Rádis-Baptista *et al.*, 2004). Debido a ello, las poblaciones que contienen crotamina en su veneno se clasifican como crotamina-positiva y las que no, crotamina-negativa (Boldrini-França *et al.*, 2010; Neri-Castro *et al.*, 2013; Rádis-Baptista *et al.*, 2004).

Además, la crotamina puede encontrarse en cantidades muy variables que van desde 1.5 hasta 37.9% del proteoma de diferentes serpientes del género *Crotalus* (Boldrini-França *et al.*, 2010; Calvete *et al.*, 2010; Durban *et al.*, 2017; Neri-Castro *et al.*, 2013). Se ha propuesto que la cantidad de crotamina depende del número de copias de su gen *Crt-p1* (Rádis-Baptista *et al.*, 2003). No obstante, otros autores proponen que la regulación traduccional mediada por micro ARNs (“miRNAs” por sus siglas en inglés) también tiene un papel importante (Durban *et al.*, 2017).

1.4 Antivenenos contra venenos de serpientes


Las mordeduras de serpiente constituyen un problema importante de salud pública a nivel mundial, sobre todo para las regiones con menos recursos económicos. La Organización Mundial de la Salud estima que 5 millones de personas son atacadas por serpientes venenosas cada año alrededor del mundo (figura 6). Más de 100,000 personas mueren a causa de envenenamientos por la mordedura de éstas serpientes y cerca de 400,000 sufren de amputaciones y otras consecuencias graves (Carrie, 2016). En México, tan sólo durante el 2018, se estima que hubo más de 3800 accidentes ofídicos de acuerdo con datos de la Secretaría de Salud (2019).



Nature Reviews | Disease Primers

Figura 6. Distribución geográfica y número de envenenamientos y muertes ocasionados por serpientes venenosas. Las regiones más afectadas son África, Asia y América Latina. Tomado de Gutiérrez, *et al.* (2017).

Actualmente, el único tratamiento que existe para neutralizar el veneno de las serpientes son los antivenenos, los cuales idealmente deben tener una alta capacidad neutralizante contra todos los componentes tóxicos del veneno (Fry, 2015). Los




antivenenos están constituídos por inmunoglobulinas o sus fragmentos Fab o F(ab')₂ de animales como caballos o borregos que han sido hiperinmunizados con uno o varios venenos durante un periodo de tiempo. Por lo general, los venenos que se utilizan para la producción de los antivenenos, son los de las especies de mayor relevancia médica dentro de una región (WHO, 2017).

A pesar de la gran efectividad de los antivenenos, una de las principales limitaciones que tienen es la gran cantidad que se requiere cuando tienen una baja potencia neutralizante (Borja *et al.*, 2018). Además, la abundancia de componentes poco inmunogénicos y la variabilidad intraespecie e interespecie de los venenos disminuyen su eficacia (Calvete *et al.*, 2009; Teixeira-Araújo *et al.*, 2017). Como ya se ha mencionado, la crotamina, es una de las toxinas menos inmunogénicas de los venenos de las serpientes del género *Crotalus*.

Ensayos de antivenómica realizados por Calvete y colaboradores (2010), han demostrado que el antiveneno polivalente del Instituto Clodomiro Picado (Costa Rica) contra *Bothrops asper*, *Crotalus simus* y *Lachesis stenophrys* no reconoce a la crotamina de *C. d. terrificus* ni la de *C. d. cumanensis*. Resultados similares se obtuvieron con el antiveneno botrópico-crotálico de la Universidad Central de Venezuela (Venezuela) producido a partir de los venenos de *B. colombiensis* y *C. d. cumanensis*, el antiveneno crotálico del Instituto Butantan (Brasil) producido contra *C. d. terrificus* y *C. d. collilineatus* y el antiveneno crotálico del Instituto Vital Brazil (Brasil) contra *C. d. terrificus* (Boldrini-França *et al.*, 2010; Calvete *et al.*, 2010).

Por otro lado, ensayos de neutralización realizados por Borja y colaboradores (2018) demostraron que el antiveneno Antivipmyn del Instituto Bioclón (México) y el faboterápico polivalente de Laboratorios Birmex (México), son incapaces de neutralizar la parálisis rígida producida por miotoxinas parecidas a la crotamina de *Crotalus molossus nigrescens*. El antiveneno CroFab de la compañía BTG (E.E.U.U.) producido contra *Agkistrodon piscivorus*, *C. adamanteus*, *C. atrox* y *C. scutulatus*, también muestra poca reactividad hacia la miotoxina “a” de *Crotalus viridis viridis* en ensayos de antivenómica (Saviola *et al.*, 2015).



En contraste, otros autores reportaron la obtención de anticuerpos contra crotamina inmunizando caballos y conejos con veneno de *C. d. terrificus* crotamina-positivo (Boldrini-França *et al.*, 2010; Teixeira-Araújo *et al.*, 2017). Mediante ensayos de antivenómica y Western blot se observó el reconocimiento de los anticuerpos hacia la crotamina de *C. d. terrificus*. Sin embargo, estos autores no mencionan si los anticuerpos producidos son capaces de neutralizar la parálisis rígida que produce la crotamina en ratones.

La ausencia de anticuerpos contra crotamina en los antivenenos sugiere que además de ser poco inmunógena en caballos, los venenos utilizados para su producción no contienen crotamina o la contienen en muy poca cantidad (Boldrini-França *et al.*, 2010; Calvete *et al.*, 2010; Teixeira-Araújo *et al.*, 2017). Debido a ello, la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria de Brasil (ANVISA) recomienda utilizar venenos crotamina-positivos de *C. durissus* para la producción de antivenenos (Teixeira-Araújo *et al.*, 2017).

2. ANTECEDENTES

2.1 Entrecruzamiento o conjugación de toxinas

Con la finalidad de reducir la toxicidad de los venenos y mejorar la respuesta de anticuerpos durante la producción de un antiveneno, se han propuesto varios tratamientos con agentes físicos y químicos. Estos tratamientos pueden ser fotooxidación, quelación, iodinación, exposición a calor, radiación con rayos X, gamma o ultravioleta; alquilación, y entrecruzamiento de toxinas o venenos con formaldehído o glutaraldehído (León *et al.*, 2011).

El entrecruzamiento o conjugación involucra la unión de una molécula con otra, a través de un enlace covalente, para formar complejos o conjugados que tengan propiedades fisicoquímicas diferentes (Hermanson, 2013). La producción de conjugados involucra el uso de agentes entrecruzadores que reaccionan con uno o más grupos funcionales en las moléculas que se desean entrecruzar. Para la producción de vacunas e inmunógenos, los reactivos entrecruzadores más utilizados son los homobifuncionales como el glutaraldehído (GTA) y los de longitud-cero como el hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC o EDAC) (Hermanson, 2013). En particular, el entrecruzamiento con glutaraldehído ha sido una de las estrategias más empleadas por su disponibilidad comercial, bajo costo y eficiencia para reducir la toxicidad de varios venenos sin afectar su inmunogenicidad (Ferreira *et al.*, 2016).

2.2 Mecanismos de reacción del glutaraldehído y EDC

El glutaraldehído es un reactivo entrecruzador homobifuncional que en soluciones acuosas puede encontrarse como dialdehído monomérico o polimérico. A pH neutro o ligeramente alcalino, las múltiples formas del glutaraldehído son altamente reactivas hacia proteínas. Entre los principales grupos funcionales de los aminoácidos con los que reacciona el glutaraldehído se encuentran aminas primarias, tioles, fenoles e imidazoles (Migneault *et al.*, 2004).

Uno de los diversos mecanismos de reacción del entrecruzamiento de proteínas y péptidos con glutaraldehído involucra la formación de bases de Schiff y la reducción con otro reactivo para formar un enlace amino estable (figura 7). La base de Schiff une la amina-ε de la lisina o la amina-α del extremo N-terminal de las proteínas con uno de los aldehídos del glutaraldehído. El aldehído que quedó libre puede entrecruzarse con otra proteína o péptido para formar polímeros de varios tamaños. Finalmente la reducción de la base de Schiff con otro reactivo como el cianoborohidruro, forma enlaces amino más estables (Hermanson, 2013).

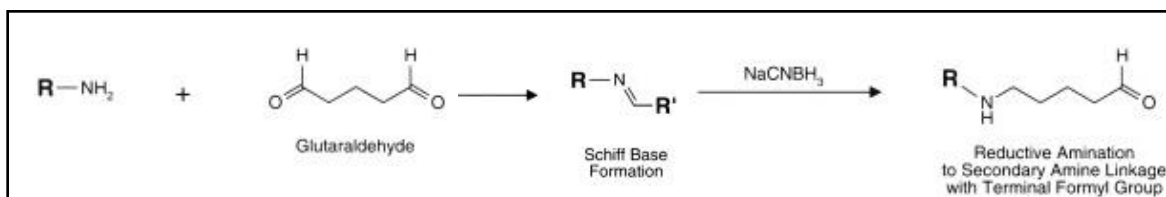


Figura 7. Mecanismo de reacción del entrecruzamiento de proteínas y péptidos con glutaraldehído. Uno de los aldehídos reacciona con una amina primaria para formar la base de Schiff como intermediario. La reducción de la base de Schiff da como resultado un enlace amino estable. Modificado de Hermanson, 2013.

La conformación y la actividad biológica de las proteínas entrecruzadas con glutaraldehído no se alteran drásticamente, porque los aminoácidos con los que reacciona se localizan en la superficie de las proteínas (Migneault *et al.*, 2004). Sin embargo, el glutaraldehído puede formar polímeros que pueden precipitarse por su alto peso molecular. Dado que el pH alcalino favorece la formación de las bases de Schiff, es recomendable controlar muy bien el pH de la reacción. Además, la fuerza iónica del buffer de reacción y la concentración del glutaraldehído tienen también un papel importante en el entrecruzamiento de proteínas o péptidos (Hermanson, 2013).

Otro de los reactivos más utilizados para el entrecruzamiento de proteínas es la carbodiimida EDC. El EDC es un reactivo entrecruzador longitud-cero que reacciona con los grupos carboxilo de las proteínas para formar el intermediario altamente reactivo O-acilisourea (Hermanson, 2013). Una vez activado el grupo carboxilo, éste reacciona con

las aminas primarias para formar un enlace amida con la liberación de isourea como subproducto (figura 8).

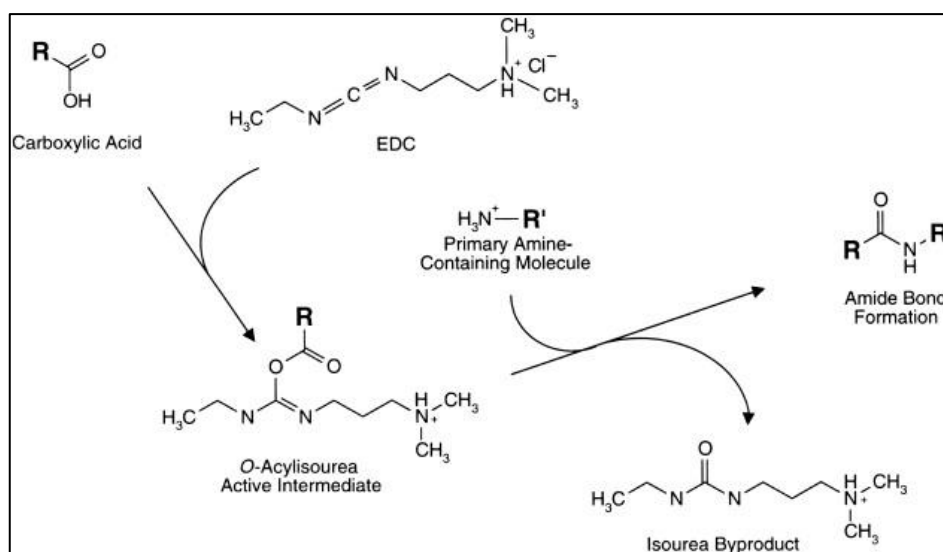


Figura 8. Mecanismo de reacción del entrecruzamiento de péptidos y proteínas con EDC. El EDC reacciona con el grupo carboxílico de una proteína para formar el intermediario O-acilisourea. El intermediario reacciona con las aminas primarias para formar un enlace amida liberando isourea como subproducto. Tomado de Hermanson, 2013.

Este tipo de reacción puede llevarse a cabo entre el extremo amino y el extremo carboxilo de las proteínas, además de las aminas primarias como la de la lisina. La máxima formación de enlaces amida ocurre entre pH 4.5 y 7.5, aunque a pH ácido existe una mayor hidrólisis del EDC. Una de las desventajas que tiene utilizar EDC como agente entrecruzador es que puede modificar la estructura antigénica de la proteína que se desea emplear como inmunógeno. Para conservar los sitios antigénicos de interés, algunos investigadores prefieren entrecruzar el antígeno consigo mismo y evitar el uso de proteínas acarreadoras (Hermanson, 2013).


2.3 Producción de conjugados de toxinas y venenos

El glutaraldehído se ha utilizado para producir conjugados del veneno o de fracciones tóxicas de varios escorpiones, con el propósito de mejorar la respuesta de anticuerpos y la neutralización de los venenos. Ferreira y colaboradores (2016) por ejemplo, utilizaron glutaraldehído con el propósito de detoxificar el veneno del escorpión *Tityus serrulatus*. Además de reducir los efectos adversos que se producen en los animales inmunizados, los conjugados de veneno producidos con glutaraldehído fueron capaces de generar anticuerpos neutralizantes. Resultados similares se obtuvieron con los conjugados de la fracción tóxica del veneno de *T. serrulatus* y albúmina sérica bovina (BSA) entrecruzados con glutaraldehído (Machado *et al.*, 2004). Los ratones inmunizados con estos conjugados desarrollaron una respuesta inmune protectora contra el veneno de *T. serrulatus* que duró hasta nueve semanas después de la última inmunización.

Por otra parte, conjugados de la fracción tóxica del veneno del escorpión *Buthus occitannus tunetanus* y conjugados de la fracción tóxica del veneno de *Androctonus australis hector* también se han producido con glutaraldehído (Kharrat *et al.*, 1997). Los ratones, caballos y monos inmunizados con estos conjugados produjeron anticuerpos neutralizantes contra los dos venenos. En el mismo trabajo, ratones inmunizados con estos conjugados desarrollaron una respuesta inmune protectora contra estos venenos, la cual fue eficiente hasta 54 días después de la última inmunización.

Possani y colaboradores (1981) produjeron conjugados de la fracción tóxica del veneno del escorpión *Centruroides noxius* con glutaraldehído. Además de reconocer el veneno de *C. noxius*, el suero obtenido de la inmunización de estos conjugados fue capaz de reconocer el veneno de otros escorpiones como *C. elegans*, *C. limpidus limpidus*, *C. suffusus suffusus*, *C. limpidus tecomanus* y *T. serrulatus*. Conejos inmunizados con estos conjugados desarrollaron una respuesta inmune protectora que les permitió sobrevivir a la inyección de 50 veces la DL₅₀ del veneno de *C. noxius*.

El glutaraldehído y el EDC se han utilizado como reactivos entrecruzadores para producir conjugados de la toxina Aahl del escorpión *Androctonus australis hector* utilizando BSA, hemocianina (KLH por sus siglas en inglés) o el análogo no tóxico de la




toxina AahlI como proteínas acarreadoras (Devaux *et al.*, 2002). Varios anticuerpos monoclonales con gran afinidad por la toxina Aahl fueron el resultado de la inmunización de ratones con estos conjugados. Sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron con los conjugados producidos con glutaraldehído. En contraparte, el anticuerpo monoclonal producido mediante la inmunización del conjugado de la fracción tóxica del veneno de *T. serrulatus* y BSA, neutralizó parcialmente la toxicidad de la fracción. (Alvarenga *et al.*, 2005).

En otros experimentos, Stiles y colaboradores (1992) demostraron la efectividad de utilizar como inmunógenos, conjugados de la α -conotoxina GI del cono marino *Conus geographus* y KLH u ovoalbúmina producidos con glutaraldehído. Los sueros de cabras y conejos inmunizados con estos conjugados reconocieron además de la α -conotoxina GI, otras α -conotoxinas como la MI y la SI. Además de ello, el suero obtenido de cabra, neutralizó la letalidad de las α -conotoxinas GI y MI.

Pocos han reportado el uso de conjugados producidos con glutaraldehído para mejorar la respuesta de anticuerpos hacia el veneno de serpientes. La Organización Mundial de la Salud (2017), recomienda evitar el uso de entrecruzadores para producir conjugados de venenos o toxinas, ya que los sitios antigénicos pueden modificarse. A pesar de la respuesta de anticuerpos que se produce en los animales inmunizados, éstos, por lo general no son neutralizantes.

No obstante, los conjugados con glutaraldehído de la fracción letal del veneno de *Naja naja sputatrix* y la neurotoxina schistosa-5 de la serpiente marina *Enhydrina achistasa* fueron buenos inmunógenos (Tan, 1983). La potencia neutralizante del suero obtenido mediante la inmunización de estos conjugados, fue mayor a la del suero obtenido con la inmunización de la fracción letal del veneno de *N. n. sputatrix*.

Por otro lado, Kuo y Chang (1991) produjeron conjugados monoméricos, diméricos y triméricos de la cobrotoxina de *Naja naja atra* con glutaraldehído. Mientras que la antigenicidad de los conjugados hacia anticuerpos anti-cobrotoxina se conservó, la letalidad y la actividad de unión a los receptores de acetilcolina se afectaron. Sin embargo, el suero obtenido mediante la inmunización con los conjugados, tuvo una




potencia neutralizante mayor que el suero obtenido mediante la inmunización con la cobrotoxina.

En otro trabajo se describió que el uso de conjugados de cobrotoxina, producidos con glutaraldehído como inmunógenos, puede influenciar la diversidad de anticuerpos que se producen (Chang *et al.*, 2003). Chang y colaboradores, encontraron que al inmunizar conjugados diméricos de la cobrotoxina de *N. n. atra* con glutaraldehído, se producían más anticuerpos contra la región carboxilo terminal de la cobrotoxina que inmunizando la cobrotoxina sin tratamiento.

En otros experimentos realizados por Tan y colaboradores (1990), se obtuvieron resultados similares con los conjugados de metaloproteasas del veneno de la cobra *Ophiophagus hannah* producidos con glutaraldehído. Además de conservar la inmunogenicidad de las metaloproteasas, los conjugados obtenidos no tuvieron actividad hemorrágica.

Aunado a ello, el glutaraldehído también se ha utilizado para producir conjugados de veneno de *Crotalus durissus terrificus* y de la mezcla del veneno de siete especies de *Bothrops* (*B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. neuwiedi*, *B. moojeni*, *B. alternatus*, *B. cotiara* y *B. prado*) (Guidolin *et al.*, 1989). La toxicidad de los conjugados de veneno producidos disminuyó, más no su capacidad antigénica para producir anticuerpos en caballos. En otro trabajo, el glutaraldehído ha sido utilizado para entrecruzar a la crotamina de *C. d. terrificus* con la proteína acarreadora BSA. Mientras que la inmunización de ratones con crotamina no generó anticuerpos, la inmunización del conjugado crotamina-BSA, lo hizo de manera importante contra crotamina. El resultado fue la generación de un anticuerpo monoclonal contra crotamina para fines diagnósticos, más no para fines terapéuticos (Losoya-Uribe, 2019).

Por su parte, el EDC se ha utilizado para la producción de conjugados de la cardiotoxina VII 1 de la cobra *Naja nivea* con poli-L-lisina (Osthoff, 1989). El suero obtenido de los animales inmunizados con estos conjugados fue capaz de reconocer a la cardiotoxina. Resultados similares se han obtenido con los conjugados de BSA y la ω -conotoxina GVI A sintética del cono marino *Conus geographus*, utilizando EDC como




entrecruzador (Tombaccini *et al.*, 1990). El anticuerpo monoclonal obtenido de la inmunización de estos conjugados fue capaz de reconocer a la toxina nativa y de bloquear su unión a los sinaptosomas de cerebro de ratón. Por el contrario, los conjugados de la crotoxina de *C. d. terrificus* producidos con EDC además de perder el 95% de su actividad fosfolipasa, también perdieron los epítomos importantes para su reconocimiento (Lennon *et al.*, 1990).

La producción de conjugados con glutaraldehído o EDC para mejorar la capacidad inmunogénica de las proteínas también se ha propuesto en otras áreas de la ciencia. Al respecto, De Filette y colaboradores (2011) demostraron que la inmunización de ratones con conjugados de la proteína M2e del virus de la influenza A y KLH producidos con glutaraldehído, fue capaz de inducir un título alto de anticuerpos IgG. En este mismo trabajo se demostró que los conjugados producidos con glutaraldehído fueron más inmunogénicos que los producidos con EDC. Además de ello, los ratones inmunizados con los conjugados desarrollaron una respuesta inmune protectora contra el virus de la influenza A.

Al comparar diferentes entrecruzadores utilizados en la conjugación de proteínas, Mera y colaboradores (2008) observaron que el glutaraldehído fue el reactivo más eficiente para entrecruzar N^ε-carboximetil lisina (CML) con albúmina sérica humana. La inmunización de ratones con estos conjugados resultó en la producción de anticuerpos específicos contra CML. Esto sugiere que además de ser altamente eficiente para entrecruzar proteínas y péptidos, el glutaraldehído también funciona para entrecruzar moléculas de baja masa.

Por otro lado, Vidunas y colaboradores (2016) observaron que conjugados de las toxinas recombinantes A y B de *Clostridium difficile* producidos con EDC y N-hidroxisuccinimida (NHS) fueron menos tóxicos que las toxinas nativas. Además de ello, varios anticuerpos monoclonales contra las toxinas nativas A y B fueron capaces de reconocer y unirse a los conjugados. Esto sugiere que el tratamiento con EDC y NHS no alteró los epítomos importantes para su reconocimiento. En ese mismo trabajo, la inmunización de hámsters con los conjugados generó anticuerpos capaces de neutralizar a las toxinas A y B de *C. difficile*.



En otro trabajo realizado por Paik y colaboradores (2010) se obtuvieron conjugados de ovoalbúmina (OVA), KLH y BSA con la pared celular del bacilo de Calmette-Guérin *Mycobacterium bovis* (BCG-CWS por sus siglas en inglés) producidos con EDC/NHS. La inmunización de ratones Balb-C con los conjugados de OVA y la pared celular produjeron una respuesta de anticuerpos de tipo Th1 comparable a lo que se obtiene al inmunizar OVA y adyuvante completo de Freund. Los autores sugieren que el entrecruzamiento de antígenos con la pared micobacteriana utilizando EDC/NHS puede contribuir al desarrollo de vacunas contra infecciones, enfermedades alérgicas y cáncer.

Finalmente, con un objetivo diferente al de obtener anticuerpos neutralizantes, Karpel y colaboradores (2018) utilizaron el reactivo entrecruzador orto-piridildisulfuro-polietilenglicol-N-hidroxisuccinimida (OPSS-PEG-SVA por sus siglas en inglés) para producir conjugados de nanopartículas de oro coloidal con crotamina. Los conjugados obtenidos conservaron la capacidad para interactuar con células HeLa (derivadas de un cáncer cérvicouterino hace más de 60 años), lo cual abre la posibilidad para otras aplicaciones biomédicas.

Los resultados descritos anteriormente sugieren que el uso de conjugados de proteínas o péptidos producidos mediante entrecruzamiento con glutaraldehído o EDC como inmunógenos, pueden favorecer la respuesta de anticuerpos. En particular, esto puede contribuir al mejoramiento de antivenenos contra venenos que contengan toxinas poco inmunogénicas o difíciles de neutralizar como la crotamina de *C. d. terrificus*.

3. JUSTIFICACIÓN

La crotamina representa de 1.5 hasta un 38.0% de la composición del proteoma del veneno de las serpientes del género *Crotalus*. La baja inmunogenicidad de la crotamina reduce la efectividad de los antivenenos diseñados para neutralizar venenos de serpientes de cascabel crotamina-positivo. Los conjugados del veneno de la serpiente sudamericana *Crotalus durissus terrificus* producidos con glutaraldehído o EDC, o bien, de crotamina-crotamina producidos con los mismos entrecruzadores, pueden mejorar la inmunogenicidad de la crotamina. La utilización de alguno de éstos conjugados como inmunógenos puede contribuir al desarrollo de antivenenos con mayor potencia neutralizante hacia crotamina.

4. HIPÓTESIS

Los conjugados del veneno de *C. d. terrificus* o crotamina-crotamina serán buenos inmunógenos y servirán para que los animales inmunizados desarrollen anticuerpos neutralizantes contra crotamina.

5. OBJETIVO GENERAL

Producir conjugados de crotamina y evaluarlos como inmunógenos en conejos.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- § Producir conjugados de crotamina-crotamina mediante entrecruzamiento con EDC.
- § Producir conjugados del veneno de *C. d. terrificus* mediante entrecruzamiento con glutaraldehído o EDC.
- § Caracterizar los conjugados mediante técnicas electroforéticas y bioensayos de toxicidad en ratones.
- § Inmunizar conejos con los conjugados obtenidos y evaluar la producción de anticuerpos mediante ensayo inmunoenzimático.
- § Analizar el reconocimiento de los sueros producidos en conejos hacia los componentes de venenos de varias especies del género *Crotalus* mediante Western blot.
- § Analizar el reconocimiento de los sueros producidos en conejos hacia los epítomos conformacionales o lineales de crotamina mediante Slot blot.
- § Determinar la potencia neutralizante de los sueros producidos en conejos hacia crotamina y hacia el veneno de *C. d. terrificus*.

7. METODOLOGÍA

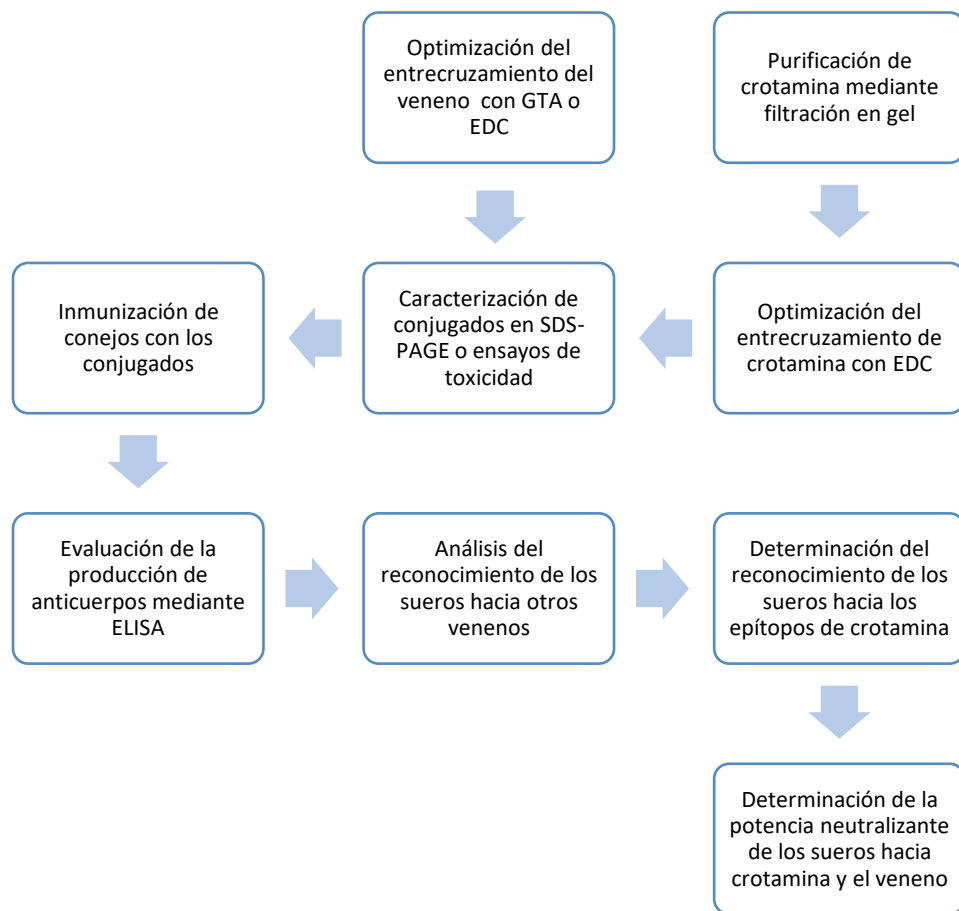



Figura 9. Diagrama de flujo de la metodología general del proyecto. Abreviaciones: BSA: albúmina sérica bovina; GTA glutaraldehído; EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.

7.1 Buffers y soluciones de trabajo

En el anexo 1 se encuentra la composición y la forma de preparación de cada uno de los buffers y soluciones de trabajo empleadas en este proyecto.

7.2 Purificación de crotamina mediante filtración en gel

Para la obtención de crotamina, se realizó una purificación mediante filtración en gel a partir del veneno liofilizado de la serpiente sudamericana *C. d. terrificus*. El veneno con número de lote Cdt_Mtox-062618 fue adquirido del Centro Nacional de



Investigación en Toxinas Naturales (NNTRC) de E.E.U.U. La columna (200 cm de alto y 1.2 cm de diámetro) se empacó con resina Sephadex G-75 (Sigma) y se equilibró con 2 volúmenes de acetato de amonio 20 mM pH 4.7.

Después se pesaron y resuspendieron 20 mg de veneno liofilizado en 1.8 mL de acetato de amonio 20 mM pH 4.7. La solución se centrifugó a 16,873 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente utilizando la centrífuga 5418 (Eppendorf). La concentración del sobrenadante se determinó en base a la absorbancia a 280 nanómetros (A_{280nm}) utilizando el espectrofotómetro BioMate (ThermoScientific) y una celda de cuarzo de 1 cm de longitud. Con base en la ley de Lambert-Beer, se asumió que una absorbancia de uno equivale a 1 mg/mL.

Para la cromatografía, 20 U.A._{280nm} se cargaron en la columna, la elución se realizó a temperatura ambiente a una velocidad de flujo promedio entre 12 y 15 mL/hora y las fracciones se recolectaron con un colector. Posteriormente se determinó la concentración de las fracciones y los resultados se graficaron con el software Prisma. Para la detección de NaCl, se determinó la conductividad eléctrica con un conductímetro. Las fracciones obtenidas se concentraron mediante liofilización, se resuspendieron en un volumen de 2 a 3 mL de buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.2 y se determinó la concentración. Las fracciones se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) en el sistema tris-tricina.

Sólo para los ensayos de entrecruzamiento, la fracción de crotamina se desaló mediante filtración en gel utilizando resina Sephadex G10-120 (Sigma) en buffer de fosfatos 0.025 M pH 7.2. Las fracciones obtenidas se juntaron y se concentraron mediante liofilización. Finalmente, la fracción de crotamina se resuspendió en H₂O destilada y se determinó la concentración.

7.3 Entrecruzamiento de crotamina con EDC


Para la obtención de conjugados de crotamina con EDC se utilizó buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.2 y EDC a una concentración 100 y 500 veces mayor a la de crotamina. La concentración de crotamina se ajustó a 2.5 mg/mL (512 nM) utilizando el valor de la $A_{280\text{nm}}$ corregido por el coeficiente de extinción de crotamina ($\epsilon_{1\text{ mg/mL}}=2.6$). En un volumen de reacción de 500 μL , se realizaron mezclas con 10 o 50 mg/mL de EDC (Thermo Scientific), correspondientes a 52 y 260 mM, respectivamente. Las muestras se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Como control negativo se utilizó crotamina sin EDC. Los conjugados resultantes se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

7.4 Caracterización de los conjugados de crotamina con EDC.

Para determinar la masa molecular de los conjugados de crotamina obtenidos, las muestras se caracterizaron mediante SDS-PAGE al 15% bajo condiciones reductoras. Por otro lado, se realizó una cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa (HPLC) en una columna analítica Vydac® 218 TP (C_{18} , 5 μm , 4.6 x 250 mm). Se cargaron 250 μg de cada conjugado o del control negativo (crotamina sin EDC) en 1.8 mL de solución A. La elución se realizó a una velocidad de flujo de 1 mL/min y el gradiente de solución B que se utilizó fue de 0 a 70% de acuerdo con lo siguiente: 0% durante 5 minutos, 0-15% durante 10 minutos, 15-45% durante 60 minutos, 45-70% durante 10 minutos y 70% durante 10 minutos. La integración de las señales a 214 nm y a 280 nm se realizó utilizando el software ChemStation B.04.01 (Agilent).

7.5 Entrecruzamiento del veneno de *C. d. terrificus* con glutaraldehído o EDC

Para la obtención de conjugados de veneno de *C. d. terrificus* se utilizó un veneno con 34.2% de crotamina, el cual estaba liofilizado y almacenado en el Laboratorio del Dr. Alejandro Alagón del Instituto de Biotecnología UNAM. El veneno se resuspendió en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.2 y se determinó la concentración asumiendo que una



absorbancia de uno a 280 nm equivale a 1 mg/mL. La concentración se ajustó a 10 mg/mL en un volumen de reacción de 500 μ L y se realizaron mezclas con diferentes concentraciones de glutaraldehído (Sigma) en un rango de 0.013 a 1%.

Las muestras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación suave en un agitador orbital (Labnet) y la reacción se detuvo añadiendo tris-HCl 1 M pH 8.0. Para separar los conjugados solubles de los conjugados insolubles, las muestras se centrifugaron a 16,873 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente utilizando la centrífuga 5418 (Eppendorf). Posteriormente, se determinó la concentración de los conjugados solubles. Ambos tipos de conjugados se almacenaron a -20°C para su posterior caracterización.

Para la obtención de conjugados de veneno de *C. d. terrificus* utilizando EDC, el veneno se pesó y resuspendió en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.2. La concentración del veneno se ajustó a 2.5 mg/mL asumiendo que una absorbancia de uno a 280 nm equivale a 1 mg/mL. Después, en un volumen de reacción de 1 mL se realizaron mezclas con 10 o 50 mg/mL de EDC. Las muestras se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Como control negativo se utilizó veneno de *C. d. terrificus* sin entrecruzador.

7.6 Caracterización de los conjugados de veneno de *C. d. terrificus* producidos con glutaraldehído o EDC

Para evaluar la masa de los conjugados producidos y el porcentaje de entrecruzamiento de los componentes principales del veneno, las muestras se caracterizaron mediante SDS-PAGE al 15% bajo condiciones reductoras. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie y se analizó la intensidad de las bandas en el gel de SDS-PAGE con el software ImageJ. El porcentaje de entrecruzamiento de los principales componentes del veneno se determinó en relación con el área bajo la curva de cada pico resultante del análisis con el software ImageJ.

7.7 Toxicidad de los conjugados de veneno de *C. d. terrificus* producidos con glutaraldehído o EDC

Para evaluar si los conjugados de veneno producían parálisis rígida de las patas traseras o la muerte de los ratones, se realizaron ensayos de toxicidad en ratones CD-1 sexo indistinto de 18 a 20 g de peso. Se inyectó un ratón por dosis y se utilizaron cuatro grupos de ratones de acuerdo a lo siguiente: 1) grupo control inyectado con 5 o 10 μg de veneno completo de *C. d. terrificus*; 2) grupo inyectado con 5, 10, 20, 30 o 40 μg de conjugados solubles de veneno de *C. d. terrificus* producidos con 0.025% de glutaraldehído; 3) grupo inyectado con 10, 20, 40, 60 u 80 μg de conjugados solubles de veneno de *C. d. terrificus* producidos con 0.05% de glutaraldehído; y 4) grupo inyectado con 30, 60, 120 o 240 μg de conjugados solubles de veneno de *C. d. terrificus* producidos con 0.1% de glutaraldehído.

Para los ensayos de toxicidad de los conjugados de veneno de *C. d. terrificus* con EDC se utilizaron ratones con las características descritas anteriormente. Se inyectó un ratón por dosis y se utilizaron tres grupos de ratones de acuerdo a lo siguiente: 1) grupo control inyectado con 5 o 10 μg de veneno completo de *C. d. terrificus*; 2) grupo inyectado con 10, 80 y 150 μg de conjugados de veneno de *C. d. terrificus* producidos con 10 mg/mL de EDC; y 3) grupo inyectado con 10, 80 y 150 μg de conjugados de veneno de *C. d. terrificus* con 50 mg/mL de EDC.

Finalmente, los ratones se monitorearon durante 24 horas, se registró la presencia o ausencia de la parálisis rígida de las patas traseras de los ratones (efecto de crotamina) y el número de muertes.

7.8 Inmunización de conejos con conjugados de veneno de *C. d. terrificus* producidos con glutaraldehído o EDC

El esquema de inmunización de conejos con el veneno de *C. d. terrificus* o sus conjugados se diseñó en base a la experiencia del laboratorio del Dr. Alejandro Alagón. Se utilizaron cuatro grupos de 2 o 3 conejos hembras Nueva Zelanda inmunizados de la siguiente manera: Grupo I inmunizado con el veneno completo de *C. d. terrificus*; grupo


II inmunizado con los conjugados solubles de veneno con 0.05% de glutaraldehído; grupo III inmunizado con los conjugados insolubles de veneno con 0.05% de glutaraldehído; y grupo IV inmunizado con los conjugados solubles de veneno con 10 mg/mL de EDC.

El esquema de inmunización duró 98 días para los grupos I, II y III, mientras que para el grupo IV duró 112 días. En ambos esquemas de inmunización se alternaron el adyuvante incompleto de Freund (IFA), el adyuvante fosfato de aluminio (ADJU-PHOS) y el antígeno sin adyuvante (tabla 1). La cantidad de proteína inmunizada al inicio fue de 30 µg por conejo hasta alcanzar una dosis de 500 µg.

Tabla 1. Esquema de inmunización de conejos con los conjugados de veneno de *C. d. terrificus* con glutaraldehído o EDC. **Sólo el grupo IV inmunizado con los conjugados de veneno con EDC. IFA: adyuvante incompleto de Freund; ADJU-PHOS: adyuvante de fosfato de aluminio; SC: vía subcutánea.

Inmunización		Dosis (µg/conejo)	Adyuvante (mL)	Vía de administración (2 a 4 puntos)	Sangría (mL)
Número	Día				
1	0	30	IFA (1.5)	SC	1
2	7	30	IFA (1.5)	SC	-
3	14	60	ADJU-PHOS (1.5)	SC	-
4	21	150	IFA (1.5)	SC	2
5	28	300	Sin adyuvante	SC	2
6	42	500	ADJU-PHOS (1.5)	SC	2
7	56	500	IFA (1.5)	SC	2
8	70	500	Sin adyuvante	SC	2
9	84	500	ADJU-PHOS (1.5)	SC	2
10	98	500	IFA (1.5)	SC	2
11**	112	500	Sin adyuvante	SC	2

Las inmunizaciones se realizaron vía subcutánea alternando 2 o 4 puntos de inyección en el lomo de los conejos. Es decir, en las inmunizaciones 1, 3, 5, 7, 9 y 11 se inyectó en 4 puntos diferentes del lomo del conejo y en las inmunizaciones 2, 4, 6, 8 y 10 se inyectó en 2 puntos diferentes. En cada inmunización se tomaron muestras de



sangre de todos los conejos y se centrifugaron para la obtención de suero a 16,873 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente.

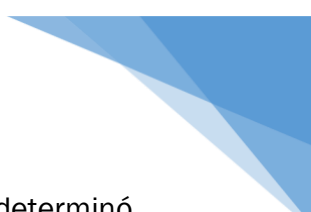
La sangría a blanco se realizó una semana después de la 10^a inmunización para los conejos de los grupos I, II y III y una semana después de la 11^a inmunización para los conejos del grupo IV. Los sueros obtenidos se almacenaron en congelación a -20°C para sus análisis posteriores.

7.9 Evaluación de la producción de anticuerpos mediante ELISA

Para evaluar la producción de anticuerpos, el análisis de los sueros obtenidos de los conejos se realizó en ELISA indirecto. Placas de poliestireno de 96 pozos se sensibilizaron con 100 µL/pozo de buffer de sensibilización con veneno completo de *C. d. terrificus* (1 µg/mL) o con crotamina pura (3 µg/mL) durante 1 hora a 37°C. El bloqueo de las placas se realizó con 200 µL/pozo de solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se añadió el suero obtenido de los conejos inmunizados realizando diluciones seriadas 1:3 en buffer de reacción y se incubó durante 1 hora a 37°C.

Después se añadieron 100 µL/pozo de anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (KPL) en buffer de reacción durante 1 hora a 37°C y las placas se revelaron con 100 µL/pozo del sustrato ABTS (Roche Diagnostics). La reacción se detuvo con 25 µL/pozo de solución de paro y entre cada paso, se realizaron tres lavados con 200 µL/pozo de buffer de lavado. La absorbancia de los pozos se determinó a 405 nm en el lector de microplacas Sunrise (Tecan) y se calculó el título de anticuerpos (EC₅₀) en un análisis de regresión no lineal utilizando el software Prisma. El título de anticuerpos se determinó como la dilución de suero a la cual se obtiene el 50% de la absorbancia máxima a 405 nm.

Para la normalización de los títulos de anticuerpos, en cada placa se utilizó como control el pool de suero de los conejos del grupo I inmunizados con el veneno de *C. d. terrificus*. Se determinó el promedio de los títulos del suero control de cada placa y se




calculó un factor de corrección para cada placa. El factor de corrección se determinó como el cociente del promedio de los títulos del suero control entre el título del suero control en cada placa. Los títulos de anticuerpos normalizados para cada suero se determinaron como el producto del título de anticuerpos por el factor de corrección de cada placa.

7.10 Análisis del reconocimiento de los pools de sueros hacia los componentes de venenos de serpientes de cascabel mexicanas mediante Western blot

Para caracterizar el reconocimiento de los sueros hacia los componentes de venenos de vipéridos mexicanos, se realizó un ensayo de Western blot. Los venenos y toxinas se separaron mediante SDS-PAGE al 15% bajo condiciones reductoras utilizando el sistema tris-tricina. En el primer pozo se cargó el marcador de peso molecular, en el segundo 5 µg del veneno de *C. basiliscus*, en el tercer y cuarto pozo 5 µg del veneno de *C. durissus terrificus*, en el quinto pozo 5 µg del veneno de *C. molossus nigrescens*, en el sexto pozo 5 µg del veneno de *C. simus simus*, en el séptimo pozo 5 µg del veneno de *C. simus culminatus*, en el octavo pozo 3 µg de crotoxina de *C. d. terrificus* y en el noveno y décimo pozo 3 µg de crotamina pura de *C. d. terrificus*.

Posterior a la corrida, las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en una cámara de transferencia durante 1 hora a 400 mA utilizando buffer de transferencia. Finalizado este tiempo, se retiró la membrana de la cámara y se incubó con 10 mL de buffer de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Para la inmunodetección, se mezclaron los sueros de la sangría final de los conejos por grupo (pool de suero). Cada membrana se incubó con 10 mL del pool de suero correspondiente en dilución 1:1,000 o en dilución proporcional al suero con los títulos de anticuerpos más bajo (1:1,000 a 1:4,000). Las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con 10 mL de anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (Invitrogen) en dilución 1:7,000 utilizando buffer TBS-T.



Finalmente, las membranas se revelaron con 1 mL del sustrato NBT/BCIP (Sigma). La reacción se detuvo con H₂O destilada y entre cada paso se realizaron tres lavados con 10 mL de buffer de lavado cada uno.

7.11 Análisis del reconocimiento de los pools de sueros hacia los epítomos conformacionales o lineales de crotamina

Para definir el tipo de epítomos que reconocen los sueros obtenidos, se realizó un ensayo de Slot blot utilizando crotamina sin desnaturizar o desnaturizada. Primero, 15 µg de crotamina se añadieron en 500 µL de buffer de desnaturización 1x y se incubaron a 90°C durante 5 minutos. Después, se colocó una membrana de nitrocelulosa en una cámara Hoefer PR 648 (Amersham Pharmacia Biotech) acoplada a una bomba de vacío. En el primer pozo se cargaron 100 µL de veneno de *C. d. terrificus* (50 µg/mL) como control positivo, en el segundo 100 µL de crotamina sin desnaturizar (30 µg/mL), en el tercero 100 µL de crotamina desnaturizada (30 µg/mL) y en el cuarto pozo 100 µL de TBS. Las muestras se filtraron aplicando vacío y la membrana se retiró de la cámara.

Posteriormente, la membrana se incubó con 5 mL de solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Para la inmunodetección, cada membrana se incubó por separado con 5 mL del pool de suero correspondiente en dilución 1:1,000 con buffer TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, las membranas se incubaron con 5 mL de anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (Invitrogen) en dilución 1:7,000 con buffer TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas se revelaron con 1 mL del sustrato NBT/BCIP (Sigma). Entre cada paso, se realizaron tres lavados con 5 mL de buffer de lavado.

7.12 Determinación de la dosis letal media de crotamina y del veneno de *C. d. terrificus*

Para conocer la letalidad de la crotamina, se determinó la dosis letal media (DL₅₀) utilizando grupos de tres ratones sexo indistinto de 18 a 20 g de peso de la cepa CD-1. Cada grupo se inyectó vía intravenosa con diferentes dosis de crotamina pura en un volumen de 500 µL (150 mM NaCl)/ratón. La duración y el nivel de la parálisis de las patas traseras de los ratones, así como el número de muertes, se registró dentro de las 48 horas posteriores a la inyección.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante regresión no lineal utilizando el software Prisma. Se expresó como DL₅₀ la cantidad de crotamina necesaria para matar al 50% de la población de ratones inyectados. El mismo procedimiento se utilizó para determinar la DL₅₀ del veneno de *C. d. terrificus*.

7.13 Determinación de la potencia neutralizante de los pools de sueros de conejo

Para conocer la potencia neutralizante de los sueros de conejo, se determinó la dosis efectiva media (DE₅₀) utilizando grupos de tres ratones sexo indistinto de 18 a 20 g de peso de la cepa CD-1. Diferentes volúmenes de cada pool de suero se mezclaron con 3 DL₅₀ de crotamina pura. El volumen se ajustó a 500 µL/ratón con 150 mM NaCl y las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, cada ratón se inyectó con 500 µL de la mezcla correspondiente vía intravenosa. El nivel y la duración de la parálisis rígida de las patas traseras, así como el número de muertes se registró durante 48 horas posteriores a la inyección.

Como control positivo se utilizó una mezcla de 3 DL₅₀ de crotamina en 150 mM NaCl. Los resultados se analizaron mediante regresión no lineal utilizando el software Prisma (Graphpad). La DE₅₀ se determinó en base al volumen de suero necesario para proteger al 50% de la población de ratones inyectados. El mismo procedimiento se utilizó para la determinación de la DE₅₀ de los sueros de conejo contra el veneno de *C. d. terrificus*, ensayo en el cual se utilizaron 3 DL₅₀ de veneno como control positivo. El veneno empleado en este experimento contenía 26.0% de crotamina.

7.14 Determinación de la potencia neutralizante de los sueros contra 2 y 3 μg de crotamina

Este ensayo se realizó para conocer la potencia neutralizante de los sueros hacia dosis menores a 3 DL_{50} de crotamina. Primero, se observó la parálisis rígida de las patas traseras de ratones producida por 2 o 3 μg de crotamina pura. Grupos de tres ratones sexo indistinto de 18 a 20 g de peso de la cepa CD-1, se inyectaron vía intravenosa con 1, 2 o 3 μg de crotamina pura en un volumen de 500 μL (NaCl 150 mM)/ratón. El nivel y la duración de la parálisis rígida de las patas traseras se monitoreó dentro de las 24 horas posteriores a la inyección.

La potencia neutralizante de los sueros se determinó utilizando grupos de tres ratones con las características descritas anteriormente. Un volumen de 100 μL de cada pool de suero se mezcló con 2 o 3 μg de crotamina pura. El volumen se ajustó a 500 μL /ratón con 150 mM NaCl y las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37°C. A cada ratón se le inyectaron 500 μL de la mezcla correspondiente vía intravenosa. El nivel y la duración de la parálisis rígida de las patas traseras se observó dentro de las 24 horas posteriores a la inyección. La neutralización de la parálisis rígida se determinó en base a la presencia o ausencia de parálisis al momento de la inyección, a la hora y a las dos horas.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 El veneno de *C. d. terrificus* contiene seis fracciones principales

Dentro de los componentes del veneno de *C. d. terrificus*, los más abundantes son la crotoxina y la crotamina (Melani *et al.*, 2015). En este trabajo la purificación de crotamina se realizó a partir del veneno de *C. d. terrificus* por su alto contenido en crotamina, que puede componer hasta el 19.0% de su proteoma (Calvete *et al.*, 2010).

En la figura 10 se muestra el cromatograma obtenido de la purificación de crotamina mediante filtración en gel utilizando la resina Sephadex G-75, que separa proteínas de entre 3 y 80 kDa. Como marcadores de masa molecular se utilizaron azul de dextrano (2,000 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), lisozima (14 kDa) y NaCl. La fracción de NaCl se detectó determinando la conductividad eléctrica con un conductímetro.

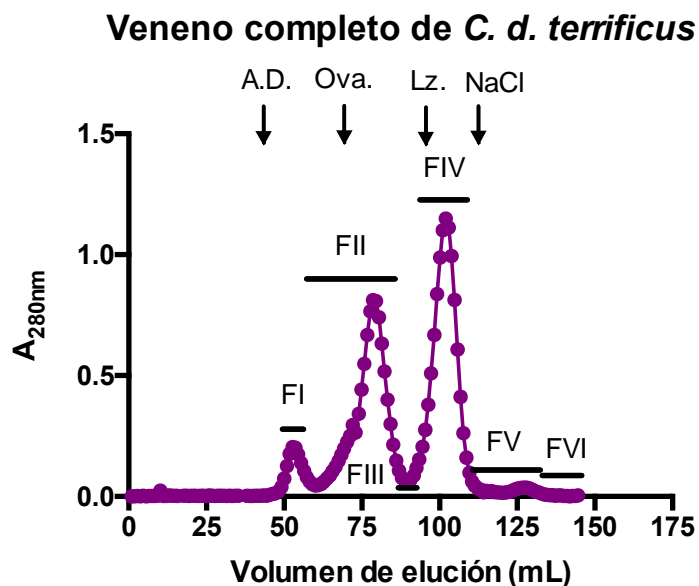


Figura 10. Cromatograma de la purificación de crotamina mediante filtración en gel. Para la purificación se utilizó resina Sephadex G-75 en acetato de amonio 20 mM pH 4.7 y se cargaron 20 UA_{280nm} de veneno de *C. d. terrificus*. A.D.: Azul de dextrano, Ova.: Ovoalbúmina; Lz.: lisozima. En el eje X se muestra el volumen de elución para cada fracción mientras que en el eje Y se muestra la A_{280nm} . El veneno se separó en seis fracciones, de las cuáles la FI contenía a los componentes de mayor masa molecular y la FVI los de menor masa molecular.

Similar a lo obtenido por varios autores (Boni-Mitake *et al.*, 2001; Lourenço *et al.*, 2013; Mancin *et al.*, 1998), el fraccionamiento del veneno de *C. d. terrificus* utilizando la resina Sephadex G-75 dio como resultado seis fracciones, de las cuales la fracción I contenía componentes de alta masa molecular, la fracción II y III componentes de mediana masa molecular y la fracción IV componentes de baja masa molecular. Las fracciones V y VI contenían componentes no proteicos de baja masa molecular.

Para conocer la composición de las fracciones obtenidas de la purificación mediante filtración en gel, las fracciones fueron analizadas mediante SDS-PAGE al 15% bajo condiciones reductoras (figura 11).

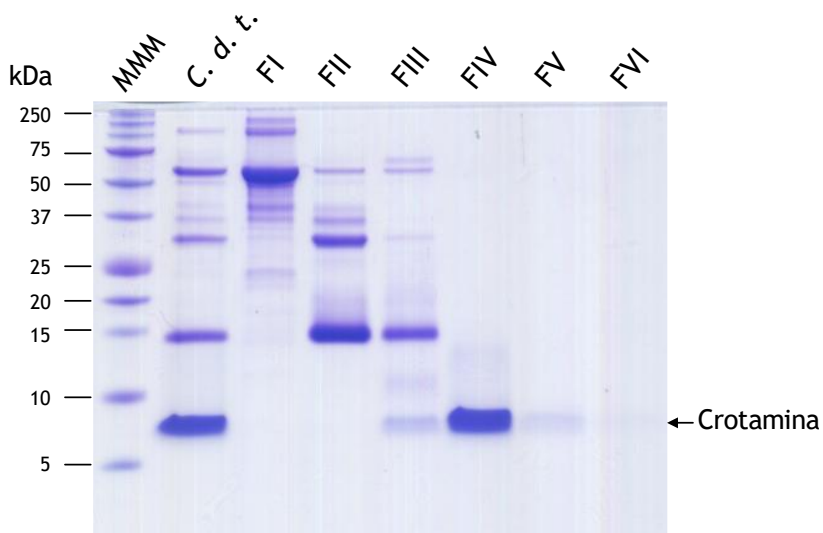


Figura 11. SDS-PAGE al 15% bajo condiciones reductoras de las fracciones obtenidas de la filtración en gel del veneno de *C. d. terrificus*. MMM: Marcador de masa molecular; *C. d. t.*: 15 µg del veneno de *C. d. terrificus*; F I: 15 µg de la fracción I; F II: 15 µg de la fracción II; F III: 15 µg de la fracción III; F IV: 7.5 µg de la fracción IV; F V: 15 µg de la fracción V; F VI: 16 µL de la fracción VI.

Los resultados del SDS-PAGE mostraron que la fracción I estaba compuesta de proteínas entre 37 y 250 kDa, la fracción II proteínas entre 15 y 75 kDa, la fracción III proteínas entre 5 y 75 kDa, la fracción IV y V proteínas de 5 kDa. Por su parte, no se observaron proteínas en la fracción VI, lo cual sugiere que esta fracción no contenía componentes proteicos. De acuerdo a las masas reportadas para las principales

proteínas del veneno de *C. d. terrificus*, se puede afirmar que la fracción I estaba compuesta principalmente por la convulxina, una lectina tipo-C de 75 kDa; la fracción II compuesta de la serinproteasa giroxina y la subunidad básica de la fosfolipasa de tipo A2 crotoxina, de 33 y 13 kDa respectivamente; la fracción III compuesta por la subunidad básica de la crotoxina y la miotoxina crotamina; las fracciones IV y V compuestas por crotamina de 5 kDa y la fracción VI formada por componentes no proteicos como aminoácidos libres, moléculas orgánicas y sales (Lourenço et al., 2013). A pesar de que la crotamina tiene una masa molecular de 5 kDa, migró cerca de los 7 kDa probablemente por su alta carga catiónica.

Adicionalmente, se determinó el rendimiento promedio de la separación del veneno de *C. d. terrificus* mediante filtración en gel con énfasis en la crotamina. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Rendimiento de la separación del veneno de *C. d. terrificus* mediante filtración en gel. Las UA_{280nm} iniciales fueron 20, por otro lado, el porcentaje de recuperación fue 89.0%.

Fracción	Número de tubos	Volumen colectado (mL)	A _{280nm}	UA _{280nm}	Recuperación (%)
Veneno de <i>C. d. terrificus</i>	NA	1.8	11.1	20	100
I	52-60	8.2	0.065	0.5	2.5
II	61-88	26	0.285	7.4	37.0
III	89-93	4.6	0.047	0.2	1.0
IV	91-114	19.2	0.456	8.8	44.0
V	115-142	26	0.029	0.8	4.0
VI	143-156	13.5	0.007	0.1	0.5

El total del veneno recuperado fue de 89.0%, mientras que la fracción más abundante fue la IV que contenía a la crotamina, con un 44.0%. El resultado de la purificación fue muy importante porque en un solo paso se logró obtener a la crotamina con un porcentaje de pureza del 96% determinado mediante HPLC en fase reversa (datos no mostrados). La crotamina obtenida se utilizó para los ensayos de

determinación de dosis letal media (DL₅₀) de crotamina y de potencia neutralizante de los sueros de los conejos inmunizados (DE₅₀).

Por otra parte, con la finalidad de evitar que la crotamina contuviera trazas de acetato de amonio que pudieran interferir con los entrecruzadores, se realizó un segundo paso de purificación. En la figura 12 se muestra el cromatograma de la desalación de 10.9 UA_{280nm} de crotamina pura utilizando la resina Shepadex G10-120.

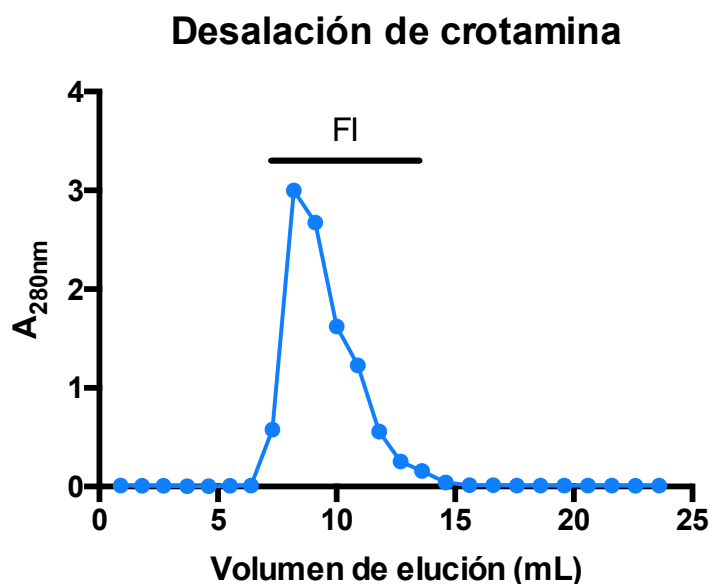


Figura 12. Cromatograma de la desalación de crotamina mediante filtración en gel. Se utilizó resina Sephadex G10-120 en buffer de fosfatos 0.025 M pH 7.2 y se cargaron 10.9 UA_{280nm} de crotamina. En el eje X se muestra el volumen de elución para cada fracción, mientras que en el eje Y se muestra la A_{280nm}. El volumen de elución de crotamina fue de entre 5 y 15 mL.

En el cromatograma de la desalación sólo se observó una fracción entre 5 y 15 mL, la cual correspondía a la crotamina. Las fracciones obtenidas de tres purificaciones se juntaron, se concentraron mediante liofilización y se resuspendieron en H₂O destilada para el ensayo de entrecruzamiento de crotamina.

8.2 El entrecruzador EDC es poco eficiente para producir conjugados de crotamina.

El ensayo de entrecruzamiento de crotamina se realizó con 10 o 50 mg/mL del reactivo EDC a pH 7.2, previa remoción del acetato de amonio de la crotamina mediante filtración en gel. Esto corresponde a una concentración 100 y 500 veces mayor a la de crotamina, lo que equivale a 511 μM de crotamina y 52 y 261 mM de EDC respectivamente. Los resultados del entrecruzamiento se analizaron mediante SDS-PAGE al 15% bajo condiciones reductoras (figura 13).

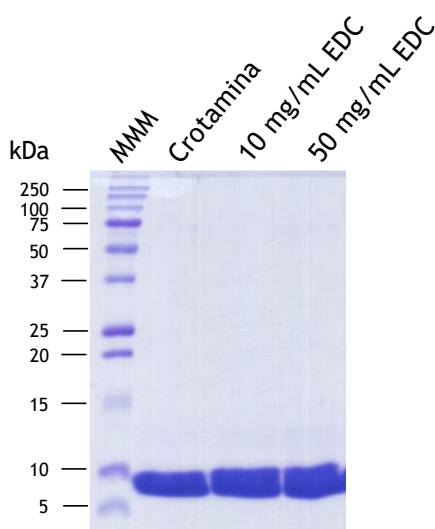
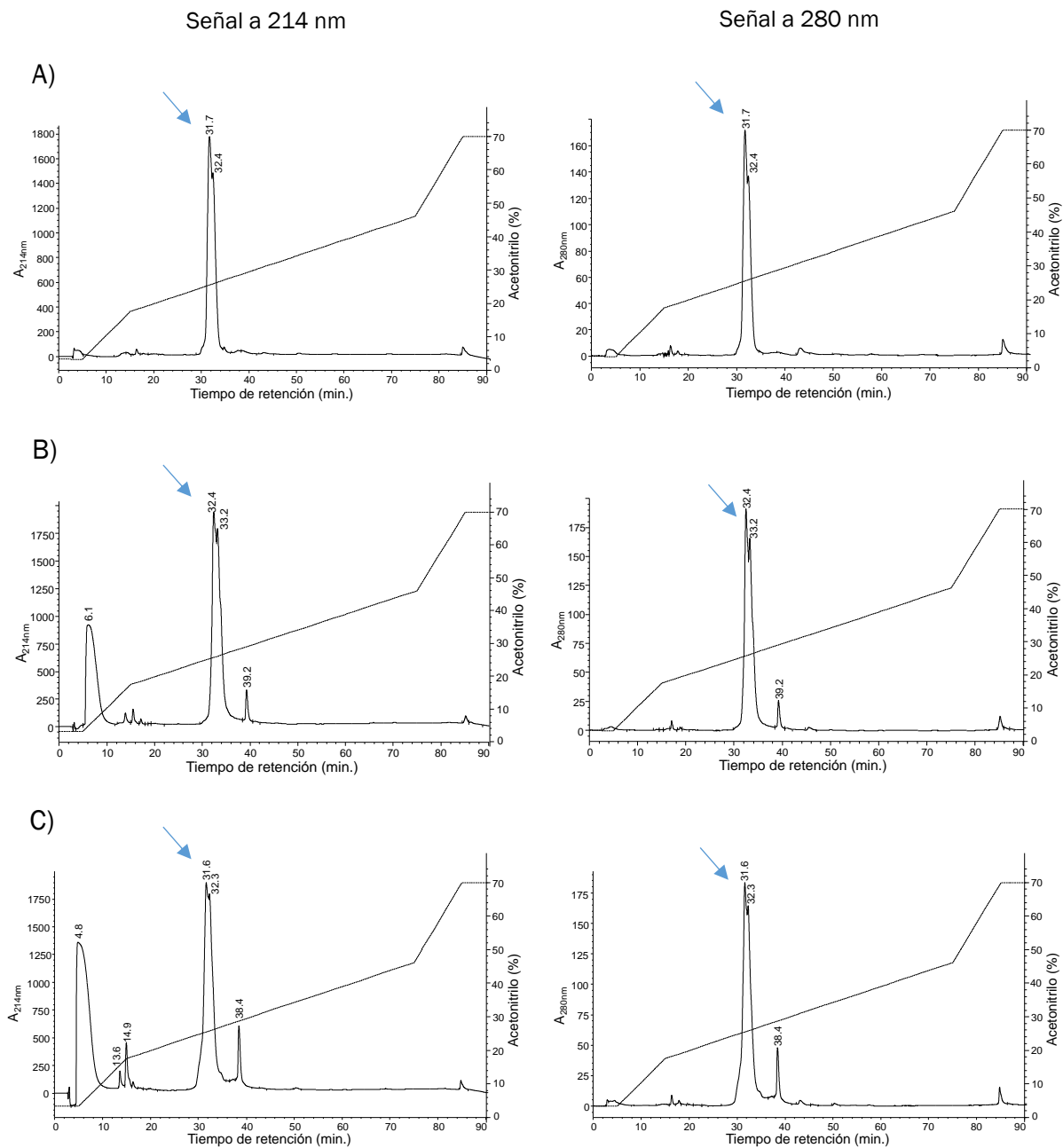



Figura 13. Análisis del entrecruzamiento de crotamina con EDC mediante SDS-PAGE al 15% bajo condiciones reductoras. MMM: Marcador de masa molecular; crotamina con 10 mg/mL de EDC (52 mM); crotamina con 50 mg/ml de EDC (261 mM). EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida; cantidad de proteína: 5 μg /pozo. No se observaron bandas adicionales a la banda de la crotamina, lo que indica que no se obtuvieron conjugados.

Como resultado, en el gel de SDS-PAGE no se observó ninguna banda aparte de la crotamina, que migra cerca de 7 kDa. Por otra parte, la banda que se observa cerca de 8 kDa pudiera tratarse de una isoforma de crotamina. Para verificar los resultados obtenidos, se realizó un fraccionamiento de las muestras mediante HPLC en fase reversa en una columna analítica Vydac® 218 TP. En la figura 14 se observa el perfil del entrecruzamiento de crotamina con EDC a pH 7.2.





El cromatograma mostró que hubo muy poca modificación de la crotamina con 10 o 50 mg/mL de EDC. Se puede observar una fracción alrededor de los 39 minutos, que pudiera tratarse del dímero de crotamina. Sin embargo, sólo corresponde al 3.8 y 7.8% del total de crotamina, respectivamente.

Por otra parte, la fracción que tuvo un tiempo de retención a los 6.1 y 4.8 minutos a 214 nm corresponde al reactivo EDC que no reaccionó. La baja cantidad de conjugados de crotamina que se obtuvo y la gran cantidad del entrecruzador EDC que no reaccionó, sugieren que éste es un método poco viable para la obtención de conjugados de crotamina.

La funcionalidad del entrecruzador EDC fue comprobado mediante el entrecruzamiento de albúmina sérica bovina en las mismas condiciones que se utilizaron para crotamina. A pH 7.2, el entrecruzamiento fue alrededor de 10%, mientras que a pH 5.0 fue mayor al 90% (resultados no mostrados). Asimismo, Lennon y colaboradores (1990) lograron el entrecruzamiento de la crotoxina de *C. d. terrificus* utilizando una concentración molar de EDC 1000 veces mayor a la de crotoxina a pH 5.0. En este trabajo la cantidad de crotamina disponible limitó la evaluación de un entrecruzamiento a un pH más ácido.

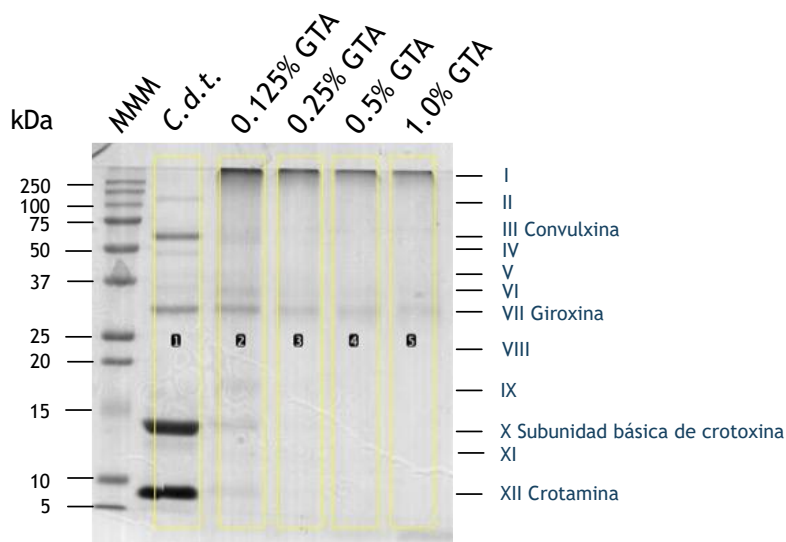
El entrecruzamiento de proteínas involucra el pKa de los grupos ionizables de los aminoácidos, el cual puede variar dependiendo de las condiciones del microambiente a su alrededor. Los factores que modifican el microambiente y afectan la ionización de los grupos funcionales pueden ser la presencia de sales, temperatura, fuerza iónica, el efecto de la cadena lateral de otros aminoácidos, entre otros (Hermanson, 2013). Es posible que las condiciones utilizadas en este trabajo no sean las óptimas para que los grupos funcionales de la crotamina se activen y reaccionen con el EDC. Asimismo, la carga altamente positiva de la crotamina y el microambiente alrededor de sus grupos funcionales reactivos pueden estar influyendo en la reacción de entrecruzamiento con EDC (Kerkis et al., 2014). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el entrecruzador, así como la concentración utilizada y el pI de la proteína tienen un papel importante para la producción exitosa de conjugados proteicos.

8.3 El entrecruzamiento del veneno de *C. d. terrificus* con glutaraldehído produce conjugados solubles e insolubles de masa molecular alta.

Debido a que no se logró la producción eficiente de conjugados de crotamina con EDC, se decidió realizar el entrecruzamiento de la crotamina con los demás componentes del veneno de *C. d. terrificus* utilizando glutaraldehído. Para el ensayo de entrecruzamiento se utilizaron 10 mg/mL de veneno con 0.125, 0.25, 0.5 o 1.0% de glutaraldehído equivalentes a 12.5, 25, 50 y 100 mM, respectivamente.

El entrecruzamiento del veneno de *C. d. terrificus* con glutaraldehído dio como resultado conjugados solubles e insolubles, los cuales se separaron mediante centrifugación. Posteriormente, los conjugados solubles se analizaron mediante SDS-PAGE al 15% bajo condiciones reductoras (figura 15).

A)



B)

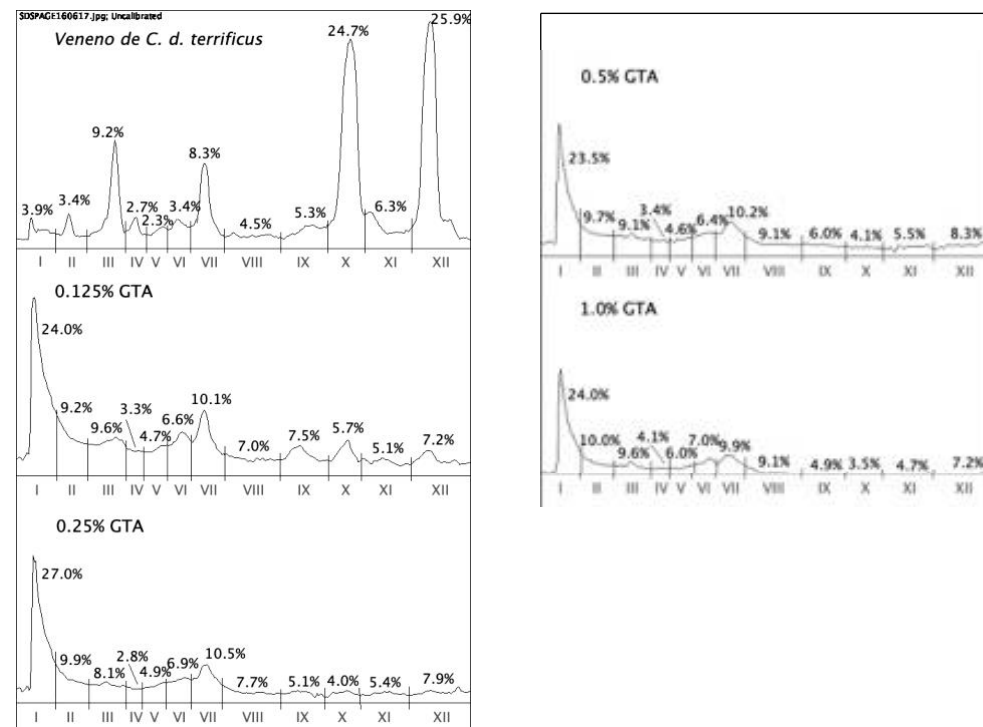


Figura 15. Caracterización de conjugados de veneno de *C. d. terrificus* con altas concentraciones de glutaraldehído. A) SDS-PAGE al 15% bajo condiciones reductoras. MMM: marcador de masa molecular; *C.d.t.*: veneno de *C. d. terrificus*; GTA: glutaraldehído. En cada pozo se cargaron 15 μ g de veneno o de conjugados solubles. B) Análisis de la intensidad de bandas con el software ImageJ. Los picos representan la intensidad de cada banda del gel de SDS-PAGE enlistada con números romanos. Los conjugados que se formaron tuvieron una masa mayor a 250 kDa.

Los conjugados solubles fueron mayores a 250 kDa y debido a su masa, quedaron atrapados al inicio del gel separador y en los pozos del gel concentrador (ver imagen en anexo 2).

Adicionalmente, para conocer las proporciones relativas de los componentes de los conjugados del veneno de *C. d. terrificus*, se analizó la intensidad de las bandas del gel de SDS-PAGE con el software ImageJ (tabla 3). Sin embargo, este análisis sólo refleja un resultado aproximado.

Tabla 3. Determinación de las proporciones relativas de los componentes de los conjugados del veneno de *C. d. terrificus* con altas concentraciones de glutaraldehído. Los porcentajes se calcularon en base al área bajo la curva del análisis de las bandas en gel del veneno o conjugados solubles con el software ImageJ.

Pico	Componente del veneno	Masa molecular en gel (kDa)	Veneno de <i>C. d. terrificus</i> (%)	Conjugados 0.125% GTA (%)	Conjugados 0.25% GTA (%)	Conjugados 0.5% GTA (%)	Conjugados 1.0% GTA (%)
III	Convulxina	75	9.2	9.6	8.1	9.1	9.6
VII	Giroxina	33	8.3	10.1	10.5	10.2	9.9
X	Subunidad básica de crotoxina	13	24.7	5.7	4.0	4.1	3.5
XII	Crotamina	5	25.9	7.2	7.9	8.3	7.2

A partir de las proporciones obtenidas, se puede inferir que el entrecruzamiento de los principales componentes del veneno de *C. d. terrificus* fue muy similar con todas las concentraciones de glutaraldehído utilizadas. Por otro lado, en la tabla 4 se observa el porcentaje de crotamina entrecruzada y el porcentaje de proteína soluble recuperada después de centrifugar los conjugados.

Tabla 4. Determinación del porcentaje de crotamina entrecruzada en los conjugados del veneno de *C. d. terrificus* con altas concentraciones de glutaraldehído.

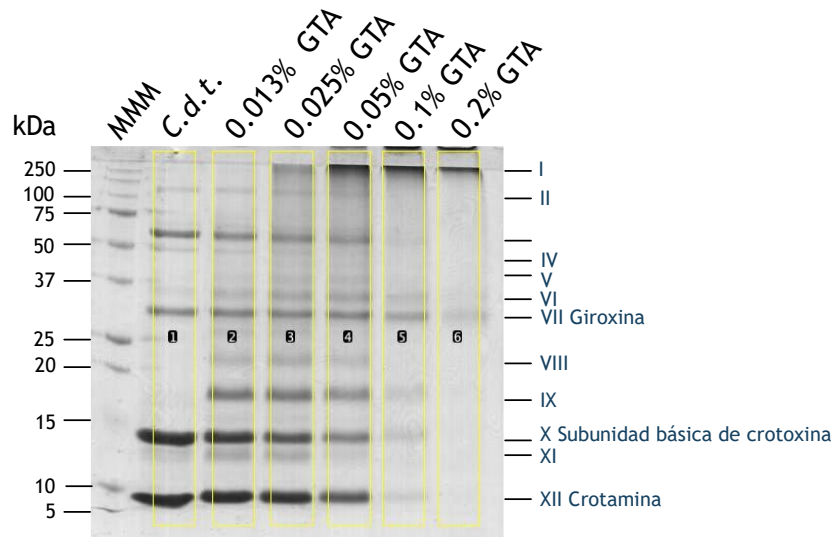
Descripción	Composición de crotamina (%)	Crotamina libre (%)	Crotamina entrecruzada (%)	Proteína soluble (%)
Veneno de <i>C. d. terrificus</i>	25.9	100	0	100
Conjugados con 0.125% GTA	7.2	27.8	72.2	25.0
Conjugados con 0.25% GTA	7.9	30.5	69.5	23.9
Conjugados con 0.5% GTA	8.3	32.0	68.0	20.1
Conjugados con 1.0% GTA	7.2	27.8	72.2	20.4

El porcentaje de crotamina entrecruzada fue muy similar con todas las concentraciones de glutaraldehído utilizadas (entre 68.0 y 72.2%). Asimismo, el porcentaje de proteína soluble fue de entre 20.1 y 25.0%.

Con la finalidad de mejorar la solubilidad de los conjugados del veneno, se utilizaron concentraciones menores de glutaraldehído. El entrecruzamiento se realizó con 10 mg/mL del veneno de *C. d. terrificus* y 0.013, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2% de glutaraldehído equivalentes a 1.3, 2.5, 5, 10 y 20 mM, respectivamente.

El entrecruzamiento del veneno de *C. d. terrificus* dio como resultado la producción de conjugados solubles e insolubles, los cuales se separaron mediante centrifugación. Los conjugados solubles se analizaron mediante SDS-PAGE al 15% bajo condiciones reductoras (figura 16).

A)



B)

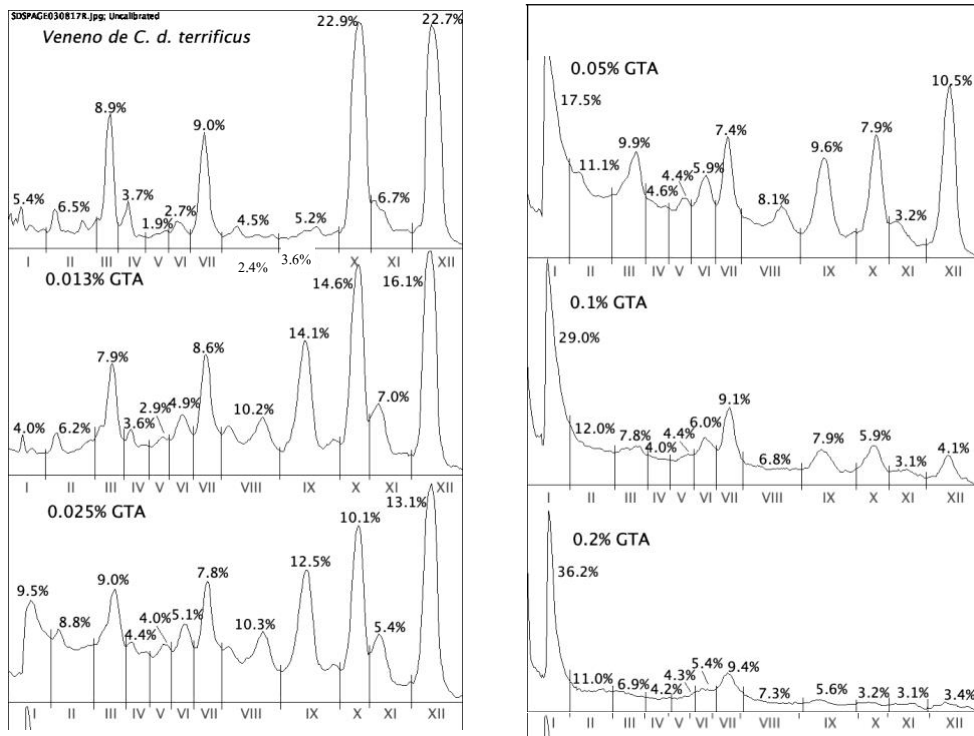


Figura 16. Caracterización de conjugados de veneno de *C. d. terrificus* con bajas concentraciones de glutaraldehído. A) SDS-PAGE al 15% bajo condiciones reductoras. MMM: marcador de masa molecular; *C.d.t.*: veneno de *C. d. terrificus*; GTA: glutaraldehído. B) Análisis de la intensidad de bandas con el software ImageJ. Los picos representan la intensidad de cada banda del gel de SDS-PAGE, enlistada con números romanos. Los conjugados que se formaron tuvieron una masa mayor a 250 kDa.

Los conjugados solubles obtenidos a partir de 0.05% de glutaraldehído, tuvieron una masa molecular entre 15 y 25 kDa y mayor a 250 kDa. Asimismo, los conjugados mayores a 250 kDa quedaron atrapados al inicio del gel separador y en los pozos del gel concentrador (ver imagen en anexo 2).

Por otro lado, para conocer las proporciones relativas de los componentes de los conjugados del veneno, se analizó la intensidad de las bandas del gel de SDS-PAGE con el software ImageJ (tabla 5).

Tabla 5. Determinación de las proporciones relativas de los componentes de los conjugados del veneno de *C. d. terrificus* con bajas concentraciones de glutaraldehído. Los porcentajes se calcularon en base al área bajo la curva del análisis de las bandas en gel del veneno o conjugados solubles con el software ImageJ.

Pico	Componente del veneno	Masa molecular (kDa)	Veneno de <i>C. d. terrificus</i> (%)	Conjugados 0.013% GTA (%)	Conjugados 0.025% GTA (%)	Conjugados 0.05% GTA (%)	Conjugados 0.1% GTA (%)	Conjugados 0.2% GTA (%)
III	Convulxina	75	8.9	7.9	9.0	9.9	7.8	6.9
VII	Giroxina	33	9.0	8.6	7.8	7.4	9.1	9.4
X	Subunidad básica de crotoxina	13	22.9	14.6	10.1	7.9	5.9	3.2
XII	Crotamina	5	22.7	16.1	13.1	10.5	4.1	3.4

El entrecruzamiento de los componentes del veneno de *C. d. terrificus* fue mejor con concentraciones de glutaraldehído mayores a 0.05%. Asimismo, se determinó el porcentaje de crotamina entrecruzada y de proteína soluble recuperada después de centrifugar (tabla 6).

Tabla 6. Determinación del porcentaje de crotamina entrecruzada en los conjugados del veneno de *C. d. terrificus* con bajas concentraciones de glutaraldehído.

Descripción	Composición de crotamina (%)	Crotamina libre (%)	Crotamina entrecruzada (%)	Proteína soluble (%)
Veneno de <i>C. d. terrificus</i>	22.7	100	0	96.7
Conjugados con 0.013% GTA	16.1	70.9	29.1	94.8
Conjugados con 0.025% GTA	13.1	57.7	42.3	79.0
Conjugados con 0.05% GTA	10.5	46.3	53.7	41.0
Conjugados con 0.1% GTA	4.1	18.1	81.9	25.6
Conjugados con 0.2% GTA	3.4	15.0	85.0	21.1

Mientras que el porcentaje de crotamina entrecruzada aumentó utilizando 0.1% de glutaraldehído, el porcentaje de proteína soluble recuperada después de centrifugar disminuyó drásticamente. La precipitación de conjugados de veneno producidos con 0.02% de glutaraldehído se ha observado en otros trabajos como el de Kharrat y colaboradores (1997). Mientras que los conjugados de la fracción tóxica del veneno de *Androctonus australis hector* producidos con glutaraldehído fueron solubles, los conjugados de la fracción tóxica del veneno de *Buthus occitannus tunetanus* fueron insolubles. La variación de la solubilidad de los conjugados producidos se debe a las propiedades fisicoquímicas de las proteínas que componen a cada veneno (Kharrat et al., 1997).

Por otra parte, el porcentaje aproximado de entrecruzamiento de la crotamina sólo representa un valor aproximado en base a las masas moleculares de los principales componentes del veneno de *C. d. terrificus*: la convulxina de 75 kDa, la giroxina de 33 kDa, la subunidad básica de la crotoxina de 13 kDa y la crotamina de 5 kDa (Lourenço et al., 2013). En términos moleculares, la crotamina es el componente más representativo en el veneno de *C. d. terrificus* por su baja masa molecular y su abundancia en relación a los demás componentes. Esto sugiere que los conjugados de veneno, molecularmente están representados en su mayoría por crotamina.

8.4 El entrecruzamiento con glutaraldehído reduce la toxicidad del veneno de *C. d. terrificus*.

Para evaluar la toxicidad de los conjugados de veneno obtenidos con glutaraldehído, se inyectaron cuatro grupos de ratones CD-1 sexo indistinto de 18 a 20 g de peso por vía intravenosa. Como control negativo, se inyectaron dos ratones con veneno de *C. d. terrificus*. Por otro lado, se inyectó un ratón por cada dosis de conjugados solubles de veneno producidos con 0.025, 0.05 o 0.1% de glutaraldehído (tabla 7). Tanto la parálisis rígida de las patas traseras de los ratones como la supervivencia se registró durante 24 horas a partir de la inyección.

Tabla 7. Toxicidad y parálisis rígida producida por los conjugados del veneno de *C. d. terrificus* con glutaraldehído. Se inyectó un ratón por dosis vía intravenosa.

Grupo de ratones	Concentración GTA (%)	Concentración GTA (mM)	Proteína soluble (%)	Dosis de veneno o conjugados (µg/ratón)	Parálisis rígida	¿Sobrevivió?
1	0	0	96.7	5	SI	NO
				10	SI	NO
2	0.025	2.5	79.0%	5	NO	SI
				10	NO	SI
				20	NO	SI
				30	NO	NO
				40	SI	NO
3	0.05	5	41.0%	10	NO	SI
				20	NO	SI
				40	NO	SI
				60	NO	SI
				80	SI	NO
4	0.1	10	25.6%	30	NO	SI
				60	NO	SI
				120	NO	SI
				240	NO	SI

Similar a lo reportado por varios autores (Devaux *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2016; Kharrat *et al.*, 1997; Kuo & Chang, 1991; Machado *et al.*, 2004), la toxicidad de los conjugados de veneno de *C. d. terrificus* producidos por glutaraldehído disminuyó de forma proporcional al aumento de la concentración de glutaraldehído. Los conjugados de veneno de *C. d. terrificus* producidos con 0.025, 0.05% de glutaraldehído tuvieron una toxicidad 6 y 16 veces menor a la del veneno, respectivamente. Mientras que los

conjugados producidos con 0.1% de glutaraldehído tuvieron una toxicidad menor a 48 veces la del veneno.

En comparación, los conjugados de la fracción tóxica del veneno de *A. a. hector* y *B. o. tunetanus* producidos con 0.02% de glutaraldehído, tuvieron una toxicidad 20 y 35 veces menor a la DL₅₀ de cada veneno, respectivamente (Kharrat *et al.*, 1997). Mientras que los conjugados de veneno de *T. serrulatus* producidos con 0.5% de glutaraldehído tuvieron una toxicidad 16 veces menor a la DL₅₀ del veneno (Ferreira *et al.*, 2016).

Por otra parte, la parálisis rígida de las patas traseras de los ratones o efecto crotamina, se observó con 5 y 10 µg de veneno de *C. d. terrificus* por ratón, y con 40 y 80 µg por ratón de los conjugados de veneno producidos con 0.025 y 0.05% de glutaraldehído, respectivamente. Varios autores han reportado la parálisis rígida de las patas traseras en ratones (20 g) inyectados vía intraperitoneal con 6, 24 y 40 µg de crotamina (Boni-Mitake *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2018; Rizzi *et al.*, 2007). Esto sugiere que la crotamina que quedó libre en los conjugados de veneno producidos con glutaraldehído, fue capaz de producir parálisis rígida en los ratones inyectados.

8.5 El entrecruzamiento del veneno de *C. d. terrificus* con EDC produce conjugados solubles de masa mediana.

Para optimizar la solubilidad de los conjugados de veneno de *C. d. terrificus*, se realizó un ensayo de entrecruzamiento con el reactivo EDC a pH 7.2. Para el entrecruzamiento de 2.5 mg/mL de veneno, se utilizaron 10 ó 50 mg/mL de EDC, correspondientes a 52 y 261 mM respectivamente (figura 17).

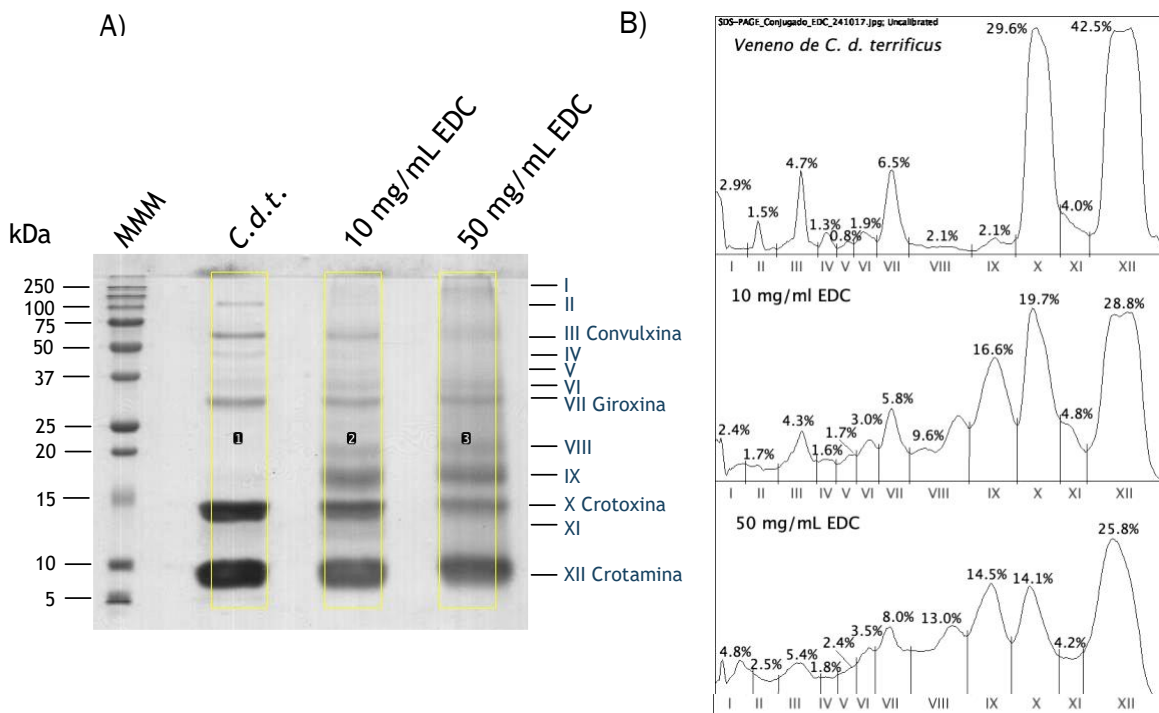


Figura 17. Caracterización de conjugados de veneno de *C. d. terrificus* con EDC. A) SDS-PAGE al 15% bajo condiciones reductoras. MMM: marcador de masa molecular; *C. d. t.*: veneno de *C. d. terrificus*; EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida. En cada pozo se cargaron 20 μ g de veneno o de conjugados. B) Análisis de la intensidad de bandas con el software ImageJ. Los picos representan la intensidad de cada banda del gel de SDS-PAGE, enlistadas con números romanos. Los conjugados que se formaron tuvieron una masa molecular de entre 15 y 25 kDa.

A diferencia de los conjugados de veneno producidos con glutaraldehído, los conjugados producidos con EDC fueron solubles y tuvieron una masa molecular de entre 15 y 25 kDa.

Para conocer el porcentaje relativo de los componentes de los conjugados del veneno con EDC, se analizó la intensidad de las bandas de los geles de SDS-PAGE con el software ImageJ (tabla 8).

Tabla 8. Determinación de la composición de los conjugados del veneno de *C. d. terrificus* con EDC. Los porcentajes se calcularon en base al área bajo la curva del análisis de las bandas en gel de 20 µg de veneno o conjugados solubles con el software ImageJ.

Pico	Componente del veneno	Masa molecular (kDa)	Veneno de <i>C. d. terrificus</i> (%)	Conjugados 10 mg/mL EDC (%)	Conjugados 50 mg/mL EDC (%)
III	Convulxina	36.4	4.7	4.3	5.4
VII	Giroxina	24.6	6.5	5.8	3.5
X	Subunidad básica de crotoxina	5.7	29.6	19.7	14.1
XII	Crotamina	3.5	42.5	28.8	25.8

A partir de los porcentajes obtenidos, se puede inferir que el entrecruzamiento del veneno de *C. d. terrificus* fue muy similar con ambas concentraciones de EDC. El porcentaje de crotamina entrecruzada se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Determinación del porcentaje de crotamina entrecruzada en los conjugados del veneno de *C. d. terrificus* con EDC.

Descripción	Composición de crotamina (%)	Crotamina libre (%)	Crotamina entrecruzada (%)
Veneno de <i>C. d. terrificus</i>	42.5	100	0
Conjugados con 10 mg/mL de EDC	28.8	67.8	32.2
Conjugados con 50 mg/mL de EDC	25.8	60.7	39.3

El porcentaje de crotamina entrecruzada fue muy similar con 10 y 50 mg/mL de EDC. Sin embargo, este porcentaje fue menor al obtenido en los conjugados del veneno con 0.025% de glutaraldehído, debido probablemente a que el pH de la reacción fue de 7.2, en lugar de 5.0 utilizado por otros autores (Hermanson, 2013; Tombaccini *et al.*, 1990). En otros trabajos se ha reportado que el glutaraldehído tiene mayor eficiencia que el EDC para producir conjugados de proteínas (De Filette *et al.*, 2011; Devaux *et al.*, 2002).

8.6 El entrecruzamiento con EDC reduce la toxicidad del veneno de *C. d. terrificus*


Para evaluar la toxicidad de los conjugados de veneno obtenidos con EDC, se inyectaron tres grupos de ratones CD-1 sexo indistinto de 18 a 20 g de peso vía intravenosa. Como control negativo se inyectaron dos ratones con el veneno de *C. d. terrificus*. Por otra parte, se inyectó un ratón por dosis de los conjugados solubles de veneno producidos con 10 o 50 mg/mL de EDC. Los resultados de los ensayos de toxicidad de los conjugados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Toxicidad y parálisis rígida de los conjugados del veneno de *C. d. terrificus* con EDC. Se inyectó un ratón por dosis vía intravenosa.

Grupo ratones	Concentración EDC (mg/mL)	Concentración EDC (mM)	Dosis de proteína (µg/ratón)	Parálisis rígida	¿Sobrevivió?
1	0	0	5	NO	SI
			10	SI	NO
2	10	52	10	SI	SI
			80	SI	SI
			150	SI	SI
3	50	261	10	NO	SI
			80	NO	SI
			150	SI	SI

Similar a los resultados obtenidos con los conjugados con glutaraldehído, los conjugados con EDC disminuyeron notablemente su toxicidad. Todos los ratones sobrevivieron a la toxicidad de los conjugados, no así los ratones que fueron inyectados con 10 µg del veneno de *C. d. terrificus*. En comparación, los conjugados de la neurotoxina Aah I del veneno de *A. australis* y BSA producidos con EDC en el trabajo realizado por Devaux y colaboradores (2002), tuvieron una toxicidad 10 veces menor a la DL₅₀ de la neurotoxina.

La parálisis rígida de las patas traseras de los ratones se observó con 10 µg de veneno de *C. d. terrificus*. Asimismo, se observó parálisis a partir de 10 µg de conjugados del veneno producidos con 10 mg/mL de EDC y solamente con 150 µg de conjugados del veneno producidos con 50 mg/mL de EDC.




La reducción de la toxicidad de los conjugados de veneno con glutaraldehído o con EDC se explica porque los aminoácidos importantes para el entrecruzamiento de proteínas son el ácido aspártico, el ácido glutámico, la arginina, la histidina, la tirosina y la lisina, por su alto potencial nucleofílico (Hermanson, 2013). En estudios previos se ha reportado que las lisinas de la crotamina tienen un papel importante en el bloqueo de los Kv (Peigneur *et al.*, 2012; Yount *et al.*, 2009).

Particularmente el bloqueo de los Kv 1.1, 1.2 y 1.3 se han asociado a la parálisis rígida que se observa en ratones inyectados con crotamina (Lima *et al.*, 2018). La lisina también tiene un papel importante en otras toxinas bloqueadoras de Kv como la BgK de la anémona marina *Bunodosoma granulifera*, la ShK de la anémona *Stichodactyla helianthus*, la κ -heufotoxina del escorpión *Heterometrus fulvipes* y la caribdotoxina del escorpión *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (Peigneur *et al.*, 2012).

La pérdida de la actividad de toxinas entrecruzadas con glutaraldehído o EDC es una situación frecuente. Otros ejemplos de conjugados de toxinas producidos con EDC o glutaraldehído que han perdido su actividad son los conjugados de cobrotoxina de *N. n. atra* y los conjugados de crottoxina de *C. d. terrificus* (Kuo & Chang, 1991; Lennon *et al.*, 1990). Mientras que los conjugados de cobrotoxina perdieron la actividad de unión a los receptores de acetilcolina en un 97%, los conjugados de crottoxina disminuyeron su actividad fosfolipasa en 95%.

8.7 La inmunización con veneno de *C. d. terrificus* o sus conjugados no producen reacciones adversas en conejos.

Para la producción de anticuerpos, se diseñó un esquema de inmunización en conejos en base a la experiencia del laboratorio del Dr. Alejandro Alagón. Se utilizaron cuatro grupos de conejos, los cuales se inmunizaron con veneno de *C. d. terrificus* como control (grupo I), con los conjugados solubles del veneno producidos con 0.05% de glutaraldehído (grupo II), con los conjugados insolubles del veneno producidos con la misma concentración de glutaraldehído (grupo III) y con los conjugados de veneno producidos con 10 mg/mL de EDC.



Los inmunógenos que se escogieron fueron los conjugados producidos con 0.05% de glutaraldehído debido a que el porcentaje de proteína soluble fue mayor que utilizando concentraciones de glutaraldehído mayores a 0.1%. Por otro lado, se escogieron los conjugados producidos con 10 mg/mL de EDC dado que el patrón de entrecruzamiento del veneno entre 10 y 50 mg/mL de EDC fue muy similar.

El tiempo de inmunización de los conejos del grupo IV, inmunizado con los conjugados de veneno producidos con EDC, fue dos semanas más largo que los conejos de los grupos I, II y III. Los conejos no presentaron reacciones adversas durante el tiempo que duró el esquema de inmunización, incluso los que pertenecían al grupo I inmunizados con el veneno de *C. d. terrificus*. Esto sugiere que el conejo puede ser más resistente al veneno de serpientes de cascabel que otros animales, y por tanto un buen modelo para la producción de anticuerpos.

La conservación de la salud de animales inmunizados con conjugados de veneno producidos con glutaraldehído también se ha reportado por otros autores (Ferreira *et al.*, 2016; Guidolin *et al.*, 1989). Incluso, se recomienda cuando se desea producir anticuerpos contra toxinas con actividad hemorrágica (Tan *et al.*, 1990).

El glutaraldehído y el EDC que no reaccionó y se encontraba en solución con los conjugados de veneno tampoco produjeron efectos adversos en los animales inmunizados. La DL₅₀ del glutaraldehído es de 2,390 mg/kg vía subcutánea; a pesar de que la DL₅₀ del EDC mediante vía subcutánea no se encuentra reportada, vía oral tiene una DL₅₀ de 300 mg/kg (revisado en www.thermofisher.com y Ferreira, *et al.*, 2016). Es importante destacar que los conejos se inmunizaron con una cantidad menor a 0.02 mg/kg de glutaraldehído y a 0.67 mg/kg de EDC. Lo que representa una cantidad 120,000 y 448 veces menor a la DL₅₀ reportada para glutaraldehído y EDC respectivamente.

8.8 La producción de anticuerpos es similar al inmunizar veneno o conjugados del veneno de *C. d. terrificus*.

Los procesos que ocurren tras la inyección del veneno de serpientes son el desarrollo de signos clínicos producidos por las toxinas del veneno y la estimulación de la respuesta inmune innata y adaptativa para neutralizar y eliminar estas toxinas. Las características fisicoquímicas de las toxinas, su abundancia en el veneno, la vía de administración y el fondo genético del animal inmunizado son factores que determinan la capacidad de inducir la respuesta inmune (León *et al.*, 2011).

En este trabajo, para evaluar la respuesta de los conejos inmunizados, el suero se analizó mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA) indirecto utilizando como antígenos veneno de *C. d. terrificus* o crotamina pura. Los títulos de anticuerpos se determinaron como la dilución de suero a la cual se obtiene el 50% de la absorbancia máxima a 405 nm. La finalidad de evaluar la respuesta inmune contra dos antígenos fue monitorear el reconocimiento específico hacia crotamina y hacia los demás componentes del veneno de *C. d. terrificus*. En la figura 18 se muestra el diseño del ELISA utilizando como antígeno veneno de *C. d. terrificus*.

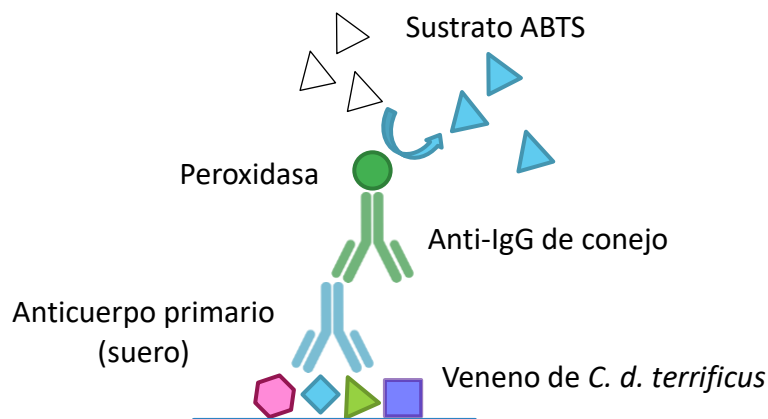
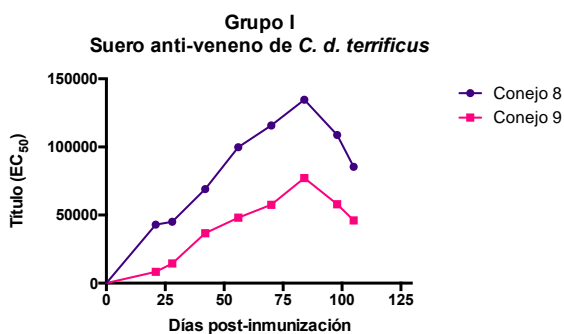


Figura 18. Esquema representativo del ELISA indirecto utilizando como antígeno veneno de *C. d. terrificus*.

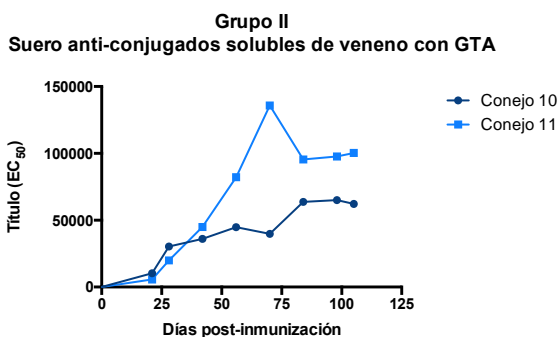
Los resultados de la determinación del título de anticuerpos utilizando veneno de *C. d. terrificus* como antígeno se muestran en la figura 19.

A)



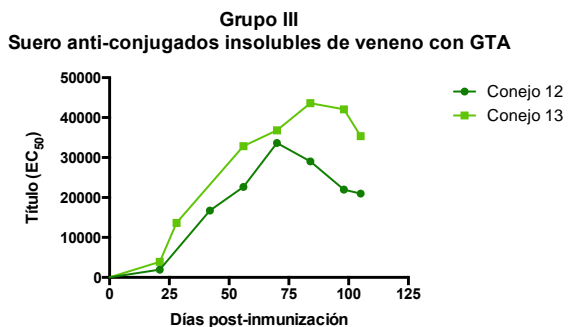
Día	EC ₅₀ Conejo 8	EC ₅₀ Conejo 9
0	47	55
21	42,981	8,317
28	45,096	14,424
42	69,087	36,720
56	99,838	48,081
70	115,838	57,548
84	134,686	77,172
98	108,845	57,901
105	85,416	46,049

B)



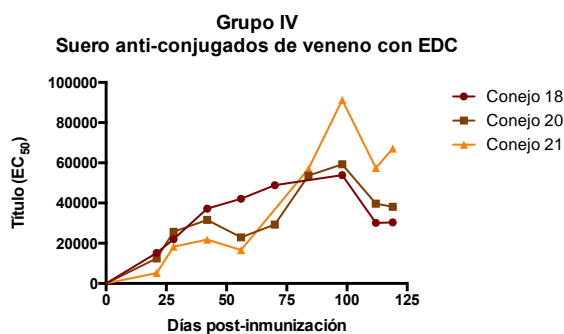
Día	EC ₅₀ Conejo 10	EC ₅₀ Conejo 11
0	29	5
21	10,316	5,691
28	30,291	19,948
42	36,046	44,939
56	44,840	82,198
70	39,831	135,800
84	63,714	95,443
98	65,094	97,740
105	62,132	100,374

C)



Día	EC ₅₀ Conejo 12	EC ₅₀ Conejo 13
0	21	8
21	1,927	3,900
28	ND	13,666
42	16,725	ND
56	22,632	32,869
70	33,631	36,819
84	29,023	43,615
98	21,980	42,069
105	20,965	35,357

D)



Día	EC ₅₀ Conejo 18	EC ₅₀ Conejo 20	EC ₅₀ Conejo 21
0	41	65	18
21	15,198	12,479	5,229
28	22,000	25,739	18,319
42	37,245	31,663	21,777
56	42,122	22,999	16,643
70	48,873	29,295	ND
84	ND	53,609	57,003
98	53,871	59,311	91,291
112	30,136	39,724	57,435
119	30,380	38,126	67,085

Figura 19. Determinación del título de anticuerpos anti-veneno de *C. d. terrificus* de conejos inmunizados con los conjugados de veneno con glutaraldehído o EDC. A) Grupo I; B) Grupo II; C) Grupo III y D) Grupo IV. ND: no determinado

Los títulos de anticuerpos contra el veneno fueron muy similares para los sueros de los conejos de los grupos I y II. En contraparte, los sueros de los conejos del grupo III obtuvieron los títulos más bajos contra el veneno, lo que indica que los conjugados insolubles de veneno producidos con glutaraldehído fueron los menos inmunogénicos. Los sueros de los conejos del grupo IV obtuvieron valores intermedios de títulos entre los sueros del grupo II y III.

En la figura 20 se muestra el diseño del ELISA indirecto utilizando como antígeno crotamina pura.

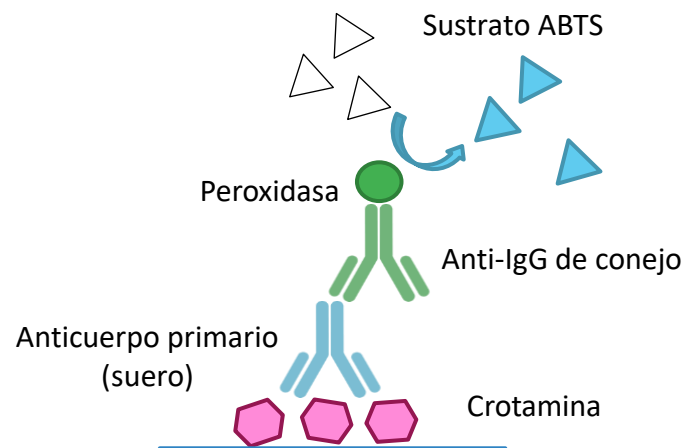
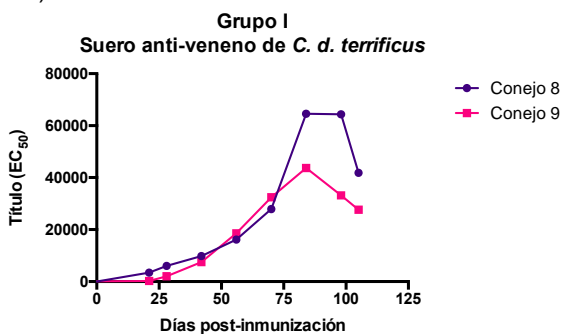


Figura 20. Esquema representativo del ELISA indirecto utilizando como antígeno crotamina pura.

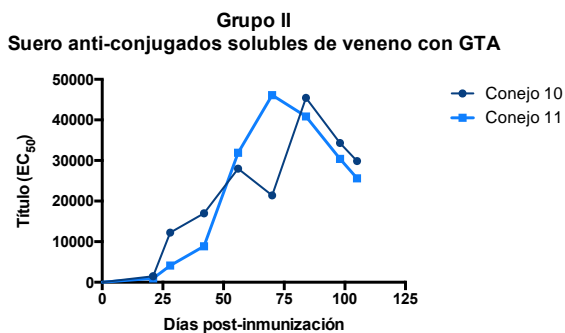
En la figura 21 se observan los resultados de la determinación del título de anticuerpos contra crotamina.

A)



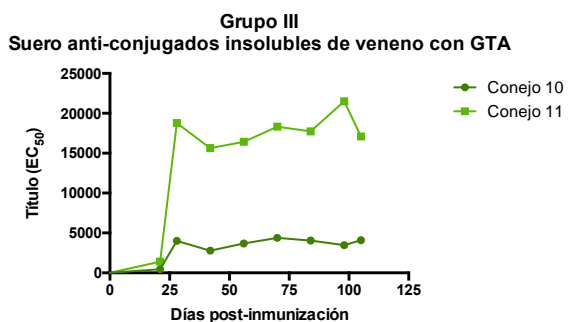
Día	EC ₅₀ Conejo 8	EC ₅₀ Conejo 9
0	2	73
21	3,439	206
28	6,055	2,050
42	9,844	7,492
56	16,169	18,594
70	27,894	32,409
84	64,586	43,674
98	64,365	33,190
105	41,866	27,658

B)



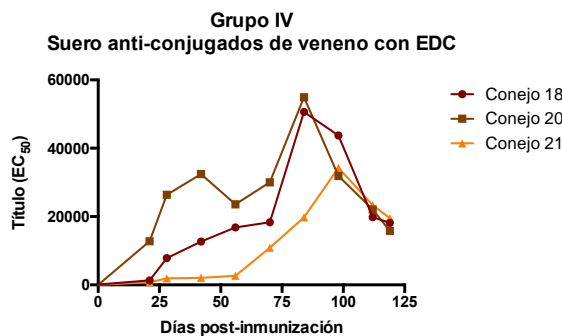
Día	EC ₅₀ Conejo 10	EC ₅₀ Conejo 11
0	7	29
21	1460	925
28	12,247	4,092
42	16,996	8,862
56	27,994	31,903
70	21,408	46,104
84	45,429	40,861
98	34,295	30,379
105	29,862	25,611

C)



Día	EC ₅₀ Conejo 12	EC ₅₀ Conejo 13
0	5	9
21	440	1,416
28	4,004	18,787
42	2,773	15,638
56	3,682	16,433
70	4,389	18,325
84	4,056	17,740
98	3,478	21,503
105	4,100	17,084

D)



Día	EC ₅₀ Conejo 18	EC ₅₀ Conejo 20	EC ₅₀ Conejo 21
0	111	6	1
21	1,301	12,783	758
28	7,827	26,365	1,926
42	12,674	32,434	2,060
56	16,830	23,559	2,686
70	18,335	30,008	10,894
84	50,647	54,914	19,797
98	43,722	31,867	34,295
112	19,843	22,096	23,345
119	18,162	15,806	19,530

Figura 21. Determinación del título de anticuerpos anti-crotamina de conejos inmunizados con los conjugados de veneno con glutaraldehído o EDC. A) Grupo I; B) Grupo II; C) Grupo III; D) Grupo IV.

A diferencia de los títulos de anticuerpos obtenidos contra el veneno, los títulos de anticuerpos contra crotamina fueron más bajos en todos los grupos. En este trabajo también se observaron variaciones individuales en la producción de anticuerpos de los conejos inmunizados con veneno de *C. d. terrificus* o con los conjugados de veneno producidos con glutaraldehído o EDC, similar a lo reportado por Ferreira y colaboradores (2016).


El proceso de hipermutación somática que ocurre en las células B aumenta la afinidad de los anticuerpos secretados con cada nueva exposición al antígeno. Este evento ocurre porque durante la exposición continua a un antígeno se dividen y seleccionan células B. La presencia de complejos antígeno-anticuerpo inducen señales que reducen la diferenciación de las células B, disminuyendo a su vez el nivel de anticuerpos secretados (Owen *et al.*, 2013). Esto explica el descenso de los títulos de anticuerpos a partir del día 84.

Por otra parte, los sueros obtenidos de los conejos al final del esquema de inmunización se mezclaron por grupo (pool de suero) y se analizaron mediante ELISA para determinar los títulos de anticuerpos (tabla 11).

Tabla 11. Título de anticuerpos de los pools de sueros hacia el veneno de *C. d. terrificus* y hacia crotamina.

Grupo del pool de sueros	Antígeno inmunizado	Título anti-veneno de <i>C. d. terrificus</i>	Título anti-crotamina
I	Veneno de <i>C. d. terrificus</i>	72,207	26,051
II	Conjugados solubles de veneno con GTA	81,253	29,319
III	Conjugados insolubles de veneno con GTA	21,525	15,270
IV	Conjugados de veneno con EDC	35,740	22,989

Al igual que para los sueros de los conejos individuales, el título de anticuerpos de los pools de sueros del grupo I y II fue muy parecido, mientras que el título de anticuerpos del pool de suero del grupo III fue el más bajo. El título de anticuerpos del pool de suero del grupo IV tuvo un valor intermedio. Parecido a los resultados anteriores,



el título de anticuerpos hacia el veneno de *C. d. terrificus* fue más alto que el título de anticuerpos hacia crotamina.

En otros trabajos, los niveles de anticuerpos fueron similares en los sueros de animales inmunizados con el veneno de *T. serrulatus* y los inmunizados con conjugados de veneno con glutaraldehído (Ferreira *et al.*, 2016). Por el contrario, en el trabajo de Losoya-Uribe (2019), la inmunización de conjugados de crotamina y BSA producidos con glutaraldehído aumentó la respuesta de anticuerpos en los ratones inmunizados en comparación con la inmunización de crotamina sola. Similar a ello, la inmunización de conjugados de la toxina Aah I con BSA o con el análogo no tóxico de Aah II, producidos con glutaraldehído, mejoró la respuesta de anticuerpos (Devaux *et al.*, 2002). Los resultados de este trabajo indican que la proteína utilizada como acarreadora también influye en la producción de anticuerpos.

8.9 Los sueros tienen reactividad cruzada hacia el veneno de cascabeles mexicanas.

En la literatura se ha reportado que existe una similitud antigénica entre venenos de serpientes relacionadas filogenéticamente. Los anticuerpos que se producen durante la inmunización de un veneno particular pueden reconocer y neutralizar el veneno homólogo y el de otras especies relacionados filogenéticamente (venenos heterólogos), lo cual se conoce como reactividad cruzada (León *et al.*, 2011).

En el presente trabajo, para evaluar el reconocimiento de cada pool de suero hacia los componentes del veneno de *C. d. terrificus* y de otras especies de serpientes de cascabel, se realizó un ensayo de Western blot. La cantidad de proteína que se cargó en el gel fue 5 µg/pozo de cada veneno o 3 µg/pozo de crotamina o crotoxina pura. En la figura 22 se muestra la separación de los componentes de los venenos en SDS-PAGE al 15% bajo condiciones reductoras y el Western blot utilizando una dilución de cada pool de suero 1:1,000.

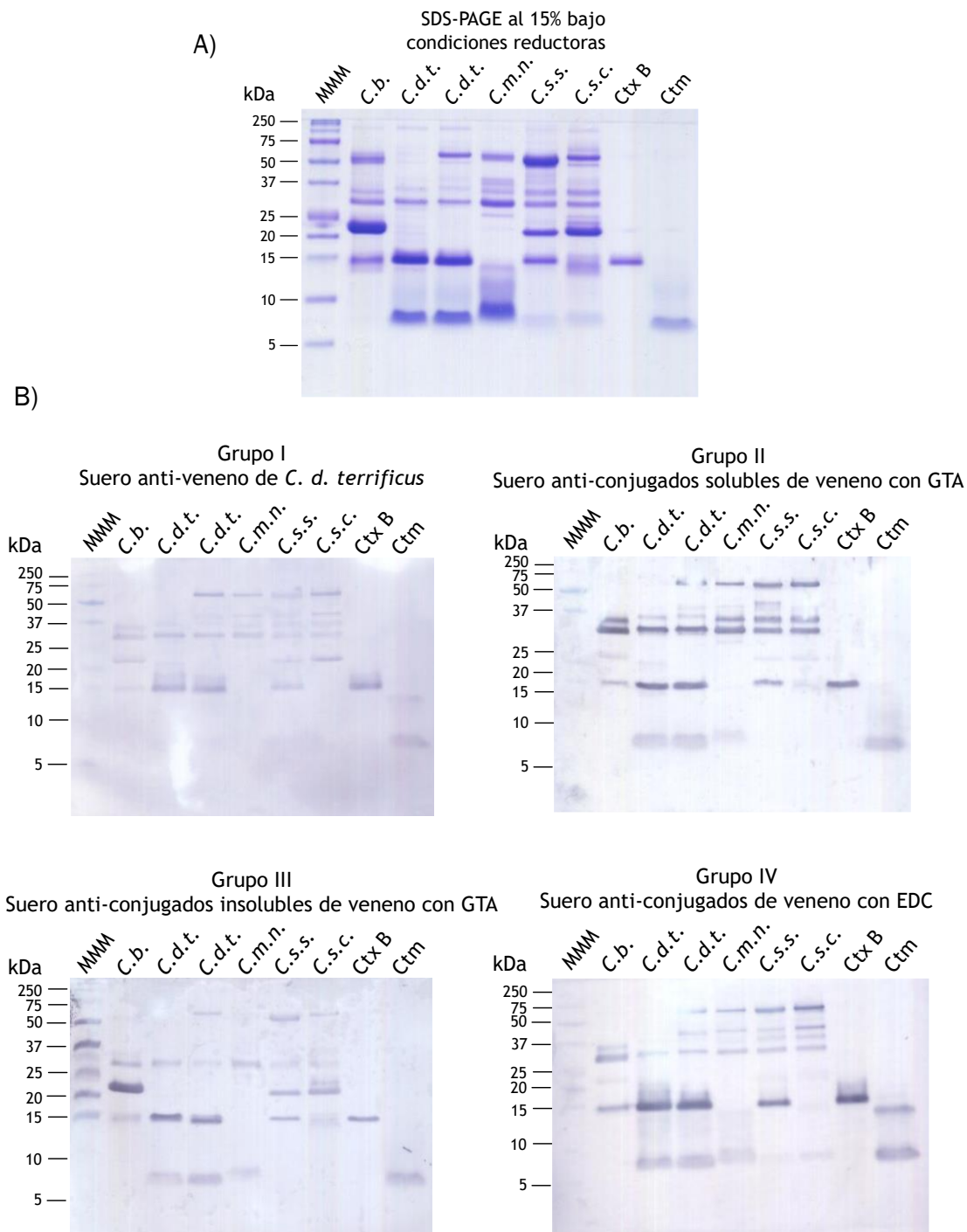



Figura 22. Análisis del reconocimiento de venenos de serpientes *Crotalus* por los pools de sueros mediante Western blot. MMM: Marcador de masa molecular; C.b.: *C. basiliscus*; C.d.t.: *C. d. terrificus*; C.m.n.: *C. m. nigrescens*; C.s.s.: *C. s. simus*; C.s.c.: *C. s. culminatus*; Ctx B: Subunidad básica de crotoxina de *C. d. terrificus* y Ctm: crotamina de *C. d. terrificus*. A) SDS-PAGE al 15% en condiciones reductoras. B) Western blot de los sueros en dilución 1:1,000.



Los principales componentes que se reconocieron por el pool de suero del grupo I, fueron la subunidad básica de la fosfolipasa A₂ crotoxina (13 kDa), serino proteasas (31 a 36 kDa), lectinas tipo C (75 kDa), metaloproteasas P-III (43-85 kDa) y L-aminoácido oxidasas (85 a 150 kDa) de la mayoría de los venenos analizados. Estas familias de proteínas se comparten entre el veneno de *C. d. terrificus* y las serpientes de cascabel *C. s. simus*, *C. s. culminatus*, *C. basiliscus* y *C. m. nigrescens* (Borja et al., 2018; Durban et al., 2017; Melani et al., 2015; Neri-Castro et al., 2013; Segura et al., 2017).

Sin embargo, estos componentes y la crotamina (5 kDa) que migra cerca de 7 kDa, se reconocieron mejor por los pools de los sueros del grupo II y IV. El suero del grupo II también reconoció las serinoproteasas de *C. simus*, *C. culminatus* y *C. m. nigrescens*. Por otro lado, los principales componentes que se reconocieron por el suero del grupo III fueron las fosfolipasas A₂, la crotamina, las serinoproteasas y las metaloproteasas de los venenos, no así componentes de mayor masa molecular.

En comparación, la reactividad cruzada hacia 6 venenos de serpientes del género *Crotalus* por 4 antivenenos monovalentes se observó en el trabajo de Ownby y Colberg (1990). Los antivenenos reconocieron varios componentes presentes en los venenos de *C. v. viridis*, *C. d. terrificus*, *B. atrox*, *C. adamanteus*, *C. atrox* y *C. h. horridus*. Los resultados obtenidos por Ownby y Colberg, demostraron que los venenos de estas serpientes de cascabel también comparten familias de proteínas con sitios antigénicos similares. Asimismo, se ha observado en el trabajo de Possani y colaboradores (1981). El suero producido mediante la inmunización de conjugados del veneno de *C. noxius*, también reconoció el veneno de los escorpiones *C. l. limpidus*, *C. s. suffusus*, *C. l. tecomanus* y *T. serrulatus* (Possani et al., 1981). Por otro lado, el suero producido de la inmunización de conjugados de metaloproteasas de *O. hannah*, reconoció las metaloproteasas del veneno de *B. aritatus*, *V. russelli*, *V. ammodytes*, *A. c. contortrix* y *C. rhodostoma* (Tan et al., 1990).

Por otro lado, para conocer el componente que se reconoce mejor por los sueros, se realizó un segundo Western blot utilizando una dilución proporcional al pool de suero con el título de anticuerpos más bajo (figura 23). La dilución de los sueros fue de 1:1,000 a 1:4,000.

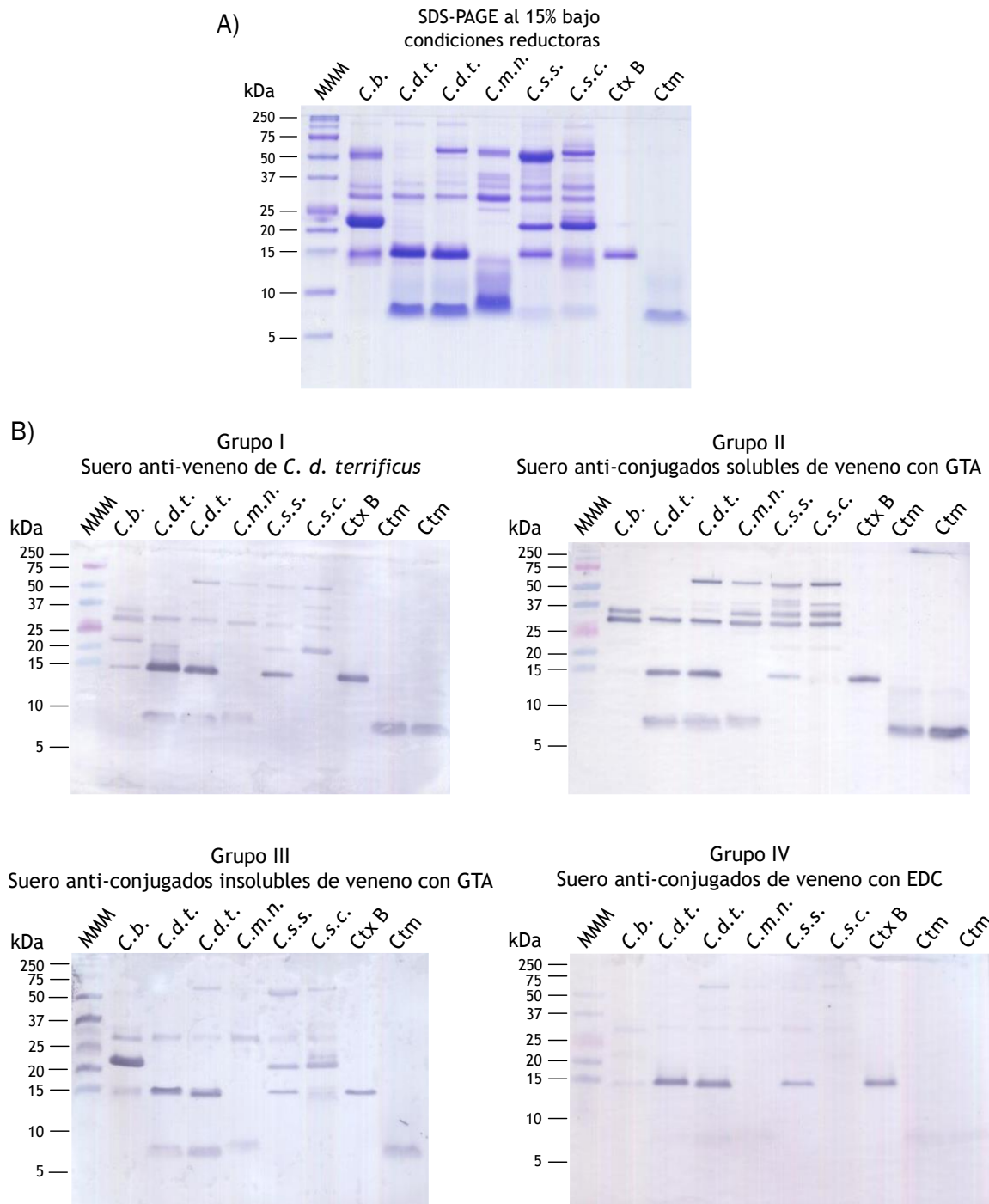



Figura 23. Análisis del reconocimiento de venenos de serpientes *Crotalus* por los pools de sueros (en dilución proporcional) mediante Western blot. MMM: Marcador de masa molecular; C.b.: *C. basiliscus*; C.d.t.: *C. d. terrificus*; C.m.n.: *C. m. nigrescens*; C.s.s.: *C. s. simus*; C.s.c.: *C. s. culminatus*; Ctx B: Subunidad básica de crotoxina de *C. d. terrificus* y Ctm: crotamina de *C. d. terrificus*. A) SDS-PAGE al 15% en condiciones reductoras. B) Western blot de los sueros en dilución proporcional de 1:1,000 a 1:4,000.



Escencialmente, los componentes que se reconocieron fueron los mismos descritos anteriormente. Sin embargo, el pool de suero del grupo IV perdió el reconocimiento hacia la mayoría de los componentes de los venenos utilizando una dilución más alta. El componente que mejor se reconoció en este caso fue la subunidad básica de la crotoxina de 13 kDa (figura 21 carriles 3, 4, 6 y 8), lo que indica que este suero contiene en su mayoría anticuerpos contra la crotoxina.

El reconocimiento preferente hacia proteínas de mediano o alto peso molecular presentes en los venenos se explica porque su complejidad contribuye a su capacidad inmunogénica. Proteínas mayores a 70kDa como las L-aminoácido oxidasas y las metaloproteasas de tipo P-III son buenos inmunógenos. Por el contrario, proteínas pequeñas de entre 5 y 30 kDa como las α -neurotoxinas de elápidos, algunas fosfolipasas de tipo A₂ y las desintegrinas son poco inmunogénicas (León *et al.*, 2011).

8.10 Los sueros reconocen preferentemente los epítopos conformacionales de crotamina.

El entrecruzamiento de toxinas puede provocar la pérdida de epítopos importantes para su actividad, y por tanto, que los anticuerpos producidos sean incapaces de neutralizar su toxicidad (WHO, 2017). Con la finalidad de analizar el reconocimiento de cada pool de suero hacia los epítopos de crotamina, se realizó un ensayo de Slot blot utilizando veneno de *C. d. terrificus* como control positivo y como control negativo buffer TBS (figura 24). El ensayo se realizó con crotamina sin desnaturizar y crotamina desnaturizada con SDS, β -mercaptoetanol y calor.

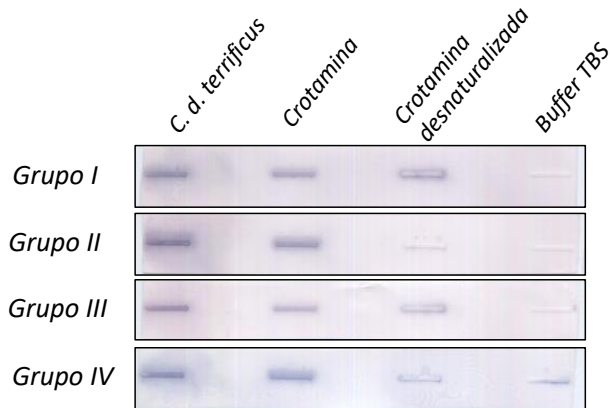


Figura 24. Ensayo de reconocimiento de los pools de suero hacia los epítomos de crotamina mediante Slot blot. Como control positivo se utilizó veneno de *C. d. terrificus* y como control negativo buffer TBS. El mejor reconocimiento fue hacia el veneno de *C. d. terrificus* y la crotamina sin desnaturalizar.

El mejor reconocimiento de los sueros fue hacia el veneno de *C. d. terrificus* y la crotamina sin desnaturalizar, lo cual sugiere que los sueros reconocieron los epítomos de tipo conformacional de crotamina. Éstos se conservaron a pesar de la modificación química con glutaraldehído o EDC, puesto que los sueros reconocieron a la crotamina sin desnaturalizar, independientemente del tratamiento de entrecruzamiento utilizado. El análisis del tipo de epítomos que reconocen los antivenenos es importante para conocer la composición de anticuerpos y predecir la neutralización de las toxinas (Ownby & Colberg, 1990).

8.11 La letalidad de la crotamina es menor a la del veneno de *C. d. terrificus*

La dosis letal media (DL₅₀) de crotamina se determinó para conocer la letalidad de la proteína y los signos clínicos que se observan en ratones. La DL₅₀ de crotamina pura se determinó vía intravenosa utilizando grupos de tres ratones CD-1 sexo indistinto de 18 a 20 g de peso (figura 25).

Determinación DL₅₀ Crotamina

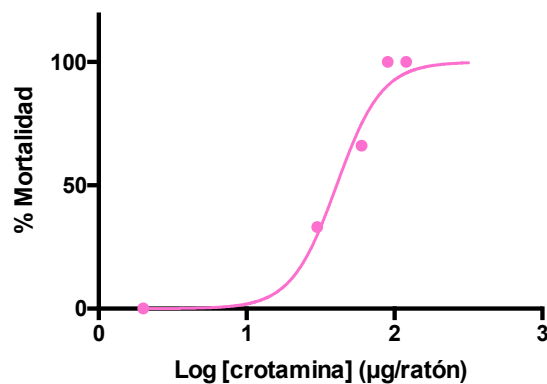



Figura 25. Determinación de la dosis letal media de crotamina. La DL₅₀ fue de 41 µg/ratón con un intervalo de confianza (I.C.) del 95% de entre 29.5 y 56.0. La DL₅₀ de crotamina se determinó como la cantidad de crotamina necesaria para matar al 50% de una población de ratones CD-1 inyectados vía intravenosa.

La DL₅₀ de crotamina fue de 41 µg/ratón, lo cual concuerda con la DL₅₀ reportada en la literatura, que va de 30 a 60 µg/ratón (20 g) (Brazil *et al.*, 1979; Cheymol *et al.*, 1971). La DL₅₀ reportada para crotamina varía dependiendo de la vía de administración utilizada y el método de purificación empleado. Sin embargo, diferencias en letalidad y nivel de parálisis producido también se han observado en ensayos realizados por el grupo de Hayashi y colaboradores, aun utilizando un mismo lote de crotamina (Marinovic *et al.*, 2017).

Por otra parte, algunos de los signos clínicos más importantes que se observaron fueron respiración agitada o entrecortada, ptosis en uno o ambos ojos, pelo erizado y parálisis rígida de las patas traseras de los ratones, también reportado por Rizzi y colaboradores (2007). La parálisis rígida de las patas traseras de los ratones se observó a partir de 2 µg/ratón, mientras que otros autores han observado parálisis en ratones (20 g) inyectados con 6 µg vía intraperitoneal (Rizzi *et al.*, 2007). En otros experimentos, no se observó parálisis en ratones (20 g) inyectados vía intraperitoneal con 0.8 µg de crotamina (Lima *et al.*, 2018). En este trabajo tampoco se observó parálisis rígida con 1 µg de crotamina inyectada en ratones de 20 g vía intravenosa.



La parálisis producida por crotamina fue más severa y duró más tiempo con cantidades mayores a 15 μg /ratón, además se establecía entre 3 y 5 segundos después de la inyección. En comparación, 24 y 40 μg de crotamina por ratón de 20 g establecieron la parálisis rígida de las patas traseras a los 13 y 7 minutos post-inyección vía intraperitoneal (Lima *et al.*, 2018). En este trabajo dependiendo de la intensidad de la parálisis, se clasificó en los niveles siguientes:

- ④ Nivel 4: Parálisis extrema, caracterizada por la extensión máxima de ambas patas traseras, desplazamiento nulo o limitado y duración de la parálisis por más de 18 horas.
- ④ Nivel 3: Parálisis alta, caracterizada por la extensión de al menos una de las patas traseras o con extensión intermedia, es decir con libertad a flexionar una o ambas patas y recuperación de la movilidad entre 8 y 18 horas.
- ④ Nivel 2. Parálisis intermedia, flexión limitada de las patas traseras sin llegar a la extensión máxima, desplazamiento lento y recuperación entre 3 y 8 horas.
- ④ Nivel 1: Parálisis ligera, cuando el desplazamiento se produce con dificultad y lentitud y existe recuperación entre 1 y 3 horas.

Los resultados de este trabajo y el realizado por Lima y su grupo, indican que el nivel y la duración de la parálisis producida por crotamina es dosis-dependiente. Asimismo, la vía de administración parece tener un papel importante en la interacción de crotamina con su blanco. Esto también se ha observado con el veneno del alacrán *C. limpidus* y de la cascabel *C. atrox* en el trabajo realizado por Vergara (2010). La vía de administración así como las propiedades fisicoquímicas de las toxinas influyen en su absorción y distribución. Por ejemplo, vía intravenosa las toxinas se distribuyen más rápido al torrente sanguíneo que otras vías, mientras que la masa molecular impacta en el proceso de absorción desde el sitio de inoculación. Por otra parte, la recuperación de la parálisis de los ratones puede deberse a que la unión de crotamina con los canales de Kv es reversible, y su eliminación ocurre en 24 horas, posiblemente vía renal (Boni-Mitake *et al.*, 2006; Peigneur *et al.*, 2012).

La DL₅₀ del veneno de *C. d. terrificus* se determinó con la finalidad de conocer la letalidad y los signos clínicos producidos por el veneno. La DL₅₀ del veneno se determinó vía intravenosa en grupos de tres ratones CD-1 sexo indistinto de 18 a 20 g de peso (figura 26).

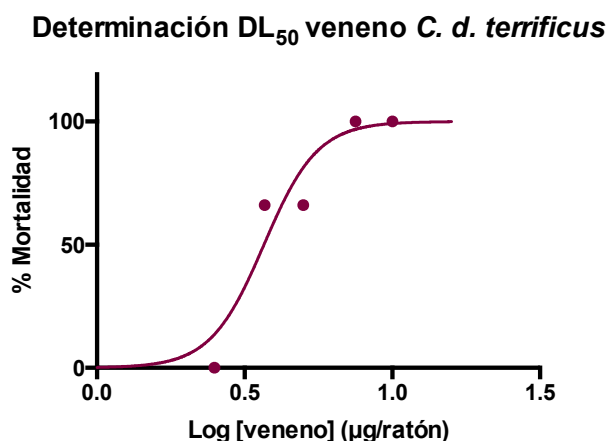


Figura 26. Determinación de la dosis letal media del veneno de *C. d. terrificus*. La DL₅₀ fue de 3.7 µg/ratón con un intervalo de confianza (I.C.) del 95% de entre 2.7 y 5.0. La DL₅₀ del veneno se determinó como la cantidad de veneno necesaria para matar al 50% de una población de ratones CD-1 inyectados vía intravenosa.

La DL₅₀ del veneno de *C. d. terrificus* fue de 3.7 µg/ratón (20 g), lo cual fue mayor a los valores reportados vía intraperitoneal, los cuales oscilan entre 1.1 y 3 µg/ratón (20 g) (Lourenço *et al.*, 2013; Teixeira-Araújo *et al.*, 2017). El veneno de *C. d. terrificus* es altamente letal en comparación con otros venenos de cascabeles mexicanas como *C. s. culminatus*, que tiene valores de DL₅₀ de entre 68.4 y 318 µg/ratón (20 g) o el de *C. m. nigrescens* que va de 22.6 a 86 µg/ratón (Borja *et al.*, 2018; Neri-Castro *et al.*, 2013).

Sin embargo, la DL₅₀ del veneno fue menor a la de crotamina, puesto que la letalidad del veneno depende principalmente de la fosfolipasa A₂ crotovina. La DL₅₀ de la crotovina va desde 1.2 hasta 3.6 µg/ratón (20 g) dependiendo de la vía de administración empleada y es la principal responsable de la neurotoxicidad y miotoxicidad sistémica y local que produce el veneno de *C. d. terrificus* (Teixeira-Araújo *et al.*, 2017).

En este trabajo, los principales signos clínicos que se observaron después de la inyección del veneno fueron muy parecidos al de la crotamina pura: respiración agitada, pelo erizado, parálisis rígida de las patas traseras y ptosis. Sin embargo, la ptosis desarrollada fue mucho menos grave que la que se observaba al inyectar crotamina pura. La parálisis rígida por su parte, se clasificó de la misma forma descrita anteriormente. A diferencia de cuando se inyectaba crotamina pura y producía parálisis unos segundos después, al inyectar el veneno, la parálisis se establecía entre 5 y 10 minutos posterior a la inyección.

8.12 Los sueros neutralizan la letalidad del veneno de *C. d. terrificus* más no la parálisis rígida producida por crotamina.

La dosis efectiva media (DE₅₀) de cada pool de suero contra crotamina se determinó con la finalidad de evaluar la potencia neutralizante contra la letalidad y la parálisis rígida producida por 3 DL₅₀ de crotamina. El ensayo se determinó vía intravenosa en grupos de tres ratones CD-1 sexo indistinto de 18 a 20 g de peso. Los resultados se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Determinación de potencia neutralizante de los pools de sueros contra 3 DL₅₀ de crotamina. La DE₅₀ se determinó como el volumen de suero necesario para proteger al 50% de la población de ratones inyectados vía intravenosa.

Grupo suero	Título anti-crotamina	DE ₅₀ (μL suero/3 DL ₅₀)	Nivel de parálisis	Tiempo de muerte (hrs)
I	26,051	>450	4	2 a 4
II	29,319	>450	4	18 a 24
III	15,270	>450	4	12 a 18
IV	22,989	>450	4	18 a 24

La DE₅₀ de los cuatro sueros fue mayor a 450 μL de suero por ratón, ya que con 400 o 450 μL no se lograron neutralizar 3 DL₅₀ de crotamina equivalentes a 123 μg. La parálisis rígida de las patas traseras de los ratones fue nivel 4 (++++) en todos los casos, la cual se manifestó entre 3 y 5 segundos después de la inyección. También se observó

respiración entrecortada y agitada en los ratones inyectados, así como pelo erizado y ptosis de uno o ambos ojos. Sin embargo, el tiempo de muerte de los ratones se retrasó con 450 μ L de los sueros de los grupos II, III y IV con respecto al tiempo de muerte con el suero del grupo I. Este resultado sugiere que los sueros hiperinmunes contienen anticuerpos contra crotamina, pero que no se encuentran en suficiente cantidad para neutralizar las 3 DL₅₀ de crotamina.

Por otro lado, para conocer la potencia neutralizante de cada pool de suero contra la letalidad de 3 DL₅₀ de veneno de *C. d. terrificus* y contra la parálisis producida por la crotamina en el veneno, se determinó la DE₅₀. Los ensayos se realizaron vía intravenosa en grupos de tres ratones CD-1 sexo indistinto de entre 18 y 20 g de peso, retando 3 DL₅₀ de veneno de *C. d. terrificus* equivalentes a 11.1 μ g de veneno por ratón (tabla 13).

Tabla 13. Determinación de potencia neutralizante de los pools de sueros de contra 3 DL₅₀ del veneno de *C. d. terrificus*. La DE₅₀ se determinó como el volumen de suero necesario para proteger al 50% de la población de ratones inyectados vía intravenosa.

Grupo de suero	Título anti-veneno <i>C. d. terrificus</i>	DE ₅₀ (μ L suero/3 DL ₅₀)	I.C. 95%	R ₂	μ g veneno/ mL suero
I	72,207	59.5	55.0 - 64.3	0.99	186.2
II	81,253	70.4	61.9 - 80.1	0.99	157.7
III	21,525	144.3	124.1 - 167.9	0.98	76.9
IV	35,740	102.5	94.6 - 111.2	0.99	108.3

En la figura 27 se muestra la representación gráfica de la determinación de la potencia neutralizante de cada uno de los sueros contra 3 DL₅₀ de veneno de *C. d. terrificus*.

Determinación de DE₅₀ contra el veneno

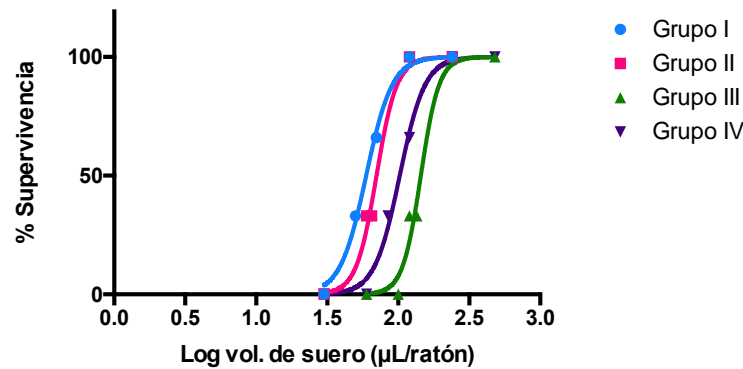


Figura 27. Determinación de la potencia neutralizante de los sueros de conejo hacia el veneno de *C. d. terrificus*. La DE₅₀ se determinó como el volumen de suero necesario para proteger al 50% de una población de ratones CD-1 inyectados vía intravenosa con el veneno de *C. d. terrificus*.

Todos los sueros fueron capaces de neutralizar la letalidad de 3 DL₅₀ del veneno de *C. d. terrificus*. Mientras que la mezcla de suero del grupo I inmunizado con el veneno de *C. d. terrificus* tuvo la mayor potencia neutralizante, la mezcla de suero del grupo III inmunizado con los conjugados insolubles de veneno con glutaraldehído tuvo la menor potencia neutralizante. La potencia neutralizante del suero del grupo II inmunizado con los conjugados solubles de veneno con glutaraldehído fue muy similar a la del suero del grupo I. Por otro lado la potencia neutralizante del suero del grupo IV tuvo un valor intermedio.

Con la finalidad de evaluar la neutralización de los sueros hacia la parálisis rígida producida por la crotamina presente en 3 DL₅₀ del veneno de *C. d. terrificus*, se monitoreó el nivel de la parálisis durante la determinación de DE₅₀ (figura 28). El veneno de *C. d. terrificus* contenía un porcentaje de crotamina del 26.0%.

Neutralización de la parálisis producida por crotamina

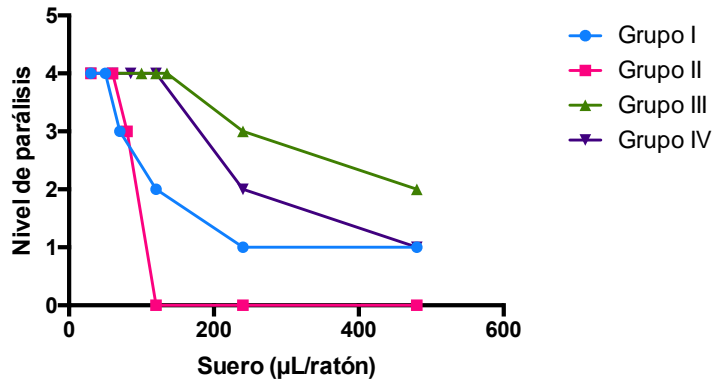


Figura 28. Neutralización de la parálisis rígida producida por crotamina. La parálisis rígida de las patas de los ratones se evaluó en una escala de 0 a 4 donde 4 representa la parálisis rígida más intensa y 0 sin parálisis. El pool de suero del grupo II neutralizó la parálisis producida por la crotamina en el veneno a partir de 90 µL de suero.

El único suero capaz de neutralizar la parálisis rígida producida por 1.1 µg de crotamina presente en 3 DL₅₀ del veneno de *C. d. terrificus*, fue la mezcla de suero del grupo II, inmunizado con los conjugados solubles de veneno con glutaraldehído. No así para los demás sueros, ya que con 480 µL de suero se observó parálisis nivel 1 para las mezclas de los sueros de los grupos I y IV, y parálisis nivel 3 para la mezcla de suero del grupo III. La parálisis rígida aumentó de nivel y duración en los ratones sobrevivientes a medida que disminuía la cantidad de suero mezclado con el veneno de *C. d. terrificus*.

Basado en la cantidad de crotamina en el veneno, aproximadamente 100 µL de la mezcla del suero del grupo II es capaz de neutralizar la parálisis rígida producida por 1.1 µg de crotamina. Para comprobarlo, se evaluó la parálisis rígida producida por 1, 2 ó 3 µg de crotamina en grupos de tres ratones CD-1 sexo indistinto de 18 a 20 g de peso. Posteriormente se retó 100 µL de cada suero contra 3 µg de crotamina y 100 µL del suero del grupo II contra 2 µg de crotamina. Los resultados se muestran en la figura 29.

Determinación de neutralización de parálisis

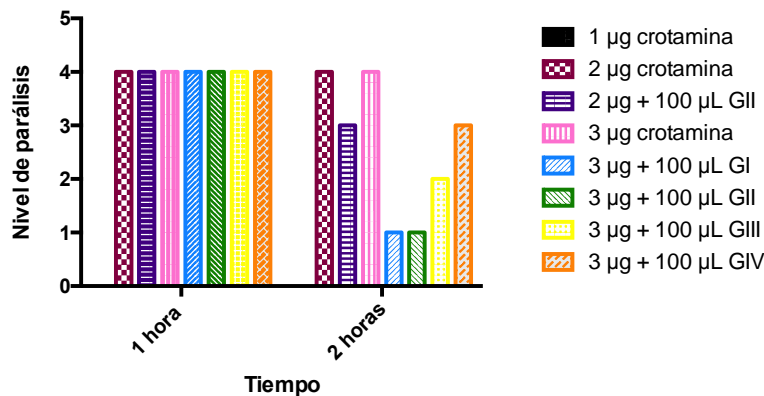



Figura 29. Determinación de neutralización de la parálisis rígida producida por 2 y 3 µg de crotoxina. La parálisis rígida se evaluó en una escala de 0 a 4 donde 4 representa la parálisis rígida más intensa y 0 sin parálisis. Con 100 µL del pool del suero del grupo II contra 2 µg de crotoxina se obtuvieron resultados similares respecto al control.

Mientras que con 1 µg de crotoxina no se observó parálisis rígida de las patas traseras de los ratones, con 2 y 3 µg de crotoxina pura se observó parálisis rígida nivel 4 una hora después de la inyección de los ratones. El tiempo para que se estableciera la parálisis en los ratones fue 15 minutos, a diferencia de cuando se inyectó cantidades mayores a 30 µg de crotoxina pura o 7.5 µg de veneno de *C. d. terrificus*. Por otra parte, a las 2 horas después de la inyección se observó una disminución de la parálisis en los ratones inyectados con crotoxina pura y suero. Sin embargo, esto no es evidencia suficiente para afirmar que los sueros neutralizan por completo la parálisis rígida producida por crotoxina.

En otros estudios, los antivenenos mexicanos Antivipmyn (Bioclón) y Faboterápico polivalente antiviperino (Birmex) no neutralizaron la parálisis rígida producida por las miotoxinas de dos venenos de *C. m. nigrescens* (Borja *et al.*, 2018). Con 246.2 y 222 µL del antiveneno Antivipmyn no se logró la neutralización de 42.5 y 20.3 µg de miotoxinas, respectivamente. Por otro lado, estas cantidades tampoco fueron neutralizadas con 158.0 y 240.1 µL del Faboterápico polivalente antiviperino.



Los valores se determinaron a partir de la composición de crotamina en 3 DL₅₀ para cada veneno de *C. m. nigrescens*.

Esto demuestra que la cantidad de crotamina en el veneno es un factor importante que limita la potencia neutralizante de los antivenenos. Por ello, la producción de antivenenos en América requiere la cuidadosa selección de venenos con el propósito de generar anticuerpos contra las toxinas más representativas presentes en los venenos de las serpientes del género *Crotalus* (Calvete *et al.*, 2010; Neri-Castro *et al.*, 2013). Entre estas familias destacan las metaloproteasas, fosfolipasas A₂, serinoproteasas con actividad tipo trombina y miotoxinas.

9. CONCLUSIONES

En este trabajo, el entrecruzamiento de la crotamina de *C. d. terrificus* con EDC tuvo bajos rendimientos debido a que el entrecruzador y las condiciones de entrecruzamiento no fueron las óptimas. Por otro lado, el mejor entrecruzador para obtener conjugados solubles fue el EDC. Mientras que el entrecruzamiento del veneno de *C. d. terrificus* con glutaraldehído dio lugar a la formación de conjugados solubles e insolubles mayores a 250 kDa, el entrecruzamiento de veneno con EDC produjo conjugados solubles de entre 15 y 25 kDa.

La inmunización de conejos con estos conjugados favoreció la producción de sueros hiperinmunes con títulos altos contra el veneno completo y contra crotamina. Los sueros reconocieron además de crotamina, los componentes que se comparten entre el veneno de *C. d. terrificus* y el veneno de varias cascabeles mexicanas mediante Western blot. Por otro lado, los ensayos de Slot blot demostraron que los sueros hiperinmunes producidos reconocen preferentemente los epítomos conformacionales de la crotamina, importantes para la neutralización de la toxina.

No obstante, los sueros fueron incapaces de neutralizar la letalidad de 3 DL₅₀ de crotamina. Asimismo, fueron incapaces de neutralizar la parálisis producida por 2 y 3 µg de crotamina. Por el contrario, todos los sueros neutralizaron la letalidad de 3 DL₅₀ del veneno de *C. d. terrificus*.

En conclusión, la inmunización de conjugados de veneno de *C. d. terrificus* producidos con glutaraldehído o con EDC es un método inadecuado para la producción de anticuerpos capaces de neutralizar la parálisis producida por la crotamina. Si bien, induce la producción de anticuerpos que neutralizan la principal actividad letal del veneno, dada por la crotoxina.

10. PERSPECTIVAS

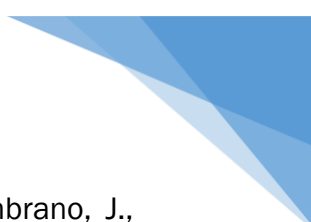
- ④ Realizar un esquema de inmunización más largo en donde se alterne veneno de *C. d. terrificus* y crotamina pura.
- ④ Evaluar la potencia neutralizante de los sueros hiperinmunes a tiempos más largos de inmunización para decidir si es necesario continuar el esquema de inmunización.
- ④ Evaluar la neutralización de la actividad de crotamina midiendo fuerza de contracción con ensayos *ex vivo* en diafragma de ratón o el cambio de voltaje con ensayos de electrofisiología en canales Kv 1.1, 1.2 o 1.3.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


- Alvarenga, L., Machado, R., Amim, P., Martins, M., Kalapothakis, E., De Lima, M., Santos, R., Granier, C., y Chávez-Olórtegui, C. (2005). Molecular characterization of a neutralizing murine monoclonal antibody against *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, 46(6), 664–671. (<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.07.014>)
- Arnaud-Franco, G., Cordero-Tapia, A., Ortíz-Ávila, V., Moctezuma-González, C. L., Tejocote-Pérez, M., y Carbajal-Saucedo, A. (2018). Comparison of biological and biochemical characteristics of venom from rattlesnakes in the southern Baja California Peninsula. *Toxicon*, 148, 197–201. (<https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2018.04.030>)
- Batista, D., Pupo, A., Gomes, A., Maria de Paula, D., Pollettini, F., de Oliveira, J., Alves, A., Remédio, A., Annichino, J., Pereira, L. y Mazzi, M. (2018). Mechanistic insights into functional characteristics of native crotamine. *Toxicon*, 146, 1–12. (<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.03.007>)
- Boldrini-França, J., Corrêa-Netto, C., Silva, M., Rodrigues, R., De La Torre, P., Pérez, A., Pérez, A., Soares, A., Zingali, R., Nogueira, R., Rodrigues, V., Sanz, L. y Calvete, J. (2010). Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. *Journal of Proteomics*, 73(9), 1758–1776. (<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.06.001>)
- Boni-Mitake, M., Costa, H., Spencer, P., Vassilieff, V., y Rogero, J. (2001). Effects of ^{60}Co gamma radiation on crotamine. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34(12), 1531–1538. (<https://doi.org/10.1590/S0100-879X2001001200004>)
- Boni-Mitake, M., Costa, H., Vassilieff, V., y Rogero, J. (2006). Distribution of ^{125}I -labeled crotamine in mice tissues. *Toxicon*, 48(5), 550–555. (<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.07.005>)


- 
- Borja, M., Neri-Castro, E., Pérez-Morales, R., Strickland, J., Ponce-López, R., Parkinson, C., Espinosa-Fematt, J., Sáenz-Mata, J., Flores-Martínez, E., Alagón, A. y Castañeda-Gaytán, G. (2018). Ontogenetic change in the venom of mexican black-tailed rattlesnakes (*Crotalus molossus nigrescens*). *Toxins*, 10(1), 501–527. (<https://doi.org/10.3390/toxins10120501>)
- Brazil, O., Prado-Franceschi, J., y Laure, C. (1979). Repetitive muscle responses induced by crotamine. *Toxicon*, 17(1), 61–67. ([https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101\(79\)90256-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101(79)90256-3))
- Calvete, J. (2017). Venomics: integrative venom proteomics and beyond. *Biochemical Journal*, 474(5), 611–634. (<https://doi.org/10.1042/BCJ20160577>)
- Calvete, J., Sanz, L., Angulo, Y., Lomonte, B., y Gutiérrez, J. (2009). Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Letters*, 583(11), 1736–1743. (<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.029>)
- Calvete, J., Sanz, L., Cid, P., de la Torre, P., Flores-Díaz, M., Dos Santos, M., Borges, A., Brems, A., Angulo, Y., Lomonte, B., Alape-Girón, A. y Gutiérrez, J. (2010). Snake venomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive pedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. *Journal of Proteome Research*, 9(1), 528–544. (<https://doi.org/10.1021/pr9008749>)
- Carrie, A. (2016). The snakebite fight. *Nature*, 537, 26–28. Recuperado de: http://www.nature.com/polopoly_fs/1.20495!/menu/main/topColumns/topLeftColumn/pdf/537026a.pdf
- Chang, L., Lin, R., Chen, K.-C., y Chang, C.-C. (2003). Enrichment of the antibodies against the C-terminus of Taiwan cobra cobrotoxin using dimeric glutaraldehyde-modified toxin as an immunogen. *Toxicon*, 41(2), 181–186. ([https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00275-1](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00275-1))


- Cheymol, J., Gonçalves, J., Bourillet, F., y Roch-Arveiller, M. (1971). Action neuromusculaire comparee de la crotamine et du venin de *Crotalus durissus terrificus* var. *Crotaminicus*—II. sur preparations isolees. *Toxicon*, 9(3), 287–289. ([https://doi.org/10.1016/0041-0101\(71\)90082-1](https://doi.org/10.1016/0041-0101(71)90082-1))
- Costa, B., Sanches, L., Gomide, A. B., Bizerra, F., Dal Mas, C., Oliveira, E., Perez, K., Itri, R., Oguiura, N. y Hayashi, M. (2014). Interaction of the rattlesnake toxin crotamine with model membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(20), 5471–5479. (<https://doi.org/10.1021/jp411886u>)
- De Filette, M., Ysenbaert, T., Roose, K., Schotsaert, M., Roels, S., Goossens, E., Schepens, B., Fiers, W. y Saelens, X. (2011). Antiserum against the conserved nine amino acid N-terminal peptide of influenza A virus matrix protein 2 is not immunoprotective. *Journal of General Virology*, 92(2), 301–306. (<https://doi.org/10.1099/vir.0.027086-0>)
- Devaux, C., Clot-Faybesse, O., Pugnère, M., Mani, J.-C., Rochat, H., y Granier, C. (2002). A strategy for inducing an immune response against *Androctonus australis* scorpion venom toxin I in mice. Production of high-affinity monoclonal antibodies and their use in a sensitive two-site immunometric assay. *Journal of Immunological Methods*, 271(1–2), 37–46. ([https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(02\)00338-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(02)00338-1))
- Durban, J., Sanz, L., Trevisan-Silva, D., Neri-Castro, E., Alagón, A., y Calvete, J. (2017). Integrated venomomics and venom gland transcriptome analysis of juvenile and adult mexican rattlesnakes *Crotalus simus*, *C. tzabcan*, and *C. culminatus* revealed miRNA-modulated ontogenetic shifts. *Journal of Proteome Research*, 16(9), 3370–3390. (<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00414>)
- El Chamy Maluf, S., Dal Mas, C., Oliveira, E., Melo, P., Carmona, A., Gazarini, M., y Hayashi, M. (2016). Inhibition of malaria parasite *Plasmodium falciparum* development by crotamine, a cell penetrating peptide from the snake venom. *Peptides*, 78, 11–16. (<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.01.013>)


- 
- Ferreira, M., Duarte, C., Oliveira, M., Castro, K., Teixeira, M., Reis, L., Zambrano, J., Kalapothakis, E., Michel, A., Soto-Blanco, M., Chávez-Olórtegui, C. y Melo, M. (2016). Toxicity of crude and detoxified *Tityus serrulatus* venom in anti-venom-producing sheep. *Journal of Veterinary Science*, 17(4), 467–477. (<https://doi.org/10.4142/jvs.2016.17.4.467>)
- Fry, B. (2015). *Venomous reptiles and their toxins: Evolution, Pathophysiology and Biodiscovery*. Nueva York, E.E.U.U.: Oxford University Press.
- Giglio, J. (1975). Analytical Studies on Crostamine Hydrochloride. *Analytical Biochemistry*, 69(1), 207–221.
- Guidolin, R., Dias da Silva, W., Higashi, H., Caricati, C., Lima, M., Morais, J., Pinto, J. y Marcelino, J. (1989). Hyperimmunization of horses with bothropic and crotalic venoms treated with glutaraldehyde. *Memories Institute Butantan*, 51(3), 85–90. Recuperado de: <https://bibliotecadigital.butantan.gov.br/arquivos/39/PDF/3.pdf>
- Gutiérrez, J., Calvete, J., Habib, A., Harrison, R., Williams, D., y Warrell, D. (2017). Snakebite envenoming. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(17063), 1–21. (<https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.63>)
- Hayashi, M., Nascimento, F., Kerkis, A., Oliveira, V., Oliveira, E., Pereira, A., Rádiz-Baptista, G., Nader, H., Yamane, T., Kerkis, I. y Tersariol, I. (2008). Cytotoxic effects of crostamine are mediated through lysosomal membrane permeabilization. *Toxicon*, 52(3), 508–517. (<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.06.029>)
- Hermanson, G. (2013). *Bioconjugate Techniques* (13th ed.). San Diego: Academic Press.
- Karpel, R., da Silva, M., Campeiro, J., Bergeon, L., Szychowski, B., Butler, A., Marino, G., Cusic, J., Gonçalves, L., Oliveira, E., De Farias, M., Villares, R., Andrade, W., Daniel, M.-C. y Hayashi, M. (2018). Design and characterization of crostamine-functionalized gold nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 163, 1–8. (<https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2017.12.013>)

- Kerkis, I., Hayashi, M., Prieto, A., Pereira, A., De Sá Júnior, P., Zaharenko, A., Rádís-Baptista, G., Kerkis, A. y Yamane, T. (2014). State of the art in the studies on crotamine, a cell penetrating peptide from South American rattlesnake. *BioMed Research International*, 2014, 1–9. (<https://doi.org/10.1155/2014/675985>)
- Kharrat, R., Zenouaki, I., Lasfar, Z., Miled, K., y El-Ayeb, M. (1997). Molecular characterization, antigenicity and immunogenicity of anatoxic polymeric forms conferring protection against scorpion venoms. *Toxicon*, 35(6), 915–930. ([https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(96\)00187-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0041-0101(96)00187-0))
- Kuo, K.-W., y Chang, C.-C. (1991). High affinity antibody to cobrotoxin prepared from the derivatives of glutaraldehyde-detoxified cobrotoxin. *The Journal of Biochemistry*, 110(6), 863–867. Recuperado de: https://www.jstage.jst.go.jp/article/biochemistry1922/110/6/110_6_863/_pdf-char/en
- Lennon, B., Plummer, D., y Kaiser, I. (1990). Effects of subunit cross-linking on the properties of crotoxin. *Toxicon*, 28(6), 718–722.
- León, G., Sánchez, L., Hernández, A., Villalta, M., Herrera, M., Segura, Á., Estrada, R. y Gutiérrez, J. (2011). Immune response towards snake venoms. *Inflammation & Allergy-Drug Targets*, 10(5), 1–18.
- Lima, S., Porta, L., Lima, Á., Campeiro, J., Meurer, Y., Teixeira, N., Duarte, T., Oliveira, E., Picolo, G., Oliveira, R., Silva, R. y Hayashi, M. (2018). Pharmacological characterization of crotamine effects on mice hind limb paralysis employing both *ex vivo* and *in vivo* assays: Insights into the involvement of voltage-gated ion channels in the crotamine action on skeletal muscles. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(8), e0006700. (<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006700>)
- Losoya-Uribe, L. (2019). Obtención de anticuerpos monoclonales anti-crotamina del veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

- 
- Lourenço, A., Zorzella, C., Curtolo, L., Delazari, L., Pimenta, D., Barraviera, B., y Ferreira, R. (2013). Individual venom profiling of *Crotalus durissus terrificus* specimens from a geographically limited region: Crostamine assessment and captivity evaluation on the biological activities. *Toxicon*, 69, 75–81.
(<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.01.006>)
- Machado, R., Alvarenga, L., Tavares, C., Molina, F., Granier, C., y Chávez-Olórtegui, C. (2004). Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. *Toxicon*, 44(3), 233–241. (<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.04.015>)
- Mackessy, S. (2009). *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. CRC Press.
- Mancin, A., Soares, A., Andrião-Escarso, S., Faça, V., Greene, L., Zuccolotto, S., Pelá, I. y Giglio, J. (1998). The analgesic activity of crostamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom: A biochemical and pharmacological study. *Toxicon*, 36(12), 1927–1937.
([https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00117-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00117-2))
- Marinovic, M., Dal Mas, C., Monte, G., Felix, D., Campeiro, J., y Hayashi, M. (2017). Crostamine: function diversity and potential applications. In *Snake Venoms* (pp. 265–293). Dordrecht: Springer Netherlands.
(https://doi.org/10.1007/978-94-007-6410-1_28)
- Melani, R., Araujo, G., Carvalho, P., Goto, L., Nogueira, F., Junqueira, M., y Domont, G. (2015). Seeing beyond the tip of the iceberg: A deep analysis of the venom of the Brazilian rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. *EuPA Open Proteomics*, 8, 144–156. (<https://doi.org/10.1016/j.euprot.2015.05.006>)
- Mera, K., Nagai, M., Brock, J., Fujiwara, Y., Murata, T., Maruyama, T., Baynes, J., Otagiri, M. y Nagai, R. (2008). Glutaraldehyde is an effective cross-linker for production of antibodies against advanced glycation end-products. *Journal of Immunological Methods*, 334(1), 82–90. (<https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.02.002>)

- 
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M., y Waldron, K. (2004). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, 37(5), 790–802.
(<https://doi.org/https://doi.org/10.2144/04375RV01>)
- Nascimento, F., Hayashi, M., Kerkis, A., Oliveira, V., Oliveira, E., Rádis-Baptista, G., Nader, H., Yamane, T., Tersariol, I. y Kerkis, I. (2007). Crotonamine mediates gene delivery into cells through the binding to heparan sulfate proteoglycans. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(29), 21349–21360.
(<https://doi.org/10.1074/jbc.M604876200>)
- Nascimento, F., Sancey, L., Pereira, A., Rome, C., Oliveira, V., Oliveira, E., Nader, H., Yamane, T., Kerkis, I., Tersariol, I., Coll, J.-L. y Hayashi, M. (2012). The natural cell-penetrating peptide crotonamine targets tumor tissue in vivo and triggers a lethal calcium-dependent pathway in cultured cells. *Molecular Pharmaceutics*, 9(2), 211–221. (<https://doi.org/10.1021/mp2000605>)
- Neri-Castro, E., Bénard Valle, M., y Alagón Cano, A. (2014). Reptiles venenosos en México. *Revista Digital Universitaria UNAM*, 15(11), 1–8. Recuperado de: <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num11/art86/#>
- Neri-Castro, E., Lomonte, B., Gutiérrez, M., Alagón, A., y Gutiérrez, J. (2013). Intraspecies variation in the venom of the rattlesnake *Crotalus simus* from Mexico: Different expression of crotoxin results in highly variable toxicity in the venoms of three subspecies. *Journal of Proteomics*, 87, 103–121.
(<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.024>)
- Oguiura, N., Boni-Mitake, M., Affonso, R., y Zhang, G. (2011). In vitro antibacterial and hemolytic activities of crotonamine, a small basic myotoxin from rattlesnake *Crotalus durissus*. *The Journal of Antibiotics*, 64(10), 327–331.
(<https://doi.org/10.1038/ja.2011.10>)

- 
- Oguiura, N., Boni-Mitake, M., y Rádis-Baptista, G. (2005). New view on crotamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. *Toxicon*, 46(4), 363–370. (<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.06.009>)
- Osthoff, G. (1989). Far-UV CD-spectroscopy and immunological properties of synthetic sequential peptides derived from cardiotoxin V_{II} 1 of *Naja nivea* venom: An amphipathic α -helix formed by sequence 15–25 of a β -protein. *International Journal of Biochemistry*, 21(12), 1365–1368. ([https://doi.org/10.1016/0020-711X\(89\)90157-2](https://doi.org/10.1016/0020-711X(89)90157-2))
- Owen, J., Punt, J., Stranford, S., y Jones, P. (2013). *Kuby Immunology* (7th ed.). Nueva York, E.E.U.U.: W.H. Freeman and Company.
- Ownby, C., y Colberg, T. (1990). Comparison of the immunogenicity and antigenic composition of several venoms of snakes in the family *Crotalidae*. *Toxicon*, 28(2), 189–199. ([https://doi.org/10.1016/0041-0101\(90\)90413-2](https://doi.org/10.1016/0041-0101(90)90413-2))
- Paik, T.-H., Lee, J.-S., Kim, K.-H., Yang, C.-S., Jo, E.-K., y Song, C.-H. (2010). Mycobacterial cell-wall skeleton as a universal vaccine vehicle for antigen conjugation. *Vaccine*, 28(50), 7873–7880. (<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.09.083>)
- Peigneur, S., Orts, D., Prieto, A., Oguiura, N., Boni-Mitake, M., Oliveira, E., Zaharenko, A., De Freitas, J. y Tytgat, J. (2012). Crotamine pharmacology revisited: novel insights based on the inhibition of Kv channels. *Molecular Pharmacology*, 82(1), 90–96. (<https://doi.org/10.1124/mol.112.078188>)
- Pereira, A., Kerkis, A., Hayashi, M., Pereira, A., Silva, F., Oliveira, E., Prieto, A., Yamane, T., Rádis-Baptista, G. y Kerkis, I. (2011). Crotamine toxicity and efficacy in mouse models of melanoma. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 20(9), 1189–1200. (<https://doi.org/10.1517/13543784.2011.602064>)
- Possani, L., Fernandez, J., y Juliá, J. (1981). Detoxification with glutaraldehyde of purified scorpion (*Centruroides noxius* Hoffmann) venom. *Toxicon*, 19(2), 323–329. ([https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101\(81\)90036-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101(81)90036-2))



Quan, D. (2012). North American poisonous bites and stings. *Critical Care Clinics*, 28(4), 633–659. (<https://doi.org/10.1016/j.ccc.2012.07.010>)

Rádis-Baptista, G., Kubo, T., Oguiura, N., Prieto, Á., Hayashi, M., Oliveira, E., y Yamane, T. (2004). Identification of crotasin, a crotamine-related gene of *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon*, 43(7), 751–759. (<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.02.023>)


Rádis-Baptista, G., Kubo, T., Oguiura, N., Svartman, M., Almeida, T., Batistic, R., Oliveira, E., Vianna-Morgante, A. y Yamane, T. (2003). Structure and chromosomal localization of the gene for crotamine, a toxin from the South American rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon*, 42, 747–752. (<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.10.019>)


Rizzi, C., Carvalho-de-Souza, J., Schiavon, E., Cassola, A., Wanke, E., y Troncone, L. (2007). Crotamine inhibits preferentially fast-twitching muscles but is inactive on sodium channels. *Toxicon*, 50(4), 553–562. (<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.04.026>)

Saviola, A., Pla, D., Sanz, L., Castoe, T., Calvete, J., y Mackessy, S. (2015). Comparative venomomics of the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) from Colorado: Identification of a novel pattern of ontogenetic changes in venom composition and assessment of the immunoreactivity of the commercial antivenom CroFab®. *Journal of Proteomics*, 121, 28–43. (<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.03.015>)

Secretaría de Salud. (2019). *Boletín epidemiológico*. Ciudad de México. Recuperado de: <http://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general>

Segura, Á., Herrera, M., Reta Mares, F., Jaime, C., Sánchez, A., Vargas, M., Villalta, M., Gómez, A., Gutiérrez, J. y León, G. (2017). Proteomic, toxicological and immunogenic characterization of Mexican west-coast rattlesnake (*Crotalus basiliscus*) venom and its immunological relatedness with the venom of Central American rattlesnake

- 
- (*Crotalus simus*). *Journal of Proteomics*, 158, 62–72.
(<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.02.015>)
- Stiles, B., y Sexton, F. (1992). Immunoreactivity, epitope mapping and protection studies with anti-conotoxin GI sera and various conotoxins. *Toxicon*, 30(4), 367–377.
([https://doi.org/10.1016/0041-0101\(92\)90533-B](https://doi.org/10.1016/0041-0101(92)90533-B))
- Tan, N.-H. (1983). Improvement of Malayan cobra (*Naja naja sputatrix*) antivenin. *Toxicon*, 21(1), 75–79. ([https://doi.org/10.1016/0041-0101\(83\)90051-X](https://doi.org/10.1016/0041-0101(83)90051-X))
- Tan, N.-H., Saifuddin, N., y Nik Jaafar, M. (1990). Preparation of antibodies to king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom hemorrhagin and investigation of their cross-reactivity. *Toxicon*, 28(11), 1355–1359.
([https://doi.org/10.1016/0041-0101\(90\)90101-C](https://doi.org/10.1016/0041-0101(90)90101-C))
- Teixeira-Araújo, R., Castanheira, P., Brazil-Más, L., Pontes, F., Leitão, M., Machado, M., Benedeta, R. y Correa-Netto, C. (2017). Antivenomics as a tool to improve the neutralizing capacity of the crotalic antivenom: a study with crotamine. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 23(1), 28.
(<https://doi.org/10.1186/s40409-017-0118-7>)
- Tombaccini, D., Adeyemo, O., Pollard, H., y Feuerstein, G. (1990). Monoclonal antibodies against the presynaptic calcium channel antagonist ω -conotoxin GVI A from cone snail poison. *FEBS Letters*, 261(1), 71–75.
([https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80639-Z](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80639-Z))
- Uetz, P., Freed, P., y Hošek, J. (2018). The reptile database. Recuperado de: <http://www.reptile-database.org>
- Vergara, I. (2010). Influencia de la vía de administración en la capacidad neutralizante *in vivo* de dos antivenenos. Tesis de maestría. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos.



Vidunas, E., Mathews, A., Weaver, M., Cai, P., Koh, E., Patel-Brown, S., Yuan, H., Zheng, Z-R., Carriere, M., Johnson, J., Lotvin, J. y Moran, J. (2016). Production and characterization of chemically inactivated genetically engineered *Clostridium difficile* toxoids. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(7), 2032–2041. (<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.04.017>)

Warrell, D. (2010). Snake bite. *Lancet*, 375, 77–88. ([https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61754-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61754-2))

World Health Organization. (2017). *Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins*. WHO Technical Report Series, 1004. Ginebra, Suiza.

Yamane, E., Bizerra, F., Oliveira, E., Moreira, J., Rajabi, M., Nunes, G., De Souza, A., Da Silva, I., Yamane, T., Karpel, R., Silva Jr., P. y Hayashi, M. (2013). Unraveling the antifungal activity of a South American rattlesnake toxin crotamine. *Biochimie*, 95(2), 231–240. (<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.09.019>)

Yount, N., Kupferwasser, D., Spisni, A., Dutz, S., Ramjan, Z., Sharma, S., Waring, A. y Yeaman, M. (2009). Selective reciprocity in antimicrobial activity versus cytotoxicity of hBD-2 and crotamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(35), 14972–14977. (<https://doi.org/10.1073/pnas.0904465106>)

12. ANEXOS

Anexo 1

Preparación de buffers y soluciones de trabajo

Soluciones de filtración en gel

§ Acetato de amonio 2 M pH 4.7 (200 mL)

Pesar y disolver 30.8 g de acetato de amonio en 100 mL de H₂O destilada. Ajustar el pH a 4.7 con ácido acético glacial y aforar a 200 mL. Etiquetar y almacenar a 4°C. Diluir a 20 mM para su uso con H₂O destilada.

§ Buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.2 (200 mL)

Preparar las siguientes soluciones stock:

- a) Fosfato de sodio monobásico 0.2 M: Pesar y disolver 13.8 g de NaH₂PO₄•H₂O en 500 mL de H₂O destilada. Etiquetar y almacenar a 4°C.
- b) Fosfato de sodio dibásico 0.2 M: Pesar y disolver 26.8 g de Na₂HPO₄•7H₂O en 500 mL de H₂O destilada. Etiquetar y almacenar a 4°C.

Mezclar 28 mL de fosfato de sodio monobásico con 72 mL de fosfato de sodio dibásico y aforar a 200 mL. Etiquetar y almacenar a 4°C.

Soluciones para el entrecruzamiento de proteínas

§ Buffer de fosfatos 0.025 M pH 7.2 (2 L)

Diluir 500 mL de buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.2 con 1.5 L de H₂O destilada. Etiquetar y almacenar a 4°C.

§ Buffer Tris-HCL 1 M pH 8.0 (50 mL)

Pesar 6.1 g de tris-hidroxi-aminometano (tris-base) y disolver en 40 mL de H₂O destilada. Ajustar el pH a 8.0 con HCl y aforar a 50 mL con H₂O destilada. Etiquetar y almacenar a temperatura ambiente.

Soluciones para HPLC en fase reversa

§ Solución A (TFA 0.1%) para 1 L

En un 1 L de H₂O tetradestilada, añadir 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA) y filtrar utilizando un filtro hidrofílico. Etiquetar y almacenar a temperatura ambiente.

§ Solución B (acetonitrilo con 0.1% TFA) para 1 L

En 1 L de acetonitrilo, añadir 1 mL de TFA y filtrar utilizando un filtro hidrofóbico. Etiquetar y almacenar a temperatura ambiente.

Soluciones para SDS-PAGE con tris-glicina

§ Acrilamida/bis-acrilamida (100 mL)

Pesar y disolver 30 g de acrilamida y 0.8 g de bisacrilamida en 50 mL de H₂O destilada. Aforar a 100 mL con H₂O destilada, cubrir el frasco con papel aluminio y almacenar a 4°C.

§ Buffer inferior (100 mL)

Pesar y disolver 18.2 g de tris-base en 50 mL de H₂O destilada y añadir 2 mL de SDS al 20%. Ajustar a pH 8.8 con HCl concentrado y aforar a 100 mL con H₂O destilada. Etiquetar y almacenar a 4°C.

§ Buffer superior (100 mL)


Pesar y disolver 6.1 g de tris-base en 50 mL de H₂O destilada y añadir 2 mL de SDS al 20%. Ajustar a pH 6.8 con HCl concentrado y aforar a 100 mL con H₂O destilada.

§ Buffer de corrida 10x (500 mL).

Pesar y disolver 15.2 g de tris-base y 72.1 g de glicina en 300 mL de H₂O destilada. Añadir 25 mL de SDS al 20% y aforar a 500 mL con H₂O destilada. Etiquetar y almacenar a 4°C. Diluir a 1x para su uso con H₂O destilada.

§ Buffer de muestra desnaturalizante 5x (10 mL)

En un tubo Falcon de 15 mL mezclar 2.5 mL de glicerol, 0.63 g de SDS (o 3.13 mL de SDS 20%), 1.25 mL de Tris-HCl pH 6.8, 1.25 mL de 2-mercaptoetanol y 0.5 mL



de azul de bromofenol al 1%. Aforar a 10 mL con H₂O destilada, mezclar y preparar alícuotas de 1 mL. Almacenar en congelación -20°C y diluir a 1x para su uso.

§ Persulfato de amonio 10% (1 mL)

Disolver 0.1 g de persulfato de amonio en 1 mL de H₂O destilada. Almacenar a 4°C. Nota: El persulfato de amonio tiene mejores resultados si se prepara en fresco, de lo contrario preparar cada 15 días.

§ Solución de tinción azul de Coomassie (500 mL)

Pesar y disolver 1 g de azul de Coomassie R-250 en 125 mL de isopropanol. Añadir 50 mL de ácido acético y aforar a 500 mL con H₂O destilada. Etiquetar y almacenar a 4°C.

§ Solución de destinción (500 mL)

Mezclar 50 mL de isopropanol con 50 mL de ácido acético y aforar a 500 mL con H₂O destilada. Etiquetar y almacenar a temperatura ambiente.

Soluciones para SDS-PAGE con tris-tricina

§ Buffer del gel (100 mL)

Pesar y disolver 36.4 g de tris-base en 60 mL de H₂O destilada y ajustar a pH 8.45 con HCl concentrado. Aforar a 100 mL con H₂O destilada, añadir 0.3 g de SDS y almacenar a 4°C.

§ Buffer del cátodo 10x (500 mL)

Pesar y disolver 60.6 g de tris-base y 89.6 g de tricina en 300 mL de H₂O destilada. Aforar a 500 mL y añadir 5 g de SDS. No es necesario ajustar pH, almacenar a 4°C. Diluir a 1x para su uso.

§ Buffer del ánodo 10x (1 L)

Pesar y disolver 242.2 g de tris-base en 600 mL de H₂O destilada y ajustar a pH 8.9 con HCl concentrado. Aforar a 1 L y almacenar a 4°C. Diluir a 1x para su uso.

Soluciones para ELISA

§ Buffer Tris-HCl 1 M pH 8.0 (1 L)

Pesar 121.1 g de tris-base y disolver en 750 mL de H₂O destilada. Ajustar el pH a 8.0 con HCl y aforar a 1 litro con H₂O destilada. Etiquetar y almacenar a temperatura ambiente.

§ NaCl 5 M (1 L)

Pesar y disolver 292.2 g de NaCl en 750 mL de H₂O destilada. Aforar a 1 litro con H₂O destilada, etiquetar y almacenar a temperatura ambiente.

§ Buffer de sensibilización (500 mL)

Pesar y disolver 4.2 g de NaHCO₃ en 500 mL de H₂O destilada. Etiquetar y almacenar a 4°C.

§ Solución de bloqueo (500 mL)

Mezclar 25 mL de Tris-HCl 1 M pH 8.0 con 2.5 g de gelatina predisuelta en 100 mL de agua caliente (50-60°C). Después de atemperar, agregar 1 mL de tween-20 y aforar a 500 mL con H₂O destilada. En uso rutinario almacenar a 4°C, de lo contrario almacenar a -20°C.

§ Buffer de lavado (1 L)

Mezclar 30 mL de NaCl 5 M, 50 mL de tris-HCl 1 M pH 8.0 y 0.5 mL de tween-20. Aforar a 1 litro con H₂O destilada, etiquetar y almacenar a 4°C.

§ Buffer de reacción (500 mL)


Mezclar 25 mL de tris-HCl 1 M pH 8.0, 50 mL de NaCl 5 M y 500 mg de gelatina predisuelta en 100 mL de agua caliente (50-60°C). Una vez atemperado, agregar 250 µL de tween-20 y aforar a 500 mL con H₂O destilada. Etiquetar y almacenar a 4°C.

§ Buffer para ABTS (500 mL)

Preparar las siguientes soluciones stock:

- a) Solución A (ácido cítrico anhidro 0.1 M): Pesar y disolver 3.8 g de ácido cítrico anhidro en 100 mL de H₂O destilada. Aforar a 200 mL, etiquetar y reservar.
- b) Solución B (fosfato de sodio dibásico 0.2M): Pesar y disolver 10.7 g de Na₂HPO₄•7H₂O en 100 mL de H₂O destilada. Aforar a 200 mL, etiquetar y reservar.

Mezclar 147 mL de Solución A con 103 mL de Solución B. Aforar a 500 mL con H₂O destilada. Alicuotar y almacenar a -20°C. Por cada placa utilizar 10 mL de buffer



para ABTS (buffer citrato-fosfato 70 mM pH 4.2), agregar 75 uL de ABTS (solución de ABTS 50 mg/mL) + 2 uL de H₂O₂ (peróxido de farmacia).

§ Solución de paro (SDS 20%) (500 mL)

Pesar y disolver 100 g de SDS en 350 mL de H₂O destilada. Aforar a 500 mL con H₂O destilada, etiquetar y almacenar a temperatura ambiente.

Soluciones para Western blot y Slot blot

§ Buffer de transferencia para membrana de nitrocelulosa

Pesar y disolver 1.45 g de glicina y 2.9 g de tris-base en 300 mL de H₂O destilada y añadir 100 mL de metanol. Aforar a 500 mL y añadir 0.185 g de SDS. Etiquetar y almacenar a temperatura ambiente.

§ Buffer de lavado 10x (TBS-T)

Mezclar 50 mL de tris-HCl 1 M pH 7.5 y 150 mL de NaCl 5 M. Aforar a 500 mL con H₂O destilada. Añadir 2.5 mL de tween-20, mezclar y almacenar a 4°C. Diluir a 1x para su uso.

§ Buffer de bloqueo (10 mL)

Pesar y disolver 0.5 g de leche Svelty en 10 mL de TBS-T 1x.

§ Buffer de desnaturalización 5x (10 mL)

En un tubo Falcon de 15 mL mezclar 0.63 g de SDS (o 3.13 mL de SDS 20%), 1.25 mL de tris-HCl pH 6.8 y 1.25 mL de 2-mercaptoetanol. Aforar a 10 mL con H₂O destilada, mezclar y preparar alícuotas de 1 mL. Almacenar en congelación -20°C y diluir a 1x para su uso.

Soluciones para la determinación de dosis letal media y potencia neutralizante

§ NaCl 150 mM (100 mL)

Diluir 3 mL de NaCl 5 M con 97 mL de H₂O destilada. Etiquetar y almacenar a 4°C.

Anexo 2

SDS-PAGE de los conjugados de veneno producidos con glutaraldehído

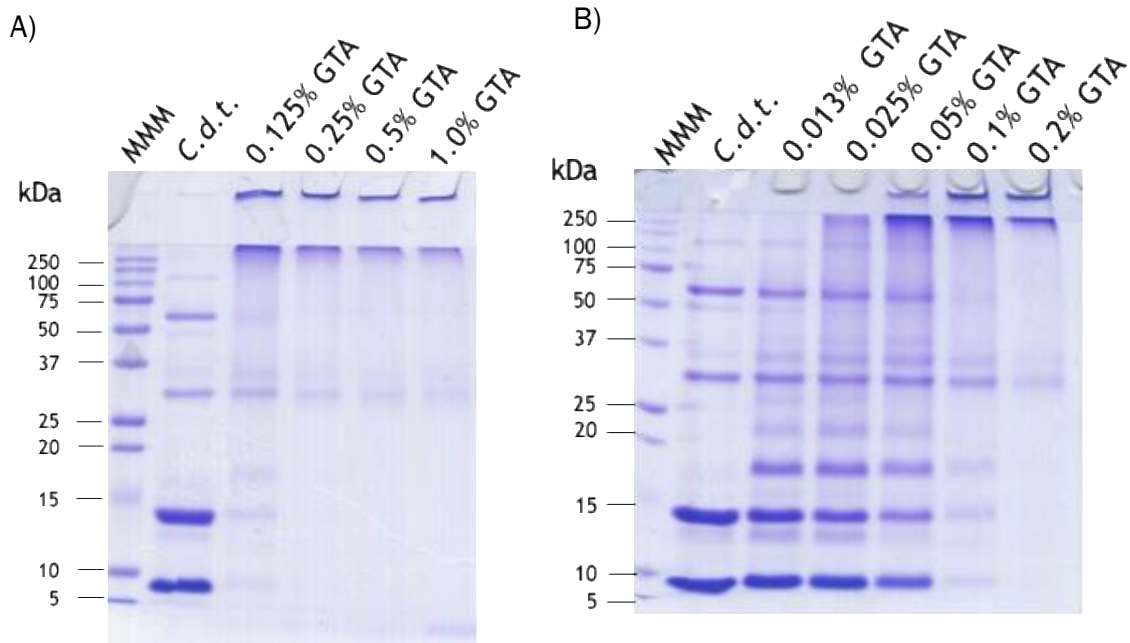


Figura 30. SDS-PAGE al 15% bajo condiciones reductoras de los conjugados de veneno producidos con A) altas concentraciones de glutaraldehído y B) bajas concentraciones de glutaraldehído. Los conjugados solubles mayores a 250 kDa quedaron atrapados al inicio del gel separador y en los pozos del gel concentrador.