



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-
CROTAMINA DEL VENENO DE *Crotalus durissus terrificus***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

LUIS FERNANDO LOSOYA URIBE



DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. ALEJANDRO OLVERA RODRÍGUEZ

CIUDAD DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Nombre: Luis Fernando Losoya Uribe

Teléfono: 044 55 44 88 11 15

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de ciencias

Carrera: Biología

Número de cuenta: 309006785

2. Datos del Asesor

Grado y nombre: M. en C. Alejandro Olvera Rodríguez

3. Datos del jurado

Grado y nombre: Dr. Baltazar Becerril Luján

4. Datos del jurado

Grado y nombre: Mae. Edgar Enrique Neri Castro

5. Suplente 1

Grado y nombre: Biól. Exp. Gonzalo Asariel Acero Galindo

6. Suplente 2

Grado y nombre: Dr. José Estuardo López Vera

Datos del trabajo escrito

Título: Obtención de anticuerpos monoclonales anti-crotamina del veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

Número de páginas: 73

Año: 2019

El presente trabajo de grado (Licenciatura) fue realizado en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano, que pertenece al departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría directa del M. en C. Alejandro Olvera Rodríguez. Agradecemos el apoyo económico otorgado para efectuar este proyecto y la escritura de esta tesis mediante los programas:

-DGAPA-PAPIIT IN205214. “Identificación, análisis molecular y expresión heteróloga de neurotoxinas provenientes de elápidos y vipéridos para la generación de antivenenos de alta calidad”.

-CONACYT CB-2013-221343. “CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE VENENOS DE Agkistrodon, ASI COMO LA RESPUESTA INMUNE EN CABALLOS A LOS MISMOS”.

-DGAPA-PAPIIT IN207218. “Investigación de venenos de serpientes para el mejoramiento de antivenenos”.

-Ebola P-364. Por concepto de beca de tesis de Licenciatura.

Agradecimientos académicos

En primer lugar quiero agradecerle al Dr. Alejandro Alagón Cano por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, y permitirme aprender del apasionante campo en la generación y mejoramiento de antivenenos. Le agradezco profundamente por todo su apoyo, conocimiento y dirección de este trabajo.

A mi tutor, el M. en C. Alejandro Olvera Rodríguez (Pichón) por rescatarme y aceptarme para formar parte de “la pichonera”. Siendo un gran maestro y guía durante todo el tiempo que llevó este proyecto. Por sus enseñanzas, consejos y sugerencias tanto académicas como personales. De ti aprendí y sigo aprendiendo mucho amigo.

Al Dr. Baltazar Becerril Luján por todos los comentarios aportados en este trabajo, los cuales fueron de vital importancia para su elaboración.

Al Biól. Exp. Gonzalo Asariel Acero Galindo por el tiempo invertido en la revisión del presente trabajo, aportando observaciones y sugerencias únicas que permitieron mejorar este escrito.

Al Dr. José Estuardo López Vera por sus acertadas opiniones y comentarios para el mejoramiento de este trabajo.

Al Mae. Edgar Enrique Neri Castro por su excelente guía, apoyo, ayuda y amabilidad mostrada en toda mi formación académica.

Al técnico académico Oswaldo Lopez Gutiérrez por su apoyo desinteresado y amable ayuda al donar los ratones BALB/c. Sin su ayuda, este trabajo hubiera sido muy complicado de realizar.

A la M.V.Z. María Elena Elizabeth Mata y M.V.Z. Graciela Margarita Cabeza, por la amable y valiosa atención recibida con el uso de animales del bioterio del IBT de la UNAM.

A la Dra. Hilda Vazquez López por el apoyo y consejos académicos brindados.

Al Dr. Gerardo Corzo Burguete por permitirme convivir, aprender de usted y su equipo de trabajo.

Al técnico de laboratorio: Biól. Felipe Olvera Rodríguez por sus valiosa asesoría técnica a lo largo de este proyecto.

A la Dra. Herlinda Catalina Clement por sus explicaciones, ayuda y sugerencias con distintas metodologías.

A mis amigos del laboratorio: Mitzi Amaro, Ana Artero, Nicolás Elizalde, Oscar Pérez, Robero Ponce, Andrea Colís, Marco Ibarra, Raúl Sánchez, Manuel Yañez, Belem García, Óscar Aguayo, Irene Catillo, Oscar Germán, Luis Román, Luis García, Irving Archundia, Iván Arenas, Samuel Cardoso, Melissa Bernard, Edgar Neri, Félix Leonardo, Alondra Callejas, Germán Obed, Jesus Borrego, Damaris Bolaños, David Villaseñor y Guillermo de la Rosa, por las buenas charlas y experiencias de convivencia dentro y fuera del laboratorio.

A la secretaria Angélica Linares Labastida por su apoyo desinteresado y amable.

Al auxiliar del laboratorio Ricardo Mondragón Cortés y la Sra. Manuela Ávila por su gran ayuda y aportación en el laboratorio.

¡Gracias! A todas la personas increíbles que han contribuido en mi aprendizaje personal y académico.

Agradecimientos

Esta tesis de Licenciatura la dedico con mucho cariño y amor a mis padres Rosario Elena Uribe Valenzuela y Arturo Losoya Solís, a los cuales respeto y admiro mucho. Agradezco su gran apoyo, paciencia, amor, cariño y esfuerzo (personal como económico) que tuvieron a lo largo de este trabajo. Ambos me brindaron un sin fin de consejos, ánimos y reflexiones, como momentos de relajación cuando lo necesitaba, pues este trabajo llevó un tiempo mayor a lo esperado. ¡Muchas gracias a ambos!.

A mis hermanos Alejandra, Arturo y José Alberto “Josefi” jajaja, por enseñarme de manera indirecta que las cosas siempre se pueden lograr aunque se pongan difíciles.

Por otro lado agradezco la compañía y apoyo único de mi padrino Diego Amor Prats por las pláticas y buenos consejos regalados en todas las reuniones. ¡Gracias Diego!

A Mitzi Guadalupe Amaro Ruíz, que además de ser mi novia (la más bonita de todos los multiuniversos), es mi compañera de trabajo, amiga y confidente. Gracias por todos los consejos, enseñanzas, pláticas y risas que pasamos juntos durante todo este tiempo en la pichonera.

A mis amigos de la infancia: Julio Cano, Guillermo “Cachibombo”, Saúl “Seguro”, Alberto “Betito”, David “Bicho”, Angel “Tom Boy”, Issac “Oso” y Francisco “Panchito” que en mis estancias en la Xochinahuac me preguntaban como me iba y me apoyaban.

A mis amigos de la preparatoria: Barcenas, Ana Ximena, Jacobo, Kenia y Alejandra. Que a pesar de no vernos con frecuencia, nunca dejaron de tener un gesto, mensaje o llamada para saludar y ponernos al tanto.

A mis amigos de la Facultad: Sandra Guadarrama, Itzel Cardena, Carlos Blanco, Jorge Humberto y David Áviles. Con cada uno de ustedes compartí y sigo compartiendo momentos excelentes. Siempre me apoyaron diciendome que ya me faltaba poquito para terminar la tesis. Luego me convencían de ir a tomar una cervecita jajaja.

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción.....	3
2.1 Serpientes a nivel mundial y taxonomía	3
2.2 Subfamilia Crotalinae.....	4
2.3 Serpientes de cascabel	5
2.4 <i>Crotalus durissus terrificus</i>	6
2.5 Venenos de serpientes	7
2.8 Epidemiología de <i>C.d.terrificus</i> y cuadro clínico	10
2.9 Tratamiento de mordeduras de serpientes.....	11
2.10 Anticuerpos policlonales y monoclonales.....	12
2.11 Bioconjugación	17
3. Antecedentes.....	19
4. Justificación	25
5. Hipótesis	25
6. Objetivo general	25
7. Objetivos particulares.....	25
8. Estrategia experimental.....	26
9. Materiales y métodos	27
9.1 Animales de laboratorio	27
9.2 Obtención de veneno	27
9.3 Cuantificación proteica del veneno por Absorbancia (A_{280nm})	27
9.4 Fraccionamiento del veneno de <i>C.d.terrificus</i> por RP-HPLC	28
9.5 Determinación de masa molecular	29
9.6 Evaluación de actividad biológica de crotamina.....	29
9.7 Análisis electroforético de las fracciones obtenidas.....	29
9.8 Comprobación de la formación de bioconjugados 1:2 y 1:4.....	30
9.9 Esquema de inmunización	30
9.10 Técnica de ELISA indirecto	31
9.11 Descongelación de células de mieloma	33
9.12 Fusión celular.....	34
9.14 Clonación por dilución límite	35

9.16 Congelación celular.....	36
9.17 Producción de líquido de ascitis	37
9.18 Purificación y cuantificación de AcM anti-crotamina	37
9.19 Evaluación de AcM por SDS-PAGE	38
9.20 Determinación de concentración efectiva media (EC ₅₀)	38
9.21 Reconocimiento específico y reacción cruzada de AcM por Western blot.....	39
9.22 Reacción cruzada de IgG's por el método ELISA.....	41
9.23 Evaluación de AcM anti-crotamina contra proteínas del veneno de <i>C.d.terrificus</i>	42
10. Resultados	43
10.1 Obtención y análisis de fracciones del veneno de <i>C.d.terrificus</i> por RP-HPLC.....	43
10.2 Análisis biológico de proteínas purificadas.....	44
10.3 Análisis electroforético SDS-PAGE de fracciones purificadas por RP-HPLC	45
10.4 Análisis electroforético de conjugados relación 1:2 y 1:4	46
10.5 Determinación de títulos de Ac's policlonales anti-crotamina	47
10.6 Obtención de anticuerpos monoclonales anti-crotamina de ratón.....	48
10.7 Extracción, purificación y cuantificación de AcM anti-crotamina.....	49
10.8 Evaluación de anticuerpos monoclonales anti-crotamina por electroforesis	50
10.9 Determinación de EC ₅₀ de anticuerpos monoclonales 1D3 y 5D1	51
10.10 Prueba de especificidad de AcM 1D3 y 5D1 contra proteínas del género <i>Crotalus</i>	52
10.11 Prueba de ELISA para comprobar reacciones cruzadas hacia crotoxina.....	53
10.12 Evaluación de Ac policlonales anti-crotoxina	54
11. Discusión.....	56
15. Anexo.....	71

Abreviaturas

Abs_{280nm}	Absorbancia a 280 nanometros	mg	Miligramo
EC₅₀	Concentración efectiva media	gr	Gramo
DL₅₀	Dosis letal media	mL	Mililitro
Ig	Inmunoglobulina	L	Litro
AcM	Anticuerpo monoclonal	s	Segundo
MPM	Marcador de peso molecular	µg	Microgramo
PBS	Buffer fosfato salino	µL	microlitro
TFA	Ácido trifluoroacético	M	Molar
C.d.t	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	mM	Milimolar
CA	Subunidad acida	kDa	Kilo Dalton
CB	Subunidad básica	Da	Dalton
PLA₂	Fosfolipasas tipo A ₂	SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
BSA	Albúmina sérica bovina	ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
F(ab')₂	Fracción variable	RP- HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
Fc	Fracción cristalizante	IFA	Adyuvante incompleto de Freud
COOH	Región carboxilo terminal	ALUM	Hidróxido de aluminio
NH₂	Región amino terminal	HRP	Enzima peroxidasa de rábano
OH	Grupo hidroxilo	DMEM	Dulbecco modified eagles minimal essential medium

1. Resumen

Crotalus durissus terrificus se distribuye únicamente en Sudamérica, presentándose en Brasil, Uruguay, Argentina, Paraguay, Perú y Bolivia. Dentro del veneno de *C.d.terrificus* se han reportado dos proteínas muy importantes, Crotamina y Crotoxina.

La crotamina es un polipéptido pequeño compuesto por 42 aminoácidos y un peso de 4.8 kDa con carga positiva. Se ha visto que esta proteína presenta en ratones tanto propiedad citotóxica (necrosis muscular) como neurotóxica (parálisis rígida en los miembros posteriores). Actualmente no existen reportes con información precisa sobre el número de accidentes ofídicos provocados por esta especie; sin embargo, se han reportado algunos casos médicos en donde el cuadro clínico de envenenamiento en humanos ocasionado por mordedura de *C.d.terrificus* involucra problemas neurotóxicos. Entre estos se puede observar la presencia de pesadez palpebral, ptosis y parálisis del músculo facial y respiratorio, así como problemas miotóxicos: dolor muscular difuso, orina roja, desfibrinogación e insuficiencia renal; síntomas que son ocasionados tanto por crotoxina como por crotamina.

Por otro lado, la presencia o ausencia de crotamina en diversos venenos de especies mexicanas y sudamericanas, así como su variación en el porcentaje que esta proteína presenta en dichos venenos de manera intra e interespecie, así como ontogenética, ha sido reportado por diversos autores.

En este trabajo se logró obtener dos anticuerpos monoclonales anti-crotamina del veneno de *C.d.terrificus* por medio de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-crotamina, utilizando células de bazo de ratones inmunizados con bioconjugado de crotamina-BSA a distintas proporciones molares y células de mieloma sp2.

Los dos anticuerpos monoclonales obtenidos reconocieron crotamina de *C.d.terrificus* y de serpientes mexicanas de manera específica, sin embargo sólo uno es capaz de utilizarse para identificación y medición cualitativa de crotamina en venenos de especies del género *Crotalus*. Así mismo, se encontró reconocimiento cruzado de ambos anticuerpos monoclonales anti-crotamina hacia crotoxina; proteína presente en el veneno de serpientes del género *Crotalus*, lo cual hace suponer que crotoxina y crotamina tienen epítopes compartidos entre sí.

2. Introducción

2.1 Serpientes a nivel mundial y taxonomía

En el mundo existen 10,711 especies de reptiles, de las cuales 3, 691 (34.4%) son serpientes; aproximadamente el 23.4% (864) de estas especies se distribuyen en México, siendo el segundo país con mayor diversidad en reptiles. Los reptiles se clasifican en 4 órdenes: Crocrodylia (cocodrilos), Testudines (tortugas), Sphenodontia (tatuaras) y Squamata (lagartijas y serpientes) (Uetz *et al.*, 2018).

Dentro de las serpientes existen 3 familias importantes a nivel de salud: Elapidae, Colubridae y Viperidae (Flores-Villela y García- Vázquez., 2014). Los vipéridos son un grupo de serpientes venenosas con un par de colmillos móviles, retráctiles y huecos que forman parte del hueso maxilar superior (dentición solenoglifa). Los miembros de esta familia, presentan un cuerpo robusto y cabeza triangular debido a la presencia de un par de músculos compresores y un par de glándulas de veneno conectadas hacia los colmillos por medio de un par de conductos, y que al momento de morder, las glándulas son presionadas por los músculos expulsando el veneno a través de los colmillos (Figura 1) (Mackessy., 2010).

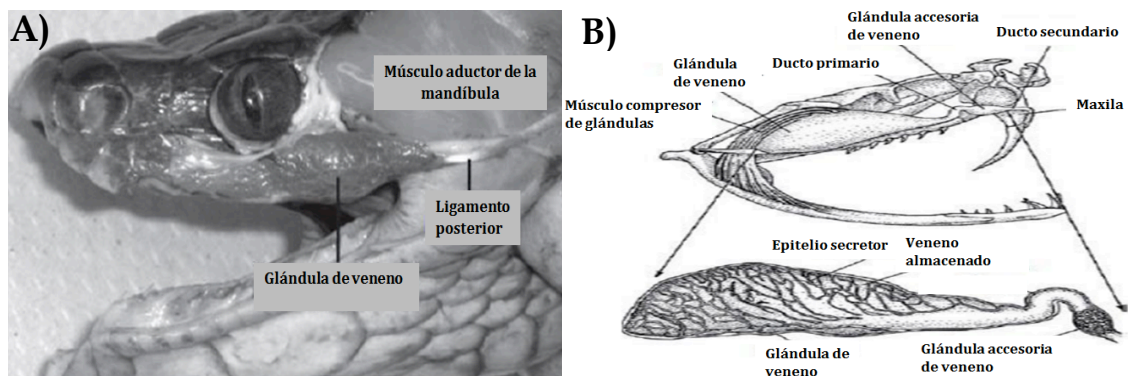


Figura 1. Aparato venenoso de una serpiente de la familia Viperidae. A) Glándula de veneno, fotografía de C. Rex. B) Esquema de aparato venenoso en Vipéridos. Imágenes tomadas y modificadas de Stephen P. (2010), y Mackessy (2010).

2.2 Subfamilia Crotalinae

Dentro de la familia Viperidae se encuentra la subfamilia Crotalinae, la cual se caracteriza por presentar dos fosetas loreales localizadas por debajo de las narinas; que ayudan principalmente a localizar a sus presas y defenderse de depredadores por medio de la temperatura (Figura 2) (Caldwell y Vit., 2014 y Castro *et al.*, 2015). Algunas especies de este grupo son las responsables de generar más del 90% de envenenamientos en el continente americano: siendo las más importantes las nauyacac (*Bothrops sp.*) y las serpientes de cascabel (*Crotalus sp.* y *Sistrurus sp.*) (de Roodt *et al.*, 2005).



Figura 2. Fosetas loreales de *Crotalus culminatus*. Fotografía tomada de Castro *et al.*, (2015).

2.3 Serpientes de cascabel

Las víboras de cascabel se encuentran exclusivamente en el continente americano, presentándose desde el Sureste de Canadá hasta el Sureste de Argentina. El nombre de este grupo se deriva del griego κρόταλον Krotalón, refiriéndose al cascabel presente en el ápice de su cola (Figura 3) (Durban *et al.*, 2017). En el continente americano se distribuyen 45 especies de serpientes del género *Crotalus* y únicamente 3 especies del género *Sistrurus*. En México se encuentran 40 especies del género *Crotalus* y una especie del género *Sistrurus* (*S. tergeminus*) (Uetz *et al.*, 2018).



Figura 3. Crótalo presente en serpientes del género *Crotalus*. Fotografía tomada de Castro *et al.*, (2015).

2.4 *Crotalus durissus terrificus*

Crotalus durissus terrificus (Laurenti, 1768) es considerada una subespecie de *Crotalus durissus*, distribuyéndose únicamente en Sudamérica, desde el Sur de Brasil, Uruguay, Norte de Argentina, Paraguay, Bolivia llegando hasta Perú (Figura 4) (Santoro M.L, *et al.*, 1999; Uetz *et al.*, 2018; Santos H.L., *et al.* 2019; Remuzgo C, *et al.*, 2000).



Figura 4. Mapa de distribución de *C.d.terrificus* en el continente Sudamericano. Imagen tomada y modificada de Colina *et al.*, (2012).

Con respecto a la morfología, *C.d.terrificus* presenta las mismas características de cualquier vipérido: cuerpo alargado y robusto, cabeza triangular, un par de fosetas loreales, dentición solenoglifa representada por un par de colmillos huecos y móviles conectados a glándulas de veneno y un cascabel en la parte final de su cola (Figura 5). Su alimentación está dada principalmente por mamíferos pequeños (ratas, ratones y ardillas) (Campbell y Lamar, 2004).



Figura 5. Cría de *C. durissus terrificus*. Fotografía tomada de Uetz (2018).

2.5 Venenos de serpientes

Un veneno se define como la mezcla compleja de compuestos orgánicos e inorgánicos, principalmente proteínas y al momento de internalizarse por cualquier vía a otro organismo; interfiere, daña o altera uno o más procesos fisiológicos y bioquímicos, ocasionando parálisis, muerte y pre-digestión del mismo (Arbuckie. K., 2015 y Lomonte *et al.*, 2014).

2.6. Proteínas de importancia médica del veneno de *C.d.terrificus*

Dentro del veneno de *C.d.terrificus* se han reportado dos proteínas muy importantes, crotamina y crotoxina. La crotoxina es uno de los componentes neurotóxicos bien descritos, contribuyendo con el 44.7% en la composición total

del veneno (Neri. C *et al.*, 2013). Con un peso de 14 kDa , heterodimérica, conformada por dos subunidades (Figura 6): 1) una subunidad ácida (Sub A), conocida como “Crotapotina” (CA), con un peso molecular de 9.4 kDa, carece de actividad enzimática y no es tóxica, formada por tres péptidos pequeños unidos por puentes disulfuro (Aird *et al.*, 1985) y, 2) una fosfolipasa de tipo A₂ (PLA₂) conocida como “subunidad básica” (Sub B), tóxica y con actividad catalítica, conformada por 122 aminoácidos con un peso molecular de 14.4 kDa. Al estar unidas ambas moléculas presentan una actividad sinérgica, promoviendo la toxicidad de crotoxina, debido a que la crotapotina funciona como chaperona de la PLA₂, favoreciendo la unión de PLA₂ con el botón presináptico, que inhibe la liberación de acetilcolina e impide la comunicación con la placa neuromuscular, y por lo tanto, evita la contracción muscular (Faure *et al.*, 2011). En ratones de laboratorio genera parálisis flácida en miembros posteriores y muerte por falla respiratoria, ocasionado por el bloqueo neuromuscular periférico (Chang y Lee., 1977).

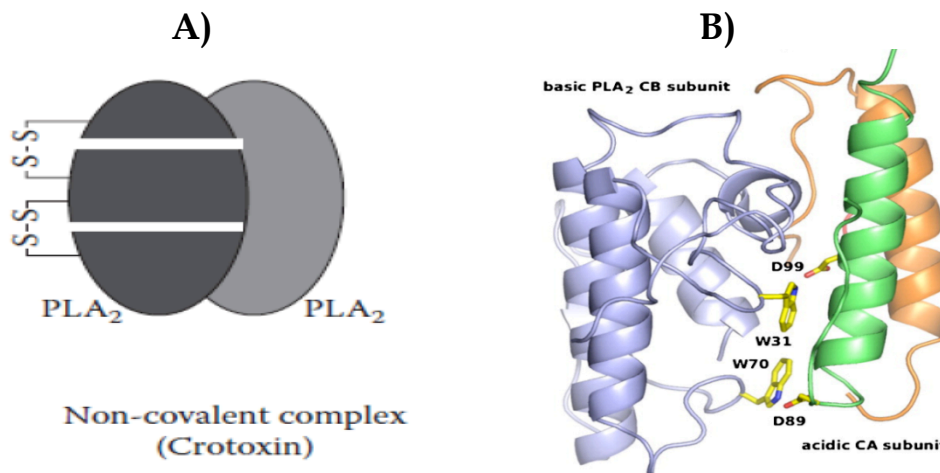


Figura 6. Estructura y conformación de crotoxina. A) Esquema de crotoxina donde se observan las dos subunidades que la conforman. Crotapotina, formada por tres péptidos unidos por enlaces disulfuro y la subunidad fosfolipasa. B) Estructura 3D de crotoxina por cristalografía de rayos X. Imágenes tomadas de Aird *et al.* (1985), Faure *et al.* (2011).

Otra proteína dentro del veneno en vipéridos es la crotamina, clasificada como miotoxina. Son pequeños péptidos de 42 aminoácidos, que inducen daño irreversible en las fibras musculares (mionecrosis) (Lomonte *et al.*, 2003). La crotamina se aisló por primera vez en 1947 utilizando el veneno de la serpiente de cascabel *C. durissus terrificus*, resultando ser el segundo componente mayoritario dentro del veneno de esta especie contribuyendo con el 38% (Goncalves & Polso., 1947; Neri C., 2013).

La crotamina es un polipéptido pequeño compuesto por 42 aminoácidos y un peso de 4.8 kDa (Goncalves & Polso., 1947; Coronado *et al.*, 2013), cargada positivamente al contener 11 residuos básicos (2 argininas y 9 lisinas) y 6 cisteínas que forman 3 puentes disulfuro, con un plegamiento homólogo a otras miotoxinas de otros venenos y un arreglo estructural similar a α - y β -defensinas (Figura 7) (Ganz and Leher., 1998; Dimarcq *et al.*, 1998). Se han descrito 2 isoformas de crotamina activas, donde, el único cambio en la secuencia de aminoácidos es la sustitución de una leucina por isoleucina en la posición 19; ambas isoformas presentan una DL_{50} de 0.5 mg/kg por ratón (Toyama *et al.*, 2000; Ponce-Soto *et al.*, 2007; Kerkis *et al.*, 2014).

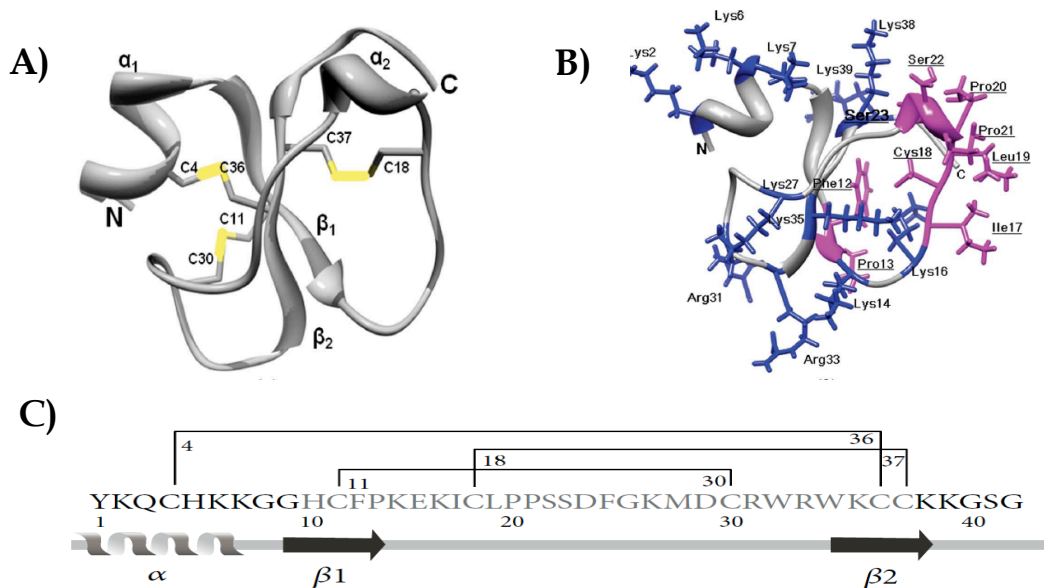


Figura 7. Estructura y conformación de la crotamina. A) Estructura terciaria de la crotamina. Región amino (N) y carboxilo (C) y puentes disulfuro (residuos de cisteínas) en amarillo. B) Residuos altamente hidrofóbicos en rosa y residuos cargados positivamente en azul. C) Secuencia de aminoácidos y puentes disulfuro de crotamina. Imágenes tomadas de Coronado *et al.* (2013), Kerkis *et al.* (2014).

La crotamina presenta propiedades tanto citotóxicas como neurotóxicas. Por un lado, se ha propuesto que la actividad citotóxica (necrosis muscular) es debida a la internalización celular y despolarización de la mitocondria (Kerkis *et al.*, 2004; Kerkis *et al.*, 2014). Al mismo tiempo, la actividad neurotóxica en ratones es evidente e inmediata, presentándose una serie de espasmos musculares que generan parálisis rígida en los miembros posteriores. Esto se explica por una despolarización del potencial de membrana en células del músculo esquelético, afectando a los canales de K⁺ dependientes de voltaje (Kv1.1-1.3) (Peigneur *et al.*, 2012).

2.7. Proteínas no neurotóxicas en el veneno de *C.d.terrificus*

Existen proteínas no neurotóxicas en el veneno de *C.d.terrificus*, tales como proteasas, serinoproteasas y metaloproteasas cuyos pesos moleculares en su mayoría son mayores a los 30 kDa. Las metaloproteasas son proteínas que provocan lesiones hemorrágicas en la zona dañada, mientras que las serinoproteasas son asociadas al cuadro clínico por provocar problemas de coagulación (Chang y Lee., 1977).

2.8 Epidemiología de *C.d.terrificus* y cuadro clínico

Gutiérrez J.M en el 2011 reportó que el número anual de accidentes ofídicos (mordedura por serpiente) en América Latina oscila entre 80,329 a 129,084 casos. Con respecto a Sudamérica, la gran mayoría de los accidentes ofídicos son provocados por el género *Bothrops*, seguidos por el género *Crotalus*; sin embargo, estos estudios carecen de información precisa del número de accidentes ofídicos provocados particularmente por *C.d.terrificus*. Aunado a esto, el cuadro clínico de envenenamiento en humanos ocasionado por mordedura de *C.d.terrificus* involucra tanto problemas neurotóxicos: pesadez palpebral, ptosis y parálisis del músculo facial y respiratorio, como problemas

miotóxicos: dolor muscular difuso, orina roja o marrón, desfibrinogación e insuficiencia renal (Figura 8). Estos síntomas son producto de la presencia de la crotoxina y la crotamina como se mencionó anteriormente (de Roodt., 2002; Campell y Lamar., 2004; Guidolin *et al.*, 2013).



Figura 8. Sintomatología de envenenamiento en humanos por mordedura de *C. durissus terrificus*. A) Niño de 12 años de edad presentando pesadez palpebral en Sao Paulo, Brasil. B) Hombre de 52 años de edad presenta parálisis de músculo facial. C) Pierna derecha con inflamación en zona de mordedura. D) Hombre de 54 años con parálisis. E) Mordedura en dedo índice de mano izquierda con sutura en Valle Sandia, Perú. Imágenes tomadas de Campbell and Lamar (2004).

2.9 Tratamiento de mordeduras de serpientes

En la actualidad, los fabotéropicos o antivenenos de tercera generación, son el único tratamiento efectivo para tratar los síntomas de envenenamiento ocasionados por mordeduras de serpientes venenosas. Los antivenenos están compuestos de la región que comprende el fragmento $F(ab')_2$ de inmunoglobulinas G (IgG) digeridos con pepsina y posteriormente liofilizados. Estos antivenenos normalmente son producidos en caballo, aunque existen otros modelos animales. Al digerir con pepsina se elimina el fragmento cristalizante (Fc), el cual está altamente relacionado con reacciones secundarias cuando se administran IgG's completas en un individuo (Bérrard-Valle *et al.*, 2015).

2.10 Anticuerpos policlonales y monoclonales

El compuesto base de los antivenenos son las inmunoglobulinas G (IgG's) o anticuerpos (Ac's) secretados por plasmocitos (linfocitos B capaces de secretar Ac's). En los mamíferos, los linfocitos B se originan en hígado durante la vida fetal, pero poco tiempo después del nacimiento la médula ósea se convierte en el sitio fundamental de linfopoyesis. En la médula, los linfocitos B surgen de una población de células "madre" autorrenovables. Los linfocitos inmaduros permanecen en contacto con la matriz de células del estroma, que producen los factores necesarios para su división. Los genes de las Ig's se ensamblan durante este proceso de diferenciación, que resulta en linfocitos B "vírgenes" con Ig's de superficie, pero que no han entrado en contacto con el antígeno. Estos linfocitos B vírgenes migran de la médula a los tejidos linfoides periféricos, tales como el bazo y los ganglios linfáticos, donde ocurrirá el encuentro con el antígeno y la diferenciación posterior a plasmocitos, los cuales tienen la capacidad de secretar Ac's (Figura 9) (Kindt *et al.*, 2007).

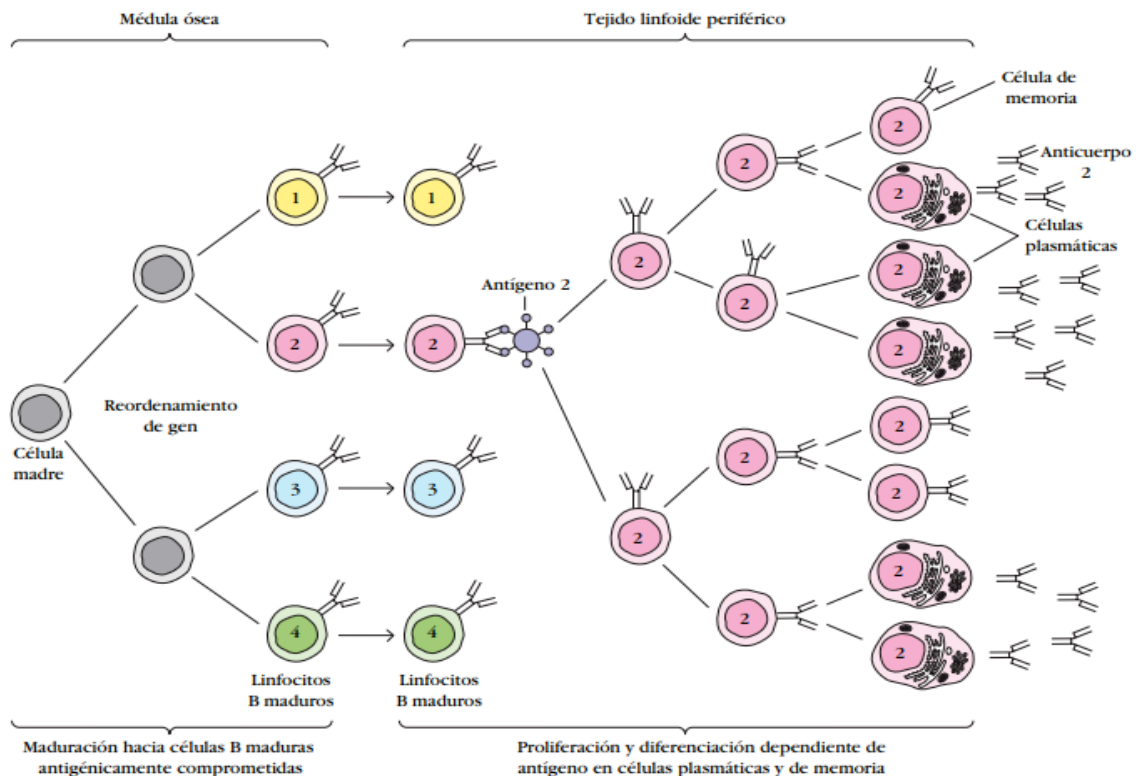


Figura 9. Producción y maduración de anticuerpos. Imagen tomada de Kindt *et al* (2007).

Los Ac's son proteínas conformadas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas [H] de 50 kDa y dos cadenas ligeras [L] de 25 kDa, unidas por enlaces disulfuro, producidas por plasmocitos en un 80% en el bazo, y son específicas hacia diferentes zonas del antígeno (epítopes). Esta respuesta se produce bajo el estímulo humoral que desarrolla un animal hiperinmunizado (Kindt *et al.*, 2007). Las cadenas H y L de los anticuerpos presentan una región carboxilo conocida como fracción cristalizable (Fc) y una región amino o variable (Fab), que reconoce el epítipo de la molécula ajena al cuerpo (Figura 10.A). Existen diferentes clases y subclases de moléculas de Ig, que varían en estructura. Las Ig's se agrupan en 5 clases: IgM, IgD, IgG, IgE e IgA, que están determinadas por el tipo de cadena pesada que poseen: mu, delta, gamma, épsilon y alfa (Figura 10.B). En particular, la IgG puede subdividirse en varias subclases (1, 2, 3 y 4 en el humano y 1, 2a, 2b y 3 en el ratón) (Gavilondo C., 1995). Mientras que las IgM's son secretadas en respuestas humorales primarias timodependientes, presenta gran avidéz por antígenos bacterianos y es fijadora del complemento. Las IgA's son las responsables en formar la primera línea de defensa frente a infecciones al inhibir la adhesión bacteriana y eliminar patógenos o antígenos a través de la vía excretora. Por otro lado las IgE's se encuentran en bajas concentraciones en el suero, pero desencadenan complejas reacciones inmunitarias como la desgranulación de mastocitos, liberación de histamina e intervención de eosinófilos en respuestas inflamatorias. Finalmente, las IgD's no se encuentran en el suero, sin embargo, están presentes en la superficie de linfocitos B, siendo un receptore antigénico de membrana (Kindt *et al.*, 2007).

Sólo existen dos tipos de cadenas ligeras: kappa y lambda, cada Ac contiene sólo un tipo de ellas. En el ratón y la rata, alrededor del 95% de las cadenas ligeras son kappa; tanto estas como las lambda participan en la especificidad de los anticuerpos (Gavilondo C., 1995).

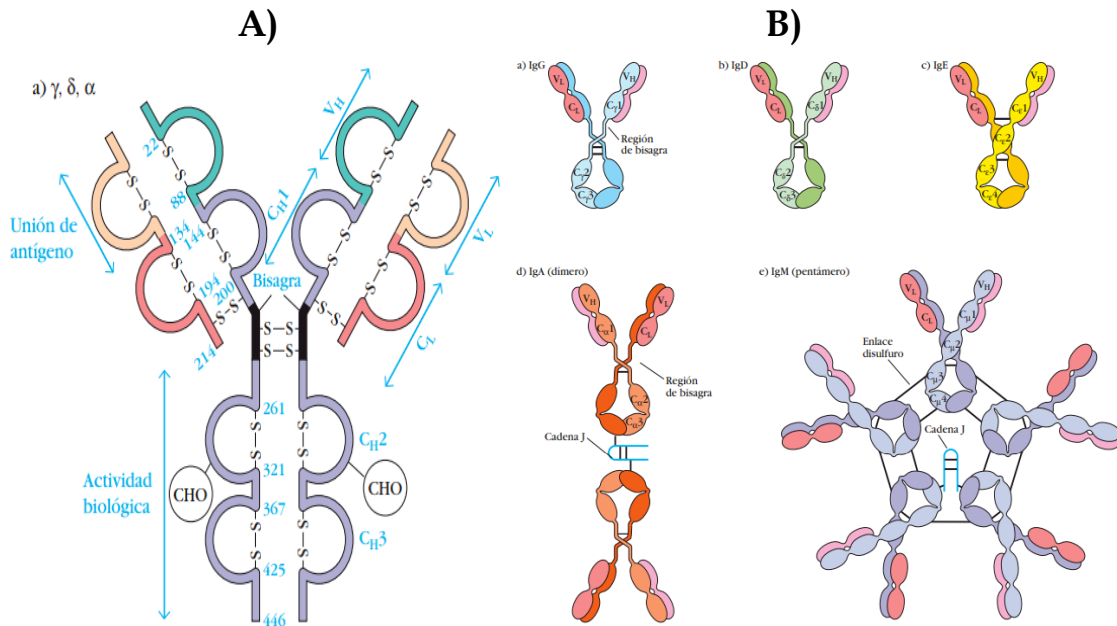


Figura 10. A) Diagrama esquemático de la estructura de las inmunoglobulinas tipo G. B) Estructuras generales de las cinco clases principales de anticuerpos secretados. Imagen tomada de Kindt *et al* (2007).

Los Ac's están categorizados en dos tipos: policlonales y monoclonales; los primeros son una mezcla de anticuerpos provenientes de diferentes clonas de linfocitos B; que reconocen distintas regiones (epítopes) de un mismo antígeno. Los epítopes reconocidos por cada anticuerpo, su afinidad y su clase, son diferentes y pueden cambiar a lo largo del proceso de inmunización. El inconveniente en esta clase de anticuerpos es que, en algunas ocasiones, se presenta reactividad cruzada al reaccionar contra diferentes determinantes antigénicos de distinto origen proteico (Figura 12) (Gavilondo C., 1995).

Un epítope es una región determinada en la estructura general de un antígeno, el cual es reconocido por la región del anticuerpo conocido como parátipo. Un epítope en un antígeno proteico puede incluir elementos de estructuras primarias, secundarias, terciaria e incluso cuaternaria. Dando lugar a los epítomos lineales, en donde la región reconocida por el parátipo es una región determinada a los largo de la cadena de aminoácidos desplegada o desnaturalizada. Mientras que los epítomos estructurales o conformacionales, son regiones del antígeno que se encuentra plegado en estructuras

secundarias, terciarias y cuaternarias. En donde, una o más cadenas interactúan entre si, formando una región estructural definida dentro de la proteína (Figura 11) (Kindt *et al.*, 2007).

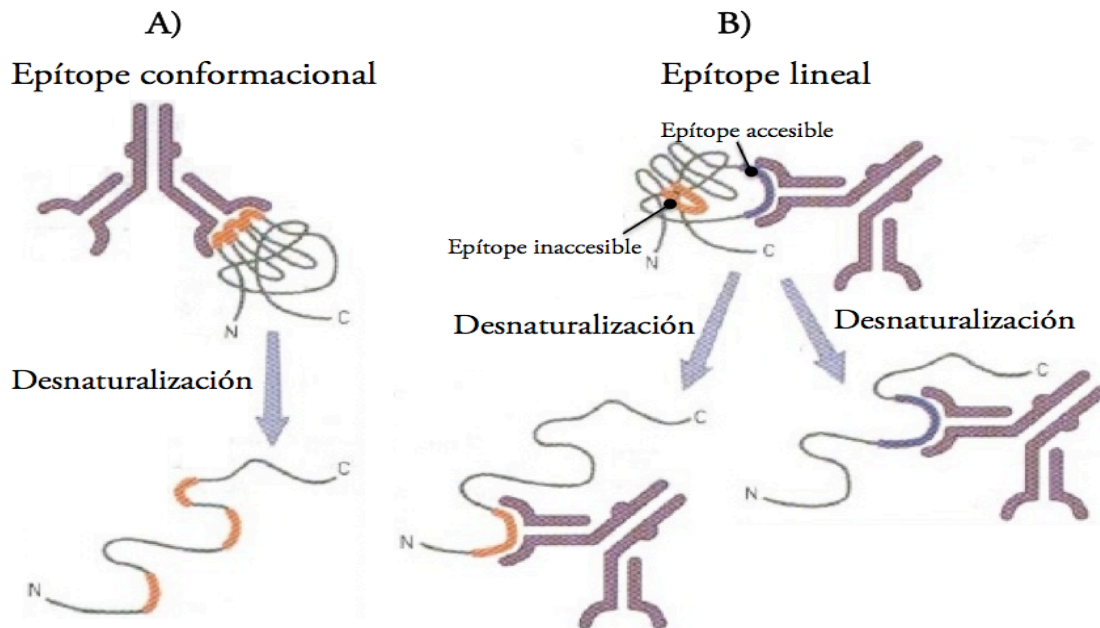


Figura 11. Clasificación de epítopos. A) Epítipo conformacional con pérdida de reconocimiento por desnaturalización. B) Epítipo lineal donde la Ig se une a los dos epítopos lineales, tanto en la conformación nativa como en la desnaturalizada.

Por otra parte, los anticuerpos monoclonales se producen por una sola clona de células B, presentando reconocimiento único y específico hacia una determinante antigénica en particular (sólo un epítipo). La obtención de este tipo de anticuerpos se descubrió entre 1974 y 1975 en Cambridge, Reino Unido, por Georges Köhler y Cesar Milstein, quienes obtuvieron hibridomas derivados de la fusión de linfocitos B provenientes de ratones BALB/c inmunizados con antígenos definidos, y células de mieloma de la estirpe MOPC21, generando líneas híbridas de crecimiento continuo capaces de secretar una variedad de anticuerpos que eran codificados por el linfocito parental (Figura 12) (Köhler, G. y C. Milstein., 1975).

Por otra parte, los hibridomas no sólo secretan los anticuerpos codificados por el genoma del linfocito parental, sino que presentan otros rasgos muy

importantes por los cuales siguen siendo una excelente opción en cuestiones de laboratorio, algunas de estas características son:

- a) Crecen indefinidamente *in vitro*, soportando la congelación indefinida y la clonación (crecimiento a partir de una sola células inicial). Esta última es esencial para garantizar el origen monoclonal de las preparaciones.
- b) Inducen tumores ascíticos cuando son inoculados a animales consanguíneos como los que les dieron origen, lo cual resulta de gran utilidad para los efectos de la producción de AcM.
- c) Secretan anticuerpos en grandes cantidades.

Gracias a las características de la técnica de generación de hibridomas, los AcM producidos por fusión celular de linfocitos y mielomas han permitido obtener la especificidad, reproducibilidad e inagotabilidad de AcM y los ha convertido rápidamente en uno de los elementos básicos para el desarrollo de la biomedicina moderna e investigación (Gavilondo C., 1995).

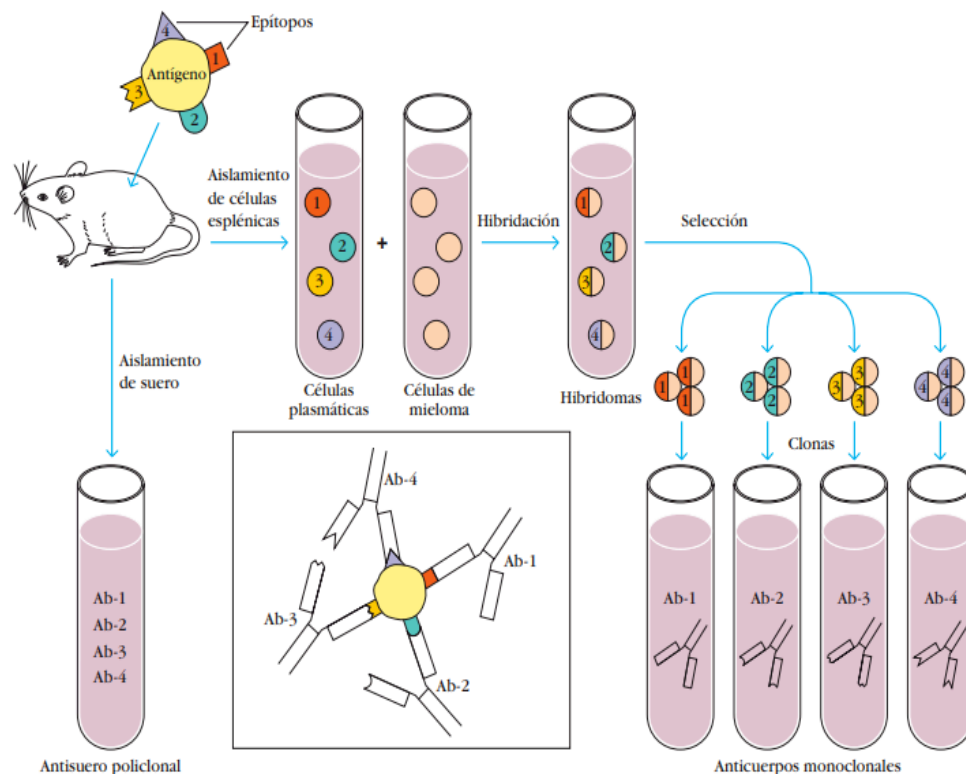


Figura 12. Diagrama mostrando la obtención de anticuerpos monoclonales y la diferencia entre anticuerpos policlonales y monoclonales. Imagen tomada de Kindt *et al.*, (2007).

2.11 Bioconjugación

El proceso de bioconjugación consiste en la unión de una molécula generalmente poco inmunogénica con un acarreador de tipo proteico, utilizando un agente entrecruzador, formando un complejo de ambas moléculas. La molécula resultante es más grande e inmunogénica, por lo cual se logra mayor producción de anticuerpos en un individuo sometido a un esquema de inmunización (Hermanson., 2013).

La elección del agente entrecruzador depende de las características conformacionales y distributivas de las proteínas a unir, ya que los agentes de entrecruzamiento contienen extremos reactivos para grupos funcionales específicos, tales como aminas primarias y sulfhidrilos, en proteínas u otras moléculas (Hermanson., 2013).

2.12 Entrecruzamiento con Glutaraldehído

Glutaraldehído es el entrecruzador más utilizado para la unión de dos proteínas iguales o distintas, actuando en la región carboxilo (COOH) y amino (NH₂). Este agente entrecruzador puede presentar dos tipos de conformación: 1) como un hemiacetal cíclico o 2) como una proteína dimérica, en ambos casos, glutaraldehído es una molécula homobifuncional con dos grupos hidroxilo (OH) situados en los extremos (Figura 13 A), ocasionando una reacción con las aminas primarias de las lisinas presentes en las moléculas a entrecruzar; formando bases de shiff y obteniendo un complejo proteico de mayor tamaño y mayor inmunogenicidad (Figura 13 B y C) (Hermanson., 2013).

Los inmunoconjugados pueden tomar diferentes formas dependiendo del tipo de acarreador elegido y los epítopes seleccionados para unirse al acarreador. Una de las proteínas acarreadoras usualmente usadas es albúmina sérica bovina (BSA), esta proteína presenta un peso de 67 kDa y dentro de su

estructura tiene un total de 69 lisinas, siendo un muy buen candidato para este proceso de unión (Hermanson., 2013).

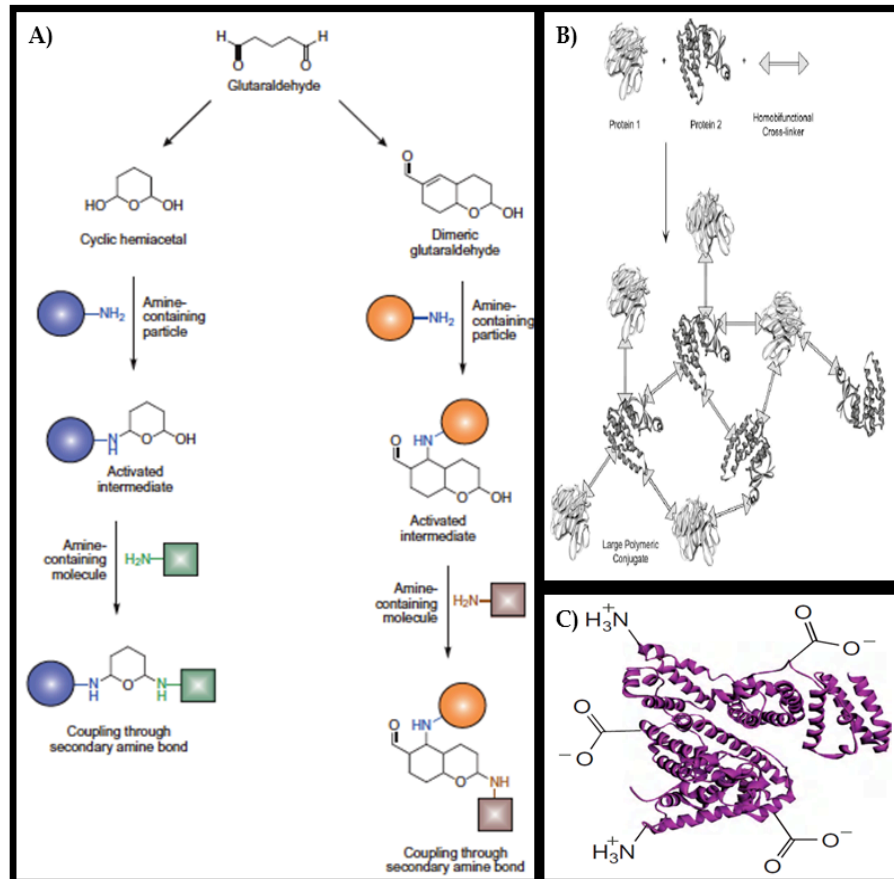


Figura 13. A) Mecanismos de acción del glutaraldehído al formar conjugados. B) Diagrama mostrando la unión de dos proteínas mediante un entrecruzador homobifuncional. C) Estructura de Albumina Sérica Bovina. Imágenes tomadas de Hermanson (2013).

3. Antecedentes

La presencia o ausencia de crotamina, así como la variación de esta proteína intra e inter especie ha sido reportada por diversos autores. Calvete *et al.* (2010) caracterizaron y compararon los venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de serpientes de cascabel de América Central *Crotalus simus*, y de las subespecies de *Crotalus durissus* de Sudamérica como *C.d.cumanensis*, *C.d.durissus*, *C.d.ruruima* y *C.d.terrificus*. Encontraron que el veneno de neonatos y adultos de *C.simus* mexicanas no presentan crotamina. Por otra parte, reportaron que cada una de las diferentes subespecies en estado adulto de *C.durissus* difieren en la concentración de crotamina en su veneno; *C.d.durissus* de Guyana presenta un 18% de crotamina, *C.d.cumanensis* de Venezuela un 13.1% y las dos últimas de Brasil, despliegan una concentración de 1.5% para *C.d.ruruima* y 19% de crotamina *C.d.terrificus*. (Figura 14).

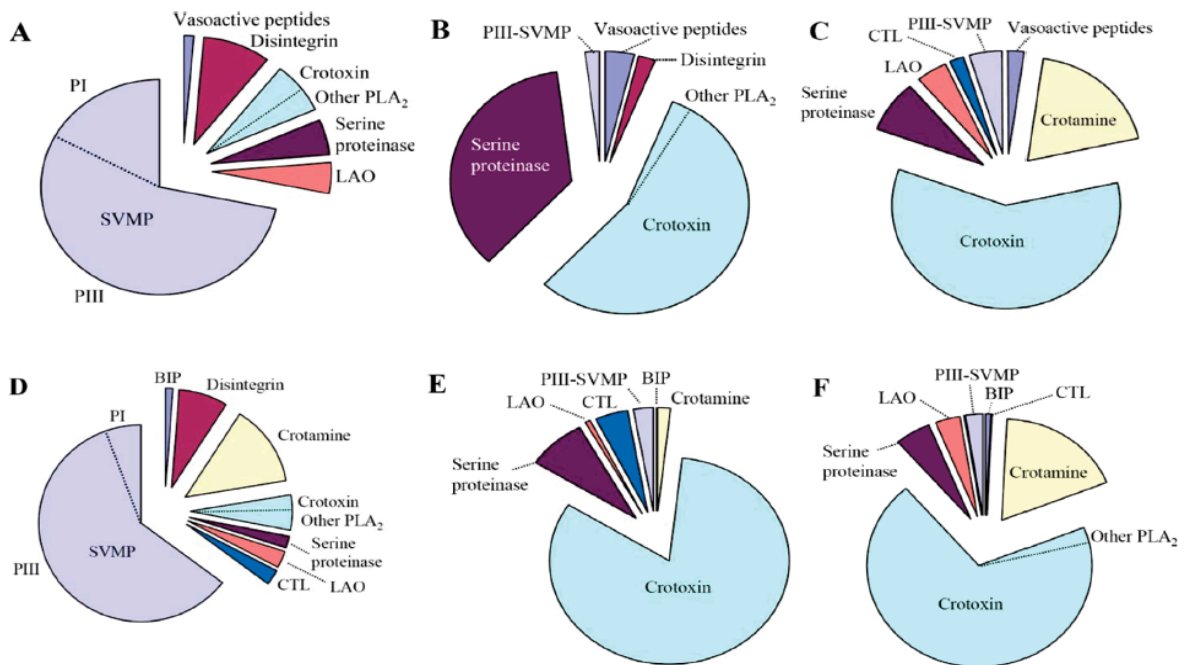


Figura 14. Composición de los venenos de *C. simus* y subespecies de *C. durissus*. Presencia relativa de proteínas provenientes de familias de toxinas diferentes en los venenos de (A) adulto y (B) neonato *C. simus*, (C) *C. d. terrificus*, (D) *C. d. cumanensis*, (E) *C. d. ruruima*, y (F) *C. d. durissus*. BPP, péptidos activadores de bradikina; fragmentos-DC, metaloproteasas Zn₂₊ (SVMPs); LAO, L-aminoácido oxidasa; PLA₂, fosfolipasa A₂; CRISP, proteína secretora rica en cisteína; Galectina, lectina específica a galactosa; CTL, molécula de unión a lectina tipo C; PI, metaloproteasas tipo I (SVMPs); BIP, péptidos inhibidores de bradikina (Modificado de Calvete *et al.*, 2010).

En 2013, Neri *et al.* Caracterizaron el veneno de tres especies de cascabel adultas (un ejemplar para cada especie); *C.s.culminatus*, *C.s.simus* y *C.s.tzabcan*. Se encontró un 3.3% de crotamina en el veneno de *C.s.culminatus* de México; sin embargo, *C.s.simus* de Costa Rica (Figura 15) y *C.s.tzabcan* de México no poseen crotamina en su veneno.

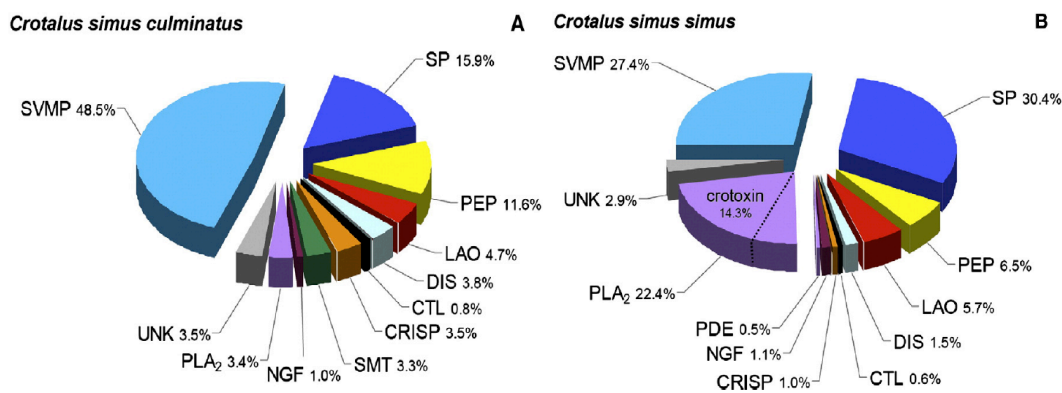


Figura 15. Composición de los venenos de *C.s. culminatus* (A) y *C. s. simus* (B) acomodado en familias proteicas (en porcentajes). Metaloproteasas (SVMP), serinoproteasas (SP), péptidos vasoactivos (PEP), L-aminoácidos oxidasas (LAO), desintegrinas (DIS), proteínas tipo C-lectinas (CTL), proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISP), fosfodiesterasas (PDE), miotoxinas pequeñas (crotamina) (SMT), factor nervioso de crecimiento (NGF), fosfolipasas A₂ (PLA₂, incluyendo crotoxina) y desconocida (UNK). (Modificado de: Neri *et al.*, 2013a).

Cuatro años más tarde Durban *et al.*, en el 2017 analizaron el veneno de las mismas especies mencionadas en el párrafo anterior, encontrando diferencias en cuanto a la procedencia y estadio de las especies. Al utilizar venenos de *C.s.tzabcan* juveniles y adultos de Guatemala y *C.s.simus* adultos de México, mientras que los venenos de *C.s.culminatus* provenían de ejemplares juveniles y adultos mexicanos. Encontraron una variación en la ontogenia de dos especies. Por un lado *C.s.tzabcan*, presentó en su veneno en estadio juvenil un 37.9% de crotamina mientras que la fase adulta hubo una disminución de crotamina hasta un 18.5%. También observaron que el veneno de *C.s.culminatus* en la fase juvenil presentaba 10.1%, esto es 4.1% más crotamina que el veneno del estadio adulto con un 6% de crotamina total. Lo

cual muestra una disminución de la presencia de crotamina en el veneno durante el crecimiento de estas dos especies. Por otro lado, *C.s.simus* de México no presentó crotamina en el veneno de la fase adulta, siendo similar al veneno de *C.s.simus* de Costa Rica evaluado por Neri *et al.*, 2013.

En ese mismo año fue estudiado el veneno de *C.basiliscus*; otra serpiente de cascabel mexicana, Segura *et al.*, 2017 describieron la composición de este veneno; donde el 14% son PLA2, 11% son serinoproteasas y un 68% son metaloproteasas. Esta especie no presentó ninguna fracción de crotamina en su perfil proteico.

En el laboratorio del Dr. Alagón se han analizado diversos venenos de especies mexicanas y sudamericanas, encontrando diferencias en la presencia/ausencia de crotamina en dichos venenos, así como una variación en el porcentaje conque esta proteína se representa en dichos venenos dependiendo del estadio en que se encuentren las serpientes. Se encontró en *C. totonacus* 4 % de crotamina en estadios neonatos y 2 % en adultos. *C. molossus* va de 5 a 25% en ejemplares adultos y *C. basiliscus* presenta 29% en adultos. Finalmente, tenemos que el veneno de *C.d.terrificus* adulto de Argentina contiene 38% de crotamina.

En la tesis de maestría de Neri Castro (2013), se analizaron los venenos de múltiples ejemplares por especie de serpientes de cascabel mexicanas correspondientes a 8 estados de la República Mexicana, reportando la existencia de variación intra e inter especie en la presencia / ausencia de crotamina en venenos de la misma especie y diferente zona de colecta. (Figura 16).

Presencia de crotamina en el veneno de <i>C. s. culminatus</i> .			Presencia de crotamina en el veneno de <i>C. s. simus</i> .			Presencia de crotamina en el veneno de <i>C. s. tzabcan</i> .		
Ejemplar	Localidad	Crotamina	Ejemplar	Localidad	Crotamina	Ejemplar	Localidad	Crotamina
HK169	Tepalcingo, Morelos	+	HK224	Playas del Conchal, Veracruz	-	HK216	Chetumal, Quintana Roo	-
Csim2A	Villa de Ayala, Morelos	-	HK270	Actopan, Veracruz	-	HK218	Chetumal, Quintana Roo	-
HK203	Tlaltizapán, Morelos	-	HK226	La Tinaja, Veracruz	-	HK211	Solidaridad, Quintana Roo	-
HK150	Puente de Ixtla, Morelos	+	HK268	Actopan, Veracruz	-	HK217	Chetumal, Quintana Roo	-
HK133	Alpuyeca, Morelos	+	HK231	Punte Nacional, Veracruz	-	HK214	Solidaridad, Quintana Roo	-
Csim2B	Villa de Ayala, Morelos	-	HK225	Tinajas, Veracruz	-	HK207	Solidaridad, Quintana Roo	-
HK168	Tepalcingo, Morelos	+	HK066	Chiapa de Corzo, Chiapas	-	HK212	Solidaridad, Quintana Roo	-
HK205	Chilpancingo, Guerrero	+	HK065	Copainalá, Chiapas	-	HK221	San Manuel, Quintana Roo	+
HK204	Tlaltizapán, Morelos	-	HK085	Chiapa de Corzo, Chiapas	-	HK254	Mérida, Yucatán	-
			HK084	Chiapa de Corzo, Chiapas	-	HK253	Mérida, Yucatán	-
			HK176	Santo Domingo, Oaxaca	+	HK255	Mérida, Yucatán	+
						HK269	Calakmul, Campeche	-

Figura 16. Variación intra e inter especie en la presencia / ausencia de crotamina en venenos de 3 especies mexicanas. (Modificado de Neri. C., 2013b).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2010 reportó que *C.atrox*, *C.oreganus*, *C.scutulatus*, *C.totonacus*, *C.viridis*, *C.simus*, *C.horridus*, *C.durissus* y *C.adamanteus* son las serpientes venenosas con mayor importancia médica en América. Seis de las nueve especies en esta lista son mexicanas, sin embargo, solamente se tiene reportada la composición de veneno en tres de las seis especies mexicanas (*C. oreganus*, *C.totonacus* y *C.simus*); donde el veneno de *C.totonacus* y *C.oreganus* son positivos para crotamina, mientras que *C.simus* es negativo. Se desconoce la composición del veneno en las otras tres especies mexicanas con importancia médica (*C.atrox*, *C.scutulatus*, *C.viridis*).

En ese mismo trabajo Neri C. trabajó con 2 diferentes lotes de antivenenos obtenidos mediante esquemas de inmunización en caballos utilizando veneno completo de diferentes especies: Viper Stat de uso veterinario, donde retó 400 µl de antiveneno contra 1.5 LD₅₀ de veneno de *C.durissus terrificus*, con la finalidad de neutralizar la actividad letal y lo que observó fue que esta dosis de antiveneno no neutralizan el efecto crotamina. El otro lote fue Antivipmyn, antiveneno polivalente Mexicano hecho en caballo utilizando una mezcla de venenos de *B. asper* y *C.simus*. Retó dos diferentes volúmenes de antiveneno contra 3DL₅₀ del veneno total de *C.d. terrificus*, observando que con 200 µl de

antiveneno todos los ratones mueren y al utilizar 477 μ l los ratones sobreviven pero muestran “efecto crotamina”.

Por otro lado, en trabajos de laboratorio se han probado dos antivenenos de uso comercial, con el mismo objetivo de neutralizar la actividad letal de 3DL₅₀ del veneno de *C.d.terrificus*. Antiveneno mexicano de Birmex (L: FV030A, V: DIC-16), con Ac’s policlonales hecho en caballo inmunizado con venenos de *C. basiliscus* y *B. asper*. Al retar 50 μ l de antiveneno todo el grupo de ratones muere, pero al utilizar 200 μ l la actividad letal del veneno se neutraliza, sin embargo, en los ratones tratados con 200 μ l se observó que se reduce el tiempo del efecto crotamina a menos de 30 minutos. El segundo antiveneno probado en el laboratorio fue un anticrotalico Argentino (L: 343, V: 31-AGO-15) polivalente de caballo inmunizado con veneno de *C.d.terrificus*, la neutralización con este antiveneno no se ha determinado aún pero al retar un volumen de 200 μ l, los ratones sobreviven mostrando un efecto crotamina igual que el grupo anterior. De manera que nos permite deducir que por lo menos estos antivenenos comerciales necesitan una mejora para neutralizar el “efecto crotamina” (Figura 17).

Antivenenos que neutralizan el efecto de crotamina 14 μ g/ratón							
Productor	Antiveneno	Lote y fecha caducidad	País	Especies utilizadas	Hecho	Efecto crotamina	Neutralización (μ l/3DL ₅₀)
Antivipmyn de Bioclon	Policlonal		México	<i>B. asper</i> y <i>C. simus</i>	Caballo	No neutraliza	200-477
Birmex	Policlonal	L: FV030A V: DIC 16	México	<i>C.basiliscus</i> y <i>B.asper</i>	Caballo	Neutraliza (efecto < 30 min)	50-200
Industria Argentina	Policlonal	L:343 V:31-AGO-15	Argentina	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Caballo	Neutraliza (efecto < 30 min)	~200

Figura 17. Neutralización de distintos antivenenos comerciales contra la actividad letal de veneno de *C.d. terrificus*.

En cuanto a las proteínas conjugadas con acarreadores, utilizando distintos agentes entrecruzadores Mera *et al.*, en el 2008 evaluaron la eficacia de tres entrecruzadores para la producción de AcM contra moléculas pequeñas: carbodimida (EDC), bis (sulfosuccinimidyl) suberato (BS3) y glutaraldehído. Los resultados por ELISA demostraron que el glutaraldehído fue el mejor agente de entrecruzamiento para la producción de anticuerpos en suero contra moléculas pequeñas como N^ε-(carboximetil) lisina (CML). Estos resultados, sugieren que utilizar acarreadores para entrecruzar solamente moléculas pequeñas con importancia médica en el envenenamiento; con proteínas más inmunogénicas, puede ser una alternativa para la obtención de anticuerpos monoclonales específicos utilizados en la elaboración de antivenenos en la industria.

4. Justificación

La obtención de anticuerpos monoclonales contra crotamina utilizando el veneno de *C. durissus terrificus*, permitirá la detección y cuantificación de esta proteína en el veneno de *C. durissus terrificus*, así como en otras especies, subespecies e individuos dentro de una misma especie de vipéridos mexicanos.

Lo anterior ayudará a generar información sobre la composición de los venenos, así como la predicción de cuadros clínicos en pacientes envenenados por víboras de cascabel.

5. Hipótesis

La inmunización de ratones con crotamina conjugada con albúmina permitirá obtener anticuerpos monoclonales que reconocerán específicamente a crotamina de diferentes venenos de serpientes del género *Crotalus*.

6. Objetivo general

Producción de anticuerpos monoclonales anti-crotamina a partir de la inmunización de complejos BSA-crotamina del veneno de *Crotalus durissus terrificus*, en ratones de la cepa BALB/c.

7. Objetivos particulares

- Determinar la relación molar óptima entre crotamina y BSA, mediante la medición de los títulos de anticuerpos policlonales anti-crotamina en el suero del ratón.
- Evaluar el reconocimiento específico de los anticuerpos monoclonales obtenidos hacia crotamina de *C. durissus terrificus*.

- Evaluar el reconocimiento cruzado de los anticuerpos monoclonales obtenidos contra distintas proteínas en venenos de serpientes de múltiples especies de cascabeles mexicanas.

8. Estrategia experimental

La Figura 18 muestra el diagrama de flujo de las actividades realizadas para cumplir con los objetivos de este proyecto.

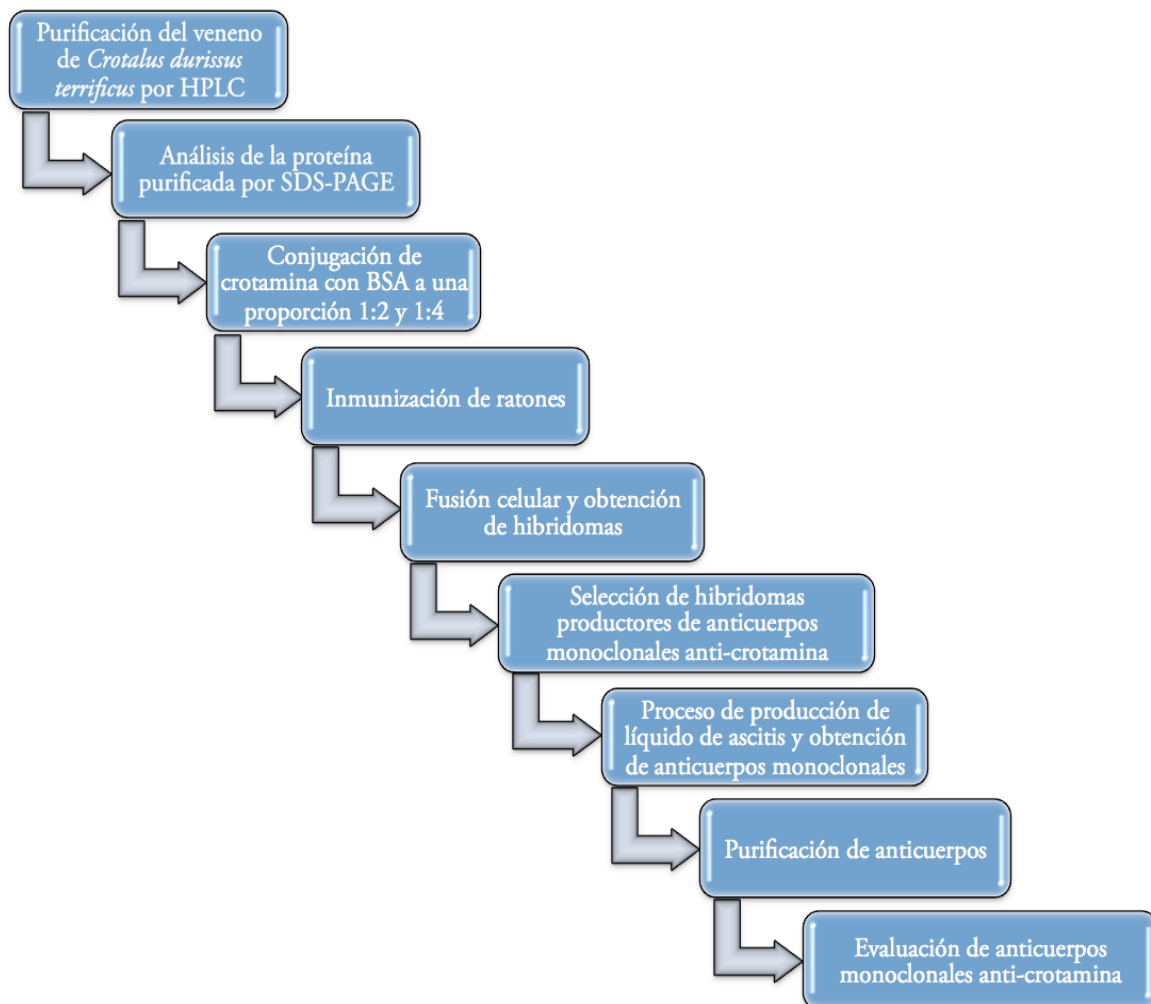


Figura 18. Esquema de actividades.

9. Materiales y métodos

9.1 Animales de laboratorio

Se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c entre 18 y 20 gramos, proporcionados por el bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, Morelos. La fase experimental fue aprobada por el comité de bioética del mismo instituto con el número de registro 340.

9.2 Obtención de veneno

El veneno utilizado en este proyecto corresponde a un ejemplar adulto argentino de *Crotalus durissus terrificus*, donado por el Dr. Adolfo de Roodt del Instituto Malbran de Buenos Aires, Argentina. El veneno se encuentra liofilizado dentro del banco de venenos en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano en el Instituto de Biotecnología de la U.N.A.M.

9.3 Cuantificación proteica del veneno por Absorbancia ($A_{280\text{nm}}$)

La concentración de proteína se cuantificó utilizando un espectrofotómetro (Eppendorph, Biophotometer) y una celda de cuarzo (Beckman) de 1 cm de longitud, basándose en la cuantificación de proteínas gracias a la presencia de 3 aminoácidos con anillos aromáticos (tirosina, triptófano y fenilalanina) que absorben luz a la longitud de onda de 280 nm.

Se utilizó un tubo eppendorf con 10 mg de veneno de *C.d.t* liofilizado, el cuál se resuspendió con 1 mL de agua tetradestilada con ácido trifluoroacético al 0.1% y centrifugó 5 minutos a 13,000 rpm, posteriormente se desechó el pellet formado.

A continuación se realizó una dilución 1:100 del veneno en solución con agua y ácido trifluoroacético y se leyó la concentración de proteína mediante un espectrofotómetro (Eppendorph, Biophotometer) a 280 nm con una celda de cuarzo (Beckman) de 1 cm de longitud, se utilizó agua y ácido trifluoroacético como solución blanco. Su valor se estimó asumiendo que una absorbancia de uno equivale a 1 mg/mL con base en la ley de Lambert-Beer y multiplicándolo por el factor de dilución.

9.4 Fraccionamiento del veneno de *C.d.terrificus* por RP-HPLC

La purificación de crotamina se realizó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), presentando una fase estacionaria no polar (columna C18) y una fase móvil polar, que eluye secuencialmente los componentes retenidos mediante un cambio de polaridad de la misma.

Se aplicaron por corrida, 6 mg de veneno liofilizado de *C.d.t* disueltos en 1 ml de H₂O / TFA 0.1% (solvente A). Para eliminar los restos insolubles se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min y el sobrenadante se inyectó a una columna analítica C₁₈ (GRACE 250 mm x 4.6 mm) equilibrada con solvente A. La columna se eluyó con un gradiente creciente (0-70% v/v) de acetonitrilo / TFA 0.1% (solvente B) a un flujo de 1 ml/min por 90 min. Las fracciones fueron monitoreadas a 280 nm, colectadas en tubos de 1.5 ml y se sometieron a un proceso de secado para eliminar los solventes en una centrífuga de vacío (Speedvac Savant). Finalmente cada fracción fue resuspendida en 1 ml de solución PBS. La cantidad de proteína se determinó por lectura de A_{280 nm} dividiéndola entre el coeficiente de extinción para cada proteína recolectada y se almacenaron a 4°C para su posterior uso.

9.5 Determinación de masa molecular

La determinación de las masas moleculares de los picos de interés se realizó en el laboratorio de secuenciación y masas del Instituto de Biotecnología de la UNAM, dirigido por el Dr. Fernando Zamudio, donde se utilizó un espectrómetro de masas LTQ-Orbitap XL (Thermo-Fischer) con sistema de ionización tipo nanoelectrospray (ESI). Los resultados espectrométricos se obtuvieron utilizando el programa Tune Plus.

9.6 Evaluación de actividad biológica de crotamina

Con el objetivo de corroborar la actividad de crotamina purificada proveniente del veneno de *C.d.t.*, se utilizó un grupo de 3 ratones hembras BALB/c de 18 a 20 g de peso. Se administraron a cada ratón por vía intravenosa, 10 µg de proteína en un volumen de 500 µL de solución PBS. Se utiliza esta concentración de proteína ya que la DL₅₀ de crotamina es de 15 µg por ratón. Este procedimiento se realizó para las dos señales obtenidas por RP-HPLC de crotamina purificada, los cuales previamente se habían cuantificado por A₂₈₀ nm. Momentos después de la administración intravenosa se registró la presencia / ausencia de parálisis rígida de miembros posteriores en cada ratón.

9.7 Análisis electroforético de las fracciones obtenidas

El sistema de electroforesis descrito por Laemli en 1970 sirve para separar biomoléculas en dependencia a su tamaño y factores de carga, mediante la acción de un campo eléctrico con un voltaje inicial de 80 volts en la fase de concentración y 120 volts en la fase de separación. Las fracciones fueron reducidas con β-mercaptoetanol para romper las uniones disulfuro en cada proteína y fueron separadas en un gel de poliacrilamida en presencia de

dodecilsulfato de sodio al 15% (SDS-PAGE), junto con marcadores de peso molecular de Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards de BIO-RAD.

9.8 Comprobación de la formación de bioconjugados 1:2 y 1:4

La bioconjugación es un proceso que involucra la unión de una molécula con otra por medio de un agente entrecruzador para formar un complejo proteico de mayor tamaño e inmunogenicidad. Para cada conjugado (crotamina-albúmina sérica bovina) se utilizaron 18 mg de albúmina sérica bovina (en buffer de carbonatos pH 9.5) con 5 mg de crotamina (en PBS) para la relación 1:2 y 10 mg de crotamina para la relación 1:4. Para entrecruzar las proteínas de cada mezcla, se añadió 0.31% (en relación al volumen final de cada mezcla) de glutaraldehído que viene de forma comercial al 50% y posteriormente se dejaron 4 horas a temperatura ambiente (1 en agitación y 3 en reposo).

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se eliminaron los restos insolubles de cada conjugado centrifugando a 13,000 rpm por 5 min, y el sobrenadante se dializó 4 veces con lavados de 1 hora a 4°C, utilizando un volumen 10 veces mayor de solución PBS con respecto al de la muestra. La mezcla fue colocada en una membrana de 3.5 KDa de diámetro Spectral/Por®, finalmente se mantuvieron a 4°C. Cada conjugado se evaluó mediante SDS-PAGE 12.5% bajo condiciones reductoras.

9.9 Esquema de inmunización

Dos grupos de 5 ratones de la cepa BALB/c fueron inyectados vía intraperitoneal con dosis crecientes de conjugado crotamina-BSA. El primer grupo fue administrado con el conjugado relación 1:2 y el segundo con el 1:4 en un volumen final de 200 µl, mezclando el conjugado con PBS emulsionada con adyuvante incompleto de Freud (IFA). Posteriormente, se intercaló con hidróxido de aluminio (ALUM), cada adyuvante cada 7 días en un lapso de 10

semanas (Tabla 1). Con la finalidad de evaluar la evolución en la producción de Ac's policlonales anti-crotamina en suero de cada ratón. En la 8^{va} semana se les extrajeron 100 µl de sangre mediante un corte en la cola y se centrifugó para eliminar eritrocitos y demás restos celulares, guardando el sobrenadante a 4°C hasta su posterior uso. Cuatro días antes de cada fusión celular, se administró al ratón candidato para la fusión celular un refuerzo con conjugado en PBS vía intraperitoneal. Las fusiones se realizaron con diferencia de 1 semana, manteniendo las inoculaciones de conjugado.

Inmunización	Día	Antígeno µg/ratón	Adyuvante	Sangrado
1	0	5	IFA	
2	7	10	Alum	
3	14	20	IFA	
4	21	40	Alum	
5	28	80	IFA	
6	35	160	Alum	
7	42	320	IFA	
8	49	640	Alum	200 µl
9	56	640	IFA	
10	63	640		

Tabla 1. Esquema de inmunización intraperitoneal de grupo 1 y 2. Utilizando conjugado crotamina-BSA de distintas concentraciones para la obtención de Ac's monoclonales anti-crotamina.

9.10 Técnica de ELISA indirecto

El ELISA indirecto consiste en el uso de un anticuerpo secundario conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP). Detectando los anticuerpos en el suero del animal inmunizado, unido al antígeno o proteína de interés adsorbido a la placa (Figura 19. A), produciéndose una reacción colorida que es cuantificada en un colorímetro de placas de ELISA (utilizado a 405 nm). Los datos arrojados se procesan y grafican por el programa GraphPad Prism Versión 6.01. (Figura 19. B).

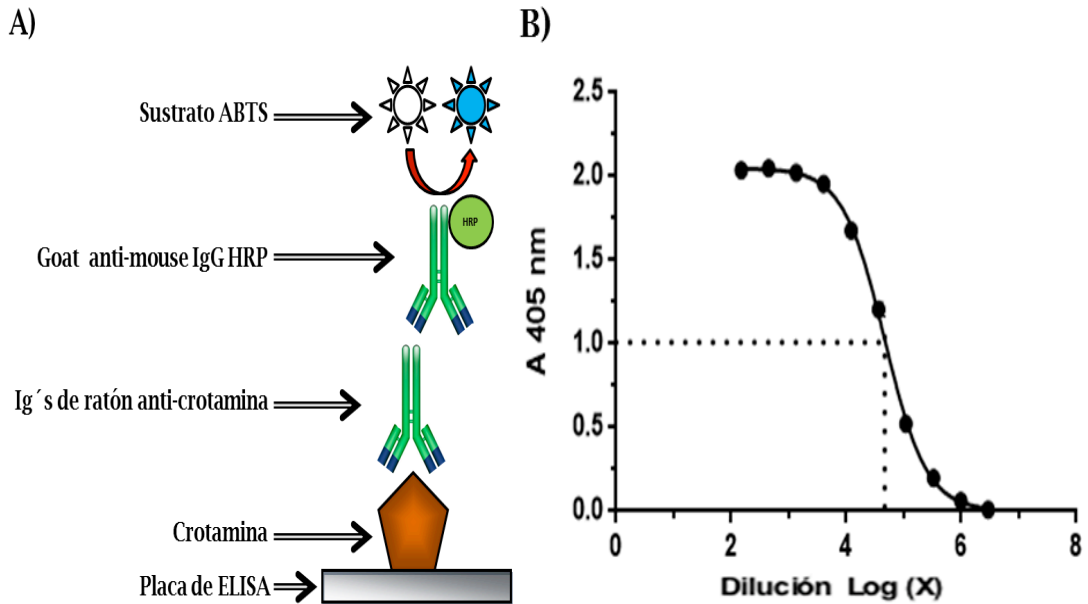


Figura 19. Esquema de técnica de ELISA indirecto utilizando sustrato ABTS, anticuerpo secundario conjugado a HRP, anticuerpo primario anti crostamina y crostamina unida a la placa. A) Esquema de ensayo ELISA indirecto para detección de anticuerpos. B) Ejemplo de ajuste de regresión sigmoideal dosis-respuesta mediante GraphPad Prism® de datos obtenidos por ELISA. Se observa la extrapolación del valor de título (línea punteada del eje de las abscisas) a partir del 50 % del máximo de absorbancia (línea punteada del eje de las ordenadas). Nota: cada punto en la curva representa un valor de absorbancia obtenido por cada dilución del suero evaluado.

Titulación del suero anti-crostamina

Sensibilización: Se inmovilizó la crostamina en una placa de microtitulación de 96 pozos (Thermofisher Sci®) en 100 μ L/pozo de buffer de carbonatos (NaCO_3 100mM, pH 9.5) a una concentración de 5 μ g/mL por 2 horas a 37°C.

Bloqueo: Se agregaron 200 μ l de solución de bloqueo (Tris-HCl 50 Mm pH 8, gelatina 5mg/mL/Tween 20 0.02%) a todos los pozos de la placa y se incubaron 2 hrs. a 37°C. Se lavaron 3 veces con 200 μ L de solución de lavado (Tris-Hcl 50 mM, pH 8/NaCl 150 mM/Tween 20 0.05%).

Adición del primer anticuerpo: A partir de una dilución 1:30 del suero anti-crotamina en diluyente (Tris-HCl 50mM pH 8/ NaCl 0.5 M/gelatina 1 mg/mL/ Tween 20 0.05%), se realizaron diluciones seriadas 1:3, hasta 10 diluciones directamente en la placa de microtitulación a un volumen final de 100 μ L. Se incubó durante 1 hr. a 37°C. Terminando la incubación, se lavaron las placas nuevamente 3 veces.

Adición del segundo anticuerpo: Se agregaron 100 μ L por pozo de una dilución 1:2000 utilizando el anticuerpo comercial Goat anti-mouse IgG (L+H) HRP incubando por 1 hr. a 37°C. Posteriormente se lavó 3 veces.

Revelado: Se dispensaron 100 μ L/pozo de solución de revelado (1 ml ABTS 1X Roche/75 μ L ABTS 50 mg/mL/H₂O), se desarrolló por 10 minutos y se detuvo la reacción añadiendo 30 μ L/pozo de SDS al 20%.

Lectura colorimétrica de placa a 405 nm a los 10 minutos. (Lector de placas TECAN) y procesamiento de datos por el programa GraphPad Prism Versión 6.01.

9.11 Descongelación de células de mieloma

Se descongeló en baño María (37°C) la línea celular de mieloma murino SP2/0 Ag14 ATCC® mantenida en nitrógeno líquido (196°C). Descongeladas las células, se transfirieron a un tubo cónico de 15 mL y se diluyeron con 10 mL de medio DMEM (ver anexo) a 37°C, las células fueron centrifugadas a 1,800 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante, y las células (pellet) se resuspendieron con 10 mL de medio B (ver anexo). Posteriormente se colocaron en una caja de cultivo de 75 cm² (CORNING®), la cual se llevó a un volumen final de 20 mL de medio B y se mantuvieron en una incubadora Sanyo® con inyección de CO₂ del 5% y a 37°C.

9.12 Fusión celular

El ratón que presentó el mejor título de anticuerpos fue sacrificado mediante dislocación cervical. Posteriormente el bazo se extrajo utilizando material quirúrgico estéril y se colocó sobre una malla metálica con 3 mL de medio DMEM dentro de una caja Petri. El órgano fue disgregado suavemente con movimientos circulares, posteriormente se añadieron 7 mL de medio DMEM a la caja Petri quedando con un volumen final de 10 mL de medio DMEM. Este volumen se transfirió a un tubo de 15 mL y se dejó sedimentar para separar restos de tejido. Después de 2 min, el sobrenadante se transfirió a otro tubo de 15 mL y se centrifugó a 1800 rpm/5min y el pellet se lavó dos veces con 10 mL medio DMEM.

Simultáneamente las células de mieloma se centrifugaron a 1800 rpm/5min y se lavaron con 30 mL de medio DMEM. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 30 mL del mismo medio. Posteriormente se mezclaron con los esplenocitos. La mezcla se centrifugó a 1800 rpm/5 min, eliminando por aspiración el sobrenadante. El paquete celular se homogenizó agitándolo suavemente y le agregó 1 mL de polietilenglicol 1500 (Roche) en el lapso de 1 minuto con agitación suave. Se continuó agitando durante 2 minutos más. Posteriormente, se agregaron 9 mL de medio DMEM. Las células se centrifugaron a 1,800 rpm/5min y se aspiró el sobrenadante. A continuación, el paquete celular se resuspendió en 50 mL de medio selectivo HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) y posteriormente se colocaron 100 µL de cultivo celular por pozo en placas de 96 pozos (5 placas). Después de 48 horas de incubación, a cada pozo se le agregaron 100 µL de medio HT (ver anexo) para disminuir el contenido de aminopterina y mantener la cantidad de nutrientes.

9.13 Análisis de hibridomas positivos

Para la selección de los hibridomas positivos productores de anticuerpos monoclonales anti-crotamina. Se evaluó por ELISA indirecto 100 μ L de sobrenadante de los pozos que mostraron crecimiento celular durante los primeros 10 días después de la fusión (ver anexo). Las placas se leyeron a 405 nm con un lector de ELISA (TECAN) a los 15 minutos posteriores a la adición de la mezcla de revelado. Se tomaron como pozos positivos aquellos que arrojaron un valor de absorbancia mayor a 0.3.

9.14 Clonación por dilución límite

La selección de células productoras de AcM anti-crotamina se realizó mediante dilución límite, en la cual, se preparó medio alimentador rico en factores de crecimiento (Ver anexo), agregando 100 μ L a todos los pozos de una placa de cultivo celular. Por cada hibridoma positivo de AcM anti-crotamina se utilizó media placa. Los 100 μ L restantes de medio del hibridoma positivo fueron resuspendidos y transferidos al pozo A1 de una nueva placa con 100 μ L de medio alimentador (teniendo un volumen final de 200 μ L). Posteriormente, se realizó una dilución 1:2 del pozo A1 al pozo H1, quedando este último con 200 μ L. Los pozos de la columna 1 (A1-G1) se llevaron a un volumen final de 200 μ L con medio alimentador. A continuación se realizó una dilución 1:2 de todos los pozos con 200 μ L (A1-H1) hasta los pozos pertenecientes a las columnas 12 (1-12). Todos los pozos de la columna 12 quedaron con 200 μ L totales y los pozos de la columna 1-11 se llevaron a un volumen final de 200 μ L con medio alimentador.

9.15 Análisis de la primera dilución límite

Después de 8 días, se realizó el análisis de los hibridomas; utilizando 100 µL de sobrenadante de cada pozo mediante ELISA indirecto. Con el fin de evaluar la estabilidad de cada hibridoma y su producción de AcM anti-crotamina. Finalmente se realizaron dos diluciones límite más de los pozos positivos para obtener una sola clona productora por pozo. Las clonas productoras de AcM, se resuspendieron y expandieron en 2 mL de medio B utilizando una caja (CORNING®) de 24 pozos, posteriormente, las células fueron transferidas a una caja de cultivo de 75 cm² en 20 mL de medio B. Diez días después, las células se congelaron en nitrógeno líquido (-170°C) y descongelaron para probar su estabilidad evaluando el crecimiento y producción de Ac's.

9.16 Congelación celular

Los hibridomas seleccionados fueron resuspendidos en 30 mL de medio de cultivo DMEM y centrifugados a 1,800 rpm/5 min, el sobrenadante se desecha por aspiración conservando el pellet celular. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en 10 mL de medio DMEM y se contaron en cámara de Neubauer realizando con el mismo medio una dilución 1:10. Las células se centrifugaron por tercera vez bajo las mismas condiciones y el pellet fue resuspendido en 5 mL del medio de congelación 2 (Ver anexo); enseguida se agregó el mismo volumen del medio de congelación 1 (Ver anexo), obteniendo una concentración de 5×10^6 células/mL. Se agregó 1 mL de la solución en criotubos (Thermo scientific®) previamente rotulados, los cuales se depositaron en hielo y enseguida a -70°C; 24 hrs después se pasaron a nitrógeno líquido (-170°C) para su conservación.

9.17 Producción de líquido de ascitis

Para la fase de producción de líquido ascítico tumoral, se preinocularon vía intraperitoneal 3 ratones hembras BALB/c con 200 μ L de pristano (2,6,10,14-tetrametil pentadecano) SIGMA® 10 días antes de la inoculación del hibridoma. Al mismo tiempo, los hibridomas se descongelaron y crecieron utilizando un matr az de cultivo de 75 cm² en medio de cultivo B, realizando sucesivos cambios de medio. Pasados los diez días, las células de hibridomas se resuspendieron, centrifugaron y cuantificaron en la cámara de Neubauer, determinandose una concentración de 5×10^5 - 1×10^6 células (por cada clona) en 500 μ L de medio DMEM. Los ratones fueron inyectados vía intraperitoneal y observados diariamente. Una vez que hubo crecimiento tumoral, el líquido ascítico se colectó en tubos estériles de 15 mL en hielo, realizando una punción en la cavidad intraperitoneal con una aguja de calibre 18 G (1.2 mm de diámetro por 40 mm de longitud). Posteriormente, el líquido ascítico se centrifugó a 3,000 rpm/5 min, transfiriendo el paquete celular en una caja de cultivo de 75cm² con medio de cultivo B y el sobrenadante se transfirió a un tubo de 15 mL conservándolo a -20 C.

9.18 Purificación y cuantificación de AcM anti-crotamina

Para la purificación de AcM anti-crotamina se preparó una columna de afinidad con 10 mL de resina de CNBr sepharosa 4B® acoplada a proteína A de *Staphilococcus aureus*. Lo cual permite una unión específica a la región Fc de las inmunoglobulinas de mamíferos. La columna se equilibró con 10 mL de buffer de lavado (Tris-HCL 50 mM, pH 8/NaCl, 0.5 M). Al mismo tiempo, se eliminaron los residuos celulares y fibras del líquido ascítico centrifugándolo a 10,000 rpm/15 min. El sobrenadante obtenido se añadió lentamente a la columna; y el recirculante se colectó en un tubo aparte. Posteriormente, se lavó la columna con 20 mL de buffer de lavado y se colectaron fracciones en

volúmenes de 1 mL por tubo. Cada fracción fue cuantificada por absorbancia a 280 nm. Se dejó de colectar fracciones cuando una absorbancia llegó a 0.07.

En la fase de elución se usó una solución 100 mM de ácido acético. Se colectaron 20 gotas (1 mL) por tubo con 100 μ L de 2 M Tris-HCL pH 8 para evitar la desnaturalización de los anticuerpos. Cuando se obtuvo una A₂₈₀ nm de 0.07 se dejó de colectar. El rendimiento de Ac's se calculó por lectura de A₂₈₀ nm y este valor se dividió entre el coeficiente de extinción de las Ig's, siendo 1.4.

9.19 Evaluación de AcM por SDS-PAGE

Con el propósito de evaluar la integridad y purificación de los AcM obtenidos del líquido ascítico se realizó una separación por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12.5% con SDS en condiciones reductoras y no reductoras, cargando 10 μ g de Ac por pozo.

9.20 Determinación de concentración efectiva media (EC₅₀)

La concentración efectiva media (EC₅₀) se refiere a la cantidad mínima necesaria de Ac's para reconocer una proteína u antígeno. Para la determinación de la EC₅₀ de los AcM obtenidos se utilizó una placa de ELISA de 96 pozos Thermo Fisher Scientific® donde se dispensaron 100 μ L por pozo de la fila A-H en las columnas 1-11 de una solución de sensibilizado (pH 9.5, 100 mM) con una concentración de crotamina de 5 μ g/mL y fue incubada 2 hrs a 37°C. Posteriormente se lavó 3 veces con 200 μ L de solución de lavado y se saturaron los sitios inespecíficos con 200 μ L de solución de bloqueo en todos los pozos de la placa, incubandose por 2 hrs a 37°C. La placa se lavó nuevamente 3 veces. Se preparó una de cada AcM a una concentración de 100 μ g/mL en buffer de reacción agregando 200 μ L por pozo en la columna 1 por

duplicado para cada Ac. Posteriormente, se agregaron 100 μ L de solución de reacción por pozo en las columnas 2-12 y filas A-H. Por último, se realizaron diluciones seriadas 1:2 en las columnas 1-10 e incubó la placa durante 1 hr a 37°C. La placa se lavó bajo las mismas condiciones de los pasos anteriormente descritos. Para agregar el Ac secundario, se depositaron 100 μ l por pozo de una dilución 1:2000 del Ac: Goat anti-mouse IgG (L+H) HRP incubando por 1 hr a 37°C y lavando 3 veces con 200 μ L de solución de lavado. En la fase de revelado se dispensaron en toda la placa 100 μ L por pozo de ABTS 50 mM en H₂O desionizada. Se detuvo la reacción a los 10 minutos añadiendo 100 μ L por pozo de SDS al 10%. Los datos fueron procesados como ya se explicó antes usando el programa GraphPad Prism Versión 6.01.

9.21 Reconocimiento específico y reacción cruzada de AcM por Western blot

El reconocimiento específico lineal y reactividad cruzada de los AcM se evaluó mediante dos ensayos de inmunotransferencia tipo Western Blot, basados en el uso de Ac's para detectar un Ag o proteína determinada en una mezcla de diferentes componentes sobre una membrana de nitrocelulosa. Para el reconocimiento específico se utilizó como control positivo crotamina purificada anteriormente por RP-HPLC y veneno completo de *C.d.terrificus*; y como control negativo crotoxina purificada de la misma especie.

Por otro lado, el reconocimiento cruzado fue determinado utilizando venenos donde se observó la presencia / ausencia de crotamina en los perfiles cromatográficos obtenidos. Se usó veneno completo de *C. simus* y *C. basiliscus* como control negativo (especímenes que no presentaban la proteína en su perfil cromatográfico) y veneno completo de *C. basiliscus* como control positivo (crotamina presente en perfil cromatográfico).

En un gel de poliacrilamida al 15% con SDS bajo condiciones reductoras se aplicaron 3 μg de las fracciones purificadas (crotamina y crotoxina) del veneno de *C.d.t* y 15 μg del veneno completo de *C.d.terrificus*, *C. simus* y *C. Basiliscus*. Se incluyeron marcadores de peso molecular (Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standars de BioRad) en un rango de 2-250 kDa. Cada gel se corrió a 80V para el alineamiento de las proteínas y 120V para su separación; una vez finalizada la electroforesis, cada gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot 0.45 μm BioRad®) durante una hora a 400 mA en una cámara de transferencia semi-húmeda HEP-1 owl®. El sistema se preparó de la siguiente manera: inicialmente se colocaron 3 papeles filtro humedecidos con buffer de transferencia (glicina 39 mM / Tris-base 48 mM/ SDS 0.037/ metanol 20%), posteriormente el gel y por encima la membrana de nitrocelulosa. Por último, se colocaron otros tres papeles filtro en las mismas condiciones. Al terminar la inmunotransferencia, cada membrana se trató con 100 mL de solución de bloqueo (TBST; 5% de leche descremada en polvo Svelty®) durante toda la noche en agitación, para saturar los sitios inespecíficos que pudieran existir. En la mañana siguiente se lavaron 3 veces con TBST por 10 minutos. Para la primera membrana se utilizó como Ac primario el AcM anti-crotamina previamente purificado con clave 1D3, mientras que la segunda fue con el AcM anti-crotamina 5D1. Ambos anticuerpos se usaron a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en TBST y 0.05% de leche descremada en polvo durante una hora en agitación constante.

Las membranas se lavaron nuevamente y se incubaron con el Ac comercial Goat anti-mouse IgG (H+L) acoplado a fosfatasa alcalina (Millipore) en dilución 1:2000 por una hora en agitación constante. Cada membrana se lavó una vez más y se reveló con 10 mL del kit BCIP/NBT Invitrogen® deteniendo la reacción con un solución 5 mM de EDTA.

9.22 Reacción cruzada de IgG's por el método ELISA

Con la finalidad de detectar AcM específicos hacia crotamina, se llevó a cabo el ensayo de ELISA de tipo indirecto con el esquema mostrado en la figura 20, con la modificación de que en este experimento se utilizaron AcM's anti-crotamina y diferentes antígenos provenientes del veneno de *C.d.t.* Para ello, la placa se sensibilizó con 5 µg/mL de crotamina, sub A y sub B por duplicado en buffer de sensibilizado (NaCO_3 100 mM, pH 9.5) a excepción de la columna 12 que fungió como control negativo. Después de 1 h de incubación a 37°C, la placa se lavó con buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 8/ NaCl 150 mM/ Tween 20 0.05%) y se agregaron 200 µL de solución de bloqueo (Tris-HCl 50 mM, pH 8/ gelatina 5mg/mL/ Tween 20 0.02%) dejando la placa a 37°C por 2 hrs. A las 2 hrs la placa se lavó y en la columna 1 se dispensaron 200 µL de cada AcM en buffer de reacción (50mM de Tris-HCL pH 8, 0.5 M de NaCl, 1 mg/mL de gelatina, 0.05% de Tween 20) a una concentración de 100 µg de proteína. Este paso se realizó por duplicado, mientras que a los demás pozos sólo se le colocaron 100 µL de la solución de reacción. En seguida, se realizaron diluciones seriadas 1:2 para dejar todos los pozos con 100 µL y se incubó la placa 1 hr a 37°C. Se utilizó como Ac secundario Goat anti-mouse IgG (L+H) HRP de uso comercial a una dilución 1:2000 en buffer de reacción, añadiendo 100 µL/pozo a toda la placa e incubando 1 hr a 37°C. Finalmente, para la fase de revelado, se lavó la placa e inmediatamente se aplicaron 100 µL/pozo de solución de revelado (1 mL ABTS 1X Roche/75 µL ABTS 50 mg/mL/8.9 mL de H₂O). La reacción se dejó proceder por 10 min a temperatura ambiente e inmediatamente se paró la reacción con 20 µL de SDS al 20%. Se midió Abs_{405nm} utilizando un lector de ELISA marca Magallan®. Se tomaron como positivos los pozos con una Abs_{405nm} mayor a 0.3.

9.23 Evaluación de AcM anti-crotamina contra proteínas del veneno de *C.d.terrificus*

Para evaluar si los AcM obtenidos reconocían otras proteínas presentes en el veneno de *C.d.terrificus*, se realizaron 3 ensayos de Western Blot, empleando como control positivo veneno completo de *C.d.terrificus* y crotamina purificada. Por otro lado, las dos subunidades de crotoxina; sub A y Sub B fueron usadas como control negativo.

En cada gel de poliacrilamida al 15% se aplicaron 5 µg de veneno completo de *C.d.terrificus* y 3 µg de crotamina, sub A y sub B de crotoxina, bajo condiciones reductoras. Al finalizar la electroforesis, la primer membrana se incubó con el AcM anti-crotamina con clave 1D3 y la segunda membrana se trató con el AcM 5D1, ambas a una concentración de 10 µg/mL en TBST. En ambos ensayos se utilizó como Ac secundario Goat anti-mouse IgG AP, Millipore® a una dilución 1:2000. Por otro lado, la membrana del tercer ensayo se incubó con los Ac's policlonales anti-sub.B de crotoxina a una dilución 1:3000, obtenidos y purificados en el laboratorio del Dr. Alagón Cano, del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se utilizó el Ac comercial Goat anti-rabbit IgG AP Millipore® como Ac secundario a una dilución 1:3000. Cada membrana se lavó una vez más y se reveló con el kit NTB/BCIP (Invitrogen®) deteniendo la reacción con un solución 5 mM de EDTA. Al mismo tiempo, se corrió y tiñó un gel SDS-PAGE al 15% con 20 µg de veneno y 5 µg de crotamina, sub A y sub B, bajo las mismas condiciones.

10. Resultados

10.1 Obtención y análisis de fracciones del veneno de *C.d.terrificus* por RP-HPLC

En la figura 20 se muestra el Cromatograma resultante de la separación del veneno de *C.d.terrificus* por RP-HPLC. A lo largo de la corrida, se encontraron tres proteínas en diferente tiempo de elución, las cuales presentan una alta proporción dentro del veneno. Este resultado coincide con el trabajo de Neri Castro en el 2013, en donde se caracterizó el mismo veneno; y donde se determinó que crotamina y las dos subunidades que conforman crotoxina son proteínas con mayor abundancia en el veneno *C.d.terrificus*.

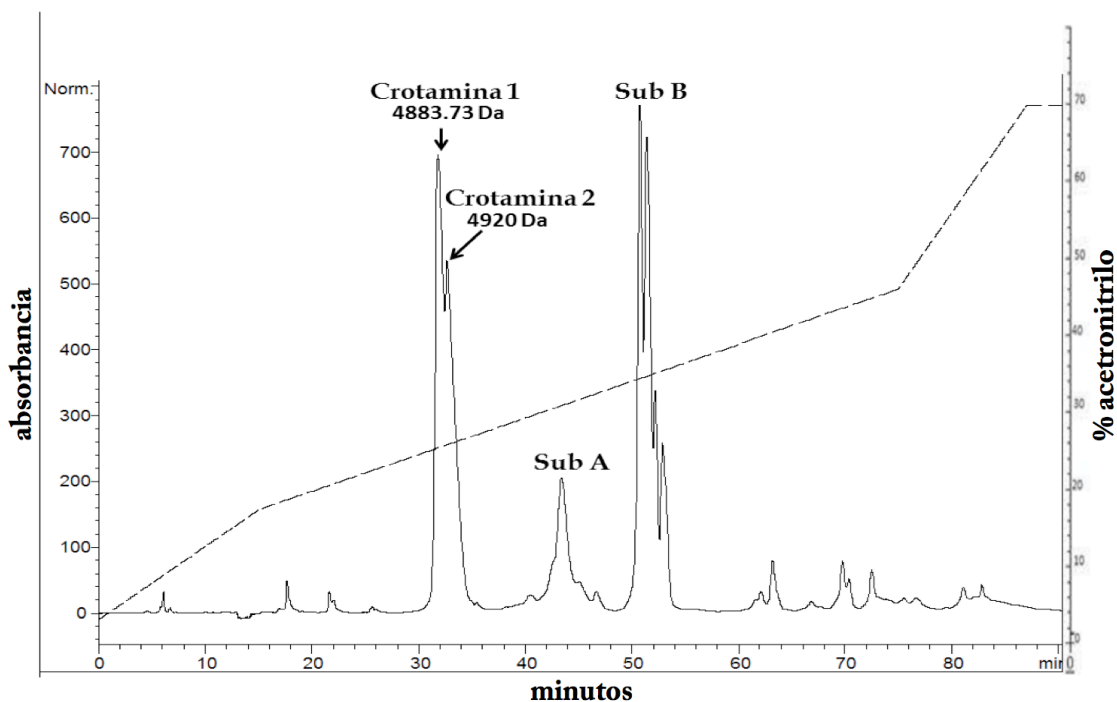


Figura 20. Cromatograma del veneno de *C.d.terrificus* por RP-HPLC. Columna analítica C-18, 6 mg de veneno Flujo: 1 mL/min. Solución A (agua+0.1% TFA), solución B (acetonitrilo + 0.1% TFA). El gradiente de B fue 5% durante los primeros 5 min, 5-15% de B en 10 min, 15-45% de B en 60 min, 45-70% en 90 min, las fracciones fueron monitoreadas a 280 nm.

La crotamina mostró dos picos no resueltos y de gran tamaño a partir del minuto 30, los cuales se etiquetaron como crotamina 1 y crotamina 2; en base a su tiempo de aparición presentando pesos moleculares de 4883.73 Da y 4920 Da. Por otro lado, las dos subunidades que conforman la crotoxina se eluyeron al minuto 41 para sub A y 50 para sub B, este último mostro tres picos no definidos.

10.2 Análisis biológico de proteínas purificadas

Se realizaron ensayos de actividad en ratones inyectando las dos fracciones correspondientes a la crotamina vía intraperitoneal. Ambas fracciones mostraron actividad biológica paralizante de miembros posteriores en los ratones de cada grupo. El porcentaje de supervivencia fue de 100%, demostrando que las condiciones de purificación no afectaron la actividad tóxica de la proteína de interés. Con base en los resultados, cada fracción se rotuló como crotamina 1 y 2 en base a su tiempo de elución, y se juntaron en un sólo tubo el cual fue etiquetado como crotamina. Fue determinanda la concentración de proteína por A_{280nm} y fue dividida entre el coeficiente de extinción de crotamina. Los resultados de cada fracción se muestran en la tabla 2.

Fracción	Individuo	Parálisis rígida en miembros posteriores	Mortalidad
Fracción 1 (Crotamina 1)	Ratón 1	Positivo	0/3
	Ratón 2	Positivo	
	Ratón 3	Positivo	
Fracción 2 (Crotamina 2)	Ratón 1	Positivo	0/3
	Ratón 2	Positivo	
	Ratón 3	Positivo	

Tabla 2. Signología observada en grupos de 3 ratones BALB/c al inyectarles 10 µg de crotamina (corresponde a 2/3 de la dosis letal) vía intravenosa, obtenida por cromatografía líquida de alta resolución - fase reversa (RP-HPLC) del veneno de *C. durissus terrificus*.

10.3 Análisis electroforético SDS-PAGE de fracciones purificadas por RP-HPLC

Con la finalidad de identificar y evaluar la pureza de las fracciones proteicas del veneno utilizado en este trabajo, se realizó un gel de SDS-PAGE. Se corrieron cuatro muestras totales, de las cuales, tres de ellas provenían de RP-HPLC (Fig 21). El carril 2 presentó componentes de bajo, mediano y alto peso molecular desde 10 kDa hasta ~60 kDa. Las proteínas con baja proporción migran en la zona de ~60 kDa que corresponde a metaloproteasas y en la zona de ~35 kDa que corresponde a las serinoproteasas. Por otro lado, proteínas con alta proporción dentro del veneno se observan en pesos moleculares bajos, como la crotoxina (15 kDa) y la crotamina con corrimiento anómalo de ~10 kDa. Las fracciones purificadas van del carril tres al cinco, mostrando alto grado de pureza para crotamina y sub B de crotoxina. La sub A de crotoxina, proteína cargada en carril 4 no se logra observar. (Figura 21).

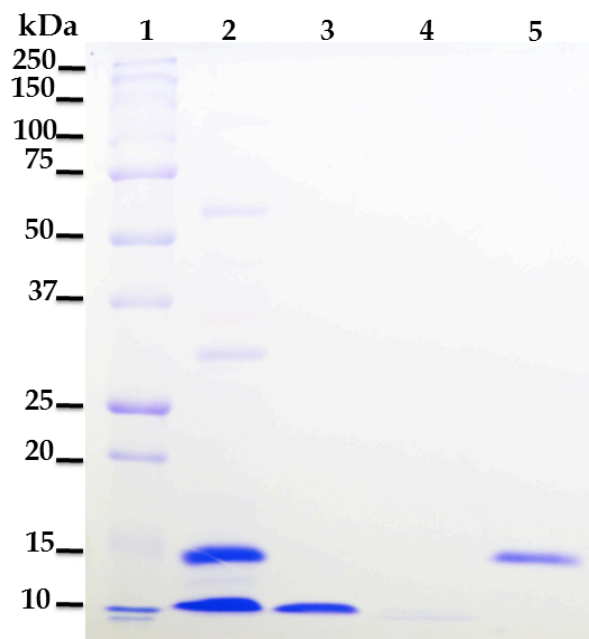


Figura 21. SDS-PAGE condiciones reductoras al 15%. Carril 1. MPM; 2.Veneno completo de *C.d.terrificus* (15 µg); 3. Crotamina (2.5 µg); 4. Sub A (16 µg); 5. Sub B (4.5 µg).

10.4 Análisis electroforético de conjugados relación 1:2 y 1:4

Después de obtener la crotamina pura y activa, se entrecruzó a diferentes relaciones molares con albúmina sérica bovina utilizando glutaraldehído al 50%. Dichos conjugados se evaluaron mediante SDS-PAGE al 12.5% usando el mismo orden de muestras (Figura 22).

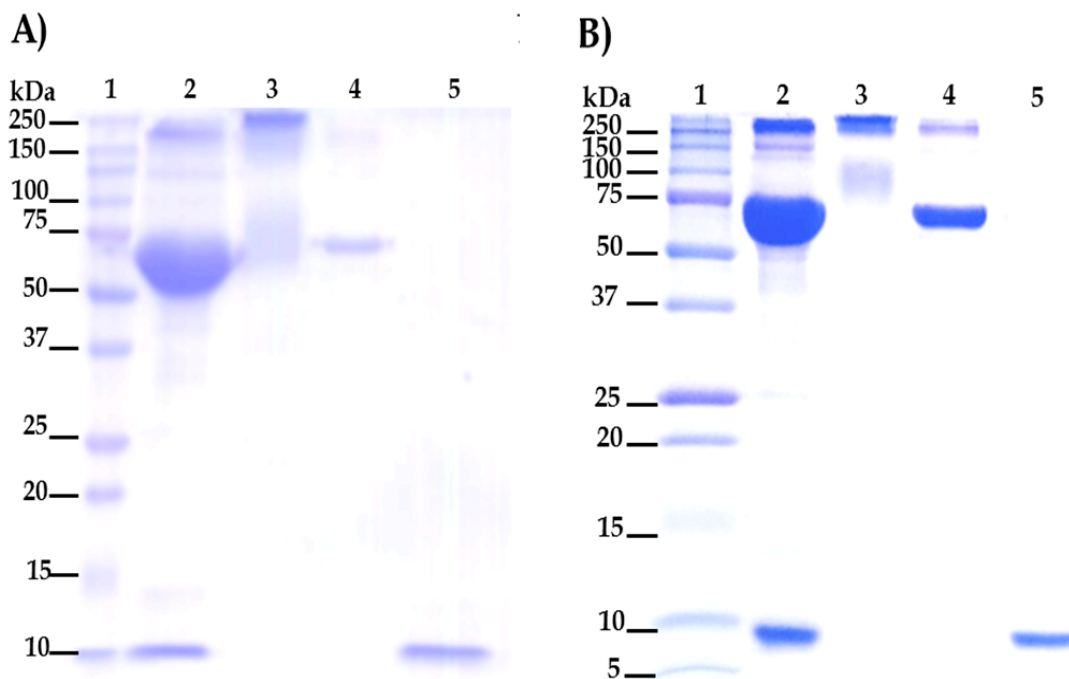


Figura 22. Evaluación de conjugados crotamina-BSA. A) Relación 1:2 y B) Relación 1:4. SDS-PAGE 12.5%. Condiciones reductoras. Carril 1. MPM; 2. Mezcla crotamina-BSA sin glutaraldehído (3µl); 3. Mezcla crotamina- BSA con glutaraldehído (3µl); 4. BSA: A (1µg) y B (2.5µg); 5. Crotamina (2.5µg).

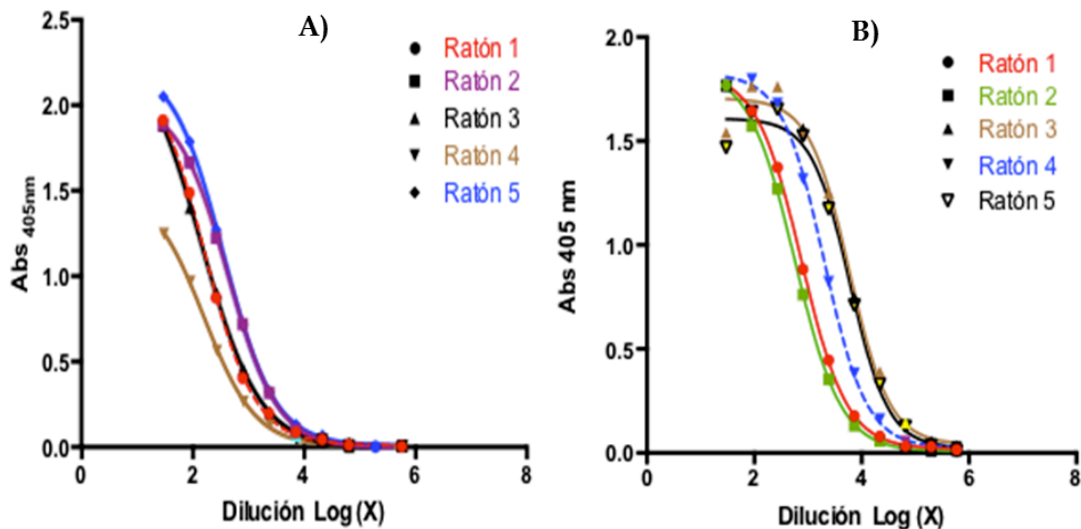
En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular (MPM). En el carril 2 de ambos geles se separaron dos bandas abundantes que corresponden a las 2 proteínas de la mezcla, la crotamina y BSA sin glutaraldehído. La banda de mayor peso molecular se presentó entre 50 y 75 kDa y corresponde a la albúmina sérica bovina y en 10 kDa se encuentra la crotamina. Ambos conjugados se observan en el carril 3, siendo la misma mezcla proteica con glutaraldehído. Se observa un

ligero barrido por encima de 75 kDa y una banda más en 250 kDa. Por otro lado, los controles del gel en donde se evaluó el conjugado relación BSA-crotamina 1:2, muestran un estado de alta pureza, apareciendo en el carril 4 una banda entre 50 y 75 kDa, que corresponde al peso de BSA. La crotamina purificada se observa en el carril 5 con un peso de 10 kDa. Los controles del gel con el conjugado relación 1:4 presenta el mismo patrón de corrimiento. El control con BSA se ubica entre 50 y 75 kDa en el carril 4 y la crotamina en carril 5 en la banda correspondiente a 10 kDa.

Por otro lado, la relación 1:4 presento una mejor formación de conjugados con una banda entre 75 y 100 kDa más compacta y mejor definida en el carril 3 en comparación con la banda del conjugado relación 1:2.

10.5 Determinación de títulos de Ac's policlonales anti-crotamina

En la figura 23 se muestran los títulos de Ac's policlonales obtenidos a partir de suero del grupo 1 y 2; inmunizados con conjugados crotamina-BSA a diferentes concentraciones. La EC_{50} más baja del grupo 1 fue de 90.8, mientras que el valor más alto está representado por 427.8. Estos valores corresponden a los ratones 3 y 4. Por otro lado, el grupo 2 presentó valores más elevados respecto al grupo 1, mostrando una EC_{50} de 570.4 para el ratón 2 y 6028 para para el ratón 5. Al graficar los datos obtenidos de los Ac's policlonales en suero de ambos grupos, se observó que el título más bajo del grupo 2, está por encima del título más alto del grupo 1. Resultó ser más inmunogénico el conjugado de crotamina-BSA relación 1:4 en comparación al conjugado 1:2.



A) Grupo 1					
Conjugado Crotamina-BSA relación 1:2					
	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4	Ratón 5
EC 50	163.4	427.8	90.8	157.5	358.1
R ²	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
B) Grupo 2					
Conjugado Crotamina-BSA relación 1:4					
EC 50	755.8	570.4	5942	1998	6028
R ²	0.999	0.999	0.990	0.999	0.992

Figura 23. Títulos de ELISA de Ac's policlonales anti-crotamina de sueros de ratones inmunizados con conjugado 1:2 y 1:4 crotamina-BSA. A) Gráfica de títulos individuales de ratones de grupo 1 inmunizados con conjugado 1:2 B) Gráfica de títulos individuales de ratones de grupo 2 inmunizados con conjugado 1:4.

10.6 Obtención de anticuerpos monoclonales anti-crotamina de ratón

Se realizaron 10 fusiones celulares, utilizando las células del bazo de los ratones inmunizados y células de mieloma SP2 de ratón, tal como se describe en el anexo. Se obtuvieron un total de 2,262 hibridomas. De éstos, sólo 17 clonas fueron productoras de Ac's anti-crotamina. Únicamente 2 de las 17 clonas (1D3 y 5D1), sobrevivieron al proceso de selección manteniendo la capacidad productora de AcM alcanzando valores de Abs_{405nm} por encima de 0.3. Ambas clonas corresponden al grupo 1 inmunizado con el conjugado 1:2 (Tabla 3).

Para obtener los AcM anti-crotamina en el líquido ascítico Los hibridomas productores de AcM se inocularon en 2 grupos de 3 ratones hembra de la cepa BALB/c vía intraperitoneal.

Hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-crotamina		
	Grupo 1	Grupo2
Conjugado	1:2	1:4
Hibridomas obtenidos	1 298 /2 400	964 /2 400
Hibridomas productores de AcM anti-crotamina	14	3
Hibridomas estables	1D3 5D1	0

Tabla 3. Número de colonias de hibridomas productoras de AcM anti-crotamina obtenidas de fusión celular, diluciones límite y ascitis.

10.7 Extracción, purificación y cuantificación de AcM anti-crotamina

Se llevó a cabo la purificación del líquido ascítico por columna de afinidad con proteína A. Se obtuvo una la concentración (mg/mL) de los dos AcM al dividir las unidades de A_{280nm} entre el coeficiente de extinción de las inmunoglobulinas (1.4). El rendimiento final de cada anticuerpo fue de 0.425 mg/mL de líquido ascítico para 1D3 y 0.160 mg/mL para 5D1 (Tabla 4).

Rendimiento de AcM anti-crotamina 5D1 y 1D3 (mg/mL) de líquido ascítico	
Anticuerpo monoclonal	Concentración (mg/mL)
1D3	0.425
5D1	0.160

Tabla 4. Concentración de AcM anti-crotamina 5D1 y 1D3 (mg/mL) de líquido ascítico purificado con proteína A. Coeficiente de extinción de Ac's = 1.4

10.8 Evaluación de anticuerpos monoclonales anti-crotamina por electroforesis

Para ver el grado de pureza de los Ac's 1D3 y 5D1 se corrió un gel de poliacrilamida al 12.5% (Figura 24) apreciando en el carril 1 las bandas del marcador de peso molecular que van desde 10 kDa a 250 kDa. Por otro lado, los carriles 2 y 3 muestran solamente la presencia de una banda bien definida en el peso aproximado de 150 kDa, peso correspondiente al de un anticuerpo tipo IgG sin reductores. Mientras los carriles 5 y 6 exhiben 2 bandas bien marcadas en el peso de 25 y 50 kDa, es decir, las cadenas ligeras de los Ac's 1D3 y 5D1 se presentan en el peso de 25 kDa, mientras que las cadenas pesadas corresponden al peso de 50 kDa.

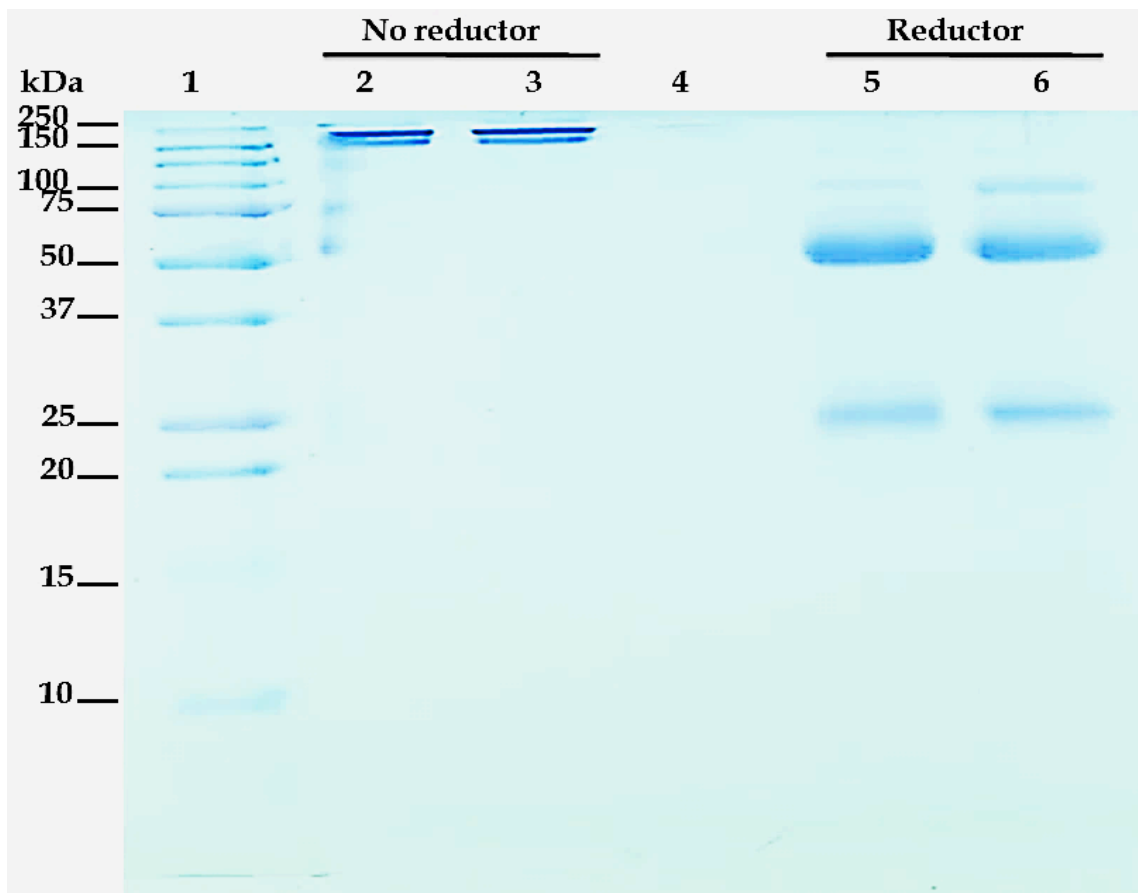


Figura 24. SDS-PAGE al 12.5%. Determinación de integridad y pureza de AcM 1D3 y 5D1 anti-crotamina. Carril 1. Marcador de peso molecular (kDa); 2 y 5. AcM 1D3 (10 µg); 3 y 6. AcM 5D1 (10 µg).

10.9 Determinación de EC_{50} de anticuerpos monoclonales 1D3 y 5D1

En la figura 25 se encuentra representada la curva estándar de la EC_{50} de los AcM 1D3 y 5D1 que representa el reconocimiento de la crotamina mediante la técnica de ELISA indirecto. Por un lado, el Ac 5D1 mostró tener un buen reconocimiento hacia la crotamina, necesitando $5.7\mu\text{g}$ de AcM por cada $5\mu\text{g}$ de crotamina, mientras que el Ac 1D3 no manifestó un buen reconocimiento contra crotamina, ya que todos los valores de $Abs_{405\text{nm}}$ estuvieron por debajo de 0.1.

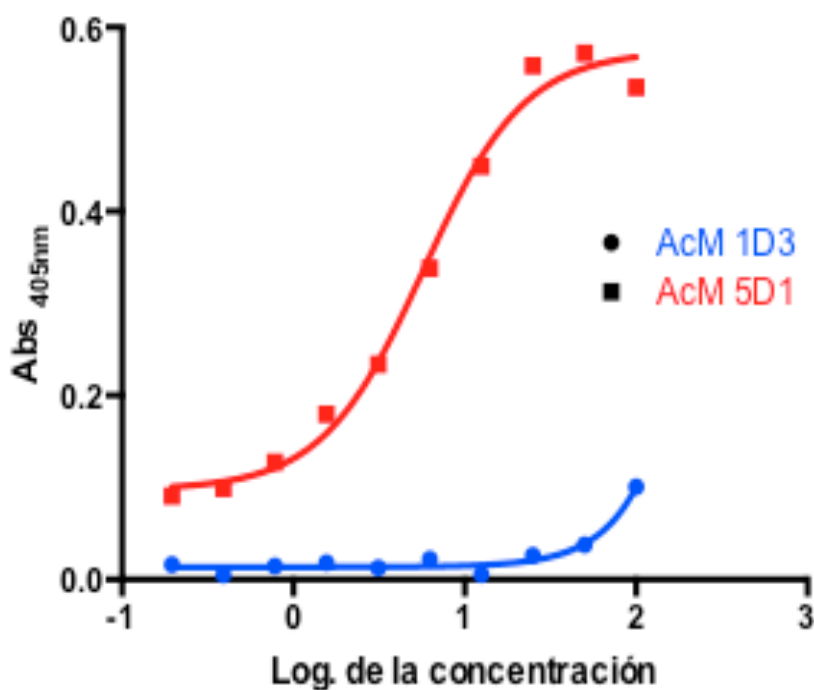


Figura 25. Concentración efectiva media (EC_{50}) por ELISA a $A_{405\text{nm}}$ de AcM anti-crotamina 1D3 y 5D1 partiendo de una concentración inicial de $200\mu\text{g}$ y diluciones seriadas 1:2. El AcM 5D1 obtuvo un EC_{50} de 5.731 con una R^2 de 0.99, mientras que el AcM 1D3 mostro un EC_{50} de ~ 2073 con una R^2 de 0.95.

10.10 Prueba de especificidad de AcM 1D3 y 5D1 contra proteínas del género *Crotalus*

Los resultados obtenidos en la técnica de Western blot donde se evaluó el reconocimiento específico de los Ac's 1D3 y 5D1 anti-crotamina, utilizando veneno completo de *C.d.terrificus* (crotamina +), *C.simus* (crotamina -) y *C.basiliscus* (crotamina + y -), mostraron la presencia de 3 bandas en el peso de 10 kDa en los carriles 2,4 y 5, existiendo un reconocimiento de crotamina del veneno de *C.d.terrificus* y *C.basiliscus* por parte de ambos Ac's, donde, 1D3 tuvo un mayor reconocimiento que 5D1 (Figura 26).

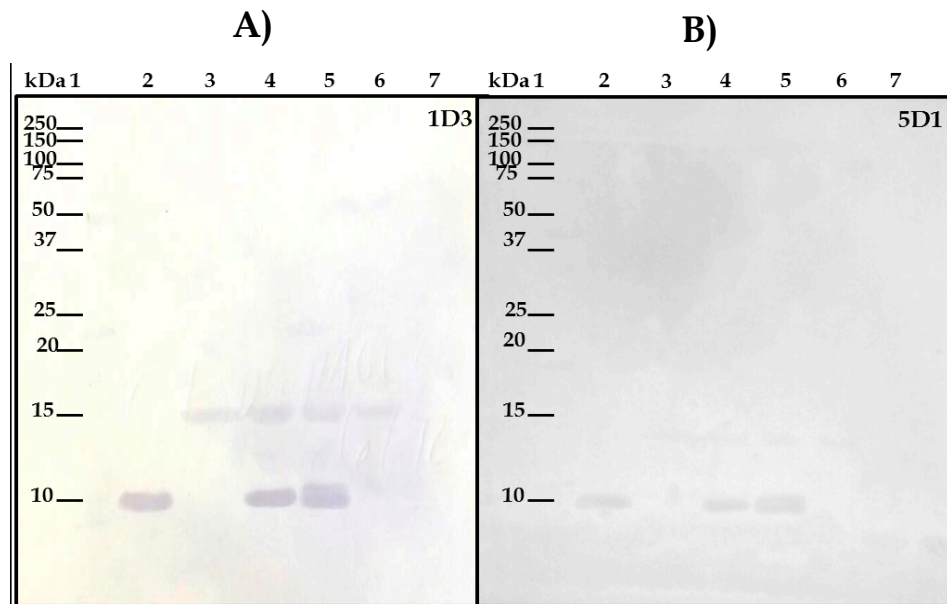


Figura 26. Western blot mostrando reacción cruzada de los Ac's 1D3 y 5D1. Se utilizaron venenos de diferentes especies de serpientes del género *Crotalus*. A las membranas A) Incubada con 1D3 (10 µg/mL) y B) incubada con 5D1 (10 µg/mL) se les añadió la misma cantidad de proteína por carril. 1. MPM. 2. Crotamina de *C.d.t* (3 µg) (Control +). 3. Crotoxina de *C.d.t* (3 µg) (Control -). 4. Veneno completo de *C.d.t*. (15 µg) (Control +). 5. Veneno de *C.basiliscus* (15 µg) (Control +). 5. Veneno de *C.simus* (15 µg) (Control -). 6. Veneno de *C.basiliscus* (15 µg) (Control -). Ambas membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario comercial Goat anti-mouse IgG (H+L) AP. Dilución 1:2000.

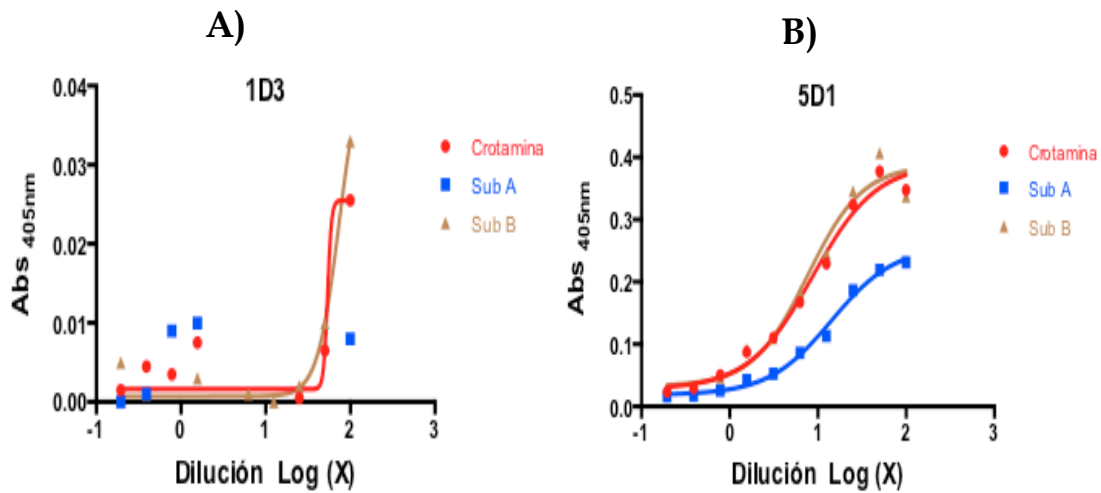
Se puede observar que ambos AcM presentaron reacción cruzada hacia crotoxina de *C.d.terrificus*, *C.simus* y *C.basiliscus*, exhibiendo 4 bandas correspondientes a los carriles 3-6 con un peso de 15 kDa.

10.11 Prueba de ELISA para comprobar reacciones cruzadas hacia crotoxina

Con base en los resultados anteriores, donde los Ac's obtenidos reconocen tanto crotamina como crotoxina, se decidió comprobar si realmente existe reconocimiento específico y cruzado de los Ac's obtenidos hacia crotamina, crotoxina o alguna de sus 2 subunidades mediante un ELISA indirecto. Para ello, la placa se sensibilizo por duplicado con 5 µg/ml de crotamina, sub A y sub B purificadas por RP-HPLC.

El AcM 5D1 presenta reconocimiento conformacional hacia crotamina y crotoxina, reconociendo especialmente la sub. B de crotoxina. El reconocimiento hacia estas 2 proteínas es muy similar ya que ambas proteínas exhiben valores de absorbancia por encima de 0.35. Por el contrario, 5D1 no reconoce a sub. A de crotoxina ya que los valores obtenidos están por debajo del valor de corte.

En cambio, el AcM 1D3 no tiene reconocimiento a epítopes estructurales hacia ninguna de las 3 proteínas probadas en este experimento, las cuales provienen del veneno de *C.d.terrificus* (crotamina, sub. A y sub. B) ya que mostró valores de absorbancia menores a 0.05 (Figura 27).



C)

Reacción específica y cruzada de AcM 1D3 y 5D1 hacia diferentes proteínas del veneno de <i>C.d.t</i>						
	1D3			5D1		
	Crotamina	Sub A	Sub B	Crotamina	Sub A	Sub B
Sigmoide dosis-respuesta	Ambiguo	No converge				
EC50	~53.83		73.50	8.74	14.29	7.63
R²	0.86		0.95	0.986	0.992	0.972

Figura 27. ELISA indirecto evaluando AcM 1D3 y 5D1 contra distintas proteínas del veneno de *C.d.terrificus*. A) Reconocimiento de Ac 1D3. B) Reconocimiento de Ac 5D1. C) Valores de ELISA indirecto para evaluar reacción específica y cruzada de AcM.

10.12 Evaluación de Ac policlonales anti-crotoxina

Para descartar el reconocimiento cruzado de los Ac's anti-crotamina utilizados en los ensayos anteriores hacia crotoxina, se procedió a realizar un Western blot utilizando los AcM anti-crotamina 1D3 y 5D1, y Ac's policlonales anti-crotoxina de conejo purificados y disponibles en el laboratorio. Todos los Ac's evaluados mostraron reconocimiento lineal hacia crotamina y sub. B de crotoxina del veneno de *C.d.terrificus*, con una banda en el carril 2 y otra en el carril 3 en el peso de 10 kDa, correspondiendo al reconocimiento de crotamina

del veneno completo y crotamina purificada; mientras que las bandas en los carriles 2 y 5 en 15 kDa corresponden al reconocimiento de sub B de crotoxina (Figura 28). La sub A de *C.d.terrificus* no fue reconocida por los AcM 1D3 y 5D1 anti-crotamina ni los Ac's policlonales anti-crotoxina de conejo, resultando en una ausencia de bandas en el carril 4 en todas las membranas.

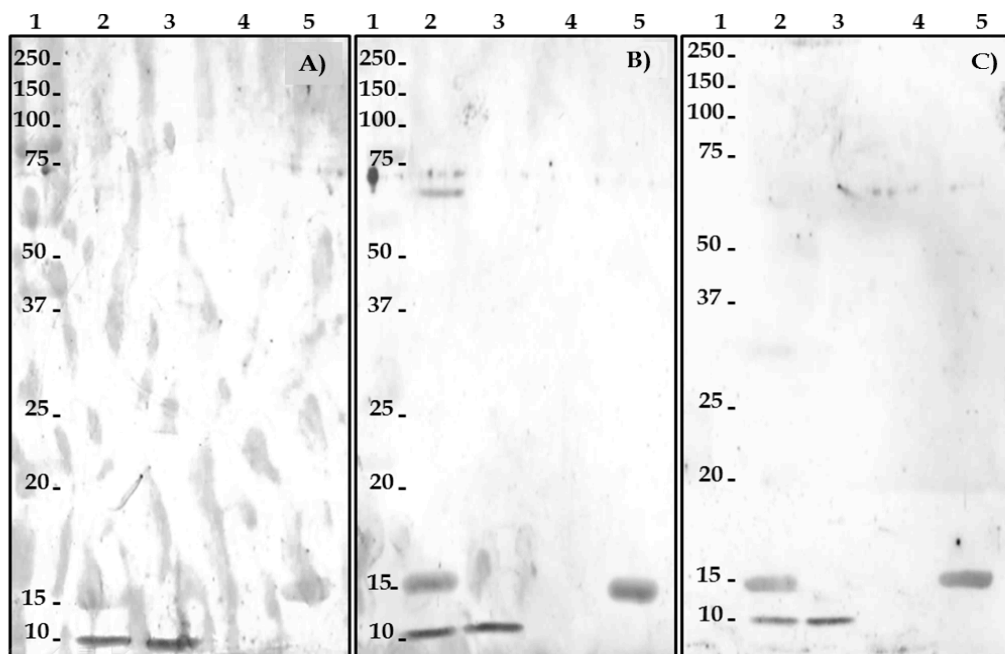


Figura 28. Western-blot de reconocimiento de AcM 1D3, 5D1 anti-crotamina y Ac's policlonales anti-crotoxina hacia veneno completo de *C.d.terrificus*, crotamina, sub. A y sub. B de crotoxina. Carril 1. MPM; 2. Veneno completo de *C.d.terrificus* (5 µg); 3. Crotamina (3 µg); 4. Sub. A (3 µg); 5. Sub. B (3 µg). A) Primer anticuerpo: 10 µg/mL de AcM 1D3 anti-crotamina. Segundo anticuerpo: Goat anti-mouse AP millipore® en dilución 1:2000. B) Primer anticuerpo: 10 µg/mL de AcM 5D1 anti-crotamina. Segundo anticuerpo: Goat anti-mouse AP millipore® en dilución 1:2000. C) Primer anticuerpo: 1 µg/mL de Ac's policlonales de conejo anti-crotoxina. Segundo anticuerpo: Goat anti-Rabbit AP millipore® en dilución 1:3000. Todas

11. Discusión

11.1. Purificación de crotamina a partir de veneno completo de *C.d.terrificus*

El fraccionamiento del veneno completo de la serpiente de cascabel *C.d.terrificus* se realizó mediante la técnica RP-HPLC, debido a que esta técnica permite separar crotamina de otras proteínas con un peso similar presentes en el veneno completo, y permite obtener un alto rendimiento de crotamina pura, además de no modificar su actividad biológica.

El veneno de *C.d.terrificus* contiene un alto porcentaje de crotamina, 38-39%; obteniéndose al calcular el área bajo la curva en el cromatograma del veneno completo. Por otro lado, en el cromatograma existen dos picos de elusión no definidos alrededor del minuto 30, correspondientes a las dos isoformas de crotamina ya reportadas (Toyama *et al.*, 2000), en donde existe una sustitución de una leucina por isoleucina. Por espectrometría de masas ambos picos mostraron un peso molecular entre 4850 y 4950 kDa similares al tamaño de la crotamina aislada y purificada reportada por Batista da Cunha *et al* 2018, en el caso del veneno de *C.d.terrificus* de Mococa, Brasil.

En la misma purificación de veneno pero a diferente tiempo se presentaron dos picos más, con un tiempo de retención a los minutos 40 y 50. El primero corresponde a la subunidad ácida (Sub A), mientras que la subunidad básica (Sub B) y sus isoformas pertenecen al segundo pico. Estos resultados concuerdan con los estudios de Toyama H. *et al.*, en el 2000 y de Oliveira A. *et al.*, del 2017, donde fraccionan veneno crudo de *C.d.terrificus* de Botucatu, Brasil, donde encontraron crotamina en el minuto 20, Sub A en el 30 y Sub B fraccionada en tres picos a partir del minuto 40.

Las dos isoformas de crotamina inyectadas en ratones BALB/c, presentaron actividad paralizante en miembros posteriores (Lourenco, *et al.*, 2013) permitiendo

inferir un bloqueo de los canales de K_v 1.1, 1.2 y 1.3. Este efecto fue estudiado por Peigneur *et al.*, (2012), al estudiar los efectos de crotamina sobre 12 canales de K_v en oocitos de *X. laevis*, en donde se demostró un efecto de bloqueo en los canales de K_v 1.1-1.3. Además no hubo letalidad en los ratones inyectados con crotamina, debido a la concentración de crotamina administrada, la cual fue de 10 μg por ratón, cantidad que se encuentra por debajo de la DL_{50} de crotamina (15 $\mu\text{g}/\text{ratón}$) reportada en el 2007 por Ponce Soto y Toyama. *et al.*, en el 2000.

Con la finalidad de observar si las fracciones obtenidas del veneno completo de *C.d.terrificus* por RP-HPLC eran puras, se corrió un gel electroforético con las fracciones colectadas. La crotamina se encontró 100% pura al mostrar una sola banda en el carril donde fue evaluada. Sin embargo, esta proteína manifestó un corrimiento anómalo al ubicarse como una banda de 10 kDa en vez de mostrarse en la banda de 5 kDa. En la actualidad no existen reportes que expliquen este fenómeno; Adicionalmente, este corrimiento anómalo de crotamina fue observado en el 2013 por Guidolin. F.R. *et al.*, donde analizaron por SDS-PAGE 12.5% el veneno completo de *C.d.terrificus* encontrando un corrimiento de crotamina igual que en este trabajo. Las otras dos proteínas principales del veneno son sub A y sub B de crotoxina, en donde, Sub A no se observó en ninguno de los 2 carriles que supuestamente la contenían, mientras que sub B aparece pura en la banda de 15 kDa.

11.2. Aumento de inmunogenicidad de crotamina y evolución de títulos de reconocimiento contra crotamina

En el laboratorio del Dr. Alagón se ha visto que grupos de ratones inmunizados con crotamina purificada, desarrollan muy bajo título de Ac's, debido a algunas características reportadas por Goncalves & Polso en 1947, en donde describen a la crotamina como una proteína con bajo peso molecular (4.8 kDa), lo que aumenta la probabilidad de ser una proteína muy poco inmunogénica.

Por otro lado, Kerkis *et al.* en 2004 y 2014 encontraron que la crotamina penetra rápidamente diferentes líneas celulares humanas y de ratón (fibroblastos primarios de humano, células linfoblásticas, tallo embrionario murino y células s-vec endoteliales) en ensayos *in vitro*. Por lo tanto, al momento de administrar crotamina sola, esta se internaliza rápidamente en diferentes células evitando su reconocimiento y por ende no hay una buena respuesta de Ac's contra la proteína, dando una baja obtención de títulos. Torres B. *et al.*, en el 2014 reportaron una elevación en la inmunogenicidad de proteínas pequeñas menores a 10 kDa (haptenos) conjugadas con BSA, generando una mayor producción de Ac's contra este tipo de conjugados. Debido a lo anterior, se procedió a conjugar crotamina purificada del veneno de *C.d.terrificus* con BSA utilizando glutaraldehído como agente entrecruzador, obteniendo dos conjugados de distinta proporción molar, 1 molécula de BSA por 2 y 4 de crotamina (1:2 y 1:4).

Los títulos más elevados fueron del grupo 2, el cual fue inmunizado con el conjugado crotamina-BSA 1:4, como resultado de tener una mayor concentración proteica crotamina-BSA y desencadenando por ello, una respuesta elevada del sistema inmune adaptativo. Se obtuvo una mayor producción de inmunoglobulinas en comparación al conjugado 1:2, mostrando una mayor lectura de absorbancia. En ejemplos, se observó que utilizando conjugados proporción 1:8 (una molécula de BSA con 8 de crotamina) se produce precipitación proteica en gran cantidad. Este resultado implica que a mayor cantidad de crotamina conjugada con BSA en solución, hay mayor generación de conjugados entre proteínas que terminan precipitándose y por ello existe una gran cantidad de crotamina precipitada (perdida) que no se puede inyectar. Estos resultados indican ser malos inmunógenos para elevar la respuesta inmune humoral contra crotamina. Por otro lado, en la proporción 1:4 hay más cantidad de crotamina conjugada con BSA en solución (ya que no genera precipitación proteica) y el conjugado resultante puede ser administrado vía intraperitoneal de manera soluble, presentando mayor cantidad de crotamina al sistema inmune de cada ratón.

11.3. Obtención de hibridomas productores de AcM anti-crotamina

La probabilidad de obtener un anticuerpo que logre reconocer el epítipo activo de crotamina es mayor en los individuos del grupo inmunizado con el conjugado proporción 1:4 en comparación con los individuos inmunizados con el conjugado 1:2. Esto se puede explicar ya que esta proporción (1:4) logra tener una mayor concentración de crotamina que puede ser reconocida por el sistema humoral del individuo, lo cual genera una mayor cantidad de Ac's específicos hacia diferentes epítopos de crotamina. Estos resultados indican una mayor probabilidad de encontrar un anticuerpo que reconozca el epítipo activo de crotamina (Abbas *et al.*, 2012).

Se obtuvieron un total de 2262 hibridomas productores de AcM y 17 de este total fueron hibridomas generadores de AcM anti-crotamina. A simple vista, el rendimiento es muy bajo; sin embargo, esta relación es muy común en este tipo de procedimientos, ya que al inicio de cada fusión celular, tanto las células esplénicas como las células de mieloma se exponen a condiciones de toxicidad debido al uso del PEG (agente fusionante) repercutiendo en la viabilidad de los hibridomas obtenidos. Estos resultados, indican que durante la fusión pudo ocurrir que alguna de las dos células o ambas se encontraran debilitadas o en fase de muerte (por la toxicidad del PEG); resultando en hibridomas no viables, los cuales después de un tiempo mueren (Gavilondo. C, 1995). En la tesis de maestría de Hernández Arely en el 2015 se obtuvieron 676 hibridomas, de los cuales dos clonas resultaron ser productoras de anticuerpos anti-crotoxina, demostrando lo complejo que es obtener AcM contra la toxina por el método de hibridomas.

Otro factor muy importante en este tipo de experimentos, que explica el bajo número obtenido de hibridomas productores de AcM anti-crotamina, es la probabilidad de fusión entre células de mieloma con células de bazo. Partiendo de la mezcla de esplenocitos y células de mieloma en proporción 1:5, pudieron ocurrir fusiones entre células de mieloma-mieloma, bazo-bazo y bazo-mieloma. Enfocándonos en la tercera posibilidad, en donde se fusiona una célula esplénica

con una de mieloma, ocurre una fusión de los núcleos de cada célula (heterocarionte) y por lo tanto hay recombinación genética a nivel alélico y genético que concluye en la formación de un hibridoma. Cada clona de hibridoma tiene la característica de producir un solo tipo de AcM, el cual va a reconocer una región específica (epítipo) de un solo antígeno que fue reconocido por el sistema inmune del ratón (Gavilondo. C, 1995). Sin embargo, este proceso se repite en millones de células de bazo y de mieloma (mezcla), resultando en 2262 hibridomas obtenidos, de los cuales solo 17 generaron Ac's monoclonales hacia crotamina y de estas 17, solamente 2 clonas sobrevivieron y se establecieron, dando las clonas 5D1 y 1D3. Lo que nos dice que la técnica para obtener AcM provenientes de hibridomas se complica debido a distintos factores como la toxicidad del PEG, la baja tasa de fusión entre células de bazo-mieloma y la dificultad de los hibridomas por establecerse después de un proceso de recombinación genética, resultando en un bajo número de clonas obtenidas.

11.4. Evaluación de la obtención y purificación de anticuerpos monoclonales 1D3 y 5D1 contra crotamina

Por otro lado, existe la posibilidad de que la lectura de concentración proteica (mg/mL) de AcM 1D3 y 5D1 anti-crotamina purificados de ascitis, puede ser un tanto sobreestimada. Dado que existe la posibilidad de encontrar Ac's contra otros antígenos en menor proporción debido a la respuesta natural del sistema inmune adaptativo de cada ratón (Abbas *et al.*, 2012). Los hibridomas, además de tener células tumorales generadoras de Ac's únicos, están en contacto con agentes (antígenos) externos, produciendo una respuesta policlonal hacia los mismos. Esta probabilidad es baja, ya que los ratones se encuentran en aislamiento y provienen de un laboratorio donde los cuidados sanitarios son extremadamente rigurosos.

Aunado a esto, se confirmó la especificidad de los AcM 1D3 y 5D1 hacia crotamina utilizando la técnica de ELISA, donde la placa se sensibilizó únicamente con crotamina purificada. Además, se utilizaron los dos AcM purificados y analizados mediante un gel SDS PAGE 12.5%, en donde se observó un grado de

purificación alto para cada Ac manteniendo su estructura conformacional al mostrar el peso molecular esperado de 150 kDa (Owen A, 2014).

11.5. Reconocimiento de AcM 1D3 y 5D1 contra crotamina purificada

Utilizando la técnica de ELISA se comparó la EC_{50} de los dos AcM obtenidos, mostrando el reconocimiento del AcM 1D3 y 5D1 hacia crotamina en su forma conformacional. El AcM 5D1 reconoció a crotamina utilizando 5.7 μ g de Ac, mientras que el AcM 1D3 resultó ser 63 veces menos afín, es decir, al sensibilizar la placa de microtitulación con crotamina purificada y en su forma nativa, permite sugerir que existe un reconocimiento conformacional hacia crotamina por parte del AcM 5D1, siendo el único AcM candidato para pruebas de laboratorio donde se quiera determinar la presencia de crotamina de manera cualitativa en venenos de serpientes del género *Crotalus*.

11.6. Reconocimiento contra venenos de diferentes especies

Mebis D y Kornalik F., 1989; Harrison et al., 2003 y Casasola et al., 2009 reportan la existencia de actividad cruzada de antivenenos hacia venenos de serpientes que no son empleados en el proceso de inmunización. Estos grupos mencionan que entre especies relacionadas taxonómicamente la reactividad cruzada es común, debido a la gran cantidad de epítopes antigénicos conservados en los venenos de estos reptiles. Es así que al evaluar el reconocimiento específico o cruzado de los Ac's 1D3 y 5D1 anti-crotamina hacia diferentes componentes proteicos en venenos de *C.d.terrificus*, *C.simus* y *C.basiliscus* utilizando la técnica de Western Blot bajo condiciones reductoras. Ambos anticuerpos reconocieron crotamina de forma lineal, sobre todo 1D3, ya que presentó mayor resolución de bandeo que 5D1. Aunado a esto, ambos AcM presentaron reacción cruzada hacia crotoxina de *C.d.terrificus*, *C.simus* y *C.basiliscus*. Nuevamente, 1D3 resultó tener mayor resolución de bandeo que 5D1, por lo tanto, mayor reconocimiento hacia

crotoxina. Sin embargo, este experimento no muestra que parte de la crotoxina es reconocida, ya que está compuesta por dos subunidades proteicas: subunidad ácida y subunidad básica (Aird *et al.*, 1985 y Faure *et al.*, 2011).

11.7. Reconocimiento conformacional contra crotamina y subunidad básica de crotoxina del veneno de *C.d.terrificus*

Para corroborar el resultado anterior, en donde existe un reconocimiento de los Ac's 1D3 y 5D1 hacia crotamina, y por otra parte, localizar cual de las dos subunidades de crotoxina es reconocida por los mismos Ac's, se realizó un ELISA de tipo indirecto.

Los resultados permitieron determinar y observar que no sólo existe un acoplamiento conformacional de ambos AcM hacia crotamina, donde 5D1 tiene mayor afinidad que 1D3; sino que también reconocen a la subunidad básica de crotoxina, al mostrar valores similares al de crotamina, suponiendo la existencia de epítopes conformacionales y/o estructurales compartidos entre estas dos proteínas.

Al observar este resultado, se realizó un alineamiento de residuos entre ambas proteínas utilizando el programa Clustal Omega®, tomando en cuenta los accesos NCBI® de AAF34911.1 para crotamina y P0CG56.1 para la subunidad básica de crotoxina de *C. durissus terrificus* (Figura 29), arrojando un 28.33% de identidad entre ambas proteínas.

```

crotamina_C_durissus_terrificus  MKILYLLFAFLF-LAFLS----EPGNAYKQC-HKKGGHCFPK---EKICLPPSSDFGKM-
crotoxina_subB                    -----SLLQFNKMIKFETRKNVAVPFYAFYGCYCGWGGQGRPKDATDRCCFVHDCCYGKLA
                                   *: *  : * :   * * : *   **: **  :: * : .. **:

crotamina_C_durissus_terrificus  DCRWRWKCKKG--SGK-----
crotoxina_subB                    KCNTKWDIYRYSLKSGYITCGKGTWCKEQICECDRVAAECLRRSLSTYKNEYMFYPDSRC
                                   . * . : * . : . **

crotamina_C_durissus_terrificus  ----- 65
crotoxina_subB                    REPSETC 122

```

Figura 29. Alineamiento de residuos de aminoácidos de crotamina y sub. B de crotoxina de *C.d.terrificus* por Clustal Omega®. (*) Aminoácidos compartidos. (:) Aminoácidos diferentes en el mismo grupo o clasificación). (.) Aminoácidos distintos con diferente clasificación.

Es importante mencionar que esta identidad no se encuentra en una región en particular, sino que la identidad se encuentra en distintos aminoácidos discontinuos, por lo que este porcentaje de identidad no es totalmente válido. Por otra parte, al comparar la región amino de ambas proteínas se observa que las dos regiones son distintas, sin embargo, estas dos comparten aminoácidos con características fisicoquímicas semejantes, lo que nos permite suponer que el grado de identidad obtenido entre ambas proteínas es debido a estas semejanzas. Bajo este resultado, suponemos que el reconocimiento cruzado entre crotamina y la subunidad básica de crotoxina se debe a que ambas proteínas pudieran compartir por lo menos un epítipo lineal.

11.8. Epítipes compartidos entre crotamina y crotoxina: proteínas de diferente origen

Con la finalidad de comprobar la existencia de epítipes lineales compartidos entre crotamina y sub. B de crotoxina del veneno de *C.d.terrificus*, se llevó a cabo un Western blot utilizando los AcM anti-crotamina generados en este trabajo, en ratones inmunizados con crotamina purificada conjugada con BSA y Ac's policlonales anti-crotoxina de conejo inmunizado con veneno sin crotamina de

Crotalus simus. Los tres Ac's, tanto los monoclonales anti-crotamina como los policlonales anti-crotoxina reconocieron tanto a la crotamina como a la sub B de crotoxina, demostrando así la existencia de epítopes lineales compartidos entre estas dos proteínas. Actualmente no hay reportes sobre la compartición de epítopes ya sea conformacionales o lineales entre estas dos proteínas, por lo que estos resultados son pioneros en este tema. Estas observaciones sugieren un mayor estudio sobre el reconocimiento cruzado entre crotamina y sub B de crotoxina del veneno de *C.d.terrificus*.

12. Conclusiones

- Los títulos de anticuerpos anti-crotamina aumentaron al inmunizar a los ratones con conjugados de crotamina-BSA con relación molar 1:2 y 1:4
- El conjugado 1:4 mostró ser más inmunogénico en comparación al conjugado con relación 1:2.
- Se obtuvieron 2,262 hibridomas totales, de los cuales solamente 17 fueron productoras de anticuerpos contra crotamina; de estas 17, sólo 2 clonas se establecieron produciendo los AcM 5D1 y 1D3 los cuales presentan un bajo reconocimiento contra crotamina.
- El AcM 5D1 es el único Ac capaz de utilizarse para evaluar cualitativamente la presencia de crotamina en distintos venenos de serpientes de cascabel, ya que el AcM 1D3 presentó un reconocimiento conformacional hacia crotamina casi nulo.
- Tanto la crotamina como la subunidad básica de crotoxina comparten un epítotope lineal y conformacional, el cual es reconocido por los Ac's anti-crotamina 5D1 y 1D3.

13. Perspectivas

- Realizar nuevos conjugados modificando la relación molar entre crotamina y BSA.
- Obtener uno o más AcM con mayor afinidad hacia crotamina, los cuales puedan utilizarse para cuantificar crotamina en distintos venenos de serpientes de cascabel por medio de la técnica de ELISA.
- Identificar el o los epítotope (s) compartidos (s) entre crotamina y crotoxina.

14. Referencias

- Arbuckle, K. (2017). Evolutionary context of venom in animals. *Evolution of Venomous Animals and Their Toxins*, 1-23.
- Abbas A.K. Lichtman A. H. y Pober J. S. (2012). 6° Ed. "Inmunología celular y molecular". Sanunders-Elsevier.
- Aird, S. D., Kaiser, I. I., Lewis, R. V., & Kruggel, W. G. (1985). Rattlesnake presynaptic neurotoxins: primary structure and evolutionary origin of the acidic subunit. *Biochemistry*, 24 (25), 7054-7058.
- Batista da Cuña D., *et al.* (2018). Mechanistic insights into functional characteristics of native crotamine. *El Sevier. Toxicon*. Vol. 146. 1-12 pp.
- Bernard-Valle, M., Neri-Castro, E.E. , Fry, B.G., Boyer, L., Cocharan, C., Alam, M., Jackson, N.W., Paniagua, D., Olvera-Rodríguez, F., Koludarov, I., Sunagar, K. & Alagón, A. Antivenom research and development. En. Fry, B. G. (2015). *Venomous reptiles and their toxins: evolution, pathophysiology, and biodiscovery*. Oxford University.
- Caldwell J.P., Vitt L.J. *Herpetology. An introduction of Amphibians and Reptiles* fourth edition. ELSEVIER. USA. 2014.
- Calvete J. (2010). Journal of proteome research. Snake Venomics of the Central American Rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* Complex Points to Neurotoxicity as an Adaptive Paedomorphic Trend along *Crotalus* Dispersal in South America. 9.528-544 pp.
- Campbell, J.A., Lamar, W.W. 2004. The venomous reptiles of the western hemisphere (vol. 2). Comstock Pub Assoc. Estados Unidos de América.528-533
- Casasola, A., Ramos-Cerillo, B., de Roodt, A. R., Saucedo, A. C., Chippaux, J.P., Alagón, A., y Stock, R. P. (2009). Paraspecific neutralization of the venom of African species of cobra by an equine antiserum against *Naja melanoleuca*: a comparative study. *Toxicon*, 53(6), 602-608 pp.
- Chang, C.C., Lee, J.D. (1977). Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venoms, is a presynaptic toxin acting like b-bungarotoxin. *Naunyn-Schimiedebergs Arch. Pharmacol.* 296, 159-168.
- Chippaux, J.P. (1998). Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bulletin of the World Health Organization*, 76(5), 515.

Chippaux, J.P., 2006. Snake Venoms and Envenomations. Krieger Publishing Company.

Coronado, M. A., Gabdulkhakov, A., Georgieva, D., Sankaran, B., Murakami, M. T., Arni, R. K., & Betzel, C. (2013). Structure of the polypeptide crotoxin from the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 69(10), 1958-1964.

de Oliveira L.A., et al. (2017). *Crotalus durissus terrificus* crotoxin naturally displays preferred positions for amino acid substitutions. Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases. 23:46.

de Roodt, A. R., Estévez-Ramirez, J., Paniagua-Solís, J. F., Litwin, S., Carvajal-Saucedo, A., Dolab, J.A., Robles-Ortiz L.E., & Alagón, A. (2005). Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México. Gaceta médica de México, 141 (1), 13-21.

de Roodt, A. R. Estudio inmunológico del veneno de serpientes de importancia sanitaria de la Argentina. (2002). Tesis de Doctorado. Universidad de Buenos Aires. Argentina. 320 p.

Durban J. et al., (2017). Journal de proteome research. Integrated Venomics and Venom Gland Transcriptome Analysis of Juvenile and Adult Mexican Rattlesnakes *Crotalus simus*, *C. tzabcan* and *C. culminatus* Revealed miRNA-modulated Ontogenetic Shifts.

Durban, J., Sanz, L., Trevisan-Silva, D., Neri-Castro, E., Alagón, A., & Calvete, J. J. (2017). Integrated Venomics and Venom Gland Transcriptome Analysis of Juvenile and Adult Mexican Rattlesnakes *Crotalus simus*, *C. tzabcan*, and *C. culminatus* Revealed miRNA-modulated Ontogenetic Shifts. Journal of proteome Research, 16(9), 3370-3390.

Faure, G., Xu, H., & Saul, F. A. (2011). Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric β -neurotoxin. Journal of molecular biology, 412(2), 176-191.

Flores Villela y García Vázquez. 2014. Biodiversidad de reptiles en México. Revista Mexicana de biodiversidad. 85: 467-475.

Gavilondo J.V. (1995). Anticuerpos monoclonales. La Habana. Elfos Scientiae.

Goncalves JM & Polson A. (1947). The electrophoretic analysis of snake venoms. Arch Biochemical. Vol. 13 (2): 253-9.

Guidolin F.R., *et al.* (2013). Characterization of *anti-crotalic* antibodies. El Sevier. Toxicon. Vol. 66. 7-17 pp.

Harrison, R. A., Wuster, W., & Theakson, R. D. G. (2003). The conserved structure of snake venom toxins confers extensive immunological cross-reactivity to toxin-specific antibody. Toxicon, 41(4), 441-449.

Hermason. G. (2013). Bioconjugate techniques. Tercera edición. El Sevier

Hernández D.I. (2015). Crotoxina en el veneno de la serpiente de cascabel *Crotalus simus* en México: su relación con la toxicidad y distribución geográfica. Tesis de Maestría. UNAM.

Kerkis, I., Hayashi, M. A., Prieto da Silva, A. R., Pereira, A., De Sá Júnior, P. L., Zaharenko, A. J., Ráptis, B. G., Kerkis, A., & Yamane, T. (2014). State of the art in the studies on crotamine, a cell penetrating peptide from South American rattlesnake. BioMed research international, 2014.

Kerkis A., *et al.* (2004). Crotamine is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. The FASEB Journal. Vol. 18. No. 12.

Kindt T. J., Goldsby R.A., & Osborne B.A. Inmunología de Kuby. Sexta edición. Mc Graw Hill. México. 2007. 697 pp.

Lomonte B., Angulo Y., & Calderón L (2003). An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. Journal El Sevier, Vol. 42. 885-901 pp.

Lomonte B., Fernández J., Sanz L., Angulo Y., Sasa M., Gutierrez J.M., & Calvete J. J. (2014). Venomous snakes of Costa Rica: Biological and medical implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of snake venomomics. *Journal of Proteomics*. 105, 323-339.

Lourenco, Jr. A., *et al.* (2013). Individual venom profiling of *Crotalus durissus terrificus* specimens from a geographically limited region: Crotamine assessment and captivity evaluation on the biological activities. Toxicon. Vol.69. 75-81 pp.

Mackessy, S.P. 2010. Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles. CRC Press/Taylor and Francis group. Florida, USA. 521 pp.

Mebs, D. & Kornalik, F. (1989). Studies on the cross reactivity of snake venom antisera. Mem. Inst. Butantan. 51:127-132.

Milstein y Kohler (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* Vol. 256.

Neri. C. *et al* (2013 a). *Journal Proteomics*. 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. 87. 103-121 pp.

Neri C. (2013b). Variación intraespecífica en el veneno de *Crotalus simus* de México. Tesis UNAM. 39-40 pp.

Neri Castro, Melisa Bénar Valle y Alejandro Alagón Cano. (2015). Reptiles venenosos en México 1 Noviembre de Vol 15. Num 11 ISSN 1607-6079 Revista digital universitaria.

Owen A.J. *et al*. (2014). *Inmunología de Kuby*. 7e Edición. McGraw Hill. México. 567 pp.

Peigneur, S., Orts, D. J. da Silva, A. R. P., Oguiura, N., Boni-Mitake, M., de Oliveira, E. B., Zharenko, A. J., de Freitas, J. C., & Tytgat, J. (2012). Crotoxin pharmacology revisited: novel insights based on the inhibition of KV channels. *Molecular pharmacology*, 82(1), 90-96.

Ponce-Soto L.A., Camillo N. & Marangoni. (2007). Structural and biological characterization of two crotoxin isoforms IV-2 and IV-3 isolated from the *Crotalus durissus cumanensis* venom. *Springer Science*. Vol. 26: 533-540.

Remuzgo, C., Alvarez, M. P., Lazo, F., Yarlequé, A., (2000). Caracterización parcial del veneno de la serpiente de cascabel peruana *Crotalus durissus terrificus*. *Rev. Peru. Biol.* 7(1): 67-73 pp.

Santoro M.L, *et al*. (1999). Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collineatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 122. 61-73 pp.

Santos H. L., *et al*. (2019). Rattlesnakes bites in the Brazilian Amazon: Clinical epidemiology, spatial distribution and ecological determinants. *Acta tropica*. Vol 191. 69-76 pp.

Segura A. *et al*. (2017). *Journal of proteomics*. Proteomic, toxicological and immunogenic characterization of Mexican west-coast rattlesnake (*Crotalus basiliscus*) venom and its immunological relatedness with the venom of Central American rattlesnake (*Crotalus simus*) 158. 62-72 pp.

Torres B. O., *et al.* (2014). Characterization and optimization of heroin hapten-BSA conjugates: method development for the synthesis of reproducible hapten-based vaccines. Springer Science. Anal Bioanal Chem. 406: 5027-5937 pp.

Toyama M.H. *et al.* (2000). Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolated by a single steep RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islets. Journal El Sevier. Vol. 1474, 56-60 pp.

Uetz, P., Freed, P. & Jirí Hošek (2018) <http://www.reptil-database.org>

15. Anexo

❖ *Soluciones stock:*

• **OPI 100X** : Se pesa 0.15 g de oxaloacetato, 0.05 g de ácido pirúvico y 200 UI de insulina. Se disuelven en 10 mL de agua destilada y se esteriliza por filtración. Nota: Si el OPI ya viene mezclado (Sigma), se le agregan 10 mL de H₂O y se esteriliza por filtración (0.22 µm).

• **Glutamina 100X**: Se preparan 10 mL de 200 mM de L-glutamina en agua destilada y se esteriliza por filtración.

• **Stock Ampicilina/Streptomicina 1000X** : 1gr/1gr en 10 mL de H₂O filtrar en 0.22 µm.

• **Medio de cultivo DMEM**: Se disuelve el contenido de un sobre en 1L de agua destilada estéril con agitación (mosca magnética), se adiciona 3.7 g de bicarbonato de sodio y se ajusta el pH a 7.0 burbujeando CO₂, la medición se hace con un papel pH. Se esteriliza por filtración, se almacena a 4°C en frascos de 500 mL.

• **Medio de cultivo completo B (Para 1 L)**

DMEM: 779 mL

Suero Fetal Bovino: 200 mL

OPI (100X): 10 mL

Glutamina (100 X): 10 mL

Antibióticos (1000 X): 1mL

• **Medio de cultivo HAT (Para 100 mL)**: 77 mL de medio de cultivo DMEM suplementado con 20 mL de Suero Fetal Bovino, 1 mL de OPI (100X), 1 mL Glutamina (100 X), 1 mL HAT (100 X Gibco) y 100 µL de antibiótico (1000 X).

• **Medio de cultivo HT (Para 100 mL)**: 77 mL de medio de cultivo DMEM suplementado con 20 mL de Suero Fetal Bovino, 1 mL de OPI (100X), 1 mL Glutamina (100 X), 1 mL HT (100 X Sigma) y 100 µL de antibiótico (1000 X).

❖ *Medios de congelación (Para 100 ml)*

• **Medio 1**: 30 mL de medio DMEM, 50 mL de suero fetal bovino y 20 mL de DMSO.

• **Medio 2**: 90 mL de medio DMEM y 10 mL de suero fetal bovino.

❖Protocolo de congelación

Centrifugar las células en un tubo cónico de 50 mL a 2000 rpm 5 min. Lavar el pellet con 30 mL de medio DMEM sin suero, centrifugar igual que el paso anterior y resuspenderlas en 10 mL de DMEM sin suero. Hacer una dilución 1:10 y contar en un hematocitómetro.

Centrifugar las células y resuspenderlas con el medio 2 de modo que 10×10^6 células/mL, en seguida colocar el mismo volumen de medio 1 de tal manera que quede una concentración de final de 5×10^6 células/mL (se colocan 1 mL de células en criotubos de 2 mL). Colocar en hielo y en seguida a -70°C , al día siguiente pasar los tubos al contenedor de nitrógeno líquido (-170°C).

❖Descongelamos de células

Secar el o los tubos del tanque de nitrógeno y colocarlos en el baño María a 37°C , hasta que se descongele. Pasar las células (5×10^6) en un tubo cónico de 50 mL. Diluir con 20 mL de medio B precalentado a 37°C .

Centrifugar a 1 800 rpm por 5 minutos, descartar el sobrenadante y colocar las células en un frasco de 75 cm^2 con 20 mL de medio completo B. Se realiza cambio de medio cada 24 horas hasta que las células estén completamente recuperadas.

❖Protocolo de fusión celular.

Un día antes de la fusión celular se centrifugan las células a 1000 rpm y se resuspenden en 10 mL de medio DMEM sin suero, se realiza una dilución 1:10 (1 mL final) para contar las células en un hematocitómetro. Las células se resiembran a una densidad de 2.5×10^5 por mL en 40 mL totales.

❖Extracción de las células del bazo:

Se extrae el bazo del ratón inmunizado dentro de una campana de flujo laminar empleando material de cirugía estéril y es colocado con ayuda de unas pinzas sobre una rejilla dentro de una caja Petri.

El bazo es disgregado en 3 mL de medio de cultivo sin suero, precalentado a 37°C y posteriormente se agregan 7 mL de medio de cultivo (10 mL totales).

El paquete celular es transferido a un tubo cónico de 15 mL, se deja sedimentar para eliminar el tejido disgregado y el sobrenadante es transferido cuidadosamente a otro tubo de 15 mL, se centrifuga a 1800 rpm/5 min.

El paquete celular es resuspendido en 10 mL de medio DMEM sin suero precalentado a 37°C .

Se centrifuga para lavar las células a 1 800 rpm/5 min y se descarta el sobrenadante. Se realizan 2 lavados más con las mismas condiciones.

❖ **Fusión celular**

Las células de mieloma se centrifugan a 1 800 rpm/5 min. Se lavan con 30 mL de medio DMEM sin suero precalentado a 37 °C.

Las células de mieloma son resuspendidas en 30 mL de medio sin suero y se mezclan con el pellet de las células de bazo, se centrifugan a 1 800 rpm/5 min.

Aspirar el sobrenadante mediante vacío con una pipeta Pasteur cuidadosamente, sin llevarse las células.

El paquete celular se agita levemente y se adiciona 1 mL de polietilenglicol precalentado a 37 °C (PEG Roche) en un lapso de 1 minuto, se agita suavemente con la punta de la pipeta.

Diluir con 1 ml de medio DMEM sin suero precalentado a 37°C y 9 mL de medio DMEM.

Centrifugar a 1800 rpm/5 min a temperatura ambiente y se aspira el sobrenadante.

Las células se resuspenden en 50 mL de medio HAT.

Colocar 100 µL de cultivo celular/pozo en un total de 5-6 placas de 96 pozos agregar a las 48 horas medio HT, esto es para disminuir el contenido de aminopterin.

❖ **Análisis por ELISA**

Después de evaluar los hibridomas (Aproximado un 85%-90% de formación de hibridomas, conteo en el microscopio). Los hibridomas son analizados mediante la técnica de ELISA, tomando 100 µL del sobrenadante de cultivo.

❖ **Clonación por dilución límite.**

Medio de alimentación (Feeder): Se preparan 200 mL de medio de cultivo HT, se obtienen células de bazo de ratón hembra (Balb/c limpio), se lavan 3 veces con medio DMEM sin suero y el pellet se resuspende en 10 mL de medio DMEM sin suero. Para contar las células se hace una dilución 1:10 (1mL) en DMEM s/suero y se cuentan en un hematocitometro, se centrifuga nuevamente y el pellet se resuspende con medio HT para obtener una concentración final de 1×10^6 /mL.

Se colocan 100 µL de células de bazo por pozo, el número de placas depende del número de hibridomas positivos obtenidos, se dejan 24 horas a 37 °C.