



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA SUBUNIDAD B DE LA CROTOXINA,
GENERACIÓN DE ANTICUERPOS Y EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD
NEUTRALIZANTE.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
BIÓL. MIGUEL ANGEL MEJÍA SÁNCHEZ

DR. GERARDO ALFONSO CORZO BURGUETE
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

DR. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA
INSTITUTO DE LIMNOLOGÍA Y CIENCIAS DEL MAR, UNAM

DRA. DENHI SCHNABEL PERAZA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

Ciudad de México. Febrero, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**En memoria de Nicolás Sánchez Estrada,
quien fuera mi muy amado abuelo.**

Agradecimientos

Esta investigación fue realizada en el laboratorio del Dr. Gerardo Corzo gracias al financiamiento de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM), número IT200321, y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) al proyecto de investigación del consorcio Alagón-Becerril-Corzo-Possani denominado “Venenos y antivenenos”, número 303045.

A CONACyT por la beca de estudios de maestría 1034412.

Al Instituto de Biotecnología de la UNAM, por todas las facilidades.

Al Dr. Gerardo Corzo, por la dirección de este trabajo, por su enorme paciencia y serenidad al momento de explicarme, pero sobre todo por la libertad que me dio en este trabajo, buscando alcanzar y cumplir los objetivos que ambos planteamos para esta investigación.
¡Muchas gracias Doc!

A mi comité tutor, el Dr. José Estuardo López y la Dra. Denhi Schnabel, por sus valiosos comentarios a lo largo del desarrollo de este trabajo.

Al apoyo técnico de la Dra. Herlinda Clement y del Dr. Iván Arenas.

Al apoyo técnico de las Dras. Herlinda Clement y Ligia Luz Corrales, en el diseño, construcción y ensamble de la proteína mutante

Al Dr. Edgar Neri y la Dra. Melisa Bénard, por las muestras de venenos, datos y valores de referencia que muy amablemente me proporcionaron para poder continuar algunos ensayos de este trabajo. Así como los consejos dados.

Al Dr. Fernando Zamudio, por su apoyo en la obtención de las masas experimentales.

A Carmen Segura por todo el apoyo administrativo.

Al bioterio del Instituto de Biotecnología, y en especial a la Dra. Elizabeth Mata por su apoyo en la inmunización de los conejos.

Al Dr. Alejandro Carbajal por las muestras de venenos.

Agradecimientos a título personal

A mis padres por siempre confiar en mí, y por creer en que soy capaz de alcanzar los objetivos que me ponga, además, por ser mi mayor ejemplo sobre esfuerzo y la perseverancia, y como esto siempre nos lleva a cumplir cualquier meta. No tengo palabras que expresen toda mi gratitud más que ¡Muchas gracias!

A mis hermanas, porque, a pesar de todas las altas y bajas, nos mantenemos siempre en la misma frecuencia, impulsándonos a seguir adelante. No tengo forma ni palabras de agradecer todo el apoyo que me han brindado. ¡Mil gracias!

A todos los integrantes de “los corzos”: Dr. Corzo, Herli, Iván, Sam, Andrei, Astrid, Marcos, Marco, Victor, Galilea. Por todo el apoyo, las risas y sobre todo por hacerme sentir parte de un equipo, en el cual todos los miembros somos importantes y valiosos.

Al grupo de trabajo del Dr. Alejandro Alagón, Pichón, Felipón, Adreita, Meli, Neri, Manuel, Vane, Alid, Gibran y todos los demás, por compartir el espacio, los buenos comentarios y las risas que hicieron más ameno el trabajo en el laboratorio.

A todos mis compañeros de generación (César, Raz, Juan, Manuel, Sam, Angie, Indra) por hacer más llevadera, ligera y divertida esta cruz llamada posgrado.

A Edgar e Ingrid, por estar siempre ahí para escuchar mis dramas, chismear y sobre todo por la amistad tan incondicional que me han brindado. No los merezco.

INTRODUCCIÓN	1
<i>Reptiles venenosos de México</i>	1
<i>Crotalus</i>	1
<i>Composición del veneno de serpientes</i>	2
<i>Metaloproteasas</i>	2
<i>Desintegrinas</i>	3
<i>Crotamina</i>	3
<i>Fosfolipasas</i>	4
<i>Crotoxina y subunidad B</i>	5
<i>Variación en la composición del veneno</i>	8
<i>Epidemiología del accidente ofídico</i>	9
<i>Antivenenos</i>	10
<i>Inmunodominancia</i>	11
ANTECEDENTES	13
JUSTIFICACIÓN	15
HIPOTESIS	15
OBJETIVO	15
METODOLOGÍA	16
<i>Construcción del vector de expresión</i>	16
<i>Transformación en Escherichia coli (E. coli)</i>	16
<i>Construcción de la subunidad B mutante</i>	16
<i>Expresión de la subunidad B recombinante y mutante</i>	17
<i>Obtención de las proteínas en cuerpos de inclusión</i>	17
<i>Cromatografía de afinidad a níquel</i>	17
<i>Electroforesis en geles de acrilamida y bisacrilamida (SDS-PAGE)</i>	17
<i>Purificación mediante Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC)</i>	18
<i>Determinación de la masa molecular experimental</i>	18
<i>Plegamiento in vitro</i>	18
<i>Esquema de inmunización</i>	18
<i>Purificación de inmunoglobulinas a partir de la precipitación de albumina</i>	19
<i>Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)</i>	19

<i>Western-blot semi-seco</i>	19
<i>Ensayo de actividad fosfolipasa sobre yema de huevo en placa de agarosa.</i>	20
<i>Ensayo de neutralización de actividad fosfolipasa sobre yema de huevo en placa de agarosa</i> ...	20
<i>Ensayo titulométrico de actividad fosfolipasa sobre yema de huevo</i>	20
<i>Ensayo titulométrico de neutralización de la actividad de fosfolipasa sobre yema de huevo</i>	20
<i>Ensayo de neutralización in vivo</i>	20
RESULTADOS	22
<i>Expresión de la subunidad B de crotoxina recombinante</i>	22
<i>Plegamiento</i>	25
<i>Ensayos de actividad bioquímica</i>	27
<i>Inmunización y evaluación de anticuerpos presentes en el suero</i>	27
<i>Inhibición de la actividad fosfolipasa</i>	28
<i>Inhibición de la actividad letal de la crotoxina y veneno completo</i>	29
<i>Construcción de la mutante de subunidad B de crotoxina</i>	30
<i>Expresión de la mutante de subunidad B de crotoxina con los tres cambios en la secuencia</i>	39
<i>Plegamiento de la proteína mutante</i>	40
<i>Evaluación del reconocimiento de los anticuerpos generados hacia la subunidad B mutante</i>	41
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	52
PERSPECTIVAS	53
REFERENCIAS	54
ANEXOS	65

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Representación y letalidad de hómólogos de crotoxina	7
Tabla 2. Niveles taxonómicos sobre la variación de veneno en serpientes venenosas	9
Tabla 3. Neutralización de subunidad B nativa y veneno completo	29
Tabla 4. Criterios de selección de las secuencias seleccionadas para la construcción de la proteína mutante	30
Tabla 5. Alineamiento de las secuencias seleccionadas para la construcción de la proteína mutante.	31
Tabla 6. Flujo de trabajo en términos de secuencias para la obtención de la crotoxina recombinante mutada de la serpiente <i>Crotalus tzabcan</i>	32
Tabla 7. Secuencias de los oligonucleótidos para la obtención de las mutaciones.	33
Tabla 8. Reconocimiento de las tres proteínas por parte de los anticuerpos generados en conejo	42
Figura 1. Gel de acrilamida al 15% de la expresión de la subunidad B recombinante.	23
Figura 2. Perfil de elución de la proteína recombinante reducida	24
Figura 3. Determinación de la masa molecular de la proteína reducida.	25
Figura 4. Perfil de elución de la subunidad B recombinante	26
Figura 5. Perfil electroforético de la proteína subunidad B recombinante en SDS-PAGE 15%.	26
Figura 6. Actividad fosfolipasa sobre agarosa y yema de huevo al 10 %.	27
Figura 7. Evaluación de títulos de antisuero anti-subunidad B contra la proteína recombinante, proteína nativa y venenos de <i>C. tzabcan</i> y <i>C. mictlantecuhtli</i>	28
Figura 8. Gel de acrilamida al 15 % en condiciones reductoras de crotoxina nativa y distintos venenos completos	30
Figura 9. Alineamiento de las secuencias utilizadas para la construcción de la proteína mutante.	32
Figura 10. Amplificación del <i>megaprimer 1</i>	33
Figura 11. Amplificación de la construcción para la obtención de los dos primeros cambios	34
Figura 12. Resultados de PCR de colonia que fueron producto de la transformación de la construcción de la subunidad B + pQE30.	35
Figura 13. Amplificación del <i>megaprimer 2</i>	36
Figura 14. Amplificación para la obtención de las mutaciones deseadas de la subunidad B de la serpiente <i>C. tzabcan</i>	36
Figura 15. Resultados del PCR de las colonias que fueron producto de la transformación de la construcción de la pQE30: Subunidad B.	37
Figura 16. Gel de acrilamida al 15% de expresión de las colonias 1 a 9 y 11	38
Figura 17. Gel de acrilamida al 15% de la expresión de la subunidad B mutante.	39
Figura 18. Perfil de elución de la proteína mutante reducida	40
Figura 19. Perfil de elución de la proteína mutante en estado plegado.	41
Figura 20. Evaluación de títulos de antisuero anti-subunidad B contra la subunidad B recombinante, subunidad B nativa y subunidad B mutante.	42
Figura 21. Figura 21. A) SDS-PAGE 15 % en condiciones reductoras de subunidad B nativa y distintos venenos completos. B) Western-Blot	43

RESUMEN

A nivel mundial existe una gran diversidad de herpetofauna venenosa, habiendo una gran diversidad de esta fauna en América del Norte, siendo el género *Crotalus* el principal implicado en las interacciones humano-serpiente u ofidismo, dada su amplia distribución. El veneno de las serpientes de cascabel está constituido por diversos compuestos cuya abundancia varía debido a diversos factores como la distribución geográfica, edad y salud de los individuos. Sin embargo, entre estos compuestos, hay algunos de mayor interés debido a los efectos tóxicos que generan en los cuadros de envenenamientos, tales como la crotoxina, la cual es una enzima dimérica constituida de dos subunidades, la A y la B; cuya actividad principal es la neurotóxica, bloqueando la comunicación del nervio con el músculo, al inhibir la liberación o unión de algunos neurotransmisores como la acetilcolina. Trabajos previos con crotoxina, específicamente con la subunidad B, se han basado en el uso de esta proteína en estado nativo como inmunógeno en distintos modelos animales, con el fin de generar anticuerpos capaces de neutralizar el efecto tóxico de la subunidad B, la crotoxina completa y el veneno completo; Sin embargo, no existen reportes previos del uso de anticuerpos generados a partir de una crotoxina o subunidad B generada por expresión heteróloga. Con el objetivo de evaluar la capacidad inmunogénica de la subunidad B de la crotoxina, esta fue expresada en un sistema heterólogo utilizando el vector de expresión pQE-30 en la cepa *origami* de la bacteria *E. coli*. La proteína fue obtenida en cuerpos de inclusión los cuales fueron solubilizados para la purificación de la proteína mediante la etiqueta de histidinas que se le añadió en la región N-terminal, y posteriormente reducida para un segundo paso de purificación. Posteriormente, se realizó un plegamiento *in vitro*, el cuál fue inmunizado a conejos con el objetivo de generar anticuerpos capaces de reconocer y neutralizar a la proteína nativa. A la par, se realizó la construcción de una proteína mutante con cambios específicos en los residuos aminoacídicos G₅₂, A₅₅ y E₈₂, la cual fue expresada y plegada bajo el mismo protocolo de la recombinante original. Como resultado, los anticuerpos generados mostraron reconocer tanto a la proteína nativa, así como a la recombinante y a la mutante, además de reconocer la presencia de la proteína en venenos que son positivos a ella. Finalmente, ensayos de neutralización mostraron la capacidad de los anticuerpos contra la subunidad B para inhibir el efecto tóxico y enzimático de la proteína nativa, así como de veneno completo.

ABSTRACT

Globally there is a great diversity of venomous reptiles, having a great diversity in North America, being the genus *Crotalus* the main involved in the human-snake interaction, given its wide distribution. The venom of rattlesnakes is made up of various compounds whose abundance varies due to various factors such as geographical distribution, age and health of individuals. However, among these compounds, there are some of greater interest due to the toxic effects they generate on the envenomations, such as crotoxin, which is a dimeric enzyme composed of two subunits, A and B, whose main activity is neurotoxic, blocking nerve communication in muscle by inhibiting the release or binding of some neurotransmitters such as acetylcholine. Previous works with crotoxin, specifically with the subunit B (the most toxic), have been based on its use in the native state as an immunogen in different animal models, with the aim of generating antibodies capable of neutralizing the toxic effect of the whole crotoxin and of the complete crotalid venom. However, there are no previous reports of the use of antibodies generated from crotoxin or its subunit B produced by heterologous expression. Therefore, with the aim to evaluate the immunogenic capacity of the subunit B of the crotoxin it was heterologously expressed in bacteria using the expression vector pQE-30 in the *origami* strain of *E. coli*. The subunit B was obtained in inclusion bodies, which were further solubilized for purification of subunit B taking advantage of a histidine tag that was added at its N-terminal. Once it was purified, a disulfide reduction and a second purification step was performed. Subsequently, an *in vitro* folding was executed to obtain the oxidized subunit B for further immunization of rabbits with the purpose for generating antibodies able to recognize and neutralize both the native Crotoxin and subunit B. At the same time, the construction of a variant subunit B, with specific changes in the amino acid residues G₅₂, A₅₅ y E₈₂, was expressed and folded under similar conditions of the original recombinant subunit B. As a result, the anti-subunit B antibodies recognized both the variant subunit B. Therefore, the generated anti-subunit B antibodies could recognize other subunit B epitopes non related to G₅₂, A₅₅ y E₈₂. Finally, neutralization assays showed the ability of antibodies to inhibit the toxic, and enzymatic effect of the native subunit B, the whole crotoxin, as well as the complete crotalid venom.

INTRODUCCIÓN

Reptiles venenosos de México

A nivel mundial existen un aproximado de 4,000 especies de serpientes u ofidios, de los cuales únicamente el 19 % poseen veneno que puede poner en riesgo la salud y vida del ser humano (Fernández–badillo et al., 2021). En América del Norte existe una gran diversidad de herpetofauna venenosa, representada por al menos 2 especies de lagartos y 197 especies de serpientes venenosas (Campell & Lamar, 2004), siendo México quien posee una amplia riqueza de reptiles venenosos, contando con alrededor de 2 especies de lagartos, 17 de elápidos y 73 especies de vipéridos (Campell & Lamar, 2004; Uetz, 2019.), y siendo el país con la mayor riqueza a de serpientes venenosas en América y el más diverso en cuanto a especies de vipéridos (Fernández–badillo et al., 2021), estas últimas agrupadas en 10 géneros, siendo *Crotalus* el género más diverso de ellos con al menos 42 especies, 32 de ellas endémicas (Méndez de la Cruz et al., 2009; Uetz, 2019).

Crotalus

El nombre del género deriva del vocablo griego *krotalon* que significa crótalo o cascabel, y que hace alusión al apéndice al final de la cola que es característico de estas serpientes. Dicho cascabel no es más que una estructura compuesta por fragmentos córneos, trilobulados y unidos entre sí, el cual la serpiente agita como señal de advertencia ante posibles depredadores (Campell & Lamar, 2004; Valledor, 1994).

Al igual que otros vipéridos, las serpientes de cascabel se caracterizan por tener grandes colmillos inoculadores, los cuales se encuentran conectados a una glándula productora de veneno que se encuentra en la parte posterior de la cabeza, por detrás y debajo de los ojos. Poseen cabezas robustas con pequeñas escamas en la parte superior, y un cuello delgado, aunque el cuerpo generalmente es grande y robusto con escamas quilladas a lo largo del cuerpo. Finalmente, al igual que el resto de la subfamilia Crotalinae, se caracterizan por poseer una foseta termorreceptor ubicada entre orificio de la narina y el ojo a ambos lados de la cabeza (Lemos et al., 2015; Valencia, 2006).

Composición del veneno de serpientes

Los venenos de vipéridos del género *Crotalus* son una mezcla de compuestos orgánicos, principalmente de proteínas producidas en glándulas especializadas, y que son inoculados a través de conductos asociados a ambos huesos maxilares. Las principales moléculas activas de los venenos son proteínas, cuya principal función biológica es la inmovilización de la presa o la muerte de esta, y a la par, interviniendo en el proceso digestivo (Chippaux et al., 1991). De igual forma, se propone que la composición de los venenos está en función de características morfológicas de las serpientes, así como el tipo de presa al que está dirigido, pudiendo influir proteínas con distintas actividades tales como la neurotóxica, cardiotoxica, coagulante, hemorrágica e incluso hepatotóxica (Gloyd, 1940).

Entre los grupos más abundantes en el veneno del género *Crotalus* se encuentran la crotamina, crotoxina A y B, fosfolipasas, proteasas, desintegrinas, entre otras (Chippaux & Goyffon, 1998; Peterson, 2006).

Metaloproteasas

Son enzimas con actividad proteolítica dependientes de cationes divalentes, principalmente zinc, que tienen actividad hemorrágica generada por la desnaturalización de proteínas de la matriz extra celular, siendo componentes principales en el veneno de vipéridos constituyendo hasta un 70 % del mismo en algunos casos, sin embargo, también han sido descritas en venenos de elápidos y colúbridos (Casewell et al., 2015; Matsui et al., 2000).

Están constituidas por hasta 200 aminoácidos, y tienen una secuencia conservada en el sitio de acción ubicado entre los residuos 140 a 150 (Gutierrez et al., 2010; Hock & Hong, 2017; Matsui et al., 2000), y se les clasifican en cuatro grupos dependiendo de la composición de sus dominios: SVMP PI (dominio metaloproteasa), PII (dominios metaloproteasa y desintegrina), PIII (dominios metaloproteasa, desintegrina y rico en cisteínas) y PIV (mismos dominios que PIII y subunidades con dominios de lectina tipo C), siendo las PIII las que presentan la mayor actividad hemorrágica (Casewell et al., 2015; Gutierrez et al., 2010).

Además de la actividad hemorrágica, algunos miembros de esta familia tienen actividad fibrinogenolítica rompiendo las cadenas A α y/o B β del fibrinógeno (Matsui et al., 2000). Su

actividad proteolítica y hemorrágica puede ser inhibida por agente quelantes, tales como el EDTA o 1,10 fenantrolina (Gutierrez et al., 2010; Matsui et al., 2000).

Desintegrinas

Son proteínas de bajo peso molecular derivadas de un precursor de metaloproteasas, ricas en aminoácidos cargados positivamente tales como la Arg y la Lys, además de aminoácidos negativos como el Asp a lo largo de su secuencia (Hock & Hong, 2017; Selistre-de-Araujo et al., 2010). Se clasifican hasta en cinco grupos de acuerdo al número de residuos que las constituyen, además de formar complejos mono o diméricos α y β , cuya unión entre complejos es del tipo covalente mediante puentes disulfuro formados entre los residuos de cisteína, confiriendo una resistencia proteolítica a la estructura tridimensional (Calvete et al., 2010; Hock & Hong, 2017). Su actividad biológica consiste en la inhibición de la agregación plaquetaria bloqueando el receptor fibrinógeno integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, sin embargo, pueden bloquear otros receptores, teniendo un alto grado de selectividad y afinidad (Calvete et al., 2010). Entre los usos farmacéuticos y terapéuticos en los cuales participan algunas desintegrinas, se ha descrito la inhibición de la adhesión celular estudiada en células cancerígenas y la migración celular (Selistre-de-Araujo et al., 2010).

Estudios en desintegrinas recombinantes indican que aunque toda la estructura de la proteína es importante para su función, la alteración de alguna de ellas pueden inhibir la actividad de la proteína (Calvete et al., 2010).

Crotamina

Es una toxina originalmente aislada del veneno de la serpiente *C. d. terrificus*, la cual se encuentra constituida por una secuencia de 42 aminoácidos, rica en residuos básicos, incluyendo nueve lisinas y dos argininas; además de poseer seis residuos de cisteína, los cuales conforman tres puentes disulfuro que mantienen la estabilidad de la forma tridimensional de la proteína (Cameron & Tu, 1978; Kerkis et al., 2004; Radis-Baptista & Kerkis, 2012), y se le incluye en el grupo denominado *small basic polypeptide myotoxins* (SBPMs) (Weinsterin et al., 2010). Estructuralmente posee una elevada similitud a otras familias de proteínas como las miotoxinas, las α - y β -defensinas, así como a defensinas de insectos (Coronado et al., 2013; Kerkis et al., 2004), conteniendo los residuos cargados e hidrofóbicos dentro de la estructura tridimensional, que, junto con los puentes disulfuro le confieren una facilidad de unión a sus proteínas diana (Coronado et al., 2013).

Entre las actividades biológicas que han sido descritas para la proteína se encuentra la neurotoxicidad, ya que causa la despolarización de la membrana celular, mediante los canales de sodio del músculo esquelético, y la vacuolización del retículo sarcoplásmico (Radis-Baptista & Kerkis, 2012), generando parálisis de las extremidades. Derivado de lo anterior, se le ha atribuido una toxicidad moderada con una DL_{50} de 6 mg/kg (Weinsterin et al., 2010), y se ha descrito una variación en la presencia o ausencia de crotamina en venenos de crotálicos, dando lugar a las variedades crotamina-positivo y crotamina-negativo. También se han descrito distintas isoformas de la proteína, cuya presencia llegan a variar en el veneno de un mismo individuo (Oguiura et al., 2009). Algunas otras proteínas similares a la crotamina, denominadas *crotamine-like* se han descrito en los venenos de otras serpientes de cascabel, tales como *Crotalus o. helleri*, *C. o. concolor*, *C. o. oreganus*, *C. adamanteus* y *C. d. ruruima* (Radis-Baptista & Kerkis, 2012; Weinsterin et al., 2010).

Además de la neurotoxicidad, se ha descrito la actividad mionecrótica, debido al daño estructural que provoca en las fibras del músculo esquelético (Cameron & Tu, 1978; Radis-Baptista & Kerkis, 2012), y farmacológicamente, se han descrito actividades analgésicas, teniendo un mayor efecto al de algunos fármacos comerciales, tales como la morfina (Weinsterin et al., 2010).

Fosfolipasas

Las fosfolipasas A_2 (PLA_2) son enzimas con una masa molecular cercana a los 14,000 Da, con un porcentaje de identidad entre ellas que va del 40 al 99 %, con una secuencia de 115 a 125 aminoácidos, teniendo regiones conservadas, las cuales son indispensables para la(s) actividad(es) que realiza(n) (de Paula et al., 2009; Sunugar et al., 2015). Estructuralmente poseen siete enlaces disulfuros, sin embargo, se ha hipotetizado que aquel originado por los residuos Cys₅₀ y Cys₁₃₃ es de importancia para su actividad, dada su cercanía con el sitio activo de la enzima; además del residuo Asp₄₉, el cual podría tener un rol importante en la actividad biológica de la proteína (de Paula et al., 2009; Sunugar et al., 2015). Tienen una estructura terciaria altamente conservada, que consiste en una α -hélice en el N-terminal, dos α -hélices antiparalelas, dos hojas β -antiparalelas pequeñas, una región C-terminal y un sitio de unión a Ca^{2+} (de Paula et al., 2009). Sin embargo, algunas fosfolipasas no requieren del Ca^{2+} para llevar a cabo su actividad, y en aquellas que si lo requieren, la concentración de este cofactor puede variar de micromolar (μM) a milimolar (mM) (Dennis, 1997).

Su clasificación puede estar en función de su estructura: aquellas que constan únicamente de una sola cadena polipeptídica como la ammoditoxina, aquellas que constan de dos subunidades unidas covalentemente como la β -bungarotoxina, y finalmente aquellas que están constituidas por dos subunidades unidas por asociaciones no covalentes, tales como la crotoxina (Choumet et al., 1992).

Entre las actividades que llevan a cabo esta la hidrólisis de glicerofosfolípidos en la posición sn-2 del glicerol, liberando lisofosfolípidos y ácidos grasos, teniendo una selectividad por los grupos araquidónicos (Dennis, 1997; Doley et al., 2010; Kini, 2003), así como la transducción de señales, actividad antimicrobiana o actividades de defensa en hospederos e incluso apoptosis (Sunugar et al., 2015). Sin embargo, en venenos de serpientes, llevan a cabo distintas actividades, tales como la miotoxicidad o actividad neurotóxica, como la que realizan la bungarotoxina, o la crotoxina (de Paula et al., 2009).

Crotoxina y subunidad B

Es una PLA₂ aislada y purificada originalmente a partir del veneno de la serpiente *C. d. terrificus* (Slotta & Fraenkel-Conrat, 1938), se encuentra como un complejo heterodimérico, la subunidad A, o también llamada crotapotin, y la subunidad B. Las dos subunidades (A/B) están unidas por enlaces no covalentes (Doley & Kini, 2009; Fernandes et al., 2017). La subunidad B posee actividad PLA₂ y es tóxica a mamíferos, sin embargo, aunque la subunidad A no es tóxica, la letalidad de la crotoxina se ve favorecida con la formación del complejo entre ambas subunidades (Faure et al., 2011; Hendon & Fraenkel-Conrat, 1971; Rangel-Santos et al., 2004). Con respecto a la subunidad B, su principal actividad es la neurotóxica, la cual se da a nivel de la unión neuromuscular, causando inhibición en la liberación de acetilcolina (Boda et al., 2018). En ensayos *in vitro* despolariza el músculo esquelético incrementando la liberación de creatina quinasa y la mionecrosis (de Paula et al., 2009), y aunque se sabe que la subunidad B bloquea la transmisión neuromuscular, los mecanismos de reacción e interacción de los residuos aminoacídicos no han sido descritos en su totalidad (Rangel-Santos et al., 2004).

Algunos reportes sobre la subunidad B, describen regiones conservadas, como el residuo His₄₈, el cual tiene un rol importante en la actividad catalítica del sitio activo junto con los residuos Tyr₅₂ y Asp₉₉ (de Paula et al., 2009). Otra región conservada en la secuencia de la

subunidad B, es el C-terminal, el cuál este asociado a la actividad neurotóxica, que al igual que el sitio catalítico, esta actividad puede estar relacionada a residuos específicos tales como la Tyr₂₂ o la Phe₁₂₄. (Doley et al., 2010; Fernandes et al., 2017). Aunado a ello, se han descrito diversas isoformas de ambas subunidades de la crotoxina, cada una de ellas con distintas propiedades las cuales se ven reflejadas en las actividades tóxicas y enzimáticas que presentan (Faure *et al.*, 1994; Fernandes *et al.*, 2017).

Algunas proteínas homólogas a la crotoxina o *crotoxin like* de *C. d. terrificus* han sido descritas en los venenos de importancia médica como *C. s. scutulatus*, *C. tigris*, *C. vengrandis*, *C. horridus*, *C. simus*, *C. tzabcan*, *Bothriechis negroviridis* y *Ophryacus sphenophrys*, las cuales mantienen la conformación A/B, siendo la subunidad B la de efecto tóxico (Neri-Castro et al., 2019).

Estas proteínas homólogas, al igual que la crotoxina, pueden llegar a representar un gran porcentaje del veneno de las serpientes, yendo desde el 4.3 % en *Crotalus basiliscus*, hasta un 60 % en *C.d. cumanensis* y *C. d. cascavella* (Rangel-Santos et al., 2004; Segura et al., 2017). En la **Tabla 1**, se muestran algunos datos sobre homólogos de crotoxina descritos hasta el momento.

Tabla 1. Representación y letalidad de homólogos de crotoxina descritos en especies de crotalinos de América

Especie	% Ctx	DL ₅₀ mg/Kg	Modelo experimental	Vía de administración	
<i>Crotalus tzabcan</i>	3.0 – 7.7				Neri-Castro et al., 2019
<i>C. simus (Mx)</i>	6.3 – 44.3				Neri-Castro et al., 2019
<i>C. simus (C.R.)</i>	4.1				Segura et al., 2017
<i>C. s. scutulatus</i>		0.58	Murino Cepa Swiss-Webster	i.v.	Cate & Bieber, 1978
<i>C. basiliscus</i>	4.3				Segura et al., 2017
<i>C. tigris</i>		0.050	Murino Cepa Swiss-Webster	i.p.	Weinstein & Smith, 1990
<i>C. d. terrificus</i>	~60	0.070	Murino Cepa BALB/c	i.p.	Rangel-Santos et al., 2004
<i>C. d. cascavella</i>	~60	0.067	Murino Cepa BALB/c	i.p.	Rangel-Santos et al., 2004
<i>C. d. collilineatus</i>	~60	0.055	Murino Cepa BALB/c	i.p.	Rangel-Santos et al., 2004
<i>Bothriechis nigroviridis</i>		2.9	Murino Cepa CD1	i.v.	Lomonte et al., 2015
<i>Ophryacus sphenophrys</i>	12.9	0.49	Murino Cepa CD1	i.v.	Neri-Castro et al., 2019
<i>Mixcoatlus melanurus</i>	15.9	0.31	Murino Cepa CD1	i.v.	Neri-Castro et al., 2020

Ctx: crotoxina

DL₅₀: dosis letal media. Dosis a la cual la mitad de la población sobrevive

i.v.: vía intravenosa en la vena caudal

i.p.: vía intraperitoneal

Variación en la composición del veneno

La composición de los venenos en serpientes se ve influenciada por un gran número de factores tanto bióticos como abióticos. Se ha descrito variación del veneno en diversos taxas, yendo desde familia hasta subespecie (Amazonas et al., 2018; Chippaux et al., 1991), (véase **Tabla 2**).

La variación inter e intra especie ha sido registrada en distintas especies de serpientes. En la serpiente *Naja naja* se ha descrito variación en el veneno en distintas regiones dentro de su distribución en India, dicha variación se ve reflejada en algunas actividades como enzimática, toxicidad y algunas actividades farmacológicas (Mukherjee, 2020). Ejemplos similares se han descritos en vipéridos como *Crotalus atrox* en distintas localidades en USA, y entre dos poblaciones insulares de la serpiente *Trimeresurus flavoviridis* (Jayanthi & Veerabasappa Gowda, 1988).

Además del taxa, se ha registrado variación a través de otros factores abióticos, siendo la variación geográfica la más común, aunque algunos otros autores sugieren que factores como la alimentación influyen en la composición con igual o mayor fuerza que la distribución de la especie (Yu et al., 2020). La ontogenia es otro factor asociado a la variación de los venenos en serpientes. En la serpiente *Bothrops asper* se ha registrado una mayor predominancia de metaloproteasas en el veneno de neonatos, mientras que en adultos hay una mayor presencia de otros componentes como las fosfolipasas A₂ (Alape-Girón et al., 2008), caso similar se ha reportado en las serpientes *Crotalus tzabcan* y *C. simus* de México y Centroamérica respectivamente (Durban et al., 2017).

La variación en los venenos se da en algunas familias de proteínas que prevalecen, tales como metaloproteasas, fosfolipasas A₂ y lectinas tipo C, entre otras. Esta variación se ve reflejada en las actividades del veneno, tales como las actividades biológicas: enzimática, citotoxicidad, neurotoxicidad, cardiotoxicidad, etc. (Yu et al., 2020).

Tabla 2. Niveles taxonómicos sobre la variación de veneno en serpientes venenosas (Tomado y modificado de Chippaux et al., 1991).

Clasificación		Nivel de variación en el veneno
Phylum	Chordata	Entre phylum
Clase	Reptilia	
Orden	Squamata	
Suborden	Serpentes	
Familia	Colubridae	Inter familia/subfamilia
	Viperidae	
	Subfamilia	Viperinae
		Crotalinae
	Elapidae	
	Hydrophiidae	
Genero (múltiple)		Inter genero
Especies (múltiple)		Inter especie/subespecie
Subespecies (múltiple)		Intra especie
		Incluyendo variación geográfica
		Individual Estación
		Dieta Hábitat
		Edad
		Sexo

Epidemiología del accidente ofídico

El envenenamiento por mordedura de serpiente es un problema a nivel mundial y son consideradas una amenaza para la salud humana, llegando a ser catalogada como una emergencia médica e incluso una enfermedad tropical desatendida (Fernández-Badillo et al., 2021). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las mordeduras de serpiente tienen su mayor índice en regiones tropicales y subtropicales del África subsahariana, el este y sureste asiático y Latinoamérica (León et al., 2018). Como resultado de la interacción humano-serpiente, cada año se reportan más de 100,000 muertes, y cerca de 400,000 personas con alguna amputación o secuela (Gómez-Betancur et al., 2019; Mukherjee, 2020; Singh, 2015). A nivel mundial hay una relación entre la incidencia por mordedura de serpiente y el estatus socioeconómico de la población, siendo el estrato más bajo el más afectado.

En México anualmente se reportan cerca de 4,000 mordeduras de serpientes, siendo los estados de Oaxaca, Veracruz, San Luis Potosí, Puebla e Hidalgo los más afectados, además de existir una menor incidencia en la zona norte del país, la cual tiende a ir en aumento hacia

el sur del territorio mexicano (Fernández–Badillo et al., 2021). Cerca del 44 % de los casos de mordedura son generados por víboras de cascabel, y si bien no existen muchos datos sobre las especies implicadas en el accidente ofídico, se han señalado a las especies *Bothrops asper*, *Crotalus atrox*, *C. basiliscus*, *C. culminatus*, *C. tzabcan*, *C. mictlantecuhtli*, *C. molossus*, *C. simus* y *Agkistrodon bilineatus* como las principales implicadas en los casos de envenenamientos (Epidemiológica, 2014; Fernández–badillo et al., 2021; Siria Hernández & Arellano Bravo, 2009).

La OMS reconoce el uso de antivenenos como el único tratamiento efectivo contra el envenenamiento por mordedura de serpiente, y si bien en México se producen y comercializan dos antivenenos polivalentes específicos para vipéridos, los cuales muestran un reconocimiento moderado para la neutralización del efecto letal de algunas especies (Sánchez et al., 2008), la disponibilidad y distribución de estos es un problema, ya que en zonas rurales o de difícil acceso se carece de ellos, ocasionando que en muchos lugares los pobladores recurren a remedios caseros o tradicionales, implicando el uso de plantas medicinales, siendo prácticas poco eficaces para contrarrestar los efectos nocivos del envenenamiento (Fernández–Badillo et al., 2021).

Antivenenos

El primer registro que se tiene sobre inmunización haciendo uso de veneno de serpiente como antígeno se remonta al trabajo de Henry Sewall en 1887, quién inmunizó palomas con el veneno de *Sistririus catenatus*. Posteriormente Albert Calmette inmunizó conejos con veneno de cobras recuperando el suero de dichos animales para posteriormente inocularlo en conejos sanos previa la inoculación de veneno. Calmette describe el suero como antitóxico en sus ensayos *in vitro*, así como un tratamiento preventivo que posteriormente podía ser utilizado en seres humanos, y finalmente en 1898, Calmette produjo el primer suero comercial para su uso en Vietnam, y posteriormente la producción de antivenenos llegó a diversos países como Brasil, Estados Unidos, Australia y Japón (Chulasugandha, 2003; Laloo & Theakston, 2003; Pucca et al., 2019).

Algunos antivenenos son producido por medio de la inoculación de veneno o una mezcla de estos en modelos equinos, cuyas dosis van en aumento a lo largo del esquema de inmunización, el cuál puede durar meses, y que, como resultado, produce anticuerpos

neutralizantes del tipo IgG sin efectos adversos al animal inmunizado. Posteriormente, se pueden realizar modificaciones a los anticuerpos, tales como el corte con pepsina generando fragmentos $F(ab')_2$, e incluso un segundo corte con papaína generando fragmentos Fab (Lalloo & Theakston, 2003).

En el caso específico de México, actualmente se cuenta con la producción de dos antivenenos antiviperinos, los cuales son generados por las empresas BIRMEX y el Instituto Bioclon de los Laboratorios Silanes, los cuales utilizan como inmunógenos los venenos de las serpientes *Bothrops asper* y *Crotalus basiliscus*, así como *Bothrops asper* y *C. simus* respectivamente. Dichos antivenenos son utilizados para el tratamiento de mordeduras por otros vipéridos y elápidos distribuidos en el país, siendo capaces de neutralizar los efectos tóxicos generados por el envenenamiento (Fernández–badillo et al., 2021).

Inmunodominancia

Dentro de la secuencia y/o estructura de algunas proteínas hay regiones que tienen un mayor reconocimiento por células del sistema inmune, tales como los linfocitos B y linfocitos T. Estas secuencias son denominadas epítomos inmunodominantes o determinantes inmunogénicos o antigénicos, y pueden tener una estructura lineal o tridimensional, denominados epítomos secuencias y estructurales respectivamente (Abbas & Litchman, 2006; Kindt et al., 2007). Estos dominios pueden tener una secuencia o estructura conservada entre antígenos semejantes, además de encontrarse expuestos en la superficie del antígeno y pueden estar constituidos por secuencias no continuas repetidas a lo largo del antígeno, (Mahanty et al., 2015). Si bien estos determinantes son reconocidos de forma distinta por el sistema inmune de distintos hospederos, estudios recientes se centran en la identificación de sitios determinantes para células B con la finalidad de su uso terapéutico. Estas regiones se pueden ser reconocidos y tener una gran afinidad por ambos tipos de linfocitos B y T, siempre y cuando estas no se sobrelapen entre sí (Adorini, 1998).

En el caso de las células B, estas no son capaces de reconocer epítomos lineales no continuos, es decir, existe un sesgo en el reconocimiento de epítomos cuya secuencia se ve interrumpida por alguna otra; a pesar de esta instancia, son capaces de reconocer tanto epítomos lineales como epítomos conformacionales en la estructura de las proteínas, tales como secuencias móviles dentro de las mismas, pueden tener un mayor reconocimiento dado que esta

flexibilidad permite un mayor reconocimiento del antígeno por parte del anticuerpo o el receptor del linfocito (Adorini, 1998; Kindt et al., 2007). El reconocimiento del antígeno se da mediante el complejo del receptor del linfocito o BCR (*B cell receptor*), el cual está constituido por un anticuerpo del tipo Inmunoglobulina o Ig, cuya región variable tanto de las cadenas pesadas y ligeras se encargan del reconocimiento, para transmitir la señal mediante las proteínas intermembranales $Ig\alpha$ e $Ig\beta$, quienes intervienen en estimulación de la maduración de los estos linfocitos para la generación de anticuerpos (Abbas et al., 2017).

El reconocimiento de los determinantes antigénicos por parte de los anticuerpos o Ig, es mediante regiones específicas denominadas regiones determinantes de la complementariedad o CDRs (*complementarity-determining regions*), las cuales están localizadas en las región variable o V de las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos (Janeway et al., 2001b). Estas regiones CDR llegan a tener una gran afinidad, sobre todo por aquellos epítomos que se encuentran en la superficie del antígeno, pudiendo reconocer epítomos similares entre antígenos con estructuras similares entre sí, siendo estos antígenos reconocidos por anticuerpos que no estén generados específicamente contra ellos, derivando en el fenómeno de reacción cruzada (Abbas et al., 2017).

En los linfocitos T, el reconocimiento de los epítomos está limitado a secuencias cortas discontinuas a lo largo de la secuencia del antígeno, las cuales pueden ser reconocidas cuando están asociadas a los complejos de inmunohistocompatibilidad (MHC), generando una fuerte respuesta inmune, derivando en una unión eficiente entre el antígeno y el MHC (Abbas et al., 2017; Janeway et al., 2001a; Mahanty et al., 2015). A su vez, esta interacción, es reconocida por el receptor de célula T o TCR (*T cell receptor*), los cuales reconocen la interacción antígeno-MHC mediante los dominios variables del propio receptor con la intervención de otros complementos existentes en la membrana celular, tales como el complejo proteico CD3 y la proteína ζ , quienes se encargan de traducir las señales de reconocimiento al interior de la célula, estimulando la maduración del linfocito (Abbas et al., 2017).

ANTECEDENTES

La crotoxina y la crotamina son las principales toxinas asociadas al envenenamiento causado por el género *Crotalus* en humanos, por lo que la correcta neutralización de dichas proteínas son clave en producción de antivenenos comerciales contra *Crotalus spp.* (Molina et al., 2020) . Algunos anticuerpos provenientes de antivenenos comerciales han mostrado una menor afinidad a crotoxina completa, o a la subunidad B de la misma, cuando han sido comparados con los de antivenenos experimentales obtenidos de la inmunización con crotoxina o con la subunidad B únicamente; los anticuerpos resultantes han mostrado una buena inhibición de venenos completos, pudiendo así neutralizar la actividad tóxica de los mismos (Beghini et al., 2004; Kaiser et al., 1986); por lo que la capacidad neutralizante de los antivenenos comerciales, por ejemplo, contra el veneno de *Crotalus durissus* recae principalmente sobre la neutralización de la crotoxina (Oshima-Franco et al., 1999).

Estudios recientes han buscado mejorar los antivenenos; por ejemplo, Fusco et al., (2015) plantearon un nuevo modelo de generación de anticuerpos contra el veneno de *Crotalus*, combinado que inicia con la administración de crotoxina purificada para después administrar el veneno completo. Sus resultados mostraron que este modelo genera una mayor cantidad de anticuerpos contra la crotoxina, comparado con el método tradicional de inmunización (utilizando veneno completo desde el inicio), además de mejorar la neutralización del efecto toxico de los venenos.

Otros estudios se han centrado en el uso de proteínas o péptidos recombinantes como inmunógenos con el objetivo de generar una mayor cantidad de anticuerpos neutralizantes, tal y como llevaron a cabo Molina et al., (2020), quienes generaron un suero experimental contra la crotoxina mediante la inmunización en conejos de tres secuencias peptídicas de la subunidad B y dos secuencias de la subunidad A, todas expresadas de forma heteróloga en una sola secuencia multiepítipo, la cual incluyó los residuos 46 a 60, 76 a 90 y 103 a 122 de la subunidad B, y los residuos 67 a 81 y 84 a 101 de la subunidad A. El suero resulto efectivo en ensayos de neutralización contra la crotoxina nativa en ratones, similar a la eficacia de un suero generado contra veneno completo de *C. d. terrificus*.

Choumet et al., (1989) elaboraron sueros en conejos anti-subunidad B y anti-subunidad A de la crotoxina, a partir de los cuales produjeron fracciones Fab de inmunoglobulinas; sus

resultados indican que ambas subunidades difieren en su capacidad de generar anticuerpos, siendo la subunidad B la más inmunogénica, y de igual forma los fragmentos Fab neutralizan de una forma más eficaz la actividad fosfolipasa de la subunidad B en comparación de anticuerpos completos.

A nivel molecular, Soares et al., (2001) realizaron modificaciones en aminoácidos específicos tales como la His₄₈, Lys_{10,16,38,54,57,61,70,78,83,105}, Tyr_{52,104,108,111} y Trp_{31,62,81} en la secuencia de la subunidad B de una crotoxina aislada de *C. d. terrificus*. Sus resultados indican que las modificaciones de His y Lys reducen de forma considerable la toxicidad, mientras que la toxicidad es levemente reducida al modificar los residuos de Tyr y Trp.

Recientemente se clonó, en nuestro grupo de trabajo, una subunidad B de crotoxina de la especie del sureste mexicano llamada *Crotalus tzabcan*, con la secuencia:

```
> Subunidad B |CB|  
HLLQFNKMIKFETRKNAI PFYAFYGCYCGWGGRGQPKDATDRCCFVHDCCYGKLAKCNTKWDIYPY  
SLKSGYITCGKGTWCEEQICECDRVA AECLRRSLSTYKYGYMFYPDSRCRGPSETC
```

Con un porcentaje de identidad de 99 % con la subunidad B de la crotoxina del veneno de *C. d. terrificus* (datos no publicados). Esta proteína será expresada por medios recombinantes, y una vez obtenida en su forma pura, será plegada y utilizada para inmunizar conejos con la intención de obtener anticuerpos con actividad neutralizante.

JUSTIFICACIÓN

El envenenamiento por mordedura de serpiente es un problema de salud pública en México, siendo los vipéridos los principales implicados en la interacción humano – serpiente, y el género *Crotalus* como uno de los principales implicados en dicha interacción debido a su amplia distribución en el territorio nacional. En años recientes se han descrito proteínas con actividades neurotóxicas dentro del veneno de algunas serpientes de cascabel y otros vipéridos, las cuales se encuentran agrupadas en una misma familia proteica, que comparten características estructurales, actividades biológicas y bioquímicas. La generación de anticuerpos capaces de reconocer y neutralizar a la subunidad B de la crotoxina de los venenos de *Crotalus spp.* podría mejorar los procesos de producción de antivenenos.

HIPOTESIS

La subunidad B de la crotoxina expresada heterológamente en *E. coli* podrá generar anticuerpos con la capacidad de disminuir la actividad tóxica del veneno de *Crotalus spp.*

OBJETIVO

General

Evaluar la inmunogenicidad de la subunidad B recombinante en conejos.

Particulares

1. Expresar la subunidad B de la crotoxina de *Crotalus tzabcan*.
2. Evaluar la capacidad inmunogénica de la subunidad B recombinante.
3. Modificar epítomos inmunogénicos de la subunidad B, y determinar si los anticuerpos generados contra la subunidad B continúan reconociendo a la mutante producida.

METODOLOGÍA

Construcción del vector de expresión

Se diseñaron oligonucleótidos considerando los sitios de restricción *Bam*HI, la secuencia de corte para el Factor *TEV* en el extremo 5' y sitios de restricción *Pst*I, así como codones de paro en el extremo 3' del vector pQE-30. Además, se añadió una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal de la secuencia. Todo lo anterior se realizó bajo el marco de lectura del promotor T5, el cual está reprimido por el operón *lac*, así como un gen de resistencia a ampicilina.

Transformación en Escherichia coli (E. coli)

Para la expresión de la proteína recombinante y mutante, se tomó una alícuota del plásmido, el cual se insertó en la cepa *Origami* de la bacteria *E. coli*. Para lo cual se hizo la transformación de las bacterias mediante shock térmico. Una vez transformadas las células, se sembraron en medio sólido Luria-Bertani (LB) con ampicilina y se dejó crecer a 37 °C durante toda la noche con la finalidad de obtener colonias de bacterias.

Construcción de la subunidad B mutante

Para generar la secuencia de la subunidad B con los cambios en residuos aminoacídicos específicos, se sintetizaron dos oligonucleótidos de 22 y 24 nucleótidos de longitud, denominados *Crotox-Rev* y *Crotox-Dir* respectivamente, y con las siguientes secuencias:

Crotox-Dir	CCT GGT GCA AGG AAC AGA TTT G
Crotox-Rev	CAC TTG GTC AGT TTT TCG TAA CAG

Con estos oligonucleótidos se realizó la construcción de los *megaprimer 1* y *megaprimer 2* (MP1 y MP2), los cuales se utilizaron para el ensamble de la proteína mutante. Los oligonucleótidos *Crotox-Rev* y pQE-*Frw* fueron utilizados para la elaboración del MP1, utilizando como templado la secuencia de la subunidad B nativa. Posteriormente se utilizó el MP1 con el oligonucleótido pQE30-*Rev* para la síntesis de la secuencia con los dos primeros cambios en la secuencia. Una vez obtenía la secuencia con los cambios, fue utilizada como templado en la generación del tercer cambio deseado, haciendo uso del oligonucleótido PLA2-pQE30-*Fwr* y el M2, el cual se elaboró previamente con los oligonucleótidos pQE30-

Rev y *Crotox-Dir*, utilizando como templado la secuencia de subunidad B con los dos cambios. La inserción en el vector de expresión, así como su construcción se realizó siguiendo el procedimiento ya antes mencionado.

Expresión de la subunidad B recombinante y mutante

Para realizar la expresión de la proteína, se tomó una o varias colonias obtenidas de la expresión en medio sólido LB, y se puso en crecimiento en medio de cultivo líquido LB con ampicilina (100 µg/ mL) y se colocó durante 18 horas en agitación a 37 °C. La inducción de la expresión se realizó una vez alcanzada una OD_{600 nm} de 0.6, añadiendo isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM.

Obtención de las proteínas en cuerpos de inclusión.

Para la recuperación de la proteína de interés, el medio de cultivo fue centrifugado a 8,000 rpm; se recuperó la fracción soluble y el concentrado celular se disolvió en Tris-HCl 50 mM para posteriormente romper las células mediante fuerza mecánica 35 libras/pulgada² (PSI) en una prensa de French. Acto seguido, se realizó un segundo ciclo de centrifugado a 12,000 rpm, se separó la fracción soluble y la fracción no soluble, y esta última se disolvió en Tris-HCl 50 mM + cloruro de guanidinio (ClGnd) 6 M.

Cromatografía de afinidad a níquel

Para la purificación de la proteína recombinante haciendo uso de la cola de histidinas añadidas en la región 3', el resultado de la disolución en presencia de ClGnd fue centrifugado durante 10 minutos a 14,000 revoluciones por minuto (rpm), y la fracción soluble se pasó en una columna de agarosa-Ni (previamente equilibrada) en dos ocasiones, y se realizaron dos lavados con 0 y 40 mM de imidazol. La proteína fue eluida con una concentración 400 mM de imidazol.

Electroforesis en geles de acrilamida y bisacrilamida (SDS-PAGE)

Para visualizar la expresión de la proteína, se tomaron muestras de las fracciones solubles e insolubles de la expresión, los lavados y las eluciones, las cuales fueron cargadas en geles de acrilamida-bisacrilamida (30-0.8%) en presencia de duodecil sulfato de sodio (SDS) al 15 %. Las muestras fueron preparadas en condiciones reductoras con *buffer* de carga reductor (10%

glicerol, 2.5% SDS, 50 mM Tris-HCl, 2- β -mercaptoetanol, azul de bromofenol) en un volumen final de 12 μ l y hervidas durante 5 minutos previos a cargarlas en el gel. El gel se corrió durante 30 minutos a 70 V y posteriormente 60 minutos a 120 V. Una vez transcurrido este tiempo, el gel se tiñó con solución de tinción (metanol, ácido acético glacial, azul brillante de Coomassie) durante una hora, y se destiñó (metanol, ácido acético glacial) durante otra hora.

Purificación mediante Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC)

Para la purificación de la proteína en su estado reducido, esta se incubó con 20 mM de ditioneitol (DTT) durante dos horas a 50 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se purificó en un sistema *HPLC* en un gradiente de 0 a 60% de solución B (Acetonitrilo + 0.1% TFA) durante 60 minutos, haciendo uso de una columna *Vydac*® 218TP C18 (5 μ 250 x4.6 mm) ó *Vydac*® 218TP C4 (5 μ 250x4.6 mm). Una vez obtenida la muestra deseada, se secó con concentrador de muestras y se almacenó a 4 °C.

Determinación de la masa molecular experimental

Para obtener la masa molecular experimental resultante de las expresiones, se determinaron mediante la técnica de *electro spray* (ESI-MS) en un equipo Finnigan LCQ-DUO ion trap.

Plegamiento in vitro

Para hacer que la proteína adquiriera una estructura tridimensional similar o idéntica a la nativa, se colocó 1 mg de proteína en *buffer* de plegamiento (Tris-HCl 50 mM, ClGnd 2M, CaCl₂ 1 mM, cistina-cisteína 1:8) durante 48 horas en agitación constante a 400 rpm. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la muestra fue purificada mediante la técnica de fase reversa en un sistema *HPLC* siguiendo la metodología y equipo previamente descrito.

Esquema de inmunización

Para generar anti-cuerpos contra la subunidad B recombinante, se hizo uso de dos conejos hembra de la cepa *New Zealand* con pesos de entre 2 y 2.5 kg, a las cuales se les administraron dosis crecientes de la subunidad B recombinante en conjunto con adyuvantes (*Imject*® Alum y Adyuvante incompleto de Freud) en volúmenes de 1.5 mL, los cuales se administraron vía

subdérmica en los costados de los animales. Las inoculaciones se realizaron de forma semanal durante un periodo de cuatro meses.

De forma periódica, se tomaron de 1 a 2 mL de muestra sanguínea por conejo, mediante la punción de la arteria de la oreja izquierda o derecha. Estas muestras se utilizaron para evaluar la generación de anticuerpos contra la subunidad B recombinante mediante la prueba de ELISA (véase más adelante)

Purificación de inmunoglobulinas a partir de la precipitación de albumina

Para obtener únicamente las inmunoglobulinas a partir del suero de los conejos, este último fue disuelto en agua destilada ajustando el pH 5 con ácido acético 3N. Se añadió ácido caprílico hasta obtener una concentración 4% y se centrifugo a 14,000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó la fracción soluble y se dializó con PBS. Se midió la concentración mediante absorbancia a 280 nm y se realizaron alícuotas de 50 mg, las cuales fueron liofilizadas hasta su uso.

Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

Con la finalidad de evaluar el reconocimiento de los anticuerpos hacia la subunidad B y venenos positivos a crotoxina, se sensibilizaron placas de 96 pozos con 500 ng de antígeno por pozo con *buffer* de carbonato de sodio 0.1 M pH 9.5. Como primer anticuerpo se utilizaron las inmunoglobulinas anti-subunidad B recombinante generadas en conejo en una dilución 1:30, y como segundo anticuerpo un anti-conejo conjugado con enzima peroxidasa en una dilución 1:1000. Se utilizó un factor de dilución 1:3 para el primer anticuerpo. El revelado se realizó con ABTS (ácido cítrico 0.1 M, NaHPO₄*7H₂O 0.2 M) y se midió la absorbancia a 405 nm.

Western-blot semi-seco

Para visualizar el reconocimiento de los anticuerpos a distintos antígenos, se realizó un gel SDS-PAGE 15% siguiendo la metodología previamente descrita. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en una cámara semi seca, para lo cual se colocó en el siguiente orden: papel filtro, gel, membrana de nitrocelulosa, papel filtro. Una vez transferidas las proteínas, se bloqueó la membrana (TBST + 5% leche) y se incubo con el primer anticuerpo, es decir anti-subunidad B en una dilución 1:200, y como segundo

anticuerpo, un anti-conejo acoplado a fosfatasa en dilución 1:1000. El revelado se hizo con el reactivo BCIP/NBT1.

Ensayo de actividad fosfolipasa sobre yema de huevo en placa de agarosa.

Para visualizar la actividad de la proteína, se mezcló solución de yema de huevo al 10% (Tris-HCl 1M, CaCl₂ 20 mM, Tritón X-100), con solución stock (Tritón X-100, rodamina 6G 0.1%, CaCl₂ 20 mM, agarosa). Una vez solidificada la solución en una caja de Petri, se colocaron las muestras en un volumen de 10 µL, y se incubó durante una hora a 37 °C.

Ensayo de neutralización de actividad fosfolipasa sobre yema de huevo en placa de agarosa

Con la finalidad de observar la neutralización de la actividad de fosfolipasa, se incubaron muestras de proteína con distintas concentraciones de anticuerpos anti-subunidad B, siguiendo las mismas condiciones y procedimientos del ensayo mencionado anteriormente.

Ensayo titulométrico de actividad fosfolipasa sobre yema de huevo

Se preparó una solución de yema de huevo al 10 % (NaCl 0.1 M, CaCl₂ 0.01 M, Tritón X-100) cuyo pH se ajustó a un valor de 8.05. Se añadió la muestra (distintas concentraciones) en un volumen de 10 µL y se midió el tiempo en que el valor de pH bajó a 7.99, para posteriormente recuperar el valor con NaOH 50 mM, todo esto durante seis ocasiones consecutivas. El ensayo se realizó por triplicado.

Ensayo titulométrico de neutralización de la actividad de fosfolipasa sobre yema de huevo

Para la neutralización de la actividad, se realizó el procedimiento antes mencionado, con la diferencia de que las muestras fueron preparadas con distintas concentraciones de anticuerpos anti-subunidad B purificados e incubados durante una hora a 37 °C antes de la realización del ensayo.

Ensayo de neutralización in vivo

A grupos de ratones de la cepa CD1 de entre 18 y 20 g., se les administraron vía intravenosa 3 DL₅₀ de subunidad B nativa o veneno a distintas concentraciones. Las muestras fueron incubadas durante una hora a 37 °C con distintas concentraciones de anticuerpos anti-

subunidad B purificados. El porcentaje de muerte o sobrevivencia se determinó a las 48 horas después de la administración.

Purificación de subunidad B nativa a partir de veneno completo

Para obtener la proteína nativa, se purificó veneno completo de *Crotalus tzabcan* mediante un sistema *HPLC* en un gradiente de 0 a 100% de solvente B (acetonitrilo + 0.1% TFA) durante 90 minutos, utilizando una columna *Supelco® Discovery® C18* (25 cm x 4.6 mm, 5 μm).

RESULTADOS

Expresión de la subunidad B de crotoxina recombinante

Para realizar la expresión de la subunidad B de la crotoxina se utilizó el vector pQE-30 y la cepa *origami* de *E. coli* en medio líquido LB. La proteína fue recuperada como se describe en materiales y métodos, obteniendo un rendimiento aproximado de 3 mg de proteína purificada por litro de cultivo. Este rendimiento es un promedio obtenido de cinco ensayos de expresión individuales, todas realizadas bajo las mismas condiciones, como esta descrito en el protocolo.

Una vez expresada la proteína, se procedió a su purificación mediante cromatografía de afinidad a níquel, obteniéndose 10 mL del primer lavado, 10 mL del segundo lavado y 20 mL de elución, estos últimos divididos en 10 alícuotas de 2 mL cada una, las cuales fueron almacenadas a 4 °C para usarse posteriormente.

Una vez realizada la expresión de la proteína, se tomaron muestras de las células previas a la inducción, así como la fracción soluble, la cual es resultado de la centrifugación del cultivo; se tomó muestra de ambos lavados, y del recirculante, el cuál es el volumen sobrante una vez pasada la muestra por la columna de afinidad dos veces; y finalmente de las eluciones 1, 3, 5, 7, 9 y 10. Las muestras fueron precipitadas siguiendo con el protocolo descrito y utilizadas para observar la expresión de la proteína mediante un gel SDS-PAGE al 15% en donde se logró apreciar una banda cercana a los 15,000 Da, la cual corresponde a una banda esperada dado el peso molecular de la proteína recombinante el cuál es de 16, 421.6 Da, debido a la etiqueta de histidinas que se le añadió.

Como se puede apreciar en la **Figura 1**, en los lavados y eluciones se logran apreciar bandas de mayor y menor peso al esperado para la proteína recombinante. Dichas bandas pueden representar proteínas propias de la bacteria *E. coli*, por los cuál se realiza un segundo proceso de purificación de la proteína, como se describe a continuación.

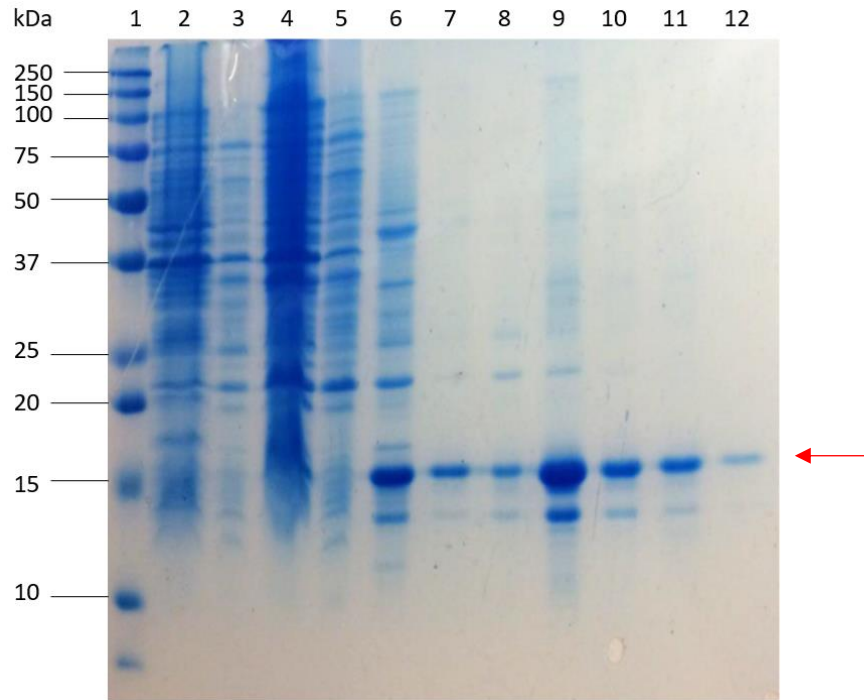


Figura 1. Gel de acrilamida al 15% de la expresión de la subunidad B recombinante. 1: Marcador de masa molecular (MPM); 2: células sin inducir; 3: fracción soluble; 4: recirculante; 5: lavado 1 sin imidazol (15 mL); 6: lavado 2 con 40 mM de imidazol (15 mL); 7-12: eluciones con 400 mM de imidazol

Reducción de la proteína

En la **Figura 2**, se observa el perfil de separación de la proteína reducida con ditioneitol, que se determinó a los 48 minutos a un porcentaje de solución B del 40 %. Una vez tomada la muestra de la proteína, se secó en concentrador de muestras - *Savant* y posteriormente fue almacenada a 4 °C.

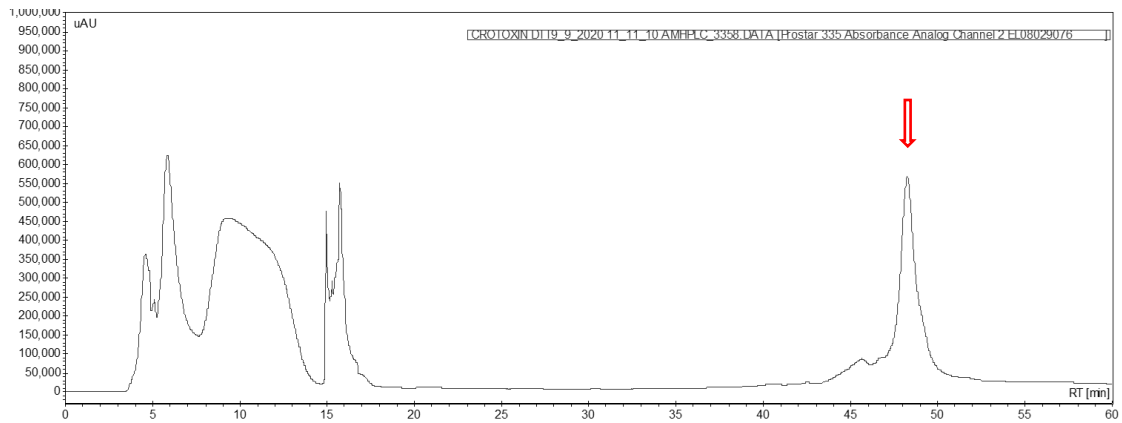


Figura 2. Perfil de elución de la proteína recombinante reducida con 20 mM DTT durante 2 h a 50° C. El tiempo de retención de la proteína se determinó a los 48 minutos con un 40 % de solución B (Acetonitrilo + 0.1 % TFA) en columna *Vydac*® 214TP C18 (250 x 4.6 mm, 5µg).

Una vez obtenida la muestra se resuspendió en un volumen de 100µL de agua MiliQ y se cuantificó por absorbancia 280 nm en *nanodrop* para obtener la concentración. Se tomó una muestra de 5 µg y se secó mediante concentrador de muestras - *savant* para posteriormente determinar la masa experimental mediante la técnica de ionización por *electro spray*. El resultado de la masa molecular experimental fue de 16,421.5 Da, la cual coincide con la masa molecular teórica, que es de 16,421.5 Da. (**Figura 3**), por lo que se confirma que el pico colectado corresponde a la proteína recombinante.

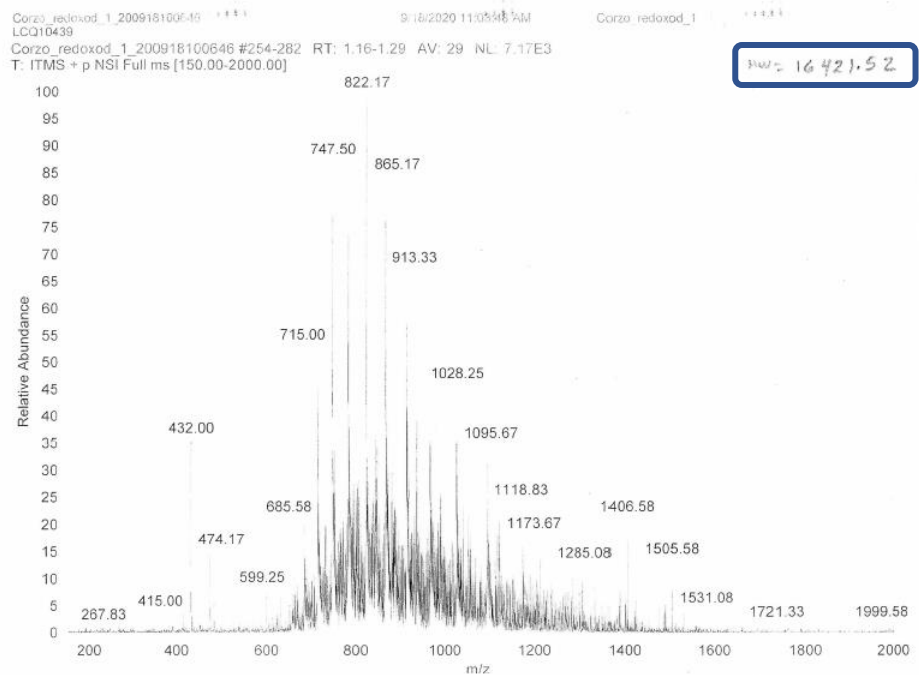


Figura 3. Determinación de la masa molecular de la proteína reducida. El resultado de la serie iónica muestra la presencia de una masa molecular experimental similar a la teórica, la cual es de 16,421.52 Da.

Plegamiento

Una vez reducida la proteína, esta fue re suspendida en agua Mili-Q, y posteriormente pasada al *buffer* de plegamiento señalado en el apartado de materiales y métodos. La muestra se dejó en el *buffer* de plegamiento en agitación constante durante 2 días a temperatura ambiente y posteriormente se purificó mediante HPLC-RP (**Figura 4**) con las mismas condiciones utilizadas en la purificación de la proteína reducida. Las muestras de proteína reducida y plegada fueron evaluadas por electroforesis en un gel de acrilamida al 15 % (**Figura 5**), en donde podemos observar que las muestras correspondientes a la subunidad B recombinante presentan una mayor masa que la subunidad B nativa, esto debido a la presencia del tag de 6 histidinas añadidas a la proteína, las cuales le confieren una mayor masa molecular con respecto a la nativa.

También se aprecian bandas superiores en el carril correspondiente a la proteína nativa, los cuales podrían ser multímeros de esta generados por el tiempo de almacenamiento que tuvo la muestra antes de ser utilizada, o bien, impurezas al momento de su purificación.

Una vez purificada la muestra, se secó concentró durante 2 horas para posteriormente ser congelado y liofilizado durante un aproximado de 12 horas a una presión de 4 Pa. Una vez liofilizado, se almacenó a 4° C.

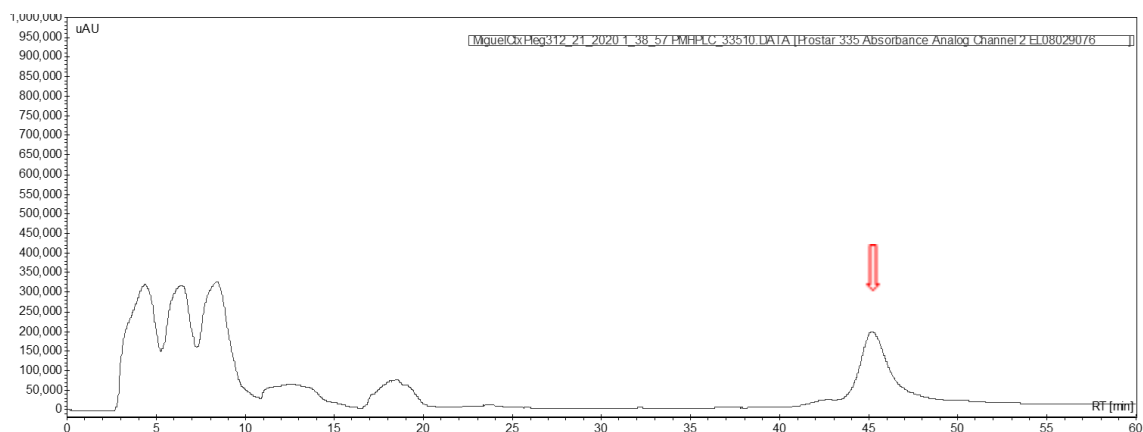


Figura 4. Perfil de elución de la subunidad B recombinante en columna *Vydac*® 214TP C4 (250 x 4.6 mm, 5µg), con un porcentaje de retención de 36% de solución B (Acetonitrilo + 0.1% TFA).

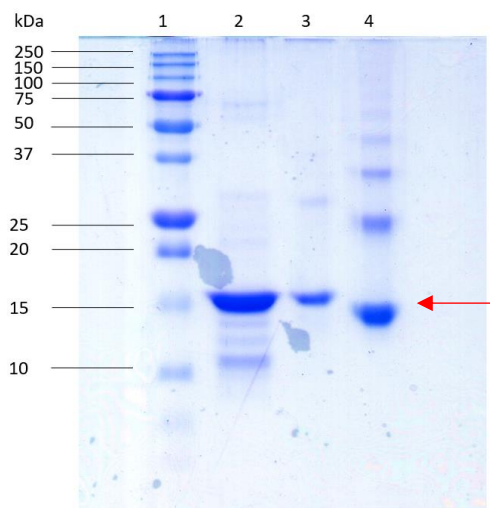
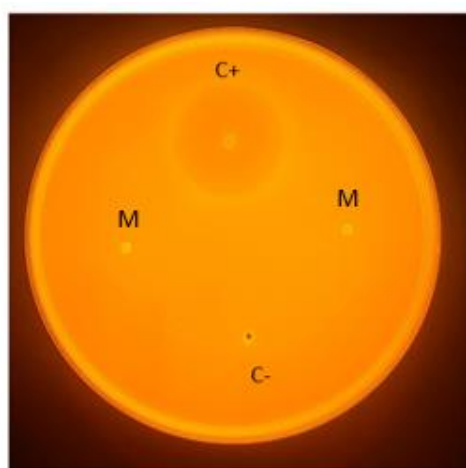


Figura 5. Perfil electroforético de la proteína subunidad B recombinante en SDS-PAGE 15%. 1: MPM, 2: subunidad B recombinante (reducida), 3: subunidad B recombinante (plegada), 4: subunidad B nativa (*C. tzabcan*). Cada carril contiene 5 µg de muestra.

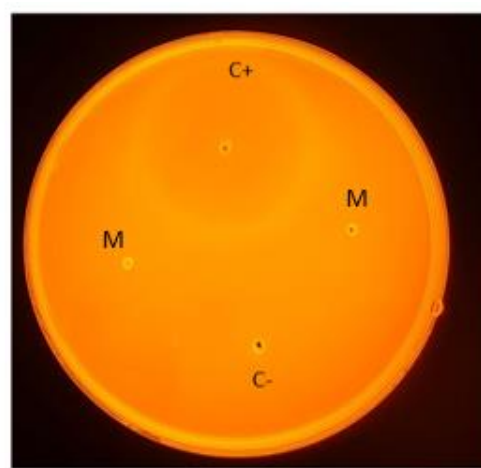
Ensayos de actividad bioquímica

Se evaluó la actividad de fosfolipasa haciendo uso de yema de huevo al 10 % en agarosa sobre una placa de *Petri* (**Figura 6**), observándose la generación de un halo de 1 cm de radio, producto de la degradación de lípidos, por la actividad del control positivo. Pero no así por las muestras de la proteína recombinante, las cuales no mostraron actividad una vez transcurrido el tiempo de incubación.

También se evaluó la actividad enzimática específica mediante un ensayo titulométrico utilizando como sustrato yema de huevo al 10 % a un pH de 8.01. El ensayo se realizó tanto para la proteína nativa como para la recombinante. La actividad enzimática específica de la proteína nativa se determinó en 9.8 ± 2.5 U/mg, y la de la proteína recombinante en 0.24 ± 0.05 U/mg, siendo la actividad de la proteína nativa cuarenta veces mayor a la actividad de la recombinante.



Actividad PLA2 en placa de agarosa. C+: 100 µg proteína nativa. M: 100 µg. C- : agua destilada. Volumen de 10 µl. 03/12/20. después de 24 h incubada a 37° C.



Actividad PLA2 en placa de agarosa. C+: 100 µg proteína nativa. M: 100 µg. C- : agua destilada. Volumen de 10 µl. 04/12/20. después de 48 h incubada a 37° C.

Figura 6. Actividad fosfolipasa sobre agarosa y yema de huevo al 10 %. C. C+, subunidad B purificada del veneno de *C. tzabcan*; C-, agua destilada. M, muestra de subunidad B recombinante. En todos los casos se utilizaron 100 µg de muestra.

Inmunización y evaluación de anticuerpos presentes en el suero

Para obtener anticuerpos neutralizantes, se realizó un esquema de inmunización, en el cual se administró la proteína recombinante en estado plegado, utilizando una concentración inicial de 50 µg, hasta un máximo de 640 µg por conejo a lo largo de 133 días (véase anexo).

Hasta el día 133 del esquema de inmunización (**Figura 7**) los títulos evaluados contra la proteína recombinante utilizando suero hiperinmune, fueron de **7,900 (6673 - 9386)** seguidos de los títulos contra la proteína nativa, **4,842 (4410 - 5318)** y finalmente las muestras de veneno completo de *C. miclantecuhtli* y *C. tzabcan* con **419.6 (379.6 - 460.1)** y **7.12 (0 - 23.7)** respectivamente, utilizando un factor de dilución 1:3.

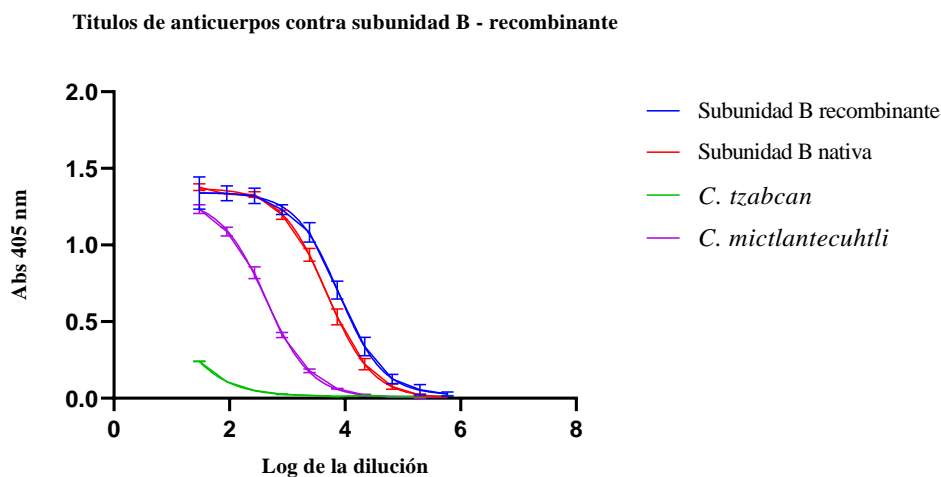


Figura 7. Evaluación de títulos de antisuero anti-subunidad B contra la proteína recombinante, proteína nativa y venenos de *C. tzabcan* y *C. miclantecuhtli*. Las placas fueron incubadas con antígeno (500 ng/pozo) e incubadas con suero hiperinmune. Después de la incubación se reveló con anticuerpos IgG-peroxidasa, y el resultado mediado a una absorbancia de 405 nm.

Inhibición de la actividad fosfolipasa

Se incubó durante una hora a 37 °C distintas concentraciones de anticuerpos con 15 µg de proteína nativa. Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a realizar el ensayo titulométrico de actividad con la metodología previamente descrita. Como se mencionó con anterioridad, la actividad de la proteína nativa se determinó en **9.8 ± 2.5 U/mg**, mientras que la actividad de la proteína más 800 µg de anticuerpos purificados fue de **2.3 ± 0.5 U/mg**, representando un **23 %** respecto a la actividad original. También se realizó el ensayo con el veneno completo de *C. tzabcan*, el cual tuvo una actividad de **9 ± 1 U/mg** sin anticuerpos, y de **2.9 ± 0.9 U/mg** con 800 µg de anticuerpos, representando cerca del **32 %** de la actividad original del veneno completo.

Inhibición de la actividad letal de la crotoxina y veneno completo

Para los ensayos de neutralización *in vivo* se utilizaron ratones de la cepa CD1 en pesos de entre 18 y 20 g. Se retaron con 3 dosis letal media (DL₅₀) contra distintas concentraciones de anticuerpos purificados, todo incubado a 37 °C durante una hora, los cuales fueron administrados de forma intravenosa a los ratones mediante la vena caudal y se evaluó la supervivencia de estos a las 48 h después de la administración. Como control positivo se utilizaron 3 DL₅₀ con PBS y como control negativo anticuerpos con PBS incubados durante 1 hora a 37 °C.

De igual forma se retaron los anticuerpos contra veneno completo de la serpiente *C. miclanthecuhkli* usando el mismo protocolo. Los resultados se pueden observar en la **Tabla 3** observando que la dosis mínima efectiva contra la crotoxina es de **1.5 mg/ratón** (19 g), mientras que la dosis contra veneno completo es de **2.1 mg/ratón** (19 g) para el veneno de *C. mictlantecuhkli*.

Tabla 3. Neutralización de subunidad B nativa y veneno completo

Veneno / toxina	DL ₅₀		DE ₅₀
	µg/ratón	mg AV / 3 DL ₅₀	mg AV / mg veneno
Subunidad B nativa	6.7	1.5	7.6
<i>C. mictlantecuhkli</i>	4.0	2.1	175

DL₅₀: dosis letal media en ratones CD1 (18-20 g.)

DE₅₀: dosis mínima efectiva.

3 DL₅₀ fueron utilizadas para la determinación de la DE₅₀ y para la determinación del mg AV/ mg veneno.

Reconocimiento de los anticuerpos a la crotoxina y subunidad B

Mediante un *western-blot* se evaluó el de reconocimiento de los anticuerpos generados en conejo contra la subunidad B de crotoxina nativa y subunidad B recombinante, así como su reconocimiento a venenos completos que poseen y que carecen de crotoxina, pero que poseen fosfolipasas A₂. Como resultado, los anticuerpos provenientes de suero hiperinmune detectan la subunidad B tanto nativa como recombinante, así como los homólogos presentes en venenos completos, sin embargo, no se percibe un reconocimiento para los venenos que carecen de crotoxina pero que poseen fosfolipasas (**Figura 8**).

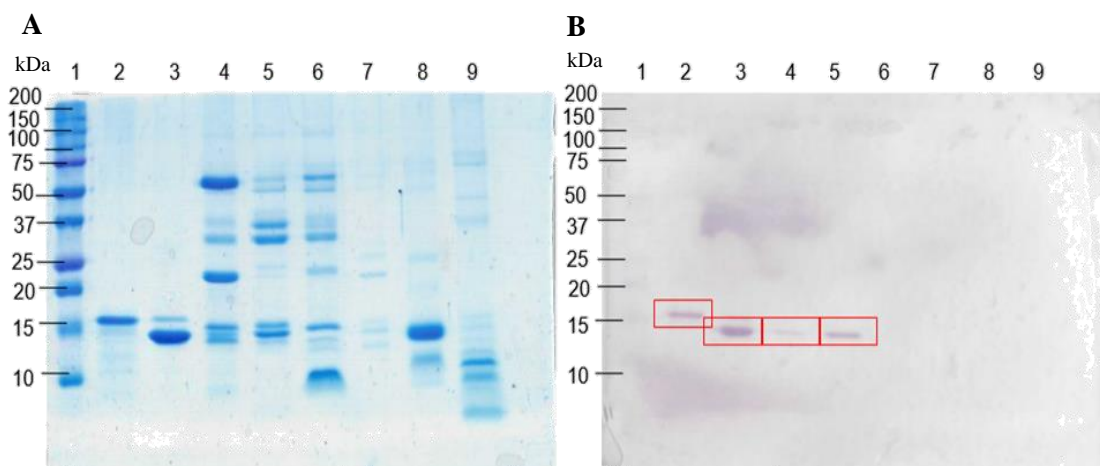


Figura 8. **A)** Gel de acrilamida al 15 % en condiciones reductoras de crotoxina nativa y distintos venenos completos, 1: MPM, 2: subunidad B recombinante; 3: subunidad B nativa de *C. tzabcan*; 4: Veneno de *C. tzabcan*; 5: Veneno de *C. miclantecuhtli*; 6: Veneno *C. culminatus*; 7: Veneno de *Bothrops asper*; 8: Veneno de *Micrurus laticollaris*; 9: Veneno de *Chihuahuanus crassimanus*. **B)** Western-Blot del gel en donde las marcas rojas reportan un reconocimiento por la crotoxina recombinante y nativa, así como a los homólogos presentes en venenos completos: *C. tzabcan* y *C. miclantecuhtli*.

Construcción de la mutante de subunidad B de crotoxina

Con el objetivo de evaluar la capacidad inmunogénica de la subunidad B, derivado de realizar cambios de residuos aminoacídicos específicos en la secuencia, se realizó la búsqueda de secuencias de proteínas homologas o *crotoxin-like* de la subunidad B, reportadas en la base de datos UniProt, usando como templado la secuencia de la proteína inicial. Como criterios para seleccionar las secuencias a utilizar, se consideró un porcentaje de identidad superior al 80 %, la secuencia completa y la letalidad, si es que esta reportada (**Tabla 4**).

Tabla 4. Criterios de selección de las secuencias seleccionadas para la construcción de la proteína mutante

Secuencia	DL50	Secuencia completa	Homología	Fuente
P62022	480 µg/kg	Si	99	Faure <i>et al.</i> , 1993
P0CAS6	N/D	Si	92	Hernandes-Oliveira <i>et al.</i> , 2004
P24027	700 µg/kg	Si	93	Faure <i>et al.</i> , 1993

Una vez seleccionadas las secuencias, se realizó un alineamiento haciendo uso del software *JalView* versión 2.11.1.3 (**Tabla 5**). En el alineamiento se añadió una secuencia de epítomos inmunogénicos de la subunidad B de la crotoxina, determinada por Molina y colaboradores (2020). Una vez obtenida la secuencia consenso, es decir, aquella secuencia resultado del análisis de la posición de aminoácidos de las demás proteínas (**Figura 9**), se visualizó la posición de los aminoácidos que cambian entre ésta y la secuencia inicial, seleccionando los aminoácidos que serían sustituidos de acuerdo con su capacidad inmunogénica, esto partiendo del reporte realizado por Kolaskar & Tongaonkar, (1990) quienes asignaron valores inmunogénicos a cada aminoácido a partir de su presencia en epítomos.

Las secuencias seleccionadas para la construcción son las P62022, P0CAS6 y P24027, las cuales corresponden a diferentes isoformas de la subunidad B de la crotoxina aislada de la serpiente *C. d. terrificus*.

Tabla 5. Alineamiento de las secuencias seleccionadas para la construcción de la proteína mutante, así como alineamiento junto con los epítomos inmunogénicos reportados por Molina et al. (2020).

Proteína	Secuencia
C	HLLQFNKMIK FETRNKNAIPF YAFYGCYCGW GGRGQPKDAT DRCCFVHDC YGKLAKNTK WDIYFYSLSKSGYITCGKGIW CEQICECDR VAAECLRRSL STYKNGYMEY PDSRCRGPSETC
tzabcan	HLLQFNKMIK FETRNKNAIPF YAFYGCYCGW GGRGRPKDAT DRCCFVHDC YGKLAKNTK WDIYFYSLSKSGYITCGKGIW CEQICECDR VAAECLRRSL STYKNGYMEY PDSRCRGPSETC
P62022	HLLQFNKMIK FETRNKNAIPF YAFYGCYCGW GGRGRPKDAT DRCCFVHDC YGKLAKNTK WDIYFYSLSKSGYITCGKGIW CEQICECDR VAAECLRRSL STYKNGYMEY PDSRCRGPSETC
P0CAS6	SLLQFNKMIK FETRNKNAIPF YAFYGCYCGW GGRRRPKDAT DRCCFVHDC YEKVTKNTK WDIYFYSLSKSGYITCGKGIW CEQICECDR VAAECLRRSL STYKNGYMEY PDSRCRGPSETC
P24027	SLLQFNKMIK FETRNKNAIPF YAFYGCYCGW GGRGRPKDAT DRCCFVHDC YGKLAKNTK WDIYFYSLSKSGYITCGKGIW CEQICECDR VAAECLRRSL STYKNGYMEY PDSRCRGPSETC
Epitopes	-----VHDC YEKVTKNTK -----GKGIW CEQICECDR -----YKNGYMEY PDSRCRGPSETC
Consenso	+LHQFNKMIK FETRNKNA+PF YAFYGCYCGW GGRGRPKDAT DRCCFVHDC YEKVTKNTK WDIY+YSLKSGYITCGKGIW CEQICECDR VAAECLRRSL STYKNGYMEY PDSRCRGPSETC
Final	HLLQFNKMIK FETRNKNAIPF YAFYGCYCGW GGRGRPKDAT DRCCFVHDC YEKVTKNTK WDIYFYSLSKSGYITCGKGIW CEQICECDR VAAECLRRSL STYKNGYMEY PDSRCRGPSETC

Amarillo: Cisteínas a lo largo de las secuencias

Azul fuerte y azul claro: residuos cambiantes entre secuencias.

Verde: aminoácidos asignados por el algoritmo del programa *JalView* para las posiciones 52,55 y 82.

Rojo: aminoácidos seleccionados para la secuencia final.

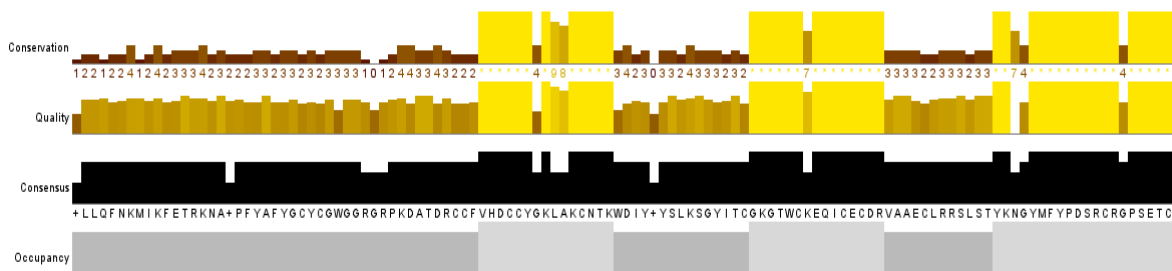


Figura 9. Alineamiento de las secuencias utilizadas para la construcción de la proteína mutante. Se hizo uso del programa JalView en su versión 2.11.1.3 y, y del algoritmo Crystal por defecto del programa.

Una vez seleccionada la secuencia de aminoácidos final, se realizó el diseño de los oligonucleótidos para generar los cambios en la secuencia original. El gen codificante con las tres mutaciones, cuya secuencia se puede observar en la **Tabla 6**, dará lugar a la proteína de 122 residuos con una masa molecular de 14,272.43 Da.

Tabla 6. Flujo de trabajo en términos de secuencias para la obtención de la crotoxina recombinante mutada de la serpiente *Crotalus tzabcan*

Descripción	Secuencia
1. Secuencia de residuos de aminoácidos de la subunidad B	HLLQFNKMIKFETRKNAI PFYAFYGCYCGWGGRRGQPKDATDRCCFVHDC Y G K L A K CNTKWDIYPYSLKSGYITCGKGTWC E EQICECDRVAECLRRSL STYKGYMFYPDSRCRGPSETC (14171.28 Da; 122 residuos)
2. Secuencia de residuos de aminoácidos de la subunidad B con las tres mutaciones	HLLQFNKMIKFETRKNAI PFYAFYGCYCGWGGRRGQPKDATDRCCFVHDC Y E K L T KCNTKWDIYPYSLKSGYITCGKGTWC K E QICECDRVAECLRRSL STYKGYMFYPDSRCRGPSETC (14272.43 Da; 122 residuos)
4. Secuencia completa: con las tres mutaciones	CACCTGCTGCAATTCAACAAGATGATCAAGTTTGAGACAAGGAAAAACGC TATTCCCTTCTATGCCTTTTACGGCTGCTACTGTGGCTGGGGGGGCCGAG GCCAGCAAAGGACGCCACTGACCGCTGCTGCTTTGTGCATGACTGCTGT TACGaAAAAGTGaCCAAGTGCAACACCAAATGGGACATCTATCCCTACAG CTTGAAGAGTGGGTATATCACCTGCGGAAAGGGCACCTGGTGCaAGGAAC AGATTTGTGAGTGCACAGGGTTCGCGGCAGAATGCCTCAGAAGGAGTCTG AGCACGTACAAGTATGGATATATGTTTTACCCGGACTCTCGTTGCAGGGG GCCTTCAGAGACATGCTAA (369 nucleótidos)

Ya obtenido el diseño de la secuencia completa, se plantean dos oligonucleótidos para obtener las tres mutaciones (**Tabla 7**) por medio de la técnica de PCR.

Tabla 7. Secuencias de los oligonucleótidos para la obtención de las mutaciones.

Descripción	Secuencia del oligonucleótido (5' →3')
Oligo directo: Crotox-Dir: Longitud 22 nt	CCT GGT GCA AGG AAC AGA TTT G
Oligo reverso: Crotox-Rev antiparalelo: Longitud 24 nt	CAC TTG GTC AGT TTT TCG TAA CAG

Una vez sintetizados los oligonucleótidos, se procedió a introducir las mutaciones en la secuencia mediante la técnica de PCR, en la secuencia original siguiendo la metodología descrita.

De purificación del producto de PCR a partir del gel de agarosa se obtuvo una banda con un peso cercano de 568 pb, como en puede observar en la **Figura 10**, el cual correspondería el *megaprimer 1*, el cual generara los dos primeros cambios deseados de la secuencia en una primera instancia, para posteriormente introducir el tercer y último cambio mediante el *megaprimer 2*.

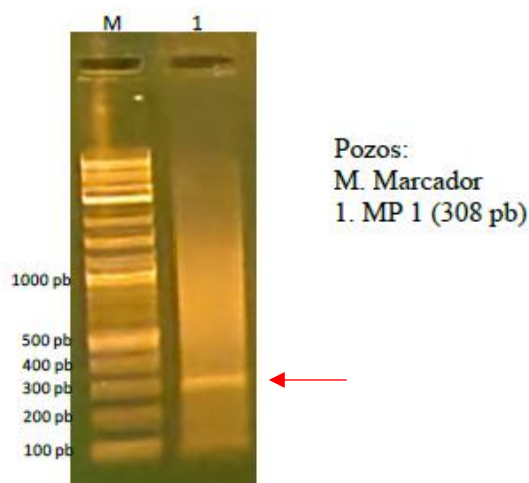


Figura 10. Amplificación del *megaprimer 1* para la obtención de las mutaciones de la subunidad B. Se muestra una banda correspondiente al tamaño esperado de 308 pb.

Una vez que se obtuvo el *megaprimer* 1, se utilizó como templado la secuencia original de la subunidad B de *C. tzabcan* para obtener el gen completo que contuviera las dos primeras mutaciones de la secuencia, es decir G₅₂E y A₅₅T. Después de la PCR y visualizándose mediante un gel de agarosa al 1 %, se observan varias bandas, entre ellas la del tamaño esperado que es de 568 pb como se aprecia en la **Figura 11**, que correspondería a la secuencia de subunidad B de crotoxina con los cambios en las posiciones 52 y 55.



Figura 11. Amplificación de la construcción para la obtención de los dos primeros cambios de la subunidad B. Se muestra una banda que corresponde al tamaño esperado de 568 pb.

Una vez obtenido el gen, se procedió a digerir y ligarlo en el vector de expresión pQE30 para evaluar su expresión en células quimio competentes de *E. coli* mediante un PCR de colonia. De las 7 colonias evaluadas al azar, únicamente las colonias 5 a 7 muestran bandas con pesos cercanos a los 583 pb (**Figura 12**), por lo que se procedió a purificar el plásmido, encontrando que la clona 6 presenta la secuencia correcta para el gen de la subunidad B mutante con los dos cambios esperados.

> Clona 6 No de secuencia 4705

MRGSHHHHHHGSSENLYFQGHLLQFNKMIKFETRKNAI PFYAFYGCYCGWGGRGQPKDATDRCCFVHDCCY
EKLTKCNTKWDIYPYSLKSGYITCGKGTWCEEQICECDRVAECLRRSLSTYKYGYMFPDSRCRGPSET
C

Number of amino acids: 141

Molecular weight: 16523.77

Theoretical pI: 8.50

Cys (C): 14



Figura 12. Resultados de PCR de colonia que fueron producto de la transformación de la construcción de la subunidad B + pQE30. Los pozos del 1 al 7 corresponden a las colonias que crecieron luego de la transformación y de las que se esperaba un tamaño de 583 pb.

Una vez verificada la secuencia de la proteína con los dos cambios deseados, se procedió a la generación del *megaprimer 2*, el cual generara el tercer cambio deseado dentro de la secuencia (**Figura 13**).

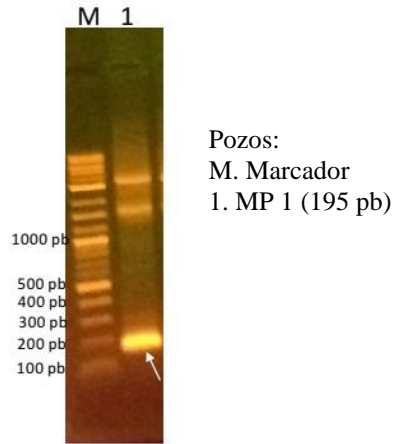


Figura 13. Amplificación del *megaprimer 2* para la obtención de mutaciones de la subunidad B de la serpiente *Crotalus tzabcan*. Se muestra una banda que corresponde al tamaño esperado de 195 pb.

Una vez generado el *megaprimer 2*, mediante la técnica de PCR y utilizando los oligonucleótidos de la subunidad B original, así como el *megaprimer 2*, y la secuencia con los dos primeros cambios como templado, se procedió a generar la secuencia de la subunidad B mutante con los tres cambios deseados, es decir G₅₂E, A₅₅T y E₈₂K. De dicha secuencia se esperaba un peso cercano a los 499 pb, justo como se puede observar en la **Figura 14**, en donde se puede ver una banda cercana al peso.

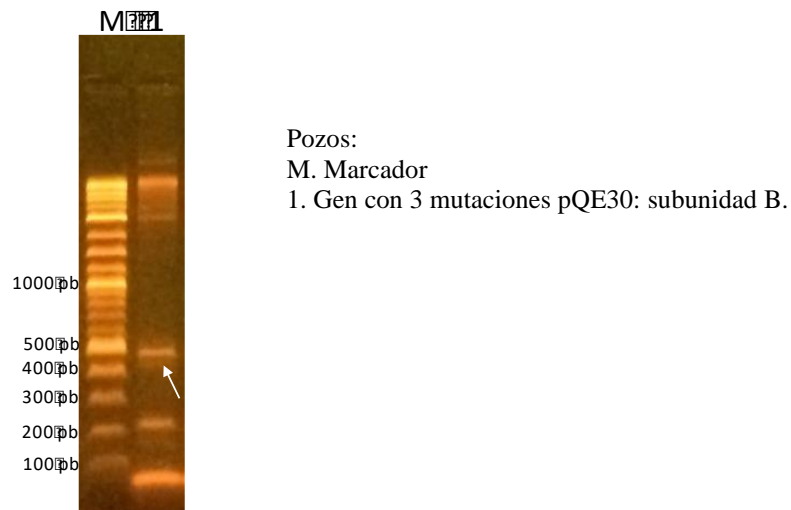


Figura 14. Amplificación para la obtención de las mutaciones deseadas de la subunidad B de la serpiente *C. tzabcan*. Se muestra una banda que corresponde al tamaño esperado de 499 pb.

Una vez generada la construcción con el peso esperado, esta se purificó y se ligó en el plásmido de expresión pQE30, para ser transformada en células quimio competentes de *E. coli*. Como resultado de la transformación se obtuvieron diversas colonias, de las cuales se seleccionaron algunas al azar, y se realizó una amplificación del gen. Como se puede observar en la **Figura 15**, diez de las once colonias evaluadas presentaron el producto esperado de 583 pb, que corresponde al gen mutante de la subunidad B.

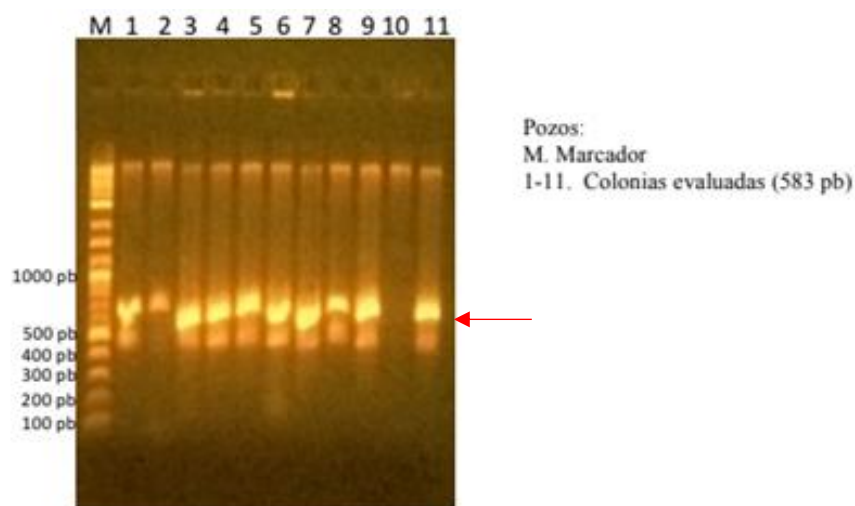


Figura 15. Resultados del PCR de las colonias que fueron producto de la transformación de la construcción de la pQE30: Subunidad B. Los pozos del 1 al 11 corresponden a las colonias que crecieron después de la transformación y de las que se esperaba un tamaño de 583 pb.

Se realizó un gel de poliacrilamida al 15 % (**Figura 16**) de la expresión de las mismas colonias utilizadas en el PCR de colonia a excepción de la clona 10, y se observó una banda cercana a los 16,000 Da, cercano a la masa de la proteína mutante.

Se eligieron las clonas 3,7,8 y 9 de forma azarosa, de las cuales se purificó plásmido, cuyos resultados de secuenciación coincidían para el gen de la proteína con tres mutaciones.

>Clona3 secuencia-5977

```
MRGSHHHHHGSENLYFQGHLLQFNKMIKFETRKNAI PFYAFYGCYCGWGGRGQPKDATDRCCFVH
DCCYEKLT KCNTKWDIYPYSLKSGYITCGKGTWCKEQICECDRVAECLRRSLSTYKYGYMFYPDS
RCRGPSETC
```


>Clona7 secuencia-5978

MRGSHHHHHHGSSENLYFQGHLLQFNKMIKFETRKNAI PFYAFYGCYCGWGGRGQPKDATDRCCFVH
DCCYEKLT KCNTKWDIYPYSLKSGYITCGKGTWC KEQICECDRVA AECLRRSLSTYKYGYMFYPDS
RCRGPSETC

>Clona8 secuencia-5979

MRGSHHHHHHGSSENLYFQGHLLQFNKMIKFETRKNAI PFYAFYGCYCGWGGRGQPKDATDRCCF
VHDCCYEKLTKCNTKWDIYPYSLKSGYITCGKGTWC KEQICECDRVA AECLRRSLSTYKYGYMF
YPDSRCRGPSETC

>Clona9 secuencia-5980

MRGSHHHHHHGSSENLYFQGHLLQFNKMIKFETRKNAI PFYAFYGCYCGWGGRGQPKDATDRCCF
VHDCCYEKLTKCNTKWDIYPYSLKSGYITCGKGTWC KEQICECDRVA AECLRRSLSTYKYGYMF
YPDSRCRGPSETC

Number of amino acids: 141

Molecular weight: 16522.83

Theoretical pI: 8.73

Cys (C): 14

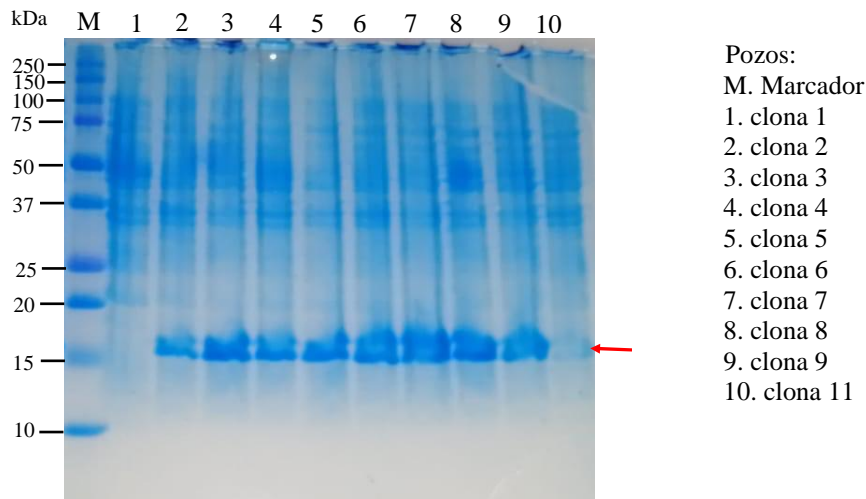


Figura 16. Gel de acrilamida al 15% de expresión de las colonias 1 a 9 y 11, las cuales mostraron el tamaño esperado en el PCR de colonia con la construcción pQE30: subunidad B mutada con tamaño esperado de 16,000 Da.

Expresión de la mutante de subunidad B de crotoxina con los tres cambios en la secuencia

Una vez obtenido el plásmido, se transformó la cepa *origami* de *E. coli* para su posterior cultivo en medio sólido LB con ampicilina en la caja de *Petri*. Una vez que se obtuvieron clonas en la placa de *Petri*, se procedió a inducir la expresión utilizando el mismo protocolo de expresión utilizado para la subunidad B de crotoxina (véase materiales y métodos).

Ya obtenida la proteína, se procedió a purificarla por cromatografía de afinidad a níquel realizando dos lavados con a 0 y 40 mM de imidazol para eliminar proteínas unidas inespecíficamente o de baja afinidad. Finalmente, la elución se realizó con 400 mM de imidazol, obteniéndose 10 alícuotas de 2 mL cada una, las cuales fueron almacenadas a 4 °C para posteriormente ser utilizadas en un gel SDS-PAGE al 15 % para verificar la expresión (**Figura 17**).

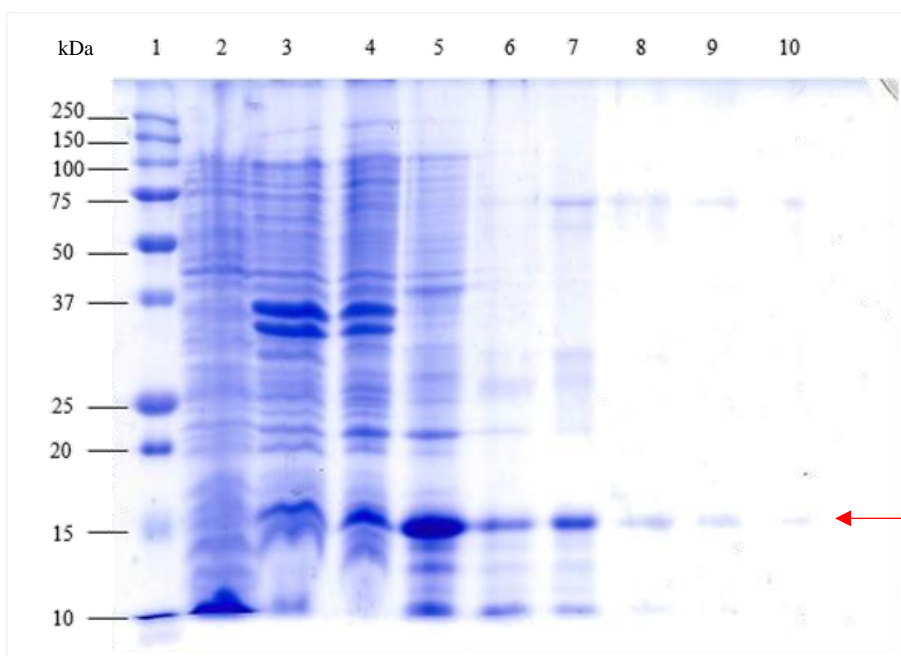


Figura 17. Gel de acrilamida al 15% de la expresión de la subunidad B mutante. 1: MPM; 2: fracción soluble; 3: recirculante; 4: lavado 1 sin imidazol; 5: lavado 2 con 40 mM de imidazol; 6 - 10; 1, 3, 5,7, 9 eluciones con 400 mM de imidazol.

Plegamiento de la proteína mutante

Tras la expresión de la proteína se procedió a realizar la reducción de ésta utilizando el mismo protocolo previamente descrito para la subunidad B. El tiempo de retención de la proteína fue de 43 minutos a un porcentaje de solución B del 38 % (**Figura 18**). La masa experimental resultante de este pico fue de 16,520.6 Da, siendo consistente con la masa teórica de 16,522.8 Da.

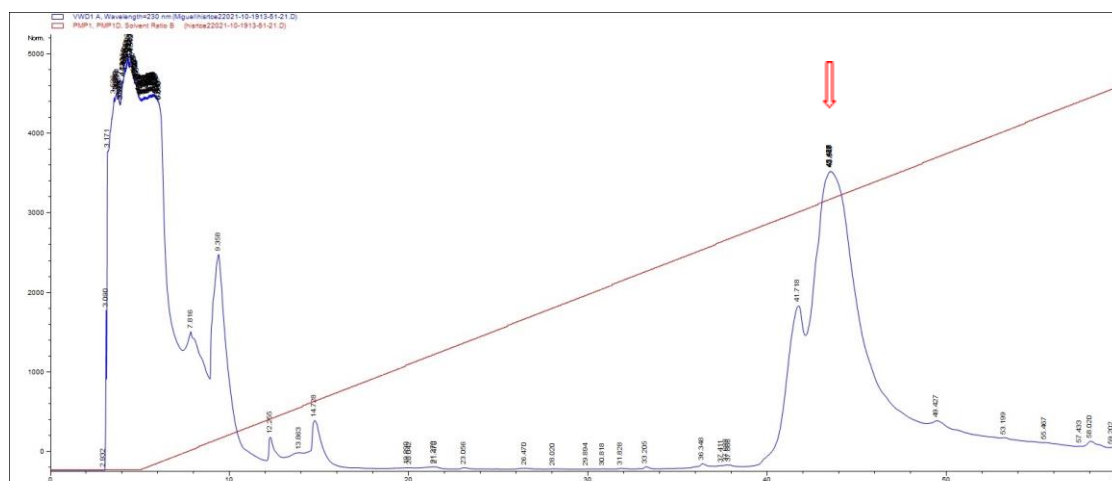


Figura 18. Perfil de elución de la proteína mutante reducida con 20 mM de DTT durante 2 horas a 50 °C. El tiempo de retención de la proteína se determinó a los 44 minutos con un 38 % de solución B (Acetonitrilo + 0.1 % TFA) en una columna *Vydac*® 218TP C18 (250 x 4.6 mm, 5µg) en un programa de 0 a 60 % en 60 minutos.

Una vez verificada la masa de la proteína, se procedió a realizar el plegamiento bajo las mismas condiciones utilizadas en la proteína anterior, el cual fue purificado mediante la técnica de fase reversa utilizando el protocolo previamente descrito (**Figura 19**).

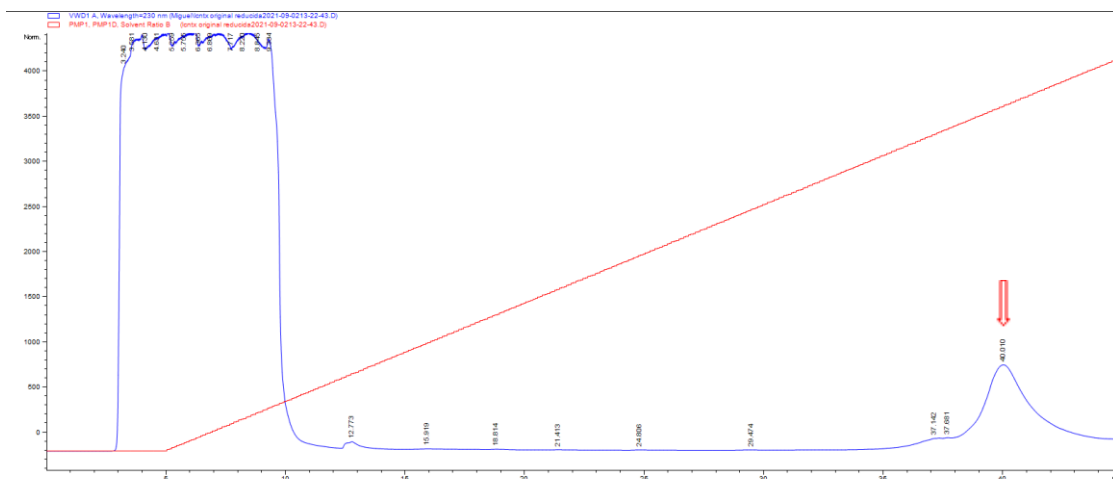


Figura 19. Perfil de elución de la proteína mutante en estado plegado. El tiempo de retención de la proteína se determinó a los 40 minutos con un 36 % de solución B (Acetonitrilo + 0.1 % TFA) en una columna Vydac® 218TP C18 (250 x 4.6 mm, 5µg) en un programa de 0 a 60 % en 60 minutos.

Evaluación del reconocimiento de los anticuerpos generados hacia la subunidad B mutante

Ya obtenida la proteína mutante en estado oxidado, se procedió a evaluar el nivel de reconocimiento que tienen los anticuerpos generados contra la subunidad B recombinante hacia esta proteína mutante. Para ello, se realizó la evaluación mediante un ensayo de ELISA, en el cual se evaluó el reconocimiento hacia la subunidad B nativa purificada del veneno de *C. tzabcan*, la subunidad B recombinante y la proteína mutante haciendo uso de suero hiperinmune de los conejos, en una escala de dilución 1:3

Los resultados del reconocimiento se pueden apreciar en la **Tabla 8**, en donde se puede observar que hay un mayor reconocimiento hacia la subunidad B nativa, seguida de la subunidad B mutante, y finalmente hacia la subunidad B recombinante inicial, sin embargo, los intervalos de confianza son muy similares entre ellos, interpretándose como un reconocimiento igual para los tres antígenos por parte de los anticuerpos. En la **Figura 20**, se puede observar de forma gráfica el reconocimiento que hubo hacia estas proteínas.

Tabla 8. Reconocimiento de las tres proteínas por parte de los anticuerpos generados en conejo

Muestra	Título	Intervalo de confianza
Subunidad B nativa	6,045	5,156 – 7,133
Subunidad B recombinante	5,686	5,049 – 6,414
Subunidad B mutante	6,337	5,627 – 7,147

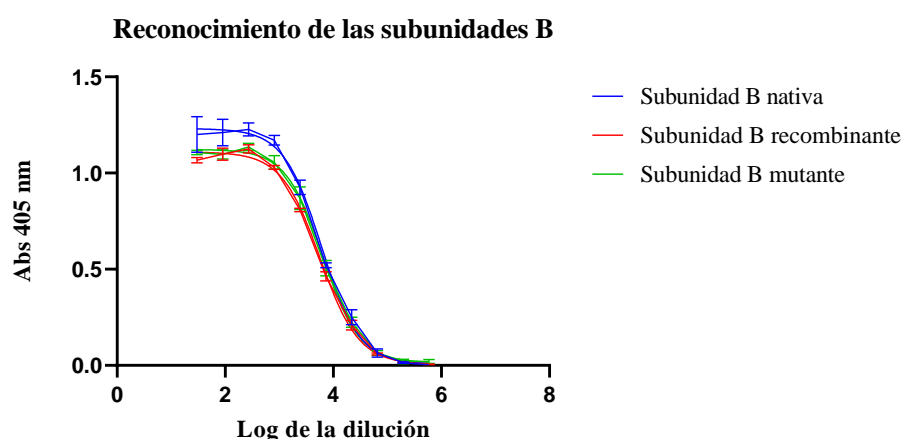


Figura 20. Evaluación de títulos de antisuero anti-subunidad B contra la subunidad B recombinante, subunidad B nativa y subunidad B mutante. Las placas fueron incubadas con antígeno (500 ng/pozo) e incubadas con suero hiperinmune. Después de la incubación se reveló con anticuerpos IgG-peroxidasa, y el resultado mediado a una absorbancia de 405 nm.

Finalmente se realizó un western-blot con la finalidad de determinar el reconocimiento de los anticuerpos a partir de suero sanguíneo, contra las mismas muestras, además de otras muestras de venenos completos los cuales son positivos a homólogos de crotoxina en su composición así como negativos a homólogos de crotoxina pero que poseen fosfolipasas A₂ en su composición.

Los resultados se muestran en la **Figura 21**, en donde se puede ver un reconocimiento positivo a las subunidades B, así como a dos de los venenos que poseen crotoxina en su composición, pero no a uno, el cual pertenece a otros género de vipéridos. El reconocimiento fue negativo para los venenos que únicamente poseen fosfolipasas en su composición.

Aunque en la imagen se puede observar el reconocimiento de los anticuerpos hacia las proteínas esperadas, también se logran apreciar otras bandas, las cuales son provocadas por la inespecificidad y oxidación del reactivo utilizado en el revelado de la membrana, por lo que se sugiere evaluar la sustitución del reactivo en futuros ensayos y evitar confusiones a la hora del análisis de los resultados.

Por otra parte, en el carril 4, correspondiente a la subunidad B mutante, se logran apreciar bandas superiores e inferiores a la masa de la proteína, la cuál es cercano a los 16,000 Da. Estas bandas podrían ser oligómeros o degradados de la misma proteína, los cuáles se pudieron formar mientras se realizó la electroforesis, por lo que faltaría la caracterización de la formación de estos agregados de la proteína, con la finalidad de obtener la muestra con mayor pureza.

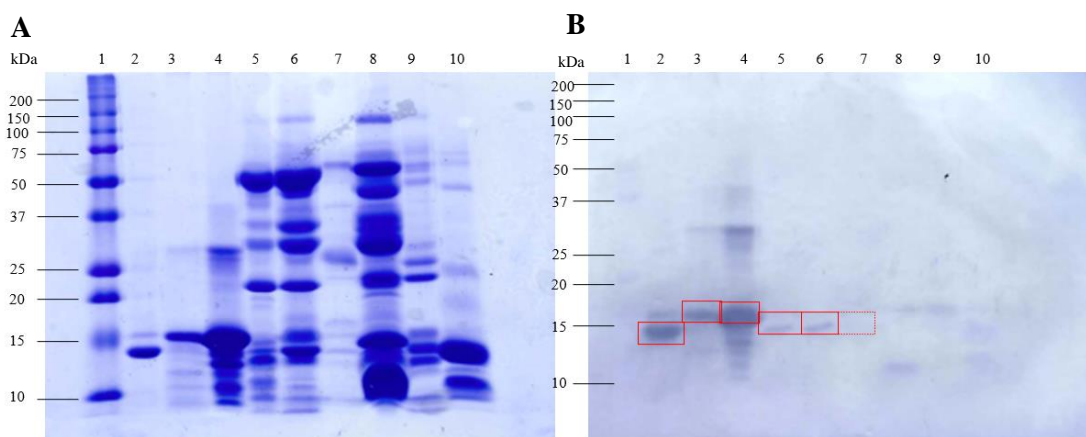


Figura 21. A) SDS-PAGE 15 % en condiciones reductoras de subunidad B nativa y distintos venenos completos, 1: MPM, 2: subunidad B nativa; 3: subunidad B recombinante, 4: subunidad B mutante, 5: veneno de *C. tzabcan*, 6: veneno de *C. miclantecuhli*, 7: veneno de *Ophryacus sphenophrys*, 8: veneno de *C. culminatus*, 9: veneno de *Bothrops asper*, 10: veneno de *Micrurus laticollaris*. B) Western-Blot del gel en donde las marcas rojas reportan un reconocimiento por la crotoxina nativa, recombinante y variante, así como a los homólogos presentes en venenos completos: *C. tzabcan* y *C. miclantecuhli*, pero no al veneno de *O. sphenophrys*.

Finalmente, aunque no se llegó a realizar un esquema de inmunización con esta proteína mutante, además de los ensayos de neutralización es claro que los anticuerpos anti-subunidad B pueden reconocer variantes (homólogos) de la subunidad B de la crotoxina. Así que estos anticuerpos anti-subunidad B pueden ser utilizados para identificar venenos con variantes

(homólogos) de subunidad B. Más trabajo por realizar con esta mutante de subunidad B queda en la sección de perspectivas, esperando poder completar el proyecto en un futuro cercano y corroborar nuestra hipótesis sobre la sustitución de residuos aminoacídicos en la secuencia, y su posible utilidad para generar anticuerpos de mayor afinidad por la subunidad B en venenos de crotálidos.

DISCUSIÓN

La crotoxina es un componente con una fuerte actividad neurotóxica, sin embargo, se han descrito otras actividades, tales como la miotóxicidad y antibacteriana (Giuliani et al., 2001). Aunque originalmente fue descrita a partir del veneno de la serpiente *Crotalus durissus terrificus*, actualmente se han reportado proteínas homologas en el veneno de serpientes del género *Crotalus* y en otros géneros.

Dado que esta proteína es la principal responsable de los cuadros neurotóxicos por envenenamiento de algunas especies de serpiente de cascabel, algunas investigaciones se han centrado en la caracterización de la proteína aislándola a partir del veneno completo, lo cual implica un arduo trabajo de captura y mantenimiento de especies, riesgo durante la ordeña y limitación de la cantidad de muestras recuperadas. Por lo que alternativas más seguras e igualmente eficientes pueden ser utilizadas como es la expresión de esta proteína y otras fosfolipasas A₂ en sistemas heterólogos. En este trabajo se realizó la expresión de la subunidad B de la crotoxina en el vector pEQ-30 y la cepa *origami* de *E. coli*, en la construcción del gen se añade una etiqueta de histidinas en la secuencia de la proteína. Boda et al., (2018) hace uso del vector pET-30b, el cual de igual forma añade dicho tag a la proteína, pero además la co expresa junto a una enteroquinasa, haciendo una proteína de fusión. Caso similar es reportado por Giuliani et al. (2001) y Yang et al. (2003) quienes expresan fosfolipasas A₂ haciendo uso de sistemas de proteínas de fusión con distintas vectores de expresión, coincidiendo además en la adición de una cola de histidina que facilita la purificación de esta.

Si bien los trabajos de Giuliani et al. (2001) y Yang et al. (2003) reportan rendimientos de 2.3 y 0.3 mg de proteína pura por litro de cultivo respectivamente, el trabajo de De Oliveira et al., (2003) reporta la obtención de subunidad B de crotoxina en cuerpos de inclusión, tal y como sucedió en este trabajo, en donde se obtuvieron un aproximado de 3 mg de proteína por litro de expresión a partir de la solubilización de cuerpos de inclusión. Clement et al. (2019) obtuvieron un rendimiento aproximado de 2.5 mg por litro de cultivo de una fosfolipasa A₂ recombinante (datos no publicados), siendo un rendimiento más cercano al obtenido haciendo uso del mismo sistema de expresión (cepa y vector). La obtención de la proteína en cuerpos de inclusión es una situación relativamente común en las técnicas de

expresión heteróloga, y eso se puede deber a distintos factores tales como la cantidad de proteína producida por la bacteria, así como el tamaño de la misma proteína, además de otros factores durante el protocolo de expresión que se esté utilizando, tales como el agente inductor de expresión utilizado, la temperatura y tiempo de incubación e incluso la cepa de *E. coli* utilizada. Aquí se hizo uso de la cepa *Origami* de *E. coli*, la cuál tiene mutaciones en los genes tioredoxina y glutatión reductasa, los cuales permiten la formación de proteínas en el citoplasma, debido a la condición reducida de este último (Xiong et al., 2005), y que además, su uso ha sido reportado por Clement et al. (2019), quienes lograron expresar una fosfolipasa A₂ de víperido haciendo uso de esta misma cepa.

Para el plegamiento de la proteína se utilizó un *buffer* con ClGnd, ya que el plegamiento de proteínas a estados nativos es más exitoso en presencia de agentes caotrópicos en distintas metodologías de plegamiento, como aquellas que se basan en el uso de exclusión molecular o diálisis (Fonseca et al., 2009); aunque algunas estrategias de plegamiento como la diálisis o filtración en gel son rápidas y difíciles de controlar, por lo que las proteínas pueden formar agregados o generarse interacciones no deseadas que derivan en la formación de conformaciones no nativas (Russo et al., 2019); mientras que algunas otras como técnicas de dilución e incluso diálisis pueden derivar en la precipitación de la proteína (Ward et al., 2001).

En general, el plegamiento de proteínas *in vitro* es un área de interés para diversos grupos, que estudian el proceso en el que las proteínas generadas en sistemas externos al original adquieren una estructura semejante a la nativa. Algunos factores que pueden intervenir en la generación de puentes disulfuro y por ende en un correcto plegamiento son, el pH, la temperatura, la intervención de agentes oxidantes y la reactividad intrínseca de las cisteínas (Bulaj., 2005). Sin embargo, el proceso llega a ser impredecible por la cantidad de factores que intervienen, pudiendo derivar en la formación de interacciones no específicas, como la que puede ocurrir entre grupos hidrofóbicos expuestos de dos o más proteínas en un mal estado de plegamiento, derivando en la formación de agregados, los cuáles no suceden de forma natural, debido a la intervención de chaperonas y enzimas que facilitan el correcto plegamiento de la proteína (Bulaj, 2005; Hartl & Hayer-Hartl, 2009).

Se hizo uso del par de oxidación-reducción cistina - cisteína, ya que este, en conjunto con la cepa y medio de cultivo, fue la combinación que mejor rendimiento generó, además de obtener repeticiones exitosas; ya que el uso de este par de oxidación-reducción, ya ha sido reportado en *buffers* de plegamiento de fosfolipasas (Fonseca et al., 2009; Ward et al., 2001). El uso de algunos agentes oxidantes de bajo peso molecular en *buffers* de plegamiento, tales como la cisteína, glutatión oxidado o ácido 2-nitrobenzoico, está asociado a su capacidad de oxidación de los grupos tiol (-SH) promoviendo la generación de enlaces disulfuro (Bulaj., 2005), que, junto con otros factores, podrían contribuir a un correcto plegamiento de la proteína.

La actividad enzimática obtenida fue de 0.24 ± 0.05 U/mg para la proteína recombinante y de $9.56 \pm$ U/mg para la proteína nativa. La actividad de la proteína nativa es menor a la reportada previamente por Castro et al. (2013), la cual fue de 478 ± 17 U/mg, y por Su & Chang, (1984) para la crotoxina de *C. d. terrificus*, con 154 ± 8 U/mg, así como los homólogos β -bungarotoxina y taipoxina con 97 ± 12 y 43 ± 4 U/g, respectivamente; sin embargo, dichos valores fueron obtenidos a partir de protocolos basados en absorbancia a 450 nm con el sustrato sintético 4-NOBA, y de monitoreo del valor de pH de una solución emulsificada respectivamente, mientras que el valor obtenido en este trabajo se realizó haciendo uso de yema de huevo como sustrato, por lo que una comparativa más objetiva sería con valores obtenidos en metodologías que incluyan el mismo sustrato o su equivalente, como el valor reportado por Soares et al. (2001) quienes reportan una actividad específica de 39.8 U/mg para la crotoxina de *C. d. terrificus*. En la literatura se han reportado diversas metodologías utilizadas para la evaluación de la actividad fosfolipasa, sin embargo, muchas de ellas difieren entre sí, ya que algunas se basan en el monitoreo de pH, de absorbancia o incluso colorimetría, sin embargo, creemos que la utilización de un sustrato más parecido a la molécula blanco de la proteína sería el más adecuado para la evaluación de la actividad, y permitiría una comparación más precisa entre los valores reportados entre los diversos grupos de investigación que trabajen con este grupo de proteínas.

Por otro lado, la actividad de la proteína recombinante es aproximadamente el 2.5 % de la actividad de la proteína nativa. Si bien es una actividad casi nula, se ha reportado la ausencia de la actividad fosfolipídica en proteínas recombinantes, sin embargo, algunas de ellas

conservan otras actividades tales como la miotóxicidad o la actividad antiviral (Giuliani et al., 2001; Russo et al., 2019). La falta de actividad en la proteína podría deberse a distintos factores, como lo puede ser el sistema de expresión. Uno de los problemas en sistemas de expresión con distintas cepas de *E. coli* es la generación de proteínas con múltiples puentes disulfuro, que resultan inactivas en cuerpos de inclusión, las cuales pueden ser sometidas a procesos de renaturalización, sin que este llegue a ser exitoso, careciendo de la actividad (Fathi-Roudsari et al., 2016), debido a un mal plegamiento.

El reconocimiento de los anticuerpos de conejos contra la proteína recombinante y nativa hasta el final del esquema de inmunización fue de 7,900 y 4,842 títulos respectivamente, habiendo también un reconocimiento contra el veneno completo de donde se purificó la proteína nativa - *C. tzabcan* - y veneno de *C. mictlantecuhli*, una especie que posee un homólogo de la proteína. Algunos trabajos han demostrado un reconocimiento de homólogos de crotoxina a partir de sueros generados contra ella, tal como reportan Kaiser et al. (1986) quienes generaron un suero anti-crotoxina, el cual tuvo un buen reconocimiento para los homólogos concolor y mojave-toxinas. Algunos otros trabajos han evaluado el reconocimiento de sueros generados contra la subunidad B de la crotoxina con otras proteínas homologas de vipéridos, observándose una reactividad cruzada en el reconocimiento de dichos homólogos tales como la AGTX y la AMTX-A (Choumet et al., 1992), e incluso contra venenos completos de otras serpientes de cascabel e incluso otros vipéridos (Beghini et al., 2005; Choumet et al., 1989). Esta reacción cruzada también ha sido observada en el reconocimiento de anticuerpos generados contra fosfolipasas recombinantes contra venenos completos, como reporta Clement et al. (2019) en donde se probaron anticuerpos generados en conejos contra distintas especies del género *Bothrops*, viéndose un reconocimiento por los venenos de varias de las especies retadas contra los anticuerpos. Este reconocimiento por homólogos se puede deber a la similitud entre las secuencias proteicas, ya que algunas de ellas llegan a tener una similitud igual o mayor al 90 %, como es el caso de algunas crotoxinas de serpientes de cascabel, por lo que es posible que los anticuerpos generados hacia la crotoxina sean capaces de reconocer epítomos tanto estructurales como lineales de las proteínas homólogas.

Estudios previos han mostrado que sueros generados contra la subunidad B de la crotoxina, reconocen al antígeno contra el que están dirigidos, así como la proteína en dímero, pero no hay reconocimiento para la subunidad A (Choumet et al., 1989), por lo que los valores de los títulos obtenidos contra los venenos completos se pueden deber al reconocimiento de los anticuerpos únicamente contra la subunidad B del complejo. Aunado a ello, se debe considerar la representatividad de la proteína en el veneno completo, ya que los porcentajes de crotoxina varían entre especies e incluso entre individuos. En el veneno de *C. tzabcan* la crotoxina representa del 0 al 7.7 % del veneno total, mientras que en *C. miclantecuhтли* va de un 6 a 44 % (Neri-Castro et al., 2019), por lo cual no sorprende un valor mayor en los títulos de reconocimiento para la segunda especie.

En cuanto a la neutralización algunos estudios como el realizado por Choumet et al. (1989), indican que la actividad toxica de la proteína, así como la actividad enzimática de la misma, se puede neutralizar a partir de sueros generados únicamente contra la subunidad B. Clement et al. (2019) realizaron ensayos de neutralización de la actividad fosfolipasa contra veneno completo a partir de una fosfolipasa recombinante de *Bothrops ammodytoides*. Sus resultados indican que existe una neutralización de dicha actividad tanto en protocolos con placa de agar como titulométrico para venenos completos, siendo similares con nuestros resultados, en donde logramos disminuir la actividad enzimática de la proteína en ensayos titulométricos utilizando anticuerpos purificados.

Para la inhibición en sistemas *in vivo*, los resultados indican que se requieren 1.5 mg de anticuerpos generados contra la crotoxina recombinante para neutralizar 3 DL₅₀ de la subunidad B nativa y 2.1 mg para la neutralización completa del veneno de *C. miclantecuhтли*. Algunos estudios han reportado la neutralización de crotoxina u homólogos *in vivo* a partir del uso de sueros completos, tales como el estudio de Molina Molina et al., (2020) quienes utilizan suero generado contra el veneno de *C. d. terrificus* y su secuencia multiepitopo rMEPCtx, en ambos casos utilizaron distintos volúmenes de suero para evaluar la capacidad neutralizante observando el uso de al menos 400 µL de suero para rescatar al 100 y 75 % de su población respectivamente. Trabajo similar es el reportado por Kaiser et al., (1986), quienes evalúan la potencia neutralizante de sueros generados contra la crotoxina dimérica y contra la subunidad B, observando que dichos sueros son capaces de

neutralizar la actividad tóxica de la proteína, sobre todo si el anticuerpo se administra previo a la administración de la toxina, e incluso si el anticuerpo se administra hasta 1 minuto después de la crotoxina, logrando un rescate de hasta el 100 % de la población experimental. Choumet et al. (1991) logran neutralizar la actividad letal de la crotoxina a partir de anticuerpos monoclonales generados hacia la subunidad B de esta, e incluso logran la neutralización de la toxina AGTX proveniente de otro vipérido.

Aunque el uso de los anticuerpos anti-subunidad B recombinante resulto efectivo contra la subunidad B nativa, es claro que se requiere una mayor cantidad de anticuerpos para la neutralización del veneno de *C. mictlantecuhtli*, y esto podría estar relacionado con el hecho de que el veneno contiene hasta un 40% de crotoxina (Neri-Castro et al., 2019), mientras que el restante son proteínas hacia las cuales no hay un reconocimiento por parte de los anticuerpos, lo que podría desencadenar en la muerte de los organismos experimentales, aún cuando se este llevando a cabo la neutralización de la tóxina de interés. Para corroborar la capacidad neutralizante de los anticuerpos, se requeriría de la aplicación del ensayo utilizando venenos que tengan un mayor porcentaje de crotoxina y alguno(s) que carezca(n) de la misma.

La generación de anticuerpos del tipo IgG dirigidos hacia toxinas de origen animal, tales como toxinas de arañas, escorpiones, serpientes e incluso abejas son capaces no solo de reconocer a las toxinas contra los que están dirigidos, sino incluso a neutralizarlos. En el caso de anticuerpos generados contra toxinas de serpientes, algunos de estos anticuerpos son incluso capaces de reconocer proteínas que lleven a cabo actividades biológicas similares, tales como la mionecrosis o hemorragia (Laustsen et al., 2018). En el caso de este trabajo, mediante los ensayos de ELISA y *western-blot*, se observó un reconocimiento por parte de los anticuerpos generados a partir de la inmunización con la crotoxina subunidad B recombinante hacia la misma proteína, e incluso hacia la subunidad B nativa, hacia la subunidad B mutante y algunos otros venenos de vipéridos que poseen crotoxina en su composición, como es el caso de *C. mictlantecuhtli*. Este reconocimiento puede estar relacionado con el porcentaje de identidad que existe entre las secuencias, ya que tanto la secuencia de la subunidad B recombinante, subunidad B mutante y nativa de *C. tzabcan*, así como las secuencias de *C. mictlantecuhtli*, son semejantes en un 99 % en comparación con

la secuencia de *C. durissus terrificus*. Sin embargo, en el caso del reconocimiento hacia el veneno de *O. sphenophrys*, el *western-blot* parece no mostrar un reconocimiento de los anticuerpos hacia este veneno, el cual posee un homólogo de crotoxina, el cual tiene una identidad del 85 % comparada con la secuencia de *C. d. terrificus* (Neri-Castro et al., 2019).

El reconocimiento, además, puede estar asociado a la presencia de regiones conservadas dentro de las proteínas. En el caso de las fosfolipasas A₂, existen regiones conservadas dentro del grupo IIB, grupo al que pertenecen la crotoxina y otras fosfolipasas de vipéridos, hay regiones conservadas entre sí, tales como la región de unión a calcio, el cual está constituido por los residuos Tyr₂₈, Gly₃₀, Gly₃₂, Gly₃₃ y Asp₄₉ (de Paula et al., 2009). Esta región se encuentra conservada dentro de las secuencias de subunidades B recombinantes generadas, así como las secuencias de las crotoxinas presentes en los venenos, por lo que es factible suponer que podría haber un reconocimiento de los anticuerpos hacia esta misma región y alguna otra.

CONCLUSIONES

- La subunidad B recombinante en su estado plegado mostró ser un buen inmunógeno, capaz de generar anticuerpos neutralizantes.
- Los anticuerpos generados en conejo mostraron ser capaces de reconocer tanto a la crotoxina nativa como a la proteína mutante, así como a los homólogos de crotoxina presentes en el veneno de otras serpientes cascabeles, no así, a otras fosfolipasas no neurotóxicas.
- Hay una neutralización significativa hacia la actividad enzimática de la subunidad B nativa y sobre el veneno completo en estado *in vitro*.
- Hay una neutralización tanto de la toxina nativa como de veneno completo positivo a crotoxina en ensayos *in vivo*.

PERSPECTIVAS

- Retar los anticuerpos contra otros venenos positivos y negativos a homólogos de crotoxina tanto en ensayos de neutralización tanto *in vivo* como *in vitro*.
- Evaluar el reconocimiento de los anticuerpos contra otras fosfolipasas no neurotóxicas y su capacidad neutralizante.
- Evaluar la capacidad inmunogénica de la proteína mutante mediante su inmunización en conejos, para posteriormente realizar ensayos de inhibición con los anticuerpos generados.
- Determinar el tipo de plegamiento de la subunidad B recombinante mediante difracción circular.
- Purificar anticuerpos monoclonales a partir de la mezcla de policlonales ya existente, y evaluar la capacidad neutralizante de los mismos.
- Comparar la eficacia de la neutralización de los anticuerpos anti-subunidad B recombinante contra anticuerpos anti-subunidad B nativa, y antivenenos comerciales.

REFERENCIAS

- Abbas, A., & Litchman, A. (2006). Anticuerpos y Antígenos. En A. Abbas & A. Litchman (Eds.), *Inmunología celular y molecular* (5a ed.). Elsevier.
- Abbas, A., Litchman, A., & Pillai, S. (2017). Reconocimiento del antígeno en el sistema inmunitario adaptativo. En A. Abbas, A. Litchman, & S. Pillai (Eds.), *Inmunología básica. Funciones y trastornos del sistema inmunitario*. (5a ed.). Elsevier España.
- Adorini, L. (1998). Inmunodominance. En P. Delves (Ed.), *Encyclopédia of immunology* (2a ed.). Elsevier.
- Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M., & Calvete, J. J. (2008). Snake venomics of the lancehead pitviper bothrops asper. Geographic, individual, and ontogenetic variations. *Journal of Proteome Research*, 7(8), 3556–3571. <https://doi.org/10.1021/pr800332p>
- Amazonas, D. R., Portes-Junior, J. A., Nishiyama-Jr, M. Y., Nicolau, C. A., Chalkidis, H. M., Mourão, R. H. V., Graziotin, F. G., Rokyta, D. R., Gibbs, H. L., Valente, R. H., Junqueira-de-Azevedo, I. L. M., & Moura-da-Silva, A. M. (2018). Molecular mechanisms underlying intraspecific variation in snake venom. *Journal of Proteomics*, 181, 60–72. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2018.03.032>
- Beghini, D. G., Da Cruz-Höfling, M. A., Randazzo-Moura, P., Rodrigues-Simioni, L., Novello, J. C., Hyslop, S., & Marangoni, S. (2005). Cross-neutralization of the neurotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararacussu* venoms by antisera against crotoxin and phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon*, 46(6), 604–611. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2005.06.018>
- Beghini, D. G., Hernandez-Oliveira, S., Rodrigues-Simioni, L., Novello, J. C., Hyslop, S., & Marangoni, S. (2004). Anti-sera raised in rabbits against crotoxin and phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* venom neutralize the neurotoxicity of the venom and crotoxin. *Toxicon*, 44(2), 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.05.011>
- Boda, F. A., Salamon, P., Orbán, C., Berta, L., Curticăpean, A., Gâz, Șerban A., & Dogaru, M. (2018). Heterologous expression and purification of recombinant crotoxin B, the

- phospholipase A2 subunit of crotoxin. *Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia*, 63(1), 7–20. <https://doi.org/10.24193/subbchem.2018.1.01>
- Bulaj, G. (2005). Formation of disulfure bons ins proteins and peptides. *Biotechnology Advances*, 23, 87-92. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.09.002>
- Calvete, J., Juárez, P., & Sanz, L. (2010). Snake venomics and desintegrins. Portrait and evolution of a family of snake venom integrin antagonist. En S. P. Mackessy (Ed.), *Handbook of venoms and toxins of reptiles*. CRC Press.
- Cameron, D. L., & Tu, A. T. (1978). Chemical and functional homology of myotoxin a from prairie rattlesnake venom and crotamine from south american rattlesnake venom. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 532(1), 147–154. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(78\)90457-9](https://doi.org/10.1016/0005-2795(78)90457-9)
- Campell, J., & Lamar, W. (2004). *The venomous reptiles of the western hemisphere, Vol. I*. Cornell University Press.
- Casewell, N., Sunagar, K., Takacs, Z., Calvete, J., Jackson, T., & Fry, B. (2015). Snake venom metalloproteinase enzymes. En Bryan Fry (Ed.), *Venomous reptiles and their toxins. Evolution, pathophysiology and biodiscovery*. Oxford University Press.
- Castro, E. N., Lomonte, B., del Carmen Gutiérrez, M., Alagón, A., & Gutiérrez, J. M. (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>
- Chippaux, J. P., & Goyffon, M. (1998). Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon*, 36(6), 823–846. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(97\)00160-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(97)00160-8)
- Chippaux, J. P., Williams, V., & White, J. (1991). Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, 29(11), 1279–1303. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90116-9](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90116-9)
- Choumet, V., Faure, G., Robbe-Vincent, A., Saliou, B., Mazié, J. C., & Bon, C. (1992). Immunochemical analysis of a snake venom phospholipase A2 neurotoxin, crotoxin,

- with monoclonal antibodies. *Molecular Immunology*, 29(7–8), 871–882. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(92\)90125-H](https://doi.org/10.1016/0161-5890(92)90125-H)
- Choumet, Valérie, Jiang, M. S., Radvanyi, F., Ownby, C., & Bon, C. (1989). Neutralization of lethal potency and inhibition of enzymatic activity of a phospholipase A2 neurotoxin, crotoxin, by non-precipitating antibodies (Fab). *FEBS Letters*, 244(1), 167–173. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81185-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81185-8)
- Choumet, Valérie, Jiang, M. S., Specker, I., & Bon, C. (1991). Immunochemical cross-reactivity of two phospholipase A2 neurotoxins, agkistrodotoxin and crotoxin. *Toxicon*, 29(4–5), 441–451. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90018-M](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90018-M)
- Chulasugandha, P. (2003). Snake antivenoms: Heterologous and polyclonal antisera. *Journal of Toxicology - Toxin Reviews*, 22(1), 1–14. <https://doi.org/10.1081/TXR-120019561>
- Clement, H., Corzo, G., Neri-Castro, E., Arenas, I., Hajos, S., de Roodt, A. R., & Villegas, E. (2019). cDNA cloning, heterologous expression, protein folding and immunogenic properties of a phospholipase A2 from *Bothrops ammodytoides* venom. *Protein Expression and Purification*, 154, 33–43. <https://doi.org/10.1016/J.PEP.2018.09.004>
- Coronado, M. A., Gabdulkhakov, A., Georgieva, D., Sankaran, B., Murakami, M. T., Arni, R. K., & Betzel, C. (2013). Structure of the polypeptide crotoxin from the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 69(10), 1958–1964. <https://doi.org/10.1107/S0907444913018003>
- De Oliveira, U. C., Assui, A., Da Silva, Á. R. D. B. P., De Oliveira, J. S., & Ho, P. L. (2003). Cloning and characterization of a basic phospholipase A2 homologue from *Micrurus corallinus* (coral snake) venom gland. *Toxicon*, 42(3), 249–255. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00139-9](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00139-9)
- de Paula, R., Castro, H., Rodrigues, C., Melo, P., & Fuly, A. (2009). Structural and Pharmacological Features of Phospholipases A2 from Snake Venoms. *Protein & Peptide Letters*, 16(8), 899–907. <https://doi.org/10.2174/092986609788923365>
- Dennis, E. A. (1997). History, Classification, Structure and Function of Phospholipase A2. *Toxicon*, 24, 1–7.

- Doley, R., & Kini, R. M. (2009). Protein complexes in snake venom. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(17), 2851–2871. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0050-2>
- Doley, R., Zhou, X., & Manjunathe, R. (2010). Snake venom phospholipase A2 enzymes. En S. P. Mackessy (Ed.), *Handbook of venoms and toxins of reptiles*. CRC Press.
- Durban, J., Sanz, L., Trevisan-Silva, D., Neri-Castro, E., Alagón, A., & Calvete, J. J. (2017). Integrated Venomics 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>
- Epidemiológica, S. N. de V. (2014). CENA VECE.
- Fathi-Roudsari, M., Akhavian-Tehrani, A. & Maghsoudi, N. (2016). Comparison of Three *Escherichia coli* Strains in Recombinant Production of Reteplase. *Journal of MEDical Biotechnology*, 8, 16-22.
- Faure, G., Xu, H., & Saul, F. A. (2011). Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric β -neurotoxin. *Journal of Molecular Biology*, 412(2), 176–191. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.07.027>
- Fernandes, C. A. H., Pazin, W. M., Dreyer, T. R., Bicev, R. N., Cavalcante, W. L. G., Fortes-Dias, C. L., Ito, A. S., Oliveira, C. L. P., Fernandez, R. M., & Fontes, M. R. M. (2017). Biophysical studies suggest a new structural arrangement of crotoxin and provide insights into its toxic mechanism. *Scientific Reports*, 7(January), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep43885>
- Fernández–badillo, L., Zuria, I., Sigala–rodríguez, J., Sánchez–rojas, G., & Castañeda–gaytán, G. (2021). Review of the human–snake conflict in Mexico: Origin, mitigation and perspectives. *Animal Biodiversity and Conservation*, 44(2), 153–174. <https://doi.org/10.32800/abc.2021.44.0153>
- Fonseca, R. G., Ferreira, T. L., & Ward, R. J. (2009). Refolding and purification of the human secreted group IID phospholipase A2 expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 67(2), 82–87.

<https://doi.org/10.1016/J.PEP.2009.04.006>

- Fusco, L. S., Rodríguez, J. P., Teibler, P., Maruñak, S., Acosta, O., & Leiva, L. (2015). New immunization protocol to produce crotalic antivenom combining *Crotalus durissus terrificus* venom and its PLA2. *Biologicals*, 43(1), 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2014.09.001>
- Giuliani, C. D., Iemma, M. R. C., Bondioli, A. C. V., Souza, D. H. F., Ferreira, L. L., Amaral, A. C., Salvini, T. F., & Selistre-de-Araujo, H. S. (2001). Expression of an active recombinant lysine 49 phospholipase A2 myotoxin as a fusion protein in bacteria. *Toxicon*, 39(10), 1595–1600. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00142-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00142-8)
- Gloyd, H. K. (1940). *The Rattlesnakes, Genera Sistrurus and Crotalus: A Study in Zoogeography and Evolution*. The Chicago Academy of Science.
- Gómez-Betancur, I., Gogineni, V., Salazar-Ospina, A., & León, F. (2019). Perspective on the therapeutics of anti-snake venom. *Molecules*, 24(18), 1–29. <https://doi.org/10.3390/molecules24183276>
- Gutierrez, J. M., Rucavado, A., & Escalante, T. (2010). Snake venom metalloproteinases. Biological roles and participation in the pathophysiology of envenomation. En S. P. Mackessy (Ed.), *Handbook of venoms and toxins of reptiles*. CRC Press.
- Hartl, F. & Hayer-Hartl, M. (2009). Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(6), 574–581. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1591>
- Hendon, R. A., & Fraenkel-Conrat, H. (1971). Biological roles of the two components of crotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(7), 1560–1563. <https://doi.org/10.1073/PNAS.68.7.1560>
- Hock, C., & Hong, N. (2017). Toxinology of snake venoms: The Malaysian context. En P. Gopalakrishnakone (Ed.), *Snake venoms*. Springer.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. (2001a). Antigen Recognition by B-cell and T-cell Receptors. Antigen recognition by T cells. En C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport, & M. Shlomchik (Eds.), *Immunobiology: The Immune System in*

Health and Disease (3a ed.). Garland Science.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27098/>

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. (2001b). Antigen Recognition by B-cell and T-cell Receptors. The interaction of the antibody molecule with specific antigen. En C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport, & M. Shlomchik (Eds.), *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* (5a ed.). Garland Science.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27160/>

Jayanthi, G. P., & Veerabasappa Gowda, T. (1988). Geographical variation in India in the composition and lethal potency of Russell's viper (*Vipera russelli*) venom. *Toxicon*, 26(3), 257–264. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90216-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90216-4)

Kaiser, I. I., Middlebrook, J. L., Crumrine, M. H., & Stevenson, W. W. (1986). Cross-reactivity and neutralization by rabbit antisera raised against crotoxin, its subunits and two related toxins. *Toxicon*, 24(7), 669–678. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(86\)90030-9](https://doi.org/10.1016/0041-0101(86)90030-9)

Kerkis, A., Kerkis, I., Rádis-Baptista, G., Oliveira, E. B., Vianna-Morgante, A. M., Pereira, L. V., & Yamane, T. (2004). Crotamine is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *The FASEB Journal*, 18(12), 1407–1409. <https://doi.org/10.1096/fj.03-1459fje>

Kindt, T., Goldsby, R., & Osborne, B. (2007). Antígenos y anticuerpos. En T. Kindt, R. Goldsby, & B. Osborne (Eds.), *Inmunología de Kuby* (6a ed.). McGraw-Hill Interamericana.

Kini, R. M. (2003). Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon*, 42(8), 827–840.
<https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2003.11.002>

Laloo, D. G., & Theakston, R. D. G. (2003). Snake antivenoms. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology*, 41(3), 277–290. <https://doi.org/10.1081/CLT-120021113>

Laustsen, A. H., María Gutiérrez, J., Knudsen, C., Johansen, K. H., Bermúdez-Méndez, E., Cerni, F. A., Jürgensen, J. A., Ledsgaard, L., Martos-Esteban, A., Øhlenschläger, M.,

- Pus, U., Andersen, M. R., Lomonte, B., Engmark, M., & Pucca, M. B. (2018). Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development. *Toxicon*, 146, 151–175. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.03.004>
- Lemos, J., Smith, H., Dixon, J., & Cruz, A. (2015). *Anfibios y reptiles de Sonora, Chihuahua y Coahuila, México. Tomo I. CONABIO.*
- León, G., Vargas, M., Segura, Á., Herrera, M., Villalta, M., Sánchez, A., Solano, G., Gómez, A., Sánchez, M., Estrada, R., & Gutiérrez, J. M. (2018). Current technology for the industrial manufacture of snake antivenoms. *Toxicon*, 151(May), 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.06.084>
- Mahanty, S., Prigent, A., & Garraud, O. (2015). Immunogenicity of infectious pathogens and vaccine antigens. *BMC Immunology*, 16(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/S12865-015-0095-Y/METRICS>
- Matsui, T., Fujimura, Y., & Titani, K. (2000). Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1477(1–2), 146–156. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00268-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00268-X)
- Méndez de la Cruz, F., Díaz de la Vega, A., & Jiménez, V. (2009). Herpetofauna. En A. Lot & Z. Cano (Eds.), *Biodiversidad del ecosistema del Pedregal de San Angel*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Molina Molina, D. A., Guerra-Duarte, C., Costal-Oliveira, F., Almeida Rocha, E., Rego Rodrigues, C., Machado-de-Ávila, R. A., Soccol, V. T., & Chávez-Olórtegui, C. (2020). Engineered protein containing crotoxin epitopes induces neutralizing antibodies in immunized rabbits. *Molecular Immunology*, 119(December 2019), 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.01.012>
- Mukherjee, A. K. (2020). Species-specific and geographical variation in venom composition of two major cobras in Indian subcontinent: Impact on polyvalent antivenom therapy. *Toxicon*, 188, 150–158. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2020.10.024>
- Neri-Castro, E., Hernández-Dávila, A., Olvera-Rodríguez, A., Cardoso-Torres, H., Bénard-

- Valle, M., Bastiaans, E., López-Gutiérrez, O. & Alagón, A. (2019). Detection and quantification of a β -neurotoxin (crotoxin homologs) in the venom of the rattlesnakes *Crotalus simus*, *C. culminatus* and *C. tzabcan* from México. *Toxicon*: X, 2. <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2019.100007>
- Neri-Castro, E., Lomonte, B., Valdés, M., Ponce-López, R., Bénard-Valle, M., Borja, M., Strickland, J. L., Jones, J. M., Grünwald, C., Zamudio, F., & Alagón, A. (2019). Venom characterization of the three species of *Ophryacus* and proteomic profiling of *O. sphenophrys* unveils Sphenotoxin, a novel Crotoxin-like heterodimeric β -neurotoxin. *Journal of Proteomics*, 192, 196–207. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2018.09.002>
- Oguiura, N., Collares, M. A., Furtado, M. F. D., Ferrarezzi, H., & Suzuki, H. (2009). Intraspecific variation of the crotoamine and crotoasin genes in *Crotalus durissus* rattlesnakes. *Gene*, 446(1), 35–40. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2009.05.015>
- Oshima-Franco, Y., Hyslop, S., Prado-Franceschi, J., Cruz-Höfling, M. A., & Rodrigues-Simioni, L. (1999). Neutralizing capacity of antisera raised in horses and rabbits against *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and its main toxin, crotoxin. *Toxicon*, 37(10), 1341–1357. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00246-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00246-3)
- Peterson, M. E. (2006). Snake Bite: Pit Vipers. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 21(4), 174–182. <https://doi.org/10.1053/J.CTSAP.2006.10.008>
- Pucca, M. B., Cerni, F. A., Janke, R., Bermúdez-Méndez, E., Ledsgaard, L., Barbosa, J. E., & Laustsen, A. H. (2019). History of envenoming therapy and current perspectives. *Frontiers in Immunology*, 10(JULY), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01598>
- Radis-Baptista, G., & Kerkis, I. (2012). Crotoamine, a Small Basic Polypeptide Myotoxin from Rattlesnake Venom with Cell-Penetrating Properties. *Current Pharmaceutical Design*, 17(38), 4351–4361. <https://doi.org/10.2174/138161211798999429>
- Rangel-Santos, A., Dos-Santos, E. C., Lopes-Ferreira, M., Lima, C., Cardoso, D. F., & Mota, I. (2004). A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. *Toxicon*, 43(7), 801–810.

<https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2004.03.011>

- Russo, R. R., dos Santos Júnior, N. N., Cintra, A. C. O., Figueiredo, L. T. M., Sampaio, S. V., & Aquino, V. H. (2019). Expression, purification and virucidal activity of two recombinant isoforms of phospholipase A 2 from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Archives of Virology*, 164(4), 1159–1171. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04172-6>
- Sánchez, E. E., Lopez-Johnston, J. C., Rodríguez-Acosta, A., & Pérez, J. C. (2008). Neutralization of two North American coral snake venoms with United States and Mexican antivenoms. *Toxicon*, 51(2), 297–303. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2007.10.004>
- Segura, Á., Herrera, M., Reta Mares, F., Jaime, C., Sánchez, A., Vargas, M., Villalta, M., Gómez, A., Gutiérrez, J. M., & 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>
- Selistre-de-Araujo, H. S., Pontes, C. L. S., Montenegro, C. F., & Martin, A. C. B. M. (2010). Snake Venom Disintegrins and Cell Migration. *Toxins*, 2(11), 2606–2621. <https://doi.org/10.3390/toxins2112606>
- Singh, R. (2015). Medicinal plants : A review. *Journal of Plant Sciences*, 3(1–1), 50–55.
- Siria Hernández, C. G., & Arellano Bravo, A. (2009). Mordeduras por serpiente venenosa: Panorama epidemiológico en México. *Salud Publica de Mexico*, 51(2), 95–96. <https://doi.org/10.1590/s0036-36342009000200002>
- Slotta, K. & Fraenkel-Conrat, H. (1938). Two active proteins from Rattlesnake venom. *Nature*, 142, 213. <https://doi.org/10.1038/142213a0>
- Soares, A. M., Mancin, A. C., Cecchini, A. L., Arantes, E. C., França, S. C., Gutiérrez, J. M., & Giglio, J. R. (2001). Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A2 subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom,

- on its enzymatic and pharmacological activities. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33(9), 877–888. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(01\)00065-6](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(01)00065-6)
- Su, M. J., & Chang, C. C. (1984). Presynaptic effects of snake venom toxins which have phospholipase A2 activity (β -bungarotoxin, taipoxin, crotoxin). *Toxicon*, 22(4), 631–640. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(84\)90003-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(84)90003-5)
- Sunugar, K., Tai, L., Lomonte, B., Jackson, T., & Fry, B. . (2015). Group II phospholipases A2 enzymes. En B. Fry (Ed.), *Venomous reptiles and their toxins. Evolution, pathophysiology and biodiscovery*. Oxford University Press.
- Uetz, P. (s/f). The reptile database. <http://www.reptile-database.org/>
- Valencia, A. (2006). Taxonomía y distribución del género *Crotalus* (Linneo, 1758) en el estado de Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Valledor, A. (1994). *Envenenamiento por animales: animales venenosos y urticantes del mundo*. Ediciones Díaz de Santos.
- Ward, R. J., De Oliveira, A. H. C., Bortoleto, R. K., Rosa, J. C., Faça, V. M., & Greene, L. J. (2001). Refolding and Purification of Bothropstoxin-I, a Lys49–Phospholipase A2 Homologue, Expressed as Inclusion Bodies in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 21(1), 134–140. <https://doi.org/10.1006/PREP.2000.1353>
- Weinstein, S. A., & Smith, L. A. (1990). Preliminary fractionation of tiger rattlesnake (*Crotalus tigris*) venom. *Toxicon*, 28(12), 1447–1455. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(90\)90158-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(90)90158-4)
- Weinsterin, S., Smith, T., & Karding, K. (2010). Reptile venom glands. Forms, function, and future. En S. P. Mackessy (Ed.), *Handbook of venoms and toxins of reptiles*. CRC Press.
- Xiong, S., Wang, Y., Ren, X., Li, B., Zhang, M., Luo, Y., Zhang, L., Xie, Q., & Su, K. (2005). Solubility of disulfide-bonded proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* and its "oxidizing" mutant. *World J Gastroenterol*, 11 (7), 1077-1082. <http://doi.org/10.3748/wjg.v11.i7.1077>.

- Yang, W. L., Peng, L. S., Zhong, X. F., Wei, J. W., Jiang, X. Y., Ye, L. T., Zou, L., Tu, H. Bin, Wu, W. Y., & Xu, A. L. (2003). Functional expression and characterization of a recombinant phospholipase A2 from sea snake *Lapemis hardwickii* as a soluble protein in *E. coli*. *Toxicon*, 41(6), 713–721. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00047-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00047-3)
- Yu, C., Yu, H., & Li, P. (2020). Highlights of animal venom research on the geographical variations of toxin components, toxicities and envenomation therapy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2994–3006. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.10.190>

ANEXOS

Transformación de células

Añadir 2 μL de plásmido a 100 μL de células *origami* e incubar durante 30 minutos en frío (usar hielo). Una vez transcurrido el tiempo dar *shock* térmico a 42 °C durante 30 segundos e incubar durante 5 minutos en frío. Añadir 220 μL de medio SoC a la mezcla e incubar durante una hora a 37 °C. Plaquear 50 o 100 μL en medio solido LB.

Construcción de la subunidad B mutante

Para generar la secuencia de la subunidad B con los cambios en residuos aminoacídicos específicos, se sintetizaron dos oligonucleótidos de 22 y 24 nucleótidos de longitud, denominados *Crotox-Rev* y *Crotox-Dir* respectivamente, y con las siguientes secuencias:

Crotox-Dir CCT GGT GCA AGG AAC AGA TTT G
Crotox-Rev CAC TTG GTC AGT TTT TCG TAA CAG

Con estos oligonucleótidos se realizó la construcción de los *megaprimer* 1 y 2 (MP1 y MP2), los cuáles se utilizaron para el ensamble de la proteína mutante. Los oligonucleótidos *Crotox-Rev* y *pQE-Frw* fueron utilizados para la elaboración del MP1, utilizando como templado la secuencia de la subunidad B nativa, para ello se realizan dos PCR, la primera para generar el MP1, y la segunda para la generación de la secuencia con los dos primeros cambios deseados. Las condiciones de reactivos para los PCR son las siguiente:

MP1		Mutante con dos cambios	
Reactivo	Cantidad μL	Reactivo	Cantidad μL
<i>Buffer thermol 10X</i>	10	<i>Buffer thermol 10X</i>	10
dNTPS	4	dNTPS	4
<i>pQE-30-Fwr</i>	2 (10 pmol/ μL)	<i>MP1-Dir</i>	2 (10 pmol/ μL)
<i>Crotox-Rev</i>	2 (10 pmol/ μL)	<i>pQE-30-Rev</i>	2 (10 pmol/ μL)
<i>Crotoxina-pQE-30</i>	1	<i>Crotoxina-pQE-30</i>	1
<i>Vent polimeraza</i>	1	<i>Vent polimeraza</i>	1
Agua	10	Agua	80

Las condiciones de PCR para los procesos anteriores fueron las siguientes:

MP1			Mutante con dos cambios		
Etapa	Ciclos	T °C	Etapa	Ciclos	T °C
1	1	94	1	1	94
2	30	94, 56 y 72	2	30	94, 57 y 72
3	2	72 y 4	3	2	72 y 4

Los productos resultantes de las PCR fueron purificados con el *Kit* de purificación de productos de PCR *Roche*®.

Una vez obtenía la secuencia con los cambios, esta fue utilizada como templado en la generación del tercer cambio deseado, haciendo uso del oligonucleótido PLA2-pQE30-*Fwr* y el M2, el cual se elaboró previamente con los oligonucleótidos pQE30-*Rev* y Crotox-*Dir*, utilizando como templado la secuencia de subunidad B con los dos cambios. Las condiciones de reactivos y ciclos para las PCR fueron las siguientes:

MP2		Mutante con tres cambios	
Reactivo	Cantidad μL	Reactivo	Cantidad μL
<i>Buffer thermol 10X</i>	10	<i>Buffer thermol 10X</i>	10
dNTPS	4	dNTPS	8
Crotox- <i>Dir</i>	2 (10 pmol/μL)	PLA2-pQE30- <i>Dir</i>	2 (10 pmol/μL)
pQE-30- <i>Rev</i>	2 (10 pmol/μL)	MP2- <i>Rev</i>	2 (10 pmol/μL)
Crotoxina/mutante- pQE-30	1	Crotoxina/mutante- pQE-30	1
<i>Vent</i> polimeraza	1	<i>Vent</i> polimeraza	1
Agua	10	Agua	80

MP2			Mutante con tres cambios		
Etapa	Ciclos	T °C	Etapa	Ciclos	T °C
1	1	94	1	1	94
2	30	94, 55 y 72	2	30	94, 58 y 72
3	2	72 y 4	3	2	72 y 4

Los productos resultantes de las PCR fueron purificados con el *Kit* de purificación de productos de PCR Roche®.

Expresión de la subunidad B recombinante y mutante

Sembrar en una caja de Petri con medio sólido LB con ampicilina e incubar a 37 °C durante toda la noche. Tomar una muestra de la caja con asa y sembrar en 50 mL de medio líquido LB e incubar en agitación durante 16 horas. Transferir el inóculo a 1 L de medio líquido LB con ampicilina e incubar durante 2 a 3 h a 37 °C. Medir la concentración a 600 nm en espectrofotómetro e inducir una vez alcanzado un valor de 0.6 con IPTG 1 mM disuelto en agua estéril. Dejar en crecimiento durante 18 horas a 37 °C en agitación a 180 rpm.

Obtención de las proteínas en cuerpos de inclusión.

Centrifugar el cultivo durante 25 minutos a 8,000 rpm en rotor JA-10, desechar la fracción soluble y resuspender el concentrado celular en Tris-HCl 50 mM pH 8.0. Romper las células en prensa de Fench a 35 kpsi, pasando la muestra dos ocasiones. Posteriormente centrifugar la muestra durante 20 minutos a 12,000 rpm en rotor JA-20, separar la fracción soluble de la fracción no soluble, y esta última se solubiliza en Tris-HCl 50 mM pH 8.0 + ClGnd 6 M durante 24 horas. Finalmente se centrifuga la muestra durante 10 minutos a 14,000 rpm.

Cromatografía de afinidad a níquel

Se limpia la columna de afinidad a níquel pasando 4 volúmenes de agua. Posteriormente se equilibra con 5 volúmenes de resina de *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 8.0 + ClGnd 6M, antes de añadir la muestra en dos ocasiones. Se realiza un primer con 3 volúmenes de *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 8.0 + ClGnd 6M, recuperando una alícuota de 15 mL, y un segundo lavado con 3 volúmenes de *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 8.0 + ClGnd 6M + 40 mM de imidazol, recuperando una alícuota de 15 mL. Finalmente, se la elución se realiza con 4 volúmenes con *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 8.0 + ClGnd 6M + 40 mM de imidazol, recuperando 10 alícuotas de 2 mL cada una.

Una vez recuperada la muestra, se lava la columna con 5 volúmenes de agua desionizada y 3 volúmenes de etanol al 20%. La columna se almacena con etanol 20% y se guarda a 4 °C.

Plegamiento in vitro

Para hacer que la proteína adquiriera una estructura tridimensional similar o idéntica a la nativa, se colocó 1 mg de proteína en *buffer* de plegamiento (Tris-HCl 50 mM, ClGnd 2M, CaCl₂ 1 mM, cistina-cisteína 1:8, pH 6.0) durante 48 horas en agitación constante a 400 rpm.

Precipitación de muestras para análisis en geles SDS-PAGE.

Se toman 50 µL de muestra a las cuales se les añade 200 µL de metano, 50 µL de cloroformo y 150 µL de agua desionizada. Se centrifuga a 14,000 rpm durante 1:30 minutos y se retira la fase superior. Se añaden 200 µL de metanol y se centrifuga a 14,000 rpm durante 5 minutos, y se retira la fase soluble. Se seca la pastilla a 37 °C durante 20 minutos.

Geles SDS-PAGE

Se realiza un gel separador al 15% con 3 mL de solución Acrilamida-bisacrilamida (30% acrilamida, 0.8% bis-acrilamida), 1.5 mL gel separador (1.5 M Tris + 0.4% SDS) 1.5 mL de agua desionizada, 5 µL de TEMED y 20 µL de persulfato de amonio al 10%, dejando polimerizar a temperatura ambiente. Una vez polimerizado, en la parte superior se carga el gel concentrador al 4% constituido por 0.33 mL de solución acrilamida-bisacrilamida (30% acrilamida, 0.8% bis-acrilamida), 0.63 mL de gel concentrador (0.5 M Tris + 0.4% SDS), 1.54 mL de agua desionizada, 2.5 µL de TEMED y 12.5 µL de persulfato de amonio al 10%, se colocarán los peines para la carga de muestra y se dejara polimerizar a temperatura ambiente. El gel se coloca en una cámara de electroforesis la cual se llena con *Tank buffer* (0.25M Tris, 0.19 M Glicina, 0.1% SDS) hasta cubrir el gel; Se cargan las muestras las cuales son preparadas en un volumen de 10 µL de agua desionizada + 2 µL de *buffer* desnaturalizante (10% glicerol, 2.5% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 6.5, 5% 2-β-mercaptoetanol y 0.02% azul de bromofenol) y hervidas durante 5 minutos. Se conecta la cámara a corriente en una fuente de poder *BIORAD® PowerPac Basic*, y se corre el gel durante 30 minutos a 70 V y posteriormente a 120 V durante 40 minutos. Posteriormente se coloca el gel en solución de tinción (50% metanol, 10% ácido acético glacial, 0.2% azul brillante de Coomassie) en agitación durante 40 minutos. Ya teñido se procederá a la desteñir con solución (50% metanol, 10% ácido acético glacial) durante 40 minutos en agitación constante.

Precipitación de inmunoglobulinas a partir de plasma

El suero de ambos conejos se disuelve en el mismo volumen de agua destilada (Ej. 5 mL de suero + 5 mL de agua), se ajusta el pH a un valor de 5 con ácido acético 3N en agitación constante. Se añade ácido caprílico para obtener una concentración final de 4% (V/V). Se mantiene en agitación hasta observar la precipitación de albumina. Centrifugar por 10 minutos a 14,000 rpm. Las IgG e IgG (T)s se encuentran en el sobrenadante, el cual es dializado con 4 cambios de PBS. Se mide la concentración mediante absorbancia a 280 nm en un equipo *Thermo Scientific® BioMate 3S*, y finalmente se elaboran alícuotas de 50 mg cada una, se liofilizan durante 48 h en un equipo *LABCONCO® FreeZone 2.5* y almacenan a 4°C.

Ensayo por Inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

Sensibilizar placas de 96 pozos con 100 µL de muestra (veneno completo o proteínas purificadas) a una concentración de 5 µg/mL reconstituidos en *buffer* de carbonato de sodio 0.1 M pH 9.5 hasta la columna 11, incubando durante dos horas a 37°C. Posteriormente se lavan los pozos con 200 µL/pozo de *buffer* de lavado (50 mM Tris-HCl pH 8.0 + 150 mM NaCl + 0.05% Tween 20), continuando con el bloqueo de los pozos, añadiendo 150 µL/pozo de solución de bloqueo (50 mM Tris-HCl pH 8.0 + 0.5 % gelatina + 0.2% Tween 20) e incubando durante dos horas a 37° C. Se hace un segundo lavado para añadir el primer anticuerpo (suero o anticuerpos purificados) en la columna 1 en un volumen de 150 µL/pozo re suspendida en *buffer* de reacción (50 mM Tris-HCl pH 8.0 + 500 mM NaCl + 0.1 mg/mL Gelatina + 0.05% Tween 20). En las columnas 2 a 12 se añaden 100 µL/pozo de solución de reacción, y se hacen diluciones seriadas en proporción 1:3 hasta la columna 10, dejando las columnas 11 y 12 como controles. Se incuba durante 1 h a 37 °C para nuevamente lavar. Se incuba una hora con 100 µL de segundo anticuerpo (anti-conejo conjugado a la enzima peroxidasa) en una dilución 1:1000 en *buffer* de reacción. Finalmente, se lava y rebela con 100 µL/pozo de solución de ABTS (0.1 M. ácido cítrico anhidrido + 0.2M NaHPO₄*7H₂O), incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos y se lee absorbancia en lector de Elisa *Sunrise® Tecan* a 405 nm. Los resultados son analizados en el programa *GraphPad Prism 8.0.1*.

Western-Blot semi-seco

Se realiza un gel SDS-PAGE al 15% en condiciones reductoras, el cual se colocará en una cámara semi-seca entre papeles filtro con el siguiente orden: papel filtro, gel, membrana de nitrocelulosa y finalmente papel filtro. Se añade *buffer* de transferencia (39 mM glicina, 48 mM Tris-base, 0.037% SDS y 20% metanol), se tapa la cámara y se colocará a corriente constante a 400 mAmps durante una hora. Una vez transcurrido ese tiempo, se saca la membrana de la cámara y se bloquea con *buffer* de bloqueo (TBST 1X + leche al 5%) durante dos horas en constante agitación. Se realizan 3 lavados con TBST y se incuba con un primer anticuerpo (anti-crotoxina) a una concentración de 1 µg/mL en *buffer* TBST durante una hora en constante agitación. Se realizan 3 lavados y se incuba el segundo anticuerpo (anti-conejo acoplado a fosfatasa) en TBST en una dilución 1:1000 durante una hora en agitación. Se realiza un tercer lavado y se revela con BCIP y NBT 1.

Ensayo de actividad de fosfolipasa sobre yema de huevo en placa de agarosa

Se hace un *buffer* constituido por yema de huevo al 10 % en *buffer* estándar (Tris-HCl 1M pH 7.5, CaCl₂ 30mM, Tritón X-100) en un volumen final de 50 mL. Posterior a eso se toman 2 mL de la solución de yema de huevo, a la cual se le integrarán 100 µL de Tritón X-100, 8 mL de Rodamina 6G 0.1%, 1 mL CaCl₂ 20 mM y 0.1g de agarosa en 10 mL Tris-HCl 0.2 M. La mezcla se mantiene en agitación y finalmente se vierte en una placa de Petri de 100 x 15 mm. Se deja polimerizar a temperatura ambiente, para posteriormente realizar pozos. Las muestras son preparadas en distintas concentraciones a un volumen final de 10 µL, los cuales se colocan en los pozos realizados. Se incuba durante una hora a 37 °C, y se miden los halos obtenidos utilizando luz U.V. y un vernier.

Ensayo titulométrico de actividad de fosfolipasa sobre yema de huevo.

Se prepara una solución estándar constituida por 0.1 M de NaCl, 0.01M CaCl₂ y Tritón X-100. Una vez realizada, se pesa la yema de huevo y se afora con la solución estándar hasta el 10 %., de agita durante 10 min y se centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos, rescatando el sobrenadante. Se toman 500 µL de la solución de yema de huevo y se mantiene en agitación constante bajo un ligero burbujeo de nitrógeno. Se lleva la solución a un pH de 8.05 con

NaOH 50 mM, para posteriormente añadir la muestra un volumen de 10 μ L. Cuando el pH llega a 7.99, se añaden de 1 a 5 μ L de NaOH 50 mM para recuperar el pH superior a 8.0. Se mide el tiempo transcurrido desde la adición del NaOH hasta que el pH vuelva a bajar a 7.99 durante 6 ocasiones. El ensayo se realiza por triplicado.

Esquema de inmunización

Se realizó la inoculación subdérmica de concentraciones crecientes de subunidad B recombinante (plegada), la cual se inóculo con distintos adyuvantes, como el adyuvante incompleto de Freud o Alum.

Inmunización	Día	Inmunógeno por conejo (μg)	Total (μg)	Volumen final con PBS (mL)	Adyuvante	Volumen final (mL)
1	0	20	40	1.5	IFA	3
2	7	20	40	1.5	ALUM	3
3	14	40	80	1.5	IFA	3
4	21	40	80	1.5	ALUM	3
5	28	80	160	1.5	IFA	3
6	35	80	160	1.5	ALUM	3
7	42	160	320	1.5	-	3
8	49	160	320	1.5	IFA	3
9	56	320	640	1.5	ALUM	3
10	64	320	640	1.5	-	3
11	70	640	1280	1.5	IFA	3
12	77	640	1280	1.5	ALUM	3
13	84	640	1280	1.5	IFA	3
14	91	640	1280	1.5	-	3
15	98	640	1280	1.5	ALUM	3
16	105	640	1280	1.5	ALUM	3
17	112	640	1280	1.5	IFA	3
18	119	640	1280	1.5	-	3
19	126	640	1280	1.5	ALUM	3
20	133	640	1280	1.5	ALUM	3

μ g microgramos

mL mililitros

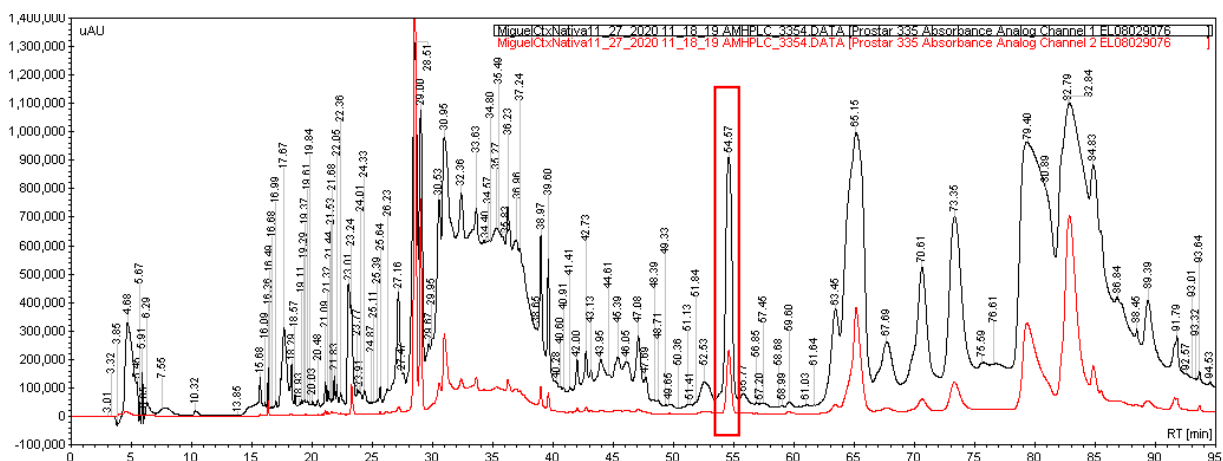
IFA Adyuvante incompleto de Freud

ALUM Hidróxido de aluminio

- No se administró adyuvante

Purificación de subunidad B nativa a partir de veneno completo.

Se inyecta 1 o 1.5 mg de veneno de *Crotalus tzabcan* en un volumen de 1 mL, el cual es eluido en un sistema HPLC en un gradiente de 0 a 100% de solvente B (acetonitrilo + 0.1% TFA) durante 90 minutos bajo el siguiente protocolo: 0% por 5 minutos, 0-15% por 10 minutos, 15-45% durante 60 minutos, 45-70% durante 10 minutos, y finalmente 70-100% durante 9 minutos, utilizando una columna *Supelco® Discovery® C18* (25 cm x 4.6 mm, 5 µm) a un flujo de 1 mL por minuto. Posteriormente la muestra es liofilizada y almacenada hasta su uso.



Perfil de elución de veneno completo de *C. tzabcan*, utilizando el protocolo antes mencionado, en donde la marca roja indica el tiempo de elución de la subunidad B de la crotoxina, a un tiempo de 54.5 minutos y 35% de solución B (Acetonitrilo + 0.01% TFA).