



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN DE LA SPHENOTOXINA DE *OPHRYACUS SPHENOPHRYS* Y
SU COMPARACIÓN CON LA CROTOXINA CLÁSICA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
Tania Corkidi Zajur

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Alejandro Alagón Cano
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Enrique Rudiño Piñera
Instituto de Biotecnología, UNAM
Dra. Carmen Nina Pastor Colón
Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM

Cuernavaca, Morelos. Marzo, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Biotecnología de la UNAM, por permitirme el uso de sus equipos e instalaciones para el desarrollo de este proyecto de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante la maestría (No. 000237).

Al programa DAGAPA-PAPIIT IN211621 (Caracterización del veneno de tres serpientes de importancia médica en México: investigación básica y mejoramiento de antivenenos) y al programa del FORDECYT-CONACYT 303045 (Venenos y Antivenenos) por el apoyo brindado para realizar el proyecto.

Al Dr. Alejandro Alagón Cano, por la dirección del proyecto, y por su manera tan singular de hacerme crecer. Admiro mucho su pasión por la naturaleza y su calidez humana.

Al Dr. Edgar Neri Castro, por su tiempo dedicado a guiarme en la investigación y por su apoyo durante el desarrollo de los experimentos.

Al técnico académico Felipe Olvera Rodríguez, por el apoyo brindado durante la realización de los experimentos.

Al Dr. Fernando Zamudio Zuñiga por su colaboración en este proyecto con espectrometría de masas y secuenciación.

Al M.B. Timoteo Celso Olamendi Portugal por su colaboración en este proyecto con los procesos de carboximetilación, reducción y secuenciación de las toxinas de interés.

A la Dra. Hilda Vázquez, por sus aportes al proyecto y por su amabilidad y empatía.

Al Biol. Alid Guadarrama Martínez, por su apoyo durante los experimentos de esta investigación y por escucharme.

A todo el personal del bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM, por permitir el uso de sus instalaciones, recursos y por instruirme para tener un adecuado manejo de animales de acuerdo con las políticas del comité de ética.

Al personal de cómputo del Instituto de biotecnología de la UNAM, en particular a la Técnico Académico Shirley Elizabeth Ainsworth Gore.

A los miembros de mi comité tutorial, por sus acertadas observaciones que contribuyeron al enriquecimiento del proyecto.

A mis padres, a mi hermano y a mi novio, que con su amor incondicional me hacen crecer y creer en mí misma, me hacen sentir que puedo afrontar todos los retos que me presenta la vida.

Contenido

INTRODUCCIÓN	7
ANTECEDENTES	14
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	22
4.1 Objetivo general	22
4.2 Objetivos particulares	22
METODOLOGÍA	23
5.1 Venenos, antivenenos y anticuerpo monoclonal	23
5.2 Cuantificación de proteína	23
5.3 Purificación de la subunidad B de la sphenotoxina	24
5.5 Transferencia a membrana de PVDF	26
5.6 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	26
5.7 Actividad de PLA₂ mediante método titulométrico	27
5.8 Actividad de PLA₂ mediante 4-NOBA	28
5.9 Secuenciación, espectrometría de masas y alineamiento	28
6 Pruebas de cristalización	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
Purificación	30
Letalidad	35
Secuencias, peso y modelos	36
Pruebas de reconocimiento de antivenenos, anticuerpo monoclonal y anticuerpos policlonales	45
Neutralización	47
Actividad de PLA₂	48
Epítopes e interfase	51
Cristalización	56
Conclusiones	62
BIBLIOGRAFÍA	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Alineamiento de secuencias de las subunidades B de la crotoxina clásica de <i>Crotalus durissus terrificus</i> y la subunidad B de la sphenotoxina de <i>Ophryacus sphenophrys</i>	12
Figura 2 Composición proteica del veneno de y fotografía de <i>O. sphenophrys</i>	15
Figura 3 Alineamiento de subunidades B de “crotoxin like”	16
Figura 4 Representación de la estructura de la crotoxina clásica	19
Figura 5 Cristales de crotoxina	21
Figura 6 Procedimiento para la purificación de la subunidad B de la sphenotoxina	25
Figura 7 Cromatograma de RP-HPLC de veneno de <i>O. Sphenophrys</i>	30
Figura 8 Cromatograma de cromatografía de exclusión molecular	31
Figura 9 Cromatograma de RP-HPLC de FII y SDS-PAGE 15%	33
Figura 10 SDS-PAGE 15%	34
Figura 11 Secuencias alineadas de subunidad B de crotoxina clásica, sphenotoxina B1 y B2	39
Figura 12 Empalme de subunidades B crotoxina y sphenotoxina	39
Figura 13 Modelos H1 W30	41
Figura 14 Modelos A17 I18 P19 F20	42
Figura 15 Modelos F11 E12 R14	43
Figura 16 Modelos N6	44
Figura 17 Modelos R35	45
Figura 18 Reconocimiento de las subunidades por antivenenos y anticuerpo monoclonal ..	47
Figura 19 Actividad de PLA₂	50
Figura 20 Sitio de rompimiento de enlace para las PLA₂	51
Figura 21 Reacción con el sustrato 4-NOBA	51
Figura 22 Aminoácidos 33 y 116	52
Figura 23 Aminoácidos 55 y 83	53
Figura 24 Aminoácidos 14 y 99	54
Figura 25 Interfase de B las subunidades B	56
Figura 26 Matriz propuesta 2	61

Figura 27 Cristal de sphenotoxina B2.....	62
--------------------------------------------------	-----------

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Fosfolipasas tipo A₂ de venenos de diferentes serpientes	8
Tabla 2 “crotoxin like”	16
Tabla 3 Fracciones recuperadas de CEM	31
Tabla 4 Fracciones recuperadas de RP-HPLC	33
Tabla 5 Secuencias de las bandas 1, 2 y 3.....	35
Tabla 6 Letalidad	36
Tabla 7 Peso molecular	37
Tabla 8 Títulos ELISA	47
Tabla 9 Neutralización (dosis efectiva media)	48
Tabla 10 Actividad de PLA₂	50
Tabla 11 Condiciones de cristalización y resultados día 80	57
Tabla 12 Condiciones de cristalización y resultados.....	58
Tabla 13 Matriz propuesta 1	59

LISTA DE ABREVIATURAS

CEM (Cromatografía de Exclusión Molecular)

ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas)

PEG (polietilenglicol)

PLA₂ (Fosfolipasa Tipo A II)

PVDF (fluoruro de polivinilideno)

RP-HPLC (Cromatografía líquida de Alta Resolución de Fase reversa)

SPR (Resonancia de Plasmones de Superficie)

V.C (Veneno completo)

ABSTRACT

Sphenotoxin is a β -neurotoxin with phospholipase A₂ (PLA₂) activity found in the venom of the snake *Ophryacus sphenophrys*. This β -neurotoxin has one acidic subunit (A) without catalytic activity and a basic subunit with catalytic activity, just like in the case of the classic crotoxin (CB) present in *Crotalus durissus terrificus*'s venom (rattlesnake). Even though the basic subunit of sphenotoxin has a high percentage of identity in its amino acid sequence with the subunit B of crotoxin (86%), there are some provocative differences concerning the recognizing and neutralizing capacities of commercial antivenoms, PLA₂ activity, and lethal potency. In this project, we identified 2 different isoforms of the basic subunit of sphenotoxin (B1 and B2) being B1 the isoform having less lethal potency, less recognition by the two antivenoms tested, and more PLA₂ activity in contrast with CB and B2, which is the one isoform that is found in higher proportion within the venom. CB is 1.5 and 3.6 times more lethal than B2 and B1 respectively. Also, B2 has 2.5 times more PLA₂ activity than CB while B1 6 times more CB. Using two different Mexican antivenoms (Antivipmyn and BIRMEX), we observed that the recognition capacity of Antivipmyn has slightly different titles when comparing CB, B1 and B2, being B1 4 and 7 times less recognized by Antivipmyn and BIRMEX respectively comparing to the recognition capacity of CB. On the other hand, B2 is 7 and 9 times less recognized by Antivipmyn and BIRMEX respectively in contrast to the recognition capacity for CB.

Using computerized models, we observed that the principal chain of amino acids of CB and the isoforms B1 and B2 do not significantly change their tridimensional structure. However, specific changes in amino acids within the N-terminal and the interface between the two subunits (A and B) could explain the subtle changes in PLA₂ activity, lethal potency, and recognition of antivenoms. Even though the three basic subunits studied in this project have the catalytic amino acids conserved in the same positions (47 and 89), specific changes in the lateral amino acid chains as in B1 (H1-D1 y W30-G30) could modify the interaction with A subunit and the first contact with the cell membrane (W80-P80). We also observed that most changes between CB and the isoforms B1 and B2 occur along the N-terminal and C-terminal, and that these two parts are exposed to the solvent. This information may explain the differences in recognition and neutralization by the antivenoms used.

RESUMEN

La sphenotoxina es una β -neurotoxina con actividad de fosfolipasa de tipo A₂ (PLA₂) que se encuentra en el veneno de la serpiente *Ophryacus sphenophrys*. Esta β -neurotoxina tiene una subunidad ácida (sin actividad catalítica) y una subunidad básica (con actividad catalítica), igual que la crotoxina clásica (CB) de *Crotalus durissus terrificus* (serpiente de cascabel). A pesar de que la subunidad básica de la sphenotoxina tiene un alto porcentaje de identidad (86%) con respecto a la subunidad básica de la crotoxina clásica, existen diferencias en cuanto al reconocimiento y neutralización por parte de antivenenos, actividad de PLA₂ y letalidad. En este trabajo se identificaron dos isoformas diferentes de la subunidad básica de la sphenotoxina (llamadas B1 y B2), siendo la isoforma que se encuentra en menor proporción (B1), la que es menos letal, la menos reconocida por antivenenos y con mayor actividad de fosfolipasa con respecto a la isoforma en mayor proporción (B2) y con respecto a la CB. CB es 1.5 veces más letal que la B2 y 5.6 veces más que la B1, siendo la isoforma B2 3.6 veces más letal que la isoforma B1. La subunidad B2 tiene 2.5 veces más actividad de PLA₂ que la CB y la isoforma B1 6 veces más que la CB en un ensayo titulométrico con yema de huevo. La isoforma B1 es 4 veces menos reconocida por Antivipmyn y 7 veces menos reconocida por el antiveneno de BIRMEX con respecto a la CB. Por otra parte, la isoforma B2 es 7 veces menos reconocida por Antivipmyn y 9 veces menos reconocida por el antiveneno de BIRMEX con respecto a CB. El anticuerpo monoclonal 4F6 anti-CB no reconoce ninguna de las isoformas de la subunidad B de la sphenotoxina.

Con modelamiento computacional, se observó que a pesar de que existen diferencias entre las isoformas B1, B2 y CB, se conserva la estructura tridimensional general (cadena principal). Los cambios de aminoácidos en zonas como el amino terminal y en la interfase entre la subunidad A y la B pudieran explicar los cambios en los valores de letalidad, neutralización por parte de los antivenenos y actividad de PLA₂. A pesar de que las tres toxinas conservan los aminoácidos del sitio catalítico, el cambio en las cadenas laterales en aminoácidos clave (como H1-D1, W30-G30 y W80-P80 en B1), podrían alterar la interacción con la subunidad A y el primer contacto con la membrana celular, generando en este caso una interacción más débil lo que podría explicar la menor letalidad observada. Cambios de aminoácidos en el amino y carboxilo terminales de las toxinas, podrían explicar las diferencias en los datos obtenidos sobre reconocimiento y

neutralización de los antivenenos mexicanos (Antivipmyn y BIRMEX), ya que estos dos sitios se encuentran expuestos al solvente y son los sitios con mayor cantidad de cambios.

INTRODUCCIÓN

Los venenos de las serpientes

Los venenos de serpientes están compuestos por múltiples componentes que determinan su toxicidad. Estos poseen moléculas de naturaleza inorgánica y orgánica, donde las proteínas representan entre el 90-95% del veneno (Tasoulis y Isbister, 2017). En los venenos de las serpientes existen 63 familias proteicas reportadas, aunque en cada especie se pueden encontrar de 10-20 familias (Tasoulis y Isbister, 2017). Existen diferentes variantes en cada familia proteica, lo cual hace que los venenos sean aún más complejos (Calvete, 2017). Hay diferentes proteínas de importancia médica contenidas en los venenos de las serpientes; entre las más importantes se encuentran las familias de las metaloproteasas, serina proteasas, fosfolipasas tipo A₂ (PLA₂) **Tabla 1** (Calvete et al., 2009; Mackessy, 2008). El conocimiento sobre los componentes de los venenos permite entender la fisiopatología del envenenamiento, predecir cuadros clínicos y es información relevante para la producción, mejoramiento y administración de antivenenos (Lomonte y Calvete, 2017). Las PLA₂ no son exclusivas de venenos de serpientes, sino que están presentes en los venenos de distintos animales como escorpiones, abejas, lagartos y caracoles. Este tipo de fosfolipasas catalizan la hidrólisis del enlace éster *sn*-2 de fosfolípidos, liberando un ácido graso y un liso fosfolípido (Berg et al., 2001; Dennis et al., 2011). Las fosfolipasas de venenos de serpientes pueden provocar efectos neurotóxicos, miotóxicos o simplemente digestivas. La amplia diversidad en función de las PLA₂ durante la evolución, demuestra que son toxinas con alta “plasticidad” a nivel estructural (Mackessy, 2021). Cada toxina debido a sus características puede variar en su función y por esto mismo, la información sobre el contenido proteico de los venenos permite el estudio de las toxinas que lo conforman de forma individual. Estudios recientes de venómica de serpientes muestran componentes no estudiados anteriormente (Neri-Castro et al., 2019), por lo que es necesario obtener información para acercarnos al entendimiento del mecanismo de acción, ya que se mantiene limitado y se quedan preguntas clave por resolver (Mackessy, 2021).

Tabla 1 Fosfolipasas tipo A₂ de venenos de diferentes serpientes

Nombre	Especie de serpiente	Características estructurales	Toxicidad	Letalidad en ratones (µg/kg)	Proteína de unión en tejido	Acrividad de PLA ₂ (µmol/min/mg de toxina)
Neurotoxina						
Crotoxina	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Heterodimérica	Neurotóxica, miotóxica, cardiotóxica	60-240 (i.v)	Crocalbina; CaM	85
MsPLA ₂ -I	<i>Micrurus spixii</i>	Monomérica	Neurotóxica, miotóxica, edema, actividad antiplasmodial	n.d	nAchR	Sí
Taipoxina	<i>Oxyuranus scutellatus</i>	Trimérica	Neurotoxicidad presináptica, citotóxica	2 (i.v)	M-sPLA ₂ R; NP; TCBP-49	0.4
Textiltoxina	<i>Pseudonaja textilis</i>	Pentamérica	Neurotoxicidad presináptica	1 (i.v)	M-sPLA ₂ R	3.2
Ammodytoxina	<i>Vypera ammodytes</i>	Monomérica	Neurotoxicidad presináptica, anticoagulante	21 (i.v)	Proteínas M-sPLA ₂ R; CaM; PDI; FXa; 14-3-3	280
β-Bungarotoxina	<i>Bungarus multicinctus</i>	Dimérica	Neurotoxicidad presináptica	19-130 (i.p)	Canales v.-d. K ⁺	61
Notexina	<i>Notechis scutatus</i>	Monomérica	Miotóxica, neurotoxicidad presináptica, nephrotóxica	17 (i.v)	n.d	1390
Miotoxina III	<i>Bothrops asper</i>	Dimérica	Miotóxica, anticoagulante, edema	470 (i.v)	n.d	750
Miotoxina II	<i>B. moojeni</i>	Monomérica	Miotóxica, edema	7600 (i.p)	n.d	No
CoaTx-II	<i>Crotalus oreganus abyssus</i>	Dimérica	Miotoxicidad, edema, actividad	n.d	n.d	No

			antibacterial			
Cr,5	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	Monomérica	Citotóxica, miotóxica, edema	70 (i.c.v)	n.d	No
BaTX	<i>Bothrops alternatus</i>	Monomérica	Citotóxica, miotóxica, edema, neurotóxica	7000 (i.v)	n.d	No
Cr-IV 1	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	Monomérica	Miotóxica, citotóxica, edema	70 (i.c.v)	n.d	0.014
Ammodytin L	<i>Vipera ammodytes</i>	Monomérica	Miotóxica	3600 (i.p)	n.d	No
Anticoagulante						
Daboxina P	<i>Daboia russelii</i>	Monomérica	Anticoagulante fuerte	n.d	FX; FXa	1140
RVV-PFIIc´	<i>D. russelii</i>	Monomérica	Anticoagulante	100 (i.p)	n.d	Sí
CM-IV	<i>Naja nigricollis</i>	Monomérica	Anticoagulante fuerte, neurotoxicidad presináptica	180 (i.p)	FXa; FVIIa	Sí
CM-II	<i>Naja mossambica</i>	Monomérica	Anticoagulante débil, miotóxica. neurotóxica	n.d	TF; FVII	Sí

Características, toxicidades, receptores de unión y actividad enzimática de PLA₂ de venenos de serpientes. Tabla adaptada de (Xiao et al., 2017). Abreviaturas: i.v, intravenoso; i.p, intraperitoneal; i.c.v, intracerebroventricular; n.d, no determinado; CaM, calmodulina; NP, pentraxina neuronal; PDI, proteína disulfuro isomerasa; TCBP-49, taipoxina asociada a proteína de unión a calcio 49; M-sPLA₂ R, receptor de sPLA₂ tipo M; Fxa, factor de coagulación Xa; FX, factor de coagulación X; TF, factor de tejido; FVII, factor de coagulación VII; FVIIa, factor de coagulación VIIa; v.-. K⁺ channel, canal de K⁺ dependiente de voltaje.

La crotoxina clásica

La crotoxina es uno de los principales componentes proteicos tóxicos del veneno de algunas serpientes de cascabel (género *Crotalus* y *Sistrurus*), la cual es un heterodímero (subunidades A y B). La crotoxina del veneno de *Crotalus durissus terrificus*, serpiente que se distribuye en Brasil y norte de Argentina, ha sido ampliamente estudiada y está implicada en generar los síntomas neurotóxicos en los envenenamientos (Chang y Lee, 1977; Faure et al., 1994; Slotta y Fraenkel-

Conrat, 1938). A la crotoxina de esta especie se le conoce como “crotoxina clásica” porque fue la primera que se caracterizó (Slotta y Fraenkel-Conrat, 1938). Se han estudiado distintas isoformas de la crotoxina clásica, llegando a la conclusión que hay 2 clases diferentes que comparten características: la clase I que contiene las isoformas CBb, CBc, CBd y CA, es altamente tóxica y menos activa enzimáticamente (actividad de PLA₂), mientras que la clase II que contiene a las isoformas CBA₂ y CA, son menos tóxicas, pero con mayor actividad de PLA₂. La crotoxina de clase I es más eficiente bloqueando la transmisión neuromuscular que la de tipo II. También se ha visto que la crotoxina de tipo I es más estable que la de tipo II, lo cual es relevante ya que la estabilidad está directamente relacionada con la toxicidad, ya que la interacción entre la subunidad A y B es importante para entender más sobre el funcionamiento del complejo (Faure et al., 1993). Así como la interacción entre ambas subunidades influye en la potencia neurotóxica, la secuencia de aminoácidos es de gran importancia, ya que se ha observado que variaciones en la subunidad B son las responsables en incrementar o disminuir la potencia neurotóxica, mientras que variaciones en la subunidad A no tienen tantas repercusiones en esta característica (Faure et al., 1993). Ya que ambas subunidades de la crotoxina actúan en sinergia, es imprescindible estudiar su interacción, pero también se les deben estudiar a detalle de manera individual para comprender a fondo cómo es su mecanismo de acción.

Las “crotoxin like” y la sphenotoxina

Por otra parte, estudios recientes de venómica revelan que existen otros géneros de víboras con venenos con toxinas “crotoxin-like” (Neri-Castro et al., 2019), de las cuales no existen estructuras cristalográficas previamente reportadas (Fernández et al., 2010; Lomonte et al., 2015; Yang et al., 2015a, 2015b). Las “crotoxin like” son toxinas que comparten ciertas características con la crotoxina clásica de *Crotalus durissus terrificus* como el hecho de que están conformadas por un heterodímero no covalente, son neurotóxicas en ratones, tienen reactividad inmunológica cruzada y actividad de fosfolipasa tipo A₂ (Of et al., 1990). El veneno de la víbora *Ophryacus sphenophrys*, también llamada víbora de cuernos anchos o nauyaca de cuernos, contiene en su veneno una “crotoxin like” a pesar de que pertenece a un género distinto del *Crotalus*. Esto se descubrió en 2019 mientras se caracterizaba su veneno por primera vez (Neri-Castro et al., 2019). Esta serpiente se encuentra sólo en una comunidad de Oaxaca (Cerro Perico) y aunque su veneno

posee una toxicidad importante, no representa un problema de salud pública por su acotada distribución. Sin embargo, su veneno es de interés por contener la sphenotoxina, la cual al ser una “crotoxin like” tiene propiedades toxicológicas de importancia y presenta diferencias que, si se estudian a fondo, podrían dar información relevante sobre por qué los antivenenos comerciales neutralizan mejor algunas crotoquinas que otras. A parte de ser interesante desde el punto de vista evolutivo, el descubrimiento de las “crotoxin like” abren múltiples preguntas interesantes como ¿cuáles son las principales diferencias de estas toxinas con respecto a la crotoxina clásica? ¿qué implicaciones tienen estos cambios a nivel estructural? ¿tendrán estos cambios algún efecto en su mecanismo biológico? ¿serán diferentes los efectos fisiológicos en pacientes envenenados? ¿los antivenenos mexicanos comerciales serán igual de eficientes neutralizando los efectos de las crotoxin like que con respecto a la crotoxina clásica?

Evolución

Los componentes proteicos y las estructuras específicas conservadas de las toxinas no sólo brindan información sobre su función, sino que brindan información sobre su historia evolutiva y sobre su antigüedad (Fry, 2005; Jackson et al., 2013). Los componentes conservados y componentes similares en diferentes especies de víboras no sólo son interesantes por su antigüedad sino por la presencia de toxinas que están más distribuidas de lo que antes se pensaba (Neri-Castro et al., 2019). En este proyecto se estudiarán las diferencias estructurales de la subunidad B de la sphenotoxina en comparación con la subunidad B de la crotoxina clásica con la que tiene una identidad de ~85% (Figura 1) en sus secuencias de aminoácidos.

```

CrotoxinaB      HLLQFNKMIKFETRKN AIPFYAFYGCYCGWGGGRPKDATDRCCFVHDCCYGKLA KCNTK 60
SphenotoxinaB  HLLQFNKMIKEETGKN AIPFYAFYGCYCGWGGSGKPKDATDRCCFEHDCCYGLTNCNTK 60
***** ** *****
***** * *****

CrotoxinaB      WDIYPYSLKSGYITCGKGTWCEEQICECDRVAAECLRRSLSTYKYGYMFYPSRCRGPSE 120
SphenotoxinaB  WDIYSYSLKDG YITCGKGTWCEKEVCECDK----CLRRNLRTYKYGYMFYL----- 107
**** * . *****
**** * *****

```

85% de identidad

Figura 1 Alineamiento de secuencias de las subunidades B de la crotoxina clásica de *Crotalus durissus terrificus* y la subunidad B de la sphenotoxina de *Ophryacus sphenophrys*

Secuencia parcial de aminoácidos de la subunidad B de la sphenotoxina de *O. sphenophrys* (Neri-Castro et al., 2019) alineada con la subunidad B de la crotoxina de *Crotalus durissus terrificus* (PDB: 3R0L). Alineamiento de secuencias con CLUSTAL OMEGA y porcentaje de identidad. (*) Coincidencia, (:) Existe una conservación fuerte, (.) Existe una conservación débil, () no hay coincidencia. Colores en el alineamiento; Azul, aminoácidos ácidos; rojo, aminoácidos hidrofóbicos o chicos; verde, aminoácidos con grupos hidroxilo, sulfhidrilo o amida; rosa, aminoácidos básicos.

Ya que se han encontrado “crotoxin like” en diferentes géneros de víboras, se ha propuesto que la crotoxina existe desde un ancestro perteneciente al “Viejo Mundo” de los vipéridos que migró desde Asia al Norte de América por el Estrecho de Bering hace 22 millones de años (Casewell, 2016; Lomonte et al., 2015). Estudios *in silico* sugieren que una sola mutación pudo ser necesaria para explicar a través de un proceso filogenético completo, que algunas toxinas se modificaran y se favoreciera la asociación a una subunidad B, como es el caso de la mojave toxina A, la cual es un homólogo de la crotoxina (Whittington et al., 2018). De esta manera se puede plantear la existencia de los heterodímeros, como el que conocemos en la crotoxina clásica. El hecho de que algunas especies de víboras de cascabel contengan en su veneno a la crotoxina y otras no, puede deberse a que hubo linajes independientes que causaran la pérdida de ciertos genes, en vez de tratarse de una evolución convergente (Casewell, 2016). El descubrimiento de “crotoxin like” en diferentes especies como *B. nigroviridis*, *G. intermedius* y *O. sphenophrys* es de interés desde la perspectiva evolutiva porque aporta información que puede sustentar que los genes de la crotoxina ya existían en ancestros del “Nuevo Mundo” de vipéridos y que efectivamente, los genes se perdieron en algunos linajes (Casewell, 2016). Estudios de genética sobre el número, organización y expresión de los genes en serpientes de cascabel con venenos neurotóxicos y no neurotóxicos revelan que, a pesar de que la mayoría de las serpientes de cascabel que se encuentran en Norte América no presentan componentes neurotóxicos en sus venenos, los genes especializados en codificar heterodímeros neurotóxicos ya existían desde antes de la aparición de las cascabeles, es decir, que existían en un ancestro común de hace 22 millones de años (Dowell et al., 2016). Víboras como *Crotalus atrox* y *Crotalus adamanteus* no presentan componentes neurotóxicos, siendo así ejemplos de cómo se perdieron los genes en los linajes de serpientes (Dowell et al., 2016).

Estructura y función

Ya que existen mutaciones individuales que pueden tener grandes implicaciones incluso en la formación de los heterodímeros como en el caso de la mojave toxina A (Whittington et al., 2018) y la crotoxina, puede haber mutaciones que impliquen cambios estructurales que modifiquen su funcionamiento. A pesar de que algunos aminoácidos se conserven e implican a nivel estructural regiones relevantes para su función y que a través de estas regiones conservadas se pueda entender más sobre el mecanismo de acción de las toxinas, es necesario estudiar los cambios de aminoácidos a nivel estructural, en particular a nivel de cadenas laterales de los aminoácidos, para entender por qué puede haber variaciones en la actividad biológica y potencia neurotóxica. Estudios estructurales de las proteínas brindan información que puede correlacionarse con las variaciones en la secuencia de aminoácidos (Rangel-Santos et al., 2004) y pueden ayudar a entender por qué algunas son reconocidas y neutralizadas más eficientemente por los antivenenos que otras. El descubrimiento y el análisis de diferencias estructurales pueden ser determinantes para explicar variantes en la actividad biológica (Rangel-Santos et al., 2004) y también pueden brindar información para el mejoramiento de diversos antivenenos. Por ejemplo, han sido reportadas previamente las estructuras cristalográficas de ambas subunidades de la crotoxina clásica y algunas de sus isoformas, lo cual ha sido relevante para entender sobre su mecanismo de acción (Nemecz et al., 2020). La estructura cristalográfica reveló los sitios de interacción hidrofóbica y polares entre ambas subunidades y mostró que la subunidad A impide físicamente que la subunidad B tenga actividad de PLA₂ (Faure y Saul, 2011). También, las diferencias estructurales podrían explicar por qué en los diferentes accidentes ofídicos son necesarios diferentes cantidades de antiveneno y podrían predecir si se requiriesen más de los que se aplican inicialmente. Ya que existen diferencias entre este tipo de toxinas que tienen una implicación directa en su actividad, es de gran utilidad realizar estudios estructurales que brinden información para dilucidar su mecanismo de acción.

En este proyecto se intentará avanzar en el entendimiento de las implicaciones que tienen los cambios estructurales en las toxinas que tienen altos porcentajes de identidad entre sí.

ANTECEDENTES

Lo que se sabe de la crotoxina clásica

Como ya se mencionó, la crotoxina clásica es una β -neurotoxina heterodimérica ampliamente estudiada con actividad de fosfolipasa (PLA₂). Tiene una subunidad B (básica) con actividad catalítica y una subunidad A (ácida), sin actividad catalítica que se asocian de manera no covalente mediante interacciones hidrofóbicas e interacciones polares (Faure y Saul, 2012). Este tipo de fosfolipasas catalizan la hidrólisis del enlace éster *sn*-2 de fosfolípidos, liberando así un ácido graso y un liso fosfolípido (Berg et al., 2001; Dennis et al., 2011). Se han reportado las estructuras cristalográficas de ambas subunidades como heterodímero y algunas de las isoformas de la subunidad B (Faure et al., 2011; Nemezc et al., 2020). También se han realizado estudios de caracterización funcional en donde para probar la actividad miotóxica, se midió el incremento de la proteína creatina cinasa (CK) en suero después de la administración de la toxina, ya que ésta es indicativa de daño muscular. Se observó la mayor concentración a las 4 horas de la administración (Rangel-Santos et al., 2004). Por otra parte, el efecto neurotóxico se ha medido con preparación de nervio frénico midiendo la inhibición de la contracción nerviosa, resultando con una T₉₀ 58.9 minutos (Neri-Castro et al., 2019) y la dosis letal media (DL₅₀) está reportada con un valor de 0.08 μ g/g (Rangel-Santos et al., 2004).

Las “crotoxin like” identificadas hasta ahora

En estudios recientes se caracterizaron los venenos de 3 especies de serpientes endémicas de México del género *Ophryacus*: *O. undulatus*, *O. smaragdinus* y *O. sphenophrys*. En la **Figura 2** se muestra la composición del veneno de *O. sphenophrys*, ya que es la especie de interés para este proyecto. Estudios de proteómica revelaron una nueva “crotoxin like” llamada sphenotoxina, una toxina similar a la crotoxina de *C. durissus terrificus*, siendo *O. sphenophrys*, una de las cuatro especies de víboras que no pertenecen al género *Crotalus* o *Sistrurus* con una “crotoxin like” (Neri-Castro et al., 2019), junto con las serpientes *Bothriechis nigroviridis* (nigroviriditoxina) (Lomonte et al., 2015), *Gloydus intermedius* (gintexina) (Yang et al., 2015b) y *Mixcoatlus melanurus* (melanurutoxina) (Neri-Castro et al., 2020) **Tabla 2**. En la **Figura 3** se muestran el

alineamiento de las secuencias de las “crotoxin like” excepto de la melanurutoxina ya no ha sido reportada hasta ahora. Por otra parte, la letalidad de cada una de estas ha sido obtenida como se muestra en la **Tabla 2** siendo la nigroviriditoxina la menos letal de las “crotoxin-like” (~5 veces menos letal que la crotoxina y con un porcentaje de identidad del 80%).

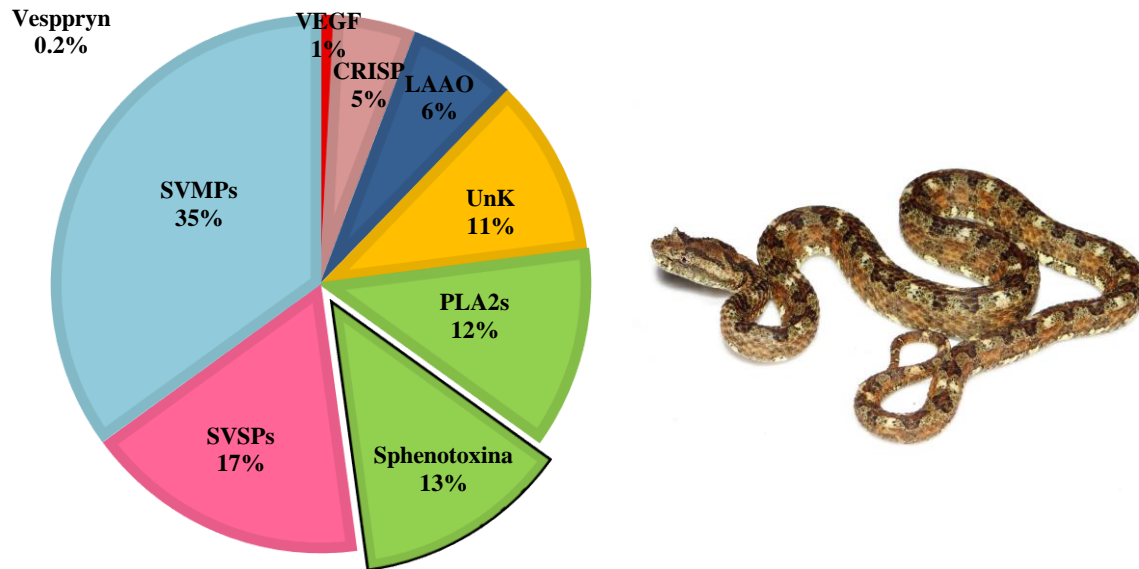


Figura 2 Composición proteica del veneno de y fotografía de *O. sphenophrys*

Representación de la abundancia relativa de las familias de proteínas en el veneno de *O. sphenophrys*. SVMPs: metaloproteasas; SVSPs: serinoproteasas; LAAO: L-amino ácido oxidasa; CRISP: proteínas secretoras ricas en cisteína; sphenotoxina: “Crotoxin-like”; PLA₂: fosfolipasa de tipo A₂; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; Vesp: vespryna/ohanina; Unk: proteínas desconocidas. Gráfica adaptada de (Neri-Castro et al., 2019).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

Nigroviriditoxina  NLLQFNRMIKLETKKNAVPFYAFYGCYCGWGGQGPKDATDRCCFEHDCCYGKLTNCNTK  60
Sphenotoxina      HLLQFNKMIKEETGKNAIPFYAFYGCYCGWGGSGPKDATDRCCFEHDCCYGKLTNCNTK  60
Crotoxina         HLLQFNKMIKFETRKNVAVPFYAFYGCYCGWGGQGRPKDATDRCCFVHDCCYGLAKCNTK  60
Gintexina         HLLQFNKMIKVETGKNAIPFYAFYGCYCGWGGRRPKDGTDRCCFVHDCCYGLPNCNTK  60
                  :*****:** * * ***:***** *:*:*:*:* * * * * * :****
                  :

Nigroviriditoxina  SDLYSYSSKYGFLLCGKGTWCEEQICECDRIAATCLRRSLDITYKLYMFYLDYCKGPSE  120
Sphenotoxina      WDIYSYSLKDGYITCGKGTWCEEKVCCEDK--C-LARRNLRITYKYGYMFYL-----  108
Crotoxina         WDIYRYSLSGYITCGKGTWCEEQICECDRVAEECLRRSLSTYKNGYMFYPSRCRGPSE  120
Gintexina         WDIYPYSLKDGYITCGKGTWCEKQICECDRVAEECLRRNLSTYKYRYMFYLDYRCTGPSE  120
                  *:* * * * * : : *****: : *****: . *:* * * * * * * * *
                  :

Nigroviriditoxina  KC          122
Sphenotoxina      --         108
Crotoxina         TC          122
Gintexina         KC          122

```

Figura 3 Alineamiento de subunidades B de “crotoxin like”

Se muestra el alineamiento en Clustal Omega (1.2.4) de la secuencia de aminoácidos de las subunidades B de las “crotoxin like” reportadas: crotoxina de *Crotalus durissus terrificus* (como referencia), gintexina de *Gloydus intermedius*, nigroviriditoxina de *Bothriechis nigroviridis* y secuencia parcial de sphenotoxina de *Ophryacus sphenophrys*. (*) Coincidencia, (:) Existe una conservación fuerte, (.) Existe una conservación débil, () no hay coincidencia. Colores en el alineamiento; Azul, aminoácidos ácidos; rojo, aminoácidos hidrofóbicos o chicos; verde, aminoácidos con grupos hidroxilo, sulfhidrilo o amina; rosa, aminoácidos básicos.

Tabla 2 “crotoxin like”

Especie	Nombre	DL ₅₀	Vía de administración
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Crotoxina	0.08-0.65 µg/g	i.v
<i>Ophryacus sphenophrys</i>	Sphenotoxina	0.16 µg/g	i.v
<i>Mixcoatlus melanurus</i>	Melanurtoxina	0.31 µg/g	i.v
<i>Gloydus intermedius</i>	Gintexina	0.45 µg/g	i.p
<i>Bothriechis nigroviridis</i>	Nigroviriditoxina	2.2 µg/g	i.v

Especies de víboras con “crotoxin like” y su dosis letal media en ratones (Lomonte et al., 2015; Neri-Castro et al., 2019, 2020; Yang et al., 2015b). Vías de administración: i.v, intravenoso; i.p, intraperitoneal.

La sphenotoxina al igual que la crotoxina, es una β-neurotoxina heterodimérica con actividad de fosfolipasa (PLA₂) con una subunidad A, también llamada crotapotina, de 9.5 kDa y una subunidad B de 14.264 kDa. La subunidad B tiene un ~85% de identidad en secuencia de aminoácidos con la subunidad B de la crotoxina mientras que de la subunidad A tiene un 74% de

identidad con la subunidad A de la crotoxina. Con el veneno completo de *O. sphenophrys* se realizaron estudios de neurotoxicidad, actividad proteolítica, letalidad, actividad de fosfolipasa y dosis mínima coagulante, mientras que con la sphenotoxina purificada se evaluó la DL₅₀ (0.16 (0.1-0.19) µg/g para el dímero A+B y 0.49 (0.47-0.5) para la subunidad B aislada, actividad de PLA₂ (34 ± 8.3 U/mg para el dímero A+B, 174 ± 17.5 para la subunidad B aislada) y neurotoxicidad (T₉₀ 74.6 minutos) (Neri-Castro et al., 2019). Estos estudios aparte de caracterizar a la toxina, brindan información que resaltan sus particularidades en comparación con otras proteínas homólogas. Las diferencias en secuencias de aminoácidos de las proteínas están relacionadas con diferencias en las estructuras tridimensionales y, por tanto, con su función. En particular, las mutaciones en la subunidad B de la crotoxina están implicadas en diferencias en la función (Nemecz et al., 2020).

Mecanismo de acción

La toxicidad del complejo depende de la interacción entre ambas subunidades. La subunidad A, a pesar de no tener actividad catalítica, incrementa la neurotoxicidad del complejo y disminuye la actividad de PLA₂ (Neri-Castro et al., 2019). Las β-neurotoxinas bloquean de la liberación del neurotransmisor acetilcolina en las neuronas periféricas de la unión neuromuscular del músculo estriado, causando parálisis generalizada y respiratoria y, en algunos casos, muerte por asfixia. El mecanismo de acción de las β-neurotoxinas aún no está completamente comprendido (Sampaio et al., 2010), pero se ha reportado que la toxina puede interactuar con alta afinidad con proteínas de los botones presinápticos de las neuronas blanco (Sribar y Krizaj, 2011). La estructura cristalográfica reveló los sitios de interacción hidrofóbica y polares entre ambas subunidades y mostró que la subunidad A impide físicamente que un sitio importante de la subunidad B interactúe con los fosfolípidos de membrana, permitiendo que la subunidad B se asocie a un receptor específico de 48 kDa (R48) en la membrana presináptica de la unión neuromuscular. Una vez formada la interacción entre ambas subunidades y el receptor, la subunidad A se disocia, permitiendo que la subunidad B presente actividad catalítica (Faure y Saul, 2011). Se observó que hay ciertos aminoácidos críticos para la estabilización del complejo de A y B, como W31, W70 de la subunidad B (isoforma CBd) que interactúan con D99 y D89 de la cadena β de la

subunidad A (isoforma CA2) (Faure et al., 1993). También W36 de la subunidad A es importante para estabilizar el complejo (Faure et al., 2011).

Para que las PLA₂ de venenos de víboras como la crotoxina ejerzan su función, tienen que actuar en la interfase entre el agua y la bicapa lipídica de la membrana celular. A pesar de que estas enzimas pueden hidrolizar fosfolípidos de uno a la vez, en estas condiciones estas fosfolipasas tienen una gran actividad en sustratos que están de forma agregada (como en la bicapa lipídica). Este fenómeno es llamado “activación interfacial” (Berg et al., 2001; Verger, 1976). Se sabe que la superficie de la enzima puede interactuar con alrededor de 20-40 fosfolípidos a la vez, aunque para que pueda ocurrir la catálisis, uno de los fosfolípidos tiene que ser “arrancado” de la membrana para poder transportarse por un canal específico llamado “canal hidrofóbico”, el cual está formado por las hélices H2 y H3 (Lambeau y Gelb, 2008). Una vez sucedido esto, la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana ocurre mediante un ataque nucleofílico que rompe el enlace éster *sn*-2. Para que ocurra esto, la diada catalítica de H/D activa una molécula de agua. Para lograr esta activación también es necesario un ión de Ca⁺² (Lambeau y Gelb, 2008; Scott et al., 1990). El sitio catalítico no solo depende de la diada mencionada, si no que se trata de una red catalítica formada por H48, D49, Y52 y D99. El *loop* de unión a Ca⁺² está conformado por Y28, G30 y G32 junto con D49 del sitio catalítico (Berg et al., 2001).

Algunos estudios demuestran que la neurotoxicidad no se puede explicar únicamente estudiando la actividad catalítica de la subunidad B de la crotoxina. Se sabe que Y22 de la subunidad B (Tzeng et al., 1995) y el carboxilo terminal (Čurin-Šerbec et al., 1994) tienen un papel importante para la neurotoxicidad. De hecho, hay estudios que reportan que el carboxilo terminal es responsable de la neurotoxicidad de una β- neurotoxina de *Vipera ammodytes ammodytes* (Prijatelj et al., 2006; Saul et al., 2010).

Estructura tridimensional e isoformas

Existen también diferencias en actividad enzimática entre crotoxinas de subespecies diferentes por esta misma razón (Rangel-Santos et al., 2004), así como diferencias en actividad en isoformas de crotoxina (Nemecz et al., 2020). Las estructuras cristalográficas de las isoformas de la

subunidad B de la crotoxina (CBa₂, CBb, CBc, CBd) revelan que existen ciertas estructuras secundarias conservadas como las α -hélice A en el amino terminal, seguida de una α -hélice B corta, un dominio o “loop” de unión a Ca⁺², una α -hélice C larga, una estructura β -plegada de dos hebras antiparalela, una α -hélice D larga (antiparalela a la α -hélice C) y una extensión en el carboxilo terminal, siendo la estructura completa estabilizada por la formación de 7 puentes disulfuro. También se revelan 5 regiones de mayor variabilidad (flexibilidad) entre estas 4 isoformas de la subunidad B (Nemecz et al., 2020). Por otra parte, la subunidad A pasa por modificaciones post-traduccionales siendo formada por 3 cadenas polipeptídicas unidas covalentemente denominadas α , β , γ de 39, 35 y 14 aminoácidos respectivamente (Figura 4) (Bouchier et al., 1991; Faure et al., 1991) y también existen 4 isoformas (CA1, CA2, CA3, CA4) como para la subunidad B (Faure y Bon, 1988). Las cadenas α y β de la subunidad A (25 aminoácidos que hacen contacto directo con la isoforma CBd) contribuyen a ocultar la interfase de la subunidad B antes de interactuar con el receptor (Bouchier et al., 1991; Faure et al., 1991). La cristalización de la crotoxina es un proceso retador precisamente por la variedad de isoformas y el grado de pureza al que se debe llegar para poder generar un cristal de buena calidad. Para la purificación de las isoformas se utilizó cromatografía de exclusión molecular (CEM) y cromatografía de intercambio aniónico (CIA) (Faure et al., 2011).

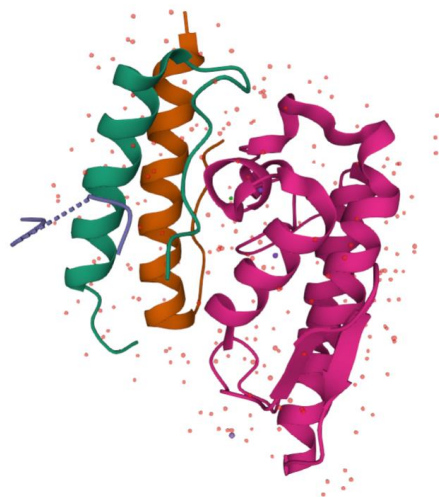


Figura 4 Representación de la estructura de la crotoxina clásica

Estructura tridimensional de la crotoxina donde se observa la subunidad B en rosa y la subunidad A se ve representada con los 3 péptidos que la conforman: verde: α , naranja: β , azul: γ . PDB: 3R0L. <https://www.rcsb.org/structure/3R0L>

Cristalización

Múltiples isoformas de la crotoxina clásica se han logrado cristalizar en diferentes condiciones. Muestras liofilizadas de CB se disolvieron en agua destilada a una concentración de 10 mg/mL. Se utilizó la técnica de gota colgante y difusión de vapor y se dejó por 20 días a 17.85 °C. Los cristales se formaron en la condición de 0.1 M Tris HCl pH 9.0 y 11.0% (w/v) PEG 8000.22 (Marchi-Salvador et al., 2008). Por otra parte, la isoforma CBd se disolvió en 20 mM Tris (pH 7.4), NaCl 300 mM y 0.02% DDM a una concentración de 4.2 mg/mL. Utilizando kits MemGold, los cristales crecieron dentro de 8-10 días. Los mejores cristales se obtuvieron con el método de gota colgante y difusión de vapor con las condiciones de 21% (v/v) PEG 400, NaCl 0.1 M, acetato de sodio 0.18 M, y Tris 0.1 M (pH 8.0). Los cristales crecieron en 7 semanas a 4 °C (Nemecz et al., 2020). También se han realizado cristales con el complejo CA₂CBb, donde se utilizó el mismo método de cristalización, donde la proteína se disolvió en fosfato de sodio 0.05 M pH 6.5, quedando en una concentración de 4.1 mg/mL. Se consiguieron cristales en las condiciones de 30% PEG 4000, acetato de sodio 0.1 M (pH 4.6) y MgCl₂ 0.1 M. Los cristales crecieron en 2 semanas a 17 °C (Faure et al., 2011). Por otra parte, también se han hecho cristales de PLA₂ de otras serpientes como de *Bothrops pirajai*, donde se utilizó el mismo método de gota colgante en las condiciones de 20% 2-propanol, 20% PEG 4000, citrato de sodio 0.1 M a pH 5.6 a una concentración de 10 mg/mL a 17.85 °C. Luego se refinaron las condiciones y se observó que con las condiciones para generar cristales de mejor calidad fueron de 18% 2-propanol, 21% PEG 4000 y citrato de sodio 0.1 M a pH 5.3 (Rigden et al., 2003). En la literatura se reportan casos de cristales formados con tetrámeros de subunidad B de crotoxina con una mezcla de las isoformas CB1 y CB2 (Marchi-Salvador et al., 2008). A pesar de que se han logrado generar cristales con más de una isoforma, se considera que es mejor conseguir isoformas puras, pues a pesar de que la crotoxina fue la primera proteína de veneno de serpiente en ser cristalizada (Figura 5) (Slotta y Fraenkel-Conrat, 1938), hubo grandes retos en los primeros intentos de cristalización debido a la gran cantidad de isoformas que contiene el veneno donde al menos del complejo completo podrían existir 16 variantes (Faure y Bon, 1987).

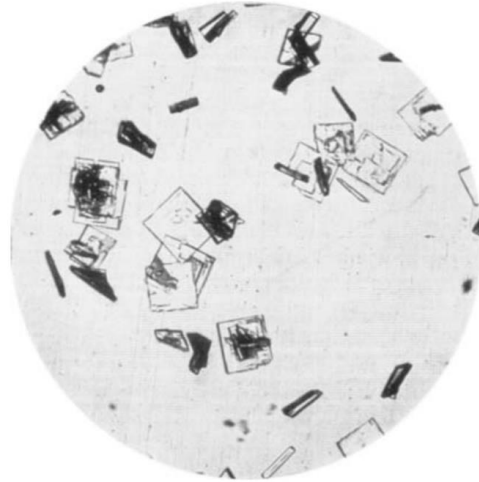


Figura 5 Cristales de crotoxina

Se muestran Cristales de crotoxina, la primer proteína de veneno de serpiente en ser cristalizada en 1938 (Slotta y Fraenkel-Conrat, 1938).

La importancia de las diferencias estructurales

Ya que el mejoramiento de antivenenos es una de las aplicaciones que resaltan debido a sus implicaciones sanitarias, se realizaron estudios con anticuerpos para probar su capacidad neutralizante y de reconocimiento. Dos estudios previos sugieren que la sphenotoxina y la crotoxina son neutralizados de distinta forma. Se realizaron neutralizaciones de un suero de conejo anti-*Crotalus miclantecuhli* contra varios venenos de especies con “crotoxin-like”, siendo *Ophryacus sphenophrys* la especie que más suero necesitó para lograr dicha neutralización (Neri-Castro et al., 2019). Por otro lado, se demostró que el reconocimiento de un anticuerpo monoclonal (4F6) es capaz de reconocer las “crotoxin-like” de especies de cascabel, pero no la de sphenotoxina, mostrando que la estructura o el epítotope reconocido es distinto (Neri-Castro et al., 2019; Ponce-López et al., 2020). En otros estudios mediante la técnica de ELISA y SPR (“Surface Plasmon Resonance”), se ha utilizado el anticuerpo monoclonal (A56.36), que reconoce la subunidad A de la crotoxina, y se ha visto que este neutraliza la toxicidad mediante la disociación del complejo, ya que el anticuerpo bloquea la unión de ambas subunidades, compitiendo con la subunidad B por la unión a la subunidad A (Choumet et al., 1992).

HIPÓTESIS

- La caracterización de la subunidad B de la sphenotoxina y su comparación con la subunidad B de la crotoxina clásica dará información relevante sobre su mecanismo de acción y las diferencias en capacidad neutralizante de antivenenos, neurotoxicidad y actividad de fosfolipasa.

OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Caracterizar la subunidad B de la sphenotoxina a nivel bioquímico/estructural y analizar las diferencias con respecto a la crotoxina clásica.

4.2 Objetivos particulares

- Generar modelos *in silico* de la Subunidad B de la sphenotoxina.
- Obtener la estructura tridimensional de la subunidad B de la sphenotoxina de manera experimental utilizando la técnica de cristalografía de rayos X.
- Analizar las diferencias entre los aminoácidos de los sitios catalíticos, aminoácidos que interactúan entre las subunidades A y B y aminoácidos externos.
- Determinar la DL_{50} , y actividad de PLA_2 de la subunidad B de la sphenotoxina comparados con la subunidad B de la crotoxina.
- Comparar la capacidad neutralizante y de reconocimiento de dos antivenenos mexicanos para vipéridos (Antivipmyn de Laboratorios Silanes y Faboterápico Polivalente Antiviperino de BIRMEX) y el anticuerpo monoclonal 4F6 con las subunidades B de sphenotoxina y crotoxina.

METODOLOGÍA

5.1 Venenos, antivenenos y anticuerpo monoclonal

Se hizo una mezcla de veneno de 4 ejemplares adultos y 2 juveniles de *O. sphenophrys* provenientes de Cerro Perico, Oaxaca, los cuales se resguardaron a -70°C . Por otra parte, se realizó una segunda mezcla de venenos de ejemplares provenientes de la misma localidad, donde se extrajo el veneno de 3 ejemplares juveniles y un adulto, las muestras se liofilizaron hasta su uso. Ya que los ejemplares son de acotada distribución y hay escasos ejemplares en cautiverio, las muestras de veneno se consiguieron en tiempos diferentes. Por esta razón se realizaron 2 mezclas de veneno en vez de 1.

Se utilizaron los dos antivenenos comerciales mexicanos para realizar las pruebas de reconocimiento y neutralización de las toxinas. Estos son: Antivipmyn (laboratorios Silanes) y Faboterápico polivalente antiviperino (BIRMEX). Del antiveneno Antivipmyn se utilizó el lote: B-0D-32 MAR/24 y de BIRMEX se utilizó el lote: FV043A SEP-20. Ambos antivenenos se obtuvieron en frascos con 35 mg de producto liofilizado, el cual se resuspendió en 10 mL de agua destilada. Por otra parte, el anticuerpo monoclonal 4F6 que reconoce la subunidad B de la crotoxina clásica de *Crotalus durissus terrificus* se encontraba conservado a -70°C resuspendido en agua destilada.

5.2 Cuantificación de proteína

La determinación de la concentración de las toxinas se hizo mediante la cuantificación por BCA (ácido bicinconínico). Este método se basa en el principio del reactivo de Biuret, en donde gracias a la reducción de átomos de cobre por las proteínas en un ambiente alcalino, se genera un color morado característico que se puede medir a 562 nm (Smith et al., 1985). Se utilizó el kit *Pierce® Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay (Thermo Scientific)*, donde se utilizaron estándares marcados por el protocolo.

- Se utilizaron 5 estándares y 3 muestras de proteína por duplicado. Para la solución estándar se utilizaron los reactivos A y B en una proporción 50:1 respectivamente. Se utilizaron los estándares de 20, 40, 80, 160 y 320 µg/mL.
- Se midieron las muestras a 280 nm para estimar las diluciones que se tienen que hacer de las muestras. La subunidad B1 de sphenotoxina se diluyó 1:10, la subunidad B2 de la sphenotoxina se diluyó 1:50 y la subunidad B de la crotoxina 1:3.
- Se midieron las absorbancias de la placa a 562 nm y se obtuvieron las concentraciones.

5.3 Purificación de la subunidad B de la sphenotoxina

A) Exclusión molecular

- Se utilizó una columna de vidrio de 0.9 cm de diámetro y 1.8 m de altura con una capacidad de volumen 130 ml ajustada a un flujo de 12.5 mL/h de PBS 1x con la resina Sephadex G75, donde se agregaron 88.6 mg de veneno completo de *Ophryacus sphenophrys* en un volumen de 1 mL de PBS 1X. Las fracciones se monitorearon a 280 nm por 12 h y se recolectaron utilizando el equipo F9-R General Electric Company®.

Los datos de la exclusión molecular se graficaron utilizando el programa GraphPad Prism 8 y con base en los resultados se distinguieron 4 fracciones principales. Las fracciones se liofilizaron para conservarlas y se resuspendieron en agua destilada al momento de su uso.

- Las fracciones obtenidas de exclusión molecular se probaron en grupos de 3 ratones CD1 (18-20 g) para observar sus efectos. La fracción de interés (FII) que fue con la que los ratones presentaron efectos de neurotoxicidad (parálisis flácida) fue la que se utilizó para seguir los pasos de la purificación de la subunidad B de la sphenotoxina.

B) RP-HPLC de la fracción de interés

- Para RP-HPLC se utilizó la columna Vydac (C₁₈ de 4.6 x 250 mm, área 4.15 cm³). Se utilizó un gradiente con 2 solventes: solvente A (H₂O con ácido trifluoroacético (TFA) 0.1%) y solvente B (100% acetonitrilo) de la siguiente manera: 0% B por 5 minutos, 0-10% B en 10 min, 15-45% B por 60 min, 45-70% B por 10 min, 70% B por 9 min. Las fracciones fueron colectadas manualmente, monitoreadas a 214 nm. Fueron secadas por evaporación y posteriormente se resuspendieron en agua destilada para cuantificarse (Castro et al., 2013; Lomonte et al., 2015; Rivas et al., 2017).
- Se realizó SDS-PAGE 15% en condiciones reductoras y no reductoras para verificar la pureza de las fracciones obtenidas de RP-HPLC. También se obtuvieron las masas de las muestras mediante espectrometría de masas (MALDI TOF).

Los pasos para la purificación de la subunidad B de la sphenotoxina se muestran en la **Figura 6**.

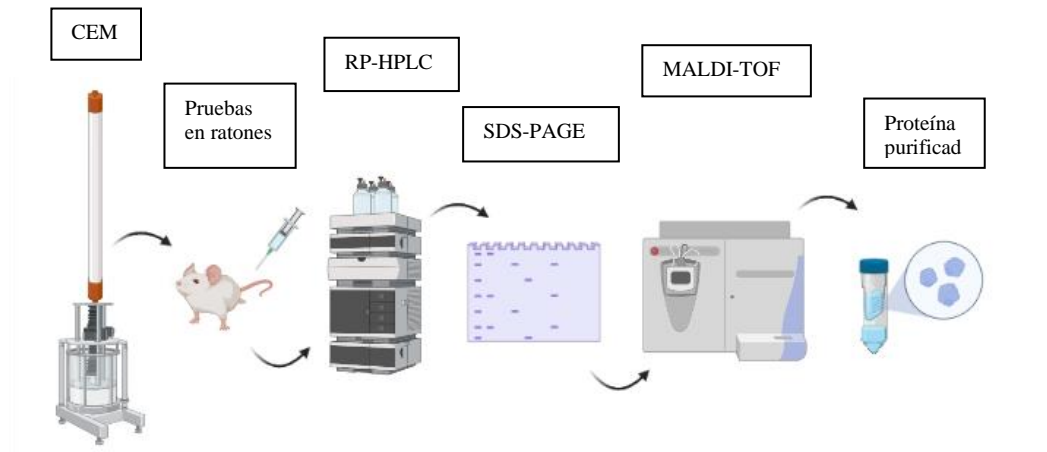


Figura 6 Procedimiento para la purificación de la subunidad B de la sphenotoxina

Procedimiento para la purificación de la subunidad B de la sphenotoxina. Se muestran los pasos en orden; cromatografía de exclusión molecular (CEM), pruebas de los efectos de las fracciones en ratones CD1, seguido de cromatografía de fase reversa líquida de alta resolución (RP-HPLC) de la fracción de interés. Análisis de la pureza de la muestra mediante SDS-PAGE 15% en condiciones reductoras y no reductoras y mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).

5.5 Transferencia a membrana de PVDF

- Se preparó *buffer* de transferencia CAPS (inmobilom-P) para 600 mL. Para esto se pesaron 1.32 g de CAPS (10 mM) y se ajustó el pH a 11 con NaOH 10 N. Se agregaron 120 mL de metanol.
- Se realizó un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) con la proteína de interés (25 µg).
- La membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno) se sumergió en metanol puro por 20 segundos y luego se sumergió en *buffer* CAPS.
- Se utilizó papel filtro (3M) del tamaño del gel. Estos se sumergen en *buffer* CAPS por 5 minutos.
- Una vez teniendo el gel, la membrana y el papel filtro se colocó en la cámara de Western Blot de la siguiente manera: 3 papeles filtro, membrana de PVDF, gel, 3 papeles filtro.
- La cámara se conectó a la fuente de poder y se dejó transferir la muestra por 1 hora a 400 mAmps.
- Para revelar las proteínas la membrana se tiñó con rojo de Ponceau (1 minuto en agitación) y se dejó en solución de destinción (10% isopropanol, 10% ácido acético) por un día.

5.6 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

El reconocimiento de los antivenenos (Antivipmyn (Silanes) y Faboterápico polivalente (BIRMEX)) y el anticuerpo monoclonal 4F6 se midieron mediante la técnica de ELISA como está descrito en (Borja et al., 2018; Rivas et al., 2017).

- Se utilizaron placas de 96 pozos de la marca *SPL life sciences*®, las cuales fueron sensibilizadas con 2 µg/mL de las toxinas de interés utilizando *buffer* de sensibilizado. Se agregaron 100 µL en cada pozo y se incubaron las placas por 1 h a 37°C.
- Se realizaron lavados por triplicado con *buffer* de lavado.
- Se agregó a cada pozo 200 µL de *buffer* de bloqueo y se dejaron incubar las placas por 2 hs a 37 °C.
- Se realizaron lavados por triplicado con *buffer* de lavado.

- Se preparó la solución con anticuerpo primario (Antivipmyn, BIRMEX y anticuerpo monoclonal 4F6). Para Antivipmyn y BIRMEX se agregaron 100 μL en cada pozo a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, haciendo diluciones 1:3, mientras que para el anticuerpo monoclonal 4F6 se agregaron 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se hicieron diluciones 1:2. Las placas se incubaron por 1 h a 37°C.
- Se realizaron lavados por triplicado con *buffer* de lavado.
- Se preparó la solución con anticuerpo secundario (anti-caballo y anti-ratón acoplados a HRP) haciendo dilución 1:5,000 para Antivipmyn y BIRMEX y 1:4,000 para anticuerpo monoclonal 4F6.
- Se realizaron lavados por triplicado con *buffer* de lavado.
- Para el revelado de las placas se utilizó ABTS (75 μL por 10 mL de *buffer* ABTS) y peróxido de hidrógeno (4 μL por cada 75 μL de ABTS). La reacción se detuvo con 30 μL de SDS 10% a los 20 min para posteriormente leer las placas a 405 nm.

5.7 Actividad de PLA₂ mediante método titulométrico

La actividad de PLA₂ se midió con el método titulométrico con yema de huevo, donde se reporta en unidades específicas definidas como μmol de NaOH consumidas por minuto por miligramo de toxina. Las μmol de NaOH consumidas son directamente proporcionales a la cantidad de ácidos grasos liberados por acción de la actividad de PLA₂ (Bénard Valle, 2009; Shiloah et al., 1973).

- Se prepararon 150 mL de *buffer* estándar (0.1 M NaCl, 0.01 M CaCl, 0.1% tritón). Se separó una yema de huevo separándola de la clara y secando la membrana con papel secante y se pesó. Se preparó la solución de sustrato para actividad de PLA₂ con el *buffer* estándar con 10% yema de huevo.
- Para medir la actividad se colocaron en agitación 500 μL de la solución con yema de huevo y se ajustó el pH (8.00, 8.02, 8.03, dependiendo de la enzima a medir) con NaOH 50 mM.
- Se agregaron las toxinas de interés a la muestra en agitación y se tomó el tiempo que tardó la muestra en alcanzar un pH de 7.99. Se hicieron 3 repeticiones con medición de 5 tiempos (vueltas).

- Los datos se analizaron utilizando Excel y GraphPad Prism 8 para conseguir la actividad de PLA₂.

5.8 Actividad de PLA₂ mediante 4-NOBA

El ácido 4-nitro-3-octaoiloxybenzoico se utilizó como sustrato para medir la actividad de PLA₂ de las subunidades B de sphenotoxina y crotoxina clásica (Holzer y Mackessy, 1996; Lomonte et al., 2012; Neri-Castro et al., 2019).

- Se preparó *buffer* Tris-HCl 0.01 M, CaCl₂ 0.01 M, NaCl 0.1 M, pH 8.0.
- Se disolvió el sustrato 4-NOBA (4-nitro-3-octanoiloxy-ácido benzoico) en acetonitrilo a 1 mg/ml, quedando a una concentración final de 0.32 mM (100 µg/mL).
- Se agregaron 200 µl de *buffer*, 25 µl de sustrato y 25 µl de muestra (15 µg de PLA₂) en una placa.
- La muestra se incubó a 37°C y se leyó la absorbancia a los 10, 20, 30 y 60 min a 405 nm.
- Los valores se multiplicaron por un factor arbitrario de 10.

5.9 Secuenciación, espectrometría de masas y alineamiento

La secuenciación de las isoformas de subunidad B de la sphenotoxina se obtuvieron mediante degradación de Edman con un secuenciador de proteína PPSQ-31A (Shimadzu). Para esto se realizó el protocolo de reducción y alquilación con las siguientes condiciones:

- Se disolvió la muestra (200 µg de B2 y B1 por separado) en Tris-HCl 200 mM a pH 8.6 con 1 mg/ml de EDTA 6 M cloruro de guanidinio (agente reductor).
- Se agregó 0.5 mg de DTT (ditiotreitól) disuelto en el mismo *buffer* (50 µL).
- Se burbujeó la muestra con N₂ por 5 minutos. Se tapa la muestra y se colocó a 55 °C por 45 minutos.
- Se agregó ácido iodoacético 5 mg disuelto en el mismo *buffer*. Se cubre de la luz con aluminio, se mezcla y se dejó en reposo a temperatura ambiente (25 °C) por 30 minutos.
- Se separó la mezcla de los otros reactivos en una columna de biogel equilibrada con ácido acético al 20%.

Se realizó digestión enzimática con la proteasa V8 para la secuenciación de los péptidos por degradación de Edman. Para determinar las masas de las subunidades B aisladas de la sphenotoxina se utilizó espectrometría de masas (MALDI-TOF-TOF 4800 *Proteomics Plus*) con *LCQ Fleet Ion Trap*. El alineamiento de las secuencias se realizó con el servidor Clustal Omega (EMBL-EBI).

6 Pruebas de cristalización

- Las pruebas de cristalización se realizaron con el método de “micro batch” utilizando el kit de cristalización IndexTM el cual se eligió ya que contiene condiciones similares a las que se han utilizado para generar cristales de crotoxina y sus isoformas, así como PLA₂ de otras especies de serpientes. Las pruebas se realizaron en placas de 96 pozos.
- La sphenotoxina purificada se resuspendió en Tris HCl 20 mM a pH 7.3, quedando a una concentración de 11 mg/ml.
- Se agregó 1 µL de muestra a cada uno de los pozos, junto con 1 µL de la condición de cristalización. Finalmente, se agregó una gota de parafina para cubrir la muestra. Las pruebas se dejaron a 18 °C.
- Con los resultados de las primeras pruebas de cristalización se plantearon nuevas matrices y la proteína se resuspendió en Tris HCl 20 mM a pH 7.3 quedando a una concentración de 19 mg/ml.
- Las pruebas de cristalización se observaron después de un mes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Purificación

En la **Figura 7** se muestran los cromatogramas superpuestos de RP-HPLC de las 2 mezclas de veneno de *O. sphenophrys* que se utilizaron para la purificación de la subunidad B de la sphenotoxina. Al minuto 56 se identificó el pico de interés, que corresponde con lo descrito en la literatura (Neri-Castro et al., 2019). Estos cromatogramas superpuestos muestran que a pesar de que hay algunas variaciones entre las mezclas de venenos (en composición y proporción), el componente de interés está presente en ambos. Una vez sabiendo esto se continuó con el proceso de purificación.

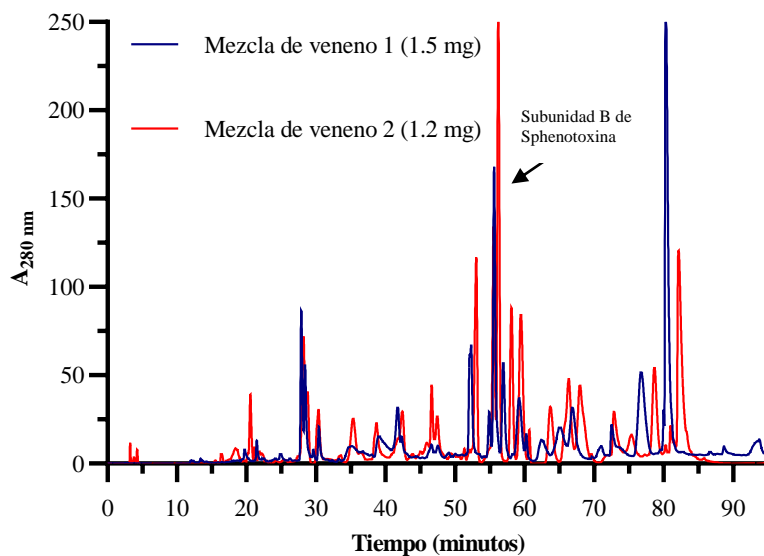


Figura 7 Cromatograma de RP-HPLC de veneno de *O. sphenophrys*

Se muestran 2 Cromatogramas superpuestos donde se observa el perfil de las 2 mezclas de venenos utilizados para la purificación de la subunidad B de la sphenotoxina. Los perfiles se observan a 280 nm y se dejaron correr por 95 min.

Los resultados de exclusión molecular mostraron cuatro fracciones principales, las cuales fueron analizadas por SDS-PAGE (**Figura 8**). Se puede observar que los componentes proteicos fueron separados por peso, en la F1 se observan bandas de 35-247 kD que con base en reportes anteriores podría tratarse de serino proteasas, metaloproteasas y L-amino oxidasas (Neri-Castro et al., 2019). En la fracción II se observan bandas de 12-50 kDa, donde aparte de serino proteasas

se encuentran las PLA₂. La subunidad B de la sphenotoxina se señala con flechas negras alrededor de las 14 kDa. (Neri-Castro et al., 2019). Las fracciones III y IV no se observan bandas más que las misma de ~14 kDa que se encuentran en las fracciones II y III, en condiciones reductoras. Posteriormente, se inyectaron grupos de 3 ratones de la cepa CD1 (20 µg por ratón en PBS 1X) de cada una de las fracciones. Las fracciones que mostraron neurotoxicidad (fracción II y III) fueron analizadas mediante RP-HPLC como se mostrará más adelante. En la **Tabla 3** se muestran los mg de las 4 fracciones recuperadas de CEM donde se observa que se recupera el 98% de la muestra (86.9 mg de 88.6 mg) siendo la fracción II de la que se obtuvo mayor cantidad con respecto a las otras (48.6 mg). Las fracciones fueron liofilizadas y almacenadas a -70°C hasta su uso.

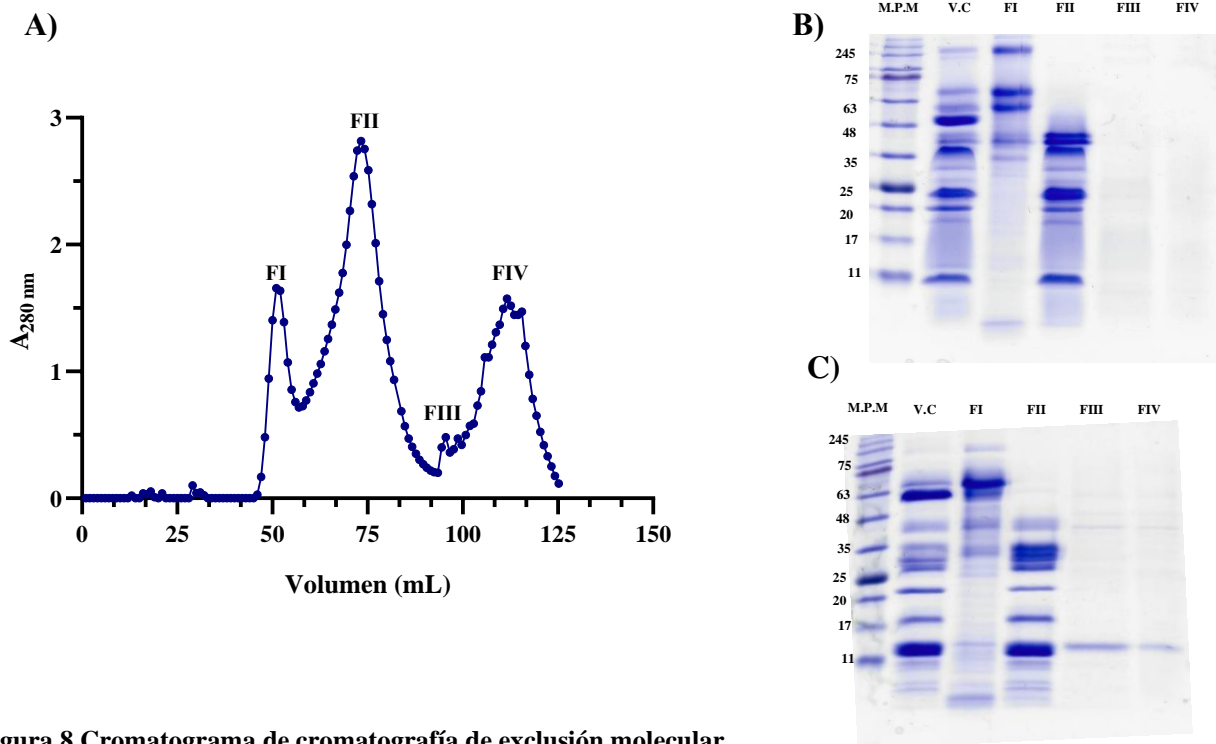


Figura 8 Cromatograma de cromatografía de exclusión molecular

A) Cromatograma con columna de exclusión molecular de 0.9 cm de diámetro y 1.8 m de altura con una capacidad de volumen 130 mL ajustada a un flujo de 12.5 mL/h de PBS 1X. Se utilizó la resina Sephadex G75. **B)** SDS-PAGE 15% Condiciones no reductoras carriles: 1 MPM, 2 V.C, 3 FI, 4 FII, 5 FIII, 6 FIV. **C)** SDS-PAGE 15% Condiciones reductoras carriles: 1 MPM, 2 V.C, 3 FI, 4 FII, 5 FIII, 6 FIV. De V.C se cargaron 25 µg y de todas las fracciones 15 µg.

Tabla 3 Fracciones recuperadas de CEM

Fracciones	mg/mL	Volumen (mL) obtenidos por fracción	Cantidad/fracción (mg)
FI	0.9	12	11.1
FII	1.3	37.5	48.6
FIII	0.5	9.5	4.6
FIV	1	22.5	22.6
Cantidad total recuperada (mg)			86.9

Se muestra la absorbancia de las muestras obtenidas a 280 nm de las fracciones de exclusión molecular con la columna de vidrio, volumen recuperado y mg totales. Se cargaron inicialmente 88.6 mg de veneno de *O. sphenophrys*. La concentración fue obtenida por absorbancia a 280 nm.

Una vez obtenidos estos resultados se procedió a la siguiente etapa de purificación en la que se realizó RP-HPLC de la fracción II de CEM. En la **Tabla 4** se presentan las cantidades recuperadas de estas fracciones. Por otro lado, en la **Figura 9** se muestra el cromatograma de la fracción II, de la cual se recuperaron manualmente los picos 1-5 que se muestran señalados con flechas negras. En los geles de poliacrilamida se puede ver que en los carriles de las fracciones 4 y 5 tanto en condiciones reductoras como no reductoras, hay bandas de ~14 kDa. Sin embargo, también se observan bandas de ~28 kDa y ~44 kDa. Una de las bandas de ~45 kDa fuertemente marcada se encuentra en el carril 4 en condiciones no reductoras, mientras que las bandas de ~28 kDa se ven tenues en los carriles 4 y 5 en condiciones reductoras. Ya que se observaron más bandas que no estaban alrededor de 14 kDa, las muestras se analizaron mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) para obtener el peso molecular. La fracción 4 presentó un único peso molecular de 13,701.7 Da y la fracción 5 uno de 14,262.7 Da.

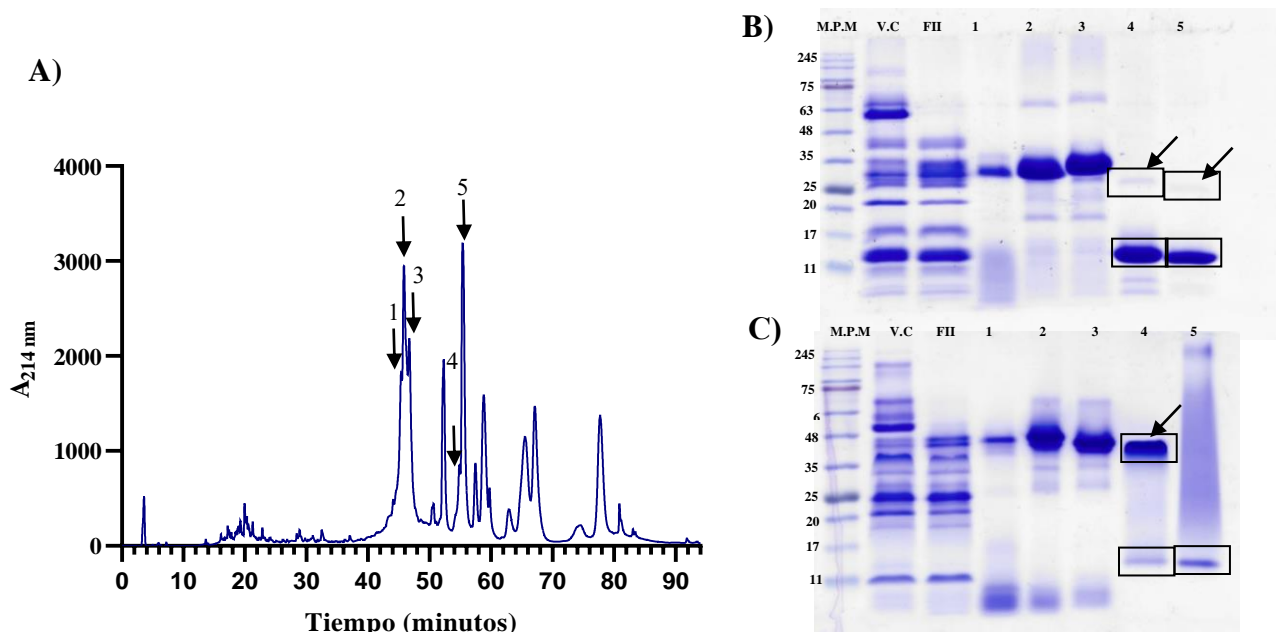


Figura 9 Cromatograma de RP-HPLC de FII y SDS-PAGE 15%

A) Se agregaron 2 mg de FII y se obtuvo el cromatograma de RP-HPLC, con la columna C₁₈ 4.6 x 250 mm Vydac (área 4.15 cm³). Solventes A (H₂O con TFA 0.1%) y solvente B (100% acetonitrilo). **B)** SDS-PAGE 15%. Condiciones reductoras carriles: 1: M.P.M, 2: V.C, 3: FII, 4: fracción 1, 5: fracción 2, 6: fracción 3, 7: fracción 4, 8: fracción 5. **C)** SDS-PAGE 15%. Condiciones no reductoras carriles: 1 M.P.M, 2 V.C, 3: FII, 4: fracción 1, 5: fracción 2, 6: fracción 3, 7: fracción 4, 8: fracción 5. De V.C se cargaron 25 µg y de todas las fracciones 15 µg.

Tabla 4 Fracciones recuperadas de RP-HPLC

Fracciones	A _{280 nm} (µg/ µL)	Volumen (µL)	U.A _{280 nm} (µg)
1	0.2	100	20
2	1	100	100
3	1.3	100	130
4	1.1	150	165
5	1.8	150	270

Se muestra la absorbancia de las muestras obtenidas a 280 nm de las fracciones de RP-HPLC, volumen recuperado y µg totales. Se cargaron inicialmente 2 mg de FII de CEM. La concentración fue obtenida por absorbancia a 280 nm.

Como se puede observar en la **Figura 10**, el SDS-PAGE en condiciones reductoras muestra las bandas enumeradas del 1-3, donde se utiliza el control de una muestra con la subunidad B de la crotoxina con peso de 14 kDa (CB, en el carril 2 y 6) y se corren las fracciones 4 (carriles 3 y 7) y 5 de RP-HPLC (carriles 4 y 8). Ya que los resultados de espectrometría de masas dieron las masas anteriores, se realizó una transferencia a membrana de PVDF para secuenciar los aminos terminales de las bandas enumeradas. Los resultados de la secuenciación por degradación de Edman se muestran en la **Tabla 5**, donde se puede ver que se trata de dos secuencias diferentes: las de las bandas 1 y 2 que son las mismas y la banda 3. Observando estas y que se trataba de secuencias parecidas, se tomaron las fracciones 4 y 5 de RP-HPLC como dos isoformas de la subunidad B de la sphenotoxina, las cuales se nombraron B1 y B2 respectivamente. Ya que los resultados muestran que se trata de isoformas y que son las únicas proteínas en estas fracciones, las bandas de ~28 kDa y ~44 kDa pueden deberse a dímeros o trímeros que se generen de cada una de las isoformas, explicando así la diferencia en el peso molecular pero la pureza en los resultados de masas y de secuenciación.

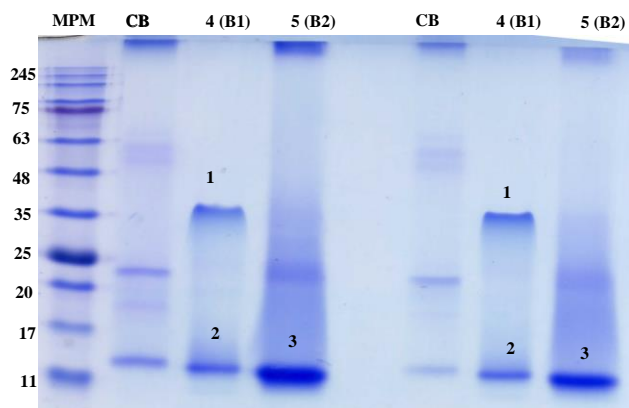


Figura 10 SDS-PAGE 15%

A) SDS-PAGE 15%. Condiciones reductoras carriles: 1 MPM, 2 crotoxina B, 3 sphenotoxina B1, 4 sphenotoxina B2, 5 ----. Condiciones no reductoras carriles: 6 crotoxina B sphenotoxina B1, 4 sphenotoxina B2. De todas las fracciones se cargaron 5 µg.

Tabla 5 Secuencias de las bandas 1, 2 y 3

	Secuencias amino terminal
Banda 1	DLLQFRKMIKKMTGKEPAIS
Banda 2	DLLQFRKMIKEMTGKEPAISYAFYGCYC
Banda 3	HLLQFNKMIKEETGKNAIPFYAFYGCYGGMG

Secuencias del amino terminal obtenidas después de la realización de la transferencia a membrana de PVDF y tinción con rojo de Ponceau. Se recortaron las bandas de interés y se guardaron las membranas a 4°C. Las membranas se secuenciaron por degradación de Edman.

Letalidad

En la **Tabla 6** se muestran los datos obtenidos de la dosis letal media (DL_{50}) de las dos isoformas identificadas de la subunidad B de la sphenotoxina (B1 y B2) y de la subunidad B de la crotoxina clásica (CB), donde se utilizaron ratones de la cepa CD1 de 18-19 g. Las DL_{50} se obtuvieron administrando diferentes dosis de las toxinas respectivas en solución salina (PBS 1X) por vía intravenosa. Las diferentes dosis de administradas de B2 (8, 10, 10.2, 11, 12, 15 $\mu\text{g}/\text{ratón}$) se realizaron por triplicado (tres ratones CD1 para cada punto), de igual manera se administraron las dosis para B1 (10, 15, 20, 35, 38, 40, 60 $\mu\text{g}/\text{ratón}$). Los datos fueron transformados a logaritmo (base 10) y ajustados a una regresión no lineal utilizando el programa GraphPad Prism 8. La DL_{50} representa los $\mu\text{g}/\text{g}$ de ratón que matan a la mitad de una población de ratones, la cual se obtuvo con el valor de EC_{50} de la tabla de datos de GraphPad Prism 8.

Con la obtención de estos datos se puede observar que la isoforma B2 es 3.6 veces más letal que la isoforma B1. Por otra parte, la DL_{50} para la crotoxina clásica (CB) es de 0.35 $\mu\text{g}/\text{g}$, siendo 1.5 veces más letal que la B2 y 5.6 veces más que la B1.

A pesar de que los aminoácidos catalíticos H47 y D89 se conservan tanto en las isoformas de la subunidad B de la sphenotoxina (B1 y B2) como en la subunidad B de la crotoxina clásica, (como se muestra en la **Figura 11**) las isoformas presentan diferentes letalidades, lo cual nos habla de que estos aminoácidos, como es de esperarse, no son los únicos implicados en la letalidad y en la neurotoxicidad.

Tabla 6 Letalidad

	DL₅₀ µg/ratón (CI 95%)	DL₅₀ µg/g de ratón
CB	6.7 (6.5-6.8)*	0.35 (0.3-0.4)
B1	37.4 (33.3-39.3)	1.9 (1.7-2)
B2	10.3 (10.1-10.5)	0.54 (0.53-0.55)

Dosis letal media de ambas isoformas de la subunidad B de la sphenotoxina y de la subunidad B de la crotoxina clásica. El resultado de la DL₅₀ de CB fue realizado por la Biol. Mitzi Amaro*

Secuencias, peso y modelos

En la **Tabla 7** se muestran los pesos moleculares de la subunidad B de la crotoxina y las subunidades B de ambas isoformas encontradas de la subunidad B de la sphenotoxina. Para la crotoxina clásica, se obtuvo un peso molecular de 14,295 Da mientras que para las isoformas B1 y B2 de la sphenotoxina se obtuvieron los pesos moleculares de 13,701.7 y 14, 262.77 Da respectivamente. Se puede observar que a pesar del alto porcentaje de identidad entre las isoformas y la crotoxina, existen cambios en aminoácidos a lo largo de las secuencias que tienen un impacto en el peso molecular, siendo así la crotoxina 593.3 kDa más pesada que la isoforma B1 y 32.2 kDa más pesada que la isoforma B2. En la **Tabla 7** se muestran dos pesos moleculares para las isoformas de la subunidad B de la sphenotoxina, esto se debe a que las masas se midieron mediante dos espectrómetros de masas, uno en el instituto Clodomiro Picado en Costa Rica y otro en el Instituto de Biotecnología e la UNAM. Ambas masas a pesar de ser diferentes son muy cercanas y demuestran que las tres subunidades B de las toxinas, presentan sus diferencias en peso.

Por otra parte, en la **Figura II**, se muestran los empalmes de las secuencias de las isoformas con respecto a la crotoxina clásica. De la isoforma B1 de la sphenotoxina (**Figura II A**) sólo se muestran los primeros 45 aminoácidos del amino terminal. Con la información de esta secuencia que se pudo obtener, se puede observar que hay un 73.3% de identidad con respecto a la crotoxina Clásica. En el 23.7% de diferencias, se muestran algunos aminoácidos a lo largo del amino terminal que podrían tener implicaciones relevantes para explicar las diferencias en

neurotoxicidad a nivel estructural. Los aminoácidos que presentan diferencias y que tienen un cambio en propiedades fisicoquímicas se encuentran circulados en rojo. Dentro de estos, se muestran ciertos cambios en las isoformas que están implicados en la estabilidad del complejo de A+B (como el W30), mientras que los aminoácidos catalíticos se conservan (H47 y D89). Por otra parte, en la **Figura II B** se muestra el empalme de la secuencia parcial de la isoforma B2 reportada en (Neri-Castro et al., 2019) con la crotoxina clásica. Se observa que hay un 85% de identidad. Se encuentran circulados en rojo los aminoácidos que en la isoforma B1 tuvieron cambios relevantes. En el caso de la isoforma B2, en las mismas zonas no ocurren cambios tan relevantes como con la isoforma B1. Finalmente se muestra en la **Figura II C**, la comparación entre el amino terminal de la B1 con la B2 previamente reportada. Únicamente comparando el amino terminal de las dos isoformas se puede ver que hay un 75% de identidad. A pesar de que no se podría concluir que el amino terminal es el responsable de los cambios en actividad o neurotoxicidad de las isoformas, este nos da un indicio de que sí es un elemento que juega un papel importante.

Tabla 7 Peso molecular

Fracción	Peso molecular (Da)
Subunidad B de Sphenotoxina reportada	14,264
Sphenotoxina B1	13,699.14 / 13,701.7
Sphenotoxina B2	14,710/ 14, 262.77
Crotoxina B	14, 187.65/ 14,295

Se muestran los pesos moleculares obtenidos de las isoformas de la subunidad B de la sphenotoxina y de la subunidad B de la crotoxina clásica mediante espectrometría de masas.

Figura 11 Secuencias alineadas de subunidad B de crotoxina clásica, sphenotoxina B1 y B2

Secuencia de aminoácidos de las isoformas de la subunidad B de la sphenotoxina (B1 y B2) alineada con la subunidad B de la crotoxina clásica. A) Alineamiento de crotoxina con amino terminal de B1 de sphenotoxina. B) Alineamiento de crotoxina con B2 de sphenotoxina reportada en (Neri-Castro et al., 2019). Alineamientos realizados en CLUSTAL OMEGA y porcentaje de identidad. (*) Coincidencia, (:) Existe una conservación fuerte, (.) Existe una conservación débil, () no hay coincidencia. Colores en el alineamiento; Azul, aminoácidos ácidos; rojo, aminoácidos hidrofóbicos o chicos; verde, aminoácidos con grupos hidroxilo, sulfhidrilo o amina; rosa, aminoácidos básicos.

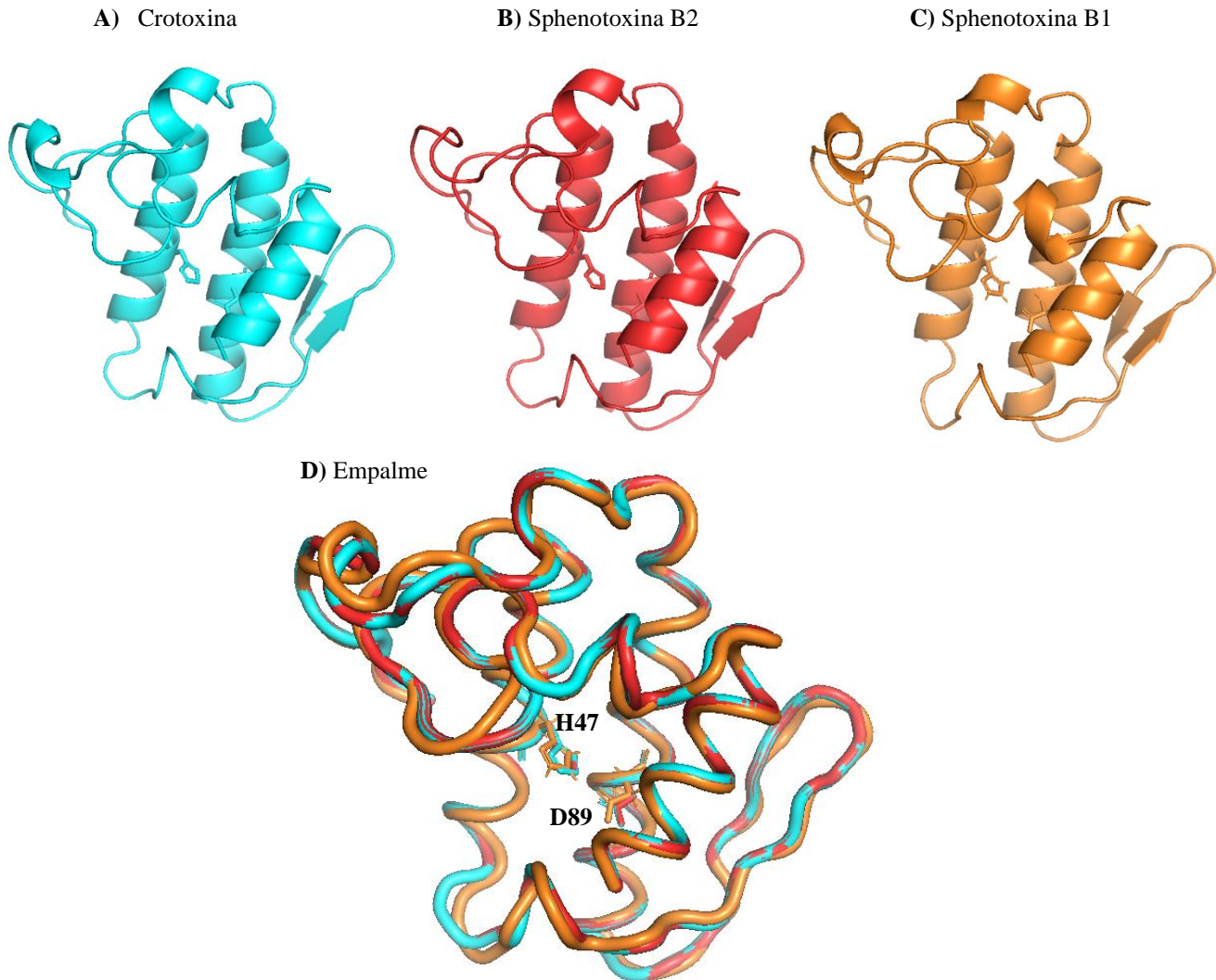


Figura 12 Empalme de subunidades B crotoxina y sphenotoxina

A) Estructura de la subunidad B de la crotoxina (estructura cristalográfica del complejo CA₂CBb (PDB: 3R0L)) representada en color cian, B) subunidad B2 de la sphenotoxina representada en rojo y C) subunidad B1 de la sphenotoxina representada en naranja. D) empalme de las tres estructuras anteriores en representación de trazo de cadena principal. Modelo realizado en ITASSER utilizando el visualizador PyMOL 2.5.0.

En la **Figura 12 A** se observa la estructura de la subunidad B de la crotoxina (cian), la subunidad B de la sphenotoxina B2 (rojo) **Figura 12 B** y la estructura de la subunidad B de la sphenotoxina B1 (naranja) **Figura 12 C**. Los aminoácidos catalíticos (H47 y D89) se encuentran en representación de líneas, donde si analizamos las 3 estructuras, se ve que se encuentran en los mismos sitios y son de la misma naturaleza. Por otro lado, los 7 puentes disulfuro que se encargan de estabilizar la subunidad B de la crotoxina, también se encuentran conservados en las isoformas de la sphenotoxina (B1 y B2). La figura **Figura 12 C** muestra los trazos de la cadena principal de aminoácidos y se puede ver que siguen la misma trayectoria, como se podría esperar, ya que son modelos hechos por homología. Sin embargo, esto nos puede indicar que las diferencias más importantes no se encuentran en la estructura general, si no que se trata de las cadenas laterales de los aminoácidos que, al cambiar de propiedades fisicoquímicas y estructurales, podrían explicar las variaciones en algunas propiedades que se miden en este trabajo, como el reconocimiento de antivenenos y del anticuerpo monoclonal (4F6), cuyos resultados se presentarán más adelante. El hecho de que sean las cadenas laterales las que podrían explicar las diferencias, indica que es necesario analizarlas e identificar aquellas que estén mayormente expuestas.

Como se mencionó anteriormente, en las tres estructuras se muestran los aminoácidos catalíticos formado H47 y D89, los cuales son altamente conservados. Teniendo como referencia los aminoácidos catalíticos, podemos observar en la **Figura 13**, cómo se modifican las superficies de contacto con los cambios en los aminoácidos 1 y 30. En el caso de la isoforma B1 (en naranja), la mutación de H1 por D1 podría tener grandes implicaciones en la estabilidad del complejo (asociación entre subunidad A y B) por el cambio en el acomodo espacial de los aminoácidos (Fernandes et al., 2017). En el caso de la de la crotoxina clásica, se sabe que el cambio de propiedades fisicoquímicas en el primer aminoácido de la secuencia puede proceder a un desplazamiento en el acomodo tridimensional de W70 y K69, lo cual puede llevar a una disminución en la afinidad entre ambas subunidades (Faure y Saul, 2011). Por otra parte, la mutación de W30 por G30 en la isoforma B1 también podría tener implicaciones en la estabilidad del complejo de A+B, ya que se sabe que, en la crotoxina, el W30 interactúa con D99 de la subunidad A (isoforma CA₂) mediante una interacción polar directa. En este caso, no sólo cambiarían las propiedades químicas de la interacción, sino que hay un cambio de un aminoácido

voluminoso por uno no voluminoso, lo cual disminuye la superficie de contacto, como se muestra en la **Figura 13 C**. La inestabilidad en la formación del complejo de B1 con A por esta mutación podría explicar las diferencias en neurotoxicidad con respecto a la subunidad B de la crotoxina e incluso las diferencias con la isoforma B2 de la sphenotoxina (Faure y Saul, 2012). Con respecto a la isoforma B2 de la sphenotoxina, podemos ver que no hay mutaciones en los sitios 1 y 30. La crotoxina (**Figura 13 A**) y la isoforma B2 de la sphenotoxina (**Figura 13 B**) se ven exactamente igual con respecto a las superficies que brindan estos aminoácidos, lo cual podría explicar por qué son más parecidas en letalidad que con respecto a la B1.

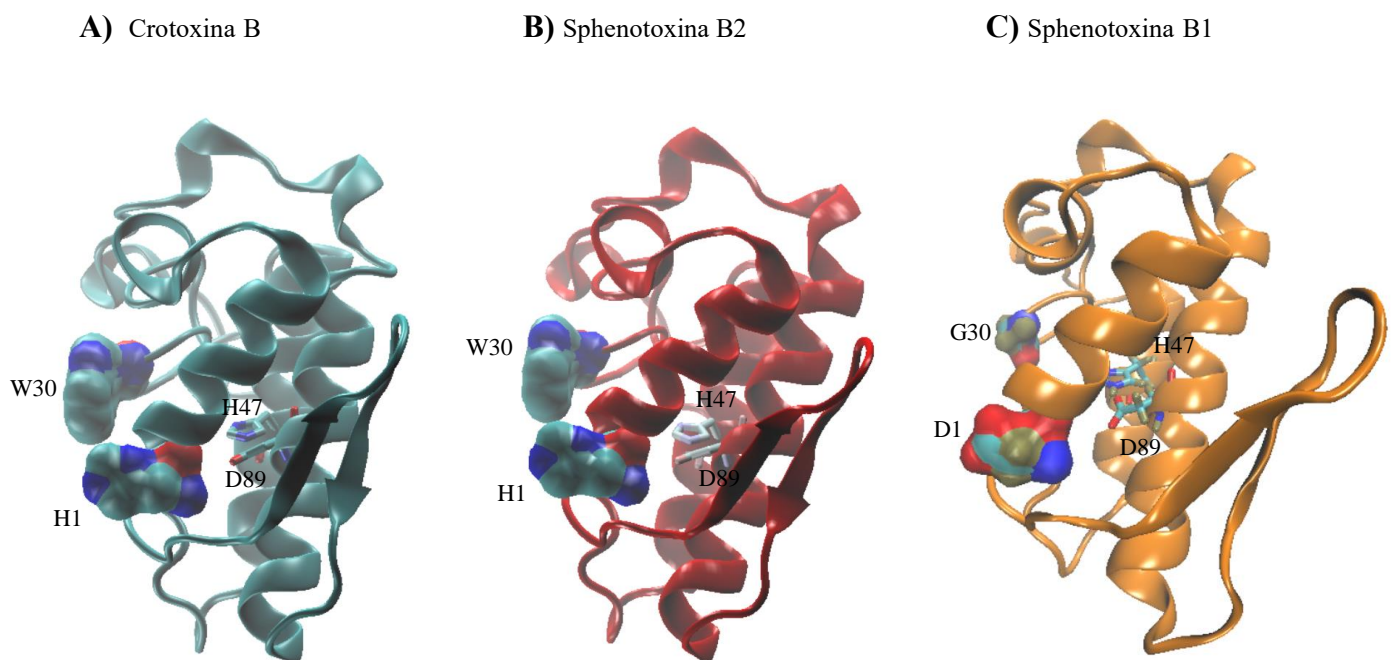


Figura 13 Modelos H1 W30

Modelos de la subunidad B de la crotoxina clásica y 2 isoformas de subunidad B de sphenotoxina utilizando SWISS MODEL ITASSER y el visualizador VMD 1.9.3. **A)** crotoxina B (PDB: 3R0L) en azul, **B)** sphenotoxina B2 en rojo, **C)** sphenotoxina B1 en amarillo. Se muestra el sitio catalítico en las tres figuras, formado por His47 y Asp89. Se resalta como superficie los aminoácidos H1 y W30 de la crotoxina y los aminoácidos 1 y 30 de las isoformas para su comparación.

Por otra parte, en la **Figura 14**, se observan los mismos modelos que en la **Figura 13**, aunque en diferentes posiciones y observando la superficie de los aminoácidos 17-20. De nuevo, se puede observar que en estos aminoácidos la B1 es la única que presenta cambios de aminoácidos con

respecto a la subunidad B de la crotoxina clásica y la isoforma B2. La posición en la que se encuentran estas representaciones da pie a imaginar la subunidad A, tanto de crotoxina como de sphenotoxina, del lado izquierdo de los modelos. A pesar de que los aminoácidos 17-20 no están reportados en la literatura como particularmente relevantes para la formación del complejo A+B, en las figuras se puede observar cómo las mutaciones de A17-P17, I18-A18, P19-I19, F20-S20 de la isoforma B1 pueden modificar las interacciones y la superficie de contacto. Sobre todo, los cambios en aminoácidos de I18-A18 y F20-S20, podrían explicar la disminución en la superficie, ya que son cambios que disminuyen el volumen y por lo tanto el contacto.

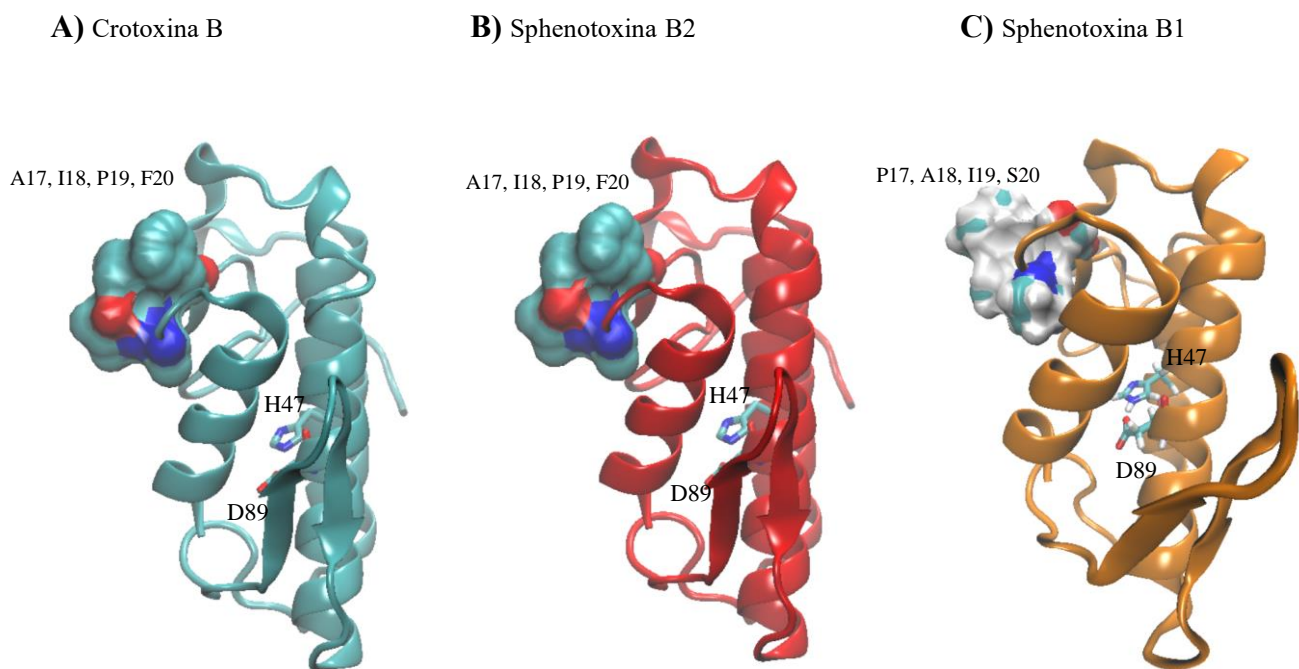


Figura 14 Modelos A17 I18 P19 F20

Modelos de la subunidad B de la crotoxina clásica y 2 isoformas de subunidad B de sphenotoxina utilizando SWISS MODEL ITASSER y el visualizador VMD 1.9.3. **A)** crotoxina B (PDB: 3ROL) en azul, **B)** sphenotoxina B2 en rojo, **C)** sphenotoxina B1 en amarillo. Se muestra el sitio catalítico en las tres figuras, formado por His47 y Asp89. Se resalta como superficie los aminoácidos A17, I18, P19 y F20 de la crotoxina y los aminoácidos 17, 18, 19 y 20 de las isoformas para su comparación.

En la **Figura 15** se ve la representación de las subunidades B con los aminoácidos 11, 12 y 14 representados como superficie. En el caso de la crotoxina B y la sphenotoxina B2 hay cambios en

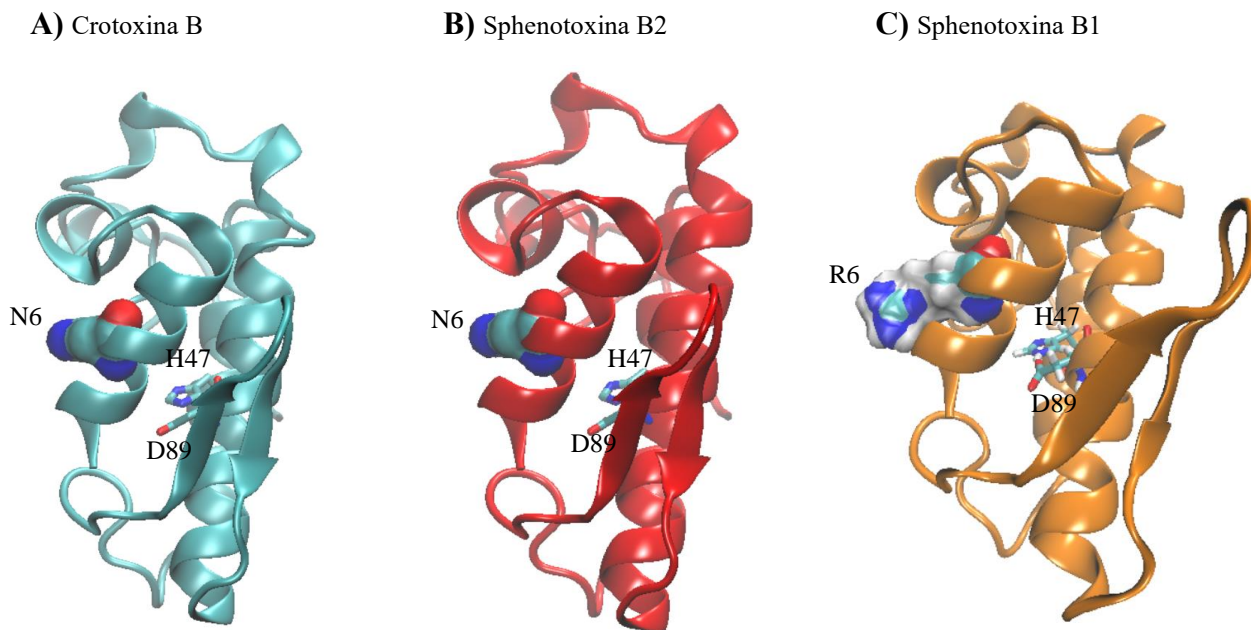


Figura 16 Modelos N6

Modelos de la subunidad B de la crotoxina clásica y 2 isoformas de subunidad B de sphenotoxina utilizando SWISS MODEL ITASSER y el visualizador VMD 1.9.3. **A)** crotoxina B (PDB: 3R0L) en azul, **B)** sphenotoxina B2 en rojo, **C)** sphenotoxina B1 en amarillo. Se muestra el sitio catalítico en las tres figuras, formado por His47 y Asp89. Se resalta como superficie el aminoácido N6 de la crotoxina y los aminoácidos No. 6 de las isoformas para su comparación.

Por otra parte, en la **Figura 17** se observa como superficie un cambio en aminoácido en la sphenotoxina B1, donde el cambio no se encuentra en la interfase del complejo, si no que queda expuesto al solvente. Este podría ser un cambio en un epítipo que reconozcan los antivenenos de manera diferente, o que incluso no reconozca el anticuerpo monoclonal 4F6, como se ve en la **Figura 18** y en la **Tabla 8**. Sin embargo, para poder asegurar que se tratara de este epítipo el reconocimiento del anticuerpo 4F6 se tendrían que realizar más pruebas.

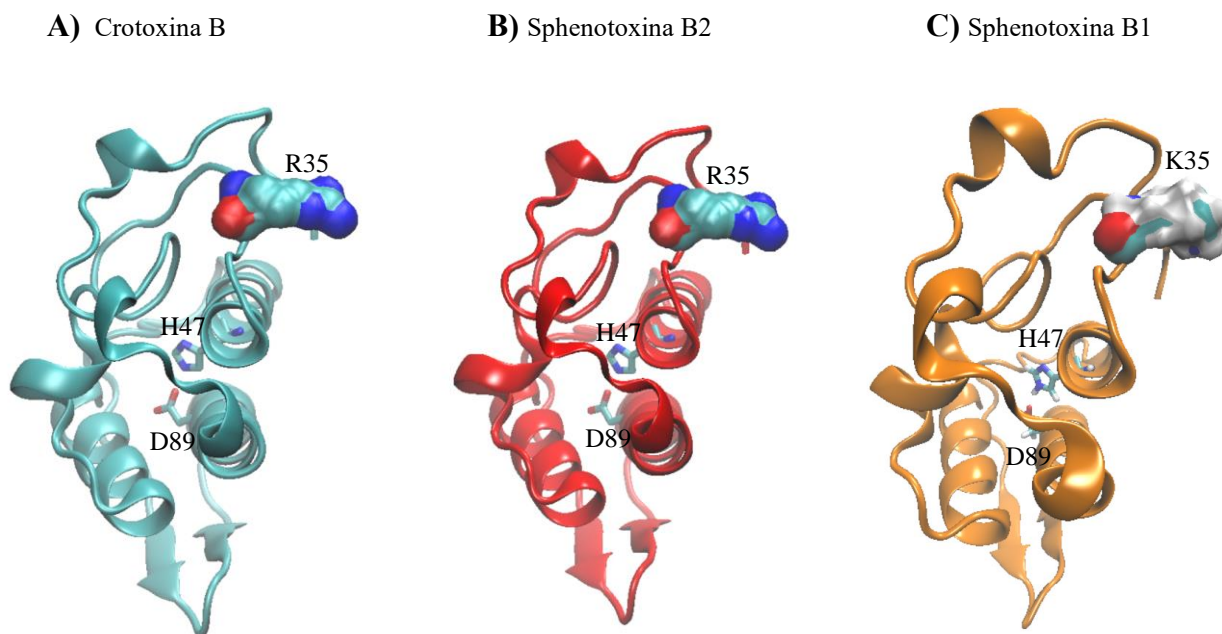


Figura 17 Modelos R35

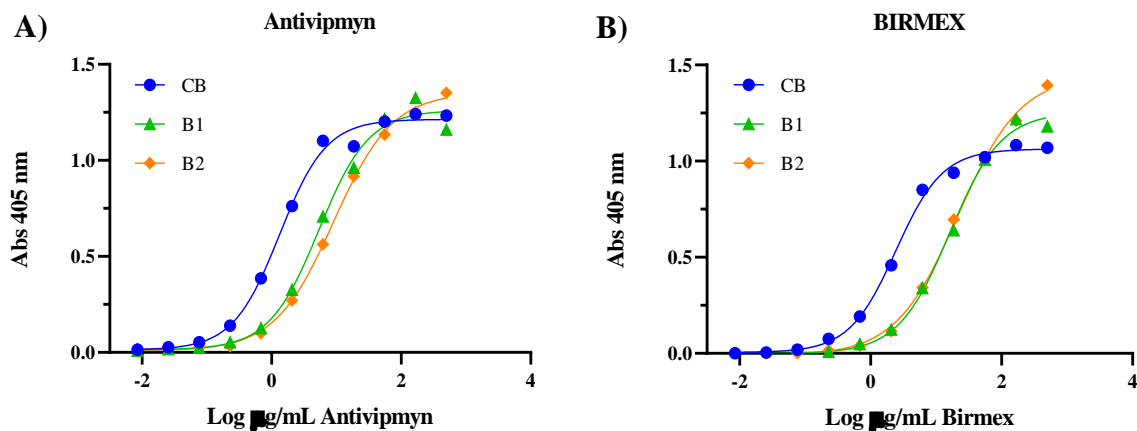
Modelos de la subunidad B de la crotoxina clásica y 2 isoformas de subunidad B de sphenotoxina utilizando SWISS MODEL ITASSER y el visualizador VMD 1.9.3. **A)** crotoxina B (PDB: 3ROL) en azul, **B)** sphenotoxina B2 en rojo, **C)** sphenotoxina B1 en amarillo. Se muestra el sitio catalítico en las tres figuras, formado por His47 y Asp89. Se resalta como superficie el aminoácido R35 de la crotoxina y los aminoácidos No. 35 de las isoformas para su comparación.

Pruebas de reconocimiento de antivenenos, anticuerpo monoclonal y anticuerpos policlonales

Se realizaron pruebas de reconocimiento de antivenenos con ambas isoformas de la subunidad B de la sphenotoxina y con la subunidad B de la crotoxina por medio de títulos de ELISA. En la **Figura 18 (A-C)** se prueba Antivipmyn, Faboterápico Polivalente Antiviperino (BIRMEX), anticuerpo monoclonal 4F6 que reconoce la subunidad B de crotoxina.

En la **Tabla 8** se presentan los valores de los títulos. Se observa que hay un mayor reconocimiento de ambos antivenenos por la subunidad B de la crotoxina clásica. La isoforma B1 es 4 veces menos reconocida por Antivipmyn y 7 veces menos reconocida por el antiveneno de BIRMEX con respecto a la subunidad B de la crotoxina clásica (CB). Por otra parte, la isoforma B2 de la

subunidad B de la sphenotoxina es 7 veces menos reconocida por Antivipmyn y 9 veces menos reconocida por el antiveneno de BIRMEX con respecto a la subunidad B de la CB. Este resultado de primera instancia parecería contra intuitivo, ya que como se observó en los modelos anteriores y las secuencias de las toxinas, la isoforma B2 es la que tiene un mayor porcentaje de identidad con respecto a la CB (86%), mientras que la isoforma B1 tiene un menor porcentaje de identidad con respecto a la CB (58%). Por otra parte, el anticuerpo monoclonal 4F6 anti-crotoxina reconoce la CB mientras que no reconoce ninguna de las isoformas de la subunidad B de la sphenotoxina. Estos resultados podrían tener varias explicaciones: los cambios de aminoácidos más relevantes en la isoforma B1 para el reconocimiento de los antivenenos no están expuestos al solvente o los antivenenos reconocen mayormente a la B1 porque están hechos con antígenos de *Bhotrops asper*, la cual tiene gran cantidad de fosfolipasas no neurotóxicas que probablemente reconozcan más a la B1 que a la B2, ya que la B1 es considerablemente menos neurotóxica que cualquiera de las otras dos toxinas. Ninguna de las dos propuestas se puede descartar o aceptar con los experimentos presentados en este trabajo. Sin embargo, los experimentos que se presentan abren la discusión sobre cómo se podrían poner a prueba estas teorías.



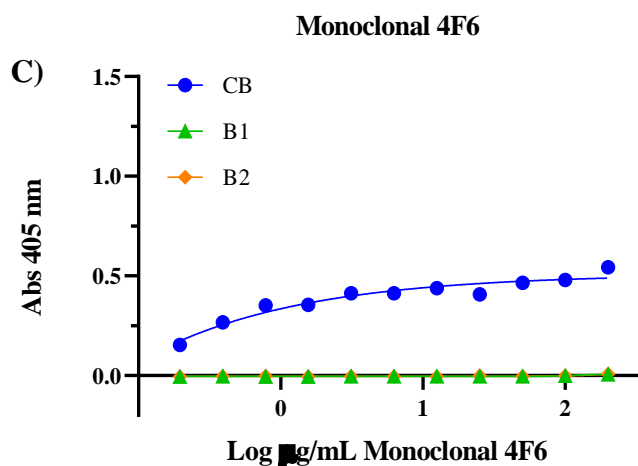


Figura 18 Reconocimiento de las subunidades por antivenenos y anticuerpo monoclonal

A) Reconocimiento con Antivipmyn. **B)** Reconocimiento con Faboterápico Polivalente Antiviperino (Birmex). **C)** Reconocimiento del anticuerpo monoclonal 4F6. Las placas fueron sensibilizadas con las isoformas de la subunidad B de sphenotoxina (B1 y B2) y subunidad B de la crotoxina clásica.

CB: Subunidad B de crotoxina clásica. **B2:** subunidad B de la sphenotoxina. **B1:** subunidad B de la sphenotoxina.

Tabla 8 Títulos ELISA

Antivipmyn	Título ($\mu\text{g/mL}$)	95% CI ($\mu\text{g/mL}$)
CB	1.3	1 - 1.7
B1	5.4	3.8 - 7.7
B2	9	7.9 - 10.4
BIRMEX	Título ($\mu\text{g/mL}$)	95% CI ($\mu\text{g/mL}$)
CB	2.4	2 - 2.9
B1	16.1	23 - 20.1
B2	21.6	17.6 - 27.6

Valores de los títulos (EC_{50}) obtenidos mediante ELISA para los dos antivenenos mexicanos (Antivipmyn y el Faboterápico polivalente antiviperino de BIRMEX).

Neutralización

Se realizaron pruebas de neutralización con Antivipmyn con la isoforma de la subunidad B de la sphenotoxina que se encuentra en mayor proporción (B2) y con la subunidad B de la crotoxina

clásica (CB). Las muestras administradas a los ratones de la cepa CD1 fueron pre incubadas con Antivipmyn (7 mg/mL), 3 dosis letales (3 DL₅₀) y PBS 1X. Se probaron las cantidades de Antivipmyn 288, 274, 260, 257, 256 µL por ratón de la crotoxina clásica (CB) y cada cantidad fue aplicada a grupos de 3 ratones. Para la sphenotoxina B2 se probaron las cantidades de 277.7, 280.3, 282.6, 285.2, 287.2, 288 µL por ratón en grupos de 3 ratones. No se realizó la prueba con la isoforma B1 ya que no se contó con la suficiente cantidad de toxina para obtener los datos. Los resultados se muestran en la **Tabla 9** donde se observa que la dosis efectiva media para las toxinas en prueba son 257 µL/ratón (2 mg/ratón) para la CB y 288 µL/ratón (1.7 mg/ratón) para la B2. Esto indica que fueron necesarios 31 µL más por ratón para neutralizar la B2 en comparación con la CB.

Tabla 9 Neutralización (dosis efectiva media)

Antivipmyn	EC ₅₀ µL/ratón	EC ₅₀ µL/g de ratón
CB	~257	~13.5
B1	No se hizo	No se hizo
B2	288	15

Valores de la dosis efectiva media obtenidos mediante ensayos de neutralización en modelo murino (cepa CD1) con el antiveneno Antivipmyn.

Actividad de PLA₂

La actividad de PLA₂ se obtuvo mediante dos ensayos, el método titulométrico con yema de huevo (**Figura 19** y **Tabla 10 A**) y con el sustrato 4-NOBA (**Tabla 10 B**). Con el método primero se observa que la subunidad B2 de la sphenotoxina tiene 2.5 veces más actividad que la CB de la crotoxina y la isoforma B1 6 veces más que la CB de la crotoxina. Se utilizó como control la FII (fracción II) de veneno de *Micrurus diastema*, la cual se conoce que tiene alta actividad de PLA₂. En los experimentos titulométricos de yema de huevo puede haber variaciones en la actividad debido a la la variación en contenido de fosfolípidos en las diferentes yemas de huevo. Sin

embargo, a pesar de las variaciones por este factor, se conservan las proporciones en actividad en las repeticiones, siendo de mayor a menor actividad: B2 -> B1 -> CB.

Por otra parte, con el sustrato 4-NOBA los valores de absorbancia revelan que hay otro orden de mayor a menor en actividad de PLA₂: B2 -> CB -> B1. Esta variación puede deberse a los diferentes sustratos (fosfolípidos presentes en la yema de huevo) y la especificidad del sustrato 4-NOBA. En la **Figura 20** se ve la representación del corte que hace una PLA₂ en el enlace sn-2 de un fosfolípido inespecífico, mientras que en la **Figura 21**, se muestra la reacción que ocurre con el sustrato 4-NOBA y los productos específicos de la misma. La variación en orden de actividad de fosfolipasa puede deberse al tipo de enlace que tiene 4-NOBA y cómo algunas isoformas son más específicas para este.

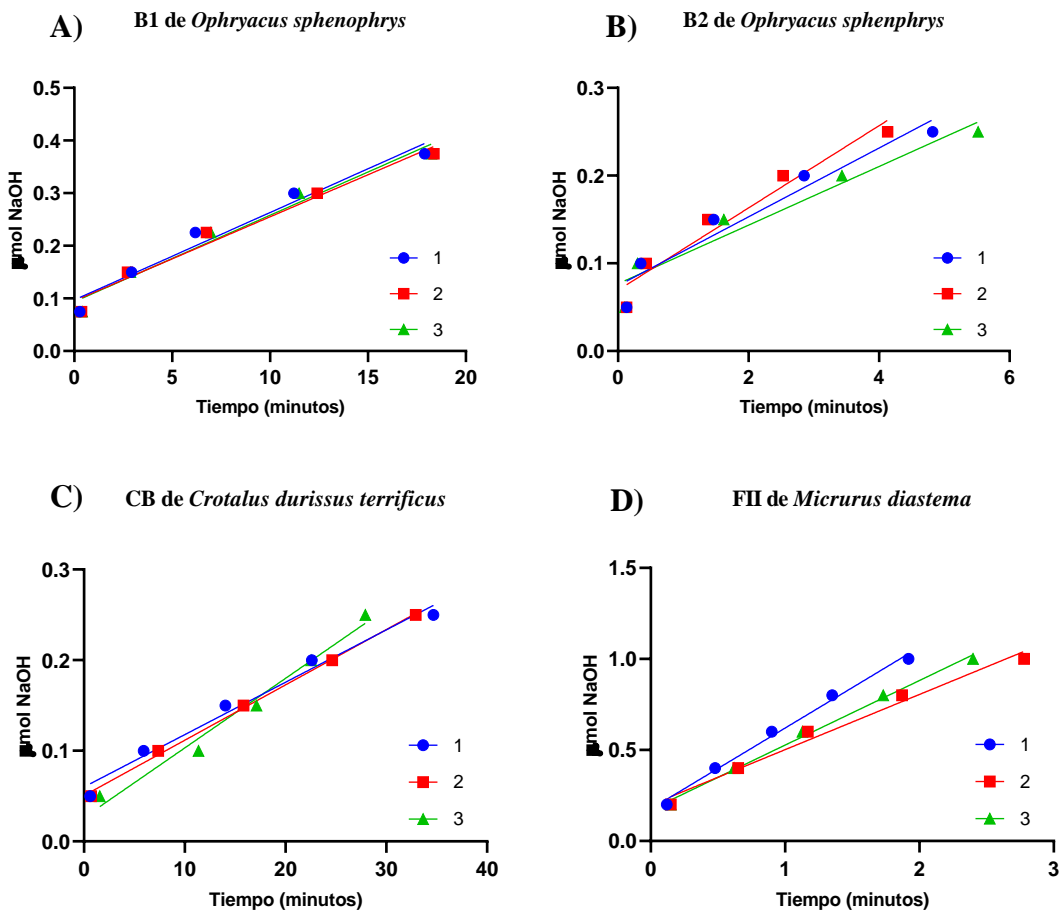


Figura 19 Actividad de PLA₂

Actividad de PLA₂ medida con el método titulométrico con yema de huevo. A) Actividad de la subunidad B1 de la sphenotoxina con 3 repeticiones. B) Actividad de la subunidad B2 de la sphenotoxina con 3 repeticiones. C) Actividad de F2 de *Micrurus diastema* con 3 repeticiones como control positivo de actividad de PLA₂.

Tabla 10 Actividad de PLA₂

A)

Subunidades	Actividad de PLA ₂ (U/mg) (Método titulométrico con yema de huevo)
CB	3.2 ± 11
B1	8.1 ± 6
B2	19.9 ± 2
FII <i>Micrurus diastema</i>	479 ± 1

B)

Subunidades	Actividad de PLA ₂ a 405 nm (Sustrato 4-NOBA)
CB	2.3
B1	2.1
B2	2.4
FII <i>Micrurus diastema</i>	2.2

A) Actividad de PLA₂ reportada en U/mg utilizando el método titulométrico de yema de huevo. Los datos se obtuvieron a partir de las gráficas de actividad de PLA₂. Se calcularon las pendientes de las rectas y se promediaron, siendo este dato los μmol de NaOH por minuto. Se dividió el valor de μmol de NaOH entre los μg de toxina utilizados. **B)** Actividad de PLA₂ reportada en unidades de absorbancia a 405 nm X10 utilizando el sustrato 4-NOBA.

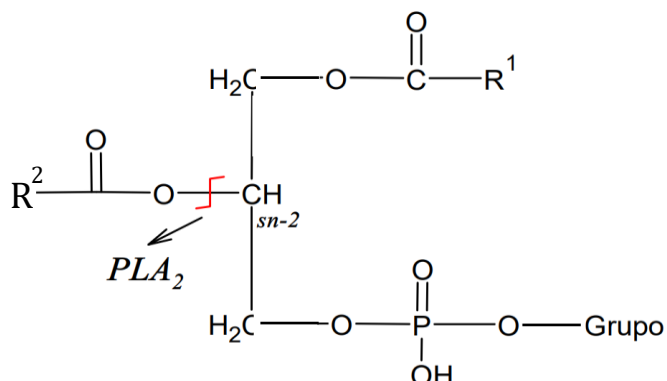


Figura 20 Sitio de rompimiento de

Las PLA₂ catalizan la hidrólisis del enlace sn-2 de los fosfolípidos y se forma un ácido graso libre y un lisofosfolípido.

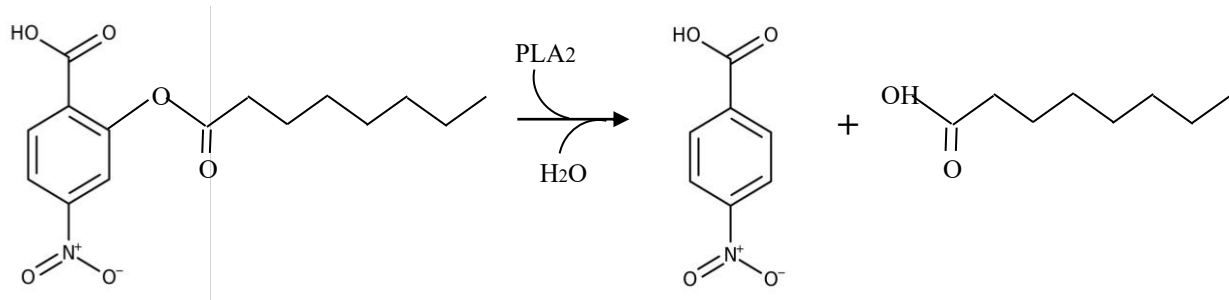


Figura 21 Reacción con el sustrato 4-NOBA.

Se muestra la representación de la reacción que se da con el sustrato 4-NOBA y la PLA₂. Hidrólisis del enlace éster del sustrato y representación del producto, el cual se cuantifica midiendo la absorbancia a 405 nm.

Epítopes e interfase

Ya que los resultados del reconocimiento del anticuerpo monoclonal 4F6 muestran que no hay reconocimiento hacia la subunidad B de la crotoxina clásica y sí hay para ambas isoformas de la sphenotoxina, esto implica que tiene que haber algún epítotope que estas tengan en común que en la crotoxina no esté presente. Para poder encontrar algún posible epítotope con estas características se utilizaron los modelos por computadora mostrados anteriormente. Para poder saber qué aminoácidos de las toxinas estaban expuestos, se utilizó el servidor VADAR (*Volume, Area, Dihedral Angle Reporter*) para calcular el área de los aminoácidos expuestos al solvente. Para hacer viable el proceso de análisis, se tomaron en cuenta aquellos aminoácidos que estuvieran expuestos al menos en un 60% de acuerdo con VADAR. Una vez obtenida la lista de estos aminoácidos, se alinearon las secuencias de las 3 toxinas de interés y se identificaron aquellos aminoácidos expuestos que fueran comunes entre las isoformas de sphenotoxina y diferentes en la crotoxina clásica. Se encontraron los aminoácidos de las posiciones 14, 33, 55, 83, 99 y 116, los cuales se encontraron dispersos en la estructura. Aunque, por otra parte, ciertas parejas de aminoácidos como el 33 y 116, el 55 y 83 y el 14 y 99, se encontraban entre sí a una distancia

interesante como para poder considerarlas como epítopes. Tomando en cuenta esto, se analizaron estos aminoácidos por parejas y se observaron también los aminoácidos que estuvieran a 5 Å de cada uno. La suma de estos aminoácidos y sus vecinos dan áreas de alrededor de 1000 Å², área suficiente para considerarse epítipo que puede reconocer un anticuerpo (Ramaraj et al., 2012). En la **Figura 22** se observa la representación de las toxinas de interés, donde se muestran las superficies dadas por los aminoácidos 33 y 116, junto con aquellos que se encuentran a al menos 5 Å de distancia. En la **Figura 22 A** se observa la subunidad B de la crotoxina clásica con la superficie anteriormente mencionada, donde abunda el carácter positivo (color azul) mientras que en las isoformas de la subunidad B de la sphenotoxina (**Figura 22 B y C**) cambian sus propiedades en esta zona. A pesar de que se identifica esta zona exclusiva de la crotoxina, no hay propiedades evidentes en común entre las isoformas de la sphenotoxina, ya que en la isoforma B2 hay una carga negativa predominante (rojo) mientras que la isoforma B1 no hay esta carga negativa y hay una sección hidrofóbica que ninguna de las otras dos tiene (**Figura 22 B y C**).

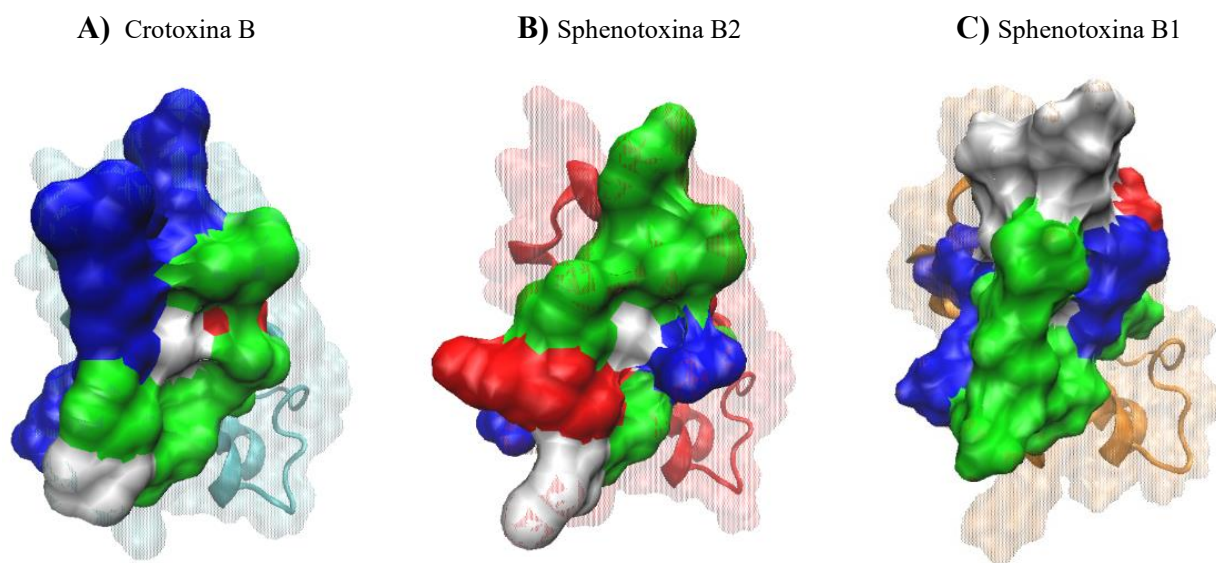


Figura 22 Aminoácidos 33 y 116

Representación de las subunidades B de crotoxina y subunidad B de las isoformas de la sphenotoxina en las mismas posiciones. Las superficies mostradas son los aminoácidos 33 y 116, junto con los aminoácidos que están al menos a 5 Å de distancia. Los colores de las superficies se muestran como tipos de aminoácidos; rojo: negativos, azul: positivos, verde: polares, blanco: hidrofóbico.

Ya que los aminoácidos 33 y 116 no mostraron alguna característica evidente que compartan las isoformas de la sphenotoxina que no presentara la crotoxina clásica, se analizó el siguiente par de aminoácidos expuestos en las posiciones 55 y 83. En la **Figura 23** se observa la representación de las toxinas de interés, donde se muestran las superficies dadas por los aminoácidos 55 y 83, junto con aquellos que se encuentran a al menos 5 Å de distancia. En este caso observamos una saliente con carga positiva en la crotoxina clásica (**Figura 23 A**) que en ninguna de las dos isoformas de la sphenotoxina se presenta (**Figura 23 B y C**). Sin embargo, de nuevo no hay características evidentes en común entre las isoformas de la sphenotoxina, mientras que se nota que las tres toxinas tienen un “centro” hidrofóbico (blanco).

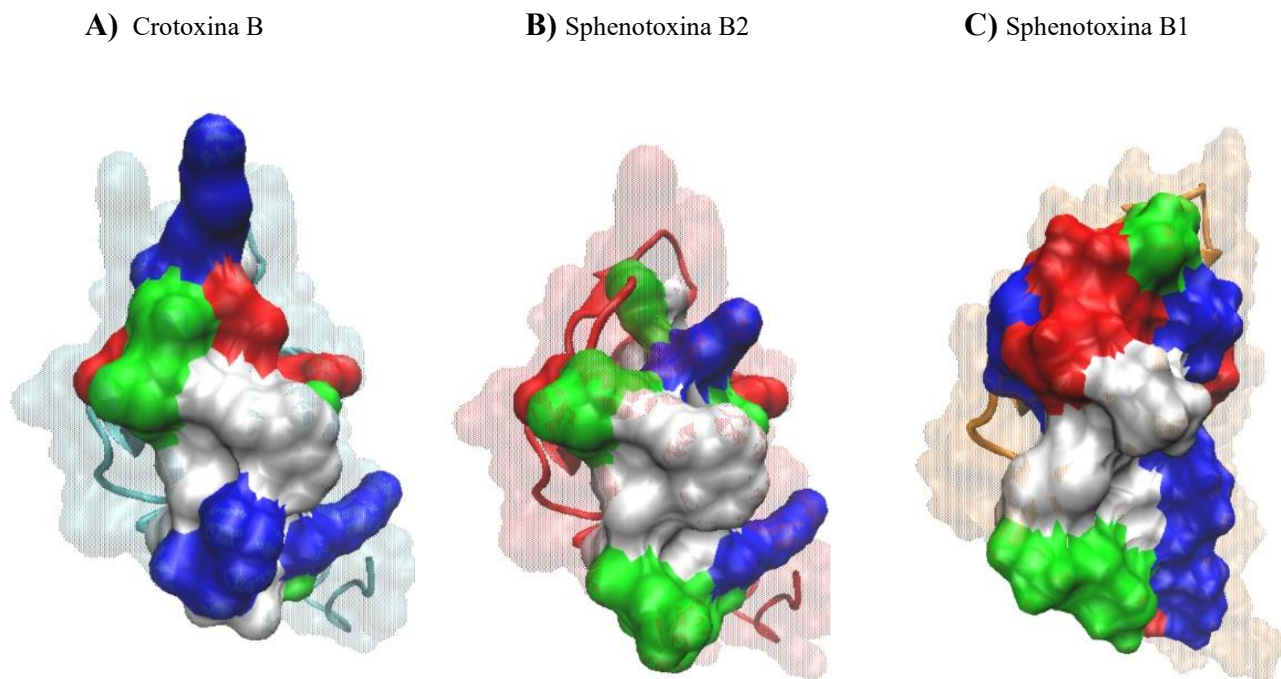


Figura 23 Aminoácidos 55 y 83

Representación de las subunidades B de crotoxina y subunidad B de las isoformas de la sphenotoxina en las mismas posiciones. Las superficies mostradas son los aminoácidos 55 y 83, junto con los aminoácidos que están al menos a 5 Å de distancia. Los colores de las superficies se muestran como tipos de aminoácidos; rojo: negativos, azul: positivos, verde: polares, blanco: hidrofóbico.

En la **Figura 24** se observa la representación de las toxinas de interés, donde se muestran las superficies dadas por los aminoácidos 14 y 99, junto con aquellos que se encuentran a al menos 5 Å de distancia. En esta parte de la superficie de las toxinas se ve una clara conservación de las zonas (parches) con características químicas iguales. Se ven cargas positivas (azul) en los costados de las tres toxinas, la parte superior con características polares neutras (verde) y un centro hidrofóbico (blanco). Por otra parte, la subunidad de la crotoxina clásica y la isoforma B2 de la sphenotoxina (**Figura 24 A y B**) tienen una zona con carácter negativo (rojo), mientras que en la isoforma B1 de la Sphenotoxin se encuentra en otro sitio (**Figura 24 C**). Esta carga a pesar de que se conserva podría tener implicaciones el cambio de sitio, aunque no se puede concluir.

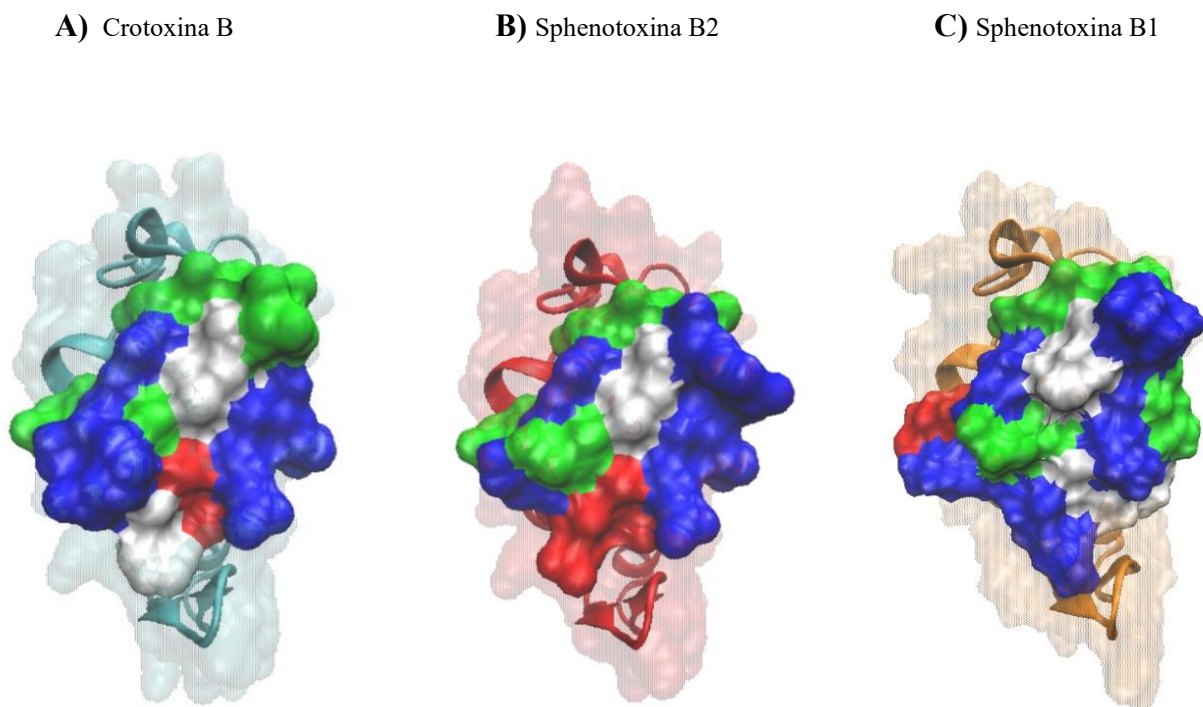


Figura 24 Aminoácidos 14 y 99

Representación de las subunidades B de crotoxina y subunidad B de las isoformas de la sphenotoxina en las mismas posiciones. Las superficies mostradas son los aminoácidos 14 y 99, junto con los aminoácidos que están al menos a 5 Å de distancia. Los colores de las superficies se muestran como tipos de aminoácidos; rojo: negativos, azul: positivos, verde: polares, blanco: hidrofóbico.

En la **Figura 25** se observa la representación de las toxinas de interés, donde se muestran la superficie dadas por la posición 80 y los alrededores a 5 Å. En la isoforma B1 hay una carga

negativa expuesta mientras que CB y B2 tienen conservado el carácter polar sin carga (circulado en negro). Ya que en la literatura se reporta que el W80 en CB es importante para establecer el primer contacto con la membrana celular, estos cambios en características podrían hacer que algunos contactos sean más fuertes que otros. En el caso de la B1 hay un cambio importante de W por P en la posición 80, lo cual podría tener consecuencias importantes con respecto a la letalidad, ya que el cambio de un aminoácido hidrofóbico por uno de menor tamaño podría establecer un contacto más débil con la membrana. En este caso, si la carga negativa interfiriera con el contacto inicial, se podría explicar por qué CB y B2 tienen un carácter más parecido.

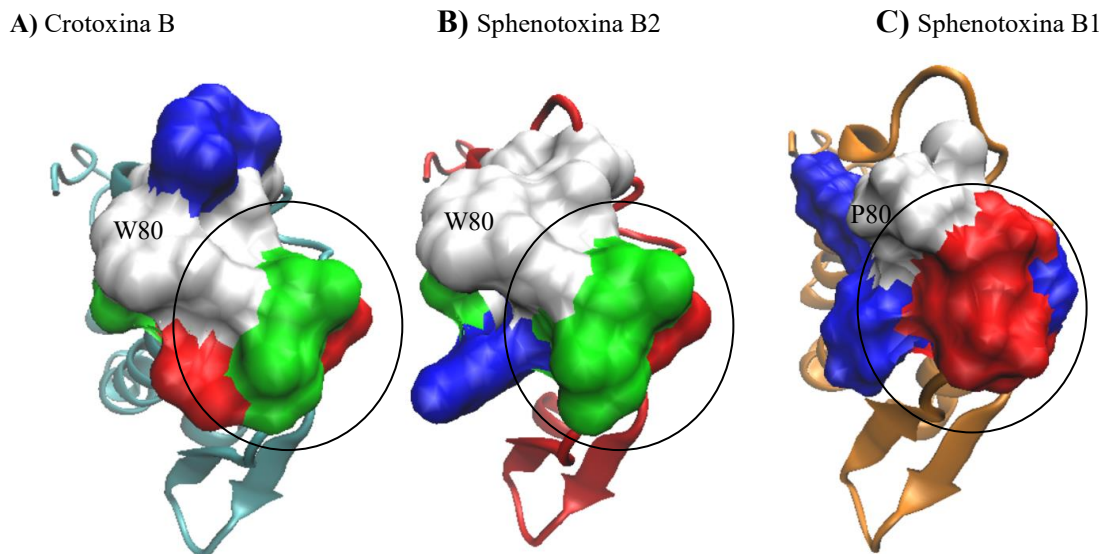


Figura 25 W80 y alrededores

Se muestra la zona de W80 y los alrededores a 5 Å. Los colores de estas superficies se muestran como tipos de aminoácidos; rojo: negativos, azul: positivos, verde: polares, blanco: hidrofóbico.

Por otra parte, para poder entender las diferencias entre las tres toxinas de interés, es esencial analizar la interfase entre la subunidad B y la subunidad A. En la **Figura 26** se muestran las estructuras de las toxinas donde la interfase de la subunidad B se encuentra representada como superficie. Salta a la vista que las tres tienen la parte del centro con propiedades hidrofóbicas (blanco), lo que es de esperarse ya que este tipo de interacciones mantienen asociado al complejo.

Sin embargo, vemos en la **Figura 26 C** la estructura de B1, donde es claro que hay menor área de superficie y deja más expuesto al sitio activo de la toxina. Esto podría sugerir que la interacción entre la subunidad A y la B en la isoforma B1 sería más débil ya que hay menos superficie de interacción.

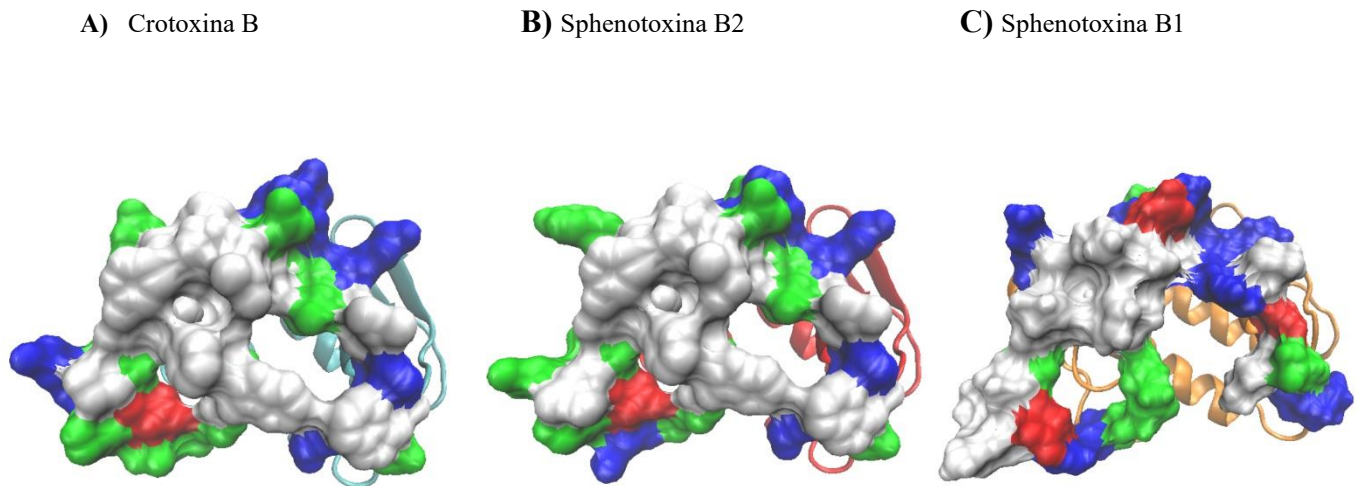


Figura 26 Interfase de B las subunidades B

Los aminoácidos de la interfase de B que interactúa con la subunidad A se muestra como superficie. Los colores de estas superficies se muestran como tipos de aminoácidos; rojo: negativos, azul: positivos, verde: polares, blanco: hidrofóbico.

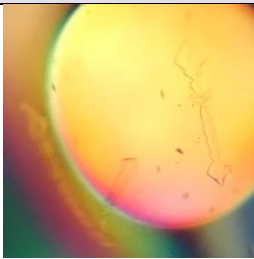
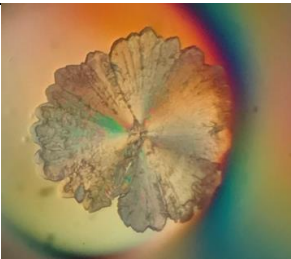
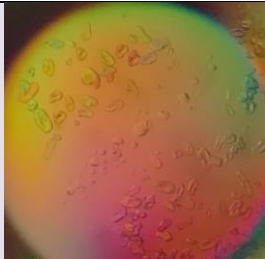
Cristalización


El día 0 se colocaron 96 pruebas de cristalización y se observaron cristales a partir del día 49 y nuevos a partir del día 101.

Se obtuvieron cristales de proteína con el kit Index en las siguientes condiciones: Malonato de sodio 1.1 M pH 7, HEPES 0.1 M pH 7, 0.5% Jeffamina[®] ED-2001 pH 7 (**Tabla 11** y **Tabla 12**). A pesar de la obtención de los cristales estos no fueron del tamaño suficiente para continuar con los estudios estructurales, así como otros cristales en la **Tabla 11** y **Tabla 12**, que se identificaron como cristales de sal. Se propuso una matriz con base en los resultados obtenidos con las condiciones

del kit Index para observar el efecto del PEG de 2 pesos moleculares (400 y 3,250) y la variación en su porcentaje. Se utilizaron 2 buffers: HEPES pH 7 y citrato/acetato de sodio pH 3.5. Las pruebas se observaron el día 21 y únicamente se observó un cristal en el pozo 9C, es decir en la siguiente condición: HEPES pH 7 PEG 3, 350 35% (Tabla 13). Este cristal fue probado con radiación asegurando que se trata de un cristal de proteína, sin embargo, difractó a baja resolución (5 Å) por lo cual fue necesario plantear una nueva matriz de cristalización que se observa en la Figura 27. En esta matriz se probaron 3 pH diferentes y 3 diferentes porcentajes de PEG 400. Las pruebas se realizaron con la subunidad B2 de la sphenotoxina con dos concentraciones diferentes: 11 y 19 mg/ml. La matriz propuesta 2 con la sphenotoxina B2 a 19 mg/ml se colocó el 12/05/22 y la de 11 mg/ml se colocó el 26/05/22.

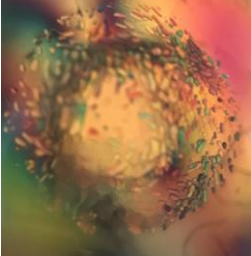
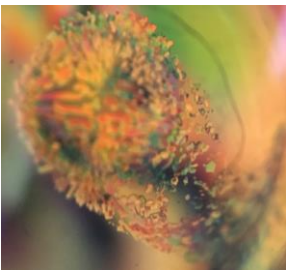
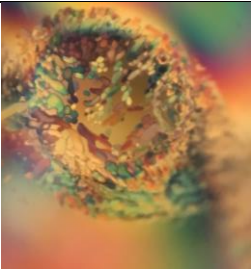
Tabla 11 Condiciones de cristalización y resultados día 80


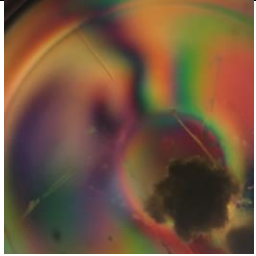
	Sal	Buffer	Agente precipitante	Fotografías
A11 (Caja 1)	No	HEPES 0.1 M pH 7.5	Cloruro de sodio 3 M	 <p>Cristales de sal</p>
B4 (Caja 1)	No	Tris 0.1 M pH 8.5	Formato de magnesio dihidratado 0.3 M	 <p>Cristales de sal</p>
C9 (Caja 1)	Malonato de sodio 1.1 M pH 7	HEPES 0.1 M pH 7	0.5% Jeffamina® ED-2001 pH 7	

				Cristales de proteína
B4 (Caja 2)	Acetato de amonio tribásico 0.2 M pH 7	No	20% PEG 3,350	 <p>Cristales de sal</p>

Se muestran las condiciones en las que se obtuvieron cristales a partir del día 80. Se indica la sal, buffer y agente precipitante, así como una fotografía a través del microscopio con aumento. Las fotos fueron tomadas el día 80.


Tabla 12 Condiciones de cristalización y resultados

	Sal	Buffer	Agente precipitante	Fotografías
A1 (Caja 1)	No	Ácido cítrico 0.1 M pH 3.5	Sulfato de amonio 2.0 M	 <p>Cristales de sal</p>
A4 (Caja 1)	No	BIS-TRIS 0.1 M pH 6.5	Sulfato de amonio 2.0 M	 <p>Cristales de sal</p>
A6 (Caja 1)	No	Tris 0.1 M pH 8.5	Sulfato de amonio 2.0 M	

				Cristales de sal
C9 (Caja 1)	Malonato de sodio 1.1 M pH 7	HEPES 0.1 M pH 7	0.5% Jeffamina® ED-2001 pH 7	 Cristales de proteína
A4 (Caja 2)	Sulfato de litio monohidratado 0.2 M	HEPES 0.1 M pH 7.5	25% PEG 3,350	 Precipitado

Se muestran las condiciones en las que se obtuvieron cristales a partir del día 101. Se indica la sal, buffer y agente precipitante, así como una fotografía a través del microscopio con aumento.

Tabla 13 Matriz propuesta 1

# pozo	% PEG	PEG 3,350 Citrato/acetato de sodio pH 3.5	PEG 400 Citrato/acetato de sodio pH 3.5	PEG 3,350 HEPES pH 7	PEG 400 HEPES pH 7
1	0	----	----	----	----
2	5	----	----	Precipitados	----
3	10	----	Cristales 	Precipitados	----
4	15	----	----	Precipitados	Precipitados

5	20	Precipitados	----	Precipitados	----
6	25	Precipitados	----	----	----
7	30	Precipitados	----	Precipitados	----
8	35	----	----	Microcristal	----
9	40	----	----	Microcristal	Precipitados
10	45	----	----	----	Precipitados

Se observan los resultados obtenidos con la utilización de PEG de 2 pesos moleculares diferentes (400 y 3,250) y la variación en su porcentaje. Se utilizaron 2 *buffers*: HEPES pH 7 y citrato/acetato de sodio pH 3.5. La proteína se resuspendió en Tris-HCl 20 mM pH 7.3.

Las pruebas de cristalización de la matriz propuesta No. 2 (**Figura 27**) se revisaron 3 meses después de su colocación. A partir de estas se obtuvo un cristal de proteína de ~3 x 4 mm (**Figura 28**) con la matriz donde la concentración de proteína fue de 11 mg/ml. Este cristal se formó en la condición con 0.1 M citrato de sodio, PEG 400 10% a pH 5.5. Posteriormente, el cristal se pondrá en las mismas condiciones, pero con un mayor porcentaje de PEG (35%) para que funcione como crioprotector para poder transportarlo al lugar donde se realizarán las pruebas de difracción.

	Citrato 0.1 M pH 5.5 PEG 400 5%	Citrato 0.1 M pH 5.5 PEG 400 10%	Citrato 0.1 M pH 5.5 PEG 400 15%
pH ↑	Citrato 0.1 M pH 4.5 PEG 400 5%	Citrato 0.1 M pH 4.5 PEG 400 10%	Citrato 0.1 M pH 4.5 PEG 400 15%
	Citrato 0.1 M pH 3.5 PEG 400 5%	Citrato 0.1 M pH 3.5 PEG 400 10%	Citrato 0.1 M pH 3.5 PEG 400 15%
	← % PEG →		

Figura 27 Matriz propuesta 2

Se generó la matriz con base en los resultados de la matriz propuesta 1. Se agregó 1 µl de la proteína (sphenotoxina B2) a 11 y 19 mg/ml. Los cuadros marcados indican las condiciones en las cuales se generaron cristales.

Para continuar el análisis estructural, el cristal presentado en la **Figura 28** se difractará y se presentarán los resultados posteriormente.

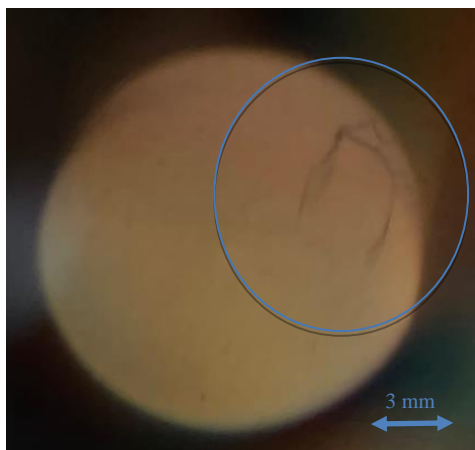


Figura 28 Cristal de sphenotoxina B2

Se muestra el cristal de proteína (sphenotoxina B2) obtenido a partir de la matriz propuesta No. 2. Condiciones de cristalización: 0.1 M citrato de sodio, PEG 400 10% a pH 5.5

Conclusiones

La subunidad B de la sphenotoxina se puede purificar mediante cromatografía de exclusión molecular (CEM) y cromatografía de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC). Esta estrategia de purificación permite encontrar dos isoformas de la subunidad B de la sphenotoxina (B1 y B2) mientras que anteriormente sólo se conocía aquella que está en mayor proporción (B2). Las diferentes isoformas de la subunidad B de la sphenotoxina comparadas con la subunidad B de la crotoxina clásica siguen la misma trayectoria de cadena principal. Sin embargo, presentan diferentes propiedades en las cadenas laterales de los aminoácidos, cambiando su acomodo espacial y sus propiedades fisicoquímicas. A pesar de que las tres toxinas conservan los aminoácidos del sitio catalítico, el cambio en las cadenas laterales en aminoácidos clave (como H1-D1 y W30-G30 en B1), pueden alterar la interacción con la subunidad A, generando en este caso una interacción más débil y por lo tanto, menos letalidad. De igual manera, la disminución de superficie por el cambio W80-P80 en B1 podría ser relevante en el primer contacto con la membrana celular. Cambios de aminoácidos en el amino y carboxilo terminal de las toxinas, podrían explicar las diferencias en los datos obtenidos sobre reconocimiento y neutralización de los antivenenos (Antivipmyn y BIRMEX), ya que estos dos sitios se encuentran expuestos al solvente y son los sitios con mayor cantidad de cambios. A pesar de que se identificaron

aminoácidos expuestos al solvente como los de las posiciones 14, 33, 55, 83, 99 y 116 que se conservan en las isoformas de la sphenotoxina y son diferentes en la crotoxina clásica, no se logró identificar el epítipo que no reconoce el anticuerpo monoclonal 4F6. Analizando las superficies de estos epítopes se pueden observar cambios en propiedades fisicoquímicas que podrían estar implicadas en explicar las diferencias antes mencionadas, pero no se encuentran patrones claros que compartan las isoformas de la sphenotoxina, además de que encontrar estas diferencias no asegurarían que fuera el epítipo que reconoce el anticuerpo monoclonal 4F6.

A pesar de que las diferencias entre las isoformas y la crotoxina clásica no modifican la estructura tridimensional general (cadena principal), ciertos cambios de aminoácidos en zonas como el amino terminal, en la interfase entre la subunidad A y la B y algunos cambios de aminoácidos voluminosos por no voluminosos o viceversa, podrían tener implicaciones que explican los cambios sutiles en los valores de DL_{50} , EC_{50} y actividad de PLA_2 .

Es necesario conseguir la estructura tridimensional de la isoforma B2 con datos experimentales, ya que esto implica una aproximación más acertada a la realidad sobre la estructura. A pesar de que para este trabajo no se obtuvo la estructura tridimensional de la isoforma B2 de manera experimental, se consiguieron 2 condiciones en las que se generan cristales: citrato de sodio 0.1 M, PEG 400 10% a pHs 5.5 y 3.5. Estas condiciones dan pista para la generación de nuevos cristales tanto para la isoforma B2 como para la isoforma B1. La aproximación al entendimiento a nivel sutil de las diferencias estructurales, bioquímicas y funcionales es un campo amplio de investigación que es necesario seguir desarrollando.

BIBLIOGRAFÍA

- Bénard Valle, M., 2009. Caracterización bioquímica del veneno de la serpiente de coral *Micrurus tener*. Universidad Nacional Autónoma de México. <https://doi.org/TESIUNAM: 001-00551-B7-2011>
- Berg, O.G., Gelb, M.H., Tsai, M.D., Jain, M.K., 2001. Interfacial enzymology: The secreted phospholipase A2-paradigm. *Chem. Rev.* 101, 2613–2653. <https://doi.org/10.1021/cr990139w>

- Borja, M., Neri-Castro, E., Castañeda-Gaytán, G., Strickland, J.L., Parkinson, C.L., Castañeda-Gaytán, J., Ponce-López, R., Lomonte, B., Olvera-Rodríguez, A., Alagón, A., Pérez-Morales, R., 2018. Biological and proteolytic variation in the venom of *crotalus scutulatus scutulatus* from Mexico. *Toxins (Basel)*. 10, 1–19. <https://doi.org/10.3390/toxins10010035>
- Bouchier, C., Boulain, J.C., Bon, C., Ménez, A., 1991. Analysis of cDNAs encoding the two subunits of crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from rattlesnake venom: the acidic non enzymatic subunit derives from a phospholipase A2-like precursor. *BBA - Gene Struct. Expr.* 1088, 401–408. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(91\)90132-6](https://doi.org/10.1016/0167-4781(91)90132-6)
- Calvete, J.J., 2017. Venomics: Integrative venom proteomics and beyond. *Biochem. J.* 474, 611–634. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160577>
- Calvete, J.J., Sanz, L., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., 2009. Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Lett.* 583, 1736–1743. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.029>
- Casewell, N.R., 2016. Venom Evolution: Gene Loss Shapes Phenotypic Adaptation. *Curr. Biol.* 26, R849–R851. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.07.082>
- 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. *J. Proteomics* 87, 103–121. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.024>
- Chang, C.C., Lee, J.D., 1977. Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venom, is a presynaptic toxin acting like β -bungarotoxin. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* 296, 159–168. <https://doi.org/10.1007/BF00508469>
- 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. *Mol. Immunol.* 29, 871–882. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(92\)90125-H](https://doi.org/10.1016/0161-5890(92)90125-H)
- Čurin-Šerbec, V., Délot, E., Faure, G., Saliou, B., Gubenšek, F., Bon, C., Choumet, V., 1994. Antipeptide antibodies directed to the C-terminal part of ammodytoxin A react with the

- PLA2 subunit of crotoxin and neutralize its pharmacological activity. *Toxicon* 32, 1337–1348. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90406-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90406-5)
- Dennis, E.A., Cao, J., Hsu, Y., Magrioti, V., Kokotos, G., 2011. Phospholipase A enzymes Physical Structure, Biological Function,.pdf. *Chem. Rev.* 111, 6130–6185.
- Dowell, N.L., Giorgianni, M.W., Kassner, V.A., Selegue, J.E., Sanchez, E.E., Carroll, S.B., 2016. The Deep Origin and Recent Loss of Venom Toxin Genes in Rattlesnakes. *Curr. Biol.* 26, 2434–2445. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.07.038>
- Faure, G., Bon, C., 1988. Crotoxin, a Phospholipase A2 Neurotoxin from the South American Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: Purification of Several Isoforms and Comparison of Their Molecular Structure and of Their Biological Activities. *Biochemistry* 27, 730–738. <https://doi.org/10.1021/bi00402a036>
- Faure, G., Bon, C., 1987. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* 25, 229–234. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(87\)90246-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(87)90246-7)
- Faure, G., Choumet, V., Bouchier, C., Camoin, L., Guillaume, J. -L, Monegier, B., Vuilhorgne, M., Bon, C., 1994. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Eur. J. Biochem.* 223, 161–164. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18978.x>
- Faure, G., Harvey, A.L., Thomson, E., Saliou, B., Radvanyi, F., Bon, C., 1993. Comparison of crotoxin isoforms reveals that stability of the complex plays a major role in its pharmacological action. *Eur. J. Biochem.* 214, 491–496. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17946.x>
- Faure, G., Saliou, B., Bon, C., Guillaume, J.L., Camoin, L., 1991. Multiplicity of Acidic Subunit Isoforms of Crotoxin, the Phospholipase A2 Neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* Venom, Results from Posttranslational Modifications. *Biochemistry* 30, 8074–8083. <https://doi.org/10.1021/bi00246a028>
- Faure, G., Saul, F., 2012. Crystallographic characterization of functional sites of crotoxin and

- ammodytoxin, potent β -neurotoxins from Viperidae venom. *Toxicon* 60, 531–538.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.05.009>
- Faure, G., Saul, F., 2011. Structural and Functional Characterization of Anticoagulant, FXa-binding Viperidae Snake Venom Phospholipases A2 - PubMed. pp. 671–677.
- 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. *J. Mol. Biol.* 412, 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. *Sci. Rep.* 7, 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep43885>
- Fernández, J., Lomonte, B., Sanz, L., Angulo, Y., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., 2010. Snake venomomics of bothriechis nigroviridis reveals extreme variability among palm pitviper venoms: Different evolutionary solutions for the same trophic purpose. *J. Proteome Res.* 9, 4234–4241. <https://doi.org/10.1021/pr100545d>
- Fry, B.G., 2005. From genome to “venome”: Molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome Res.* 15, 403–420. <https://doi.org/10.1101/gr.3228405>
- Holzer, M., Mackessy, S.P., 1996. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. *Toxicon* 34, 1149–1155. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(96\)00057-8](https://doi.org/10.1016/0041-0101(96)00057-8)
- Jackson, T.N.W., Sunagar, K., Undheim, E.A.B., Koludarov, I., Chan, A.H.C., Sanders, K., Ali, S.A., Hendrikx, I., Dunstan, N., Fry, B.G., 2013. Venom down under: Dynamic evolution of Australian elapid snake toxins. *Toxins (Basel)*. 5, 2621–2655.
<https://doi.org/10.3390/toxins5122621>
- Lambeau, G., Gelb, M.H., 2008. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A 2. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 495–520.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.062405.154007>

- Lomonte, B., Calvete, J.J., 2017. Strategies in “snake venomics” aiming at an integrative view of compositional, functional, and immunological characteristics of venoms. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 23, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0117-8>
- Lomonte, B., Mora-Obando, D., Fernández, J., Sanz, L., Pla, D., María Gutiérrez, J., Calvete, J.J., 2015. First crotoxin-like phospholipase A2 complex from a New World non-rattlesnake species: Nigroviriditoxin, from the arboreal Neotropical snake *Bothriechis nigroviridis*. *Toxicon* 93, 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.11.235>
- Lomonte, B., Rey-Suárez, P., Tsai, W.C., Angulo, Y., Sasa, M., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., 2012. Snake venomics of the pit vipers *Porthidium nasutum*, *Porthidium ophryomegas*, and *Cerrophidion godmani* from Costa Rica: Toxicological and taxonomical insights. *J. Proteomics* 75, 1675–1689. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.12.016>
- Mackessy, S.P., 2021. *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*, Second ed. ed, Taylor & Francis Group. CRC Press.
- Mackessy, S.P., 2008. Venom composition in rattlesnakes. *Biol. Ratt.* 495–510.
- Marchi-Salvador, D.P., Corrêa, L.C., Magro, A.J., Oliveira, C.Z., Soares, A.M., Fontes, M.R.M., 2008. Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: Crystal structure of a tetrameric phospholipase A2 formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 72, 883–891. <https://doi.org/10.1002/prot.21980>
- Nemecz, D., Ostrowski, M., Ravatin, M., Saul, F., Faure, G., 2020. Crystal Structure of Isoform CBd of the Basic Phospholipase A2 Subunit of Crotoxin: Description of the Structural Framework of CB for Interaction with Protein Targets. *Molecules* 25. <https://doi.org/10.3390/molecules25225290>
- 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. *J. Proteomics* 192, 196–207. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.09.002>

- Neri-Castro, E., Sanz, L., Olvera-Rodríguez, A., Bénard-Valle, M., Alagón, A., Calvete, J.J., 2020. Venomics and biochemical analysis of the black-tailed horned pitviper, *Mixcoatlus melanurus*, and characterization of Melanurutoxin, a novel crotoxin homolog. *J. Proteomics* 225. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103865>
- Of, I., From, A.C.P., Of, V., American, A.S., 1990. (*Crotalus Durissus Collilineatus*) 97, 695–699.
- Ponce-López, R., Neri-Castro, E., Borja, M., Strickland, J.L., Alagón, A., 2020. Neutralizing potency and immunochemical evaluation of an anti-*Crotalus mictlantecuhtli* experimental serum. *Toxicon* 187, 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.08.026>
- Prijatelj, P., Charnay, M., Ivanovski, G., Jenko, Z., Pungerčar, J., Križaj, I., Faure, G., 2006. The C-terminal and β -wing regions of ammodytoxin A, a neurotoxic phospholipase A2 from *Vipera ammodytes ammodytes*, are critical for binding to factor Xa and for anticoagulant effect. *Biochimie* 88, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.06.015>
- Ramaraj, T., Angel, T., Dratz, E.A., Jesaitis, A.J., Mumeý, B., 2012. Antigen-antibody interface properties: Composition, residue interactions, and features of 53 non-redundant structures. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1824, 520–532. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.12.007>
- 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, 801–810. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.03.011>
- Rigden, D.J., Hwa, L.W., Marangoni, S., Toyama, M.H., Polikarpov, I., 2003. The structure of the D49 phospholipase A2 piratoxin III from *Bothrops pirajai* reveals unprecedented structural displacement of the calcium-binding loop: Possible relationship to cooperative substrate binding. *Acta Crystallogr. - Sect. D Biol. Crystallogr.* 59, 255–262. <https://doi.org/10.1107/S0907444902021467>
- Rivas, E., Neri-Castro, E., Bénard-Valle, M., Hernández-Dávila, A.I., Zamudio, F., Alagón, A., 2017. General characterization of the venoms from two species of rattlesnakes and an

- intergrade population (*C. lepidus* x *aquilus*) from Aguascalientes and Zacatecas, Mexico. *Toxicon* 138, 191–195. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.09.002>
- Sampaio, S.C., Hyslop, S., Fontes, M.R.M., Prado-Franceschi, J., Zambelli, V.O., Magro, A.J., Brigatte, P., Gutierrez, V.P., Cury, Y., 2010. Crotoxin: Novel activities for a classic β -neurotoxin. *Toxicon* 55, 1045–1060. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.01.011>
- Saul, F.A., Prijatelj-Žnidaršič, P., Vulliez-le Normand, B., Villette, B., Raynal, B., Pungerčar, J., Križaj, I., Faure, G., 2010. Comparative structural studies of two natural isoforms of ammodytoxin, phospholipases A2 from *Vipera ammodytes ammodytes* which differ in neurotoxicity and anticoagulant activity. *J. Struct. Biol.* 169, 360–369. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.10.010>
- Scott, D.L., White, S.P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M.H., Sigler, P.B., 1990. Interfacial catalysis: The mechanism of phospholipase A2. *Science* (80-.). 250, 1541–1546. <https://doi.org/10.1126/science.2274785>
- Shiloah, J., Klibansky, C., Vries, A., Berger, A., 1973. Phospholipase B activity of a purified phospholipase A from *Vipera palestinae* venom 14. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)36884-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)36884-X)
- Slotta, K.H., Fraenkel-Conrat, H.L., 1938. Schlangengifte, III. Mitteil.: Reinigung und Krystallisation des Klapperschlangen-Giftes. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft (A B Ser.* 71, 1076–1081. <https://doi.org/10.1002/cber.19380710527>
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Frovenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid'. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.
- Sribar, J., Krizaj, I., 2011. Secreted Phospholipases A2 - not just Enzymes - PubMed. pp. 678–688.
- Tasoulis, T., Isbister, G.K., 2017. A review and database of snake venom proteomes. *Toxins* (Basel). 9. <https://doi.org/10.3390/toxins9090290>
- Tzeng, M.C., Yen, C.H., Hseu, M.J., Tseng, C.C., Tsai, M.D., Dupureur, C.M., 1995. Binding

- proteins on synaptic membranes for crotoxin and taipoxin, two phospholipases A2 with neurotoxicity. *Toxicon* 33, 451–457. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)00189-F](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)00189-F)
- Verger, R., 1976. Interfacial enzyme kinetics of lipolysis. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 5, 77–117. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.05.060176.000453>
- Whittington, A.C., Mason, A.J., Rokyta, D.R., 2018. A single mutation unlocks cascading exaptations in the origin of a potent pitviper neurotoxin. *Mol. Biol. Evol.* 35, 887–898. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx334>
- Xiao, H., Pan, H., Liao, K., Yang, M., Huang, C., 2017. Snake Venom PLA2, a Promising Target for Broad-Spectrum Antivenom Drug Development. *Biomed Res. Int.* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6592820>
- Yang, Z.M., Guo, Q., Ma, Z.R., Chen, Y., Wang, Z.Z., Wang, X.M., Wang, Y.M., Tsai, I.H., 2015a. Structures and functions of crotoxin-like heterodimers and acidic phospholipases A2 from *Gloydius intermedius* venom: Insights into the origin of neurotoxic-type rattlesnakes. *J. Proteomics* 112, 210–223. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.09.009>
- Yang, Z.M., Yang, Y.E., Chen, Y., Cao, J., Zhang, C., Liu, L.L., Wang, Z.Z., Wang, X.M., Wang, Y.M., Tsai, I.H., 2015b. Transcriptome and proteome of the highly neurotoxic venom of *Gloydius intermedius*. *Toxicon* 107, 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.08.010>