



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Expresión heteróloga de crotamina de *Crotalus molossus nigrescens* fusionada a esfingomielinasa D de *Loxosceles* en *Escherichia coli*, para su utilización como posible inmunógeno

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

José Roberto Ponce López

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Alejandro Alagón Cano  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Lidia Riaño Umbarila  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Dr. José Estuardo López Vera  
[Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos, noviembre, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**El presente trabajo de grado (Maestría) 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 del Dr. Alejandro Alagón Cano y la co-tutoría 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 IN207218. “Investigación de venenos de serpientes para el mejoramiento de antivenenos”.**

**-CONACYT 264255. “Automatización de llenado de bolsas de agua para ratas y ratones del bioterio del Instituto de Biotecnología-UNAM”.**

**-FORDECYT 303045. “Venenos y Antivenenos”.**

**-CONACYT. Beca por estudios de posgrado (CV: 925566).**

## Agradecimientos

En primera instancia, al Dr. Alejandro Alagón Cano por todo su apoyo y confianza depositada en mí desde el momento que entré al su laboratorio.

Al M. en C. Alejandro Olvera Rodríguez por la supervisión de avances de proyecto y aportaciones académicas brindadas.

A la Dra. Lidia Riaño Umbarila, por formar parte de mi comité tutorial y por todas las sugerencias y comentarios oportunos para la mejora del presente trabajo.

Al Dr. José Estuardo López Vera por formar parte de mi comité tutorial y participar desinteresadamente en aumentar la calidad del presente trabajo.

A los siguientes investigadores que formaron parte del jurado de evaluación de examen profesional y por sus valiosas sugerencias para mejorar la presente tesis: Dr. Baltazar Becerril, Dra. Viviana Valadez, Dra. Dehni Schnabel, Dr. Fernando Esquivel y Dr. Takuya Nishigaki.

Al Dr. Juan Miguel Borja Jiménez por la convivencia de trabajo y conocimientos compartidos, además de los venenos de *C. molossus nigrescens* donados para este trabajo.

A la Dra. Elda E. Sánchez de la universidad de Texas A&M en Kingsville por la amable donación de los venenos de *C. d. terrificus* y *C. o. helleri* para la realización de este proyecto.

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

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

A los técnicos del laboratorio: Biól. Felipe Olvera Rodríguez, así como al auxiliar de laboratorio Ricardo Mondragón Cortés, por sus valiosas asesorías técnicas a lo largo de este proyecto.

A la Sra. Manuela Ávila por su gran aportación al laboratorio y apoyo brindado.

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

A la Ing. Leticia Olvera Rodríguez por su apoyo amable en técnicas de biología molecular.

Al bioterio del Instituto de Biotecnología a cargo de la Dra. Elizabeth Mata por el apoyo concebido en la manipulación de animales de laboratorio.

A la unidad de síntesis y secuenciación del IBt-UNAM a cargo del Dr. Paul Gaytán por su amable atención y excelentes servicios brindados.

A mis amigos del IBt: Mauro, Ulises, Eduar YTS y Diego.

A mis amigos del laboratorio: Fernando, Mitzi, Nicolás, Marcela, Belém, Miguel, Samuel, Edgar, Melisa, Andrea, Alid, Manuel, Andrei, Marco, Astrid, Jesús, Erika, Iván y Gibrán.

A mi novia Estefanía de Allende por el cariño y haber hecho juntos la Maestría.

A Conacyt por la beca de posgrado otorgada durante mis estudios de Maestría (CV: 925566).

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo económico recibido para asistir a un congreso nacional y otro internacional durante mis estudios de Maestría.

A la UNAM por todas las enseñanzas y valores adquiridos desde que soy estudiante de esta universidad.

A mi Padre Roberto Ponce, Madre Mary Carmen, hermanos Víctor, Ángel y Kevin, a quienes dedico esta tesis.

## Índice

<b>1. Resumen</b> .....	3
<b>Abstract</b> .....	4
<b>2. Introducción</b> .....	5
<b>2.1 Epidemiología de envenenamientos por serpiente</b> .....	5
2.2 Diversidad de víboras de cascabel en Norte América.....	5
2.3 Componentes en venenos de víbora de cascabel.....	6
2.4 Crotamina o miotoxina A en venenos de víbora de cascabel.....	9
2.5 Antivenenos antiviperinos producidos en E.E.U.U. y México .....	15
2.6 Uso de adyuvantes en la producción de antivenenos .....	17
2.7 Esfingomielinasa D de la araña violinista ( <i>Loxosceles spp.</i> ).....	18
<b>3. Antecedentes</b> .....	19
3.1 Venenos con crotamina.....	19
3.2 Estudios de neutralización de crotamina .....	20
3.3 Expresión heteróloga de SMD y crotamina .....	21
3.4 Aumento de inmunogenicidad de toxinas en venenos .....	21
<b>4. Justificación</b> .....	23
<b>5. Hipótesis</b> .....	23
<b>6. Objetivo general</b> .....	23
<b>7. Objetivos particulares</b> .....	23
<b>8. Estrategia experimental</b> .....	24
<b>9. Materiales y métodos</b> .....	24
9.1 Animales de laboratorio.....	24
9.2 Venenos y toxinas empleadas en este estudio .....	24
9.3 Cuantificación de proteínas .....	25
9.4 Calidad de ARN de glándulas del veneno de un individuo de <i>C. m. nigrescens</i> ..	25
9.5 Síntesis de ADNc .....	26
9.6 Amplificación por PCR de secuencias de crotamina .....	26
9.7 Clonación de secuencias de crotamina.....	28
9.8 Análisis de colonias por PCR y obtención de plásmido.....	28
9.9 Incorporación de sitios de restricción a secuencia de SMD para su subclonación en el vector TOPO 2.1.....	29

9.10 Incorporación de sitios de restricción a secuencia de crotamina para su subclonación en el vector TOPO 2.1 .....	30
9.11 Cortes con enzimas de restricción sobre construcción en TOPO 2.1 de SMD y crotamina .....	31
9.12 Ligación del gen de crotamina y SMD en el vector de expresión pQE30 .....	32
9.13 Pruebas de expresión de la proteína de fusión SMD-crotamina .....	33
9.14 Análisis electroforético de localización de proteína soluble.....	34
9.15 Western-blot de la proteína de fusión SMD-crotamina.....	35
9.16 Purificación de la proteína SMD-crotamina mediante cromatografía de afinidad a níquel .....	36
9.17 Análisis de la proteína SMD-crotamina purificada por columna de níquel por western-blot.....	37
9.18 Evaluación de actividad letal en ratones de la proteína SMD-(linker)-crotamina	37
9.19 Inmunización de conejos con venenos completos ricos en crotamina .....	38
9.20 Inmunización de conejos con la proteína SMD-(linker)-crotamina .....	39
9.21 ELISA indirecto para medición de títulos de anticuerpos .....	40
9.22 Purificación de anticuerpos por el método de ácido caprílico.....	42
9.23 Western-blot de antivenenos experimentales.....	42
9.24 Ensayos de especificidad de anticuerpos anti-SMD-(linker)-crotamina por ELISA. ....	43
9.25 Ensayos de neutralización de parálisis espástica producidos por crotamina .....	43
9.26 Análisis estadístico .....	44
<b>10. Resultados</b> .....	<b>45</b>
10.1 Gel de agarosa de ARN de glándula de veneno .....	45
10.2 RT-PCR de transcritos codificantes de crotamina.....	45
10.3 Secuenciación de variantes de crotamina obtenidas en el vector pJET 1.2.....	47
10.4 Secuenciación del vector de expresión pQE30 con construcción codificante para SMD y crotamina <i>in tandem</i> .....	49
10.5 Ensayos de expresión de la proteína de fusión SMD-crotamina .....	53
10.6 Obtención de la proteína de fusión SMD-crotamina.....	55
10.7 Pruebas de toxicidad en ratones de la proteína de fusión SMD-(linker)-crotamina .....	58
10.8 Títulos de anticuerpos hacia venenos completos de conejos inmunizados .....	59
10.9 Títulos de anticuerpos de conejos hacia crotamina de conejos inmunizados ....	60

10.10	Títulos de anticuerpos hacia SMDr de conejos inmunizados .....	61
10.11	Generación de antivenenos experimentales .....	62
10.12	Western-blot de reconocimiento de crotamina por antivenenos experimentales .....	63
10.13	Especificidad de antivenenos experimentales generados con la proteína recombinante hacia crotamina por ELISA .....	65
10.14	Neutralización de parálisis espástica de crotamina por antivenenos experimentales .....	66
<b>11.</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>69</b>
11.1	Neutralización de crotamina por antivenenos mexicanos .....	69
11.2	Secuencias de crotamina aisladas .....	70
11.2	Obtención de proteína de fusión entre SMD y crotamina .....	70
11.3	Títulos de anticuerpos contra crotamina .....	72
11.4	Actividad cruzada de reconocimiento entre crotaminas .....	73
11.5	Neutralización de parálisis espástica por crotamina.....	74
<b>12.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	<b>76</b>
<b>13.</b>	<b>Perspectivas</b> .....	<b>76</b>
<b>14.</b>	<b>Literatura citada</b> .....	<b>77</b>
<b>15.</b>	<b>Artículos publicados</b> .....	<b>85</b>



## 1. Resumen

Dentro de los componentes proteicos presentes en venenos de algunas víboras de cascabel destacan las neurotoxinas paralizantes como es el caso de crotamina (Peso molecular: ~ 5 kDa). Crotamina es una toxina mionecrótica que genera un síntoma característico de parálisis espástica en ratones de laboratorio. Actualmente, los antivenenos mexicanos presentan una nula reactividad hacia esta toxina, lo cual obstaculiza el tratamiento adecuado de los pacientes mordidos por serpientes con venenos enriquecidos con crotamina (p.ej. *Crotalus molossus nigrescens* y *C. oreganus helleri*). Con el objetivo de incrementar la inmunogenicidad de crotamina para la generación de anticuerpos neutralizantes, en la presente investigación se diseñó y expresó, en el modelo de *Escherichia coli*, una proteína de fusión compuesta por la crotamina de la especie *C. m. nigrescens* y la enzima esfingomielinasa D de la araña *Loxosceles reclusa*. La proteína recombinante de fusión SMD-crotamina fue obtenida en dos formatos con o sin linker de glicinas (GGGGS) para ser evaluada como inmunógeno en conejos. Asimismo, se describió la inmunogenicidad de la crotamina del veneno de las especies *C. m. nigrescens* y *C. o. helleri*. Los anticuerpos generados con los venenos completos mostraron reactividad cruzada de reconocimiento por western-blot y neutralización de la parálisis espástica en ratones contra crotaminas de las especies homólogas y de la especie *C. durissus terrificus* de Sudamérica. Los anticuerpos generados contra la proteína de fusión SMD-crotamina presentaron la misma capacidad de reactividad cruzada de reconocimiento por western-blot hacia las crotaminas de las otras especies. Sin embargo, la neutralización de la parálisis espástica fue lograda con altas dosis de anticuerpos administrados en ratones. Los resultados sugieren que es necesaria la formulación de venenos ricos en crotamina o la proteína recombinante SMD-crotamina para ser usados en esquemas de inmunización de caballos. Esto permitiría lograr que los antivenenos mexicanos presenten una adecuada reactividad hacia la crotamina, y a la vez mejorar su potencia neutralizante hacia esta toxina.

## Abstract

Among other protein components found in rattlesnake venoms, there exist the paralyzing neurotoxins such as crotamine (Molecular weight: ~ 5 kDa). Crotamine or myotoxin A is a myonecrotic toxin that causes an unique spastic paralysis symptom when injected in mice. Recently, it is was reported that Mexican antivenoms lack antibodies against this low-molecular weight toxin, which in turn can generate severe management outcomes for any snake bite caused by snakes with a high proportion of crotamine in their venoms (e.g. *Crotalus molossus nigrescens* and *C. oreganus helleri*). In order to increment crotamine's immunogenicity to generate neutralizing antibodies against this toxin, in this research we designed and expressed, in the *Escherichia coli* model, a fusion protein composed of crotamine from *C. m. nigrescens* and the enzyme sphingomyelinase D from the spider *Loxosceles reclusa*. The recombinant fusion protein SMD-crotamine was obtained in two formats which include the addition of a glycine linker (GGGGS) or lacked it to be further evaluated as immunogen in rabbits. Besides, we described the immunogenicity of the crotamine from the venoms of the species *C. m. nigrescens* and *C. o. helleri*. The antibodies generated against the whole venoms showed cross-reactivity via western-blot and neutralization of the spastic paralysis in mice against crotamine from the homologous species as well as from the Southamerican species *C. durissus terrificus*. Likewise, the antibodies generated against the fusion protein showed the same cross-reactivity against the crotamine from the other species. Nevertheless, the neutralization of the spastic paralysis was achieved only by the administration of high doses of antibodies in mice. Our results denote the use of crotamine enriched venoms and our novel recombinant fusion protein as promising immunogens to improve the neutralizing potency against crotamine for the Mexican antivenoms.

## 2. Introducción

### 2.1 Epidemiología de envenenamientos por serpiente

El envenenamiento por mordedura de serpiente es un problema de salud pública con cerca de 2.7 millones de mordeduras al año en el mundo, mismas que ocasionan cerca de 100,000 muertes y la incapacidad de 400,000 personas con secuelas severas como amputaciones y deformación de extremidades (Gutiérrez *et al.*, 2017). En el continente americano se reportan alrededor de 60,000 mordeduras por serpientes venenosas al año de los cuales cerca de 400 son fatales, además se sabe que las especies de serpiente más involucradas en el accidente ofídico son las serpientes de cascabel (*Sistrurus* y *Crotalus*) y las nauyacas del género *Bothrops* (Chippaux, 2017).

En cuanto a esta situación en México no se tiene un buen registro, debido a su alta frecuencia en zonas rurales donde resulta problemático la identificación y el registro epidemiológico del ofidismo dada la escasez de servicios médicos. Sin embargo, existen estimaciones de la frecuencia del ofidismo entre los años 2003 y 2007 años en los que se reportaron un total de 18, 848 casos, de los cuales el 15.44% resultó en decesos en los estados de Veracruz, Oaxaca, San Luis Potosí, Hidalgo y Puebla (González-Rivera *et al.*, 2009; Hernández & Bravo, 2009). No obstante, es importante destacar la disparidad de los datos ya que una revisión reciente sobre ofidismo en México, en los años 2003-2015, reportó un promedio de mordeduras anuales de 4,000 y una tasa de mortalidad anual mayor en el sur del país (7/100,000 habitantes) en comparación con la región norte (2/100,000 habitantes) (Chippaux, 2017).

### 2.2 Diversidad de víboras de cascabel en Norte América

Las serpientes de cascabel son reptiles endémicos del continente americano y pertenecen a la familia Viperidae (subfamilia Crotalinae) que se caracterizan por presentar dentición tipo solenoglifa, escamas quilladas, focetas termorreceptoras y glándulas del veneno en cada lado de la región cefálica. Estos animales además acumulan restos de muda queratinizada en la cola, que constituyen el cascabel. Las

especies de serpiente de cascabel en su mayoría se encuentran dentro del género *Crotalus* (51 spp.), aunque también se les puede encontrar en el género *Sistrurus* (3 spp.) (Uetz, et al. 2020).

En Norteamérica se encuentran la mayoría de las especies de estas serpientes de cascabel siendo México el país con mayor número (44 spp.), mientras que en E.E.U.U. y Canadá sólo 23 y 4 especies se distribuyen, respectivamente (Uetz, et al. 2020). En la figura 1 se muestran imágenes de algunas de estas especies de cascabel representativas de Norteamérica.



*Crotalus oreganus helleri*



*Crotalus viridis viridis*



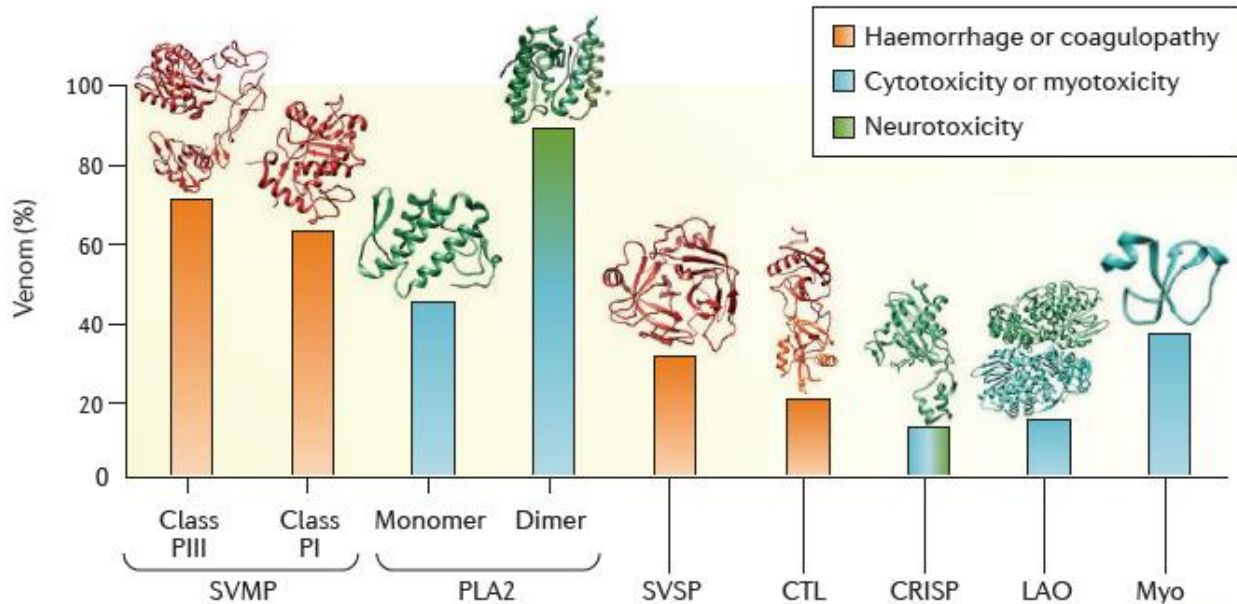
*Crotalus molossus nigrescens*

**Figura 1. Algunas especies de víbora de cascabel de Norteamérica.** De derecha a izquierda: cascabel del pacífico sur, cascabel de la pradera y cascabel de cola negra.

### 2.3 Componentes en venenos de víbora de cascabel

En general el veneno de las serpientes se compone de una mezcla de iones metálicos o sales y proteínas como pueden ser péptidos y polipéptidos complejos como enzimas. Los componentes proteicos del veneno de las víboras de la familia Viperidae pueden ser muy diversos clasificándose en cerca de 60 familias proteicas (Tasoulis & Isbister, 2017). Los componentes proteicos encontrados en el veneno son responsables de ocasionar el verdadero envenenamiento en cualquier intoxicación por estos reptiles. El grado de daño que generen en cada uno de sus tejidos diana dependerá, entre otros factores, en gran medida de la proporción en la que cada componente se encuentra dentro del veneno. En la figura 2 se resumen las proporciones relativas en las que se pueden encontrar las

principales familias proteicas en venenos de vipéridos, así como el daño fisiológico al que están relacionadas.



**Figura 2. Porcentaje de toxinas en venenos de vipéridos basado en el análisis de sus proteomas.** SVMP, metaloproteasas de venenos de serpientes; PLA<sub>2</sub>, fosfolipasas A<sub>2</sub>; SVSP, serino-proteasas de venenos de serpientes. CTL, proteínas tipo lectina-C; CRISP, proteínas secretoras ricas en cisteína. LAO, L-amino oxidasas; Myo, miotoxina A o crotamina (tomado de: Gutiérrez *et al.*, 2017).

En víboras de cascabel son cerca de nueve familias proteicas las que más comúnmente se encuentran en estos venenos, éstas pueden variar dependiendo de diferentes factores como la especie de la que se trate, la población en estudio y el estadio ontogénico (edad) de la serpiente (Tasoulis & Isbister, 2017). En la tabla 1 se muestran las características generales de los componentes más importantes encontrados en venenos de serpiente de cascabel.

**Tabla 1. Características generales de los componentes proteicos comúnmente encontrados en el veneno de las víboras de cascabel.**

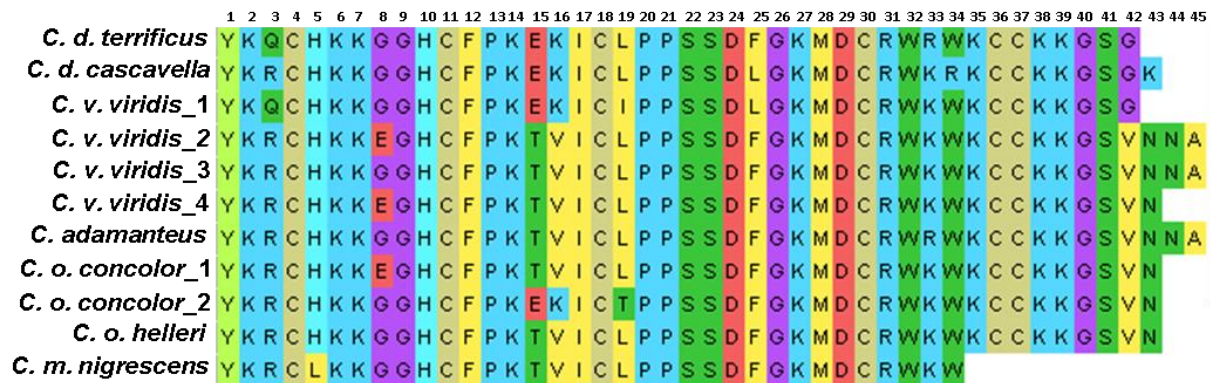
<b>Componente</b>	<b>Masa molecular (kDa)</b>	<b>Actividad bioquímica</b>	<b>Actividad biológica</b>	<b>Referencias</b>
<b>L-amino oxidasas</b>	85 - 150	Desaminación de L-amino ácidos.	Inducción de apoptosis, citotoxicidad.	Du & Clemetson, 2002.
<b>Metaloproteasas P-III</b>	43 - 85	Con actividad hidrolítica sobre colágeno, laminina, fibronectina y perlecano de membrana basal.	Extravasación celular; hemorragias.	Herrera <i>et al.</i> , 2015.
<b>Serinproteasas</b>	26 - 36	Hidrólisis de fibrinógeno	Problemas de coagulación.	Serrano, 2013.
<b>Metaloproteasas P-I</b>	20 - 24	Degradación de componentes de membrana basal.	Extravasación celular; hemorragias.	Herrera <i>et al.</i> , 2015.
<b>Fosfolipasas A<sub>2</sub> (Grupo II)</b>	13 - 15	Catalizan hidrólisis de C-2 glicerofosfolípidos	Mionecrosis, hemólisis, edemas, etc.	Sunagar <i>et al.</i> 2015.
<b>Fosfolipasas A<sub>2</sub> Heterodímero neurotoxinas pre-sinápticas.</b>	~ 24	Bloqueo de liberación de acetilcolina de terminal pre-sináptica.	Degradación de botón pre-sináptico de placa neuromuscular.	Doley & Kini, 2009.
<b>Lectinas tipo-C</b>	27 - 29	Unión a plaquetas y receptor de colágeno	Anticoagulante, modulador de plaquetas	Du & Clemtson, 2010.
<b>Desintegrinas</b>	5 - 15	Interacción con proteínas integrinas de matriz extracelular.	Inhibición de agregación plaquetaria.	Rivas-Mercado & Garza-Ocañas, 2017.
<b>Crotamina o miotoxina A</b>	~ 5	Bloqueo de canal de potasio Kv1.1-3. Internalización celular via endosomas.	Mionecrosis y parálisis espástica.	Kerkis <i>et al.</i> , 2014.

## 2.4 Crotamina o miotoxina A en venenos de víbora de cascabel

La crotamina es una toxina de bajo peso molecular compuesta de 42 - 45 aminoácidos (PM: 4.8 - 5.2 kDa) y descrita por primera vez en el veneno de una serpiente de cascabel sudamericana *Crotalus durissus terrificus* (Laure, 1975). Tras su descubrimiento, gran parte de la investigación científica pionera, en el estudio de esta toxina, se centraba en describir su actividad biológica de generación de parálisis rígida de extremidades en animales experimentales (Brazil *et al.*, 1979; Schenberg, 1959). Dicha actividad hoy en día se ha relacionado con un posible papel ecológico de captura de presa. Sin embargo, aún existen dudas del verdadero papel que tiene esta toxina en la biología de las serpientes de cascabel.

Es importante mencionar que toxinas homólogas fueron también descritas en una especie de víbora de cascabel norteamericana (*Crotalus viridis*) a las que se les llamó miotoxinas A debido a que en un inicio su actividad biológica descrita fue el elevado nivel de daño en fibras musculares que estas toxinas generaban (Cameron & Tu, 1977). Actualmente, a las moléculas de crotamina también se les conoce como miotoxinas, pero es importante no confundir estas moléculas con las miotoxinas de tipo PLA<sub>2</sub> encontradas en venenos de otros vipéridos ya que su naturaleza es totalmente distinta (Lomonte & Rangel, 2012). Con la finalidad de evitar confusiones, en esta tesis se utilizará el término crotamina como sinónimo de miotoxina A.

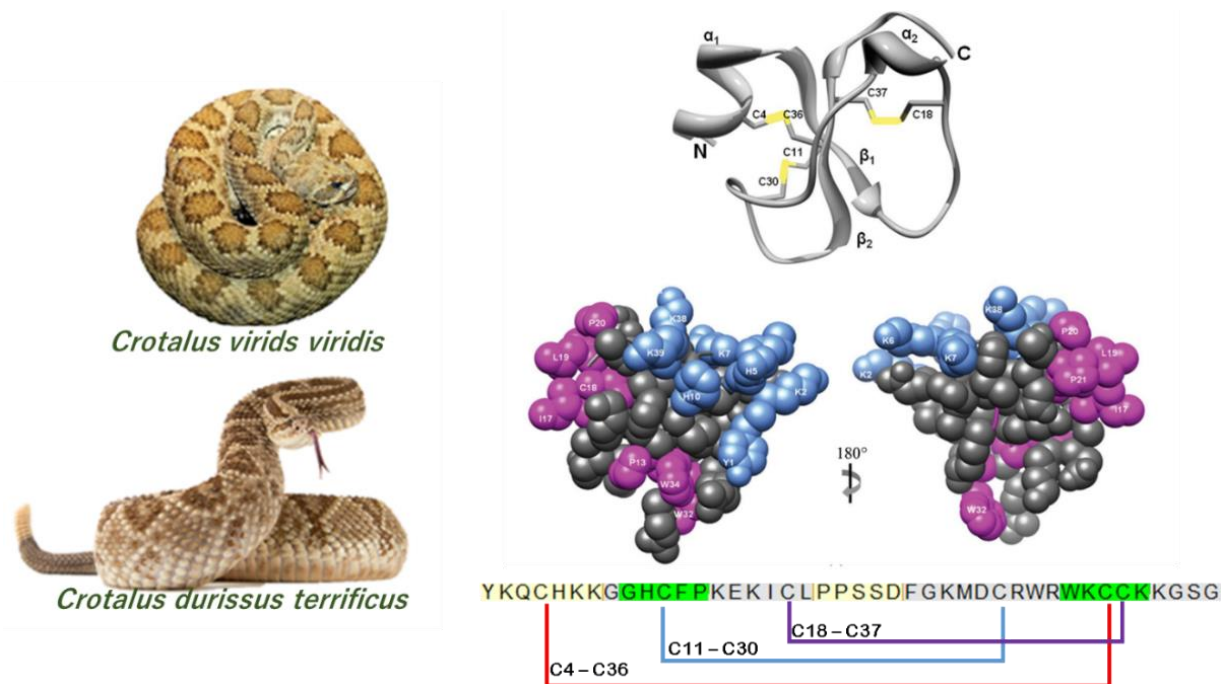
Las isoformas de crotaminas actualmente descritas dentro de venenos de diferentes especies de serpientes de cascabel presentan un porcentaje de identidad mayor o igual al 85 % (Figura 3). Dado este elevado porcentaje de identidad, se ha descrito que las crotaminas de especies de víboras sudamericanas y de especies norteamericanas generan el mismo efecto de parálisis rígida de extremidades, así como de necrosis muscular en animales experimentales (Cameron & Tu, 1978).



**Figura 3. Alineamiento de isoformas de crotamina presentes en los venenos de diferentes especies.** *C. d. terrificus* (Laure, 1975). *C. d. cascavella* (Toyama *et al.*, 2005). *C. v. viridis* (Griffin & Aird, 1990). *C. adamanteus* (Samejima *et al.*, 1991). *C. o. concolor* (Bieber *et al.*, 1987). *C. o. helleri* (Maeda & Tamiya, 1978). Secuencia parcial de *C. m. nigrescens* (Borja *et al.*, 2018).

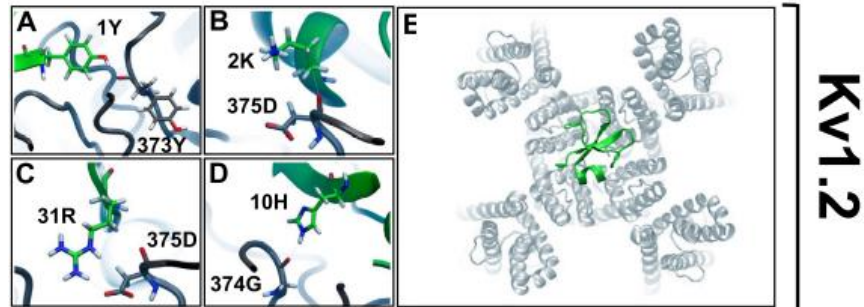
La estructura tridimensional de crotamina ha sido descrita mediante cristalización de proteínas y difracción con rayos X (Figura 4) (Coronado *et al.*, 2013). Gracias a su estructura se sabe que crotamina tiene un plegamiento típico de una  $\beta$ -defensina dado su patrón de seis cisteínas mismas que forman tres puentes disulfuro. La toxina es de tipo anfipática, esto significa que la molécula parece distribuir aminoácidos cargados positivamente en un lado y aminoácidos hidrofóbicos por el otro lado de su superficie molecular (Coronado *et al.*, 2013). Además, se ha sugerido que la crotamina es una molécula cargada positivamente (punto isoeléctrico = 9.5) lo que le confiere facilidad de interacción con membranas celulares cargadas negativamente (Coronado *et al.*, 2013; Oguiura & Ra, 2005).





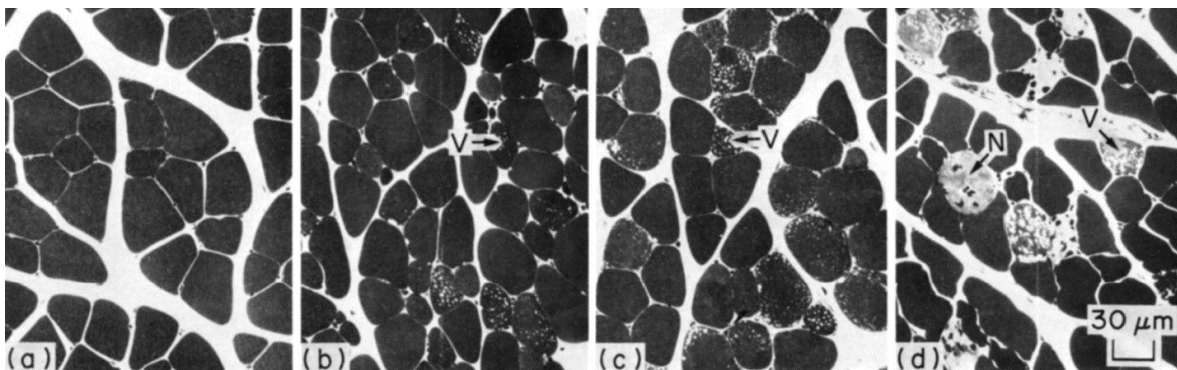
**Figura 4. Especies donde se describió por primera vez la crotamina y su estructura 3D determinada por cristalografía de rayos X. Ilustración de la secuencia primaria y el arreglo de cisteínas que forman los 3 puentes disulfuro.** Se puede observar en color azul, la distribución de los aminoácidos cargados positivamente y en morado los aminoácidos hidrofóbicos (modificado de: Coronado *et al.* 2013).

Ahora bien, en cuanto a actividades biológicas reportadas para crotamina es importante aclarar que esta toxina carece de actividad enzimática. Así, se ha reportado que crotamina puede interactuar y bloquear selectivamente ciertos canales iónicos. La literatura sugiere que esta toxina bloquea canales de potasio dependientes de voltaje, específicamente de los subtipos Kv1.1, Kv1.2 y Kv1.3 con afinidades experimentales de 369 nM, 386 nM y 287 nM, respectivamente (Peigneur *et al.*, 2012). Se sabe muy poco acerca de los aminoácidos involucrados en esta actividad de bloqueo de canal, sólo mediante modelaje de acomplamiento se han propuesto a los aminoácidos Y1, K2, H10 y R31 como posibles responsables de la interacción con el canal de potasio Kv1.2 como se muestra en la figura 5 (Yount *et al.*, 2009).



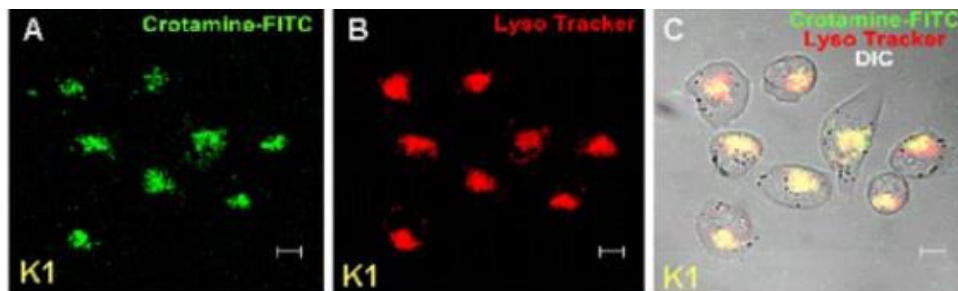
**Figura 5. Modelo de la interacción de crotamina con canal de potasio Kv1.2.** En verde se representa la toxina y en gris el canal iónico (tomado de: Yount *et al.* 2009).

Crotamina ha sido considerada miotóxica por el daño que genera en el músculo esquelético de ratón (Figura 6). Se ha descrito que el daño mio-tisular generado por crotamina consiste en la aparición de vacuolas en las células musculares generando una dilatación en el retículo sarcoplasmático y estas mismas células tienden a ser necróticas con un hinchamiento de mitocondrias y una liberación de la enzima creatin cinasa aumentando su concentración en sangre (Ownby *et al.*, 1982). Sin embargo, el mecanismo de acción de crotamina sigue sin ser comprendido y sólo se ha sugerido que esta toxina puede penetrar las membranas celulares del retículo sarcoplasmático provocando una despolarización de membrana (Mebs & Ownby, 1990).



**Figura 6. Preparaciones histológicas de músculo sartorio primario de ratón tomadas a diferentes tiempos después de la inyección intramuscular de una dosis experimental de crotamina (3 µg/g).** A) 3 h; B) C) 24 h y D) 72 h. V, células con vacuolas; N, células amorfas consideradas necrosadas (tomado de: Ownby *et al.* 1982).

Otra actividad que se le ha atribuído a crotamina es la de internalización celular (Figura 7). Esta actividad ha sido ampliamente estudiada dada su aplicación terapéutica y se ha propuesto que crotamina es capaz de interactuar con receptores heparan sulfato proteoglicanos de algunos tipos celulares y promover su endocitosis (Nascimento *et al.*, 2007). Dentro de la célula y durante el proceso de fagocitosis, crotamina es capaz de escapar de lisosomas y promover la liberación de enzimas tipo catepsinas en el citoplasma, lo cual activa a moléculas de señalización involucradas en procesos de muerte celular como lo son las caspasas (Hayashi, 2017; Nascimento *et al.*, 2007). Otra actividad decrita para crotamina es su capacidad de penetrar la barrera hematoencefálica y ocasionar estrés oxidativo en el cerebro (Boni-mitake *et al.*, 2006; Gonçalves *et al.*, 2014; Hayashi *et al.*, 2008).



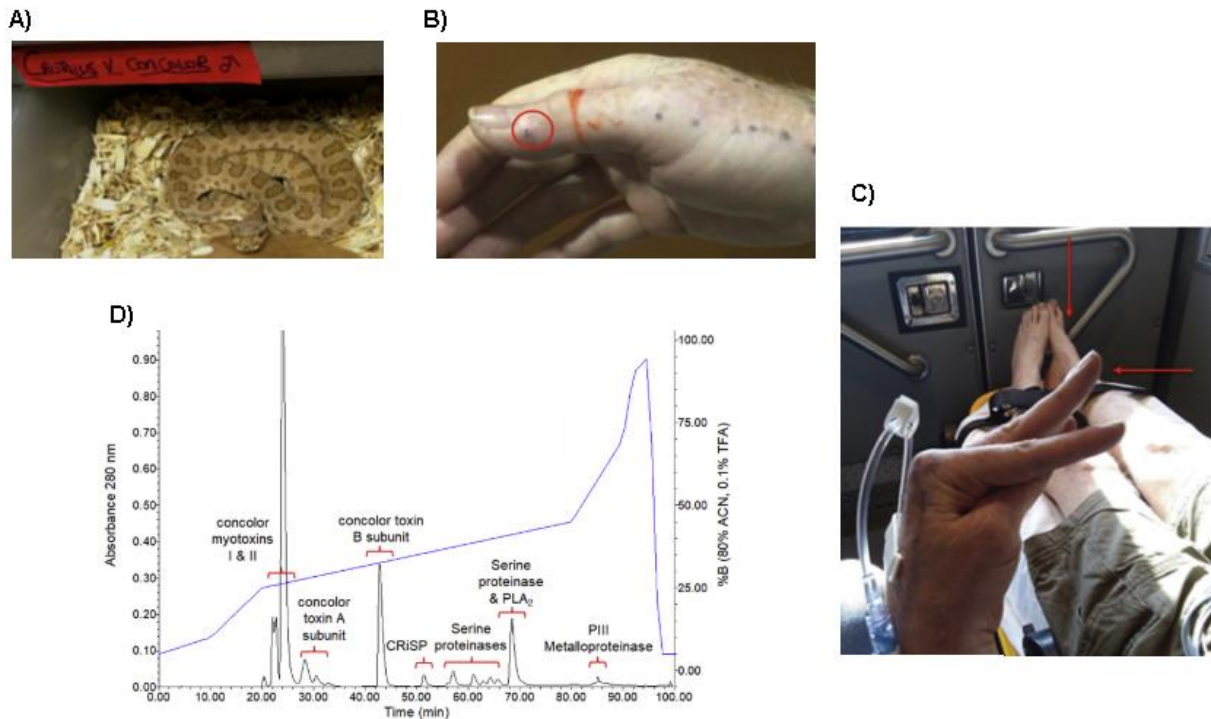
**Figura 7. Microscopía de fluorescencia que muestra la internalización de crotamina por células CHO.** A) Señal detectada de crotamina unida al fluoróforo FITC. B) Señal de marcador de lisosomas LysoTracker. C) Señal de sobrelape entre ambos marcadores (tomado de: Nascimento *et al.*, 2007).

Sin duda la actividad más conocida para crotamina tiene que ver con una generación de espasmos musculares tras su administración en ratones de laboratorio. Este síntoma ha recibido diferentes nombres como parálisis espástica, parálisis rígida o parálisis tipo tetánica y se ha descrito que su grado de severidad depende de la dosis administrada (Lima *et al.*, 2018). Este síntoma genera una imposibilidad de desplazamiento del roedor por la presencia de parálisis, principalmente en las patas posteriores, misma que puede durar minutos y ser reversible si la dosis es baja, o si la dosis es muy cercana a la dosis letal media (DL<sub>50</sub>), dicha parálisis puede generar la muerte del ratón (Lima *et al.*, 2018). Es por este motivo que la crotamina purificada de diferentes especies han sido reportadas como letales en ratones (Tabla 2).

**Tabla 2. Dosis letal media en ratones (DL<sub>50</sub>) de la crotamina purificada del veneno de diferentes especies de serpiente de cascabel.**

Especie de serpiente	País de la serpiente en estudio	Vía de administración	DL <sub>50</sub> (µg/g ratón)	Referencia
<i>C. d. terrificus</i>	Argentina	Intraperitoneal	6	Boni-Mitake <i>et al.</i> , 2001
<i>C. d. terrificus</i>	Argentina	Intravenosa	1.5	Brazil <i>et al.</i> , 1979
<i>C. adamanteus</i>	E.E.U.U.	Subcutánea	0.9	Mebis <i>et al.</i> , 1983
<i>C. horridus</i>	E.E.U.U.	Subcutánea	0.86	Mebis <i>et al.</i> , 1983
<i>C. v. viridis</i>	E.E.U.U.	Intravenosa	4	Ownby <i>et al.</i> , 1985
<i>C. m. nigrescens</i>	México	Intravenosa	2.2	Borja <i>et al.</i> , 2018

Todo lo referente a la toxicidad de crotamina y sus actividades biológicas descritas tiene grandes implicaciones clínicas en pacientes mordidos por una víbora de cascabel, por lo tanto, es de suma importancia garantizar que los antivenenos actuales neutralicen a esta toxina. Extrapolado en humanos, se ha reportado que intoxicaciones ocasionadas por dos especies de serpiente de importancia clínica en la región sur de E.E.U.U. y con crotamina en sus venenos (*C. oreganus helleri* y *C. scutulatus*), generan síntomas inmediatos de fasciculaciones musculares en extremidades y en la región facial (Bush *et al.*, 2002; Vohra *et al.*, 2008). Asimismo, existe evidencia que soporta que estos síntomas pueden ser graves si el porcentaje de crotamina en el veneno es muy alto. Tal es el caso de la especie *C. o. concolor* que presenta un 60 % de crotamina en su veneno, porcentaje que fue determinado tras el análisis del veneno de una serpiente de esta especie involucrada en un accidente ofídico (Keyler *et al.*, 2020). La intoxicación por esta serpiente provocó en el paciente dificultad para respirar y la aparición periódica de espasmos musculares tipo tetánicos caracterizados por extensiones involuntarias de las extremidades como se muestra en la figura 8 (Keyler *et al.*, 2020).



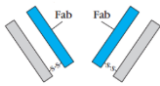
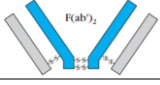
**Figura 8. Estudio de un caso de intoxicación por serpiente de cascabel con alto contenido de crotoamina.** A) Ejemplar de *C. o. concolor* involucrado en el accidente ofídico. B) Sitio de mordedura. C) Paciente presentando espasmos musculares tipo tetánicos en 30 min después de la mordedura. D) Cromatograma de HPLC en fase reversa del veneno completo del ejemplar involucrado la intoxicación, en el cual se observa un pico abundante de miotoxinas (crotoamina) entre otros componentes (tomado de: Keyler *et al.*, 2020).

## 2.5 Antivenenos antiviperinos producidos en E.E.U.U. y México

Hasta la fecha el único tratamiento farmacológico para tratar el envenenamiento por mordedura de serpiente es el uso de antivenenos. Estos productos tienen como moléculas activas a anticuerpos (principalmente IgGs) que produce un animal que es hiperinmunizado con venenos de serpientes consideradas de importancia médica en cierto país o región. El mecanismo de acción de un antiveneno se basa en la interacción molecular de anticuerpos, en determinado formato, con las toxinas de un veneno deteniendo sus efectos tóxicos y promoviendo su eliminación, de tal manera que un antiveneno no revierte el daño ya generado por estas toxinas, pero sí impide que el envenenamiento siga progresando (León *et al.*, 2011).

Siendo la región de América con mayor diversidad de víboras de cascabel, los antivenenos de Norteamérica deben ser de gran eficacia para el tratamiento de intoxicaciones por estas serpientes venenosas. México y E.E.U.U. cuentan con dos antivenenos aprobados para uso humano en cada país (Cocchio *et al.*, 2020). En la tabla 3 se muestran las características de los antivenenos disponibles en estos países.

**Tabla 3. Listado de antivenenos antiviperinos de uso humano en E.E.U.U. y México**

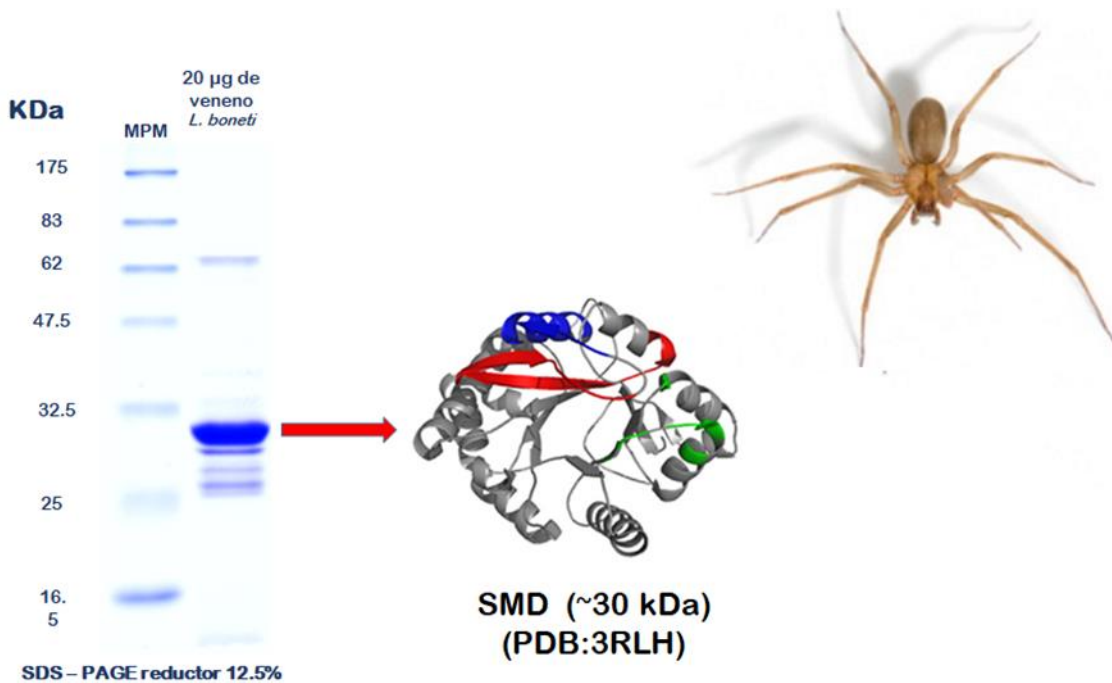
Producto	Empresa	País	Inmunógeno	Animal inmunizado	Formato de anticuerpos del producto
<b>CROFab®</b>	BTG	E.E.U.U.	- <i>C. atrox</i> - <i>C. adamanteus</i> - <i>C. scutulatus</i> - <i>Agkistrodon piscivorus</i>	Oveja	Fab 
<b>ANAVIP®</b>	RDT Silanes Instituto Bioclon	E.E.U.U.	- <i>C. simus</i> - <i>Bothrops asper</i>	Caballo	F(ab') <sub>2</sub> 
<b>Antivipmyn®</b>	Instituto Bioclon	México	- <i>C. simus</i> - <i>Bothrops asper</i>	“ ”	“ ”
<b>Faboterápico polivalente antiviperino®</b>	BIRMEX S.A.	México	- <i>C. basiliscus</i> - <i>B. asper</i>	“ ”	“ ”

## 2.6 Uso de adyuvantes en la producción de antivenenos

En la producción de antivenenos es común el empleo de adyuvantes en los esquemas de inmunización. Estos son soluciones que potencian la generación de anticuerpos hacia un inmunógeno en particular. Dentro de los adyuvantes más usados en la producción de antivenenos destacan los adyuvantes completo e incompleto de Freund y las sales de aluminio como hidróxidos o fosfatos de aluminio. Los primeros dos están compuestos de aceite mineral, un emulsificador y células inactivadas de *Mycobacterium tuberculosis*, las cuales sólo se encuentran en el caso del adyuvante completo de Freund (WHO, 2017). Estos adyuvantes presentan diferentes mecanismos de acción que incluyen: formación de depósitos del inmunógeno para su lenta liberación; contribución en la fagocitosis del inmunógeno por células procesadoras de antígeno; estimulación de activación celular y síntesis de citosinas (Lambrecht *et al.*, 2009). Sin embargo, se ha sugerido que en el área de producción de antivenenos es necesario la evaluación de nuevos adyuvantes para mejorar la producción de anticuerpos principalmente hacia toxinas de bajo peso molecular. Por ejemplo, se ha sugerido que adyuvantes sintéticos basados en ligandos de receptores tipo Toll like del tipo 4 (TLR4), podrían ser de gran ayuda para la mejora de antivenenos (Reed *et al.*, 2016). Por lo tanto, en la presente investigación se busca evaluar la capacidad adyuvante de la enzima esfingomielinasa D presente en el veneno de la araña violinista.

## 2.7 Esfingomielinasa D de la araña violinista (*Loxosceles spp.*)

La esfingomielinasa D (SMD) es una fosfolipasa de la familia de las fosfodiesterasas presente en el veneno de la araña violinista (género *Loxosceles*). Esta enzima está compuesta por 279 residuos de aminoácidos (PM: ~ 30 kDa) y se ha resuelto su estructura tridimensional por cristalografía de rayos X (Figura 9) (Oliveira *et al.*, 2011). Esta enzima es el principal componente letal y necrotizante del veneno de la araña violinista y se ha propuesto que la fisiopatología por mordedura de esta araña inicia por un proceso inflamatorio agudo, el cual es debido a la actividad hidrolítica de la enzima SMD sobre esfingomielina de la membrana celular generando fosfoceramida, la cual está asociada a un reclutamiento masivo de neutrófilos y a la secreción de citosinas pro-inflamatorias (Rivera *et al.*, 2015).



**Figura 9. Esfingomielinasa D del veneno de *Loxosceles sp.*** Se muestra el perfil electroforético del veneno de *L. boneti* en el que el componente mayoritario corresponde a la SMD.



### 3. Antecedentes

#### 3.1 Venenos con crotamina

En la tabla 4 se muestran las especies de serpiente de cascabel con crotamina reportada en sus venenos. Como se puede observar, existe un alto grado de variación en la proporción en la que esta toxina se encuentra, misma que es dependiente de la edad de la serpiente. Es importante aclarar que el número de especies de serpiente de cascabel con crotamina reportado para México puede aumentar. Lo anterior debido a que aún hace falta mucha investigación referente a estudios bioquímicos de venenos de serpientes mexicanas.

Tabla 4. Especies de víbora de cascabel que contienen crotamina en sus venenos hasta la fecha reportadas.

Espece	Distribución	Porcentaje	Referencia
<i>C. durissus terrificus</i>	Brasil y Argentina	19	Calvete <i>et al.</i> , 2010
<i>C. d. cumanensis</i>	Venezuela	13.1	Calvete <i>et al.</i> , 2010
<i>C. d. durissus</i>	Guyana Francesa	18	Calvete <i>et al.</i> , 2010
<i>C. tzabcan</i>	México	18 a 38	Durban <i>et al.</i> , 2017
<i>C. culminatus</i>	México	6 a 11	Durban <i>et al.</i> , 2017
<i>C. m. nigrescens</i>	México	0 a 53	Borja <i>et al.</i> , 2018
<i>C. v. viridis</i>	México y E.E.U.U.	5 a 38	Saviola <i>et al.</i> , 2015
<i>C. o. helleri</i>	México y E.E.U.U.	49 a 62	Smith & Mackessy, 2016
<i>C. o. concolor</i>	E.E.U.U.	60	Keyler <i>et al.</i> , 2020
<i>C. scutulatus</i>	México y E.E.U.U.	5 a 35	Massey <i>et al.</i> , 2012
<i>C. adamanteus</i>	E.E.U.U.	22	Margres <i>et al.</i> , 2014
<i>C. basiliscus</i>	México	0 a 30	Datos no publicados
<i>C. totonacus</i>	México	0 a 50	Datos no publicados

### 3.2 Estudios de neutralización de crotamina

Existen pocos trabajos reportados en la literatura donde se compruebe la neutralización de crotamina por antivenenos. Sólo son destacables las investigaciones realizadas por Charlotte Ownby quien demostró que la necrosis muscular generada por crotamina del veneno de *C. viridis viridis* era bien neutralizada por sueros experimentales de conejos inmunizados con la crotamina de este veneno (Ownby *et al.*, 1984, 1983, 1979). Además, estos mismos anticuerpos presentaban inmunoreactividad hacia crotaminas de venenos de otras especies como *C. adamanteus* y *C. d. terrificus* (Li *et al.*, 1993). Sin embargo, no se reportó si estos anticuerpos eran capaces de neutralizar la parálisis espástica generada por crotamina.

Recientemente, se ha comprobado que la inmunización de caballos con mezclas de veneno de la especie *C. d. terrificus*, con una proporción aproximada de crotamina de 20 % en su veneno, genera anticuerpos que reconocen crotamina. Sin embargo, en este reporte tampoco se evaluó si, además del reconocimiento, estos anticuerpos tenían la capacidad de neutralizar la parálisis provocada por esta toxina (Teixeira-Araújo *et al.*, 2017).

En E.E.U.U. se ha comprobado que uno de sus antivenenos más usados (CROFab®) presenta reconocimiento por western-blot hacia la crotamina de *C. viridis* lo cual podría indicar una posible neutralización hacia esta toxina (Saviola *et al.*, 2015). En contraste, se ha comprobado que los dos antivenenos disponibles en México para uso humano no reconocen a crotamina del veneno de *C. m. nigrescenes* via western-blot y tampoco la neutralizan (Borja *et al.*, 2018).

Con el objetivo de neutralizar el síntoma de parálisis espástica generado por crotamina, en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón se han generado conjugados proteicos de crotamina acoplada a los componentes del veneno de *C. d. terrificus*, utilizando como entrecruzador glutaraldehído, para su uso en la inmunización de conejos. Los resultados obtenidos sugieren que el efecto de parálisis no es neutralizable en ratones aun con anticuerpos que reconocen a crotamina por ELISA y western-blot (Castillo, 2019).

### 3.3 Expresión heteróloga de SMD y crotamina

Con respecto a la expresión heteróloga de crotamina, en la literatura destaca un trabajo sobre la generación de la crotamina recombinante del veneno de *C. d. terrificus*, dicha expresión se llevó a cabo en *Escherichia coli* BL21. En este trabajo se emplearon proteínas de fácil expresión en bacterias como la proteína de unión a maltosa (MBP, por sus siglas en inglés) en la región N terminal para lograr la expresión de la toxina en formato de proteína de fusión con una región permisiva de proteólisis TEVrs (Trang *et al.*, 2014). El rendimiento final de crotamina fue de 0.9 mg/L de cultivo y se describió que la proteína purificada presentaba actividad de bloqueo hacia el canal Kv 1.3 con afinidad de 67.2 nM (Trang *et al.*, 2014). Sin embargo, en dicho trabajo no se evaluó el uso de la crotamina recombinante como inmunógeno para generar anticuerpos.

Por otro lado, la SMD ha sido expresada de manera soluble en el modelo *E. coli* BL21 (~ 5 mg/L de cultivo) comprobándose que la proteína recombinante (SMDr) presenta actividad enzimática y es letal en ratones como lo hace la proteína purificada del veneno. Asimismo, esta enzima recombinante genera títulos de anticuerpos altos en conejos y caballos hiperinmunizados con esta toxina (Olvera *et al.*, 2006).

### 3.4 Aumento de inmunogenicidad de toxinas en venenos

El aumento de la inmunogenicidad de algunas toxinas de bajo peso molecular se ha estudiado en venenos de alacranes. Así, se ha reportado que proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* compuestas de las toxinas AaHI, AaHII y AaHIII del escorpión *Androctonus australis*, y fusionadas a la proteína MBP, pueden ser usadas como inmunógenos para generar anticuerpos neutralizantes, en el modelo de conejo, contra el veneno completo de este alacrán (Legros *et al.*, 2001). Por otro lado, con la finalidad de estimular la respuesta inmune hacia la toxina Cn2 de la especie *Centuroides noxius*, se han propuesto métodos de direccionamiento de antígenos hacia células dendríticas de ratón utilizando como acarreador un anticuerpo monoclonal específico de la integrina CD11c. Con esta estrategia, aplicada en la inmunización de ratones, se observó un aumento de títulos de anticuerpos hacia la toxina Cn2 con valores de 1:6,000 en 7 días

de inmunización y con potencias neutralizantes comparables con los métodos convencionales de inmunización de 90 días con veneno completo de este alacrán (Espino-Solis *et al.*, 2009).

En cuanto a crotamina, en el laboratorio se ha descrito que conjugados químicos de esta toxina con albúmina sérica bovina (BSA), usados como inmunógeno en ratones, generan mayor valor de título de anticuerpos hacia crotamina que la inmunización con la toxina sola, pero en dicha investigación no fue evaluado si estos anticuerpos eran capaces de neutralizar el síntoma de parálisis generado por crotamina en ratones (Losoya, 2019).

Por otro lado, un estudio previo caracterizó la actividad adyuvante para la SDM de la araña *Loxosceles gaucho*, en el cual se demuestra un aumento en títulos de anticuerpos de conejos inmunizados con tres proteínas usadas como inmunógenos (ovoalbúmina, proteína ovomucoide y globulina bovina gama). Este efecto adyuvante se asoció a la fuerte reacción inflamatoria causada por la SMD (Barbaro *et al.*, 1994). Sin embargo, no existen en la literatura más trabajos que hayan dado seguimiento a la aplicación de la SMD como adyuvante en la generación de anticuerpos contra otros inmunógenos.

#### 4. Justificación

La caracterización bioquímica de venenos de víbora de cascabel mexicanas ha demostrado que algunas serpientes pueden expresar un alto contenido de crotamina. Esta es una situación de alto riesgo en los tratamientos clínicos sobretodo considerando que los antivenenos mexicanos presentan nula capacidad neutralizante contra esta toxina.

Por tal motivo, es necesario estudiar las propiedades inmunogénicas de crotamina o la generación y evaluación de nuevos inmunógenos recombinantes para lograr la generación de anticuerpos neutralizantes de crotamina.

#### 5. Hipótesis

El uso de la proteína recombinante de fusión SMD-crotamina y/o de venenos completos ricos en crotamina como inmunógenos generará anticuerpos neutralizantes contra crotamina en conejos hiperinmunizados.

#### 6. Objetivo general

Evaluar el uso de la proteína de fusión SMD-crotamina y venenos ricos en crotamina como inmunógenos para la generación de anticuerpos neutralizantes contra crotamina.

#### 7. Objetivos particulares

- ✓ Obtener secuencias nucleótídicas codificantes de crotamina
- ✓ Clonar y expresar una proteína de fusión entre crotamina de *C. m. nigrescens* y SMD de *Loxosceles reclusa* en el modelo de expresión *E. coli*.
- ✓ Determinar la toxicidad de la proteína de fusión SMD-crotamina en ratones CD-1.
- ✓ Generar anticuerpos policlonales con la proteína SMD-crotamina y dos venenos ricos en crotamina (*Crotalus oreganus helleri* y *Crotalus molossus nigrescens*) mediante la hiperinmunización de conejos.
- ✓ Evaluar la capacidad neutralizante de los anticuerpos generados contra la parálisis provocada por crotamina en ratones.

## 8. Estrategia experimental

En la figura 10 se muestra la estrategia experimental seguida para el cumplimiento de los objetivos de la presente investigación.

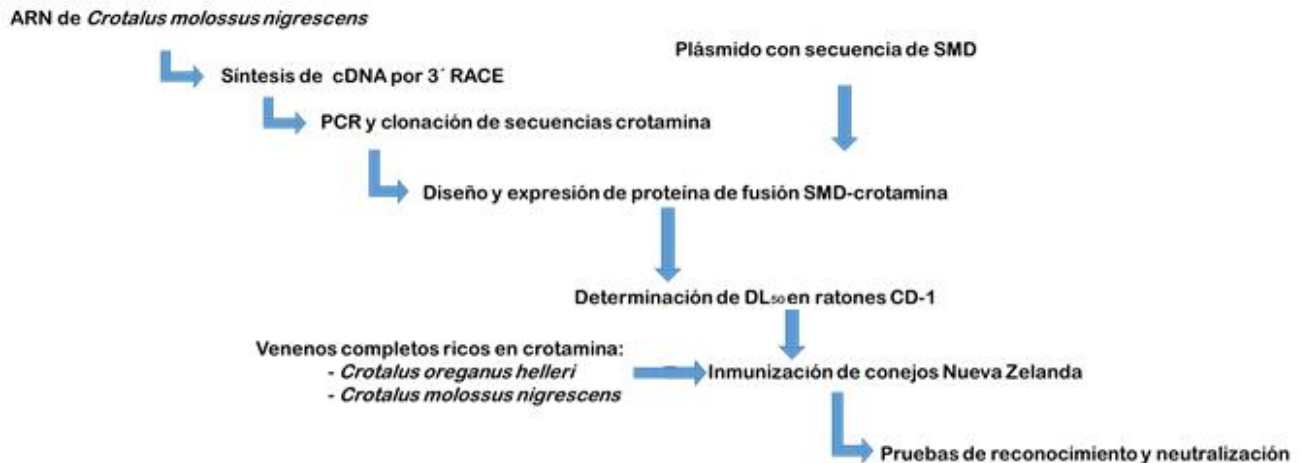


Figura 10. Estrategia experimental de la presente tesis.

## 9. Materiales y métodos

### 9.1 Animales de laboratorio

En la presente investigación se utilizaron ratones CD-1, sexo indistinto con pesos entre 18 y 20 g, alimentados con pellets proteicos *ad libitum* en un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad. Asimismo, se usaron conejos de la cepa Nueva Zelanda hembras con peso de 3 Kg y mantenidos en un mismo fotoperiodo. Todos los animales fueron adquiridos del bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM y el proyecto fue aprobado por el comité de bioética del IBt con clave de registro 319.

### 9.2 Venenos y toxinas empleadas en este estudio

Venenos de ocho especies de serpiente de cascabel fueron empleados en la presente tesis. Los venenos de *C. d. terrificus* y *C. o. helleri* fueron donados por la Dra. Elda Sánchez del National Natural Toxins Research Center con sede en Estados Unidos. Por otro lado, el veneno de *C. m. nigrescens* perteneció a un individuo estudiado previamente

(ID: CM04) (Borja *et al.*, 2018) y fue donado por el Dr. Miguel Borja de la Universidad Autónoma del Estado de Durango. El resto de los venenos pertenecían a muestras disponibles en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano: *C. simus* (ID: pool simus) y *C. atrox* (ID: IBT270712). Asimismo, se contaba con una muestra de crotamina purificada por HPLC en fase reversa (RP-HPLC) del veneno de *C. m. nigrescens* (fracción 8) (Borja *et al.*, 2018). También se contaba con esfingomielinasa D recombinante (SMDr) de la especie *L. reclusa* expresada en *E. coli* bajo métodos estandarizados en el laboratorio (Olvera *et al.*, 2006).

### **9.3 Cuantificación de proteínas**

Las muestras de veneno o toxinas fueron disueltas en PBS (NaCl 0.14 M, KCl 3 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.7 mM, pH 7.2). Después, se procedió a realizar una medición de Absorbancia a 280 nm a las muestras resuspendidas para su cuantificación. Las proteínas de origen recombinante (descritas posteriormente), también fueron cuantificadas con este método por no contar con el valor de su coeficiente de extinción molar. Para la interpretación del resultado se asumió que una unidad de absorbancia es equivalente a 1 mg/mL en una cubeta de luz UV de 1 cm de longitud, a excepción de los anticuerpos purificados en los cuales se asumió que 1.4 unidades de Abs<sub>280 nm</sub> eran equivalentes a 1 mg/mL de proteína.

### **9.4 Calidad de ARN de glándulas del veneno de un individuo de *C. m. nigrescens***

En el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón se contaba con una muestra de ARN, almacenada a -70°C, obtenida de la glándula del veneno de un individuo de la especie *C. m. nigrescens* con número de identificación CM16 y cuyo veneno fue caracterizado en la investigación realizada por Borja *et al.* (2018). Se corroboró la calidad de dicha muestra de ARN analizando 9 µL de la muestra más 1 µL de buffer de carga (0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilen cianol, 0.25% ficoll 400) en un gel de agarosa al 1 % en

amortiguador TAE (40 mM Tris-HCl, 20 mM ácido acético glacial, 1 mM EDTA pH 8 y 1 µg/mL de bromuro de etidio) bajo voltaje constante de 100 V.

### 9.5 Síntesis de ADNc

Verificada la calidad de la muestra de ARN, se procedió a realizar una reacción de 3´ RACE (Rapid Amplification of cDNA ends) utilizando el kit 1st strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (AMV) de Roche®. Dicha técnica se basa en una reacción llevada por la enzima por la enzima Transcriptasa Reversa, que hace uso de la modificación postranscripcional de poli-adenilación en el extremo 3´ que presentan los ARN mensajeros de la mayoría de los eucariontes, para sintetizar una hebra sencilla de ADN complementario (ADNc). La reacción se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del kit comercial utilizando el oligonucleótido adaptador primer (AP) que tiene una porción de timinas más una secuencia adaptadora. Las temperaturas consecutivas en un solo ciclo de la reacción fueron las siguientes:

10 min-----25°C

60 min-----42°C

5 min-----99°C

∞ ----- 4°C

### 9.6 Amplificación por PCR de secuencias de crotamina

Utilizando la base de datos de secuencias nucleotídicas de NCBI se buscaron las secuencias reportadas para crotamina (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>), con la finalidad de identificar el grado de conservación de la secuencia péptido señal de esta toxina. Posteriormente, se sintetizó un oligonucleótido en la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Tabla 5). Este oligonucleótido estaba dirigido hacia el inicio de la secuencia péptido señal de crotamina (Oligo Fw IPS).



**Tabla 5. Oligonucleótido de crotamina hacia el inicio péptido señal (IPS).**

Clave	Secuencia
<b>CroIPS</b>	<i>5' TGA AGA TCC TTT ATC TGC TGT TC 3'</i>

Posteriormente, se realizaron reacciones de PCR punto final utilizando como oligonucleótido directo (Fw) el específico hacia el péptido señal de crotamina (croIPS) y un oligonucleótido Reverso (Rev) AUAP que carece de cola de politimidinas y es complementario a la secuencia adaptadora del primer AP incorporada previamente en la síntesis de ADNc. Las condiciones de reacción de PCR para la obtención de secuencias de ADNc doble cadena de crotamina fueron las siguientes:

Buffer PCR 10x (+Mg <sup>+2</sup> ) -----	5 µL	6 min-----	94°C	} 30 ciclos
dNTP´s 2.5mM-----	4 µL	1 min-----	94°C	
Oligo IPS 20 pmolas / µL-----	1 µL	1 min-----	55°C	
Oligo AUAP 20 pmolas / µL---	1 µL	1 min-----	72°C	
ADNc-----	2 µL	10 min-----	72°C	
Taq polimerasa-----	1 µL	∞-----	4°C	
Agua tetradestilada-----	36 µL			
Total: 50 µL				

Finalmente, los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 1 % en buffer TAE, corriendo 9 µL de la muestra mezclado con 1µL de buffer de carga, utilizando los marcadores moleculares DNA ladder de New England Biolabs® como referencia. Las bandas fueron purificadas utilizando el kit High Pure PCR purification de Roche® y las muestras fueron almacenadas a - 20 °C hasta su uso.

## 9.7 Clonación de secuencias de crotamina

Con la finalidad de identificar las posibles isoformas de secuencias pertenecientes a crotamina, el producto de PCR obtenido con el oligonucleótido Fw IPS fue clonado. Dicho procedimiento se realizó utilizando el vector comercial pJET1.2/Blunt siguiendo las instrucciones del kit de Jet PCR Cloning kit de Thermo Fisher Scientific®. Con este vector se transformaron, por la técnica de electroporación, células electrocompetentes MC1061 de *E. coli*. Primero se eliminaron las sales del producto de ligación con 0.5 mL de N-butanol y se centrifugó la muestra por 3 min a 13,000 rpm, se decantó el N-butanol y se agregaron 0.5 mL de etanol 100% para volver a centrifugar bajo las mismas condiciones. El etanol fue decantado y se resuspendió la muestra con 0.5 mL de etanol 70 %, enseguida se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min, el etanol fue decantado y la muestra de DNA fue colocada a 37°C por 30 min con la finalidad de evaporar el alcohol restante. La muestra fue resuspendida en 5 µL de agua tetradestilada estéril. Se descongelaron 100 µL de células electrocompetentes MC1061 de *E. coli* y se mezclaron con la muestra de plásmido y enseguida se les dio un pulso eléctrico de 1.8 volts en una celda de 0.1 mL. Las células fueron recuperadas con medio 1 mL de medio rico SOC e incubadas a 37 °C por 1 h con agitación de 200 rpm. Cien µL de las células transformadas fueron esparcidas sobre placas de petri con medio sólido Luria Bertani (LB) + ampicilina (80 µg/mL) e incubadas a 37°C por 16 h.

## 9.8 Análisis de colonias por PCR y obtención de plásmido

Posteriormente, se aislaron colonias en 10 µL de agua destilada estéril y 1 µL de cada colonia fue utilizado como templado para realizar PCR de colonias bajo las condiciones descritas anteriormente. El resto de volumen de cada colonia aislada, con resultado positivo en la PCR, fueron puestas a crecer en 3 mL de medio líquido LB + ampicilina (80 µg/mL) toda la noche a 37°C en agitación constante de 200 rpm. Finalmente, los plásmidos de cada colonia fueron purificados por el kit High plasmid isolation kit de Roche®, mismos que se mandaron a secuenciar con el oligonucleótido universal Fw T7 en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las secuencias

obtenidas fueron analizadas con el software Gene construction kit® y fueron comparadas con la secuencia parcial de una isoforma previamente identificada en el veneno de *C. m. nigrescens* (Borja *et al.*, 2018).

### 9.9 Incorporación de sitios de restricción a secuencia de SMD para su subclonación en el vector TOPO 2.1

Los oligonucleótidos diseñados para la incorporación de sitios de restricción, mediante PCR, en la SMD se muestran en la tabla 6. En el laboratorio se contaba con una construcción de la secuencia codificante para la isoforma 1 de SMD de *L. reclusa* (Olvera *et al.*, 2006). Sin embargo, ésta presentaba codón de paro por lo que se editó la secuencia con una amplificación en PCR usando 1 µL de plásmido pQE30 que contenía a la isoforma 1 de SMD de *Loxosceles reclusa* y los oligonucleótidos SMDfwBamH1-NH3 y SMDRevSal1-COO, este último sin codón de paro.

El producto PCR fue clonado en el vector TOPO 2.1 2.1 (Invitrogen®) siguiendo las instrucciones del proveedor. Posteriormente, se transformaron bacterias quimiocompetentes de *E. coli* XL-1Blue. Primero, se mezclaron 100 µL de estas células con el plásmido TOPO 2.1 ligado con el producto de PCR para dejar incubar por 30 min en hielo. Posteriormente, se dio un choque térmico a 42 °C por 30 s y se incubaron las bacterias a 4°C por 5 min. Enseguida se adicionaron 200 µL de medio rico SOC y la muestra se dejó incubando por 1 h a 37°C. Bajo condiciones estériles, se virtieron 200 µL de solución XGal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) (15 mg/mL en DMSO) y 40 µL de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) 0.1 mM en una placa de medio sólido LB con ampicilina (80 µg/mL). Las bacterias transformadas fueron sembradas en esta placa para su incubación a 37°C por 16 h. Finalmente, se seleccionaron colonias para ser analizadas por PCR.

**Tabla 6. Oligonucleótidos para agregar sitios de restricción a secuencia de SMD.**

Clave de oligonucleótido	Secuencia
<b>SMDfwBamH1-NH3</b>	5' GGA TCC GCG AAC AAA CGC CCG GCG TG 3' BamHI
<b>SMDRevSal1-COO</b>	5' GTC GAC ATT CTT GAA TGT TTC CCA AGG ATT G 3' Sal I

## 9.10 Incorporación de sitios de restricción a secuencia de crotamina para su subclonación en el vector TOPO 2.1

Para el caso de crotamina se realizaron dos reacciones de PCR por separado para agregar los sitios de restricción Sal I en el lado 5' de la secuencia y HindIII ó Pst I en la región 3' de la secuencia madura de crotamina, y así retirar la región correspondiente al péptido señal. Como templado se usó 1µL de plásmido PJET que contenía el gen de crotamina, previamente clonado, y todas las reacciones se realizaron bajo las condiciones anteriormente descritas, pero variando los oligonucleótidos empleados (Tabla 7). La primera reacción PCR se realizó usando los oligos CROFwSalINH3 como oligo Fw y CroREvHindIIIGISI como Rev. En la segunda reacción de PCR se deseaba agregar una secuencia codificante para un linker de glicinas (GGGGS) en el lado 5' de la secuencia de crotamina, para lo cual se realizó la PCR con los oligonucleótidos CROFwSalllinker como Fw y CRORevPstI como oligonucleótido Rev. Los dos productos de PCR corridos en gel de agarosa 1 % preparativo fueron purificados y se procedió a su clonación en el plásmido TOPO 2.1 para transformar bacterias de *E. coli* XL-1 Blue, bajo las condiciones anteriormente descritas, y se realizó PCR de las colonias aisladas para confirmar presencia de inserto.

Tabla 7. Oligonucleótidos de edición de secuencias para agregar sitios de restricción a secuencia de crotamina.

Clave de oligonucleótido	Secuencia
CROFwSalINH3	5' GTC GAC TAT AAA CGG TGT CTT AAG AAA GG 3' Sal I
CROFwSalllinker	5' GTC GAC GGC GGC GGC GGC TCC TAT AAA CGG TGT CTT AAG AAA GG 3' Sal I
CRORevHindIIIGISI	5' AAG CTT TTA GAT GGA GAT GCC ATT ATT TAC AC 3' Hind III
CRORevPstI	5' CTG CAG TTA GAT GGA GAT GSC ATT ATT TAC AC 3' Pst I

### 9.11 Cortes con enzimas de restricción sobre construcción en TOPO 2.1 de SMD y crotamina

Confirmada la presencia del inserto por PCR, tanto de SMD como de crotamina, se procedió a realizar cultivos bacterianos de cada colonia en matraces con 50 mL de medio LB + ampicilina (80 µg/mL) por 16 h a 37°C con agitación constante a 200 rpm. Las bacterias crecidas fueron centrifugadas a 9,000 rpm por 15 min a 4°C, y el pellet fue resuspendido para purificar plásmido con el kit High pure Midiprep plasmid de Biorad® bajo las instrucciones del proveedor. Posteriormente, con el plásmido purificado y con la finalidad de liberar el inserto con extremos cohesivos, se realizaron digestiones enzimáticas con endonucleasas de restricción comerciales sobre las construcciones de TOPO 2.1 de la SMD y crotamina. Primero para el plásmido TOPO 2.1 con crotamina se realizaron los cortes bajo las siguientes condiciones:

Plásmido TOPO 2.1 con crotamina (50 ng/µL)-----	21 µL
Buffer NEB® 3.1-----	2.5 µL
Enzima Sal I NEB®-----	0.5 µL
Enzima Hind III ó PstI NEB®-----	1 µL
Total:	25 µL

Incubación: 37°C toda la noche

En el caso de la construcción de SMD en el vector TOPO 2.1, se procedió a realizar los cortes en las siguientes condiciones:

Plásmido TOPO 2.1 con SMD (50 ng/µL)-----	21.5 µL
Buffer NEB® 3.1-----	2.5 µL
Enzima BamHI NEB®-----	0.5 µL
Enzima Sal I NEB®-----	0.5 µL
Total:	25 µL

Incubación: 37°C toda la noche

Los insertos liberados de cada reacción de endorestricción fueron purificados por el corte de banda en un gel de Agarosa 1% usando el kit High Pure PCR purification de Roche® y las muestras se mantuvieron a -20°C hasta su posterior uso.

### 9.12 Ligación del gen de crotamina y SMD en el vector de expresión pQE30

La estrategia que se siguió para poder generar una fusión de secuencias nucleotídicas codificantes de SMD y crotamina, *in tandem*, en el vector de expresión pQE30 (QUIAGEN®) se basó en la ligación de secuencias con sitio de restricción compartido y se muestra en la figura 11. En primer lugar, el vector pQE30 permite la expresión de proteínas en el citoplasma bacteriano y agrega una cola de 6 Histidinas en el extremo NH<sub>2</sub> terminal misma que es utilizada para su purificación. Así, para la construcción del vector de expresión, primero se realizó una ligación entre insertos con extremos cohesivos de interés a fusionar aprovechando el sitio de restricción Sal I que era compartido entre ambos insertos (crotamina y SMD), dicho sitio se colocó en el extremo 3' para la SMD y en el extremo 5' de las secuencias de crotamina. Es importante aclarar que se trabajó con dos versiones de secuencia de crotamina: una con sitios de restricción agregados de Sall en 5' y Hind III en 3' y otra secuencia con Sall en 5' y PstI en 3'. El proceso de ligación consistía en dos pasos y las condiciones de la primera ligación fueron las siguientes:

Inserto SMD BamHI / Sal I (15 ng/μL) ----- 5 μL

Inserto CRO Sal I / Hind III ó Pst I (15 ng/μL) ----- 5 μL

Buffer de ligación + ATP pro Omega®10x -----1.2 μL

Enzima ligasa T4 marca pro Omega®-----0.8 μL

Volumen total: 12 μL

4 h a 25 °C

Pasado el tiempo de incubación, se agregó a la misma reacción lo siguiente: 6 μL de plásmido pQE30 linearizado con cortes en los sitios BamHI y Hind III (ó Pst I) y

desfosforilado en extremos 5'; 0.8 µL de buffer 10x de ligación; 1.2 µL de enzima ligasa T4 pro Omega®. El volumen final de ligación fue de 20 µL y con esa cantidad de plásmido se garantizaba una relación molar 1:3 entre el plásmido y el inserto (ahora compuesto por las dos secuencias). Pasadas 3 h de incubación a 25°C, se transformaron 100 µL de bacterias XL-1Blue por el método de quimiocompetencia, bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente, y se expandieron en placa de medio LB con ampicilina. Pasadas 12 h de incubación a 37°C, se realizó PCR de colonias, utilizando los oligonucleótidos pQEFw y pQERev dirigidos a secciones flanqueantes de la región polilinker o poliunión, y se purificó plásmido de las positivas para mandar a secuenciar a la unidad de secuenciación del IBt-UNAM.

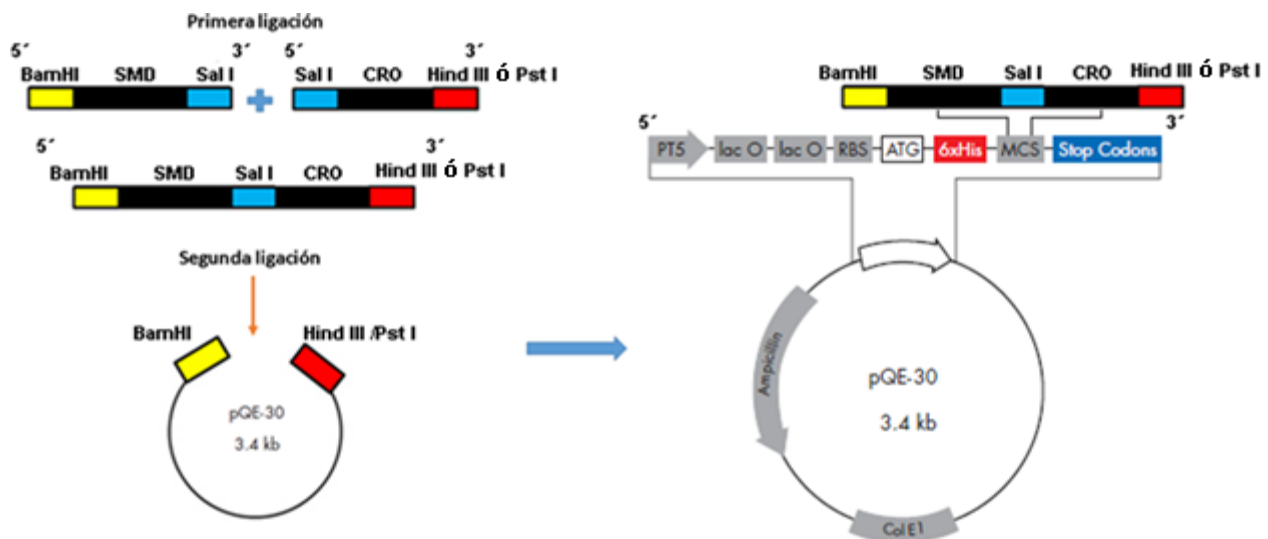


Figura 11. Estrategia para la construcción de la fusión de las secuencias nucleotídicas que codifican para la SMD y crotamina.

### 9.13 Pruebas de expresión de la proteína de fusión SMD-crotamina

La proteína de fusión compuesta por SMD y crotamina con dos aminoácidos propios del sitio de restricción Sal I (VD) como linker fue llamada “SMD-crotamina”, mientras que la que contiene un linker de glicinas (GGGGS) fue llamada “SMD-linker-crotamina”. La expresión de la proteína SMD-crotamina fue evaluada en diferentes cepas de *E. coli* disponibles en el laboratorio (Origami Gold DE3, BL21, Shuffle, Artic y Rosseta), con la finalidad de localizar la cepa que brindaba mayor expresión de la proteína de manera

soluble. Para dicho fin, el plásmido con la construcción en fase de la proteína SMD-crotamina en el vector pQE30 fue usado para transformar células quimiocompetentes de cada cepa de *E. coli* bajo las condiciones de transformación anteriormente descritas. Así, un total de 3 colonias por cepa fueron crecidas en tubos de 3mL de medio LB con ampicilina e inducidas con 1mM de IPTG a 37°C en agitación constante por 12h. Después, se tomó 1 mL de cada tubo y se centrifugó por 3 min a 13,500 rpm, el pellet bacteriano fue resuspendido en 100 µL de H<sub>2</sub>O más 100 µL de buffer reductor con β-mercaptoetanol 2x para su posterior análisis electroforético. Como control negativo de expresión, se usó una muestra de bacterias sin vector, pero crecidas con inductor y sin ampicilina.

Una colonia bacteriana de cada cepa que mostraba expresión total fue crecida en matraces de 50 mL de medio LB con ampicilina (80 µg/mL) y, basado en la experiencia en el laboratorio para la expresión de SMDr, al alcanzar una densidad óptica (DO<sub>600nm</sub>) de 0.6 se les agregó IPTG en concentraciones finales 1mM ó 0.1mM para mantenerlas en incubación por 15 h a 16°C con agitación de 200 rpm. Después, se centrifugaron las bacterias a 8,000 rpm por 15 min a 4°C y el pellet bacteriano fue resuspendido en 5 mL de Tris 1 M pH 8, con 2 µL de lizosima (3kU/µL) e incubado por 30 min a temperatura ambiente en agitación. Después, la muestra fue lisada con el uso de una prensa francesa oneshot marca constant systems cell disruptor® a una presión de 35 Kpsi. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 8,000 rpm por 15 min y una muestra de expresión total, fracción soluble y cuerpos de inclusión fueron almacenadas a 4°C.

#### **9.14 Análisis electroforético de localización de proteína soluble**

Con la finalidad de conocer la localización de la proteína SMD-crotamina en la fracción soluble o cuerpos de inclusión, se procedió a realizar un análisis de las muestras recuperadas de las pruebas de expresión de cada cepa. Para eso cada muestra fue analizada por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecyl sulfato de sodio (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras (con β-mercaptoethanol) (Laemmli, 1970). Como referencia se usaron marcadores de peso molecular (Bio-Rad®). Así, 15 µL



de muestras de los pasos de lisis de la proteína SMD-crotamina se disolvieron en sample buffer (50 mM Tris- HCl, pH 6.8, 25% SDS, 10% glycerol, and 0.002% bromo- phenol blue+ 5%  $\beta$ -mercaptoetanol) y se hirvieron a baño maría por 5 min. Las muestras fueron cargadas en el gel SDS-PAGE al 12.5 % y se corrieron usando una cámara de electroforesis marca BIO-RAD® con buffer Tank (0.02 M tris-HCl, 0.01 M glicina, 0.01% SDS) en un votaje constant de 100 V. Terminada la corrida los geles fueron teñidos con solución de azul de Coomassie (Coomassie azul brillante R-250 0.2%, ácido acético 10%, methanol 25 %) y fueron desteñidos con solución de destinción (metanol 10%, ácido acético 10 %).

### **9.15 Western-blot de la proteína de fusión SMD-crotamina**

Con la finalidad de identificar a la proteína SMD-crotamina en las fracciones obtenidas de las pruebas de expresión y verificar si la proteína permanecía soluble en un peso molecular esperado, se realizaron ensayos de reconocimiento western-blot utilizando anticuerpos dirigidos a la SMD. Así, 5  $\mu$ g de SMDr, disponible en el laboratorio, y 15  $\mu$ L de muestras de los pasos de lisis de la proteína SMD-crotamina expresada en las diferentes cepas bacterianas fueron analizadas en un gel SDS-PAGE al 12.5 % de poliacrilamida en condiciones reductoras. Terminada la corrida, el gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa (Trans-blot 0.45 $\mu$ m Bio Rad®) colocando tres papeles filtro por debajo, seguido del gel y la membrana de nitrocelulosa, además de otros tres papeles filtro por encima. Inmediatamente, se colocó dicha preparación en una cámara semi-húmeda HEP-1 owl® para comenzar la electrotransferencia a corriente constante de 400 mA por 1 h con buffer de transferencia (39 mM glicina, 48 mM Tris-base, 0.037% SDS, 20% metanol). Después, la membrana se incubó a 25°C en agitación constante toda la noche con buffer TBST (10 mM Tris-HCl pH: 7.5, 150 mM de NaCl, 0.05 % Tween-20) + 5% de leche descremada con la finalidad de bloquear sitios inespecíficos para los anticuerpos. Al día siguiente, se le dieron cinco lavados a la membrana con solución TBST y se dejó incubar 1 h con suero de conejo anti-SMD disponible en el laboratorio en dilución 1: 1,000 en buffer TBST (Olvera *et al.*, 2006). Después, se volvieron a realizar lavados y se dejó incubar la membrana por 1 h, esta vez con el anticuerpo secundario

Goat X Rabbit AP Merk® (Lote: 2448043) en dilución 1: 3,000 en 10 mL de solución TBST. Finalmente, se volvió a lavar la membrana y se reveló con 3 mL de buffer BCIP/NBT® AP (Lote: B5655-25TAB). Una vez observadas las bandas teñidas, se detuvo la reacción con agua destilada + EDTA 0.005 %.

### **9.16 Purificación de la proteína SMD-crotamina mediante cromatografía de afinidad a níquel**

Identificada la cepa de *E. coli* que brindaba mayor expresión de la proteína SMD-crotamina en la fracción soluble, se procedió a realizar la expresión de dicha proteína en medios de cultivo líquido LB de 1 L, repitiendo las condiciones de expresión del paso anterior. Así, alcanzada la DO de  $A_{600nm} = 0.6$  se agregó IPTG en una concentración final de 0.1mM para dejar incubar por 15 h en agitación constante de 200 rpm a una temperatura de 16°C. Después del tiempo de expresión, se centrifugó el cultivo bacteriano a 8,000 rpm por 15 min a 4°C, el sobrenadante fue descartado y el pellet bacteriano fue resuspendido en 20 mL de Tris 0.1 M pH 8 y se agregaron 20 µL de lizosima (3 kU/µL) para incubar por 30 min a temperatura ambiente en un agitador orbital. Seguidamente, se procedió a terminar el proceso de lisis con prensa francesa, se centrifugaron las muestras y el sobrenadante fue almacenado a 4°C para su posterior purificación, mientras que el pellet conteniendo los cuerpos de inclusión fue almacenado a -20°C.

El sobrenadante fue recirculado en una columna de cromatografía que contenía 2 mL de agarosa acoplada a níquel marca QUIAGEN® a flujo lento. Posteriormente, se realizaron lavados con PBS seguidos de lavados con imidazol 25mM + PBS para eliminar proteínas inespecíficas y después se agregó suficiente solución de elución (imidazol 250mM+PBS) para recolectar la proteína recombinante en tubos eppendorf de 1.5 mL a los que se les agitó suavemente para detectar espuma como señal de presencia de proteína. La proteína recuperada fue dializada contra PBS con una mebrana de diálisis con corte de poro de 13 kDa y almacenada a 4°C. El mismo procedimiento se realizó para la proteína con linker de glicinas (GGGGS) llamada proteína SMD-linker-crotamina, pero sólo

evaluando la cepa de *E. coli* Origami Gold DE3 y purificando la proteína obtenida bajo las mismas condiciones.

### **9.17 Análisis de la proteína SMD-crotamina purificada por columna de níquel por western-blot**

Con la finalidad de identificar a la proteína SMD-crotamina purificada, se realizaron análisis western-blot de los pasos de purificación por columna de níquel bajo las condiciones descritas en la sección 9.15, pero variando los anticuerpos primarios utilizados. El primer análisis correspondió a la detección de la cola de 6 His que presentaba la proteína SMD-crotamina. Para esto, el anticuerpo primario empleado fue el anticuerpo comercial de ratón anti-6His acoplado a peroxidasa (Roche®) en dilución 1: 5,000 en buffer TBST y el buffer de revelado aplicado fue 3 mL de ready to use TMB (Thermo®). El siguiente análisis consistió en la detección de SMD con el uso del anticuerpo monoclonal 3B10  $\alpha$  SMD, disponible en el laboratorio, en 10  $\mu$ g/mL en 10 mL de buffer TBST. El anticuerpo secundario empleado fue el Goat x Mouse AP Merk® en dilución 1:2,000, y la membrana se reveló con 3 mL de buffer BCIP/NBT® AP. El mismo procedimiento se realizó para la proteína SMD-linker-crotamina bajo las mismas condiciones. El último análisis consistió en la detección de crotamina dentro de la proteína SMD-crotamina con suero de conejos anti-*C.d. terrificus* en dilución 1; 1,000 (Castillo, 2019), para ambas proteínas recombinantes.

### **9.18 Evaluación de actividad letal en ratones de la proteína SMD-(linker)-crotamina**

Para saber el grado de toxicidad de la proteína SMD-(linker)-crotamina, se evaluó su toxicidad en ratones cepa CD1 (18 a 20 g) de acuerdo al método de Lorke (1983). Se disolvieron diferentes cantidades de esta proteína (30 a 100  $\mu$ g) en un volumen final de 200  $\mu$ L de PBS, y este volumen fue inyectado via intravenosa (i.v.) a grupos de tres ratones. Después de 24 h se tomó registro de la tasa de mortalidad de cada grupo y se determinó el valor de la dosis letal media ( $DL_{50i.v.}$ ).

### 9.19 Inmunización de conejos con venenos completos ricos en crotamina

Dos grupos de conejos cepa Nueva Zelanda (n=2) fueron inmunizados con los venenos completos de *C. m. nigrescens* y *C. o. helleri*. Durante los esquemas de inmunización se empleó el adyuvante incompleto de Freund (IFA) y el hidróxido de aluminio (ALUM) de manera alterna. Asimismo, en determinadas fechas se tomaron sangrías punzando la vena auricular del conejo para recuperar suero que fue almacenado a -20°C. El primer grupo fue inmunizado con el veneno completo de *Crotalus oreganus helleri* (grupo “anti-oreganus”) siguiendo el esquema que se muestra en la tabla 8. Los conejos de este grupo recibieron un total de 11 inyecciones subcutáneas partiendo de 5 a 3,000 µg/conejo.

Tabla 8. Esquema de inmunización de conejos del grupo “anti-oreganus”.

Número	Día	Dosis (µg/conejo)	Adyuvante	Sangría
1	1	50	IFA	2 mL (Pre-inmune)
2	7	50	IFA	-
3	14	50	ALUM	-
4	21	100	IFA	-
5	28	250	S/A	-
6	35	500	ALUM	-
7	42	750	IFA	-
8	49	1,000	S/A	-
9	63	2,000	ALUM	-
10	77	3,000	IFA	-
11	91	3,000	S/A	-
	96		Sangría blanco	
		Σ = 10,750		

IFA: Adyuvante incompleto de Freund

ALUM: Hidróxido de Aluminio

S/A: Sin adyuvante

El segundo grupo de conejos fue inmunizado con el veneno completo de *Crotalus molossus nigrescens* y fue llamado grupo “anti-molossus” (Tabla 9). Los conejos de este grupo fueron inmunizados mediante inyecciones subcutáneas con dosis crecientes de veneno, mezclado con adyuvantes (IFA o ALUM), partiendo de 50 hasta 7,000 µg/conejo repartidos en trece inyecciones (Tabla 9).

**Tabla 9. Esquema de inmunización de conejos del “anti-molossus”.**

Número	Día	Dosis (µg/conejo)	Adyuvante	Sangría
1	1	50	IFA	2 mL (Pre-inmune)
2	7	100	IFA	-
3	14	250	ALUM	-
4	21	500	S/A	-
5	28	750	IFA	2 mL
6	35	1,000	ALUM	-
7	42	2,000	IFA	-
8	49	3,000	S/A	-
9	56	4,000	ALUM	2 mL
10	63	4,000	IFA	-
11	77	5,000	ALUM	-
12	91	5,000	IFA	2 mL
13	95	7,000	S/A	
	100	Sangría blanco		
$\Sigma = 32,650$				

IFA: Adyuvante incompleto de Freund

ALUM: Hidróxido de aluminio

S/A: Sin adyuvante

## 9.20 Inmunización de conejos con la proteína SMD-(linker)-crotamina

Dos grupos de dos conejos cepa Nueva Zelanda fueron inmunizados con la proteína SMD-crotamina o su variante con linker de glicinas (SMD-linker-crotamina). Ambos grupos recibieron las mismas cantidades de proteína total administrada subcutáneamente. El esquema partió de 5 µg hasta 3,000 µg de proteína por conejo.

Durante el esquema de inmunización se emplearon adyuvantes tanto IFA y ALUM de manera alterna y se tomaron sangrías de prueba para la recuperación de suero (Tabla 10).

**Tabla 10. Esquema de inmunización de conejos del grupo “anti-SMD-crotamina” y “anti-SMD-linker-crotamina”.**

Número	Día	Dosis (µg/conejo)	Adyuvante	Sangría
1	1	5	IFA	2 mL (Pre-inmune)
2	7	10	IFA	-
3	14	25	ALUM	-
4	21	50	S/A	-
5	28	75	IFA	2 mL
6	35	100	ALUM	-
7	42	200	IFA	-
8	49	300	S/A	-
9	56	400	ALUM	2 mL
10	63	400	IFA	-
11	77	800	ALUM	-
12	91	1,500	IFA	2 mL
13	95	3,000	S/A	-
	100	Sangría blanco		
		Σ = 6,865		

IFA: Adyuvante incompleto de Freund

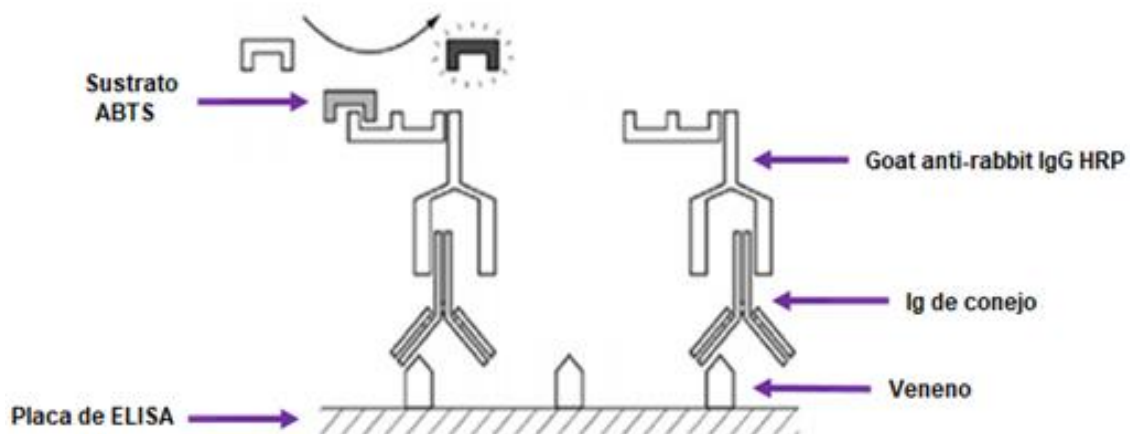
ALUM: Hidróxido de aluminio

S/A: Sin adyuvante

### 9.21 ELISA indirecto para medición de títulos de anticuerpos

Con la finalidad de detectar el valor de anticuerpos desarrollado por los conejos hiperinmunizados se llevó a cabo el ensayo ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima) de tipo indirecto con el diseño mostrado en la figura 12. Para ello, los venenos completos de *C. m. nigrescens* y *C. o. helleri*, la SMDr recombinante y la crotamina purificada por RP-HPLC disponible en el laboratorio fueron utilizados para sensibilizar

placas de ELISA marca Thermo Scientific® (96 pozos). La concentración empleada de cada antígeno fue de 5 µg/mL en buffer de sensibilizado (100 mM de NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.5), añadiendo 100 µL por pozo a excepción de la columna 12 que fungió como control. Después de 1 h de incubación (37°C), las placas fueron lavadas con buffer de lavado (50 mM de Tris-HCl pH 8, 150 mM de NaCl, 0.05% de Tween 20) y se agregaron 200 µL de solución de bloqueo (50 mM Tris-HCl pH 8, 5mg/mL gelatina, 0.02% de Tween 20) para dejar la placa en incubación a 4°C por toda la noche. Al día siguiente, la placa fue lavada y se colocó el suero de cada sangría de conejos en dilución inicial de 1:10 ó 1:100 en buffer vehículo (50 mM de Tris-HCl pH 8, 0.5 M de NaCl, 1 mg/ mL de gelatina, 0.05% de Tween 20) en un volumen de 150 µL en los pozos de la columna uno mientras que a los demás pozos sólo se le colocaron 100 µL de la solución vehículo. Inmediatamente, se realizaron diluciones seriadas 1:3 para dejar todos los pozos con 100 µL y se procedió a incubar la placa por 1 h a 37°C. Para el paso de aplicación del anticuerpo secundario, lavada la placa, se procedió a aplicar 100 µL/pozo del anticuerpo comercial Goat-anti rabbit IgG HRP conjugated marca Thermo Scientific® en dilución 1: 4,000 en buffer vehículo para dejar incubar por 1 h a 37°C. Finalmente, para la fase de revelado, se lavó la placa e inmediatamente se aplicaron 100 µL/pozo de solución de revelado (buffer para ABTS + ABTS y 0.02% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y la reacción se dejó correr por 15 min a temperatura ambiente e inmediatamente se leyó la absorbancia a 405 nm utilizando un espectrofotómetro de ELISA marca TECAN®.



**Figura 12. Diseño de ELISA indirecto para detección de anticuerpos.**

## 9.22 Purificación de anticuerpos por el método de ácido caprílico

Se generaron 4 antivenenos experimentales compuestos por IgGs purificadas del suero de conejos siguiendo el método descrito por Rojas *et al.*, (1994) con ligeras modificaciones. Así, 50 mL del suero de un conejo inmunizado con el veneno de *C. m. nigrescens*, así como de pooles generados por separado del resto de los grupos de conejos fueron individualmente mezclados con 50 mL de PBS y se ajustó el pH a 5 con ácido acético 3 N. Seguidamente, se colocaron 2 mL de ácido caprílico (C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>) para alcanzar una concentración final de 4 % (V/V) con la mezcla anterior. Después, se dejó la muestra en agitación constante a temperatura ambiente por 2 h. Pasado el tiempo de agitación y una vez observado el precipitado de proteínas, se procedió a centrifugar la muestra a 12,000 rpm por 15 min a una temperatura de 4°C. El sobrenadante con los anticuerpos, fue filtrado con una membrana millipore® hidrofílica de 0.45 µm. Posteriormente, la muestra fue dializada contra PBS 0.1x utilizando una membrana de corte de poro de 30 kDa. Las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido para ser liofilizadas en un equipo Freezone 2.5 marca LABCONCO® a una temperatura de -50°C y una presión constante de 5.5 Pa. Finalmente, se resuspendieron los anticuerpos en 10 mL agua destilada estéril y se cuantificó el total de proteína por A 280 (ε=1.4) para correr geles SDS-PAGE (12.5%) y verificar el estado de purificación de los anticuerpos.

## 9.23 Western-blot de antivenenos experimentales

Se realizaron western-blot de los 4 antivenenos experimentales utilizando la crotamina purificada y los venenos completos de *C. m. nigrescens*, *C. o. helleri* y *C. d. terrificus*. Siete µg de cada veneno completo y 3 µg de crotamina fueron corridos en geles SDS-PAGE 15 % y transferidos a una membrana de nitrocelulosa como se indica en la sección 9.17. Como anticuerpo primario se usaron cada uno de los 4 antivenenos experimentales en una concentración de 10 µg/mL en solución TBST. El anticuerpo secundario fue el Goat-anti rabbit IgG HRP conjugated marca Thermo Scientific® en dilución 1: 4,000 y la solución de revelado fue el buffer ready to use TMB (Thermo®). Como referencia, se corrió un gel SDS-PAGE al 15 % con 15 µg de cada veneno y 5 µg de crotamina purificada teñido con azul de Coomassie R-250.



#### **9.24 Ensayos de especificidad de anticuerpos anti-SMD-(linker)-crotamina por ELISA.**

Con el propósito de evaluar la especificidad de reconocimiento hacia crotamina por los anticuerpos generados con las proteínas recombinantes de fusión, se realizaron ensayos de ELISA utilizando los antivenenos experimentales generados. Las condiciones del ensayo fueron parecidas a las descritas en la sección 9.21, pero variando las proteínas de sensibilizado de placa de 96 pozos y los anticuerpos primarios utilizados. Así, se utilizaron los siguientes antígenos en concentración de 5 µg/mL para el sensibilizado de placa: crotamina purificada por RP-HPLC, veneno completo de *C. m. nigrescens*, veneno de *C. o. helleri*, veneno de *C. d. terrificus*, veneno de *C. simus* y veneno de *C. atrox*. Estos dos últimos venenos carecen de crotamina y fueron usados como controles negativos. Por el lado del anticuerpo primario se emplearon los antivenenos experimentales “anti-SMD-crotamina” y “anti-SMD-linker-crotamina” en concentración inicial de 100 µg/mL en solución de reacción para realizar soluciones seriadas 1:3. A partir de este punto se siguieron los mismos pasos de la sección 9.21 para aplicación de anticuerpo secundario y el revelado de placa.

#### **9.25 Ensayos de neutralización de parálisis espástica producidos por crotamina**

Se evaluaron los 4 antivenenos experimentales “anti-oreganus”, “anti-molossus”, “anti-SMD-crotamina y anti-SMD-linker-crotamina” contra el efecto de parálisis espástica provocado por los venenos de *C. m. nigrescens*, *C. o. helleri*, *C. d. terrificus*, así como por la crotamina purificada. Dado que los venenos completos empleados presentan otras toxinas que pueden generar mortalidad en ratones por la dosis paralizante empleada (30 µg/ratón), fue necesario pre-incubar para neutralizar a estos otros componentes con anticuerpos anti-*C. simus* disponibles en el laboratorio que carecen de reconocimiento contra crotamina, y por ende no la neutralizan. Se incubaron por 30 min a 37°C: 30 µg de veneno completo de cada especie + diferentes cantidades (0.3 a 20 mg) de los antivenenos experimentales + 2 mg de IgGs anti-*C. simus* completado a un volumen final de 500 µL con PBS. Después, 500 µL de la solución que contenía veneno / IgGs de los antivenenos experimentales / IgGs anti-*C. simus* fue inyectado a grupos de tres ratones

(CD-1) por vía intravenosa. Por otro lado, la crotamina purificada fue evaluada bajo las mismas condiciones, pero con dosis de 15  $\mu\text{g}/\text{ratón}$  y sin pre-incubar con IgGs anti-*C. simus*. Los ratones fueron observados y la inhibición de parálisis espástica fue cuantificada como porcentaje de individuos dentro de cada grupo con ausencia de parálisis durante 30 min de observación. Como control negativo, tres grupos de ratones fueron inyectados intravenosamente con cada veneno completo (30  $\mu\text{g}/\text{ratón}$ ) más los IgGs anti-*C. simus* (1.3 mg) y 20 mg de IgGs purificadas de suero pre-inmune en 500  $\mu\text{L}$  de PBS. El grupo control inyectado con crotamia purificada recibió 15  $\mu\text{g}/\text{ratón}$  de la toxina y la misma cantidad de anticuerpos de suero pre-inmune.

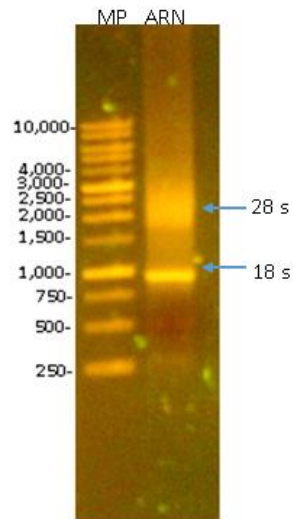
### 9.26 Análisis estadístico

Con base a los datos de absorbancia obtenidos en los ensayos de ELISA, se calcularon los valores de  $\text{EC}_{50}$  correspondientes al valor de título de anticuerpos utilizando el software GraphPad Prism Versión 4.0b<sup>®</sup>. Por otro lado, los datos obtenidos para la determinación de la  $\text{DL}_{50\text{i.v.}}$  de las proteínas recombinantes y la potencia neutralizante de parálisis ( $\text{DE}_{50\text{i.v.}}$ ) de cada antiveneno fueron analizados utilizando el ajuste por regresión no lineal mediante una sigmoide dosis-respuesta en el software estadístico ya mencionado (Casasola *et al.*, 2009).

## 10. Resultados

### 10.1 Gel de agarosa de ARN de glándula de veneno

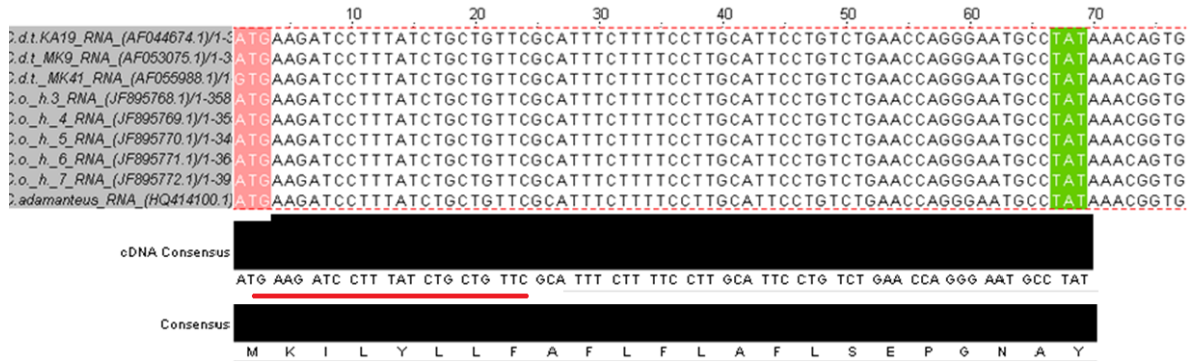
En la figura 13 se puede ver la calidad del ARN disponible en el laboratorio correspondiente a la glándula de veneno de una serpiente de la especie *C. m. nigrescens*, se pueden observar dos bandas de 1 y 1.6 Kb correspondientes a ARNs ribosomales, lo cual indica buena calidad del ARN purificado.



**Figura 13. Muestra de ARN purificado de glándulas del veneno de un individuo de *C. m. nigrescens*.**MP: Marcador de tamaño molecular expresado en pares de bases. Se señalan los ARN ribosomales y el barrido correspondiente a RNA mensajero de diferentes longitudes.

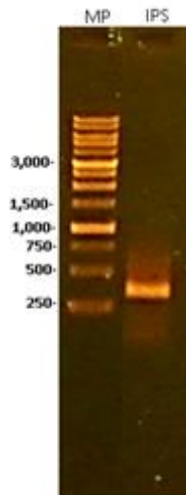
### 10.2 RT-PCR de transcritos codificantes de crotamina

Con la finalidad de identificar una región conservada permisiva para amplificar secuencias de crotamina mediante PCR y diseñar un oligonucleótido, se analizaron secuencias de crotamina reportadas en la literatura. En la figura 14 se muestra el alineamiento de secuencias nucleóticas de la región péptido señal de diferentes crotaminas y se muestra la región sobre la cual se diseñó un oligonucleótido.



**Figura 14. Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas de la región correspondiente al péptido señal de diferentes isoformas de crotonina disponibles en NCBI®. Se muestra en rosa el inicio de la secuencia péptido señal, en verde el inicio de la proteína madura y subrayado en rojo el oligonucleótido CroIPS diseñado.**

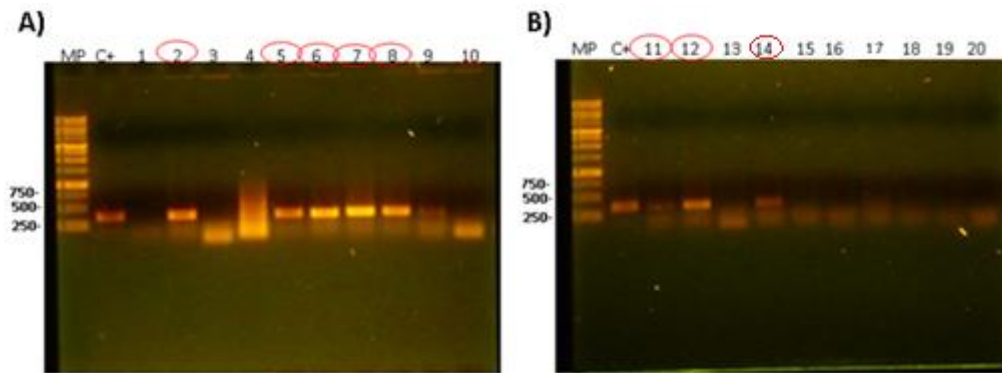
Una vez verificada la calidad del ARN, se procedió a sintetizar el ADNc que serviría como templado para las reacciones de PCR con el oligonucleótido directo complementario al inicio del péptido señal (IPS) y como oligonucleótido reverso se utilizó el AUAP que tiene una secuencia idéntica al AP que se agregó en la síntesis de cDNA con la única diferencia de no contar con una cola de T. En la figura 15, se puede observar el producto de PCR con el oligonucleótido IPS (~350 pb).



**Figura 15. Gel de agarosa 1% de el producto de PCR obtenido con el uso del oligonucleótido IPS.**

### 10.3 Secuenciación de variantes de crotamina obtenidas en el vector pJET 1.2

Con la finalidad de conocer las posibles isoformas de transcritos codificantes a crotamina, se clonó el producto PCR del oligonucleótido IPS en el vector pJET 1.2 y se transfectaron bacterias por electroporación. Diferentes volúmenes de las bacterias recuperadas (25, 50, 100 y 400  $\mu$ L) fueron esparcidos en 4 placas de medio LB con ampicilina. El número de colonias crecidas fue de 46, 115, 83 y 230 para cada volumen creciente de bacterias sembradas, respectivamente. Dado el gran número de colonias o clonas, sólo se escogieron 5 colonias al azar de cada caja para realizar una PCR de colonia con los oligonucleótidos Fw:IPS y Rev: AUAP. Las clonas positivas (n=8) fueron procesadas para purificar sus plásmidos los cuales fueron mandados a secuenciar (Figura 16).



**Figura 16. PCR de colonias de variantes de crotamina presentes en el vector pJET 1.2.** Las colonias cuyos plásmidos fueron purificados se señalan en círculos rojos.

Los resultados de secuenciación arrojaron tres secuencias diferentes de crotamina que fueron redundantes al repetirse las mismas en los demás plásmidos analizados, a partir de este resultado, se decidió llamar a cada isoforma como AISI, GISI y QICW en función a los cambios más destacables en su composición de aminoácidos (Figura 17).

A)

```
5' 1 ttgaagatcctttatctgctgttcgcatttcttttccttgcattcctgtctgaaccaggg 60
NH2- L K I L Y L L F A F L F L A F L S E P G
61 aatgcctataaacgggtgtcttaagaaaggaggacactgctttccaagaccgtaatatgt 120
  N A Y K R C L K K G G H C F P K T V I C
121 cttcctccatcttctgactttgggaagatggactgtcgatggaaatggaaatgctgtaa 180
  L P P S S D F G K M D C R W K W K C C K
181 aaggggaagtgtaaataatgccatctccatctaggaccatggatatcttcaagatatggcc 240
  K G S V N N A I S I - COO-
241 aaggacctgagagtgccgcctgctatcgctgtatctttctttaataaatcaaattgcta 300

301 cccataaaaaaaaaaaaaaaaaa 3' 323
```

B)

```
5' 1 ttgaagatcctttatctgctgttcgcatttcttttccttgcattcctgtctgaaccaggg 60
NH2- L K I L Y L L F A F L F L A F L S E P G
61 aatgcctataaacgggtgtcttaagaaaggaggacactgctttccaagaccgtaatatgt 120
  N A Y K R C L K K G G H C F P K T V I C
121 cttcctccatcttctgactttgggaagatggactgtcgatggaaatggaaatgctgtaa 180
  L P P S S D F G K M D C R W K W K C C K
181 aaggggaagtgtaaataatggcatctccatctaggaccatggatatcttcaagatatggcc 240
  K G S V N N G I S I - COO-
241 aaggacctgagagtgccgcctgctatcgctgtatctttctttaataaatcaaattgcta 300

301 cccaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 3' 320
```

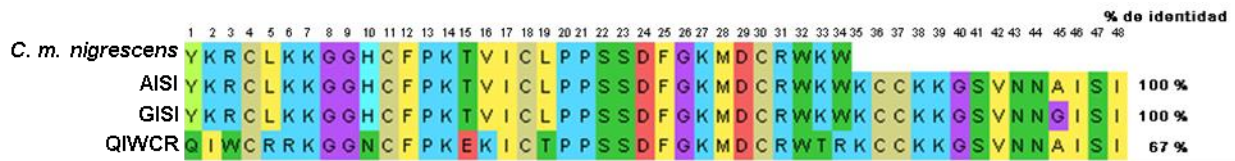
C)

```
5' 1 ttgaagatcctttatctgctgttcgcatttcttttccttgcattcctgtctgaaccaggg 60
NH2- L K I L Y L L F A F L F L A F L S E P G
61 aatgcccaaatatggtgtcgtcggaaaggaggaaactgctttccaaggagaaaatatgt 120
  N A Q I W C R R K G G N C F P K E K I C
121 actcctccatcttctgactttgggaagatggactgtcgatggacacggaaatgctgtaa 180
  T P P S S D F G K M D C R W T R K C C K
181 aaggggaagtgtaaataatgccatctccatctaggaccatggatatcttcaagatatggcc 240
  K G S V N N A I S I - COO-
241 aaggacctgagagtgccgcctgctatcgctgtatctttctttaataaatcaaattgcta 300

301 cccatcaaaaaaaaaaaaaaaaaa 3' 324
```

**Figura 17. Resultado de secuenciación de los plásmidos de crotamina AISI obtenido de las clonas 2,11 y 12 (A); crotamina GISI de clonas 5 y 6 (B) y crotamina QIWC de clonas 8 y 14 (C). Se subraya en rojo la posible secuencia primaria de la proteína madura.**

Las secuencias de crotamina encontradas fueron comparadas con la secuencia parcial de una isoforma de crotamina reportada en el veneno de *C. m. nigrescens* (Figura 18) (Borja *et al.*, 2018). En cuanto a los cambios importantes, la secuencia de crotamina AISI y GISI resultó ser idéntica a la isoforma encontrada en el veneno de la misma especie, aunque la secuencia descrita en el veneno es parcial, es probable que una de estas dos isoformas se encuentren en el veneno de esta especie. Sin embargo, la isoforma llamada QIWC es una secuencia que tiene el más bajo porcentaje de identidad con la isoforma encontrada en el veneno debido a sus cambios puntuales que presenta en la región amino terminal.

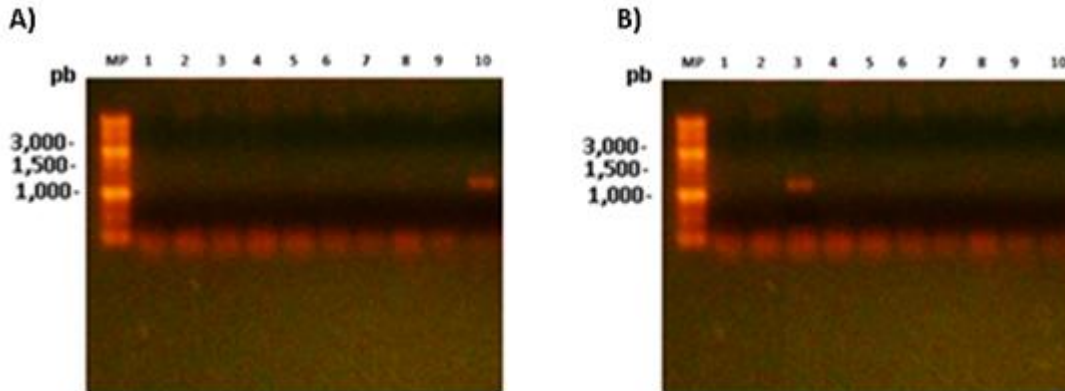


**Figura 18. Alineamiento de secuencias peptídicas de la crotamina de *C. m. nigrescens*.** Se muestra el porcentaje de identidad, calculado con el servidor clustal W®, de cada isoforma con respecto a la secuencia parcial de una isoforma descrita en el veneno de *C. m. nigrescens* y con actividad biológica de parálisis rígida en ratones (Borja *et al.*, 2018).

#### 10.4 Secuenciación del vector de expresión pQE30 con construcción codificante para SMD y crotamina *in tandem*

Dada su alta identidad en los primeros 34 aminoácidos con la isoforma de crotamina presente en el veneno de *C. m. nigrescens*, se decidió trabajar con la crotamina GISI para obtener la proteína SMD-(linker)-crotamina. Primero, se agregaron los sitios de restricción Sal I en la región 5' y Hind III/Pst I en 3'. Por otro lado, la SMD contaba con los sitios de restricción Bam HI en 5' y Sal I en 3'. Este acomodo de sitios de restricción permitió que las toxinas de interés a fusionar tuvieran un sitio de restricción en común (Sal I) permisivo para su ligación con el vector de expresión pQE30 que a su vez se encontraba linearizado entre los sitios BamHI y Hind III ó Pst I. Después de realizar esta técnica de ligación, se transformaron bacterias de *E. coli* XL-1 blue quimiocompetentes y se realizó PCR a las colonias crecidas. El resultado indicó una baja eficiencia de ligación dado que de 10 colonias de cada reacción de ligación, sólo una mostró un amplicón con el peso molecular

esperado resultado de la suma de las dos secuencias fusionadas que fue de ~ 1,050 pb (Figura 19).



**Figura 19. Productos de PCR de colonias de colonias de secuencias codificantes de la construcción SMD-crotamina (A) y la construcción SMD-linker-crotamina (B) en el vector pQE30.**

A partir de las colonias positivas por amplificación de secuencia por PCR, los plásmidos fueron purificados y secuenciados con los mismos oligonucleótidos pQFw y el pQRev empleados en el PCR. Las secuencias permitieron determinar la fase de ambas secuencias de interés y se logró identificar el codón de inicio, la cola de histidinas, la secuencia completa de SMD y la secuencia completa de crotamina tanto para SMD-crotamina (Figura 20) y SMD-linker-crotamina (Figura 21).



```

atg aga gga tgc cat cac cat cac cat cac gga tcc gcg aac aaa cgc ccg gcg tgg atc
M R G S H H H H H H G S A N K R P A W I
atg gga cac atg gtg aac gct gtc gct cag ata gac gag ttt gtg aac ctt gga gcg aat
M G H M V N A V A Q I D E F V N L G A N
tcc att gaa aca gac gta tct ttc gac aaa aat gcc aat cct gaa tac acc tat cac ggc
S I E T D V S F D K N A N P E Y T Y H G
att cca tgc gat tgt gga agg act tgc acg aag tgg gag aat ttc aac gat ttt ctc aaa
I P C D C G R T C T K W E N F N D F L K
ggt ctg cga aaa gcc aca aca cca ggc gat tcc aag tat cat gaa aaa tta gtg tta gtt
G L R K A T T P G D S K Y H E K L V L V
gta ttt gac ctg aaa acc ggc agc ctc tac gat aac caa gct tac gac gca gga aag aag
V F D L K T G S L Y D N Q A Y D A G K K
tta gcg aaa aat atc ctt cag cat tac tgg aac aac ggc aat aat ggg gga aga gca tac
L A K N I L Q H Y W N N G N N G G R A Y
atc gta ttg tcc ata cca aac ctt gcc cat tat aaa tta att acc gga ttt aaa gaa acg
I V L S I P N L A H Y K L I T G F K E T
ctc aca agc gag ggt cat cca gag tta atg gag aaa gtt gga tat gac ttc tct gga aac
L T S E G H P E L M E K V G Y D F S G N
gat gac atc gac aag gtc gga aac gct tac aaa aat gcc gga gta aca ggg cat gtg tgg
D D I D K V G N A Y K N A G V T G H V W
cag agc gat ggc atc acc aac tgt tta ctg cgg gga ctt agt cgt gtg aag gaa gct gtg
Q S D G I T N C L L R G L S R V K E A V
aaa aac aga gat tct tca aac gga ttc att aac aaa gtt tac ttt tgg aca gtg gac aag
K N R D S S N G F I N K V Y F W T V D K
cgc gca tgc act aga gat gca ctg gat gct gga gtc gat gga ata atg acc aac tac ccg
R A S T R D A L D A G V D G I M T N Y P
gat gtt att gct gat gtc ctc agt gaa tct gct tat aag gcg aat ttc aga att gcc aca
D V I A D V L S E S A Y K A N F R I A T
tac gac gac aat cct tgg gaa aca ttc aag aat gtc gac tat aaa cgg tgt ctt aag aaa
Y D D N P W E T F K N V D Y K R C L K K
gga gga cac tgc ttt ccc aag acc gta ata tgt ctt cct cca tct tct gac ttt ggg aag
G G H C F P K T V I C L P P S S D F G K
atg gac tgt cga tgg aaa tgg aaa tgc tgt aaa aag gga agt gta aat aat ggc atc tcc
M D C R W K W K C C K K G S V N N G I S
atc taa aag ctt
I -

```

**Figura 20. Resultado de secuenciación de ADN de la construcción para la proteína de fusión SMD-crotamina en el vector pQE30.** Se señala en azul la cola de 6His, en naranja la secuencia de SMD y en verde la secuencia de crotamina.

```

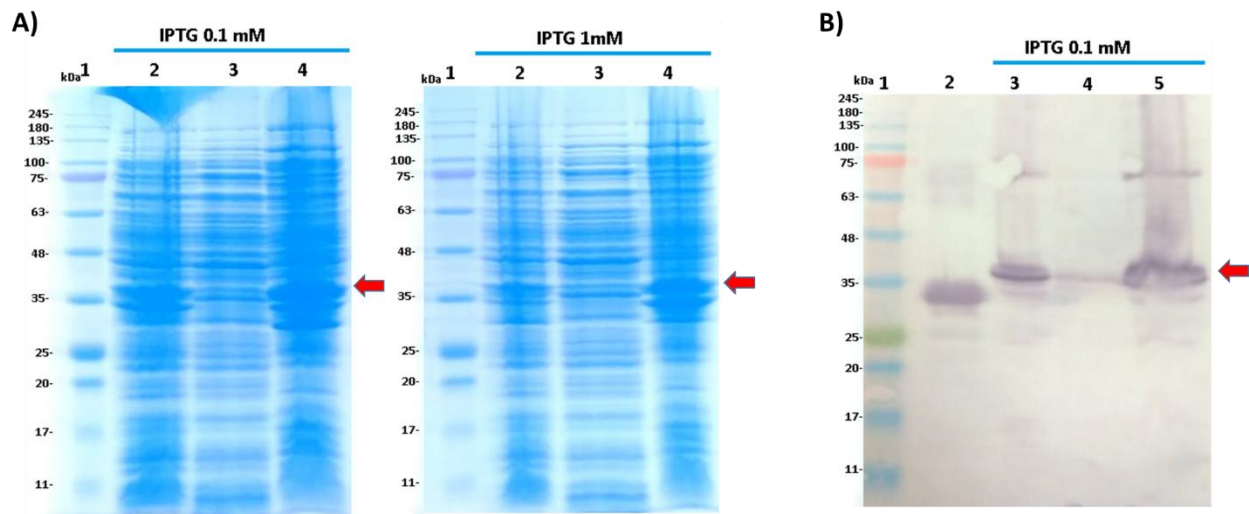
atg aga gga tcg cat cac cat cac cat cac gga tcc gcg aac aaa cgc ccg gcg tgg atc
M R G S H H H H H H G S A N K R P A W I
atg gga cac atg gtg aac gct gtc gct cag ata gac gag ttt gtg aac ctt gga gcg aat
M G H M V N A V A Q I D E F V N L G A N
tcc att gaa aca gac gta tct ttc gac aaa aat gcc aat cct gaa tac acc tat cac gcc
S I E T D V S F D K N A N P E Y T Y H G
att cca tgc gat tgt gga agg act tgc acg aag tgg gag aat ttc aac gat ttt ctc aaa
I P C D C G R T C T K W E N F N D F L K
ggt ctg cga aaa gcc aca aca cca ggc gat tcc aag tat cat gaa aaa tta gtg tta gtt
G L R K A T T P G D S K Y H E K L V L V
gta ttt gac ctg aaa acc ggc agc ctc tac gat aac caa gct tac gac gca gga aag aag
V F D L K T G S L Y D N Q A Y D A G K K
tta gcg aaa aat atc ctt cag cat tac tgg aac aac gcc aat aat ggg gga aga gca tac
L A K N I L Q H Y W N N G N G R A Y
atc gta ttg tcc ata cca aac ctt gcc cat tat aaa tta att acc gga ttt aaa gaa acg
I V L S I P N L A H Y K L I T G F K E T
ctc aca agc gag ggt cat cca gag tta atg gag aaa gtt gga tat gac ttc tct gga aac
L T S E G H P E L M E K V G Y D F S G N
gat gac atc gac aag gtc gga aac gct tac aaa aat gcc gga gta aca ggg cat gtg tgg
D D I D K V G N A Y K N A G V T G H V W
cag agc gat ggc atc acc aac tgt tta ctg cgg gga ctt agt cgt gtg aag gaa gct gtg
Q S D G I T N C L L R G L S R V K E A V
aaa aac aga gat tct tca aac gga ttc att aac aaa gtt tac ttt tgg aca gtg gac aag
K N R D S S N G F I N K V Y F W T V D K
cgc gca tcg act aga gat gca ctg gat gct gga gtc gat gga ata atg acc aac tac ccg
R A S T R D A L D A G V D G I M T N Y P
gat gtt att gct gat gtc ctc agt gaa tct gct tat aag gcg aat ttc aga att gcc aca
D V I A D V L S E S A Y K A N F R I A T
tac gac gac aat cct tgg gaa aca ttc aag aat gtc gac ggc ggc ggc ggc tcc tat aaa
Y D D N P W E T F K N V D G G G G S Y K
cgg tgt ctt aag aaa gga gga cac tgc ttt ccc aag acc gta ata tgt ctt cct cca tct
R C L K K G G H C F P K T V I C L P P S
tct gac ttt ggg aag atg gac tgt cga tgg aaa tgg aaa tgc tgt aaa aag gga agt gta
S D F G K M D C R W K W K C C K K G S V
aat aat ggc atc tcc atc taa ctg cag
N N G I S I -

```

**Figura 21. Resultado de secuenciación de ADN de la construcción para la proteína de fusión SMD-linker-crotamina en el vector pQE30.** Se señala en azul la cola de 6His, en naranja la secuencia de SMD, en rojo el linker de glicinas y en verde la secuencia de crotamina.

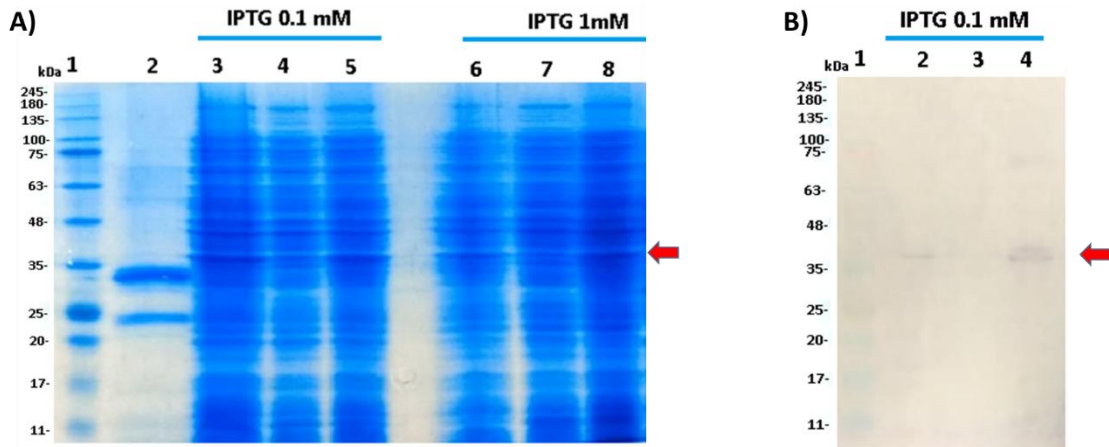
## 10.5 Ensayos de expresión de la proteína de fusión SMD-crotamina

Verificada la construcción codificante de la proteína de fusión SMD-crotamina, se procedió a transformarla en diferentes cepas bacterianas disponibles en el laboratorio con la finalidad de localizar aquella que brindará un mayor rendimiento de expresión, además de determinar la concentración de inductor (IPTG) adecuada de expresión. Dichas estandarizaciones sólo se realizaron para la proteína SMD-crotamina. En la figura 22 se observa la localización de la proteína de interés expresada en la cepa BL21, se pueden observar las bandas sobreexpresadas en el carril 2 y 4 correspondiente a la expresión total y la proteína como cuerpo de inclusión, respectivamente. Estas bandas fueron reconocidas por los anticuerpos policlonales anti-SMDr. Es importante destacar el reconocimiento de bandas por arriba del control SMDr, parámetro que mostraba el correcto incremento del peso molecular esperado de la proteína SMD-crotamina (37.5 kDa).



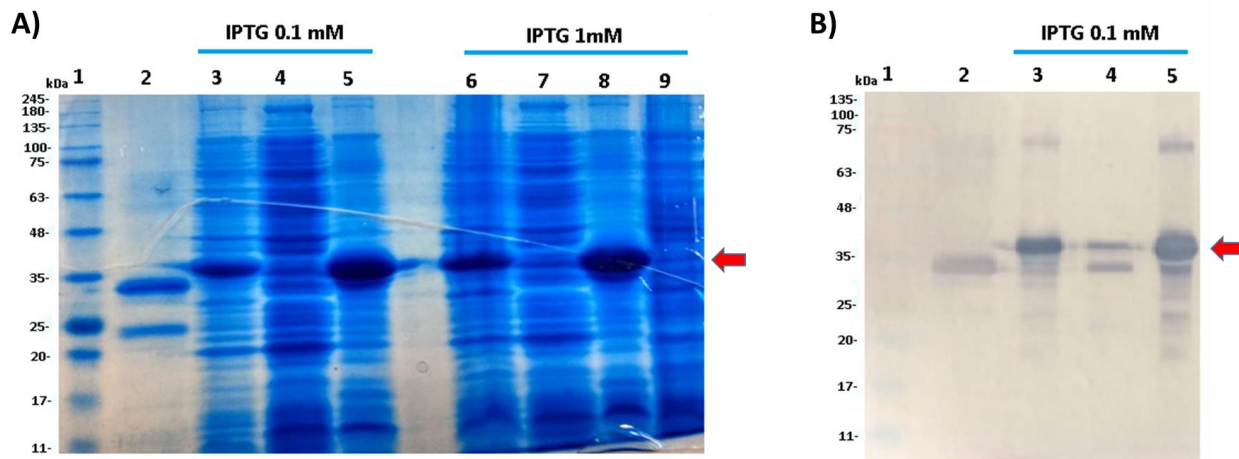
**Figura 22. Localización de la proteína de fusión SMD-crotamina en la cepa E. coli-BL21 inducida con diferentes concentraciones de IPTG.** a) Tinción con azul de Coomassie de gel SDS-PAGE al 12.5%, carriles: 1. Marcador de peso molecular; 2. Expresión total; 3. Fracción soluble; 4. Cuerpos de inclusión. b) Western-blot con suero anti-SMDr: 1. Marcador de peso molecular; 2. SMDr de *L. reclusa*; 3. Expresión total; 4. Fracción soluble; 5. Cuerpos de inclusión. Las flechas indican la proteína de interés SMD-crotamina.

La segunda cepa evaluada fue *E. coli* Rosseta y en la figura 23 se puede observar que la detección por western-blot por el suero anti-SMD fue apenas perceptible lo que indicaba un bajo rendimiento de expresión de la proteína de interés en esta cepa bajo estas condiciones.



**Figura 23. Localización de proteína de fusión SMD-crotamina en cepa Rosseta bajo diferentes concentraciones de inductor.** a) Tinción con azul de Coomassie de gel SDS-PAGE al 12.5%, carriles: 1. Marcador de peso molecular; 2. SMDr de *L. reclusa*; 3. Expresión total; 4. Fracción soluble; 5. Cuerpos de inclusión. b) Western-blot con anticuerpos policlonales anti-SMDr: 1. Marcador de peso molecular; 2. Expresión total; 3. Fracción soluble; 4. Cuerpos de inclusión. Las flechas indican la proteína de interés.

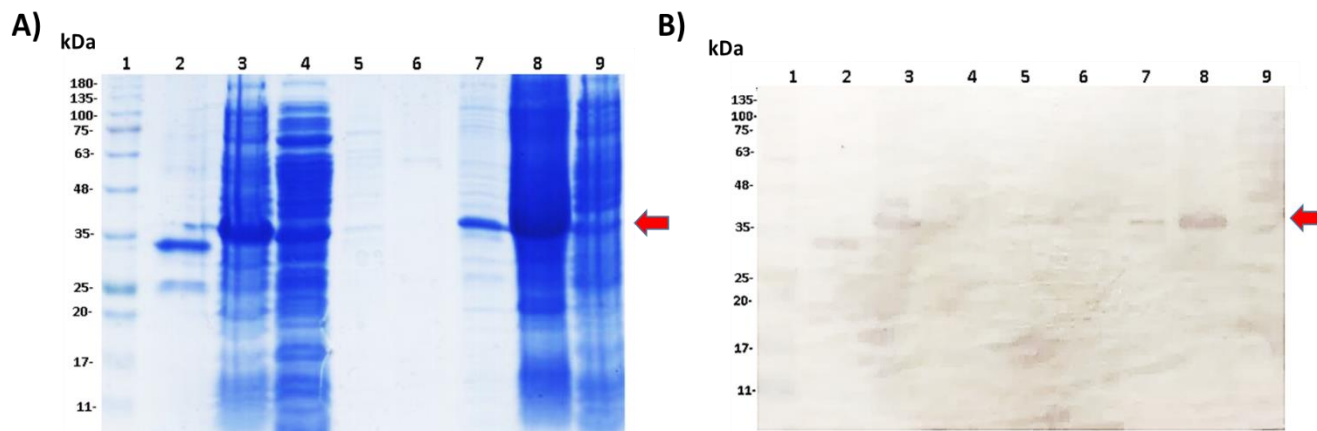
La evaluación de la expresión en las cepas Shuffle y Artic fueron similares a lo observado con la cepa Rosseta por lo que estas cepas fueron descartadas. Sin embargo, la cepa donde se observó mayor expresión total y detección por western-blot de la fracción soluble y de cuerpos de inclusión fue en Origami Gold DE3. En la figura 24 se muestra el análisis de localización de la proteína recombinante en esta cepa.



**Figura 24. Localización de la proteína de fusión SMD-crotamina en la cepa E.coli Origami Gold DE3 inducida con diferentes concentraciones de IPTG.** a) Tinción con azul de Coomassie de gel SDS-PAGE al 12.5%, carriles: 1. Marcador de peso molecular; 2. SMDr de *L. reclusa*; 3 y 6. Expresión total; 4 y 7. Fracción soluble; 5 y 8. Cuerpos de inclusión; 9. Control negativo de expresión. b) Western-blot con anticuerpos policlonales anti-SMDr: 1. Marcador de peso molecular; 2. SMDr de *L. reclusa*; 3. Expresión total; 4. Fracción soluble; 5. Cuerpos de inclusión. Las flechas indican la proteína de interés.

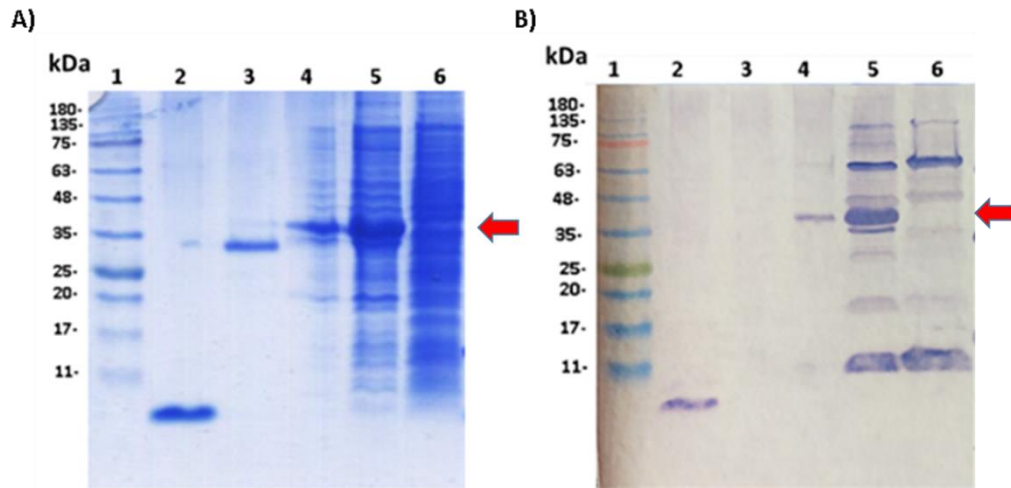
### 10.6 Obtención de la proteína de fusión SMD-crotamina

Se realizó la expresión de la proteína de fusión SMD-crotamina y SMD-linker-crotamina en la cepa Origami Gold DE3 en 1 L de cultivo. Siguiendo el protocolo de purificación por columna de afinidad a níquel de la fracción soluble, se logró obtener la proteína de interés en rendimientos variables de 3 - 5 mg/L de cultivo para la proteína SMD-crotamina y 7-10 mg/L para la proteína SMD-linker-crotamina expresada bajo las mismas condiciones estandarizadas para la proteína SMD-crotamina. En la figura 25 se muestran los pasos de purificación de la proteína SMD-crotamina analizados en gel SDS-PAGE 12.5 %, así como con western-blot usando anticuerpos dirigidos a la etiqueta de 6His. Se puede observar que se detectó reacción en el control positivo (SMDr), así como en la expresión total, soluble y cuerpos de inclusión.



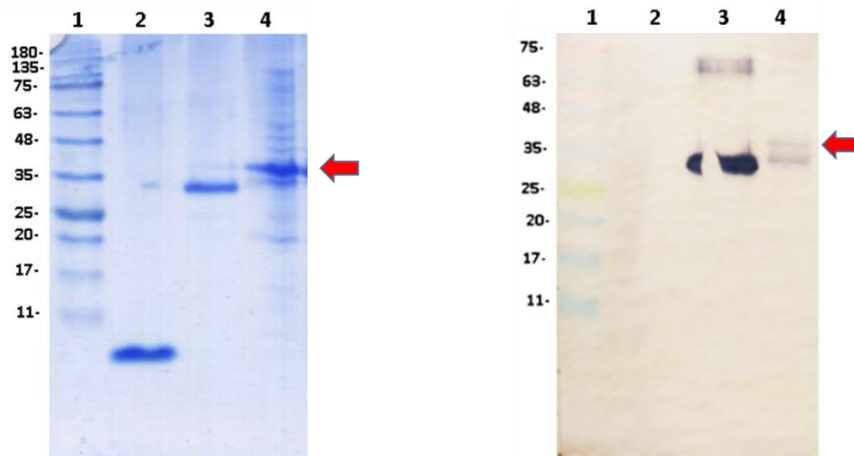
**Figura 25. Análisis de SMD-crotamina por SDS-PAGE 12.5 % (A) y western-blot con anticuerpos  $\alpha$ -6His (B).** Carriles: 1. Marcador de peso molecular; 2. SMDr como c+; 3. Expresión total; 4. Recirculante recuperado después de pasar a columna; 5. Primer lavado con PBS; 6. Segundo lavado Imidazol 25mM+PBS; 7. Elución con imidazol 250 mM +PBS; 8. Cuerpos de inclusión; 9. Control negativo de expresión. Las flechas indican la proteína de interés.

Purificada la proteína SMD-crotamina soluble se procedió a comprobar que ambas toxinas que conformaban a la proteína de fusión estuvieran en la misma banda con el peso molecular esperado. Por lo que fue necesario utilizar anticuerpos disponibles en el laboratorio para la detección por separado de ambas toxinas por western-blot. En la figura 26 se muestra el reconocimiento por western-blot un suero de conejo anti-*C.durissus terrificus* hacia la proteína de fusión SMD-crotamina. En el western-blot se puede observar la detección en los controles positivos así como en la proteína purificada y cuerpos de inclusión. Cabe destacar que aunque se observó reacción sobre diferentes bandas del control negativo, ninguna coincide con el peso esperado para la proteína de fusión recombinante.



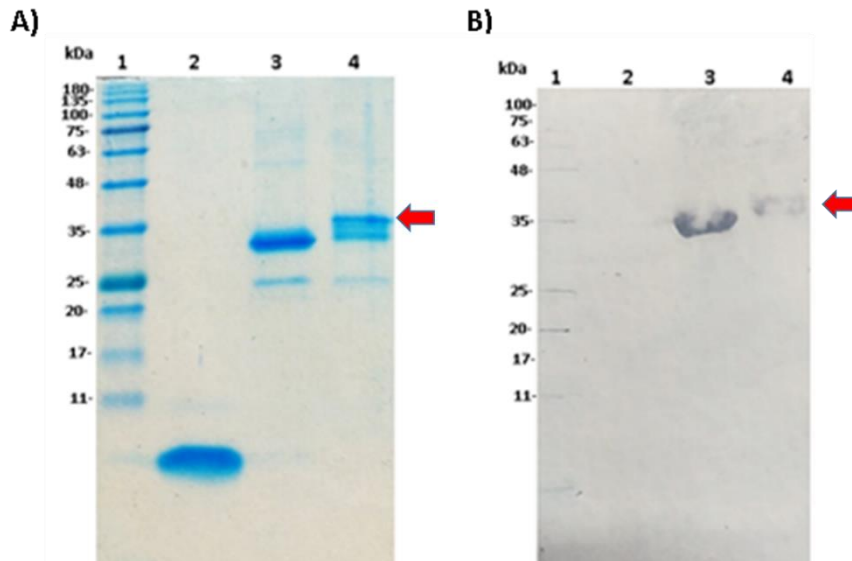
**Figura 26. Western-blot con suero anti-*C. d. terrificus* de la proteína SMD-crotamina.** A) SDS-PAGE 15 %. B) western-blot con suero anti-*C. d. terrificus*, carriles: 1. Marcador de peso molecular; 2. Crotamina nativa; 3. SMDr; 4. Proteína recombinante purificada; 5. Cuerpos de inclusión; 6. Control negativo de expresión; 7. Veneno completo de *C. d. terrificus*. Las flechas indican la proteína de interés.

Asimismo, se realizaron los mismos experimentos para la detección de SMD dentro de la proteína SMD-crotamina. En la figura 27.B se puede observar que hubo detección para la proteína de fusión en una banda esperada con peso molecular de 37.5 kDa.



**Figura 27. Western-blot con anticuerpos monoclonal anti-SMD de la proteína SMD-crotamina.** A) SDS-PAGE 15%. B) western-blot con anticuerpo monoclonal 3B10  $\alpha$ -SMD, carriles: 1. Marcador de peso molecular; 2. Crotamina nativa; 3. SMDr; 4. Proteína SMD-crotamina purificada. Las flechas indican la proteína de interés.

Este último experimento de detección de SMD dentro de la proteína de fusión se realizó también para la proteína con linker (SMD-linker-crotamina) con la finalidad de comprobar si el peso molecular observado en el gel SDS-PAGE correspondía a una proteína con un peso molecular por encima de la SMDr sola. El resultado se observa en la figura 28 y se puede notar que hubo detección por el anticuerpo monoclonal 3B10  $\alpha$ -SMD la proteína SMD-linker-crotamina.

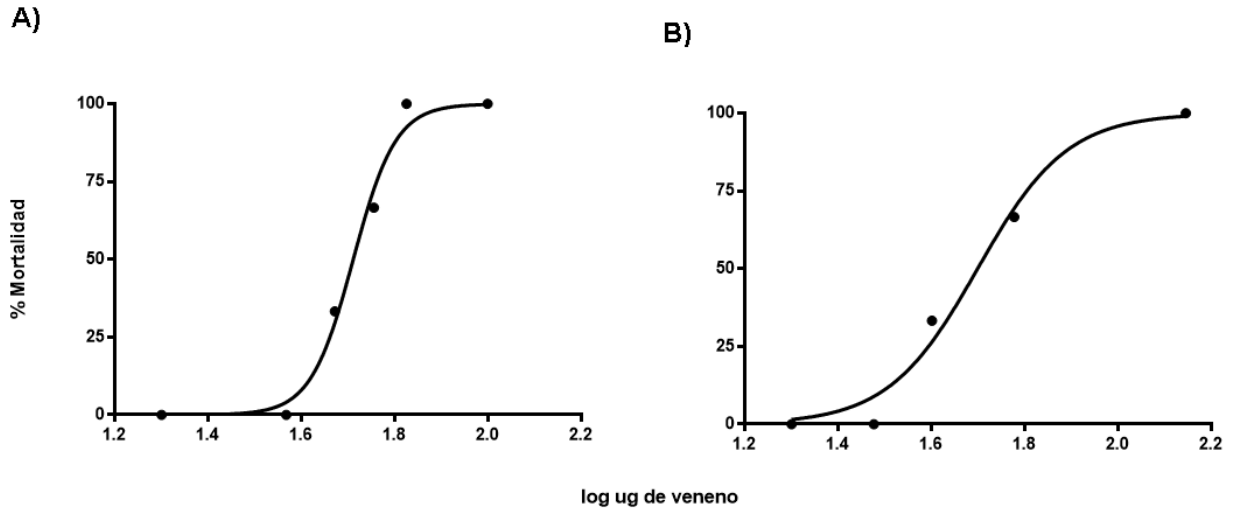


**Figura 28. Western-blot con anticuerpos monoclonal anti-SMD de la proteína SMD-linker-crotamina..**  
A) SDS-PAGE 12.5 %. B) western-blot con anticuerpo monoclonal 3B10  $\alpha$ -SMD, carriles: 1. Marcador de peso molecular; 2. Crotamina nativa; 3. SMDr; 4. SMD-linker-crotamina pura.

### 10.7 Pruebas de toxicidad en ratones de la proteína de fusión SMD-(linker)-crotamina

Con la finalidad de identificar síntomas de toxicidad y definir la  $DL_{50}$  de la proteína SMD-crotamina, se inyectaron, via i.v., ratones CD-1 con diferentes dosis de la proteína de fusión purificada. El valor estimado de  $DL_{50i.v.}$  fue de 51.5  $\mu$ g/ratón (intervalo de confianza 95 %: 45.7 a 57.9  $\mu$ g) (Figura 29). Es importante destacar que los síntomas observados en los ratones fueron más semejantes a los descritos por la SMDr sola sin presentarse algún síntoma de crotamina aún con dosis altas administradas (150  $\mu$ g/ratón). La  $DL_{50i.v.}$  de la SMD-linker-crotamina fue muy parecida con un valor de 49  $\mu$ g/ratón (intervalo de confianza 95 %: 41 a 58  $\mu$ g), y durante su determinación de igual manera no fueron evidenciados síntomas de envenenamiento por crotamina.





**Figura 29. Curva dosis respuesta calculada con el programa GraphPad Prism® para la determinación de la  $DL_{50i.v.}$  de las proteínas de fusión SMD-crotamina (A) y SMD-linker-crotamina (B). Los valores de  $LD_{50i.v.}$  fueron de 51.5 y 49  $\mu\text{g}/\text{ratón}$  por la proteína SMD-crotamina y SMD-linker-crotamina, respectivamente.**

### 10.8 Títulos de anticuerpos hacia venenos completos de conejos inmunizados

Dado que el veneno completo de las especies *C. m. nigrescens* y *C. o. helleri* fueron usados como inmunógenos en la inmunización de conejos, se deseó saber cual era el valor de título hacia el veneno completo de estas especies. En la figura 30 se muestran en gráfica los títulos de anticuerpos hacia el veneno de *C. m. nigrescens* de las sangrías tomadas durante el esquema de inmunización. Se puede observar que los valores de título hacia el veneno completo iban en aumento para los dos conejos llegando a picos máximos de título de 14, 477 para el conejo A (día 91) y 19, 871 para el conejo B (día 100). Es importante mencionar que previó a la sangría final y durante la última inyección de veneno sin adyuvante (7 mg), el conejo A del grupo “anti-molossus” sufrió síntomas graves, parecidos a los observados en ratones provocados por crotamina, situación que generó la muerte de este conejo. Por el lado del grupo “anti-oreganus”, sólo se midió el valor de título perteneciente al pool de sueros de la última sangría hacia el veneno de *C. o. helleri* el cual arrojó un valor de 18, 054.

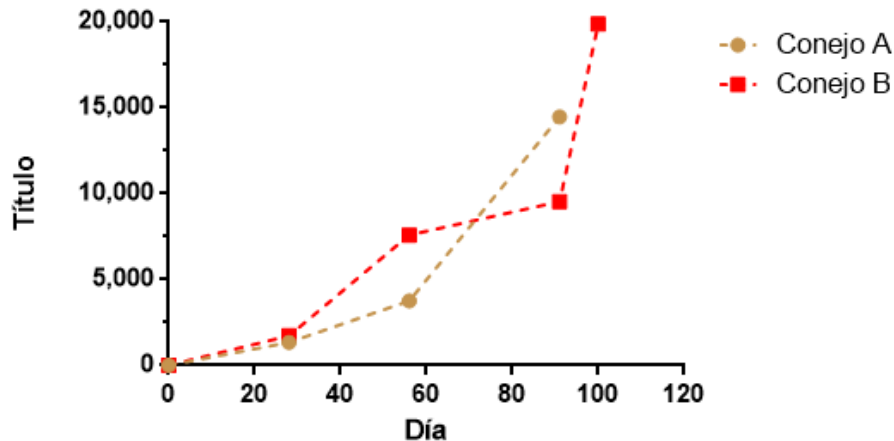


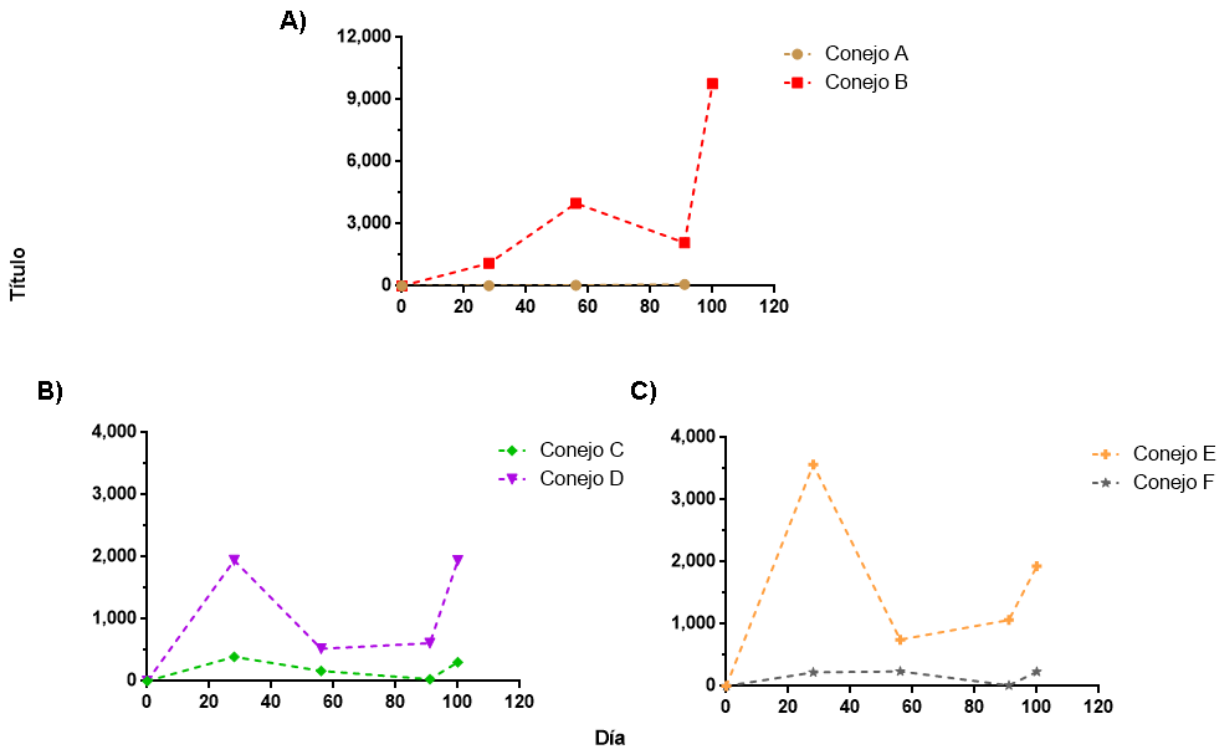
Figura 30. Títulos de anticuerpos de muestras de suero contra el veneno completo de *C. m. nigrescens* generados durante el esquema de inmunización del grupo de conejos “anti-molossus”.

### 10.9 Títulos de anticuerpos de conejos hacia crotamina de conejos inmunizados

Dado que la secuencia de crotamina expresada de manera recombinante dentro de la proteína SMD-(linker)-crotamina pertenece a la especie *C. m. nigrescens*, se realizó el seguimiento de títulos de anticuerpos hacia la crotamina de esta especie de muestras de sueros de los grupos “anti-molossus”, “anti-SMD-crotamina” y “anti-SMD-linker-crotamina”. En la figura 31 se puede observar que el título de la primera sangría (Día 28) fue alto para el conejo E dentro del grupo anti-SMD-linker-crotamina con valor (3,383). Este valor fue tres veces mayor en magnitud comparado con el valor observado dentro del grupo “anti-molossus” para el conejo B (1,000). Durante el esquema de inmunización los resultados de cada grupo mostraron variación individual dentro de los grupos inmunizados.

El valor de título hacia crotamina para el conejo B dentro del grupo “anti-molossus” en la última sangría (Día 100) fue alto (9,765), mientras que el conejo A dentro del mismo grupo, en su última sangría antes de ser dado de baja (día 91) mantuvo un valor cercano a 40. Por otro lado, existieron diferencias en el valor de título de la última sangría (día 100) dentro de cada grupo de conejos inmunizados con las proteínas recombinantes,

encontrando así los valores más altos de título para los conejos D (1,940) y E (1,931) dentro de grupo anti-SMD-crotamina y anti-SMD-linker-crotamina, respectivamente (Figura 31.B.C.). Por el lado del grupo “anti-oreganus”, sólo se midió el valor de título perteneciente al pool de sueros de la última sangría hacia crotamina obteniendo un valor de 11,048.

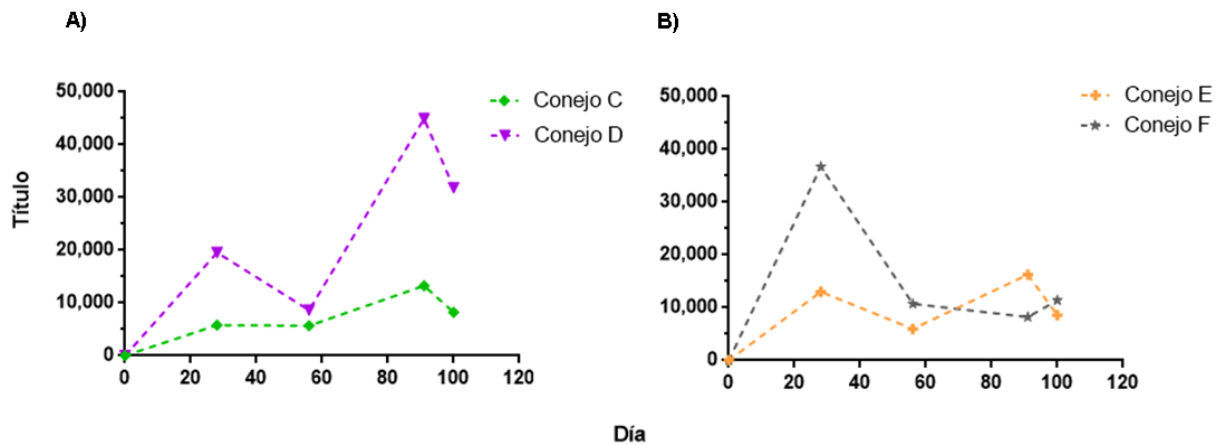


**Figura 31. Títulos de anticuerpos contra crotamina presentes en muestras individuales de suero tomadas durante el esquema de inmunización correspondiente. A) Grupo “anti-molossus”. B) Grupo “anti-SMD-crotamina”. C) Grupo “anti-SMD-linker-crotamina”.**

### 10.10 Títulos de anticuerpos hacia SMDr de conejos inmunizados

Con la finalidad de identificar si la proteína SMD-(linker)-crotamina también estaba generando anticuerpos hacia la SMDr sola al ser el componente mayoritario de la proteína (~ 85 %), se midieron los títulos de ELISA hacia esta proteína. En la figura 32 se muestran los valores de título de los cuatro conejos inmunizados con la proteína de fusión recombinante en sus dos versiones, se puede observar que durante el esquema de

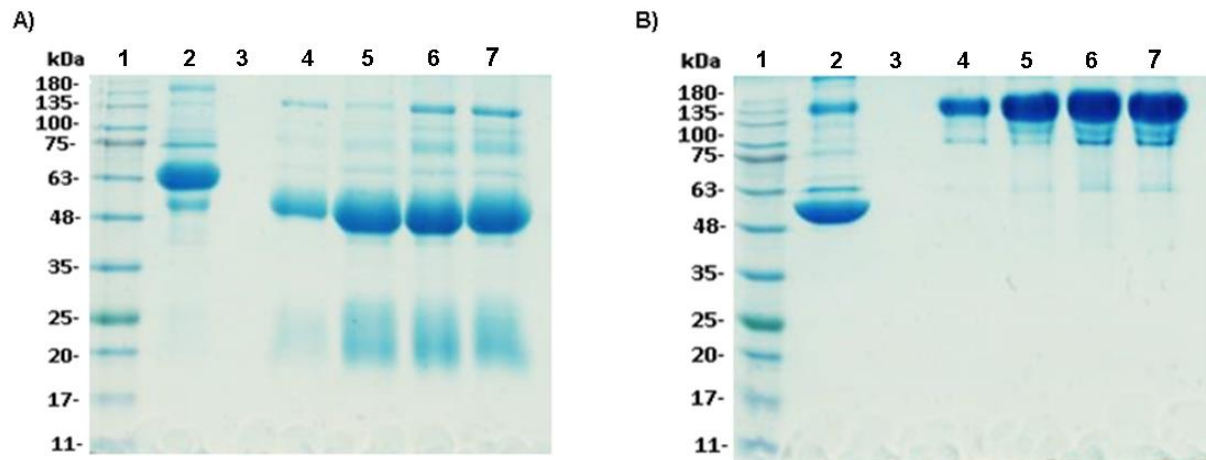
inmunización, el valor más bajo fue en el día 28 para el conejo C (5,391) mientras que el valor más alto se presentó en el día 91 para el conejo D (44,930).



**Figura 32. Títulos de anticuerpos individuales hacia SMDr sola durante esquema de inmunización.** A) Grupo anti-SMD-crotamina. B) Grupo anti-SMD-linker-crotamina.

### 10.11 Generación de antivenenos experimentales

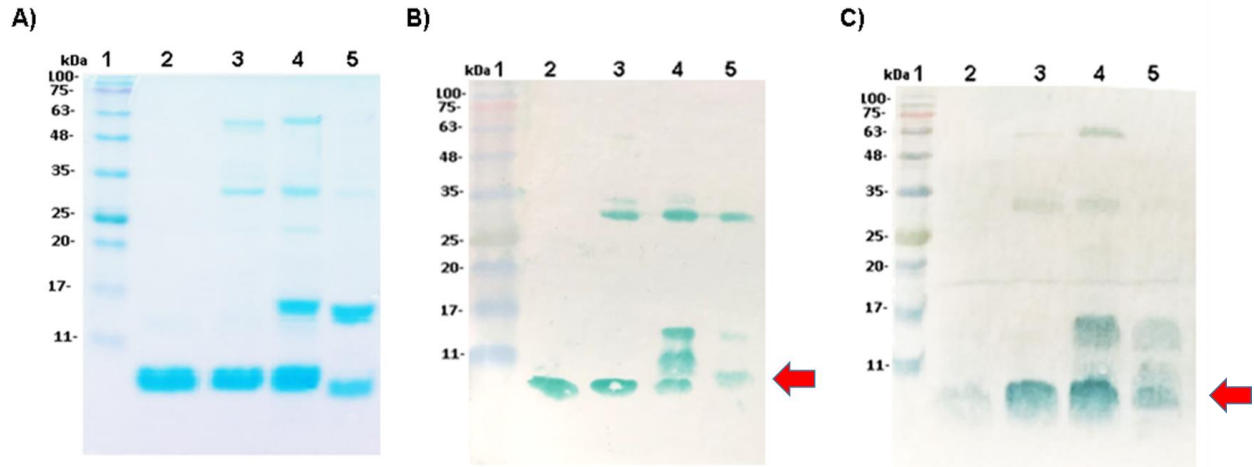
Un total de 4 antivenenos experimentales fueron generados mediante la purificación de IgGs por el método de ácido caprílico a partir de sueros de cada grupo de conejos. Por el lado del grupo “anti-molossus” sólo se empleó el suero del conejo B dado que el conejo A no generó anticuerpos contra crotamina y murió al final del esquema de inmunización. En la figura 33.A, se puede observar que bajo condiciones reductoras, todos los antivenenos mostraron bandas dominantes de ~ 25 kDa y ~ 50 kDa pertenecientes a las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos (IgGs), respectivamente. En condiciones no reductoras (Figura 33.B), todos los antivenenos mostraron bandas dominantes de 150 kDa correspondientes al peso de una inmunoglobulina G completa. Bajo las dos condiciones de corrida, se observó que la albúmina serica de conejo (~ 65 kDa) fue eliminada con el proceso de purificación.



**Figura 33. Análisis de anticuerpos purificados.** SDS-PAGE 12.5%, 15 µg/carril a excepción de carril 4 (7 µg). 1: Marcador de peso molecular; 2: Suero crudo de conejo; 3: Vacío; 4: Anticuerpos “anti-molossus”; 5: anticuerpos “anti-oreganus”; 6: anticuerpos “anti-SMD-crotamina”; 7: anticuerpos “anti-SMD-linker-crotamina”. Condiciones reductoras (A) y condiciones no reductoras (B).

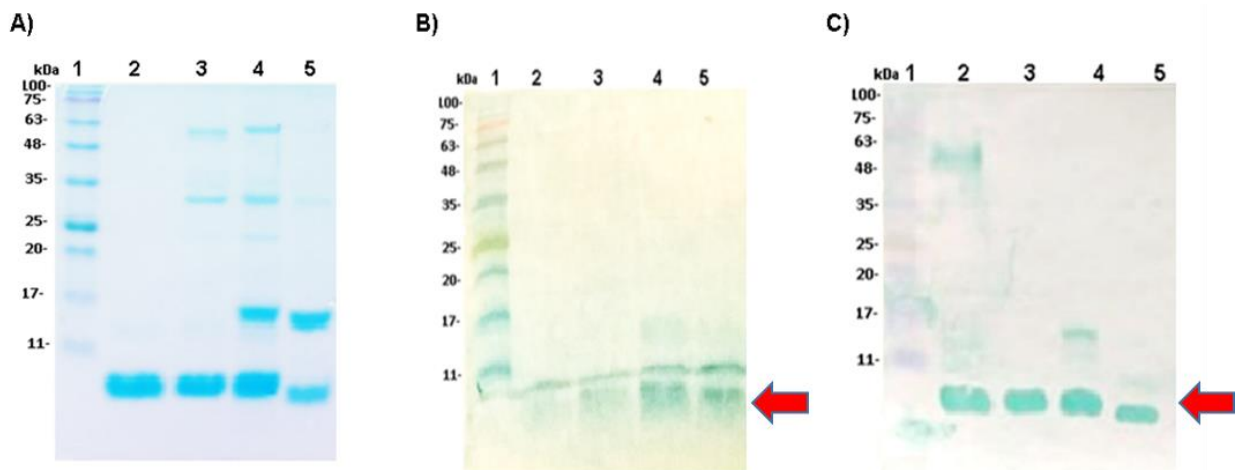
## 10.12 Western-blot de reconocimiento de crotamina por antivenenos experimentales

Con la finalidad de evaluar el reconocimiento lineal hacia crotaminas de tres especies de serpiente de cascabel (*C. m. nigrescens*, *C. o. helleri* y *C. d. terrificus*), se realizó un ensayo de reconocimiento wester-blot en condiciones desnaturalizantes empleando los 4 antivenenos experimentales generados. En primer lugar, los antivenenos “anti-molossus” y “anti-oreganus” mostraron reconocimiento hacia las crotaminas (~ 5 kDa) de las diferentes especies (Figura 34). Asimismo, se observó reconocimiento hacia componentes de mayor peso molecular como son las fosfolipasas A<sub>2</sub> (~ 15 kDa), serinproteasas (~ 33 kDa) y metaloproteasas P-III (~ 63 kDa), este último componente fue reconocido solamente por el antiveneno “anti-oreganus”.



**Figura 34. Western-blot de anticuerpos generados con venenos completos.** SDS-PAGE al 15 % en condiciones reductoras teñido con azul de Coomassie (A):15 µg/carril a excepción de carril 2 (5 µg): 1: Marcador de peso molecular; 2: Crotamina purificada; 3: Veneno completo *C. m. nigrescens*; 4: *C. o. helleri*; 5: *C. d. terrificus*. Western-blot en el mismo orden de corrida pero con 7 µg/carril a excepción de carril 2 (3 µg). Anticuerpo primario: antiveneno experimental “anti-molossus” en concentración de 10 µg/mL (B) y antiveneno experimental “anti-oreganus” en la misma concentración (C). Anticuerpo secundario: Goat anti-rabbit HRP en dilución 1:4,000. Revelado 3 mL de buffer TMB®. Las flechas indican el reconocimiento de crotamina (~ 5 kDa).

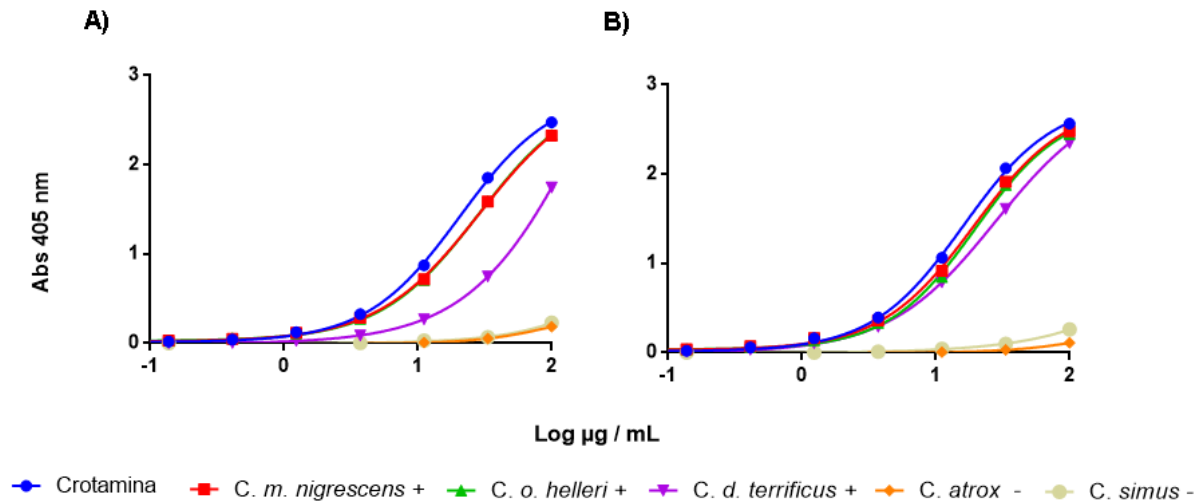
Por el lado de los anticuerpos generados con las dos versiones de la proteína recombinante SMD-crotamina con linker y sin linker, se puede observar que existió actividad cruzada de reconocimiento hacia la crotamina nativa purificada del veneno de *C. m. nigrescens* y las crotaminas de las diferentes especies de víbora de cascabel (Figura 35).



**Figura 35. Western-blot de anticuerpos generados con las proteínas de fusión recombinantes.** SDS-PAGE al 15 % en condiciones reductoras teñido con azul de Coomasie (A): 15  $\mu$ g/carril a excepción de carril 2 (5  $\mu$ g): 1: Marcador de peso molecular; 2: Crotamina purificada; 3: Veneno *C. m. nigrescens*; 4: *C. o. helleri*; 5: *C. d. terrificus*. Western-blot en el mismo orden de corrida pero con 7  $\mu$ g/carril a excepción de carril 2 (3  $\mu$ g). Anticuerpo primario: antiveneno experimental anti-SMD-crotamina en concentración de 10  $\mu$ g/mL (B) y antiveneno experimental anti-SMD-linker-crotamina en la misma concentración (C). Anticuerpo secundario: Goat anti-rabbit HRP en dilución 1:4,000. Revelado 3 mL de buffer TMB<sup>®</sup>. Las flechas indican el reconocimiento de crotamina (~ 5 kDa).

### 10.13 Especificidad de antivenenos experimentales generados con la proteína recombinante hacia crotamina por ELISA

Para saber el nivel de reconocimiento conformacional hacia crotamina por los anticuerpos generados con las proteínas recombinantes SMD-crotamina y SMD-linker-crotamina, se realizaron pruebas de ELISA con los antivenenos experimentales. Como antígenos se emplearon la crotamina purificada, los venenos completos de *C. m. nigrescens*, *C. o. helleri* y *C. d. terrificus*, así como dos venenos carentes de crotamina (*C. simus* y *C. atrox*). Los resultados indicaron una alta especificidad de reconocimiento hacia crotamina, tanto para los venenos enriquecidos con crotamina como para la toxina purificada, por ambos antivenenos experimentales. Asimismo, el reconocimiento hacia los controles negativos fue nulo o bajo por ambos antivenenos (Figura 36).

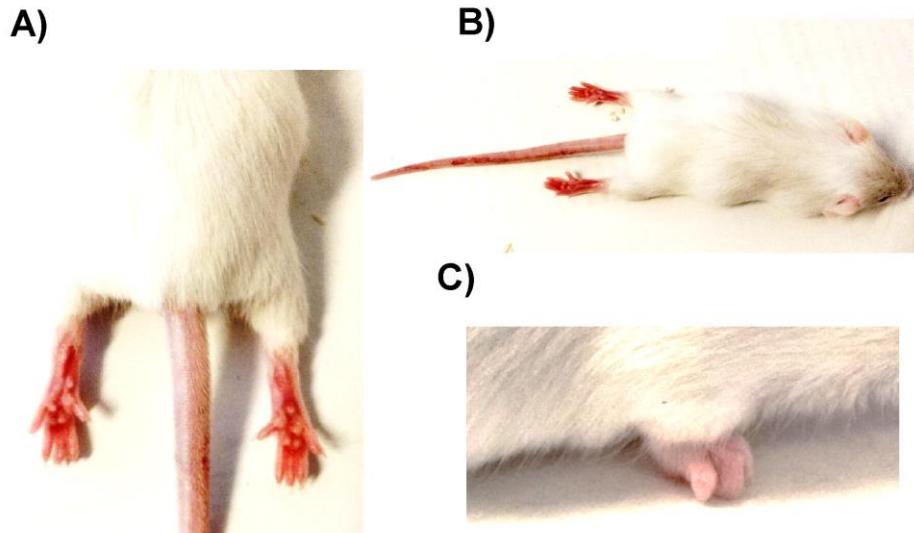


**Figura 36. Curvas de reconocimiento por ELISA hacia crotamina dentro de venenos completos por anticuerpos generados por proteínas de fusión recombinantes.** A) Títulos de anticuerpos ( $\mu\text{g/mL}$ ) anti-SMD-crotamina: Crotamina purificada (20.62); *C. m. nigrescens* (28.9); *C. o. helleri* (28.4); *C. d. terrificus* (183. 2); *C. atrox* (indefinido) y *C. simus* (indefinido). B) Títulos de anticuerpos ( $\mu\text{g/mL}$ ) anti-SMD-linker-crotamina: Crotamina purificada (16.05); *C.m. nigrescens* (19.26); *C. o. helleri* (19.77); *C. d. terrificus* (28.0); *C. atrox* (indefinido) y *C. simus* (indefinido).

#### 10.14 Neutralización de parálisis espástica de crotamina por antivenenos experimentales

En la tabla 11 se muestran los resultados de neutralización de parálisis generada por 30  $\mu\text{g}$  de cada veneno completo y 15  $\mu\text{g}$  de crotamina purificada. Los resultados se muestran en términos de dosis efectiva media ( $DE_{50}$ ) haciendo referencia a la dosis de antiveneno experimental que protege a la mitad de una población de la parálisis espástica provocada por crotamina. Es importante destacar que se observó el síntoma de parálisis espástica en ratones inyectados con inmunoglobulinas del suero pre-inmune incubadas con veneno o crotamina. Dicho sintoma se manifestó inmediatamente y tardó  $\sim 2$  h en desaparecer (Figura 37).





**Figura 37. Síntoma de parálisis espástica en ratones provocada por crotamina en grupo de ratones control (sin antiveneno).** A) Extremidades posteriores paralizadas por crotamina. B) Cuerpo completo de ratón paralizado por crotamina. C) Extremidades anteriores con dedos contraídos por parálisis.

Todos los antivenenos fueron capaces de neutralizar a crotamina debido a la ausencia de síntomas de parálisis espástica inclusive a tiempos mayores a 30 min de observación. Interesantemente, existió actividad cruzada de neutralización por los antivenenos “anti-oreganus” y “anti-molossus” contra la crotamina de los diferentes venenos evaluados. El antiveneno más eficiente fue el de “anti-oreganus” ya que necesitó dosis de anticuerpos < 1 mg para neutralizar a las crotaminas de los diferentes venenos y la crotamina purificada, mientras que el resto de los antivenenos necesitaron dosis > 1 mg para lograr dicha neutralización. Los antivenenos generados contra las proteínas recombinantes SMD-crotamina y SMD-linker-crotamina linker sólo fueron evaluados contra el veneno de *C. m. nigrescens* o su crotamina purificada y éstos mostraron protección de la parálisis rígida, pero a dosis elevadas de anticuerpos administrados (>15 mg/ratón).

**Tabla 11. Neutralización de parálisis espástica provocada por crotamina por antivenenos experimentales**

Veneno o toxina	DE <sub>50i.v.</sub> (mg AV)			
	Anti-molossus (mg)	Anti-oreganus (mg)	Anti-SMD-crotamina (mg)	Anti-SMD-linker-crotamina (mg)
<b>Crotamina purificada</b>	1.24 (0.7 a 2.1)	0.89 (0.83 a 0.94)	15.6 (14.8 a 16.5)	15.6 (14.8 a 16.5)
<b><i>C.m. nigrescens</i></b>	1.32 (1.1 a 1.5)	0.68 (0.5 a 0.9)	18.0 (16.9 a 19.0)	16.36 (14.4 a 18.5)
<b><i>C. o. helleri</i></b>	1.32 (0.7 a 2.3)	0.59 (0.4 a 0.78)	N.D.	N.D.
<b><i>C.d. terrificus</i></b>	1.21 (1.0 a 1.4)	0.75 (0.53 a 1.0)	N.D.	N.D.

DE<sub>50</sub>: Dosis de antiveneno (AV) que salva al 50 % de una población de la parálisis rígida provocada por 30 µg de los diferentes venenos completos o 15 µg de crotamina purificada, inyectados por vía intravenosa (i.v). Los intervalos de confianza se muestran dentro del paréntesis.

N.D. No determinado.

## 11. Discusión

### 11.1 Neutralización de crotamina por antivenenos mexicanos

Dada la gran diversidad de serpientes de cascabel en México y la alta variabilidad encontrada en sus venenos, es de suma importancia que los antivenenos mexicanos sean efectivos en el tratamiento clínico de cualquier envenenamiento por estas especies. Para serpientes de cascabel, se ha propuesto que estos antídotos deben neutralizar los efectos tóxicos provocados por los siguientes componentes presentes en sus venenos: metaloproteasas PI y PIII, serinproteasas, fosfolipasas A<sub>2</sub> (Incluyendo pre-sinápticas neurotóxicas), proteínas Lectinas tipo C y crotamina (Durban *et al.*, 2017). Aunque existe evidencia de la neutralización de antivenenos mexicanos contra las principales actividades biológicas de algunos venenos asociadas a estos componentes (Sánchez *et al.*, 2003, 2020), también ha sido comprobado que la crotamina presente en venenos de importancia médica en México, como lo es *C. m. nigrescens*, no es neutralizada por ninguno de los dos antivenenos mexicanos (Borja *et al.*, 2018).

En general, se ha propuesto que la ausencia de anticuerpos anti-crotamina en los antivenenos antiviperinos es debido a que los venenos de serpiente de cascabel usados como inmunógenos carecen de esta toxina o la presentan en muy baja proporción (Tasima *et al.*, 2020). Lo anterior ayuda a explicar la ausencia de anticuerpos anti-crotamina en los antivenenos mexicanos (Borja *et al.*, 2018) debido a que la proporción de crotamina presente en los venenos usados como inmunógenos puede ser nula o variable de acuerdo a los estudios de caracterización bioquímica de estos venenos: *C. simus* usado en Antivipmyn® (Castro *et al.*, 2013) y *C. basiliscus* usado por BIRMEX® (Segura *et al.*, 2017). La segunda explicación tiene que ver con una posible baja inmunogenicidad de crotamina que ha sido observada en la experiencia del laboratorio, ya que esta toxina genera bajos títulos de anticuerpos en ratones inmunizados (Losoya, 2019). Asimismo, conjugados químicos de crotamina, con otros componentes del veneno de *C. d. terrificus*, empleados como inmunógenos generaron títulos de anticuerpos que no son neutralizantes de la parálisis de esta toxina (Castillo, 2019).

Debido a que las intoxicaciones causadas por venenos con altas concentraciones de crotamina generan problemas musculares y respiratorios en humanos envenenados

(Keyler *et al.*, 2020), es de suma importancia asegurar la neutralización hacia esta toxina. Es por ello que la presente investigación se centró en lograr la neutralización de crotamina mediante la evaluación como inmunógenos de dos venenos completos ricos en crotamina (*C. m. nigrescens* y *C. o. helleri*) y una nueva proteína recombinante compuesta por la enzima esfingomielinasa D de *L. reclusa* y crotamina de la serpiente *C. m. nigrescens*, expresada en bacteria (*E. coli*).

### **11.2 Secuencias de crotamina aisladas**

Como primer paso de investigación se aislaron las isoformas de crotamina presentes en los transcritos de ARNm de la glándula de un individuo de *C. m. nigrescens* (CM16) cuyo veneno tenía esta toxina (Borja *et al.*, 2018). Se encontraron tres secuencias de crotamina (Figura 17), dos de ellas (AISI y GISI) coincidieron con 100 % de identidad en los primeros 34 aminoácidos secuenciados de una isoforma del veneno de la misma especie (Borja *et al.*, 2018). Por lo tanto, es probable que cualquiera de las dos isoformas puedan presentarse en el veneno del individuo estudiado. En contraste, la tercera isoforma encontrada (QIWCR), aunque mantiene el patrón de cisteínas y la secuencia péptido señal, su secuencia N-terminal tiene cambios importantes en los primeros dos aminoácidos (Q e I), los cuales es posible que afecten a la actividad de esta isoforma a nivel de proteína ya que se ha sugerido que los primeros dos aminoácidos (Y y K) están involucrados con la actividad de bloqueo a canales de potasio dependientes de voltaje (Peigneur *et al.*, 2012; Yount *et al.*, 2009). Sin embargo, es importante aclarar que las tres secuencias de crotamina encontradas en la presente investigación pueden no representar las de la especie *C. m. nigrescens*, ya que una muestra de veneno de un individuo de la misma especie presenta hasta 7 isoformas de crotamina con la misma actividad biológica de parálisis, pero masas moleculares variables (Borja *et al.*, 2018).

### **11.2 Obtención de proteína de fusión entre SMD y crotamina**

Obtenidas las secuencias de crotamina se procedió a realizar la construcción de un plásmido bacteriano permisivo de la expresión de las proteínas de fusión en sus dos

formatos: con linker G<sub>4</sub>S y con linker corto de dos aminoácidos (VD). La proteína pudo obtenerse de manera soluble con rendimientos de 4 a 9 mg/L de cultivo, el cual fue semejante al obtenido con la expresión de la SMDr sola que es de ~ 5 mg/L en la misma cepa de *E. coli* (Olvera *et al.*, 2006). En cuanto a la actividad biológica medida en estas proteínas recombinantes, cabe destacar que el valor de DL<sub>50i.v.</sub> fue muy parecido, entre las dos versiones de la proteína de fusión (Figura 29). La toxicidad de ambas proteínas recombinantes fue cinco veces menor que la toxicidad provocada por la SMDr de *L. reclusa*, con valor DL<sub>50i.v.</sub> de 9.3 µg/ratón (datos de laboratorio) y ~ 1.2 veces menor a la toxicidad de crotamina (DL<sub>50i.v.</sub>= 42.3 µg/ratón) de la misma especie (Borja *et al.*, 2018). Es importante aclarar que, durante la expresión de las proteínas recombinantes se generaron isoformas que conservaron la etiqueta de 6 His y se obtuvieron de manera soluble, siendo éstas purificadas y detectadas por el anticuerpo 3B10 α-SMD y ligeramente por el anti-6His (Figuras 25 y 27). Por lo tanto, es probable que estas isoformas hayan tenido una disminución de la actividad enzimática de SMD dentro de proteína de fusión, lo cual explica la reducción de la toxicidad debido a que se ha sugerido que la actividad enzimática está ligada a la mortalidad en ratones (Olvera *et al.*, 2006).

En reportes anteriores, la expresión heteróloga de crotamina sólo ha sido posible en *E. coli* a manera de proteína de fusión con la proteína MBP con bajos rendimientos de cerca de 0.9 mg/L de cultivo (Trang *et al.*, 2014). La crotamina recombinante generada de esta manera presentaba actividad de bloqueo de canal de potasio Kv1.3 en ensayos patch-clamp de ovocito de rana (67.2 nM) y esta actividad se conservaba, aunque en menor magnitud, evaluando la proteína fusionada a la proteína MBP (477.6 nM) (Trang *et al.*, 2014). En nuestra investigación, la proteína SMD-(linker)-crotamina no generó ningún síntoma de crotamina (parálisis) en los ratones inyectados, aun con altas dosis administradas (150 µg/ratón). Sin embargo, la correcta obtención de crotamina dentro de la proteína de fusión, los rendimientos de expresión soluble y la actividad biológica observada para la proteína (letalidad), permitían iniciar el esquema de inmunización en conejos y evaluar si los éstos generaban anticuerpos neutralizantes contra crotamina.

### 11.3 Títulos de anticuerpos contra crotamina

En cuanto a la generación de anticuerpos hacia crotamina con el empleo de las proteínas recombinantes de fusión (SMD-crotamina y SMD-linker-crotamina), es importante mencionar que la actividad adyuvante de la SMD, previamente reportada por Barbaro, *et al.* (1994), no fue evidenciada en la presente investigación dado que los valores de título hacia crotamina fueron bajos comparados con los valores obtenidos con la crotamina nativa en los grupos de conejos inmunizados con el veneno de *C. m. nigrescens* (Figura 31) y el valor de título final para el pool de suero de conejos del grupo “anti-oreganus”. Lo anterior se puede explicar por el hecho de que la respuesta inmune pareció concentrarse en la porción mayoritaria de las proteínas de fusión, es decir la SMD que comprendía cerca del 86 % de la proteína recombinante tomando como evidencia los valores de títulos generados hacia la SMDr (Figura 32). Asimismo, es probable que dentro de los anticuerpos generados contra crotamina, los específicos neutralizantes hacia esta toxina se hayan visto reducidos por un posible mal plegamiento de la crotamina dentro de la proteína de fusión (SMD-crotamina y SMD-linker-crotamina). Por lo tanto, es necesario diseñar y evaluar nuevas proteínas recombinantes basadas en crotamina para su utilización como inmunógenos que permitan el mejor plegamiento de esta toxina para mejorar la generación de anticuerpos neutralizantes contra esta toxina.

Por otro lado, el pool de sueros obtenido al final del esquema de inmunización de los dos conejos inmunizados con el veneno de *C.o. helleri* mostró un valor de título de anticuerpos parecido al del conejo B inmunizado con el veneno de *C. m. nigrescens*, lo cual indicaba que las isoformas de crotamina de este veneno también estaban siendo inmunogénicas. Interesantemente, el conejo B fue el único en generar anticuerpos anti-crotamina dentro del grupo “anti-molossus” (Figura 32.A). En contraste, el conejo A dentro de este mismo grupo mostró síntomas de envenenamiento de crotamina e inclusive murió. Cuando se examinó el título de un suero de este conejo, tomado previamente, éste mostró títulos despreciables hacia crotamina, lo cual indicaba que aun después de varios estímulos antígenicos este conejo no había respondido hacia crotamina. Sin embargo, al sensibilizar la placa de ELISA con el veneno completo de *C. m. nigrescens* usado como inmunógeno, se observó que ambos conejos, presentaron títulos de anticuerpos altos hacia el resto de los componentes dentro del veneno completo, muy probablemente

metaloproteasas y serinproteasas, familias proteicas que estaban siendo bien reconocidas por los sueros de los dos conejos, A y B (Figura 30).

Dado que los grupos de conejos inmunizados con venenos completos generaron altos títulos de anticuerpos hacia crotamina, se puede descartar la baja inmunogenicidad de esta toxina debido a que se ha reportado que esta toxina, de manera nativa, genera anticuerpos en animales inmunizados (Ownby *et al.*, 1979; Saviola *et al.*, 2015; Teixeira-Araújo *et al.*, 2017; Vaz *et al.*, 2020). Por lo tanto, es más probable que la falta de respuesta observada en el conejo A del grupo “anti-molossus” hacia crotamina sea debido a un alto grado de variación individual de la respuesta inmune hacia ciertas toxinas por factores incontrolables, tales como el contexto genético del animal inmunizado (León *et al.*, 2011). Nuestros resultados son semejantes a lo observado con algunos venenos de cobra usados como inmunógenos, donde se obtiene un bajo nivel de anticuerpos neutralizantes en caballos inmunizados con dichos venenos (Ratanabanangkoon *et al.*, 1994). Asimismo, es probable que el conejo A dentro del grupo “anti-molossus” no haya generado anticuerpos por un posible daño a células presentadoras de antígeno por parte de crotamina ya que se sabe que esta toxina es capaz de provocar su internalización celular en ciertos tipos celulares (Hayashi *et al.*, 2008).

#### **11.4 Actividad cruzada de reconocimiento entre crotaminas**

Con los experimentos de western-blot se pudo detectar actividad cruzada de los anticuerpos generados contra los venenos completos hacia las crotaminas de las tres especies evaluadas: *C.m. nigrescens*, *C.o. helleri* y *C.d. terrificus* (Figura 34). Este resultado fue congruente con lo reportado por Li *et al.* (1993), quienes describieron que anticuerpos generados contra la crotamina de la serpiente *C.v.viridis* reconocían por western-blot a las crotaminas de las serpientes *C. adamanteus* y *C.d.terricus*. Esta reactividad cruzada puede deberse al alto grado de identidad (> 85%) que existe entre las diferentes isoformas de crotamina (Figura 3), y al hecho de tener uno o más epitopes compartidos entre ellas. Sin embargo, dado que es una toxina de bajo peso molecular, es probable que el número de epitopes hacia donde van dirigidos los anticuerpos sea

reducido ya que una investigación reciente ha logrado identificar un epítopo lineal que comprende de los aminoácidos 12 al 32 de crotamina, mismo que es principalmente reconocido por anticuerpos policlonales generados contra la crotamina de la serpiente *C. d. terrificus* (Vaz *et al.*, 2020). Por lo tanto, este epítopo lineal descrito para crotamina puede explicar que aun sin tener un plegamiento cercano a la crotamina nativa, la crotamina contenida dentro de la proteína de fusión SMD-crotamina y SMD-linker-crotamina, generó anticuerpos que reconocían a las crotamina de *C.m.nigresens*, *C.o.helleri* y *C.d.terrificus* tanto por western-blot como por ELISA (Figura 35 y 36).

### 11.5 Neutralización de parálisis espástica por crotamina

Las IgGs purificadas de los sueros hiperimunes con el método de ácido caprílico fueron evaluados contra la parálisis de crotamina. Dicha parálisis en ratones se ha clasificado como un efecto de “todo o nada”, refiriéndose a la aparición inmediata del síntoma con dosis adecuadas y dependiendo la vía de administración (Lima *et al.*, 2018). Por lo tanto, la dosis reto considerada en la presente investigación (15  $\mu\text{g}$  i.v. para crotamina purificada; 30  $\mu\text{g}$  i.v. venenos completos) fue ideal ya que todos los ratones control (sin antiveneno) presentaron inmediatamente el síntoma de parálisis espástica, el cual se mantuvo por tiempos cercanos a 2 h (Figura 37). Sin embargo, es importante aclarar que el método empleado para la generación de los antivenenos experimentales permite la purificación de IgGs del suero, y se ha estimado que, en antivenenos producidos por este método, solamente entre 20 y 40 % de estos anticuerpos están dirigidos a los antígenos de interés o toxinas (Segura *et al.*, 2013). Así, todos antivenenos experimentales generados fueron neutralizantes de la actividad de parálisis espástica provocada por crotamina de las diferentes especies, aunque en diferentes grados de efectividad (Tabla 11). Interesantemente, en experimentos de pre-incubación, el antiveneno “anti-molossus” fue neutralizante también de la letalidad provocada por la crotamina purificada ( $3\text{DL}_{50\text{i.v.}} = 125 \mu\text{g}/\text{ratón}$ ) con una dosis efectiva ( $\text{DE}_{50\text{i.v.}}$ ) de 15  $\text{mg}$  i.v. de anticuerpos, mismos que mantuvieron síntomas de parálisis por  $\sim 3$  h después de la inyección (Datos no mostrados). Este dato es interesante sobretodo si se toma en cuenta que los venenos de serpientes norteamericanas contienen altas proporciones de crotamina en sus venenos



(Tabla 4). Así, aunque los antivenenos mexicanos logren reactividad hacia crotamina, es probable que las dosis necesarias de antiveneno sean elevadas. Tal es el caso del antiveneno estadounidense CroFab® que, teniendo anticuerpos anti-crotamina (Saviola *et al.*, 2015), es administrado en altas dosis para la neutralización de síntomas por crotamina en casos clínicos (Richard C. Dart, comunicación personal, 2020).

Por otro lado, la proteína recombinante de fusión SMD-(linker)-crotamina generó anticuerpos contra crotamina que, como se observa en la tabla 11, neutralizan el síntoma de parálisis espástica de esta toxina del veneno de *C.m. nigrescens* y su toxina purificada. Dado que los niveles de títulos de anticuerpos generados hacia crotamina durante el esquema de inmunización fueron bajos (Figura 31), las altas dosis administradas de los anticuerpos anti-SMD-crotamina y anti-SMD-linker-crotamina necesarias para evitar la aparición de la parálisis espástica fueron altas (>15 mg). Estos datos son comparables con una investigación reciente que reportó la utilización de 15.3 mg de anticuerpos anti-toxina consenso de tres dedos (de origen recombinante) para inhibir la letalidad provocada por 19.5 µg (3LD<sub>50i.v.</sub>) del veneno de *Naja melanoleuca* (Rosa *et al.*, 2019).

En contraste, dado que los anticuerpos generados con las proteínas de fusión tuvieron títulos altos hacia la SMD (Figura 32), en términos de neutralización, sólo 1 mg de anticuerpos anti-SMD-crotamina y anti-SMD-linker-crotamina fueron suficientes para lograr el 100% de sobrevivencia de ratones inyectados con 3DL<sub>50i.v.</sub> de SMDr sola (28 µg) (Datos no mostrados). Lo anterior puede explicarse por la alta inmunogenicidad de la enzima SMD *per sé* y de sus proteínas homólogas (Moez *et al.*, 2020; Olvera, *et al.*, 2006), limitando así una generación de anticuerpos hacia crotamina.

Como resumen de este trabajo de investigación, se pudo comprobar que venenos ricos en crotamina generan anticuerpos neutralizantes de la parálisis espástica provocada por esta toxina, utilizando el modelo de conejo. Sin embargo, es importante señalar que dentro de una misma población de serpientes de cascabel existe variación en la proporción de crotamina en sus venenos (Borja *et al.*, 2018; Smith and Mackessy, 2016; Tasima *et al.*, 2020). Esta situación, aunada a otros factores, pueden dificultar la obtención de estos venenos enriquecidos con crotamina en las cantidades necesarias para la producción de antivenenos. Es por esta razón y dada la evidencia de generación

de anticuerpos neutralizantes anti-crotamina, que la proteína recombinante de fusión, SMD-(linker)-crotamina, se muestra como una buena alternativa para ser incorporada a esquemas de inmunización de caballos para la producción de anticuerpos anti-crotamina y lograr la mejora de los respectivos antivenenos.

## 12. Conclusiones

- Se obtuvo de manera soluble una proteína de fusión recombinante, compuesta por la enzima esfingolielinasa D y la toxina crotamina, en el modelo de expresión de *Escherichia coli*.
- Dos venenos completos ricos en crotamina (*C. m. nigrescens* y *C. o. helleri*), usados en altas dosis en esquemas de inmunización, generaron anticuerpos neutralizantes de la parálisis rígida provocada por crotamina.
- La proteína SMD-(linker)-crotamina fue capaz de generar anticuerpos específicos que reconocen a la crotamina de tres especies de serpiente de cascabel (*C. m. nigrescens*, *C.d. terrificus* y *C. o. helleri*), y neutralizan la crotamina homóloga de la especie *C. m. nigrescens*.

## 13. Perspectivas

- Incorporar la proteína SMD-(linker)-crotamina y/o venenos ricos en crotamina en esquemas de inmunización en caballos elevando las cantidades de inmunógeno usados en el esquema.
- Evaluar la neutralización de crotaminas de diferentes especies con los anticuerpos anti-SMD-(linker)-crotamina generados en caballos hiperinmunizados.
- Generar construcciones que contengan más de una molécula de crotamina acoplada a la SMD y explorar la generación de anticuerpos hacia crotamina.

## 14. Literatura citada

- Barbaro, K.C., Eickstedt, V.R.D., Mota, I., 1994. Adjuvant effect of *Loxosceles gaucho* (South American Brown Spider) venom. *Toxicon* 32, 687–693. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90338-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90338-7)
- Bieber, A.L., McParland, R.H., Becker, R.R., 1987. Amino acid sequences of myotoxins from *Crotalus viridis concolor* venom. *Toxicon* 25, 677–680. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(87\)90115-2](https://doi.org/10.1016/0041-0101(87)90115-2)
- Boni-Mitake, M., Costa, H., Spencer, P.J., Vassilieff, V.S., Rogero, J.R., 2001. Effects of <sup>60</sup>Co gamma radiation on crotamina. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34, 1531–1538. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2001001200004>
- Boni-mitake, M., Costa, H., Vassilieff, V.S., Rogero, J.R., 2006. I-labeled crotamina in mice tissues 48, 550–555. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.07.005>
- Borja, M., Neri-Castro, E., Pérez-Morales, R., Strickland, J.L., Ponce-López, R., Parkinson, C.L., Espinosa-Fematt, J., Jorge, S.-M., Flores-Martínez, E., Alagón, A., 2018. Ontogenetic Change in the Venom of Mexican Black- Tailed Rattlesnakes (*Crotalus molossus nigrescens*). *Toxins* 10, 1–27. <https://doi.org/10.3390/toxins10120501>
- Brazil, O.V., Prado-Franceschi, J., Laure, C.J., 1979. Repetitive muscle responses induced by crotamina. *Toxicon* 17, 61–67. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(79\)90256-3](https://doi.org/10.1016/0041-0101(79)90256-3)
- Bush, S.P., Green, S.M., Moynihan, J.A., Hayes, W.K., Cardwell, M.D., 2002. Crotalidae polyvalent immune Fab (ovine) antivenom is efficacious for envenomations by Southern Pacific rattlesnakes (*Crotalus helleri*). *Annals of Emergency Medicine* 40, 619–624. <https://doi.org/10.1067/mem.2002.129939>
- Calvete, J.J., Sanz, L., Cid, P., De La Torre, P., Flores-Díaz, M., Dos Santos, M.C., Borges, A., Bremo, A., Angulo, Y., Lomonte, B., Alape-Girón, A., Gutiérrez, J.M., 2010. Snake venomomics 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. *Journal of Proteome Research* 9, 528–544. <https://doi.org/10.1021/pr9008749>
- Cameron, D.L., Tu, A.T., 1978. Chemical and functional homology of myotoxin a from prairie rattlesnake venom and crotamina from south american rattlesnake venom. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Structure* 532, 147–154. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0005-2795\(78\)90457-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0005-2795(78)90457-9)
- Cameron, D.L., Tu, A.T., 1977. Characterization of Myotoxin a from the Venom of Prairie Rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). *Biochemistry* 16, 2546–2553. <https://doi.org/10.1021/bi00630a035>
- Casasola, A., Ramos-Cerrillo, B., de Roodt, A.R., Saucedo, A.C., Chippaux, J.P., Alagón, A., 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, 602–608. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.011>

Castillo Pérez, I. M. Producción de conjugados de crotamina y su evaluación como inmunógenos. Tesis de grado Maestría en ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México (2019). 114 pp.

Castro, E.N., Lomonte, B., del Carmen Gutiérrez, M., Alagón, A., Gutiérrez, J.M., 2013. Intraspecies variation in the venom of the rattlesnake *Crotalus simus* from Mexico: Different expression of crotoxin results in highly variable toxicity in the venoms of three subspecies. *Journal of Proteomics* 87, 103–121. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.024>

Chippaux, J.P., 2017. Incidence and mortality due to snakebite in the Americas, PLoS Neglected Tropical Diseases. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005662>

Cocchio, C., Johnson, J., Clifton, S., 2020. Review of North American pit viper antivenoms. *American Journal of Health-System Pharmacy* 77, 175–187. <https://doi.org/10.1093/ajhp/zxz278>

Coronado, M.A., 2013. research papers Structure of the polypeptide crotamina from the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* research papers 1958–1964. <https://doi.org/10.1107/S0907444913018003>

Doley, R., Kini, R.M., 2009. Protein complexes in snake venom. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66, 2851–2871. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0050-2>

Du, X.Y., Clemetson, K.J., 2002. Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon* 40, 659–665. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00102-2)

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, 3370–3390. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00414>

Espino-Solis, G.P., Licea-Navarro, A.F., Gurrola-Briones, Ga., Possani, L.D., 2009. Rapid immunization against scorpion toxin by in vivo targeting mice dendritic cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128, 276–277. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.143>

Gonçalves, R., Vargas, L.S., Lara, M.V.S., Güllich, A., Mandredini, V., Ponce-Soto, L., Marangoni, S., Dal Belo, C.A., Mello-Carpes, P.B., 2014. Intrahippocampal infusion of crotamina isolated from *Crotalus durissus terrificus* alters plasma and brain biochemical parameters. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11, 11438–11449. <https://doi.org/10.3390/ijerph111111438>

González-Rivera, D.A., Chico-Aldama, D.P., Domínguez-, Viveros, D.W., Iracheta-Gerez, D.M. de la L., López-Alquicira, D.M., Cuellar-Ramírez, D.A., Zamora, E.V., 2009. Epidemiología de las mordeduras por serpiente. Su simbolismo. *Acta Pediatr Mex* 30, 182–191.

Griffin, P.R., Aird, S.D., 1990. A new small myotoxin from the venom of the prairie

- rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). *FEBS Letters* 274, 43–47. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81325-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81325-1)
- Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., Habib, A.G., Harrison, R.A., Williams, D.J., Warrell, D.A., 2017. Snakebite envenoming. *Nature reviews. Disease primers* 3, 17063. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.63>
- Hayashi, M.A.F., 2017. Crotamine: Function Diversity and Potential Applications 12 265–293. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6410-1>
- Hayashi, M.A.F., Nascimento, F.D., Kerkis, A., Oliveira, V., Oliveira, E.B., Pereira, A., Rádis-Baptista, G., Nader, H.B., Yamane, T., Kerkis, I., Tersariol, I.L.S., 2008. Cytotoxic effects of crotamina are mediated through lysosomal membrane permeabilization. *Toxicon* 52, 508–517. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.06.029>
- Hernández, C.G.S., Bravo, A.A., 2009. Mordeduras por serpiente venenosa: panorama epidemiológico en México Señor. *Salud Pública de México* 51, 51–52.
- Herrera, C., Escalante, T., Voisin, M.B., Rucavado, A., Morazán, D., Macêdo, J.K.A., Calvete, J.J., Sanz, L., Nourshargh, S., Gutiérrez, J.M., Fox, J.W., 2015. Tissue Localization and Extracellular Matrix Degradation by PI, PII and PIII Snake Venom Metalloproteinases: Clues on the Mechanisms of Venom-Induced Hemorrhage. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003731>
- Kerkis, I., Hayashi, M.A.F., Prieto, A.R.B., Pereira, A., Luiz, P., Júnior, D.S., Zaharenko, A.J., Rádis-baptista, G., Kerkis, A., Yamane, T., 2014. State of the Art in the Studies on Crotamine , a Cell Penetrating Peptide from South American Rattlesnake 2014.
- Keyler, D.E., Saini, V., O’Shea, M., Gee, J., Smith, C.F., Mackessy, S.P., 2020. *Crotalus oreganus concolor*: Envenomation Case with Venom Analysis and a Diagnostic Conundrum of Myoneurologic Symptoms. *Wilderness and Environmental Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.wem.2019.12.007>
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lambrecht, B.N., Kool, M., Willart, M.A.M., Hammad, H., 2009. Mechanism of action of clinically approved adjuvants 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.01.004>
- Laure, C.J., 1975. Die Primärstruktur des Crotamins. *Hoppe-Seyler’s Z. Physiol. Chem.* 356, 213–215.
- Legros, C., Kaabi, H., El Ayeb, M., Céard, B., Vacher, H., Bougis, P.E., Martin-Eauclaire, M.F., 2001. Use of fusion protein constructs to generate potent immunotherapy and protection against scorpion toxins. *Vaccine* 20, 934–942. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00379-6](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00379-6)
- León, G., Sánchez, L., Hernández, A., Villalta, M., Herrera, M., Segura, A., Estrada, R., Gutiérrez, J.M., 2011. Immune response towards snake venoms. *Inflammation Allergy Drug Targets* 10, 381–398. [https://doi.org/BSP/IA-DT/E-Pub 00082 \[pii\]](https://doi.org/BSP/IA-DT/E-Pub 00082 [pii])

- Li, Q., Colberg, T.R., Ownby, C.L., 1993. A simple and rapid method for isolating small myotoxins from rattlesnake venoms. *Toxicon* 31, 1197–1201. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(93\)90135-6](https://doi.org/10.1016/0041-0101(93)90135-6)
- Lima, C., Lima, S.D.C., Porta, L.D.C., Campeiro, D.A., Meurer, Y., Oliveira, E.B., Picolo, G., Godinho, R.O., Silva, R.H., Akemi, M., Hayashi, F., 2018. Pharmacological characterization of crotamina effects on mice hind limb paralysis employing both ex vivo and in vivo assays : Insights into the involvement of voltage-gated ion channels in the crotamina action on skeletal muscles. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12, 1–25. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006700>
- Lomonte, B., Rangel, J., 2012. Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A 2 to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicon* 60, 520–530. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.02.007>
- Losoya Uribe, L. F. Obtención de anticuerpos monoclonales anti-crotamina del veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Tesis de grado Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México (2019). 83 pp.
- Lorke, D., 1983. A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology* 54, 275–287. <https://doi.org/10.1007/BF01234480>
- Maeda, N., Tamiya, N., Pattabhiraman, T.R., Russell, F.E., 1978. Some chemical properties of the venom of the rattlesnake, *Crotalus viridis helleri*. *Toxicon* 16, 431–441. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101\(78\)90140-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101(78)90140-X)
- Margres, M.J., McGivern, J.J., Wray, K.P., Seavy, M., Calvin, K., Rokyta, D.R., 2014. Linking the transcriptome and proteome to characterize the venom of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *Journal of Proteomics* 96, 145–158. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.11.001>
- Massey, D.J., Calvete, J.J., Sánchez, E.E., Sanz, L., Richards, K., Curtis, R., Boesen, K., 2012. Venom variability and envenoming severity outcomes of the *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) from Southern Arizona. *Journal of Proteomics* 75, 2576–2587. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.02.035>
- Mebs, D., Ehrenfeld, M., Samejima, Y., 1983. Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: Relationship to serum creatine kinase. *Toxicon* 21, 393–404. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(83\)90096-X](https://doi.org/10.1016/0041-0101(83)90096-X)
- Mebs, D., Ownby, C.L., 1990. Myotoxic components of snake venoms: Their biochemical and biological activities. *Pharmacology and Therapeutics* 48, 223–236. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(90\)90081-C](https://doi.org/10.1016/0163-7258(90)90081-C)
- Moez, A.S., Sajedi, R.H., Bagheri, K.P., Sabatier, J.M., Shahbazzadeh, D., 2020. Novel mutant phospholipase D from hemiscorpius lepturus acts as A highly immunogen in BALB/c mice against the lethality of scorpion venom. *Molecules* 25, 1–20. <https://doi.org/10.3390/molecules25071673>
- Nascimento, F.D., Hayashi, M.A.F., Kerkis, A., Oliveira, V., Oliveira, E.B., Rádis-Baptista, G., Nader, H.B., Yamane, T., Tersariol, I.L.D.S., Kerkis, I., 2007. Crotamine mediates

- gene delivery into cells through the binding to heparan sulfate proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry* 282, 21349–21360. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604876200>
- Oguiura, N., Ra, G., 2005. New view on crotamina , a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom 46, 363–370. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.06.009>
- Oliveira, P., Giuseppe, D., Ullah, A., Trevisan, D., Helena, L., Carolina, A., Wille, M., Chaves, D., Senff, A., Meiri, O., Tyago, M., Sanches, S., Krishnaswamy, R., 2011. Biochemical and Biophysical Research Communications Structure of a novel class II phospholipase D : Catalytic cleft is modified by a disulphide bridge. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 409, 622–627. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.05.053>
- Olvera, A., Ramos-Cerrillo, B., Este, J., Clement, H., de Roodt, A., Paniagua-Solís, J., Vázquez, H., Zabaleta, A., Arruz, S.M., Stock, R.P., Alagón, A., 2006. North and South American *Loxosceles* spiders : Development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens. *Toxicon* 48, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.04.010>
- Ownby, C.L., Colberg, T.R., Claypool, P.L., Odell, G. V., 1984. In vivo test of the ability of antiserum to myotoxin a from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom to neutralize local myonecrosis induced by myotoxin a and homologous crude venom. *Toxicon* 22, 99–105. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101\(84\)90142-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101(84)90142-9)
- Ownby, C.L., Colberg, T.R., Odell, G. V., 1985. Ability of a mixture of antimyotoxin a serum and polyvalent (*Crotalidae*) antivenin to neutralize myonecrosis, hemorrhage and lethality induced by prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Toxicon* 23, 317–324. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101\(85\)90154-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101(85)90154-0)
- Ownby, C.L., Gutiérrez, J., Colberg, T.R., Odell, G. V., 1982. Quantitation of myonecrosis induced by myotoxin a from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Toxicon* 20, 877–885. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(82\)90075-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(82)90075-7)
- Ownby, C.L., Odell, G. V., Woods, W.M., Colberg, T.R., 1983. Ability of antiserum to myotoxin a from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom to neutralize local myotoxicity and lethal effects of myotoxin a and homologous crude venom. *Toxicon* 21, 35–45. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101\(83\)90047-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101(83)90047-8)
- Ownby, C.L., Woods, W.M., Odell, G. V., 1979. Antiserum to myotoxin from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Toxicon* 17, 373–380. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(79\)90265-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(79)90265-4)
- Peigneur, S., Orts, D.J.B., Prieto, A.R., Oguiura, N., Boni-mitake, M., Oliveira, E.B. De, Zaharenko, J., Freitas, J.C. De, Tytgat, J., 2012. Crotamine Pharmacology Revisited : Novel Insights Based on the Inhibition of K V Channels. *Molecular Pharmacology* 82, 90–96. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1124/mol.112.078188>.
- Reed, S.G., Hsu, F., Carter, D., Orr, M.T., 2016. ScienceDirect The science of vaccine adjuvants : advances in TLR4 ligand adjuvants. *Current Opinion in Immunology* 41, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.06.007>

- Rivas-Mercado, E.A., Garza-Ocañas, L., 2017. Disintegrins obtained from snake venom and their pharmacological potential. *Medicina Universitaria* 19, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.rmu.2017.02.004>
- Rivera, I.G., Ordoñez, M., Presa, N., Gomez-Larrauri, A., Simón, J., Trueba, M., Gomez-Muñoz, A., 2015. Sphingomyelinase d/ceramide 1-phosphate in cell survival and inflammation. *Toxins* 7, 1457–1466. <https://doi.org/10.3390/toxins7051457>
- Rojas, G., Jiménez, J., Gutiérrez, J., 1994. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: Description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon* 32, 351–363. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90087-6](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90087-6)
- Rosa, G. De, Olvera, F., Archundia, I.G., Lomonte, B., Alagón, A., 2019. Horse immunization with short-chain consensus  $\alpha$ -neurotoxin generates antibodies against broad spectrum of elapid venomous species. *Nature Communications* 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11639-2>
- Samejima, Y., Aoki, Y., Mebs, D., 1991. Amino acid sequence of a myotoxin from venom of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *Toxicon* 29, 461–468. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90020-R](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90020-R)
- Sánchez, E.E., Ramírez, M.S., Galán, J.A., López, G., Rodríguez-Acosta, A., Pérez, J.C., 2003. Cross reactivity of three antivenoms against North American snake venoms. *Toxicon* 41, 315–320. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00293-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00293-3)
- Sánchez, M., Solano, G., Vargas, M., Reta Mares, F., Neri-Castro, E., Alagón, A., Sánchez, A., Villalta, M., León, G., Segura, Á., 2020. Toxicon Toxicological profile of medically relevant *Crotalus* species from Mexico and their neutralization by a *Crotalus basiliscus* / *Bothrops asper* antivenom. *Toxicon* 179, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.03.006>
- Saviola, A.J., Pla, D., Sanz, L., Castoe, T.A., Calvete, J.J., Mackessy, S.P., 2015. ScienceDirect Comparative venomomics of the Prairie Rattlesnake ( *Crotalus viridis viridis* ) from Colorado : Identification of a novel pattern of ontogenetic changes in venom composition and assessment of the immunoreactivity of the commercial antivenom Cro. *Journal of Proteomics* 121, 28–43. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.03.015>
- Schenberg, S., 1959. Geographical pattern of crotamina distribution in the same rattlesnake subspecies. *Science* 129, 1361–1363. <https://doi.org/10.1126/science.129.3359.1361>
- Segura, Á., Herrera, M., Reta Mares, F., Jaime, C., Sánchez, A., Vargas, M., Villalta, M., Gómez, A., Gutiérrez, J.M., León, G., 2017. Proteomic, toxicological and immunogenic characterization of Mexican west-coast rattlesnake (*Crotalus basiliscus*) venom and its immunological relatedness with the venom of Central American rattlesnake (*Crotalus simus*). *Journal of Proteomics* 158, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.02.015>
- Segura, Á., Herrera, M., Villalta, M., Vargas, M., Gutiérrez, J.M., León, G., 2013. Biologicals Assessment of snake antivenom purity by comparing physicochemical



- and immunochemical methods. *Biologicals* 41, 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.11.001>
- Serrano, S.M.T., 2013. The long road of research on snake venom serine proteinases. *Toxicon* 62, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.003>
- Smith, C.F., Mackessy, S.P., 2016. *Toxicon* The effects of hybridization on divergent venom phenotypes : Characterization of venom from *Crotalus scutulatus scutulatus* x *Crotalus oreganus helleri* hybrids. *Toxicon* 120, 110–123. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.08.001>
- Sunagar, K., Tsai, h., Lomonte, B., Jackson, N.W. & Fry, B.G. Group II Phospholipase A2 enzymes. En: Fry, B. G. (2015). *Venomous reptiles and their toxins: evolution, pathophysiology, and biodiscovery*. Oxford University.
- Sunthornandh, P., Ratanabanangkoon, K., 1994. A comparative study of three vehicles on antibody responses against elapid snake neurotoxin immunogens. *Toxicon* 32, 561–571. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90204-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90204-6)
- Tasima, L.J., Serino-silva, C., Hatakeyama, D.M., Nishiduka, E.S., Tashima, A.K., Anna, S.S.S., Grego, K.F., Morais-zani, K. De, Tanaka-azevedo, A.M., 2020. Crotamine in *Crotalus durissus* : distribution according to subspecies and geographic origin , in captivity or nature. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 26, 1–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0053>
- Tasoulis, T., Isbister, G.K., 2017. A review and database of snake venom proteomes. *Toxins* 9. <https://doi.org/10.3390/toxins9090290>
- Teixeira-Araújo, R., Castanheira, P., Brazil-más, L., Pontes, F., Araújo, M.L. De, Lucia, M., Alves, M., Zingali, R.B., Correa-Netto, C., 2017. Antivenomics as a tool to improve the neutralizing capacity of the crotalic antivenom : a study with crotamina. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 23, 1–8. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1186/s40409-017-0118-7>
- Toyama, D.O., Boschero, A.C., Martins, M.A., Fonteles, M.C., Monteiro, H.S., Toyama, M.H., 2005. Structure-function relationship of new crotamina isoform from the *Crotalus durissus cascavella*. *Protein Journal* 24, 9–19. <https://doi.org/10.1007/s10930-004-0601-1>
- Trang, T., Vu, T., Jeong, B., Yu, J., Koo, B., Jo, S., Charles, R., Choe, H., 2014. *Toxicon* Soluble prokaryotic expression and purification of crotamina using an N-terminal maltose-binding protein tag. *Toxicon* 92, 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.10.017>
- Uetz, P., Freed, P. & Hošek, J. (eds.) (2020) *The Reptile Database*, <http://www.reptile-database.org>, visitado el [25 de mayo del 2020].
- Vaz, P.D., Melo, D., Almeida, S. De, Araújo, P., Medina, R., Gonzalez, E., Alves, A., Machado-de-ávila, R.A., Costal-oliveira, F., Soccol, V.T., Guerra-duarte, C., Rezende, L., Chavez-olorategui, C., 2020. *International Journal of Biological*

Macromolecules Immunoprotection against lethal effects of *Crotalus durissus* snake venom elicited by synthetic epitopes trapped in liposomes. *International Journal of Biological Macromolecules* 161, 299–307. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.171>

Vohra, R., Cantrell, F.L., Williams, S.R., 2008. Fasciculations after rattlesnake envenomations: A retrospective statewide poison control system study. *Clinical Toxicology* 46, 117–121. <https://doi.org/10.1080/15563650701638925>

WHO, 2017. Annex 5. Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins Replacement of Annex 2 of WHO Technical Report Series, No. 964. WHO Technical Report Series 197–388.

Xian-Yan, D. & Clemtson, K. J. Reptile C-Type Lectins. En: Mackeessy, S.P. (2010). *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. CRC Press Taylor & Francis Group.

Yount, N.Y., Kupferwasser, D., Spisni, A., Dutz, S.M., Ramjan, Z.H., Sharma, S., Waring, A.J., Yeaman, M.R., 2009. Selective reciprocity in antimicrobial activity versus cytotoxicity of hBD-2 and crotamina. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 14972–14977. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904465106>



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/toxicon>

## Neutralizing potency and immunochemical evaluation of an anti-*Crotalus mictlanteuhtli* experimental serum

Roberto Ponce-López<sup>a</sup>, Edgar Neri-Castro<sup>a</sup>, Miguel Borja<sup>b</sup>, Jason L. Strickland<sup>c</sup>,  
Alejandro Alagón<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, C.P. 62210, México

<sup>b</sup> Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Av. Universidad s/n. Fracc. Filadelfia, C.P. 35010 Gómez Palacio, Durango, Mexico

<sup>c</sup> Department of Biological Sciences, Clemson University, 190 Collings St, Clemson, SC, 29631, USA

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Immunogen  
Rattlesnake  
Cross-activity  
Crotoxin  
Taxonomy  
Neurotoxin

### ABSTRACT

Snakebite in Mexico is commonly treated with an antivenom which uses *Bothrops asper* and *Crotalus simus* venoms as immunogens. Current taxonomic recommendations for the *C. simus* species complex suggest a novel endemic species from Mexico: *Crotalus mictlanteuhtli*. The aim of this report was to evaluate the immunogenic properties of *C. mictlanteuhtli* venom and its potential to generate polyclonal antibodies capable of neutralizing other pitviper venoms. We generated an experimental anti-*Crotalus mictlanteuhtli* serum, using the rabbit model, to test recognition and neutralizing capacity against the homologous venom as well as venoms from *C. atrox*, *C. basiliscus*, *C. durissus terrificus*, *C. scutulatus salvini*, *C. tsabcan* and *Ophryacus sphenophrys*. Pre-incubation neutralization experiments using our experimental serum showed positive results against venoms containing crotoxin, while venoms from two non-neurotoxic pit-vipers were not neutralized. Rescue experiments in mice showed that, when intravenously injected (i.v.), *C. mictlanteuhtli* venom is not neutralized by a maximum dose of Antivipmyn® and the experimental serum after 5 min of envenomation, albeit mice envenomated intraperitoneally (i.p.) and rescued i.v. with Antivipmyn® survived even at 50 min after envenomation. Our results highlight the importance of using the highly neurotoxic *C. mictlanteuhtli* venom to increase antivenom effectiveness against Mexican neurotoxic pitvipers.

### 1. Introduction

Snakebite is a serious health problem worldwide and each year up to 2.7 million bites occur globally which cause over 100,000 deaths and another 400,000 permanent injuries (Gutiérrez et al., 2010b, 2017). To date, the only scientifically validated treatment for snakebite is the use of antivenoms (Gutiérrez et al., 2010b). Depending on the country, antivenoms can be produced by immunizing different mammals including sheep, donkeys, llamas and horses (Fernández et al., 2010; Gutiérrez et al., 2007). In order to develop an immune response, these animals are hyperimmunized with the venom of one species (monovalent) or a venom mixture of two or more species (polyvalent) to develop neutralizing antibodies that are the active molecules in antivenoms (Gutiérrez et al., 2010b).

Antivenom manufacturers must consider several factors when selecting the species and venoms used as immunogens. First, they ought

to use venom(s) from the species that cause the highest number of bites in a country or region. Second, the chosen venom(s) should have a similar composition to venoms from other snake species found in the region in order to produce an antivenom with cross neutralizing properties (Gutiérrez et al., 2006). Third, antivenom manufacturers should take into account updated data on venom composition variation due to geography and ontogeny of species that need to be neutralized by their antivenom (Chippaux et al., 1991; Gutiérrez et al., 2010b).

Mexico has a remarkable pitviper diversity which means that antivenoms produced for use in this country must neutralize the venom of each of the 72 Mexican pitviper species ([www.reptile-database.org](http://www.reptile-database.org)). Consisting of purified F(ab')<sub>2</sub> fragments of horse immunoglobulins, Antivipmyn® and Faboterápico polivalente antiviperino (Birmex® in this manuscript) antivenoms are the only available antidotes to treat human pitviper snakebites in Mexico. Antivipmyn® uses the venoms of *Bothrops asper* and *Crotalus simus* as immunogens, while Birmex®

\* Corresponding author.






E-mail address: [alagon@ibt.unam.mx](mailto:alagon@ibt.unam.mx) (A. Alagón).

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.08.026>

Received 29 May 2020; Received in revised form 10 August 2020; Accepted 30 August 2020

## Article

# Ontogenetic Change in the Venom of Mexican Black-Tailed Rattlesnakes (*Crotalus molossus nigrescens*)

Miguel Borja <sup>1,2</sup>, Edgar Neri-Castro <sup>3,4</sup>, Rebeca Pérez-Morales <sup>2</sup>, Jason L. Strickland <sup>5</sup>, Roberto Ponce-López <sup>3</sup>, Christopher L. Parkinson <sup>5,6</sup>, Jorge Espinosa-Fematt <sup>7</sup>, Jorge Sáenz-Mata <sup>1</sup>, Esau Flores-Martínez <sup>1</sup>, Alejandro Alagón <sup>3</sup> and Gamaliel Castañeda-Gaytán <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Av. Universidad s/n. Fracc. Filadelfia, C.P. 35010 Gómez Palacio, Dgo., Mexico; alessandro\_53@hotmail.com (M.B.); jsaenz\_mata@ujed.mx (J.S.-M.); pollomtz97@hotmail.com (E.F.-M.)

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Av. Artículo 123 s/n. Fracc. Filadelfia, Apartado Postal No. 51, C.P. 35010 Gómez Palacio, Dgo., Mexico; rebecapms@ujed.mx

<sup>3</sup> Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Chamilpa, C.P. 62210 Cuernavaca, Mor., Mexico; neri@ibt.unam.mx (E.N.-C.); joserobertoponcelopez21@gmail.com (R.P.-L.); alagon@ibt.unam.mx (A.A.)

<sup>4</sup> Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas UNAM, C.P. 04510 México D.F., Mexico

<sup>5</sup> Department of Biological Sciences, Clemson University, 190 Collings St., Clemson, SC 29634, USA; jlstrck@clemson.edu (J.L.S.); viper@clemson.edu (C.L.P.)

<sup>6</sup> Department of Forestry and Environmental Conservation, Clemson University, 190 Collings St., Clemson, SC 29634, USA

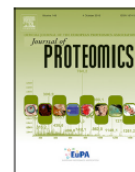
<sup>7</sup> Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Juárez del Estado de Durango, Calz. Palmas 1, Revolución, 35050 Gómez Palacio, Dgo., Mexico; dr.jorge.espinosa@gmail.com

\* Correspondence: gamaliel.cg@gmail.com; Tel.: +52-871-715-2077

Received: 31 October 2018; Accepted: 26 November 2018; Published: 1 December 2018



**Abstract:** Ontogenetic changes in venom composition have important ecological implications due to the relevance of venom in prey acquisition and defense. Additionally, intraspecific venom variation has direct medical consequences for the treatment of snakebite. However, ontogenetic changes are not well documented in most species. The Mexican Black-tailed Rattlesnake (*Crotalus molossus nigrescens*) is large-bodied and broadly distributed in Mexico. To document venom variation and test for ontogenetic changes in venom composition, we obtained venom samples from twenty-seven *C. m. nigrescens* with different total body lengths (TBL) from eight states in Mexico. The primary components in the venom were detected by reverse-phase HPLC, western blot, and mass spectrometry. In addition, we evaluated the biochemical (proteolytic, coagulant and fibrinogenolytic activities) and biological (LD<sub>50</sub> and hemorrhagic activity) activities of the venoms. Finally, we tested for recognition and neutralization of Mexican antivenoms against venoms of juvenile and adult snakes. We detected clear ontogenetic venom variation in *C. m. nigrescens*. Venoms from younger snakes contained more crotamine-like myotoxins and snake venom serine proteinases than venoms from older snakes; however, an increase of snake venom metalloproteinases was detected in venoms of larger snakes. Venoms from juvenile snakes were, in general, more toxic and procoagulant than venoms from adults; however, adult venoms were more proteolytic. Most of the venoms analyzed were hemorrhagic. Importantly, Mexican antivenoms had difficulties recognizing low molecular mass proteins (<12 kDa) of venoms from both juvenile and adult snakes. The antivenoms did not neutralize the crotamine effect caused by the venom of juveniles. Thus, we suggest that Mexican antivenoms would have difficulty neutralizing some human envenomations and, therefore, it may be necessary improve the immunization mixture in Mexican antivenoms to account for low molecular mass proteins, like myotoxins.



## Venom characterization of the three species of *Ophryacus* and proteomic profiling of *O. sphenophrys* unveils Sphenotoxin, a novel Crotoxin-like heterodimeric $\beta$ -neurotoxin



Edgar Neri-Castro<sup>a,b</sup>, Bruno Lomonte<sup>c</sup>, Mariel Valdés<sup>a,d</sup>, Roberto Ponce-López<sup>a</sup>, Melisa Bénard-Valle<sup>a</sup>, Miguel Borja<sup>e</sup>, Jason L. Strickland<sup>f</sup>, Jason M. Jones<sup>g</sup>, Christoph Grünwald<sup>g</sup>, Fernando Zamudio<sup>a</sup>, Alejandro Alagón<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, México

<sup>b</sup> Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas UNAM, México.

<sup>c</sup> Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José 11501, Costa Rica

<sup>d</sup> Laboratorio de Genética, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, 07738, México

<sup>e</sup> Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Av. Universidad s/n, Fracc. Filadelfia, Gómez Palacio C.P. 35010, México.

<sup>f</sup> Department of Biology, University of Central Florida, 4000 Central Florida Blvd, Orlando, FL 32816, USA.

<sup>g</sup> Hep.mx A.C., Villa del Álvarez, Colima, México

### ABSTRACT

Venoms of the three species of *Ophryacus* (*O. sphenophrys*, *O. smaragdinus*, and *O. undulatus*), a viperid genus endemic to Mexico, were analyzed for the first time in the present work. The three venoms lacked procoagulant activity on human plasma, but induced hemorrhage and were highly lethal to mice. These venoms also displayed proteolytic and phospholipase A<sub>2</sub> activities in vitro. The venom of *O. sphenophrys* was the most lethal and caused hind-limb paralysis in mice. Proteomic profiling of *O. sphenophrys* venom showed a predominance of metalloproteinase (34.9%), phospholipase A<sub>2</sub> (24.8%) and serine protease (17.1%) in its composition. Strikingly, within its PLA<sub>2</sub> components, 12.9% corresponded to a Crotoxin-like heterodimer, here named Sphenotoxin, which was not found in the other two species of *Ophryacus*. Sphenotoxin, like Crotoxin, is composed of non-covalently bound A and B subunits. Partial amino acid sequence was obtained for Sphenotoxin B and was similar (78–89%) to other subunits described. The mouse i.v. LD<sub>50</sub> of Sphenotoxin at 1:1 M ratio was 0.16 µg/g. Also, like Crotoxin, Sphenotoxin induced a potent neuromuscular blockade in the phrenic nerve-diaphragm preparation. *Ophryacus* is the fifth genus and *O. sphenophrys* the third non-rattlesnake species shown to contain a novel Crotoxin-like heterodimeric  $\beta$ -neurotoxin.

**Biological significance:** *Ophryacus* is an endemic genus of semi-arboreal pitvipers from Mexico that includes three species with restricted distributions. Little is known about the natural history of these species and nothing is known about the properties of their venoms. Research on these species' venoms could generate relevant information regarding venom composition of Mexican pitvipers. Additionally, research into the presence of neurotoxic Crotoxin-like molecules outside of rattlesnakes (genera *Crotalus* and *Sistrurus*) has identified this molecule in several new genera. Knowing which genera and species possess neurotoxic components is important to fully understand the repercussions of snakebites, the interaction with prey and predators, and the origin, evolution, and phylogenetic distribution of Crotoxin-like molecules during the evolutionary history of pitvipers.

Our study expands current knowledge regarding venom's compositions and function from Mexican pitvipers, providing a comparative venom characterization of major activities in the three *Ophryacus* species. Additionally, the discovery and characterization of a novel Crotoxin-like molecule, here named Sphenotoxin, in *O. sphenophrys*, and the detailed protein composition of *O. sphenophrys* venom supports the hypotheses that Crotoxin-like  $\beta$ -neurotoxins are more widespread than initially thought.

### 1. Introduction

Snake venoms consist of inorganic and organic molecules with proteins constituting 90 to 95% of the dry weight [1]. Most venom proteins cause toxic effects in prey or in envenomated individuals. Overall, 63 protein families have been reported in snake venoms [2] but the venom of each species usually contains representatives of 10–20

families. The presence of multiple variants within the same protein family results in a significant increase in snake venom complexity [3]. In Crotalinae (pitviper) venoms, the most abundant and frequently found proteins belong to a small number of protein families: phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), snake venom metalloproteinases (SVMPs), snake venom Serine proteases (SVSPs), L-amino acid oxidase (LAAO), cysteine-rich secretory protein (CRiSP), C-type lectin/lectin-like (CTL),

\* Corresponding author at: Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos 62210, México. E-mail address: [alagon@ibt.unam.mx](mailto:alagon@ibt.unam.mx) (A. Alagón).

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.09.002>

Received 30 July 2018; Received in revised form 2 September 2018; Accepted 7 September 2018

Available online 08 September 2018

1874-3919/ © 2018 Published by Elsevier B.V.