



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LAS NEUROTOXINAS MÁS NOCIVAS DE LOS
VENENOS DE ALACRANES DE LOS GÉNEROS *Centruroides* Y *Tityus* DE PANAMÁ

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
MARCOS HUGO SALAZAR AVENDAÑO

DIRECTOR DE TESIS
DR. GERARDO A. CORZO BURGUETE
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
COMITÉ TUTOR
DR. FEDERICO DEL RIO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE BIOMACROMOLÉCULAS
DR. LOURIVAL D. POSSANI
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CUERNAVACA, MORELOS.2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A todos los compañeros por el apoyo técnico en este proceso de aprendizaje para concluir mis estudios de Doctorado, Herlinda Clement, Iván Arenas, Alejandro Olvera, Fernando Zamudio, Carmen Segura sin sus enseñanzas, anécdotas, guía y ayuda este logro no sería posible.

Al M. Sc. Timoteo Olamendi-Portugal, el Sr. Ricardo Mondragón, el BSc. Felipe Olvera, Alejandro Olvera y Dra. Gloria Saab por su ayuda en digestiones enzimáticas de proteínas, inmunización de conejos, experimentos de purificación y análisis de IgGs y dicroísmo circular, respectivamente

A los miembros del Laboratorio de Proteómica del CCG Magdalena Hernández Ortiz y Sergio Encarnación Guevara por su colaboración en espectrometría de masas.

A los miembros de la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática del Instituto de Biotecnología Verónica Jiménez, Karel Estrada y Jérôme Jean Velejen por su colaboración en el uso del clúster del IBT.

A los miembros de Centro de Investigación e Información en Medicamentos y Tóxicos por la recolección en campo de escorpiones, mantenimiento en cautiverio y extracción de veneno.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de Doctorado. Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por los apoyos otorgados a los congresos que asistí.

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. Gerardo A. Corzo Burguete, que es miembro del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBt-UNAM). Esta investigación fue realizada gracias al financiamiento en México de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM), número IN203118 y IT200321, y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) al proyecto de investigación denominado "Venenos y antivenenos", número 303045, y a la beca de doctorado No.51849447-0, y por fondos panameños de SENACYT (COL10-045, INF10-051), Ministerio de Ambiente (UNDPGEF ABS Global Project) y Vicerrectoría de Investigación y Postgrado, Universidad de Panamá

1. Introducción	
1.1 Generalidades sobre la escorpionofauna de Panamá	1
1.2 El escorpionismo en Panamá	3
2. Antecedentes	
2.1 El veneno de escorpión	6
2.2 Generalidades sobre especies de escorpión en Panamá usadas en este estudio	11
2.2.1. <i>Centruroides bicolor</i>	11
2.2.2. <i>Tityus cerroazul</i>	14
2.2.3. <i>Tityus pachyrus</i>	16
2.3 Producción de proteínas recombinantes	19
2.3.1 Proteínas recombinantes del género <i>Centruroides</i>	21
2.3.2 Proteínas recombinantes del género <i>Tityus</i>	21
2.4 Sueros antiescorpiónicos	22
3. Hipótesis	25
4. Objetivos Generales	25
4.1 Objetivos Específicos	25
5. Metodología	
5.1 Veneno de escorpión y análisis de sus componentes	26
5.2 Pruebas biológicas en animales de experimentación	26
5.3 Espectrometría de masas	27
5.3.1 Masa molecular	27
5.3.2 Secuenciación por Masas/Masas	27
5.4 Extracción de RNA, secuenciación, clonación, expresión	29
5.4.1 Extracción de RNA total	29
5.4.2 Secuenciación	29
5.4.3 Vectores utilizados	30
5.4.4 Cepas de <i>E. coli</i>	31
5.4.5 Medio de crecimiento celular	31
5.5 Obtención de proteína recombinante	32
5.5.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida	32

5.5.2 Cromatografía de afinidad a níquel	32
5.5.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa	32
5.6 Evaluación de la actividad tóxica de los péptidos recombinantes	33
5.7 Evaluación de la estructura secundaria de los péptidos recombinantes	33
5.8 Inmunización de conejos	33
5.9 Purificación de IgGs por precipitación con ácido pícrico	34
5.10 Inmunoelectrotransferencia	35
5.11 Ensayo de ELISA	35
5.12 Ensayo de DE ₅₀	35
6. Resultados	
6.1 Caracterización y Expresión de Neurotoxinas del veneno de <i>Tityus pachyurus</i>	37
6.2 Caracterización y Expresión de Neurotoxinas del veneno de <i>Tityus cerroazul</i>	43
6.3 Caracterización y Expresión de Neurotoxinas del veneno de <i>Centruroides bicolor</i>	48
6.4 Dicroísmo circular	54
6.5 Evaluación de los anticuerpos obtenidos	56
7. Discusión	60
8. Conclusiones	66
9. Perspectivas	67
10. Bibliografía	68
Anexo I	77

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Especies de escorpiones reportados para Panamá.	2
Tabla 2: Clasificación clínica del escorpionismo en Panamá	5
Tabla 3: Actividades biológicas en ratones de fracciones de veneno de las especies de <i>Centruroides bicolor</i> y <i>C. panamensis</i> colectados en Panamá.	13
Tabla 4: Actividades biológicas en ratones con fracciones del veneno de <i>T. cerroazul</i> .	15
Tabla 5: Actividades biológicas en ratones con fracciones del veneno de <i>Tityus pachyurus</i> de diferentes regiones de Panamá.	18
Tabla 6: Comparación de las ventajas y desventajas de las diferentes líneas celulares de expresión.	20
Tabla 7: Toxinas recombinantes y anticuerpos producidos por otros grupos de investigación.	24
Tabla 8: Esquema de Inmunización en Conejos.	34
Tabla 9: Iniciador utilizado para obtener la secuencia 7,332 Da de <i>T. pachyurus</i>	37
Tabla 10: Alineamiento del N-terminal de la proteína del veneno de <i>T. pachyurus</i> con los transcritos obtenidos por 3'RACE.	37
Tabla 11: Alineamiento de la secuencia 3'RACE-C1 con algunas secuencias de transcritos obtenidos de las glándulas de veneno de <i>Tityus obscurus</i> , <i>Tityus zulianus</i> y <i>Tityus discrepans</i> .	38
Tabla 12: Alineamiento de la secuencia 3'RACE-C2 con algunas secuencias de transcritos obtenidos de las glándulas de veneno de <i>Tityus obscurus</i> , <i>Tityus zulianus</i> .	39
Tabla 13: Secuencias nucleotídicas obtenidas del transcriptoma de <i>T. pachyurus</i> .	40
Tabla: 14 Secuencias de aminoacídicas de las toxinas de interés en <i>T. pachyurus</i> .	40

Tabla: 15	Iniciadores construidos para la expresión de la toxina con masa molecular 7,100 Da de <i>T. pachyurus</i> .	42
Tabla: 16	Cebador utilizado para <i>T. (T.) cerroazul</i>	43
Tabla: 17	Alineamiento del N-terminal de la proteína del veneno de <i>T. cerroazul</i> con el transcrito obtenido por el método de 3´RACE.	43
Tabla 18:	Alineamiento de la secuencia obtenida por el método 3´RACE, y los fragmentos peptídicos (quimotripsina/tripsina) analizados por el programa MaxQuant para la toxina de masa molecular 6,968.0 Da.	44
Tabla 19:	Secuencias nucleotídicas obtenida del transcriptoma de <i>T. cerroazul</i> .	45
Tabla 20:	Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de toxinas obtenidas por N-terminal y técnicas “ómicas”.	45
Tabla 21:	Alineamiento de la secuencia Tce3 con algunas secuencias de <i>Tityus discrepans</i> .	46
Tabla 22:	Alineamiento de la secuencia Tce4 con algunas secuencias de <i>Tityus trivittatus</i> y <i>Tityus fasciolatus</i> .	46
Tabla 23:	Iniciador utilizado para <i>C. bicolor</i>	48
Tabla 24:	Secuencia de alineamiento del N-terminal de la proteína del veneno de <i>C. bicolor</i> con los transcritos obtenidos de las glándulas del veneno.	48
Tabla 25:	Alineamiento de la secuencia obtenida por 3´RACE con algunas secuencias de transcritos obtenidos de las glándulas de veneno de <i>Centruroides suffusus suffusus</i> y <i>Centruroides sculpturatus</i> .	49
Tabla 26:	Alineamiento de la secuencia obtenida por el método 3´RACE, y los fragmentos péptidos (quimotripsina/tripsina) analizados por el programa MaxQuant para la toxina de masa molecular 7,487.0 Da.	49
Tabla 27:	Secuencia nucleotídica obtenida del Transcriptoma de <i>Centruroides Bicolor</i> .	50
Tabla 28:	Alineamiento del transcrito obtenido por TRINITY	51

Tabla 29:	Iniciadores diseñados para HisrCbi1.	51
Tabla 30:	Porcentajes estimados con el programa BeStSel de la estructura secundaria de las neurotoxinas recombinantes y la toxina nativa Cbi1	54
Tabla 31:	Títulos de anticuerpos obtenidos por ELISA	58
Tabla 32:	Valores de dosis efectiva (DE ₅₀) del antiveneno anti-Mix para neutralizar el veneno de <i>C. bicolor</i> , <i>T. pachyurus</i> y <i>T. cerroazul</i> .	59
Tabla 33	Mejores condiciones de expresión y rendimiento para cada toxina recombinante expresada.	63

INDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1:	Ubicación de las especies de <i>Centruroides</i> y <i>Tityus</i> de importancia médica en Panamá.	3
Figura 2:	Perfil de HPLC en fase reversa del veneno de <i>Centruroides bicolor</i> de Panamá.	12
Figura 3:	Perfil de HPLC en fase reversa de venenos <i>T. cerroazul</i> de Panamá.	14
Figura 4:	Distribución Geográfica y altitudinal de <i>T. asthenes</i> , <i>T. columbianus</i> , <i>T. forcipula</i> , <i>T. furhmanni</i> , <i>T. pachyurus</i> , y <i>T. affmetuendus</i> en Colombia	16
Figura 5:	Perfil de HPLC en fase reversa del veneno de <i>T. pachyurus</i> de Panamá proveniente de la región de Coclé	17
Figura 6:	Esquema del vector de expresión pQE30	31
Figura 7:	Cromatograma de HPLC de las toxinas expresadas	52
Figura 8:	Análisis de espectrometría de masas	53
Figura 9:	Espectros de dicroísmo circular de las neurotoxinas recombinantes	55
Figura 10:	SDS-PAGE de venenos de escorpión de Panamá y Western-blot realizado con IgG polivalentes de conejo (anti-Mix).	57

“La imaginación es más importante que el conocimiento. Porque el conocimiento es limitado, mientras que la imaginación abarca todo nuestro mundo, estimulando progreso, abriéndole camino a la evolución. Es, de manera estricta, un factor incidente en la investigación científica” Albert Einstein

“No esperes. El momento nunca será el adecuado. Empieza donde estés ahora, trabaja con lo que tengas a tu disposición y encontrarás mejores herramientas a medida que sigas adelante” Napoleon Hill

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades sobre la escorpionofauna de Panamá

El *Palaeopisthacanthus schucherti* es considerado el primer escorpión terrestre del cual se tiene un fósil, que data del período Devónico Tardío hace 416 a 359 millones de años. Los orígenes exactos del Istmo de Panamá no se conocen con claridad, pero los datos geológicos indican que actividades geológicas ocurridas durante las épocas del Mioceno y el Plioceno (ambas dentro del período Neógeno el cual precede al Cuaternario) dieron origen al Istmo de Panamá, hace unos 2.5 a 10 millones de años aproximadamente; permitiendo así el “gran intercambio biológico americano” de animales y plantas terrestres (Stehli et al., 1985).

El surgimiento del Istmo de Panamá ha permitido la confluencia de fauna del Norte y Sur de América, así como también la coexistencia de escorpiones de la familia Buthidae como por ejemplo el género *Centruroides* (mayormente restringido a América del Norte) y el género *Tityus* (comúnmente situado en América del Sur). Actualmente en Panamá se reconoce la existencia de 16 especies de escorpiones pertenecientes a cinco géneros y tres familias (**Tabla 1**) (Salazar et al., 2018; Miranda, R. et al., 2020)^a. Lo cual crea interés en la comunidad científica de estudiar como ha evolucionado la composición de los venenos por los cambios evolutivos o de especiación.

Tabla 1: Especies de escorpiones reportados para Panamá.

Familia	Género	Especie	Referencia	
Hormuridae	<i>Opistacanthus</i>	<i>elatus</i>	Pocock, 1893	
Chactidae	<i>Chactas</i>	<i>exsul</i>	Werner, 1939	
	<i>Ananteris</i>	<i>platnicki</i>	Lourenço, 1993	
Buthidae	<i>Centruroides</i>	<i>bicolor</i>	Pocock, 1898	
		<i>margaritatus</i>	Gervais, 1841	
		<i>granosus</i>	Thorell, 1876	
		<i>limbatus</i>	Pocock, 1898	
		<i>panamensis</i>	Quintero and Esposito, 2014	
	<i>Tityus</i>	-Subgénero		Lourenço 2006
		- <i>Archaeotityus</i>	<i>ocelote</i>	Francke and Stockwell, 1987
			<i>tayrona</i>	Lourenço, 1991
		- <i>Atreus</i>	<i>asthenes</i>	Pocock, 1893
			<i>champione</i>	Pocock, 1898
<i>festae</i>	Borelli, 1899			
- <i>Tityus</i>	<i>pachyurus</i>	Pocock, 1897		
		<i>cerroazul</i>	Lourenço, 1986	

La distribución de estas especies es muy variable en el Istmo (**Figura 1**) pero generalmente las especies del género *Centruroides* están en áreas periurbanas o viviendo en casas, por otro lado, las especies del género *Tityus* se encuentran especialmente en áreas boscosas las cuales en los últimos años están siendo deforestadas por la creación de nuevos asentamientos urbanos.



Province	<i>C. limbatus</i>	<i>C. panamensis</i>	<i>C. bicolor</i>	<i>C. granosus</i>	<i>T. cerroazul</i>	<i>T. festae</i>	<i>T. asthenes</i>	<i>T. pachyurus</i>
Bocas del Toro	✓							✓
Coclé				✓	✓			✓
Colón				✓	✓		✓	✓
Chiriquí		✓	✓					
Darién					✓	✓	✓	
Herrera				✓				✓
Los Santos				✓				
Panamá				✓			✓	✓
Panamá Oeste				✓	✓			✓
Veraguas			✓	✓	✓			✓

Figura 1: Ubicación de las especies de *Centruroides* y *Tityus* de importancia médica en Panamá. Fuente: Salazar et al., 2018.

1.2 El escorpionismo en Panamá

En un principio se creía que el veneno de los escorpiones que habitan el istmo de Panamá no era letal, y no se conocen reportes de defunciones por picadura de escorpión en la época colonial. Sin embargo, hoy en día sabemos que esto se debió a que inicialmente las primeras áreas ocupadas por nuestros antepasados coinciden con las áreas de distribución geográfica de los escorpiones del género *Centruroides*. En los años 90 se empiezan a dar los primeros reportes de defunciones por picadura de escorpión en hábitats de bosque húmedo tropical los cuales empezaron a ser poblados ruralmente por expansión demográfica o deforestación. El hábitat de las especies consideradas más tóxicas en Panamá (*Tityus*) es el bosque húmedo tropical (Borges et al., 2011).

Hoy en día, Panamá presenta la incidencia de picadura de alacranes (60 casos por 100,000 habitantes) más elevada de Centroamérica y solamente superados por México a nivel Latinoamericano. Según datos del Ministerio de Salud en Panamá, las provincias de Colón, Coclé y el Norte de Veraguas son consideradas las áreas con mayor presencia de escorpiones ya que en el 2015 se atendieron en los Centros de Salud 3,998 personas por picadura de escorpión (Ministerio de Salud, 2017).

La picadura de los escorpiones del género *Centruroides* en Panamá, no tiende a tener consecuencias relevantes. La persona picada presenta dolor local leve o fiebre, generalmente estas picaduras son consideradas como leves (**Tabla 2**) y en muchos casos no llegan a ser atendidos en el sistema de salud Nacional. Sin embargo, en algunos casos puede provocar parálisis de extremidades y se ha reportado que la picadura de escorpión de la especie *Centruroides bicolor* es causante de cuadros clínicos críticos considerado como un envenenamiento de moderado a grave (**Tabla 2**) por lo que es considerado de importancia médica. El *Centruroides granosus* es conocido por ser la especie más común y de más alta densidad de población aún en zonas urbanas de Panamá, siendo la picadura de esta especie la causante de la mayoría de los casos de morbilidad en la población panameña.

Con respecto a las picaduras de escorpión de las especies del género *Tityus*, estas son consideradas las más peligrosas, generalmente la severidad de la picadura es considerada como grave (**Tabla 2**). Las especies *T. pachyurus*, *T. festae*, *T. asthenes*, *T. championi* y *T. cerroazul* son consideradas de importancia médica por estar asociadas a casos de defunción. Tanto *T. pachyurus* como *T. cerroazul* tienen una amplia distribución en zonas boscosas de Panamá (**Figura 1**) (Salazar et al., 2018).

Desde un punto de vista clínico la picadura de escorpión en Panamá, se ha clasificado de la siguiente manera:

Tabla 2: Clasificación clínica del escorpionismo en Panamá.

Severidad	Manifestaciones clínicas	Hallazgos de laboratorio clínico e Imagenología
Leve:	Este cuadro a nivel local se caracteriza por dolor, presencia de una zona hiperémica o blanquecina, parestesias, edema (Poco frecuente).	En este caso no hay presencia de alteraciones importantes en las pruebas de laboratorio ya que el cuadro es localizado en el área de la picadura.
Moderado:	Para esta clasificación, la clínica leve se presenta de forma concomitante con náuseas, vómitos, dolor abdominal, sudoración generalizada, sialorrea, agitación, estado de inquietud/intranquilidad, ataxia, nistagmos, taquipnea, períodos de taquicardia/bradicardia, períodos de hipotensión/hipertensión leve, sensación de cuerpo extraño en la garganta, disfagia, fasciculaciones linguales, somnolencia y priapismo.	<p>Metabólicos:</p> <p>Hiperglicemia ≥ 170 mg/dL</p> <p>Amilasa ≥ 120 mg/dL</p> <p>Electrolitos:</p> <p>Hipopotasemia</p> <p>Hipernatremia</p> <p>Hipocalcemia</p> <p>Hematológicos:</p> <p>Leucocitosis (neutrofilia)</p> <p>Coagulación:</p> <p>TP: aumentado</p> <p>TPT: aumentado</p> <p>Enzimas cardíacas:</p> <p>CK-MB: aumentado</p> <p>Imagenología:</p> <p>ECG</p> <p>Radiografía de tórax</p>
Grave:	Se presenta el cuadro moderado más edema agudo de pulmón, arritmias cardíacas, choque, hipertensión grave, encefalopatía hipertensiva, insuficiencia cardíaca congestiva (ICC), insuficiencia respiratoria, miocardiopatía dilatada, alteraciones de ECG, pancreatitis aguda, úlcera péptica sangrante, convulsiones, dolor retroesternal, epifora, disartria, coma y puede llegar a ser fatal.	<p>Metabólicos:</p> <p>Hiperglicemia ≥ 200 mg/dL</p> <p>Amilasa ≥ 240 mg/dL</p> <p>Acidosis mixta</p> <p>Oximetría:</p> <p>Hipoxemia</p> <p>Electrolito:</p> <p>Hipopotasemia</p> <p>Hipernatremia</p> <p>Hipocalcemia</p> <p>Hematológicos:</p> <p>Leucocitosis (neutrofilia)</p> <p>Coagulación:</p> <p>TP: aumentado</p> <p>TPT: aumentado</p> <p>Enzimas cardíacas:</p> <p>CK-MB: aumentada</p> <p>Imagenología, TAC confirma:</p> <p>Pancreatitis aguda</p> <p>Lesiones isquémicas</p> <p>Hemorragias cerebrales</p>

TP: Tiempo de protrombina; TPT: Tiempo Parcial de Tromboplastina; CK-MB: Creatina quinasa MB; TAC: Tomografía axial computarizada; ECG: Electrocardiograma. Fuente: Guía para El Manejo Integral de la Picadura de Escorpión en Panamá. (Ministerio de Salud, 2016)

2 ANTECEDENTES

2.1 El veneno de escorpión

El veneno de escorpión es una mezcla compleja que contiene tanto componentes tóxicos como no tóxicos. Dentro de estos componentes podemos mencionar diferentes familias de proteínas como:

Familia AVIT (Procinética): Los miembros de la familia AVIT son proteínas ricas en cisteína de aproximadamente 8 kDa (80–90 aminoácidos de longitud) que conservan diez residuos de cisteína, los cuales forman cinco puentes disulfuro y un motivo AVITG N-terminal altamente conservado que es crucial para la actividad. Tienen diversos roles reguladores en todos los vertebrados como por ejemplo en la angiogénesis y la sensación de dolor (nocicepción), además muestran muchas características parecidas a las citocinas (Morales et al., 2010).

Proteínas de secreción ricas en cisteína (CRISP): Las proteínas de secreción ricas en cisteína son glicoproteínas que tienen amplias funciones diversificadas como la inhibición de los canales de potasio activados por calcio y activados por voltaje, así como los receptores de rianodina. Las CRISP son proteínas de un solo polipéptido con pesos moleculares entre 20 a 30 kDa las cuales tienen un alto grado de similitud de secuencia de aminoácidos y un patrón específico altamente conservado de 16 residuos de cisteína. Diez de estos residuos de cisteína forman una parte integral del dominio altamente conservado rico en cisteína (CRD) en el extremo C-terminal. El CRD se compone de dos dominios, una región bisagra y un dominio regulador de canal iónico (ICR). (Zhu et al., 2002).

Proteínas con Dominio nudo de cisteínas: Son pequeñas proteínas ricas en disulfuro que contienen un dominio de “nudo” (también llamado por sus siglas en inglés Inhibitor Cystine Knot o ICK). Este dominio se caracteriza por un "nudo disulfuro a través de disulfuro" especial que se obtiene cuando un puente disulfuro cruza el

macrociclo formado por otros dos disulfuros y el esqueleto de interconexión (el disulfuro III-VI atraviesa los disulfuros I-IV y II-V). La estructura nudosa se encuentra en algunos inhibidores de proteasa vegetal, toxinas de los caracoles cónicos, arañas, insectos, cangrejos herradura, escorpiones y algunos péptidos antimicrobianos (Gracy et al., 2008).

Familia de las glicosil hidrolasas: En los venenos de escorpión se ha reportado la presencia de 3 familias principalmente: la familia 13 (alfa-amilasas), la familia 22 (lisozimas) y la familia 56 (hialuronidasas) la cual es una de las más estudiadas. Las hialuronidasas catalizan la hidrólisis del ácido hialurónico, un glicosaminoglicano aniónico no sulfatado distribuido ampliamente en los tejidos conectivos, epiteliales y neurales, formando parte de la matriz extracelular. En el veneno de escorpión, se cree que las hialuronidasas participan en la hidrólisis de glucosaminoglicanos en la degradación de la matriz extracelular, permitiendo así una rápida propagación de otros componentes del veneno de escorpión durante el proceso de envenenamiento (Bordon et al., 2012).

Péptidos natriuréticos: Son moduladores del volumen de fluidos corporales, denominados péptidos natriuréticos, debido a su papel en la natriuresis y la diuresis. En el veneno de escorpión se han descrito péptidos natriuréticos del Tipo-C (Alves et al., 2013).

Proteasas de serina: Solo se han aislado algunas proteasas de serina y su función en el veneno de escorpión no está bien caracterizada, sin embargo, se han relacionado principalmente a sus efectos en la hemostasia, actuando en varios componentes de la cascada de coagulación, la fibrinolítica, y el sistema de calicreína-cinina, lo que lleva a un desequilibrio hemostático en presas. La gran mayoría son capaces de promover la coagulación de la sangre y se asemejan al menos parcialmente a la trombina, una proteasa multifuncional con papel esencial en la coagulación (Menaldo et al., 2013).

Fosfolipasa A₂: Se encuentran ubicuamente en la naturaleza, tanto en formas intracelulares como extracelulares. En los venenos se encuentran las extracelulares o fosfolipasas A₂ de secreción. Son enzimas pequeñas (entre 13 y 15 kDa), estables, dependientes de calcio y ricas en puentes disulfuro. Degradan los fosfolípidos de membrana en la posición sn-2, liberando lisofosfolípidos y ácidos grasos. Su acción en el veneno se relaciona con el síndrome de distrés respiratorio e inflamación, que se puede producir por la picadura del escorpión (Incamnoi et al., 2013).

Toxinas que afectan al canal de sodio dependiente de voltaje (Nav): Este tipo de toxinas se puede clasificar en dos subtipos:

- a) Las toxinas α del escorpión que se unen al sitio 3 de los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav) y funcionan evitando el movimiento hacia afuera del segmento S4 desde el dominio IV de estos canales, disminuyendo o retrasando el mecanismo de inactivación (Couraud et al., 1982). Este grupo de toxinas se puede subdividir en tres grupos principales, denominados " α -clásicas", "anti-insecto" y "parecido a las α " (α -like), según la preferencia del tipo de presa. El grupo α -clásico es activo en mamíferos con poca toxicidad contra los insectos, las toxinas anti-insectos muestran ser muy tóxicas hacia los insectos, y las toxinas α -like son activas tanto en mamíferos como en insectos, con preferencia por los insectos (Gordon et al., 2007).
- b) Las toxinas β de escorpión que se unen al sitio 4 de los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav), específicamente al bucle extracelular de los segmentos S3-S4 del dominio II. Estas toxinas atrapan el segmento S4, manteniéndolo en la posición activada. Esta interacción induce un cambio en la dependencia del voltaje de la activación de Nav en la dirección de hiperpolarización y una reducción en la amplitud máxima de sodio (Cestèle & Catterall, 2000). Este grupo de toxinas puede subdividirse en cuatro categorías (Bosmans et al.,

2007): 1) toxinas β que actúan selectivamente en los canales Nav de los mamíferos (por ejemplo, C_{ss2}, C_{II2} y C_{n2}); 2) toxinas β que actúan selectivamente sobre los canales Nav de los insectos; 3) toxinas de tipo β que actúan en los canales Nav de mamíferos e insectos (p.ej. T_{s1} y Lqhb1); y 4) toxinas $\beta\alpha^*$ que tienen la estructura primaria de las toxinas β , pero exhiben un efecto funcional similar a las toxinas α (por ejemplo: C_{n12}). (Possani et al., 2002; Possani et al., 1999).

Péptidos sin puentes disulfuro de veneno de escorpión: Los péptidos sin puente disulfuro del veneno de escorpión (NDBP por sus siglas en inglés) representan un grupo de péptidos muy divergente e inconstante en cuanto a su secuencia primaria (Zengn et al., 2005) lo que los hace difíciles de clasificar. Son de interés por sus características estructurales y funcionales, entre las cuales se han determinado sus actividades citolíticas, inmunomoduladora, potenciadora de bradicinina, antimicrobiana y anticancerígena (Rincón-Cortés et al., 2017).

Toxinas que afectan al canal de potasio dependiente de voltaje (Kv): Las toxinas de escorpión que afectan al canal de potasio (KTx) dependiente de voltaje, son péptidos de 20 a 95 aminoácidos estabilizados por dos, tres o cuatro enlaces disulfuro, que hacen que su estructura terciaria sea altamente estable. Los KTx tienen una disposición estructural secundaria altamente conservada α/β estabilizada por cisteínas (CS α/β) y, la mayoría de ellos, tienen residuos conservados que son responsables del bloqueo del poro de conducción de iones y promueven una unión de alta afinidad dentro del vestíbulo del poro del canal de potasio, como un residuo de lisina y un residuo aromático a 6.6 Angstroms del carbono β de esa lisina, respectivamente (Dauplais et al., 1997). Estas toxinas se pueden clasificar en 4 familias llamadas α , β , γ y κ (Tytgat et al., 1999; Chagot et al., 2005; Srinivasan et al., 2002; Possani et al., 1999), todas ellas tienen la disposición estructural α/β altamente conservada mencionada anteriormente, a excepción de las κ que solo cuentan con dos hélices α estabilizadas por dos enlaces disulfuro (CS α/α). Entre los escorpiones identificados, la familia de toxinas α -KTx

contiene alrededor de 120 péptidos identificados hasta el momento, que se clasifican en 30 subfamilias, según su homología de aminoácidos (Rodríguez et al., 2004; Tytgat et al.; 1999, Zhu et al., 2010).

Proteínas con dominio tipo Kunitz: Los dominios Kunitz son dominios activos de proteínas que inhiben la función de las proteasas de serina. Son relativamente pequeños con una longitud de aproximadamente 50 a 60 aminoácidos. Este dominio se ha encontrado en proteínas de veneno de la mayoría de los taxones venenosos (escorpiones, serpientes, arañas, entre otros (Schoch CL, et al. 2020). Estas proteínas están compuestas casi exclusivamente de este dominio, lo que agrupa las proteínas de tipo Kunitz de veneno en una sola familia. Las proteínas del veneno de tipo Kunitz juegan un papel importante en el envenenamiento al inhibir a las proteasas de serina implicadas en sistemas y procesos biológicos, como el sistema hemostático (Masci et al., 2000), el bloqueo de los canales de potasio (Harvey, 2001), o ambos (Chen et al., 2012).

Metaloproteasas: En los venenos, las metaloproteasas han sido encontradas y estudiadas principalmente en serpientes, aunque también se han descrito en escorpiones, insectos y arañas. En los artrópodos, las metaloproteasas se han reportado para muchas clases de animales, están involucradas en trastornos pancreáticos, son dependientes de Zn^{2+} y están relacionadas con las enzimas ADAM de vertebrados, un subtipo de proteasas de metzincina (De Oliveira et al., 2018). Se les ha atribuido una serie de actividades biológicas, como hemorragia, edema, inflamación, hipotensión y necrosis. Actúan interfiriendo a diferentes niveles de hemostasia. El dominio metaloproteasa es responsable de la degradación de las proteínas de la matriz extracelular, lo que resulta en el debilitamiento de la unión de las células endoteliales, y también en la digestión de proteínas grandes involucradas en la hemostasia, como el fibrinógeno.

2.2 Generalidades sobre las especies de escorpión en Panamá usadas en este estudio

2.2.1 *Centruroides bicolor*

Esta especie fue descrita por Pocock en 1898, la presencia de esta especie ha sido reportada para Costa Rica y Panamá (Gopalakrishnakone et al., 2015). En Panamá se suele encontrar en las provincias de Chiriquí y Veraguas (**Figura 1**). Es la especie más grande reportada en Panamá, puede llegar a alcanzar los 120 mm de largo, y presenta una coloración de dos colores, las tenazas son negruzcas, e igual que el último segmento de la cola, el resto del cuerpo es amarillento. La picadura de este escorpión es considerada de importancia médica debido a que se ha asociado a casos de envenenamiento severo (Salazar et al., 2018).

El veneno de esta especie tiene una DL_{50} de 3.4 mg/kg y existen datos sobre la composición de su veneno (Salazar et al., 2018). Estudios preliminares sobre la caracterización de este veneno en HPLC fase reversa (**Figura 2**) han demostrado la presencia de compuestos que migran sobre tiempos de retención característicos de péptidos, que afectan el canal de potasio (K_v) dependiente del voltaje, así como componentes que afectan el canal de sodio dependiente de voltaje (Na_v) (Batista et al., 2004). Las actividades tóxicas reportadas para estas fracciones en modelos de ratón e insecto, así como las masas reportadas (**Tabla 3**) evidencian la presencia de neurotoxinas típicas de los venenos de las especies de este género (Salazar et al., 2018).

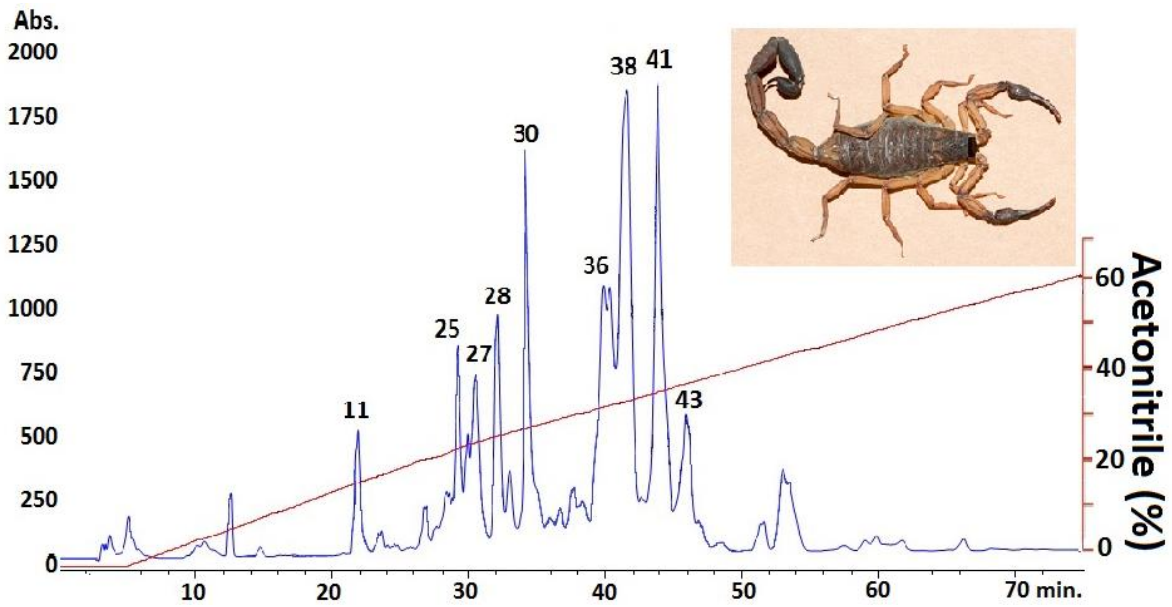


Figura 2: Perfil de HPLC en fase reversa del veneno de *Centruroides bicolor* de Panamá. Los números en la parte superior de algunas sub-fracciones se utilizaron para identificar el tipo de actividad y masa molecular. Fuente: (Salazar et al., 2018).

La comparación del veneno de *C. bicolor* con otras especies de *Centruroides* en Panamá, como *C. panamensis*, fue estudiado por Salazar et al. (2018), quién reporta la actividad biológica en ratones y masas moleculares de algunas fracciones cromatográficas (**Tabla 3**).

Tabla 3: Actividades biológicas en ratones de fracciones de veneno de las especies de *Centruroides bicolor* y *C. panamensis* colectados en Panamá.

<i>C. bicolor</i> DL ₅₀ =3.4 mg/kg	Fracción	Ratón i.c. (1 µg)	Ratón i.p. (50 µg)	Mm (Da)
	11	Leve	NI	2611.6
	25	Moderado	NI	4008.9
	27	Letal	NI	4220.7, 4332.1
	28	Moderado	NI	4048.4
	30	Moderado	NI	6904.7, 7002.0
	36	Letal	Moderado	7306.0, 7623.0
	38	Letal	Severo	7177.3, 6943.8
	41	Letal	Letal	7487.1
	43	Letal	NI	7048.6, 6979.8
	48	Moderado	NI	ND
<i>C. panamensis</i>	Fracción	Ratón i.c. (1 µg)	Ratón i.p. (50 µg)	Mm (Da)
	12	Leve	NI	3051.8, 3022.1
	32	Leve	NI	6995.5
	35	Leve	NI	7188.1, 7609.1
	36	Leve	NI	6944.1, 7608.5
	38	Leve	NI	7195.31
	41	Letal	Moderado	7487.4
	44	Letal	Moderado	7195.5

Abreviaturas utilizadas: i.c., inyección intracraneal; i.p., inyección intraperitoneal; Mm, masas moleculares promedio, los valores son ± 1 Da debido a la resolución limitada de nuestro instrumento; NT, no tóxico después de 2 h; NI, sin inyección; ND, no detectado, n=2. La última columna contiene las masas moleculares obtenidas de la fracción dada. Algunas fracciones aún contienen más de un componente. Las masas moleculares en negrita significan los péptidos de toxina más representativos del veneno de las especies de *Centruroides* colectados en Panamá. Fuente: (Salazar et al., 2018)

La fracción 41 de *C. bicolor* resalta por ser neurotóxica vía intracraneal e intraperitoneal. *C. panamensis* contiene una neurotoxina de masa molecular similar (también fracción 41), aunque con tiempos de retención diferentes, podría ser una neurotoxina similar para ambas especies y se sugiere para este trabajo, utilizar como antígeno para tratar de neutralizar el efecto letal del veneno de *C. bicolor*.

2.2.2. *Tityus cerroazul*

Es la única especie de *Tityus* en Panamá con coloración que varía desde marrón caoba hasta anaranjado claro y con bandas oscuras longitudinales en el mesosoma. Las hembras llegan a medir 66 mm, mientras que los machos logran alcanzar los 75 mm (Borges et al., 2011). Fue descrito en 1986 por Wilson Lourenço, su nombre proviene del Cerro Azul en Panamá (Lourenço, W.R., 1986). Es considerada la especie más peligrosa en Panamá, presenta una DL_{50} de 0.9 mg/kg (Salazar et al., 2018) y tiene una amplia distribución en las zonas boscosas de Panamá (**Figura 1**), pero también se ha reportado su presencia en Costa Rica. La picadura de esta especie se ha asociado a cuadros severos de envenenamiento incluyendo defunciones (Ministerio de Salud, 2017).

Estudios preliminares sobre la caracterización de este veneno por HPLC (**Figura 3**) han demostrado la presencia de compuestos que migran en tiempos de retención similares a péptidos que afectan el canal de potasio (K_v) y el canal de sodio (Na_v) dependientes del voltaje (Batista et al., 2004).

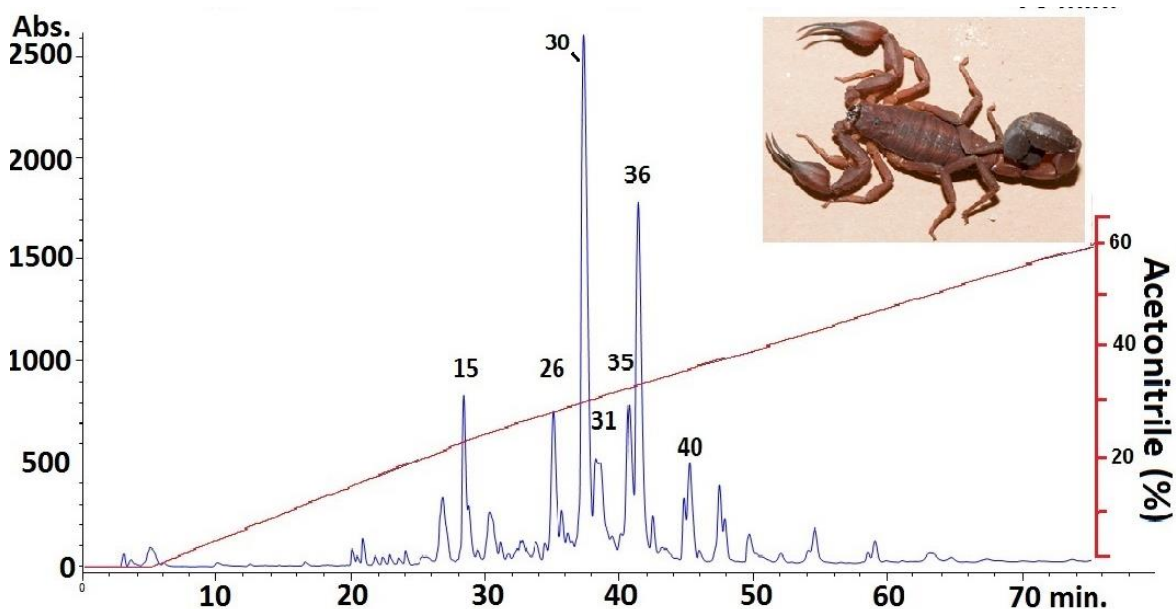


Figura 3: Perfil de HPLC en fase reversa de venenos *Tityus cerroazul* colectados en Panamá. Los números en la parte superior de algunas sub-fracciones se utilizaron para identificar el tipo de actividad y la masa molecular. Fuente: (Salazar et al., 2018).

Las actividades tóxicas reportadas para estas fracciones en modelos de ratón, así como las masas reportadas (**Tabla 4**) también evidencian la presencia de neurotoxinas típicas de los venenos de las especies de este género (Salazar et al., 2018). La fracción 31 y 36 resultaron ser las más neurotóxicas a ratones y presentan una masa molecular similar al reportado para las toxinas que afectan el canal de sodio dependiente de voltaje (entre 7 - 8 kDa).

Tabla 4: Actividades biológicas en ratones de fracciones del veneno de *T. cerroazul*.

<i>T. cerroazul</i> DL ₅₀ =0.9 mg/kg	Fracción	ratón i.c. (1 µg)	ratón i.p. (50 µg)	Mm (Da)
	15	Letal	Leve	4393.3, 3955.6
	26	Moderado	NI	7364.7
	30	Letal	Leve	7046.0
	31	Letal	Severo	6995.9, 7046.0
	35	Moderado	NI	6969.2, 10780.6
	36	Letal	Severo	6968.8
	40	Moderado	NI	7356.0

Abreviaturas utilizadas: i.c., inyección intracraneal; i.p., inyección intraperitoneal; Mm, masas moleculares promedio, los valores son ± 1 Da debido a la resolución limitada de nuestro instrumento; NT, no tóxico después de 2 h; NI, sin inyección; ND, no detectado, n=2. La última columna contiene las masas moleculares obtenidas de la fracción dada. Algunas fracciones aún contienen más de un componente. Las masas moleculares en negrita significan los péptidos de toxina más representativos del veneno. Fuente: (Salazar et al., 2018).

2.2.3. *Tityus pachyurus*

Fue Descrito en 1897 por Reginald Pocok, presenta una coloración que va de marrón rojizo hasta negro, con tonos verdes en los dos últimos segmentos de la cola. Los adultos pueden medir entre 50 y 70 mm de longitud. Es considerada la especie asociada a más casos de mortalidad en Panamá, presenta una DL₅₀ entre 3-4 mg/kg (Salazar et al., 2018), a excepción de la provincia de Darién donde no se ha reportado la presencia de esta especie, tiene una amplia distribución en las zonas boscosas de Panamá (**Figura 1**), también se ha reportado su presencia en el sector medio del valle del Río Magdalena (centro de Colombia), a través de los departamentos de Tolima, Cundinamarca, Boyacá, Antioquia y Huila (**Figura 4**)(Guerrero et al., 2013), donde también es reportado como una especie peligrosa y de interés médico (Otero et al., 2005).

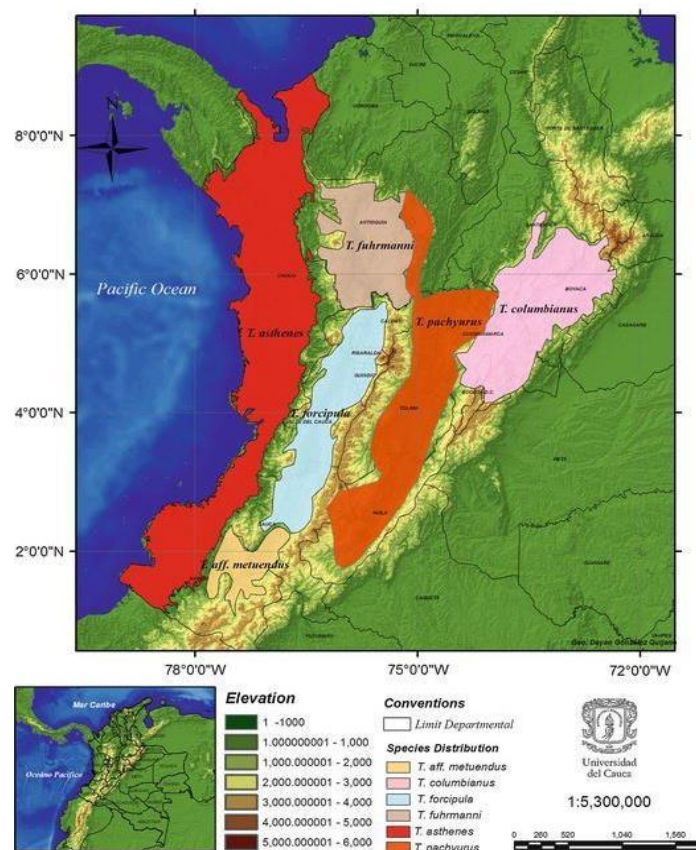


Figura 4: Distribución Geográfica y altitudinal de *T. asthenes*, *T. columbianus*, *T. forcipula*, *T. furhmanni*, *T. pachyurus*, y *T. affmetuendus* en Colombia. Fuente: (Guerrero et al., 2013).

Existen datos sobre la composición de su veneno (Salazar et al., 2018). Estudios preliminares sobre la caracterización de este veneno usando HPLC (**Figura 5**) han demostrado la presencia de compuestos que migran en tiempos de retención característicos de péptidos que afectan el canal de potasio (Kv) y el canal de sodio (Nav) dependientes del voltaje (Batista et al., 2004).

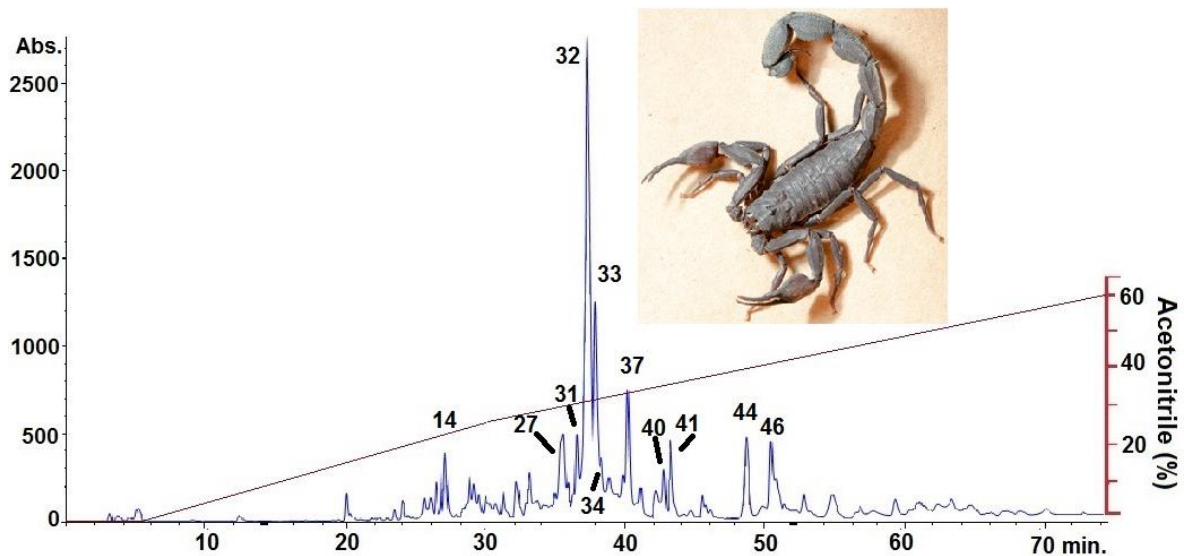


Figura 5: Perfil de HPLC en fase reversa del veneno de *Tityus pachyurus* de Panamá proveniente de la región de Coclé. Los números en la parte superior de algunas subfracciones se utilizaron para identificar el tipo de actividad y masa molecular. Fuente: Salazar et al., 2018.

Las actividades tóxicas reportadas para estas fracciones en modelos de ratón, así como las masas moleculares reportadas (**Tabla 5**) son distintas a neurotoxinas encontradas en *Tityus pachyurus* de Colombia (Schwartz et al., 2012; Salazar et al., 2018). Sin embargo, y teniendo en cuenta los datos de distribución, la composición de los venenos y estudios taxonómicos recientes, los ejemplares de esta especie son ahora considerados dos especies diferentes, proponiendo el nombre de *Tityus jaime* sp. n. para las poblaciones de *Tityus pachyurus* de Panamá y Costa Rica (Miranda et al., 2020). La picadura de este escorpión produce un cuadro clínico severo y se han reportado casos de defunciones, la DL_{50} de este veneno presenta variabilidad geográfica según datos publicados por Salazar et al., 2018 (**Tabla 5**) sin embargo las toxinas mayoritarias en el veneno parecen ser las mismas.

Tabla 5: Actividades biológicas en ratones con fracciones del veneno de *Tityus pachyurus* de diferentes regiones de Panamá.

Bocas del Toro DL ₅₀ =3.3 mg/kg	Fracción	Ratón i.c. (1 µg)	Ratón i.p. (50 µg)	Mm (Da)
	13	Letal	Severo	7332.0
	14	Letal	Severo	7101.8 , 7434.0
Coclé DL ₅₀ =2.6 mg/kg	Fracción	Ratón i.c. (1 µg)	Ratón i.p. (50 µg)	Mm (Da)
	14	Temblores	NI	973.0
	27	Leve	NI	969.0, 7345.0
	31	Leve	NI	7313.7, 6036.7
	32	Letal	Severo	7332.4
	33	Letal	Severo	7100.7 , 6521.6
	34	Letal	NI	7075.0
	37	Letal	NI	10680.1, 7400.6
	40	Leve	NI	7338.5
	41	Leve	NI	7354.9
	44	Leve	NI	7628.6
	46	Leve	NI	ND
Panamá Oeste DL ₅₀ =3.3 mg/kg	Fracción	Ratón i.c. (1 µg)	Ratón i.p. (50 µg)	Mm (Da)
	22	Poco	NI	4487.5
	29	Poco	NI	1001.3, 733.5
	31	Letal	NI	2676.8
	32	Severo	Severo	6037.5, 7295.0, 7332.0
	33	Letal	Severo	7432.7, 7100.2
	35	Letal	NI	6971.0
	36	Letal	NI	7398.6, 10680.0
	37	Letal	NI	ND
	41	Poco	NI	7627.4, 7173.1
Colón DL ₅₀ =2.6 mg/kg	Fracción	Ratón i.c. (1 µg)	Ratón i.p. (50 µg)	Mm (Da)
	27	Moderado	NI	ND
	29	Letal	Moderate	7332.6
	30	Letal	Severo	7100.0 , 7332.5
	34	Letal	Severo	7399.3
Herrera DL ₅₀ =2.0 mg/kg	Fracción	Ratón i.c. (1 µg)	Ratón i.p. (50 µg)	Mm (Da)
	24	Moderado	NI	7863.0, 2676.5
	28	Letal	Severo	7332.6 , 10800.0
	29	Letal	Severo	7099.7 , 7331.3
	32	Severo	Severo	7399.7, 10563.0

Abreviaturas utilizadas: i.c., inyección intracraneal; i.p., inyección intraperitoneal; Mm, masas moleculares promedio, los valores son ± 1 Da debido a la resolución limitada de nuestro instrumento; NT, no tóxico después de 2 h; NI, sin inyección; ND, no detectado, n=2. La última columna contiene las masas moleculares obtenidas de la fracción dada. Algunas fracciones aún contienen más de un componente. Las masas moleculares en negrita significan los péptidos de toxina más representativos del veneno de las especies de *T. pachyurus* en Panamá. Fuente: (Salazar et al., 2018).

Las características de las toxinas que posee el veneno de *T. pachyurus* en Panamá, evidencia la presencia de fracciones neurotóxicas de interés como lo son las fracciones con masas moleculares aparentes de 7,100.0 Da y 7,332.0 Da las cuales son mayoritarias en este veneno (Salazar et al., 2018). En estudios sobre los componentes de los venenos del género *Tityus* para Panamá (Borges et al., 2020) se evidenció que 3 especies de *Tityus* comparten al menos un componente tóxico de masa molecular 7,331.0 Da aprox. En estos estudios se logró determinar la secuencia completa de dos toxinas con masa molecular aproximada de 7,331.0. (Borges et al., 2020; Salazar et al., 2018)

2.3 Producción de Proteínas recombinantes

La tecnología del ADN recombinante inició su desarrollo hace unos 40 años, lo cual marcó una parte del comienzo de la industria biofarmacéutica actual. Esta tecnología nos permite modificar el ADN de una célula para que actúe como un reactor biológico produciendo una proteína de interés. Estas células pueden tener diferentes orígenes (bacterias, insectos, plantas y mamíferos). Sin embargo, de forma general, para obtener una proteína en un sistema heterólogo de expresión se sigue un protocolo que consiste en 1) tratamiento con enzimas de restricción de un vector de clonación y del ADN que contiene el gen que codifica la proteína de interés, 2) ligación del gen con el vector para obtener el ADN recombinante, 3) transformación del ADN recombinante en una célula hospedera, 4) inducción de la expresión del gen que codifica a la proteína, 5) Obtención de la proteína a partir del lisado celular, el sobrenadante del medio o cuerpos de inclusión, dependiendo si la proteína se produjo intra- o extracelularmente y de forma soluble o insoluble. La dificultad o especificidad de cada paso, así como el costo/producción o calidad de la proteína obtenida por este método dependen drásticamente del origen de la célula hospedera seleccionada (Drago et al., 2006).

Desde 1982 la insulina es el primer caso de proteína producida por ingeniería genética aprobada para uso en humanos (Quianzon, et al., 2012). Sin embargo, no es hasta 1989, cuando se publica la primera secuencia de ADN de una toxina del escorpión *Androctonus australis* (Bougis et al., 1989), y hasta 1991 se expresa

la toxina Charybdotoxina del escorpión *Leiurus quinquestriatus* en *Escherichia coli*, usando como vector de expresión pSR9 (Park et al., 1991). Desde entonces se han reportado la expresión de toxinas recombinantes de escorpión en diferentes líneas celulares como: bacterias, plantas, mamíferos, levaduras, así como en baculovirus.

Tabla 6: Comparación de las ventajas y desventajas de las diferentes líneas celulares de expresión

Tipo de célula	Ventaja	Desventaja
Bacteria	Bajo costo de producción Altos rendimientos de producción	Problemas de plegamiento y falta de modificaciones post traduccionales
Levadura	Mejor plegamiento de proteínas sencillas Libre de endotoxinas bacterianas	glicosilaciones no deseadas baja producción
Plantas	Produce proteínas complejas	Glicosilaciones con ausencia de ácido siálico Puede adicionar fructosa o xilosa
Insectos	Produce proteínas complejas	Glicosilaciones con ausencia de ácido siálico
Mamíferos	Permite modificaciones post traduccionales Pueden glicosilar	Alto costo de producción Rendimientos menores Algunas líneas celulares tienen glicosilaciones limitadas

Fuente: (Guevara-Hernández et al., 2013; Gecchele et al., 2015).

Todos estos detalles se deben tener en cuenta si se desea producir de manera recombinante las toxinas presentes en venenos de escorpión, así como el fin que se les desea dar al producto obtenido (**Tabla 6**). Sin embargo, *E. coli* ha sido el modelo más comúnmente utilizado tanto industrialmente como en laboratorios de investigación por sus beneficios en costos y alta productividad. El desarrollo de las ciencias “ómicas” también ha permitido superar las limitantes en expresión y plegamiento de toxinas ricas en puentes disulfuro bajo el modelo de expresión de *E. coli*. Una de estas limitantes es la expresión intracelular de la proteína de interés, que puede ocasionar bajos rendimientos de proteína plegada correctamente (nativa) debido al reducido espacio intracelular y una sobre expresión de la misma, podría ocasionar que se acumule dentro del citoplasma formando cuerpos de inclusión. Para superar esta limitante, una estrategia empleada es hacer el citoplasma menos reductor, mediante la introducción de mutaciones en los genes de *E. coli* que codifican glutatión reductasa (gor) y tiorredoxina reductasa (trxB) (Cepas Origami®) y al introducir la proteína disulfuro isomerasa (DsbC) al

citoplasma para mejorar la formación de enlaces disulfuro (Cepas **Shuffle®**) (Klint et al., 2013).

2.3.1 Proteínas recombinantes del género *Centruroides*

La primera proteína expresada en *E. coli*, del escorpión *Centruroides noxius Hoffmann*, fue la noxiustoxina, un péptido capaz de bloquear el canal de potasio (Martínez et al., 1996). Posteriormente Johnson et al. (2000) lograron expresar en *E. coli* la primera beta-neurotoxina Cssl del escorpión *C. suffusus suffusus* usando como vector pET15b.

Teniendo en cuenta las limitaciones del modelo de *E. coli* para lograr obtener proteínas correctamente plegadas, trabajos como el de Estrada et al. (2007) han reportado metodologías para lograr la sobre expresión de proteínas en *E. coli* y posteriormente lograr el plegamiento *in vitro* obteniendo grandes cantidades de la proteína de interés, en comparación con lo que se podría obtener del veneno. (Estrada et al., 2007). Por otra parte (Jiménez et al., 2017) logró expresar 4 toxinas de escorpiones, una toxina de *C. noxius* (Cn2), una toxina de *C. suffusus* (Css2) y dos toxinas de *C. limpidus* (Cll1 y Cll2). La construcción utilizada para la expresión de proteínas contiene un péptido señal (pelB) que dirige la proteína expresada al periplasma bacteriano, una proteína transportadora (tioredoxina), el sitio de escisión para enteroquinasa, la secuencia de la toxina de interés y una etiqueta de histidina (6xHis- tag) para la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (Columna de afinidad a Níquel), después de la expresión en la cepa BL21 de *E. coli*, las cuales utilizó como inmunógenos (Jiménez et al., 2017).

2.3.2 Proteínas recombinantes del género *Tityus*

Los estudios sobre la caracterización, secuenciación y elucidación de estructura terciaria de toxinas que afectan al canal de sodio dependiente de voltaje para el género *Tityus* se ha dirigido a algunas especies de interés médico como lo son: *T. serrulatus*, *T. bahiensis*, *T. stigmurus*, *T. costatus*, *T. zulianus* y *T. discrepans*. Sin

embargo, es limitado el conocimiento sobre expresión y plegamiento de estas toxinas.

El veneno de *T. serrulatus* es considerado el más estudiado en los últimos 50 años, y del cual se pueden destacar dos toxinas denominada Ts1 y Ts3 las cuales afectan los canales de sodio dependiente de voltaje (Martin et al., 2018). Para estas toxinas se han reportado mecanismos de expresión y síntesis, así como métodos *in vitro* para el correcto plegamiento de las mismas utilizando el par Redox Cistina/Cisteína (Dang et al., 2017; Galloway et al., 2016).

2.4 Sueros antiescorpiónicos

A finales del siglo XIX el científico francés Albert Calmette descubrió que, si un animal es inyectado con veneno en pequeñas dosis, al transcurso del tiempo su suero sanguíneo se convierte en un antídoto fuerte contra el mismo veneno (Klint et al., 2013). La aplicación temprana de un antiveneno (hasta 2 h después del accidente) es considerada la única terapia aceptada por los sistemas de salud para el tratamiento de los síntomas por picadura de escorpión.

Estos antivenenos antiescorpiónicos son anticuerpos (inmunoglobulinas) producidos generalmente en modelos de animales (caballos, ovejas, cabras entre otros) con la capacidad de neutralizar los efectos tóxicos y letales de una o varias especies de escorpión.

Actualmente para el género *Tityus* países como Brazil (Candido et al., 2004), Argentina (De Roodt et al., 2003) y Venezuela (Poggioli et al., 1996; D'Suze et al., 2015) producen antivenenos y para el género *Centruroides* únicamente México (Chippaux et al., 2008). Dependiendo del centro productor, estos antivenenos pueden ser liofilizados (se disuelven en solución salina para su inyección al paciente), en forma líquida (debe mantenerse bajo cadena de frío), anticuerpos completos o fragmentos F(ab')₂ (digeridos con pepsina). Los centros de producción de antivenenos utilizan generalmente un esquema de hiperinmunización en caballos, en el cual el veneno a neutralizar es inyectado en bajas dosis de veneno, posteriormente se le extrae sangre, la cual es procesada para purificar las inmunoglobulinas. Las inmunoglobulinas van a ser específicas para neutralizar los

efectos tóxicos del veneno que se utilizó para inmunizar y pueden tener reactividad cruzada con otras toxinas por similitud de secuencias peptídicas o estructurales. Sin embargo, un antiveneno preparado contra una especie en particular de escorpión, puede no tener la misma eficacia si es utilizado para tratar el envenenamiento por especies distintas a la que se utilizó para preparar el antiveneno.

Como se mencionó anteriormente, Jiménez et al. (2017) lograron expresar de manera heteróloga 4 toxinas de escorpiones, una toxina de *C. noxius* (Cn2), una toxina de *C. suffusus* (Css2) y dos toxinas de *C. limpidus* (CII1 y CII2) las cuales utilizó como inmunógenos, logrando producir anticuerpos en conejos, capaces de neutralizar/disminuir la actividad letal del veneno completo de estas especies.

Datos de la Universidad de Panamá en colaboración con el Ministerio de Salud (comunicación personal) han evidenciado que los antivenenos comerciales no neutralizan de manera eficaz los efectos tóxicos y letales de la picadura de escorpión en Panamá. Estas condiciones han posicionado a la producción de un antiveneno específico para Panamá como una necesidad emergente.

En un esfuerzo para la búsqueda y desarrollo de nuevas formas de inmunización o mejoramiento de los anticuerpos ya producidos, grupos de investigación han demostrado, que la producción de toxinas recombinantes y la inmunización con un único componente o algunos componentes del veneno completo, puede producir anticuerpos capaces de neutralizar los efectos farmacológicos (EF) del veneno completo, principalmente la letalidad (**Tabla 7**). Estos componentes expresados de manera recombinante, son toxinas de sodio que afectan al canal de sodio dependiente de voltaje (Nav), pues ya son bien conocidos sus efectos farmacológicos y que son las responsables de los cuadros clínicos que pueden llevar a la muerte de la persona envenenada.

Tabla 7. Toxinas recombinantes y anticuerpos producidos por otros grupos de investigación.

Especie	Toxina expresada	Estrategia de Inmunización	Antiveneno	Toxina reto	Efecto	Referencia
<i>Androctonus australis hector</i>	Toxin II (AahII)	Epítipo sintético	Antisuero murino	AahII	Letalidad	Bahraoui et al., 1986
<i>Androctonus australis hector</i>	Toxin II (AahII)	Epítipo sintético	Antisuero de conejo	No evaluado	No evaluado	Devaux et al., 1993
<i>Centruroides noxius</i>	Cn2	Epítipo sintético	Antisuero de conejo y murino	Cn2	Letalidad	Calderón-Aranda et al., 1995
<i>Buthus occitanus tunetanus</i>	α -toxin	Toxina Recombinante	Antisuero murino	Bot y AaHG	Letalidad	Bouhaouala-Zahar et al., 1996
<i>Androctonus australis hector</i>	Toxin II (AahII)	Péptido sintético	IgG murino	AahII	Letalidad	Devaux et al., 1997
<i>Androctonus australis hector</i>	Toxin II (AahII)	Péptido sintético	Antisuero de conejo	AahII	Letalidad	Zenouaki et al., 1997
<i>Centruroides noxius</i>	Cn2	Péptido sintético	Antisuero de conejo y murino	Cn2	Letalidad	Calderón-Aranda et al., 1999
<i>Tityus serrulatus</i>	TsNTxP	Toxoide recombinante	Antisuero de conejo	Veneno de <i>T. serrulatus</i>	Letalidad	Guatimosim et al., 2000
<i>Centruroides noxius Hoffmann</i>	Noxiustoxin	Mimotopos	Antisuero murino	No evaluado	No evaluado	Gazarian et al., 2000
<i>Tityus serrulatus</i>	TsNTxP	Epítipo sintético	Antisuero de conejo	TstG50	Letalidad	Chávez-Olórtegui et al., 2001
<i>Androctonus australis hector</i>	AahI, AahII and AahIII (α -toxins)	Toxina Recombinante	Antisuero de conejo y murino	AaH-G50	Letalidad	Legros et al., 2001
<i>Buthus occitanus tunetanus</i>	Bot III (α -toxin)	Toxina Recombinante	Antisuero murino	Veneno de <i>B. occitanus tunetanus</i>	Letalidad	Benkhadir et al., 2002
<i>Tityus serrulatus</i>	TsNTxP and TsIV	Epítipo sintético	Antisuero de conejo	TstG50	Letalidad	Alvarenga et al., 2002
<i>Centruroides noxius Hoffmann</i>	Cn5 and sub-fraction	Toxina Recombinante	Antisuero de conejo	Cn2	Letalidad	García et al., 2003
<i>Parabuthus transvaalicus</i>	Birtoxin	Epítipo sintético	IgG policlonal de conejo	Veneno de <i>P. transvaalicus</i>	Letalidad	Inceoglu et al., 2006
<i>Centruroides spp.</i>	Cex1-13, CII3-8, Cn4b, Cn10b, Ce3, Ce5-7, Ce13(b), Cg1-3, CsEv1-3, CsEV8-9, CsE1x, CsE1a, CexErg1-4, CII Erg1-4, Cn Erg3-5, CeErg1-3, CgErg1-3, CsErg1-5	Toxina Recombinante	Antisuero de conejo	Cn2	Letalidad	Corona Villegas et al., 2008
<i>Tityus serrulatus</i>	Ts1	Toxina Recombinante	Antisuero de conejo	Veneno de <i>T. serrulatus</i> y Ts1	Letalidad	Mendes et al., 2008
<i>Centruroides suffusus suffusus</i>	CssII	Toxina recombinante y toxoide	Antisuero de conejo	Toxinas CssII, Cn2, y veneno de <i>C. Suffusus suffusus</i>	Letalidad	Hernández-Salgado et al., 2009
<i>Parabuthus granulatus</i>	Pg8	Toxina Recombinante	Antisuero murino	Veneno de <i>P. granulatus</i> y Pg8	Letalidad	García-Gómez et al., 2009
<i>Tityus serrulatus</i>	TsNTxP	Epítipo sintético	Antisuero murino	veneno de <i>T. serrulatus</i>	Letalidad	Duarte et al., 2010
<i>Mesobuthus eupeus</i>	BMK neurotoxin	Toxina Recombinante	Antisuero murino	No evaluado	No evaluado	Eskandari et al., 2014
<i>Heterometrus laoticus</i>	Heteroscorpine-1 (HS-1)	Toxina Recombinante	Antisuero murino	veneno de <i>H. laoticus</i>	Parálisis	Uawonggul et al., 2014
<i>Centruroides spp.</i>	Cn2, Ccs2, CII1, y CII2	Toxina Recombinante	Antisuero de conejo y murino	Veneno de <i>C. noxius</i> , <i>C. suffusus</i> , <i>C. limpidus</i> , <i>C. elegans</i> , <i>C. tecomanus</i> , y <i>C. sculpturatus</i>	Letalidad	Jiménez-Vargas et al., 2017
<i>Hemiscorpius lepturus</i>	rPLD1	Toxoide recombinante	Antisuero murino	Veneno de <i>H. lepturus</i> y rPLD1	Letalidad	Safari Foroushani et al., 2018

3 Hipotesis

Las neurotoxinas más tóxicas de los venenos de *C. bicolor*, *T. pachyurus* y *T. cerroazul* expresadas de manera heteróloga, al ser utilizadas como inmunógenos en conejos generarán anticuerpos capaces de neutralizar el efecto letal de dichos venenos.

4 Objetivo General

Usar proteínas recombinantes de las toxinas más importantes de los venenos de los alacranes panameños *Tityus pachyurus*, *Tityus cerroazul* y *Centruroides bicolor*, como inmunógenos.

4.1 Objetivos Específicos:

- Caracterizar las principales neurotoxinas de los venenos de los alacranes *Tityus pachyurus*, *Tityus cerroazul* y *Centruroides bicolor*.
- Realizar la expresión en *E. coli* de al menos una neurotoxina de cada uno de los venenos de los alacranes *Tityus pachyurus*, *Tityus cerroazul* y *Centruroides bicolor*, respectivamente.
- Evaluar la actividad neutralizante de los anticuerpos obtenidos, en ratones de la cepa CD-1.

5 Metodología

5.1 Veneno de escorpión y análisis de sus componentes

El veneno de escorpión de las especies de estudio se obtuvo mediante estimulación manual, fue liofilizado y almacenado a -40°C hasta su uso. Se utilizaron 3 mg de veneno puro obtenido de un grupo de ejemplares de cada especie, el cual fue separado mediante HPLC (Agilent 1100) fase reversa (FR-HPLC), utilizando una columna C18 con un gradiente de agua (solvente A), acetonitrilo (solvente B) al 0.1% de ácido trifluoroacético (0-5 min a 0% B; 5-25 min a 0-20% B; 25-75 min a 20%-60% B). Las fracciones se monitorearon a 230 nm, y posterior a la eliminación del solvente, fueron diluidas en 100 µL de agua desionizada miliQ®. La concentración de proteína se determinó por absorbancia a una longitud de onda de 280 nm utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ One de Thermo Scientific™.

5.2 Pruebas biológicas en animales de experimentación

Para el uso de animales de experimentación, se cuenta con la aprobación del Comité de Bioética del IBT No 376 (IN203118).

Ratones: Con el fin de determinar cuáles eran las fracciones con actividad tóxica, estas fueron inyectadas por vía intracraneal (15-20 µg) en ratones cepa CD-1 de 18-20 g (WHO 2017). La actividad biológica se observó durante la primera hora, y subsecuentemente a las 2, 4, 6, 8 y hasta completar las 24 h post-inyección. La actividad tóxica de las proteínas recombinantes generadas se determinó vía intracraneal. Los ensayos de neutralización se realizaron determinando la Dosis Efectiva Media (DE₅₀) según (Otero et al., 2005) usando como dosis reto 1.5 DL₅₀ de veneno, inyectando vía intravenosa a grupos de 4 ratones (WHO 2017).

Conejos: Con el fin de producir anticuerpos neutralizantes, se utilizaron 2 conejos Nueva Zelanda con peso de 1.5 kg - 2.0 kg (WHO 2017). a los cuales se le sometió a un proceso de hiperinmunización con las toxinas recombinantes producidas.

5.3 Espectrometría de masas

Para la determinación de la masa molecular de las neurotoxinas se utilizaron las facilidades de secuenciación por MS/MS de la Unidad de Proteómica del Centro de Ciencias Genómicas y de espectrometría de masas del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

5.3.1 Masa molecular

El analizador de proteínas utilizado fue modelo LF 3000 Beckman (Palo Alto, CA). Las proteínas (2-3 µg) se reconstituyeron en de acetonitrilo al 60% con ácido acético al 0.1%, y se aplicaron directamente en un espectrómetro de masas de trampa de iones Thermo Scientific LCQ Fleet (San José, CA). El eluato de 10 µL/min se dividió para introducir solo el 5% de la muestra en la fuente de ionización (0.5 µL/min). El voltaje de ionización se ajustó desde 1.5 kV y la temperatura capilar se ajustó a 150°C. La fuente de fragmentación se hizo funcionar a 25-35 V de energía de colisión, 35-45% (unidades arbitrarias) de energía de colisión normalizada y se activó la exploración con banda ancha. Todos los espectros se obtuvieron en el modo de ion positivo. La adquisición de datos y su deconvolución se realizaron en el sistema de datos de PC Xcalibur para Windows NT. Los valores promedio de masas moleculares son ± 2 Da debido a la resolución limitada de este instrumento (Salazar et al., 2018). Las fracciones de interés se enviaron a secuenciación N-terminal, la cual se realizó mediante degradación de Edman en un secuenciador de fase gaseosa automatizado Shimadzu PPSQ-31A (Shimadzu, Kyoto, Japón). La muestra (10 µg) se disolvió en 10 mL de solución de CH₃CN al 37% (v/v) y se aplicó a membranas de fibra de vidrio tratadas con TFA y pre-cicladadas con Polibreno (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, EEUU) (Salazar et al., 2018).

5.3.2 Secuenciación por Masas/Masas

La identificación de la secuencia primaria de las proteínas por MS/MS se realizó en colaboración de la unidad de Proteómica del Centro de Ciencias Genómicas. La muestra se solubilizó en bicarbonato de amonio (ABC) 50 mM, deoxicolato de sodio (SDC) al 0.5%. Se realizaron cortes proteolíticos con tripsina y quimiotripsina a una

relación de 1:50 (enzima: sustrato), y la muestra se incubó durante 16 h a 37°C. Se eliminó el SDC mediante extracción con acetato de etilo en condiciones ácidas (se añadió 1 volumen de acetato de etilo a la muestra y se acidificó con TFA al 0.5%). Después de un vigoroso vórtice y centrifugación, la fase orgánica se descartó. Se realizó una etapa adicional de extracción con acetato de etilo sin TFA. Finalmente, la mezcla de péptidos se desaló mediante cromatografía de fase reversa (ZipTip C18 Millipore, Billerica, MA, EEUU), se secó y se almacenó a -80°C hasta el análisis LC-MS/MS.

Los péptidos se diluyeron en las condiciones cromatográficas iniciales y se separaron en un sistema UPLC RSLC nano Dionex Ultimate 3000 en línea con un espectrómetro de masas de alta resolución Q-Exactive Plus (Thermo Fischer Scientific). Las muestras se separaron primero en una precolumna (C18 PepMap 100, 5 µm, 100 A, 300 µm de diámetro interno x 5 mm) y luego se separaron después de un gradiente de elución de 60 minutos utilizando una columna capilar a 250 nL/min (Columna de pulverización EASY, PepMap RSLC, C18, 3µm, 100A, 75 µm x 150 mm). Las fases móviles fueron las siguientes: A, ácido fórmico al 0.1% en agua y B, acetonitrilo 90:10 (v/v): agua, ácido fórmico al 0.1%.

El espectrómetro de masas (MS) funcionó en modo de adquisición positivo dependiente de datos, y el rango completo de MS era de 300 a 2,000 m/z. Los 10 iones más intensos se aislaron en el cuadrupolo y se fragmentaron bajo disociación de colisión de alta energía con energía de colisión normalizada del 27%. Los iones precursores se midieron a una resolución de 70,000 (a 200 m/z), y los fragmentos se midieron a 17,500. Solo los iones con estados de carga de 2 y superiores se fragmentaron con una ventana de aislamiento de 2 Th. Los datos de espectrometría de masas se analizaron utilizando una base de datos interna generada en nuestro laboratorio a partir de secuencias obtenidas previamente a partir de análisis transcriptómicos de especies nativas de *Tityus* y *Centruroides* de Panamá (datos por publicar), utilizando el programa MaxQuant (Cox et al., 2008; Tyanova et al., 2016).

5.4 Extracción de RNA, secuenciación, clonación y expresión

5.4.1 Extracción de RNA total

Las glándulas venosas (telson) de 6 ejemplares de cada especie mantenidas en cautiverio, fueron extraídas 48 h posterior al ordeño manual de los animales (trabajo realizado en Panamá en el Centro de Investigación e Información de Medicamentos y Tóxicos, Universidad de Panamá). Las mismas fueron almacenadas en TRIZOL y transportadas hasta el Instituto de Biotecnología en México. Para la extracción del ARNm de cada especie, se utilizó el kit de extracción QUIAGEN Rneasy Mini Kit Cat No. 74104 (Salazar et al., 2018) y se siguieron las indicaciones del Kit.

Para la obtención de los ADNc se utilizó el Kit “3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends” de Invitrogen™ (cat. No. 18373019) y se realizaron geles de agarosa al 1.2% para verificar el tamaño y concentración aproximada del ADNc obtenido para cada especie. El diseño de los iniciadores directos para cada proteína, se realizó en base a los datos obtenidos de las secuenciaciones N-terminal por degradación de Edman (**Ver Sección 6** resultados), y agregando cierto grado de degeneración para obtener mejores resultados. Todos los iniciadores se prepararon a una concentración de 15 nMolar

5.4.2 Secuenciación

Para los experimentos de secuenciación se solicitó el servicio a la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática (UUSMB) donde se utilizaron 6 pares de glándulas (telson) para cada especie (*Tityus pachyurus*, *Tityus cerroazul* y *Centruroides bicolor*) procesados como se mencionó en la **Sección 5.4.1**. Las glándulas se maceraron manualmente con una vara de pellet de microtubos Kontes (Daigger) y el material genético se extrajo con el RNeasy® Mini Kit (QIAGEN). El ARN total (ARN_t) se cuantificó en un NanoDrop™ One de Thermo Scientific™ y su integridad fue confirmada por la UUSMB utilizando un Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Se construyó una biblioteca de ADN complementario (ADNc) a partir de 1 µg del ARN_t, utilizando el Kit de preparación de muestras TruSeq® Stranded mRNA, siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor.

La secuenciación automatizada de ADN se realizó en un analizador de genoma Iix (Illumina). Cada biblioteca constaba de dos archivos fastq (lecturas de avance R1 y retroceso R2). La calidad de las lecturas en bruto se evaluó mediante el programa FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

Para los procesos de análisis y obtención de las posibles secuencias peptídicas se utilizaron los programas Trinity para el ensamblado “de novo”, Transdecoder v2.01 para identificar las regiones de codificación posibles dentro de secuencias de transcripción (<http://transdecoder.sf.net>), Blast (Basic Local Alignment Search Tool) para encontrar las regiones de similitud entre secuencias biológicas (BLASTX v2.3.1, BLASTP v2.3.0) y el programa SignalP 5.0 para predecir la presencia de péptidos señal y la ubicación de sus sitios de escisión en proteínas (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>) (De Oliveira et Al, 2018; Cid-Urbe et al., 2018).

5.4.3 Vectores utilizados

Se utilizó el vector de clonación TOPO 2.1 (Invitrogen™) para la selección de las clonas. Para la expresión del inserto de interés se utilizó el vector pQE30 (Qiagen) usando los sitios de restricción BamH1 y Pst1. El vector pQE30 agrega una secuencia de seis histidinas en la sección N-terminal, la cual facilita la purificación, adicionalmente se añadió el sitio de corte FXa para escindir la secuencia de histidinas de ser necesario. Para ambos casos se confirmaron las secuencias de los insertos mediante secuenciación en la Unidad de Secuenciación y Síntesis de DNA del IBT. Para cada caso, la construcción del vector pQE30 fue como se indica en la **Figura 6.**

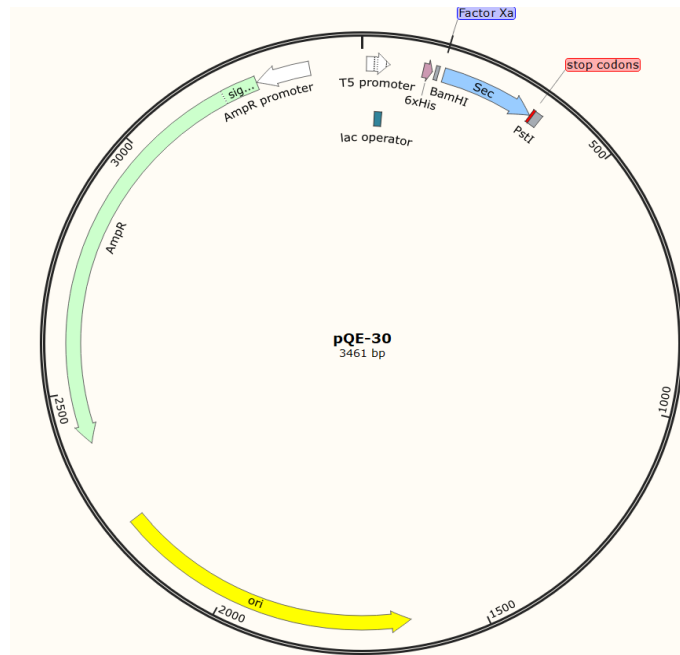


Figura 6: Esquema del vector de expresión pQE30. Se indica cada componente del vector de expresión, la abreviatura “Sec” indica el sitio donde va el gen de la secuencia para cada toxina diferente.

5.4.4 Cepas de *E. coli*

Se utilizó la cepa de *E. coli* XL1 Blue para crecimiento y selección de las clonas. Se evaluó la expresión en la cepa Origami® la cual tiene mutaciones en el gen de la tiorredoxina reductasa (*trxB*) y el gen de glutatión reductasa (*gor*), que mejoran en gran medida la formación de enlaces disulfuro, y la cepa SHuffle® la cual expresa constitutivamente una copia cromosómica de la Disulfuro Isomerasa DsbC, la cual promueve la corrección de proteínas mal oxidadas en su forma correcta.

5.4.5 Medio de crecimiento celular

Convencionalmente se utilizó el medio de crecimiento LB (Luria-Bertani) y se evaluó en dos condiciones diferentes (con peptona o con triptona) (De la Rosa et al., 2018) para el mejoramiento en la cantidad de proteína expresada. La inducción se realizó con IPTG (0.1 mM - 0.05 mM) cuando la OD₆₀₀ del medio fue de 0.8. Se incubó durante 16-18 h a 16°C. Se evaluó el mejoramiento de la expresión de proteína enriqueciendo el medio con sulfato de magnesio (al 0.7%) y glucosa (al 0.3%) al momento de realizar la inducción de la expresión.

5.5 Obtención de proteína recombinante

Posterior a la incubación, el medio de cultivo se centrifugó a 14,000 rpm por 30 min en una centrífuga BECKMAN con rotor JA-20. El concentrado celular se disolvió en Tris-HCl 50 mM a pH 8, y se sometió a presión en una prensa francesa para romper el material celular a 30 psi. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 30 min. Tanto la parte líquida (fracción soluble) como al sólido obtenido (cuerpos de inclusión) se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (al 15 %) en condiciones reductoras.

5.5.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Tanto el veneno completo de escorpión como las toxinas recombinantes expresadas, se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), en condiciones reductoras, utilizando geles al 12.5% de concentración de poliacrilamida. Los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 (Laemmli, 1970).

5.5.2 Cromatografía de afinidad a níquel

La fracción de interés (cuerpos de inclusión) se sometió a un paso de purificación por cromatografía de afinidad a columna de Níquel, la proteína recombinante se eluyó con 12 mL de 6 M Cloruro de guanidinio, 100 mM Tris HCl pH 8.8 en presencia de Imidazol (300 mM), posteriormente se diluyó al 50% v/v con agua grado miliQ®, acidificada a pH 3 con HCl y filtradas (Durapore® PVDF Membrane 0.22 µm).

5.5.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa

Las fracciones eluidas de la cromatografía de afinidad a níquel se sometieron a un segundo paso de purificación en FR-HPLC utilizando una columna preparativa Pursuit 5 C₁₈ 250x10.0 mm con un gradiente de agua/acetonitrilo en TFA al 0.1% (0-60% en acetonitrilo en 60 min) y monitoreado a 230 nm. Se colectó al tiempo de retención esperado para cada toxina recombinante, se liofilizó y cuantificó la proteína obtenida. Como tercer paso de purificación, la proteína recombinante se separó en una columna analítica Kinetex® 5 µm Biphenyl, 100 Å, 250 x 4.6 mm.

Cada señal de absorbancia se colectó individualmente y se secó en un concentrador al vacío (Savant).

5.6 Evaluación de la actividad tóxica de los péptidos recombinantes

Las fracciones obtenidas en FR-HPLC fueron diluidas en agua miliQ® con resistividad de 18.2 MΩ.cm y se cuantificó la cantidad de proteína contenida en un espectrofotómetro a 280 nm (NanoDrop™ One de Thermo Scientific™). Se inyectó vía intracraneal hasta 20-30 µg de cada fracción en ratones albinos cepa CD-1 (20 g de peso) para evaluar la toxicidad de los péptidos expresados.

5.7 Evaluación de la estructura secundaria de los péptidos recombinantes

La estructura secundaria de las cuatro neurotoxinas recombinantes se evaluó mediante dicroísmo circular (DC). La medición se realizó en un espectropolarímetro Jasco modelo J-720 (Jasco, Tokio, Japón), de 190 a 260 nm en una solución acuosa de trifluoroetanol (TFE) al 60%, a temperatura ambiente, con una celda de paso de 1 mm. Los datos se recogieron a 1 nm con una velocidad de barrido de 50 nm/min y una constante de tiempo de 0,5 s. La concentración de HisrTppa1, HisrTppa2, HisrTce3 e HisrCbi1 fue de 0,7, 0,7, 0,7 y 1,4 g/L, respectivamente. Los datos fueron el promedio de dos registros separados y analizados por el software Bestsel (<http://bestsel.elte.hu/index.php>) (Micsonai et al., 2018). La neurotoxina de escorpión nativa Cbi1 (0.7 g/L) se usó como control comparativo en las mismas condiciones.

5.8 Inmunización de conejos

La inmunización se realizó en 2 conejos con peso de 1.5 – 2.0 kg bajo el esquema presentado en la **Tabla 8**. La vía de administración de los inmunógenos (Las proteínas recombinantes HisrTppa2, HisrCbi1, HisrTppa1 y HisrTCe3) fue subcutánea en la zona dorsal. Antes de cada inmunización se procedió a realizar una toma de muestra (sangrado) de 1-2 mL de sangre para cada conejo. Se

utilizaron como adyuvante alumina (Imject™ Alum) y adyuvante incompleto de Freud (WHO 2017).

Tabla 8: Esquema de Inmunización en Conejos

# Inmunización	Día	Inmunogeno/ Conejo (µg)	Adyuvante*	Vol/Conejo (mL)	Lado
1	0	25 A-B-C	AIF	1.0	Derecho
2	7	25 D	AIF	1.0	Izquierdo
3	14	25 A-B-C	Imject®	1.0	Derecho
4	21	25 D	Imject®	1.0	Izquierdo
5	28	25 A-B-C	AIF	1.0	Derecho
6	35	25 D	Imject®	1.0	Izquierdo
7	42	50 A-B-C	NO	1.0	Derecho
8	49	50 D	NO	1.0	Izquierdo
9	56	100 A-B-C	Imject®	1.0	Derecho
10	63	100 D	Imject®	1.0	Izquierdo
11	70	150 A-B-C	AIF	1.0	Derecho
12	77	150 D	AIF	1.0	Izquierdo
13	84	200 A-B-C	Imject®	1.0	Derecho
14	91	200 D	Imject®	1.0	Izquierdo
15	98	300 A-B-C	AIF	1.0	Derecho
16	105	300 D	AIF	1.0	Izquierdo
17	112	400 A-B-C	Imject®	1.0	Derecho
18	119	400 de D	Imject®	1.0	Izquierdo
19	126	500 A-B-C-D	AIF	1.0	Derecho
20	133	500 A-B-C-D	No	1.0	Izquierdo

IF: Adyuvante Incompleto de Freud; NO: Sin adyuvante; A: Proteína HisrTppa2; B: Proteína HisrCbi1; C: Proteína HisrTppa1; D: Proteína HisrTce3.

5.9 Purificación de IgGs por precipitación con Ácido Caprílico

El plasma obtenido de los conejos se diluyó en una proporción 1:1 con agua estéril. Se ajustó el pH a un valor de 5 con ácido acético 3 M. Se añadió ácido caprílico a la solución para obtener una concentración final de 4% de ácido caprílico. Se agitó durante 30 min y se centrifugó a 11 000 rpm durante 30 min. El sobrenadante se filtró (Whatman® Filter Paper 3MM) y dializó en una membrana de diálisis (Spectra/Por® 4 Dialysis Membrane Standard RC Tubing MWCO: 12-14 kD) contra PBS 0.5 M; 150 mM de NaCl. Se realizaron recambios de PBS cada 6 h y 24 h después se filtró en una membrana de 0.22 µm (Merck Millipore), se cuantificó por UV a 280 nm y liofilizó (WHO 2017).

5.10 Inmunoelectrotransferencia

Para identificar que los anticuerpos generados estuvieran reconociendo a las toxinas recombinantes generadas, así como a las proteínas contenidas en el veneno completo, se realizó un gel de electroforesis en poliacrilamida en presencia de SDS al 12.5% en condiciones reductoras. Posteriormente, se realizó la transferencia a membrana de nitrocelulosa y se hizo reaccionar con una dilución 1:30 v/v de IgGs purificadas de conejo (a una dilución de 30 mg/mL), se bloqueó con caseína (al 5%) los sitios libres y se hizo reaccionar con un anticuerpo anti IgG de conejo el cual está marcado con fosfatasa alcalina para permitir el revelado con el kit BCIP/NBT (Invitrogen) y visualización de los complejos proteína-anticuerpo en la membrana.

5.11 Ensayo de ELISA

Para cuantificar el valor de reconocimiento de los anticuerpos obtenidos (título), se utilizó la técnica de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) (WHO 2017). En este caso se realizó un ELISA indirecto donde se unió veneno completo de escorpión a placas para ELISA de 96 pozos, posteriormente se hizo reaccionar el suero de conejo obtenido a diferentes diluciones (iniciando a una dilución 1:90), la detección de anticuerpos se realizó mediante el uso de un segundo anticuerpo (conjugado anti-conejo acoplado a peroxidasa) incubando durante 1 h a 37°C. Se adicionó el sustrato ABTS (ácido L-tartárico/Carbonato de sodio) incubó durante 10 min y se midió a 495 nm en un lector de placas de Elisa (SUNRISE™). Se utilizaron los antivenenos comerciales de tres países para comparar los títulos de reconocimiento como: Brasil dilución 1:60 para venenos de *Tityus* y 1:3 para veneno de *Centruroides*, México dilución 1:3 y Venezuela dilución 1:3 para todos los venenos.

5.12 Ensayo de DE₅₀

Para los experimentos de Dosis Efectiva (DE₅₀) (WHO 2017), se incubó 1.5 LD₅₀ de veneno de escorpión durante 30 minutos a 37°C con diferentes volúmenes de IgGs purificadas y preparadas a una concentración de 30 mg/mL. Se inyectaron por vía intravenosa en grupos de 4 ratones cepa CD-1. Después de 48 h, se calculó la DE₅₀ a partir del gráfico del porcentaje de supervivencia (a las 48 h) frente a la dosis de

antisuero, y se define como el volumen de antisuero capaz de proteger al 50% de los ratones expuestos. Para las pruebas de neutralización se utilizó el veneno de las especies *T. cerroazul*, *T. pachyurus* y *C. bicolor*. (WHO 2017).

6 RESULTADOS

6.1 Caracterización y expresión de neurotoxinas del veneno de *Tityus pachyurus*

Con base a los antecedentes de Salazar et al. (2018) se seleccionó la toxina con una masa molecular de 7,332.0 Da, la cual demostró ser tóxica para ratones siendo una de las toxinas mayoritarias en este veneno. Esta toxina fue purificada del veneno completo y la toxina nativa se sometió a secuenciación N-terminal.

La secuencia N-terminal para los primeros 20 residuos de dicha neurotoxina fue:

KDGYLVGNDGCKYSC LTRPG

Para la clonación se diseñó el iniciador que se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9: Iniciador utilizado para obtener la secuencia 7,332 Da de *T. pachyurus*.

Nombre	Secuencia 5-3'	TM °C
Directo	AAAGATGGTTACCTGGTGGGGAACGACGGTTGCAAATATAGT	69.0

Los transcritos amplificados fueron clonados (**ver Sección 5.4**), y los plásmidos con insertos del tamaño esperado fueron secuenciados. Los transcritos se tradujeron utilizaron el programa Translate Tool (https://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna_aa) (Gasteiger et al., 2005) (**Tabla 10**).

Tabla 10: Alineamiento del N-terminal de la proteína del veneno de *T. pachyurus* con los transcritos obtenidos por 3'RACE.

Nombre	Secuencia de Aminoácidos	Da*
N-terminal	KDGYLVGNDGCKYSC LTRPG	7,332.4
3'RACE-C1	KDGYLVGNDGCKYSC LTRPGHYCASECSRVKGKGDGYC YAWMACY CYNMPNWWKTWSRATNKCGKRK	7,100.1
3'RACE-C2	KDGYLVGNDGCKYSC LTRPGHYCASECSRVKGKGDGYC YAWMACY CSMPDWWKTWSRSTNRCGRGK	7,331.3

*Masa oxidada, Los aminoácidos marcados () no se utilizaron para la determinación de la masa.

La secuencia de aminoácidos de la clona 3´RACE-C1 obtenida, resultó tener la masa molecular similar a la de *Tityus pachyurus* Coclé fracción #33, fracción también neurotóxica (Salazar et al. 2018). La secuencia de aminoácidos de 3´RACE-C1 se comparó con las secuencias depositadas en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) utilizando el programa BLASTp donde se obtuvo un 97% de identidad con la beta-neurotoxina To11 de *Tityus obscurus* y un 90% de identidad con las beta neurotoxinas To3 de *Tityus obscurus*, Tz1 de *Tityus zulianus* y Bactridine 2 de *Tityus discrepans* (**Tabla 11**).

Tabla 11: Alineamiento de la secuencia 3´RACE-C1 con algunas secuencias de transcritos obtenidos de las glándulas de veneno de *Tityus obscurus*, *Tityus zulianus* y *Tityus discrepans*.

Toxina	Secuencia de Aminoácidos								%		
	1	10	20	30	40	50	60	Identidad	Código		
3´RACE-C1	KDGYLVGNDG	CKYS	CLTRPGHY	CASE	CSRVKGGK	DGYCYAWMAC	CYNMPN	WVKTWSRATNK	CGKRK	100	
To11	KDGYLVGNDG	CKYN	CLTRPGHY	CANE	CSRVKGGK	DGYCYAWMAC	CYNMPN	WVKTWSRATNK	CGKRK	97	H1ZZI0.1
Tz1	KDGYLVGNDG	CKYS	CFTRPGTY	CANE	CSRVKGGK	DGYCYAWMAC	CYSMPN	WVKTWDRATNR	CGRGK	90	Q2NME3.1
Bact-2	KDGYLVGNDG	CKYS	CFTRPGTY	CANE	CSRVKGGK	DGYCYAWMAC	CYSMPN	WVKTWN	RATNR	CGR	P0CF37.1

*Los aminoácidos subrayados () indican una posible modificación postraduccional (amidación)

La alta identidad en el alineamiento de la secuencia obtenida con las beta-neurotoxinas de la base de datos del NCBI, indica que la proteína es posiblemente una β -neurotoxina y sugiere que su blanco posiblemente sea el canal de sodio dependiente de voltaje (Borges et al., 2020).

La secuencia transcrita de aminoácidos de la clona 3´RACE-C2 resultó tener la masa molecular similar a la de *T. pachyurus* Coclé fracción #32, que también es neurotóxica (Salazar et al. 2018). Se comparó con las secuencias depositadas en la base de datos del NCBI utilizando el programa BLASTp donde se obtuvo un 96.9% de identidad con la beta-neurotoxina To3 de *T. obscurus* y un 90.1% de identidad con la beta neurotoxina Tz1 de *T. zulianus* (**Tabla 12**).

Tabla 12: Alineamiento de la secuencia 3'RACE-C2 con algunas secuencias de transcritos obtenidos de las glándulas de veneno de *Tityus obscurus* y *Tityus zulianus*.

Toxina	Secuencia de Aminoácidos						%													
	1	10	20	30	40	50	60	Identidad	Código											
3'RACE-C2	KDG	YLV	GNDG	<u>CKYS</u>	CLTR	PGHY	CASE	CSRV	KGK	DGY	CYAW	MAC	YCY	SMPD	WVK	TWSR	STNR	<u>CGRGK</u>	100	
To3	KDG	YLV	GNDG	<u>CKYN</u>	CLTR	PGHY	CANE	CSRV	KGK	DGY	CYAW	MAC	YCY	SMPD	WVK	TWSR	STNR	<u>CGRGK</u>	96.9	HE585226.1
Tz1	KDG	YLV	GNDG	<u>CKYS</u>	CFTR	PGTY	CANE	CSRV	KGK	DGY	CYAW	MAC	YCY	SMPN	WVK	TWDR	ATNR	<u>CGRGK</u>	90.1	Q2NME3.1

*Los aminoácidos subrayados () indican una posible modificación postraducciona (amidación)

La alta identidad en el alineamiento de la secuencia obtenida con las beta-neurotoxinas de la base de datos del NCBI, indica que la proteína es posiblemente una β -neurotoxina y sugiere que su blanco es el canal de sodio dependiente de voltaje.

Transcriptoma y análisis bioinformático

Similarmente, las glándulas del veneno de *Tityus pachyurus* fueron utilizadas para un análisis transcriptómico (López et al., 2022). Como resultado del proceso de secuenciación masiva, se obtuvieron 13,312,667 lecturas pareadas, para las cuales mediante el comando “-cutadapt” se eliminaron lecturas consideradas como adaptadores usados en los procesos de secuenciación o lecturas de baja calidad (phred33). Posteriormente, se utilizaron los programas TRINITY para el ensamblaje del transcriptoma (Haas et al., 2013), TransDecoder v2.01 para determinar las regiones codificantes (<http://transdecoder.sf.net>) y BLASTP v2.3.0 para el alineamiento de secuencias (López et al., 2022). Con estos datos se pudo identificar la presencia de los genes que codifican para las toxinas de interés con masa oxidada aproximada de 7,100.0 y 7,332.0 Da (**Tabla 14**).

Tabla 13: Secuencias nucleotídicas obtenidas del transcriptoma de *T. pachyurus*.

Código	Secuencias obtenidas
TRINITY_DN76_c 0_g1_i2	TTTTTTTTTTTTTTTTATAGTGCAATTAGAAGTTTTATTTATTTAAATGAACCTGTTACA GTTTATGCAAAAACCGATATTTTGTGTTAACCAGAGAGTTTCTATTTGCGTTTTCCGC ATTTATTTGTAGCACGGCTCCAGGTTTTACCCAATTTGGCATATTGTAGCAATAGCA CGCCATCCATGCATAGCAGTAACCATCTTTTCCTTTACACGACTGCATTGCTAGC ACAATAGTGCCCTGGTCTTGTAAAGGCAACTATTTTGAACCGTCGTTCCCCACCAG GTAACCGTCTTTACATTGACAACCATGCCAATTAGAAAGAAGCAGCTGATGAACAA AACGAATTGGGTCATCTTTACAGGTGGATTGCTCTTCGATAATTAC
TRINITY_DN76_c 0_g1_i12	TTTTTTTTTTTTTTTTATAGTGCAATTAGAAGTTTTATTTATTTAAATGAACCTGTTACA GTTTATGCAAAAACCGATATTTTGTGATAACCACAGATTTTCTATTTGCCTCTTCCGC ATCTATTTGTAGAACGACTCCAGGTTTTACCCAATCTGGCATACTGTAGCAATAGC ATGCCATCCATGCATAGCAGTAACCATCTTTTCCTTTACACGACTGCATTGCTAG CACAATAGTGCCCTGGTCTTGTAAAGGCAACTATTTTGAACCGTCGTTCCCCACCA GGTAACCGTCTTTACATTGACAACCATGCCAATTAGAAAGAAGCAGCTGATGAACA AACGAATTGGGTCATCTTTACAGGTGGATTGCTCTTCGATAATTAC

López et al., 2022

Se utilizaron los programas Translate Tool (https://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna_aa) (Gasteiger et al., 2005) y SignalP-5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) para la traducción y determinación de péptidos señal y la ubicación de sus sitios de escisión en proteínas (López et al., 2022). Las secuencias maduras se alinearon con las secuencias obtenidas anteriormente (Tabla 14).

Tabla 14: Secuencias aminoacídicas de las toxinas de interés en *T. pachyurus*.

Código	Secuencia	Da*
3'RACE-C1	KDGYLVGNDGCKYSC ¹ LTRPGHYCASE ² CSRVK ³ GKGDGYCYAWMACY ⁴ CYNMPN ⁵ WVKTWSRATNK ⁶ <u>CGK⁷RK</u>	7 108.0
TRINITY_DN7 6_c0_g1_i2	KDGYLVGNDGCKYSC ¹ LTRPGHYCASE ² CSRVK ³ GKGDGYCYAWMACY ⁴ CYNMPN ⁵ WVKTWSRATNK ⁶ <u>CGK⁷RK</u>	7 108.0
TRINITY_DN7 6_c0_g1_i12	KDGYLVGNDGCKYSC ¹ LTRPGHYCASE ² CSRVK ³ GKGDGYCYAWMACY ⁴ CYSMPD ⁵ WVKTWSRSTNR ⁶ <u>CGR⁷GK</u>	7 339.3
3'RACE-C2	KDGYLVGNDGCKYSC ¹ LTRPGHYCASE ² CSRVK ³ GKGDGYCYAWMACY ⁴ CYSMPD ⁵ WVKTWSRSTNR ⁶ <u>CGR⁷GK</u>	7 339.3

*masas reducidas teóricas, los aminoácidos subrayados () indican una posible modificación postraducciona (amidación) y no se consideraron para la determinación de la masa.

Una vez confirmada la secuencia de estas toxinas, se denominó a la secuencia con masa de 7,100.0 Da (± 2 Da) como Tppa2 y la secuencia con masa de 7,332.0 (± 2 Da) como Tppa1.

Expresión de la toxina HisrTppa1 de *T. pachyurus*

Al conocer la secuencia completa de la proteína denominada Tppa1, se diseñaron los iniciadores directo y reverso incluyendo los sitios de corte BamH1, Factor Xa, una señal de paro y Pst1 como se indicó en la metodología, para pasar el gen al vector pQE30 y expresar la proteína en células de *E. coli* cepa **Shuffle®**. La toxina recombinante resultante la denominamos HisrTppa1.

Se creció el medio de cultivo hasta obtener una OD₆₀₀ de 0.8, una vez alcanzada la OD₆₀₀, se adicionó IPTG para obtener una concentración final de 0.05 mM, se añadió 10 mL de glucosa al 30%, 2.3 mL de MgSO₄ al 30% y se incubó durante 14 h a 16°C. Se realizaron los pasos de purificación mencionados en la sección 4.5. Las fracciones obtenidas por HPLC (**Figura 7; A1**) fueron concentradas en un concentrador de solvente (Savant), suspendidas en H₂O y hasta 30 µg fueron inyectados vía intracraneal en ratones cepa CD-1 para evaluar la actividad biológica de la toxina expresada.

La secuencia esperada (80 aminoácidos) de la toxina recombinante HisrTppa1 es:

MRGSHHHHHHGSIEGRKDGYLVGNDGCKYSCLTRPGHYCASECSRVKGKDGICYAWMACYCYSMPDWVKTWSRSTNRCGR

La masa molecular teórica es de 9,185.3 Da (oxidada), la cual se confirmó por espectrometría de masas (**Figura 8; A**) al obtener la fracción aislada por HPLC una masa molecular aparente de 9,184.4 Da (oxidada).

La fracción marcada con una estrella (**Figura 7; A1**) mostró actividad tóxica al ser inyectada en ratones (20 µg; Ver sección **5.2**), y 400 µg de esta fracción fue purificada (**Figura 7; A2**) en un segundo paso cromatográfico bajo las mismas condiciones.

Expresión de la toxina HisrTppa2 de *T. pachyurus*

Al conocer la secuencia completa de la proteína denominada Tppa2, se diseñaron los cebadores directo y reverso incluyendo los sitios de corte BamH1, Factor Xa, una señal de parada y Pst1 (**Tabla 15**). Analizando la secuencia C-terminal de esta

clona con las secuencias C-terminal de las proteínas con alto grado de similitud se identificó una señal para la amidación, por lo cual se tomó la decisión de agregar un residuo de Arg, un aminoácido básico en el C-terminal va a ser más inmunogénico y con mayor actividad (Estrada et al., 2007). Esta nueva construcción en el plásmido pQE30 la denominamos HisrTppa2.

Tabla 15: Cebadores construidos para la expresión de la toxina con masa molecular 7,100 Da de *T. pachyurus*.

Nombre	Secuencia 5-3'	TM °C
Directo	GAGGGATCCATCGAGGGACGCAAGATGGTTAC Bam H1 FXa	68.1
Reverso	GCTACAAATAAATGCCGCTAATAGCTGCAG Arg parada Pst1	50.7

Se utilizaron los procedimientos indicados por los proveedores de las células **SHuffle®** y **Origami®**. Solo se obtuvo proteína en la fracción insoluble (cuerpos de inclusión) en la cepa **Origami®**, mientras en la cepa **SHuffle®** se obtuvo una fracción con actividad sobre ratones (**Figura 8; B1**).

La secuencia esperada (79 aminoácidos) de la toxina recombinante HisrTppa2 es:
MRGSHHHHHHGSIEGRKDGYLVGNDGCKYSCLTRPGHYCASECSRVKGKDGICYAWMACYCYNMPNWVKTWSRATNKCR

La masa molecular aparente de 9,118.3 (oxidada) se confirmó mediante espectrometría de masas (**Figura 8; B**) al obtener una masa molecular aparente de 9,109.3 Da (oxidada). La fracción marcada (*) (**Figura 7; B1**) mostró actividad tóxica al ser inyectada en ratones (20 µg). Esta fracción (400 µg) fue purificada nuevamente (**Figura 7; B2**) en un segundo paso cromatográfico bajo las mismas condiciones.

6.2 Caracterización y expresión de neurotoxinas del veneno de *T. cerroazul*

Con base a los antecedentes de Salazar et al. (2018) se seleccionó la neurotoxina con masa molecular de 6,968.0 Da (± 2 Da) la cual demostró ser tóxica para ratones. La secuencia N- terminal para los primeros 25 residuos de dicha neurotoxina fue:

KDGYIIEHRGCKYSCFFGSSSWCNK

Para la identificación del transcrito que codifica para esta neurotoxina y para su eventual clonación se diseñó el cebador que se muestra en la **Tabla 16**.

Tabla 16: Cebador utilizado para *T. (T.) cerroazul*

Nombre	Secuencia 5' a 3'	TM °C
directo	AAAGATGGTTAT	26.7

Con dicho cebador se amplificaron varios genes utilizando el método 3'RACE, estos fueron clonados (**ver sección 5.4**), y los plásmidos con insertos del tamaño esperado fueron secuenciados. Posterior a la identificación del transcrito se tradujo la secuencia (<https://web.expasy.org/translate/>) (Gasteiger et al., 2005) (**Tabla 17**).

Tabla 17: Alineamiento del N-terminal de la proteína del veneno de *T. cerroazul* con el transcrito obtenido por el método de 3'RACE.

Método	Secuencia de aminoácidos	MM (Da*)
N-Terminal	KDGYIIEHRGCKYSCFFGSSSWCNK	6 968.0
3'RACE-1	KDGYIIEHRGCKYSCFFGSSSWCNKECTLKKGSSGYCAWPACWCYGLPDSVKIFDSNNNKCSKK	6 966.9
3'RACE-2	KEGYLMDHEGCKLSCFIRPAGYCGRECAIKKGSEGYCAWPACYCYKLPNHVKVWEYATNRCGK	6 994.1

*masas moleculares oxidadas, los aminoácidos subrayados () indican una posible modificación postraduccional (amidación) y no se consideraron para la determinación de la masa.

Análisis por espectrometría de Masas/Masas

Se purificó a partir del veneno de escorpión, la toxina con masa molecular 6,968.0 Da (± 2 Da), y aproximadamente 15 μ g fueron procesados como se indicó en la **Sección 5.3**. Los resultados de masas fueron analizados con el programa

MaxQuant (versión 1.6.3.3) (Cox, 2008) los péptidos estimados se muestran en la **Tabla 18**. Se logró obtener un 100% de cobertura al analizar los espectros obtenidos de los dos cortes enzimáticos, con la secuencia obtenida anteriormente por el método de 3´RACE.

Tabla 18: Alineamiento de la secuencia obtenida por el método 3´RACE, y los fragmentos péptidicos (quimotripsina/tripsina) analizados por el programa MaxQuant para la toxina de masa molecular 6,968.0 Da.

ID	100% de cobertura	E*
3´RACE	KDGYIIIEHRGCKYSCFFGSSSWCNKECTLKKGSSGYCAWPACWCYGLPDSVKIFDSNNNKCS	
14	KDGYIIIEHR	T
15	KDGYIIIEHRGCKY	Q
4	DGYIIIEHR	T
11	IIIEHRGCKY	Q
12	IIIEHRGCKYSCF	Q
13	IIIEHRGCKYSCFF	Q
17	SCFFGSSSW	Q
19	YSCFFGSSSWCNK	T
2	CNKECTLKKGSSGY	Q
0	CAWPACW	Q
1	CAWPACWCY	Q
3	CYGLPDSVKIF	Q
7	GLPDSVKIF	Q
9	IFDSNNNK	T
8	GLPDSVKIFDSNNNKCS	Q

*La columna E indica la enzima que se utilizo para obtener el fragmento; Q: quimotripsina; T: tripsina

Secuenciación y análisis bioinformático

Paralelamente, las glándulas del telson de especímenes adultos *Tityus cerroazul* fueron utilizadas para un análisis transcriptómico (6 glándulas), donde se obtuvieron 19,526,182 millones de lecturas pareadas (López et al., 2022). Mediante el programa FastQC y el comando “cutadapt” se eliminaron lecturas consideradas como adaptadores usados en los procesos de secuenciación o lecturas de baja calidad (phred33). Posteriormente, se utilizaron los programas TRINITY (Haas et al., 2013), Transdecoder v2.01 (<http://transdecoder.sf.net>), BLASTP v2.3.0 (López

et al., 2022). Con estos datos se pudo identificar la presencia de los genes que codifican para las toxinas de interés con masa oxidada aproximada de 6,968.8 y 6,995.8 Da (Ver **Tabla 19**).

Tabla 19: Secuencias nucleotídicas obtenida del transcriptoma de *T. cerroazul*.

Código	Secuencia obtenida
TRINITY_DN337_c0_g1_i1.p1 (E_TRINITY-1)	TATAAATAGTCGGGATTTTGC GACTAAAATTC AATCGAATCTCCC GTTATTTG GAAAGCGGT CGA AGATCAATCAGTCCGAA CAATGAAAGCGATCATTTTCTTTATCGGATGCTTAATGCTTATTGATG TGGTGGTGGAAAGTAAAGACGGATACATCATCGAGCATCGAGGCTGCAAATACAGTTGCTTCTT TGGTTCGTCGCTCGTGGTGAATAAAGAATGCACGTTAAAGAAAGGCTCGTCGGGCTACTGCGC CTGGCCAGCCTGTTGGTGTACGGGCTTCCCGATAGCGTCAAATTTTCGACAGTAAACAACAT AAATGTAGCAAAAAATAAATTTTCTTTCCACTAAAAGCGTGCTTTTTTGG AATGAATTGTAAGAAG TTACGGAAACATTA AAAATTTCTTGCATTATAAAAAA
TRINITY_DN73245_c0_g1_i.p1 (E_TRINITY-2)	TTACAATTC AATTCGTGACTTTTTAATATTCGCGTGACAGGTTACAGTTCA TTGGTTCGAGGGTTA TCGACGGTACAAAATGAACTATTTGCCGCATCTATTTGTGGCGTATTTCCCAAACTTTGACGTGAT TCGGCAGTTTGTAGCAGTAACACGCCGGCCAGGCGCAGTATCCTTCGGATCCCTTCTTTATGG CGCATTTCGCGGCCGAGTATCCCGCTGGTCTGATGAAACA ACTGAGTTTACATCCTTCGTGGT CCATCAAGTATCCTTCTTTACATTCCACCACGCCGATCAGCACTAAACAGCTGACGAACAGAAT TATTCCTTTCATGCTTCAAATCGATGATTCTCGAAGGGTCTTCCAATAAAACACGATTCAATTC AATTCTAATTACGAATCGCC

López et al., 2022

Para la traducción del gen a secuencia de proteína se utilizó la herramienta bioinformática del sitio web <https://web.expasy.org/translate/> (Gasteiger et al., 2005) y la para la eliminación del péptido señal se utilizó la herramienta del sitio web <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> donde la secuencia resultante se comparó con la secuencia obtenida con el método de 3'RACE (**Tabla 20**).

Tabla 20: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de toxinas obtenidas por N-terminal y técnicas "ómicas".

Método	Secuencia de aminoácidos	MM (Da)*
N-terminal	KDGYIIEHRGCKYSCFFGSSSWCNK	6 968.0
3'RACE	KDGYIIEHRGCKYSCFFGSSSWCNKECTLKKGSSGYCAWPAWCYGLPDSVKIFDSNNNKCSKK	6 966.9
E_TRINITY-1	KDGYIIEHRGCKYSCFFGSSSWCNKECTLKKGSSGYCAWPAWCYGLPDSVKIFDSNNNKCSKK	6 966.9
E_TRINITY-2	KEGYLMDHEGCKLSCFIRPAGYCGRECAIKKGSSEGYCAWPAWCYKLPNHVKVWEYATNRCGK	6 994.5

*masas moleculares oxidadas, los aminoácidos subrayados () indican una posible modificación postraduccional (amidación) y no se consideraron para la determinación de la masa.

La secuencia de aminoácidos obtenida E_TRINITY-1 se denominó como Tce3 y se comparó con las secuencias depositadas en la base de datos del NCBI utilizando el

programa BLASTp donde se obtuvo un 93.4% de identidad con la beta neurotoxina Td5 de *Tityus discrepans* y un 91.8% de identidad con la beta neurotoxina Bactridine-1 de *T. discrepans* (Tabla 21).

Tabla 21: Alineamiento de la secuencia Tce3 con algunas secuencias de *Tityus discrepans*.

Nombre	Secuencia de aminoácidos						%																																																								
	1	10	20	30	40	50	60	Identidad	Código																																																						
Tce3	K	D	G	Y	I	E	H	R	G	C	K	Y	S	C	F	F	G	S	S	S	W	C	N	K	E	C	T	L	K	K	G	S	S	G	Y	C	A	W	P	A	C	W	C	Y	G	L	P	D	S	V	K	I	F	D	S	N	N	N	K	C	S	100	
Td5	K	D	G	Y	I	E	H	R	G	C	K	Y	S	C	F	F	G	T	N	S	W	C	N	T	E	C	T	L	K	K	G	S	S	G	Y	C	A	W	P	A	C	W	C	Y	G	L	P	D	N	V	K	I	F	D	S	N	N	N	K	C	-	93.4	C9X4K3.1
Bactridine-1	K	D	G	Y	I	E	H	R	G	C	K	Y	S	C	F	F	G	T	N	S	W	C	N	T	E	C	T	L	K	K	G	S	S	G	Y	C	A	W	P	A	C	W	C	Y	G	L	P	D	N	V	K	I	F	D	S	N	N	L	K	C	-	91.8	P0CF39.1

La alta identidad en el alineamiento de la secuencia obtenida con las beta-neurotoxinas de la base de datos del NCBI, indica que la proteína Tce3 es posiblemente una β -neurotoxina y sugiere que su blanco es el canal de sodio dependiente de voltaje.

La secuencia de aminoácidos E_TRINITY-2 se denominó como Tce4 y se comparó con las secuencias depositadas en la base de datos del NCBI utilizando el programa BLASTp donde se obtuvo un 92.0 % de identidad con la beta neurotoxina Tt1g de *Tityus trivittatus* y un 92.0 % de identidad con la beta neurotoxina Tf1 de *Tityus fasciolatus* (Tabla 22).

Tabla 22: Alineamiento de la secuencia Tce4 con algunas secuencias de *Tityus trivittatus* y *Tityus fasciolatus*.

Nombre	Secuencia de aminoácidos						%																																																										
	1	10	20	30	40	50	60	Identidad	Código																																																								
Tce4	K	E	G	Y	L	M	D	H	E	G	C	K	L	S	C	F	I	R	P	A	G	Y	C	G	R	E	C	A	I	K	K	G	S	E	G	Y	C	A	W	P	A	C	Y	C	Y	K	L	P	N	H	V	K	V	W	E	Y	A	T	N	R	C	G	K	100	
Tt1g	K	E	G	Y	L	M	D	H	E	G	C	K	L	S	C	F	I	R	P	S	G	Y	C	G	R	E	C	A	I	K	K	G	S	S	G	Y	C	A	W	P	A	C	Y	C	Y	G	L	P	N	W	V	K	V	W	E	R	A	T	N	R	C	G	K	92.0	P0DMM8.1
Tf1a	K	E	G	Y	L	M	D	H	E	G	C	K	L	S	C	F	I	R	P	S	G	Y	C	G	R	E	C	K	I	K	K	G	S	S	G	Y	C	A	W	P	A	C	Y	C	Y	G	L	P	N	W	V	K	V	W	E	R	A	T	N	R	C	G	K	92.0	P0DQH5.1

Expresión de la toxina HisrTce3 de *T. ferroazul*

Una vez confirmada la secuencia de la toxina Tce3, se diseñó el plásmido (ver **Sección 5.4**), y se denominó a la toxina recombinante Tce3 como HisrTce3, se transformó en células de *E. coli* cepa SHuffle[®]. Se creció el medio hasta obtener una OD₆₀₀ de 0.8, una vez alcanzada la OD₆₀₀, se adicionó IPTG a una concentración final de 0.05 mM, se añadió 10 mL de glucosa al 30%, 2.3 mL de MgSO₄ al 30% y se incubó durante 12 h a 16°C. Se realizaron los pasos de purificación mencionados en la **Sección 5.5**. Las fracciones obtenidas por HPLC (**Figura 7; C1**) fueron concentradas al vacío en un equipo Savant SpeedVac (concentrador de solventes), re-suspendidas en H₂O y fueron inyectados 15 µg (Salazar et al 2018) vía intracraneal en ratones cepa CD-1 para evaluar la actividad biológica de la toxina expresada.

La secuencia esperada (78 aminoácidos) de la toxina recombinante HisrTce3 es:
MRGSHHHHHHGSIEGRKDGYYIEHRGCKYSCFFGSSSWCNKECTLKKGSSGYCAWPACWCYGLPDSVKIFDSNNKCS

La masa molecular teórica de 8,820.9 Da (oxidada), se confirmó por espectrometría de masas (**Figura 8; C**) al obtener la fracción aislada por HPLC una masa molecular aparente de 9,820.9 Da (oxidada).

La fracción marcada (*) (**Figura 7: C1**) mostró actividad tóxica al ser inyectada (25 µg). vía intracraneal en ratones CD-1 (Salazar et al., 2018). Esta fracción con actividad fue purificada en otro paso cromatográfico (**Figura 7; C2**).

6.3 Caracterización y expresión de una neurotoxina del veneno de *Centruroides bicolor*

Con base a los antecedentes de Salazar et al. (2018), se seleccionó la neurotoxina con masa molecular de 7,487 Da, la cual al ser inoculada (2 µg) en ratones CD-1 via intracraneal produce letalidad.

La secuencia N-terminal de los primeros 25 residuos, para dicha neurotoxina fue: KDGYPMDNKGCKIACVINNQYCETE

Para la clonación se diseñó el iniciador que se muestra en la **Tabla 23**.

Tabla 23: Iniciador utilizado para *C. bicolor*

Nombre	Secuencia 5' a 3'	TM °C
Directo	AAA GAT GGG TAT CCT ATG GA	56.0

Este iniciador se preparó a una concentración de 20 mmolar para amplificar los genes, estos fueron clonados (**ver sección 5.4**), y los plásmidos con insertos del tamaño esperado fueron secuenciados. Posterior a la identificación del transcrito se tradujo (<https://web.expasy.org/translate/>) (Gasteiger et al., 2005) dando como resultado las siguientes secuencias de aminoácidos (**Tabla 24**).

Tabla 24: Secuencia de alineamiento del N-terminal de la proteína del veneno de *C. bicolor* con los transcritos obtenidos de las glándulas del veneno.

Plásmido	Secuencia de aminoácidos	Da
N-terminal	KDGYPMDNKGCKIACVINNQYCETE	7 487.0
3'RACE	KDGYPMDNKGCKIACVINNQYCETECVTVLKGGKGYCYFWKLACYCEGLPNWAKVWDRATNKCRA	7 485.7

La secuencia de aminoácidos obtenida por 3'RACE se comparó con las secuencias depositadas en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) utilizando el programa BLASTp donde se obtuvo un 95% de identidad con la beta neurotoxina CsxIX de *Centruroides suffusus suffusus* y un 94% de identidad con la beta neurotoxina Cs9 de *Centruroides sculpturatus* (**Tabla 25**).

Tabla 25: Alineamiento de la secuencia obtenida por 3'RACE con algunas secuencias de transcritos obtenidos de las glándulas de veneno de *Centruroides suffusus suffusus* y *Centruroides sculpturatus*.

Nombre	Secuencia de aminoácidos	%	Código
	1 10 20 30 40 50 60	Identidad	
3'RACE	KDGYPMDNKGCKIACVINNQYCETECVTVLKGKGGYCYFWKLACYCEGLPNWAKVWDRATNKCRA	100	
CsslX	KDGYPMDHKGCKISCVINNKYCETECVTVLKGKGGYCYFWKLACYCEGLPNWAKVWDRATNKCRA	95	F1CGT6.1
	KDGYPMDHKGCKISCVINNKYCETECVTVLKGKSGYCYFWKLACYCEGLPNWAKVWDRATNKCRA	94	XP_023241641.1

La alta identidad en el alineamiento de la secuencia obtenida con las beta-neurotoxinas de la base de datos del NCBI, indica que la proteína de *C. bicolor* es posiblemente una β -neurotoxina y sugiere que su blanco es el canal de sodio dependiente de voltaje. Únicamente la proteína CsslX cuenta con datos sobre su actividad biológica (Espino et al., 2011), donde indican que interactúa sobre el sitio 4 del canal de sodio dependiente de voltaje cambiando el voltaje de activación hacia potenciales negativos, afectando la activación del canal, así como su alta afinidad a Nav1.1/SCN1A, Nav1.2/SCN2A y Nav1.6/SCN8A.

Análisis por espectrometría de Masas/Masas

Se purificó a partir del veneno de escorpión la toxina con masa molecular 7,487.0 Da, y aproximadamente 15 μ g fueron procesados como se indicó en la **Sección 5.5** con quimotripsina y tripsina. Los resultados de masas fueron analizados con el programa MaxQuant (versión 1.6.3.3), los péptidos estimados se muestran en la **Tabla 26**. Se obtuvo un 100% de cobertura.

Tabla 26: Alineamiento de la secuencia obtenida por el método 3'RACE, y los fragmentos peptídicos (quimotripsina/tripsina) analizados por el programa MaxQuant para la toxina de masa molecular 7,487.0 Da.

ID	100% de cobertura	E*
3'RACE	KDGYPMDNKGCKIACVINNQYCETECVTVLKGKGGYCYFWKLACYCEGLPNWAKVWDRATNKCRA	
1	KDGYPMDNKGCKIACVINNQYCETECVTVL	T
2	KDGYPMDNKGCKIACVINNQYCETEC	T
3	KDGYPMDNKGCKIACVINNQY	Q
4	DNKGCKIACVINNQY	Q
5	KGKGGYCYFW	Q
6	CEGLPNWAKVW	Q
7	KLACYCEGLPNWAKVW	Q
8	DRATNKCRA	Q

*La columna E indica la enzima que se utilizó para obtener el fragmento; Q: quimiotripsina; T: tripsina

Secuenciación y análisis bioinformático

Similarmente, las glándulas del veneno de *Centruroides bicolor* fueron utilizadas para un análisis transcriptómico, donde se obtuvieron 12,963,910 millones de lecturas pareadas (López et al., 2022). Mediante el comando “-cutadapt” se eliminaron lecturas consideradas como adaptadores usados en los procesos de secuenciación o lecturas de baja calidad (phred33) (López et al., 2022). Posteriormente, se utilizaron los programas TRINITY (Haas et. Al., 2013), Transdecoder v2.01 (<http://transdecoder.sf.net>), y BLASTP v2.3.0. Con estos programas se pudo identificar la presencia del gen que codifica para la toxina con masa molecular aparente de 7,487.0 Da (± 2 Da) la cual denominamos Cbi1 (**Tabla 27**).

Tabla 27: Secuencia nucleotídica obtenida del transcriptoma de *Centruroides Bicolor*.

Código	Secuencia obtenida
TRINITY_DN33 7_c0_g1_i1.p1	CGATCCTATAATATACACAATAAAACTCAGACTACTATAGAATTTGTGAGAATCCGGACTTCAACATAA ACAATTTAACGTCGTAACATCGGCGTTGTCAACTTTCACACCTGGCAGTATATCTTCTTTAAAGTCCTT CTGGCCTGTTGTCCCGATTTTCGCCGTATCAATATAACAATTAATATGTGCCAACTATCGCCATCTCCC TAGCCGGGACACTCGTTTTCCGTTTCTCAAATTTCCGATACATTTGGATATATCGTTTTAATTATCTCT GCGGGTATATCATCCTTCTCGCATGCAACCATACTATCAACTATTGACCCCTGCACTAAGAAGTATCA TCTAGAAGTTTCTTCTTTTCGACCGGAAAGCATACAATCTTCAATTCCTCTACGAAATATTTATCTCCC CGCGCGCTCAAATGTAACTCTCTTTTTGCAATCGTATCTCTATAGTTGTTCTCATATAATATGTATG ATATCCTTTTTTCAAATAAACGTTATTTCTTAGTTAACTAGAATCCGAGTGAGTCACTTCCAACCCA CTGTCTCACGGTCTCCATCTCGAATCCGATCGTCCGCGCTAGCAGCCGCTCGCGTGATCTACTTTTA AAACAAACGACACTCGGTTGTGTCAGTCCGATGCATCAAAGAGGTGCCGACCCTCCGGTCAC AATTAATAAATGTTCAATATATAAGTATTGATTTAACTTTAATCATGAATGGCCAAAATGATGTAATG CGCATTCTGATCTCCGAAAGCCACCAGTGGCCGAGCAAATGATACCATTGCTTAATGGAAGATGG TCGTGGGTTTCGCGCCCAATCAATGGGATATAGTAAATTTTACGGGTTTTACAGTGTCTATTATTTA AATACGAAGCACTTTTCTATAGAAAATCCTTCCGAGGAGCATTTCCTTTCAGATCCTCCGTGTATTA CGTTGCTATATCCGATCAAACATATAACATAGTCTCCGAATATAATTTTATATACAATAAAAACCGT CAAGTAGATGAATAGTCGATTTCCAAACATACTTTACTGGAACCTAATTTTACTTACTAATACTATA TTAAATAATTTAAAGAACTTATCATTTAAACGTTATCAAAGTAAGAGTTTTTATTAATTAATCTAATACA GCGAGTGAGATGTTTTCTAAAGTTGAAATTGAAATTAATTTTTGCGATTAATAAAGAAAATGTACAAT TGAATTTAATATCTGCAGTGATATGTAATTTTATTTTATAAGACTACAATTGAAAAACAATTACGACATC ATTTCAAGCTCTGCATTTATTGGTTGCTCTATCCCAAACCTTTGCCAGTTGGGAAGTCCCTCGCAAT ACAAGCCAGTTTCCAAAAGTAGCAGTAACCCCTTCTTCCCTTCAGAACTGTAACGCATTCCGTTTCA CAATATTGATTATTGATTACACAAGCGATTTTACATCCTTTATATCCATCGGATATCCATCTTTGCTCT GAACTCCTATTATCATCAGAGAAGCGAGGATCAGGATCAAAAATTTCAATTTTGTCTTCAATTGTCTGT TTAAATTTGACTAAAGATGAGCAGTTTGAATTCAGACAAGAAGACAAGAA

López et al., 2022

Para la traducción del gen a secuencia de proteína se utilizó la herramienta bioinformática del sitio web <https://web.expasy.org/translate/> (Gasteiger et al., 2005) y la para la eliminación del péptido señal se utilizó las herramientas del sitio web <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> la secuencia resultante se comparó con la secuencia obtenida con el método de 3'RACE (**Tabla 28**).

Tabla 28: Alineamiento del transcrito obtenido por TRINITY

Método	Secuencia de aminoácidos	MM (Da)
N-terminal	KDGYPMDNKGCKIACVINNQYCETE	7 487.0
3'RACE	KDGYPMDNKGCKIACVINNQYCETECVTVLKGKKGYCYFWKLACYCEGLPNWAKVWDRATNKCRA	7 485.7
E_TRINITY	KDGYPMDNKGCKIACVINNQYCETECVTVLKGKKGYCYFWKLACYCEGLPNWAKVWDRATNKCRA	7 485.7

Expresión de la toxina HisrCbi1 de *C. bicolor*

Al conocer la secuencia completa de la proteína denominada Cbi1, se diseñaron los iniciadores directo y reverso incluyendo los sitios de corte BamH1, Factor Xa, una señal de paro y Pst1 (**Tabla 29**) para pasar el gen al vector pQE30 y expresar la proteína en células de *E. coli* cepa Origami® y SHuffle®. La toxina recombinante resultante la denominamos HisrCbi1.

Tabla 29. Iniciadores diseñados para HisrCbi1.

Nombre	Secuencia 5' a 3'	TM °C
Directo	GGA TCC ATC GAG GGA CGC AAA GAT GGG TAT CCT ATG GA Bam H1 FXa	50.7
Reverso	GCA ACC AAT AAA TGC AGA GCT TAA TAG CTG CAG Parada Pst1	55.0

Una vez diseñado el plásmido, se transformaron las células de *E. coli* cepas SHuffle® y Origami®, la expresión y purificación de la toxina se realizó como se describió previamente (**Sección 4.4**). Las fracciones obtenidas por HPLC (**Figura 8; D1**) fueron concentradas en un concentrador de solvente (Savant), re-suspendidas en H₂O (Tipo I) y se utilizó 15 µg para ser inyectados vía intracraneal

en ratones cepa CD-1 para evaluar la actividad biológica de la toxina expresada. (Salazar et al., 2018)

La secuencia esperada de la toxina recombinante HisrCbi1:

MRGSHHHHHHSIEGRKDGYPMDNKGCKIACVINNQYCETECVTLKGGKGYCYFWKLACYCEGLPNWAKVWDRATNKCRA

Con una masa molecular aparente de 9,339.7 (oxidada) se confirmó por espectrometría de masas (**Figura 8 D**) donde la masa molecular experimental fue de 9,339.4 (oxidada).

La fracción indicadas con un asterisco (*) (**Figura 7; D1**) presentaron actividad tóxica en ratones (15 µg). Esta fracción (400 µg) fue purificada en un siguiente paso cromatográfico (**Figura 7; D2**).

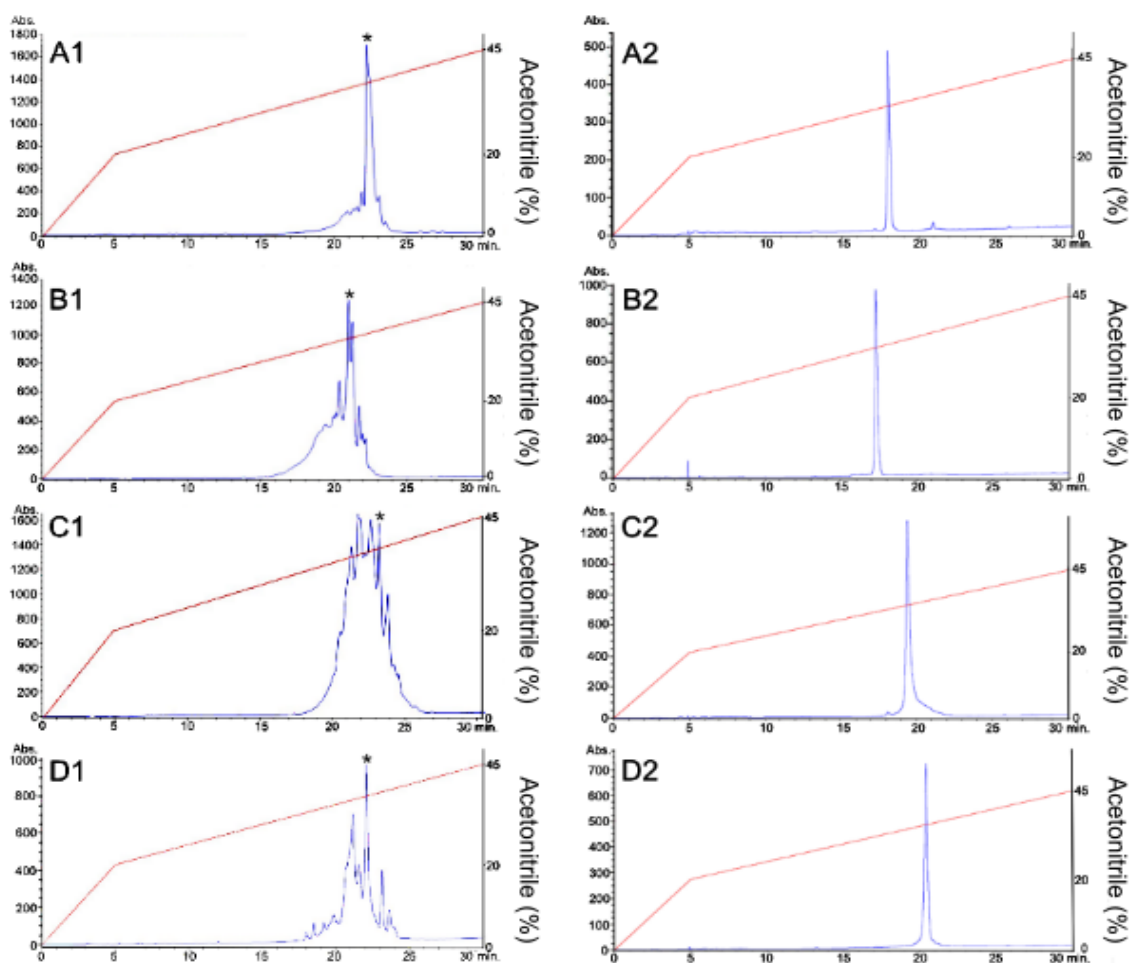


Figura 7: Cromatograma de HPLC de las toxinas expresadas. A1 y A2 HisrTppa1; B1 y B2 HisrTppa2; C1 y C2 HisrTce3; D1 y D2 HisrCbi1. (Salazar et al., 2022)

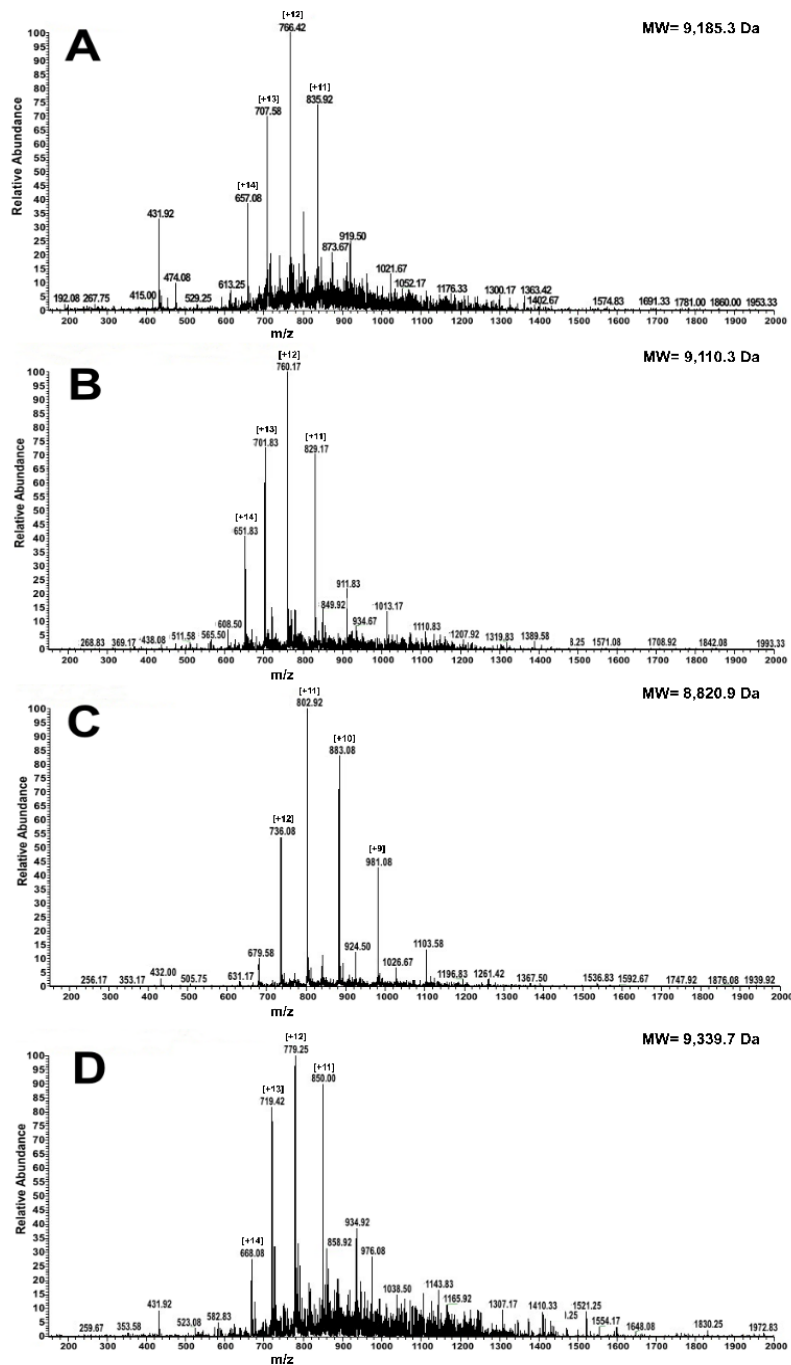


Figura 8: Análisis de espectrometría de masas. A HisrTppa1; B HisrTppa2; C HisrTce3; D HisrCbi1. (Salazar et al., 2022)

6.4 Dicroísmo circular (DC)

Para evaluar la formación de estructura secundaria en las fracciones con actividad biológica en todas las neurotoxinas recombinantes, se utilizó la técnica de dicroísmo circular (DC). Se utilizó 150 µg de cada toxina recombinante (cuantificadas en un espectrofotómetro NanoDrop One) y 150 µg de la toxina nativa Cbi1 purificada del veneno de *C. bicolor*. En la **Figura 9** se muestra los espectros de DC, los cuales se analizaron con la base de datos del programa BeStSel (Micsonai et al., 2018). Este programa cuenta con una base de datos de proteínas y espectros ya definidos (Base de datos del Protein Data Bank) y nos permite predecir si existe o no formación de estructura secundario y los porcentajes aproximados de estructura secundaria en nuestra muestra (**Ver Tabla 30**).

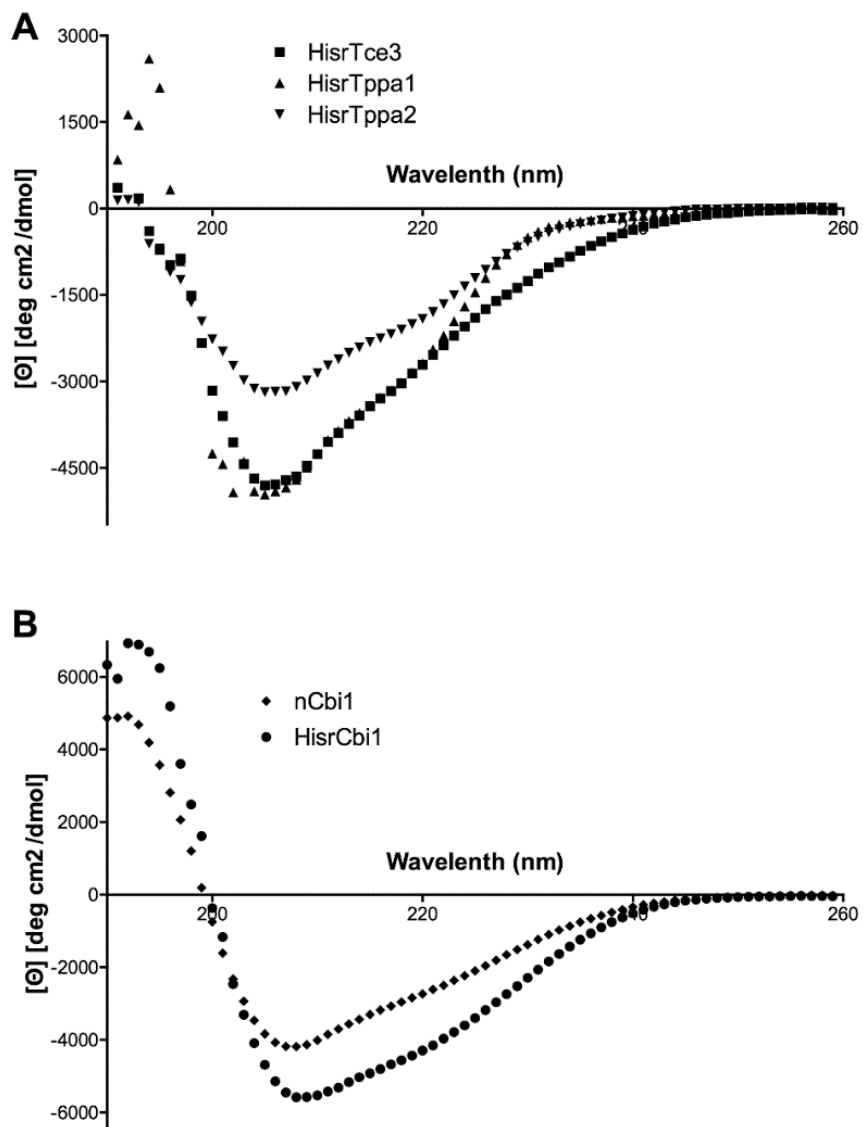
Todas las neurotoxinas recombinantes presentaron estructura secundaria similar/comparable a la presentada por la toxina nativa Cbi1. Estos datos también son comparables con los espectros de DC para las toxinas CsslI de *Centruroides suffusus suffusus* y TsVII de *Tityus serrulatus* (Loret et al 1990) donde describen que la formación de estructura tipo hoja β- antiparalela podría dar a la toxina su capacidad para unirse a los canales de sodio dependiente de voltaje de mamífero.

Tabla 30. Porcentajes estimados con el programa BeStSel de la estructura secundaria de las neurotoxinas recombinantes y la toxina nativa Cbi1.

Proteína	α-hélice	Hoja β- Antiparalela	Giro	Otras
Hisrtppa1	11.8	23.9	18.0	46.2
Hisrtppa2	11.2	25.5	20.8	42.4
Hisrtce3	9.9	24.4	20.2	45.5
Hisrcbi1	15.1	21.9	17.4	43.6
Cbi1	14.8	23.1	20.7	41.4

BeStSel (Micsonai et al., 2018)

Figura 9. Espectros de dicroísmo circular de las neurotoxinas recombinantes
A) neurotoxinas recombinantes del veneno de *T. pachyurus* y *T. cerroazul*; B) neurotoxina recombinante y nativa del veneno de *C. bicolor* *C. bicolor*.



15

Se utilizo 150 µg/mL de cada neurotoxina a 25°C.

6.5 Evaluación de los anticuerpos obtenidos

Como criterios de evaluación del antisuero obtenido, se utilizó tanto el aspecto cuantitativo (medición de títulos de anticuerpos) utilizando el método de ELISA, como el cualitativo (afinidad y especificidad) utilizando el método de inmunoelectrotransferencia y ensayos de neutralización en ratones, siendo este último el más importante (WHO 2017). Para ciertas aplicaciones, no es tan primordial el hecho de que el antisuero presente títulos de anticuerpos, sino el que sea de una alta especificidad, de tal forma que para nuestro estudio es de principal interés que el antisuero obtenido tenga un efecto neutralizante del efecto letal del veneno (WHO 2017).

6.5.1 Purificación de los anticuerpos

Terminado el proceso de inmunización con las cuatro toxinas recombinantes, las conejas fueron sangradas en su totalidad (De la rosa et al., 2018). Para la coneja 1 se obtuvo un volumen de suero de 87 mL, para la coneja 2 se obtuvo 66 mL. Se procedió a la purificación de las IgGs del suero obtenido mediante la precipitación con ácido caprílico. Posterior al proceso de diálisis, se cuantificó (aproximadamente 5 mg/mL) y liofilizó en viales en porciones de 50 mg de proteína por vial (De la rosa et al., 2018). Se obtuvieron 12 viales de la coneja 1 y 9 viales de la coneja 2. Para los siguientes análisis, los anticuerpos se prepararon como una mezcla de IgGs de ambas conejas a una concentración de trabajo de 30 mg/mL (WHO 2017).

6.5.2 Inmunoelectrotransferencia

Se utilizó como anticuerpo primario la mezcla de IgGs de conejo purificadas a una concentración de 30 mg/mL (**Ver sección 5.5.1**). En el carril 1 se agregó veneno de *C. panamensis*; en el carril 2 se agregó veneno de *C. granosus*; en el carril 3 se agregó veneno de *C. bicolor*; en el carril 4 se agregó veneno de *T. pachyurus*; en el

carril 5 se agrego veneno de *T. cerroazul*; en el carril 6 se agrego veneno de *T. asthenes*; en el carril 7 se agrego veneno de *T. festae*. (**Figura 10**).

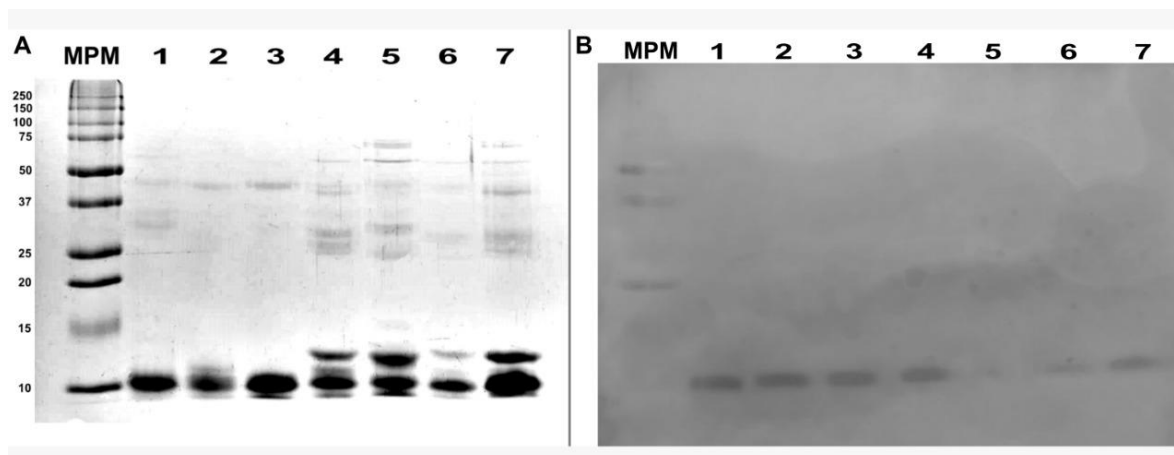


Figura 10: SDS-PAGE de venenos de escorpión de Panamá y Western-blot realizado con IgG polivalentes de conejo (anti-Mix). (A) Separación por SDS-PAGE de venenos de escorpión en condiciones reductoras y tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250. (B) Inmunotransferencia de venenos de escorpión. MPM: marcadores de masa molecular (kDa); venenos, 1 - *C. panamensis*; 2 - *C. granosus*; 3 - *C. bicolor*; 4 - *T. pachyurus*; 5 - *T. cerroazul*; 6 - *T. asthenes*; 7 - *T. festae*.

Las IgGs producidas muestran buen reconocimiento hacia los venenos (Carril 3 y 4) de las especies *C. bicolor* y *T. pachyurus* y reconocimiento hacia el veneno de *T. cerroazul* (Carril 5B). Además, se evidencia reconocimiento por los anticuerpos generados hacia los componentes del veneno completo y de igual manera se evidencia reconocimiento cruzado con veneno de otras cuatro especies diferentes. Este bajo reconocimiento en el veneno de *T. cerroazul* puede significar que los anticuerpos no están reconociendo una secuencia lineal sino probablemente a una conformacional. Para evaluar esto se realizó la técnica de ELISA (WHO, 2017).

6.5.3 ELISA

En la **Tabla 31** se comparan los títulos obtenidos de la mezcla de las IgGs polivalentes purificadas del suero de ambas conejas producido a partir de 4 neurotoxinas recombinantes (HisrTce3, HisrCbi1, HisrTppa1 y HisrTppa2) con otros anticuerpos comerciales (**ANEXO 1**).

Tabla 31: Títulos de anticuerpos obtenidos por ELISA

Antiveneno	<i>C. bicolor</i>	<i>C. granosus</i>	<i>T. pachyurus</i>	<i>T. cerroazul</i>	<i>T. asthenes</i>	<i>T. festae</i>
Alacramyn® (Mex) ^a	1,124 (910.9-1,386)	1,656 (1,374-1,997)	2,228 (1320-3,763)	803.0 (515-1,252)	1,813 (1,052-3,125)	1,816 (1,272-2,592)
Anti-Escorpión (Ven) ^b	819 (664.0-1,009)	730.0 (580.0-918.0)	2,620 (2,044-3,359)	1,027 (916.0-1,152)	1,742 (1,353-2,242)	2,585 (2,052-3,257)
Anti-Escorpión (Bra) ^c	9,822 (7,776-12,406)	8,311 (6,581-10,497)	22,370 (18,053-27,719)	13,580 (11,236-16,417)	18,182 (14,455-22,870)	15,852 (13,321-18,864)
Este trabajo ^d	1,503.0 (1,396-1,620)	862.1 (762.7-974.4)	1,023 (994.7-1,053)	734.3 (717.3-751.4)	835.4 (741.3-941.4)	1,139 (936.1-1,386)

La concentración de anticuerpos utilizada fue de: a= 37.1 mg/mL; b= 19.6 mg/mL; c= 80.8 mg/mL; d= 30 mg/mL

Se puede evidenciar que el antiveneno comercial de Brasil es el que genera mejores títulos hacia todos los venenos, pero es el que muestra mayor concentración de IgGs. El antiveneno comercial de Venezuela presenta mejores títulos hacia los venenos de *Tityus* que hacia *Centruroides* y el antiveneno de México presenta títulos comparables hacia todos los venenos a excepción del de *Tityus cerroazul* que fue el más bajo.

Sin embargo, un valor de título alto/bajo no necesariamente significa que se obtendrá una buena neutralización de las IgGs hacia el efecto letal del veneno. (WHO, 2017).

6.5.4 Ensayos de DE₅₀

Para evaluar la potencia neutralizante de las IgGs de conejo, se evaluó la DE₅₀ y comparó con otras DE₅₀ de antivenenos comerciales. Los valores de DE₅₀ y su correspondiente intervalo de confianza al 95% fueron determinados por el método Spearman-Kärber (WHO, 2017).

Tabla 32: Valores de dosis efectiva (DE_{50}) del antiveneno anti-Mix para neutralizar el veneno de *C. bicolor*, *T. pachyurus* y *T. cerroazul*.

Dosis (mg/mL)	Relación μg veneno <i>C. bicolor</i> / μg IgGs	n	Vivos	Muertos
0.3	0.010	4	4	0
0.45	0.015	4	3	1
0.675	0.022	4	2	2
1.012	0.033	4	0	4
Control	Solo veneno (94.5 μg)	2	0	2

Dosis (mg/mL)	Relación μg veneno <i>T. pachyurus</i> / μg IgGs	n	Vivos	Muertos
0.3	0.010	4	4	0
0.45	0.015	4	4	0
0.675	0.022	4	3	1
1.012	0.033	4	0	4
Control	Solo veneno (91.8 μg)	2	0	2

Dosis (mg/mL)	Relación μg veneno <i>T. cerroazul</i> / μg IgGs	n	Vivos	Muertos
0.2	0.006	4	4	0
0.3	0.010	4	4	0
0.45	0.015	4	1	3
0.675	0.022	4	0	4
Control	Solo veneno (24.3 μg)	2	0	2

1,5 DL_{50} del Veneno de *C. bicolor*, *T. pachyurus* y *T. cerroazul* corresponden a 94,5, 91,8 y 24,3 μg de veneno/ratón (18 g), respectivamente. La dosis corresponde a la relación de mg de veneno por mL de antiveneno.

7 Discusión

7.1 *Tityus cerroazul*

Se logró identificar la secuencia primaria de dos neurotoxinas con masa molecular aproximada de 6,968.8 y 6,995.8 Da, las cuales denominamos como Tce3 y Tce4 respectivamente al ser nuevas secuencia reportadas, se registraron en la base de datos de UniProt (<https://www.uniprot.org/>) y su número de acceso asignado a la secuencia Tce3 es C0HLZ2. La secuencia de la toxina Tce3 se confirmó por diversos métodos como 3´RACE, el estudio del transcriptoma de las glándulas del Telson y espectrometría de MS/MS.

Los datos obtenidos de la secuencia Tce3 y la comparación de esta secuencia mediante la herramienta BLASTp indica que es una nueva secuencia y es una posible beta neurotoxina con un 93.4% de identidad a la betaneurotoxina TdNa5 (C9X4K3.1) del escorpión *T. discrepans*. Se requieren hacer más experimentos para hacer su caracterización funcional similar a los de Yang, F. et al., 2018.

Los datos obtenidos de la secuencia Tce4 y la comparación de esta secuencia mediante la herramienta BLASTp indica que es una nueva secuencia y es una posible beta neurotoxina con un 91.8% de identidad a la betaneurotoxina Tt1g (P0DMM8.1) del escorpión *T. trivittatus*. Se requieren hacer más experimentos para hacer su caracterización funcional similar a los de Yang, F. et al., 2018.

Se logró clonar el gen de la toxina Tce3 en el vector de expresión pQE30 y la toxina recombinante resultante la denominamos HisrTce3. Para la toxina HisrTce3 se logró expresar en células de *E. coli* en la cepa **SHuffle®** donde se obtuvo en cuerpos de inclusión y al purificarla al menos una fracción demostró tener actividad biológica en ratones. Las condiciones de expresión como medio de cultivo, temperaturas de expresión o concentración de IPTG se han optimizado para lograr mejores rendimientos (**Ver tabla 33**). Teniendo en cuenta los resultados de DC, donde se evidenció la presencia de estructura secundaria, (**Ver Tabla 30**) con los espectros de DC para las toxinas CsslI de *Centruroides suffusus suffusus* y TsVII de *Tityus*

serrulatus (Loret et al 1990) se consideró que esta fracción con actividad biológica podría tener una estructura terciaria similar a la toxina nativa Tce3 por lo cual se seleccionó para ser utilizada en el esquema de inmunización de conejos. El poder obtener mayor cantidad de la toxina Tce3 nos permitirá caracterizar su actividad biológica sobre los canales que afectan al canal de sodio dependiente de voltaje.

7.2 Centruroides bicolor

La secuencia primaria de la toxina con masa molecular aparente de 7,487.0 Da, la denominamos como Cbi1. Esta secuencia se confirmó por diversos métodos como 3'RACE, el estudio del transcriptoma de las glándulas del Telson, secuenciación por degradación de Edman y espectrometría de MS/MS. Los datos obtenidos de la secuencia Cbi1 y la comparación de esta secuencia mediante la herramienta BLASTp indica que es una nueva secuencia y es una posible beta-neurotoxina con 95% de identidad con la beta neurotoxina CssiX de *Centruroides suffusus suffusus* y un 94% de identidad con la beta neurotoxina Cs9 de *Centruroides sculpturatus*. Se requieren hacer más experimentos para hacer su caracterización funcional similar a los de Yang, F. et al., 2018.

Esta nueva secuencia se registró en la base de datos de UniProt (<https://www.uniprot.org/>) y su número de acceso asignado es C0HLZ3.

Se logró clonar el gen de esta toxina en el vector de expresión pQE30 y la toxina recombinante resultante la denominamos HisrCbi1. Esta toxina HisrCbi1 se logró expresar en células de *E. coli* donde se evaluó su expresión en células SHuffle® y Origami®. Las condiciones de expresión como medio de cultivo, temperaturas de expresión o concentración de IPTG se han optimizado y según nuestros resultados la cepa Origami® presentó mejores rendimientos de expresión. Un dato muy interesante; tomando en cuenta nuestra experiencia en la expresión de toxinas donde aparentemente al probar dos cepas de expresión y diferentes condiciones, encontramos que las toxinas del género *Tityus* presentan mejores rendimientos (**Tabla 33**) al expresarlas en la cepa SHuffle®, caso contrario con la toxina expresada del género *Centruroides* (HisrCbi1) la cual presentó mejor rendimiento en la cepa Origami® (**Tabla 33**). Teniendo en cuenta los resultados de DC (ver tabla

XX) donde se evidencia la presencia de estructura secundaria se consideró que la fracción con actividad biológica podría tener una estructura terciaria igual o similar a la toxina nativa Cbi1 por lo cual se seleccionó para ser utilizada en el esquema de inmunización de conejos. El poder obtener mayor cantidad de la toxina Cbi1 nos permitirá caracterizar su actividad biológica sobre los canales que afectan al canal de sodio dependiente de voltaje.

7.3 *Tityus pachyurus*

La secuencia con masa molecular de 7,332 se denominó Tppa1 y la secuencia obtenida con masa molecular de 7,100.1 Da se denominó Tppa2. Estas secuencias se confirmaron por diversos métodos como 3'RACE, el estudio del transcriptoma de las glándulas del Telson, secuenciación por degradación de Edman. Al comparar la secuencia Tppa1 mediante la herramienta BLASTp se puede destacar que tiene un 96.8% de identidad de secuencia con la alfa neurotoxina To3 NaTx14.2 (P60213) de *T. obscurus* de Brasil.

La secuencia Tppa1 ya ha sido previamente reportada como Tas1 (QGW48877.1) de transcritos de la especie *T. asthenes* de Panamá y como TpaP2 (QGW48888.1) de transcritos de la especie *T. pachyurus* de Panamá (Borges, et al., 2020). Con lo cual confirmamos la presencia de esta toxina en el veneno de *T. pachyurus*. Al comparar la secuencia Tppa2 mediante la herramienta BLASTp se puede destacar que es una nueva secuencia no reportada y tiene una identidad de secuencia a otras beta-neurotoxinas reportadas del transcriptoma de las glándulas venenosas de los escorpiones *Tityus obscurus* (To11 NaTx14.9; H1ZZI0.1), con una identidad del 96.8% y *Tityus festae* de Panamá (Tf2; QGW48885.1) con una identidad del 98%. Ambas secuencias se registraron en la base de datos de UniProtKB con números de acceso C0HLZ0 para Tppa1 y C0HLZ1 para Tppa2.

Se logró clonar el gen de estas toxinas en el vector de expresión pQE30 y las toxinas recombinantes resultantes se denominaron HisrTppa2 y HisrTppa1 respectivamente.

La toxina HisrTppa2 se logró expresar en células de *E. coli* donde se evaluó su expresión en las cepas SHuffle® y Origami®. Las condiciones de expresión como

medio de cultivo, temperaturas de expresión o concentración de IPTG se han optimizado y según nuestros resultados la cepa SHuffle® presentó mejores rendimientos de expresión (**Ver tabla 33**).

Para la toxina HisrTppa1, utilizando nuestro conocimiento previo en expresión de toxinas del género *Tityus*, se expresó únicamente en células de *E. coli* cepa SHuffle®. Las condiciones de expresión como medio de cultivo, temperaturas de expresión o concentración de IPTG se han optimizado para obtener mejores rendimientos de expresión. Esta toxina se logró obtener en cuerpos de inclusión y al purificarla se obtuvo una fracción con actividad biológica sobre ratones. Teniendo en cuenta los resultados de DC, donde se evidenció la presencia de estructura secundaria similar a la toxina nativa Cbi1 (**Ver Tabla 30**), se consideró que la fracción con actividad biológica podría tener una estructura terciaria similar a las toxinas nativas Tppa1 y Tppa2 por lo cual se seleccionó para ser utilizada en el esquema de inmunización de conejos. El poder obtener mayor cantidad de las toxinas Tppa1 y Tppa2 nos permitirá caracterizar su actividad biológica sobre los canales que afectan al canal de sodio dependiente de voltaje.

Tabla 33. Mejores condiciones de expresión y rendimiento para cada toxina recombinante expresada.

Toxina	Cepa <i>E. coli</i>	Medio de cultivo	IPTG (mM)	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Adición de reactivos extra al medio de cultivo para mejorar el rendimiento	mg/L de medio
HisrTppa1	Shuffle®	LB2	0.050	14	16	MgSO ₄ al 0.7%, Glucosa al 0.3%	1.5
HisrTppa2	Shuffle®	LB2	0.075	16	16	MgSO ₄ al 0.7%, Glucosa al 0.3%	1.2
HisrTce3	Shuffle®	LB2	0.100	14	16	MgSO ₄ al 0.7%, Glucosa al 0.3%	0.9
HisrCbi1	Origami®	LB1	0.070	16	16	-----	2.0

IPTG: isopropil-βD-tiogalactopiranosido; MgSO₄: Sulfato de magnesio

7.4 Anticuerpos obtenidos

En cuanto al protocolo de inmunización aquí presentado, fue diseñado teniendo en cuenta la experiencia previa con otro grupo de conejos, que fueron inmunizados con las cuatro toxinas recombinantes simultáneamente. Sin embargo, los anticuerpos

resultantes no neutralizaron el efecto letal del veneno de *C. bicolor* pero solo neutralizó el de *T. pachyurus* y *T. cerroazul*.

Por tanto, consideramos que podría existir un efecto de inmunodominancia de las toxinas de *Tityus* en la producción de anticuerpos, similar a la reportada para el veneno de *Lachesis stenophrys*, que reduce la respuesta de anticuerpos equinos hacia el veneno de *Bothrops asper* (Arroyo et al., 2015). Se consideró un cambio en el protocolo de inmunización que nos permitiera obtener anticuerpos neutralizantes para las cuatro neurotoxinas y sus respectivos venenos de escorpión.

Mediante el ensayo de ELISA y electrotransferencia evaluamos la producción de los anticuerpos, en estos ensayos se ha podido demostrar que también existe una reactividad cruzada con otros venenos de *Tityus* y *Centruroides* de Panamá. Esto puede deberse al hecho de que Tppa1 también está presente en los venenos de *T. asthenes* y *T. festae* (Borges et al., 2020; Salazar et al., 2018), y también puede deberse a la similitud de secuencia significativa de Tppa1 y Tppa2 con otras toxinas de *Tityus sp.*

En la **Figura 10** se presentó el patrón electroforético de los venenos de diferentes especies de escorpiones y se evidencia que los anticuerpos producidos no reconocen los componentes del veneno de alto peso molecular, y únicamente reconocen proteínas con masa molecular aparente alrededor de 10 kDa las cuales para las condiciones del experimento es la banda donde migran las toxinas que afectan al canal de sodio dependiente de voltaje. Este comportamiento se puede deber a que estas toxinas tienen muchos aminoácidos con cargas positivas (Arg o Lys) y a pesar de ser geles SDS-PAGE producen este efecto anómalo. Sin embargo, el western blot terminó de confirmar que la banda observada en el gel es correcta y es la esperada para este tipo de toxinas. Por lo tanto, consideramos que son suficientes pruebas para demostrar que esta es la banda que contiene toxinas que son reconocidas por los anticuerpos generados (Estrada et al., 2017). Los títulos de anticuerpos obtenidos para las IgGs purificadas, son relativamente menores al compararlos con los producidos por otros grupos de investigación donde cabe mencionar que han utilizado otras metodologías (Hernández-Salgado et al., 2009;

Guatimosim et al., 2000). Sin embargo, los anticuerpos producidos pueden neutralizar el efecto letal del veneno completo. Teniendo este dato en cuenta, el inserto para el suero escorpiónico utilizado en Panamá proveniente de Venezuela, indica que 1 vial de 5 mL neutraliza al menos 1 mg de veneno del género *Tityus sp.* En estudios previos, fue calculado las dosis efectivas del antiveneno de Venezuela en ratones CD-1 (usando 1.5 DL₅₀ como dosis reto) para el veneno de *T. pachyurus* (DE₅₀ 0,47 mg/ml (0,36 - 0,62)), *T. cerroazul* (DE₅₀ 0.40 mg/mL (0.29 - 0.48)), y *C. bicolor* (DE₅₀ 0.16 mg/mL (0.12 - 0.21)).

Otros estudios han reportado las Dosis Efectivas para el veneno de *T. pachyurus* de Colombia y los antivenenos comerciales de Brasil ED₅₀ = 0,292 mg/mL (0,23-0,37), México (ED₅₀ 0,33 mg/mL (0,26-0,41 mg/mL)) y Venezuela (ED₅₀ no determinada por baja potencia) (Barona et al., 2004). Para los venenos de escorpión de Panamá, las dosis efectivas del antiveneno de Venezuela se calcularon en la cepa CD-1 de ratones utilizando 1,5 LD₅₀ como dosis de desafío (Salazar et al., 2022). Los resultados fueron una DE₅₀ de 0,47 mg/mL (0,36–0,62) para *T. pachyurus* de Panamá, una DE₅₀ de 0,40 mg/mL (0,29–0,48) para *T. cerroazul* y una DE₅₀ de 0,16 mg/mL (0,12–0,21) para *C. bicolor*.

En este trabajo de investigación/desarrollo se ha logrado obtener un suero antiescorpiónico utilizando únicamente 4 toxinas recombinantes como antígenos provenientes de estas especies, donde las DE₅₀ para los venenos de *T. pachyurus*, *T. cerroazul* y *C. bicolor* son 0.74 mg/mL, 0.41 mg/mL y 0.61 mg/mL lo que demuestra que con solo utilizar dos toxinas presentes en el veneno de *T. pachyurus*, una (1) toxina de *T. cerroazul* y una (1) toxina de *C. bicolor* se obtiene una mejor neutralización que un antiveneno comercial

8 Conclusiones

Los datos aquí presentados demuestran la prueba de concepto de que el uso de las neurotoxinas más tóxicas presentes en los venenos de escorpión, obtenidas por medios recombinantes y utilizadas como inmunógenos, pueden producir anticuerpos neutralizantes contra el efecto letal causado por los venenos de tres especies de escorpiones de importancia médica. en Panamá. Para mejorar la neutralización hacia el veneno de *T. cerroazul*, *T. asthenes* y *T. festae* con miras a producir IgGs en caballos, puede ser necesario incluir más toxinas recombinantes de estos venenos de escorpión en el proceso de inmunización. Según nuestra experiencia, podrían ser las neurotoxinas con masas moleculares de 6995,9 Da o 7046,0 Da para *T. cerroazul*, 7073,6 Da para *T. festae* y 7101,5 Da para *T. asthenes* (Salazar et al., 2018). Estas IgGs producidas en caballos deben probarse usando dosis de desafío equivalentes a por lo menos 3 DL₅₀ de cada veneno. Serán necesarios futuros estudios del transcriptoma o proteoma de estos escorpiones panameños para dilucidar las secuencias de las toxinas recomendadas.

9 Perspectivas

- 1) Utilizar la toxina Tce4 de *Tityus cerroazul* en miras de incluirla en el esquema de inmunización.
- 2) Iniciar la inmunización en caballos con las 5 neurotoxinas
- 3) Incluir en las pruebas de neutralización, venenos de otras especies de *Tityus* o *Centruroides* de Panamá para evaluar una posible reactividad cruzada.
- 4) Aumentar las dosis reto de veneno a 2-3 DL₅₀ para la evaluación de anticuerpos provenientes de caballos.

10. Bibliografía

- 1) Alvarenga L.M., Zahid M., di Tommaso A., Juste M.O., Aubrey N., Billiald P., Muzard J. Engineering venom's toxin-neutralizing antibody fragments and its therapeutic potential. *Toxins*. 2014;6:2541-2567. doi:10.3390/toxins6082541.
- 2) Alves R. S., Ximénez, R. M., Jorge A. R. C., Nascimento N. R. F., Martinés, R. D. Rabello, M. M., Monteiro, H. S. A. (2013). Isolation, homology modeling and renal effects of a C-type natriuretic peptide from the venom of the Brazilian yellow scorpion (*Tityus serrulatus*). *Toxicon*, 74, 19-26. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.07.016>
- 3) Bahraoui E.M., Granier C., Rietschoten J.V., Rochat H., El Ayeb M. Specificity and neutralizing capacity of antibodies elicited by a synthetic peptide of scorpion toxin. *J. Immunol.* 1986;136:3371-3377.
- 4) Batista, C. V. F., Zamudio, F. Z., Lucas, S., Fox, J. W., Frau, A., Prestipino, G., & Possani, L. D. (2002). Scorpion toxins from *Tityus cambridgei* that affect Na⁺-channels. *Toxicon*, 40(5), 557–562. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00252-5](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00252-5)
- 5) Batista, Cesar V F, Luis del Pozo, Fernando Z Zamudio, Sandra Contreras, Baltazar Becerril, Enzo Wanke, and Lourival D Possani. (2004). "Proteomics of the Venom from the Amazonian Scorpion *Tityus Cambridgei* and the Role of Prolines on Mass Spectrometry Analysis of Toxins." *Journal of Chromatography* 803: 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.09.002>
- 6) Benkhadir K., Mejri T., Bel Haj Rhouma R., El Ayeb M., Karoui H. Induction de protection in vivo et in vitro contre l'activité létale du veni de *Buthus occitanus tunetanus* avec une protéine recombinante. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*. 2002;79:19-26
- 7) Bordon, K. C. F., Perino, M. G., Giglio, J. R., & Arantes, E. C. (2012). Isolation, enzymatic characterization and antiedematogenic activity of the first reported rattlesnake hyaluronidase from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Biochimie*, 94(12), 2740–2748. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.08.014>
- 8) Borges A., Lomonte B., Angulo Y., Acosta H., Patiño, D. Pascale, J. M. Carolópez, J. A. (2020). Acta Tropica Venom diversity in the Neotropical scorpion genus *Tityus*: Implications for antivenom design emerging from molecular and immunochemical analyses across endemic areas of scorpionism. *Acta Tropica*, 204 (January), 105346. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105346>
- 9) Borges A., Miranda R., A de Patiño H. Los Escorpiones y el escorpionismo en Panamá. 2011 Vol 1, Primera Edición 48.
- 10) Bosmans F., Martin-Eauclaire M.F., Tytgat J. 2005. The depressant scorpion neurotoxin LqqIT₂ selectively modulates the insect voltage-gated sodium channel. *Toxicon*. 45:501–507. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.12.010>.
- 11) Bougis, P. E., Rochat, H., & Smith, L. A. (1989). Precursors of *Androctonus australis* scorpion neurotoxins. Structures of precursors, processing outcomes, and expression of a functional recombinant toxin II. *The Journal of biological chemistry*, 264(32), 19259–19265
- 12) Bouhaouala-Zahar B., Ducancel F., Zenouaki I., Khalifa R.B., Borchani L., Pelhate M., Boulain J.-C., Ayeb M.E., Ménez A., Karoui H. A Recombinant

- Insect-Specific α -Toxin of *Buthus occitanus tunetanus* Scorpion Confers Protection Against Homologous Mammal Toxins. *Eur. J. Biochem.* 1996;238:653–660. doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.0653w.x.
- 13) Calderón L., Lomonte B. Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II in mice by immunization with its synthetic 13-mer peptide 115–129. *Toxicon.* 1999;37:683–687. doi: 10.1016/S0041-0101(98)00211-6.
 - 14) Calderón-Aranda E.S., Olamendi-Portugal T., Possani L.D. The use of synthetic peptides can be a misleading approach to generate vaccines against scorpion toxins. *Vaccine.* 1995;13:1198–1206. doi: 10.1016/0264-410X(95)00059-A.
 - 15) Candido, D.M. and Lucas, S., 2004. Maintenance of scorpions of the genus *Tityus* Koch (Scorpiones, Buthidae) for venom obtention at instituto Butantan, são paulo, Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 10:86-97
 - 16) Cestèle S, Catterall WA. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie.* 2000 Sep-Oct;82(9-10):883-92. doi: 10.1016/s0300-9084(00)01174-3. PMID: 11086218
 - 17) Chagot, B., Diochot, S., Pimentel, C., Lazdunski, M., and Darbon, H. 2005. Solution structure of APETx1 from of the sea anemone *Anthopleura elegantissima*: A new fold for an HERG toxin. *Proteins* 59 380–386
 - 18) Chavez-Olortegui C., Amara D.A., Rochat H., Diniz C., Granier C. In vivo protection against scorpion toxins by liposomal immunization. *Vaccine.* 1991;9:907-910. doi: 10.1016/0264-410X(91)90012-U.
 - 19) Chen, S. (2012). Clinical uses of botulinum neurotoxins: Current indications, limitations and future developments. *Toxins*, 4(10), 913–939. <https://doi.org/10.3390/toxins4100913>
 - 20) Chippaux J.-P. Goyffon M. (2008). Epidemiología del escorpionismo: una evaluación global. *Acta Tropica*; Volumen 107, Número 2, agosto, páginas 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.05.021>
 - 21) Cid-Urbe J. I., Santibáñez-López C. E., Meneses E. P., Batista C. V. F., Jiménez-Vargas, J. M., Ortiz, E., & Possani, L. D. (2018). The diversity of venom components of the scorpion species *Paravaejovis schwenkmeyeri* (Scorpiones: Vaejovidae) revealed by transcriptome and proteome analyses. *Toxicon*, 151 (April), 47–62. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.06.085>
 - 22) Corona Villegas, M.; Garcia Rodríguez, M.C.; Gurrola Briones, G.; Valdez Cruz, N.A.; Becerril Luján, B.; Possani Postay, L.D. 2008. Recombinant immunogens for the generation of antivenoms to the venom of scorpions of the genus *Centruroides*. U.S. Patent 7,335,759 B2, 26 February.
 - 23) Couraud F., Rochat H. 1980. Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95:1607–1614 10.1016/S0006-291X(80)80082-9
 - 24) Cox, J. and Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*, 2008, 26, pp 1367-72
 - 25) D'Suze, G., Castillo, C., Sevcik, C., Brazón, J., Malave, C., Hernández, D., Zerpa, N., 2015. Scorpionism and Dangerous Species of Venezuela, in: Gopalakrishnakone, P., Possani, L.D., F. Schwartz, E., Rodríguez de la Vega,

- R.C. (Eds.), *Scorpion Venoms*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 273-298.
- 26) Dang B., Kubota T., Correa A. M., Bezanilla F., Kent S. B. H. (2017) Total Chemical Synthesis of Biologically Active Fluorescent Dye-Labeled Ts1 Toxin: HHS Public Access 53, 8970–8974. doi:10.1002/anie.201404438
 - 27) Dauplais, M., Lecoq, A., Song, J., Cotton, J., Jamin, N., Gilquin, B., Roumestand, C., Vita, C., De Medeiros, C. L. C., Rowan, E. G., Harvey, A. L., & Ménez, A. (1997). On the convergent evolution of animal toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. *Journal of Biological Chemistry*, 272(7), 4302–4309. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.7.4302>
 - 28) De la Rosa, G., Corrales-García, L.L., Rodríguez-Ruiz, X., López-Vera, E., Corzo, G., 2018. Short-chain consensus alpha-neurotoxin: a synthetic 60-mer peptide with generic traits and enhanced immunogenic properties. *Amino Acids* 50, 885–895. doi:10.1007/s00726-018-2556-0
 - 29) De Oliveira U. C., Nishiyama M. Y., Dos Santos M. B. V., De Paula Santos-Da-Silva A., De Menezes Chalkidis H., Souza-Imberg A., Junqueira-de-Azevedo I. de L. M. (2018). Proteomic endorsed transcriptomic profiles of venom glands from *Tityus obscurus* and *T. serrulatus* scorpions. *PLoS ONE*, 13(3), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193739>
 - 30) De Roodt A., García S, Salomón O, et al. Epidemiological and clinical aspects of scorpionism by *Tityus trivitattus* in Argentina. *Toxicon* 2003; 41:971-977
 - 31) Devaux C., Clot-Faybesse O., Juin M., Mabrouk K., Sabatier J.-M., Rochat H. Monoclonal antibodies neutralizing the toxin II from *Androctonus australis Hector* scorpion venom: Usefulness of a synthetic, non-toxic analog. *FEBS Lett.* 1997; 412:456–460. doi: 10.1016/S0014-5793(97)00826-0.
 - 32) Devaux C., Juin M., Mansuelle P., Granier C. Fine molecular analysis of the antigenicity of the *Androctonus australis Hector* scorpion neurotoxin II: A new antigenic epitope disclosed by the pepscan method. *Mol. Immunol.* 1993; 30:1061-1068. doi: 10.1016/0161-5890(93)90152-2.
 - 33) Drago M.E., Sainz T. del R., 2006. Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes. *Rev. Mex. Ciencias Farm.* 37, 38–44. doi:10.5565/rev/athenea.1697
 - 34) Duarte C.G., Alvarenga L.M., Dias-Lopes C., Machado-de-Ávila R.A., Nguyen C., Molina F., Granier C., Chávez-Olórtegui C. In vivo protection against *Tityus serrulatus* scorpion venom by antibodies raised against a discontinuous synthetic epitope. *Vaccine.* 2010;28:1168–1176. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.11.039
 - 35) Eskandari G., Jolodar A., Seyfiabad Shapouri M.R., Bahmainmehr A., Navidpour S. Production of Recombinant Alpha Neurotoxin of Scorpion Venom *Mesobuthus eupeus* and Analysis of its Immunogenicity. *Iran. Red Crescent Med. J.* 2014;16 doi: 10.5812/ircmj.9666.
 - 36) Espino-Solís, G.P., Estrada, G., Olamendi-Portugal, T., Villegas, E., Zamudio, F., Cestele, S., Possani, L.D., Corzo, G., 2011. Isolation and molecular cloning of beta-neurotoxins from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. *Toxicon* 57, 739–746. doi:10.1016/j.toxicon.2011.02.006

- 37) Estrada, G., García, B.I., Schiavon, E., Ortiz, E., Cestele, S., Wanke, E., Possani, L.D., Corzo, G., 2007. Four disulfide-bridged scorpion beta neurotoxin Cssl: Heterologous expression and proper folding in vitro. *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* 1770, 1161-1168. doi:10.1016/j.bbagen.2007.04.006
- 38) Galloway D.A., Laimins L.A., Division B., Hutchinson F., 2016. HHS Public Access 55, 87–92. doi:10.1016/j.coviro.2015.09.001.Human
- 39) Garcia C., Calderón-Aranda E.S., Anguiano G.A.V., Becerril B., Possani L.D. Analysis of the immune response induced by a scorpion venom sub-fraction, a pure peptide and a recombinant peptide, against toxin Cn2 of *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon.* 2003;41:417–427. doi: 10.1016/S0041-0101(02)00337-9.
- 40) García-Gómez B.I., Olamendi-Portugal T.C., Paniagua J., van der Walt J., Dyason K., Possani L.D. Heterologous expression of a gene that codes for Pg8, a scorpion toxin of *Parabuthus granulatus*, capable of generating protecting antibodies in mice. *Toxicon.* 2009;53:770–778. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.02.011.
- 41) Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005).pp. 571-607
- 42) Gazarian T., Selisko B., Héron P., Gazarian K. Isolation and structure–functional characterization of phage display library-derived mimotopes of noxiustoxin, a neurotoxin of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Mol. Immunol.* 2000;37:755–766. doi: 10.1016/S0161-5890(00)00091-2.
- 43) Gecchele, E., Merlin, M., Brozzetti, A., Falorni, A., Pezzotti, M., Avesani, L. A 2015. Comparative Analysis of Recombinant Protein Expression in Different Biofactories: Bacteria, Insect Cells and Plant Systems. *J. Vis. Exp.* (97), e52459, doi:10.3791/52459
- 44) Gopalakrishnakone, P., Possani, L.D., F. Schwartz, E., Rodríguez de la Vega, R.C. (Eds.) 2015. Scorpion Venoms, Springer Dordrecht Heidelberg New York London. DOI 10.1007/978-94-007-6404-0
- 45) Gordon, D., Karbat, I., Ilan, N., Cohen, L., Kahn, R., Gilles, N., Gurevitz, M. (2007). The differential preference of scorpion α -toxins for insect or mammalian sodium channels: Implications for improved insect control. *Toxicon*, 49(4), 452–472. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.016>
- 46) Gracy J, Le-Nguyen D, Gelly JC, Kaas Q, Heitz A, Chiche L. (2008). KNOTTIN: the knottin or inhibitor cystine knot scaffold in 2007. *Nucleic Acids Res.* 36, D314-9
- 47) Guatimosim S.C.F., Kalapothakis E., Diniz C.R., Chávez-Olórtegui C. 2000. Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* toxins by immunization with a recombinant nontoxic protein. *Toxicon.*;38:113-121. doi: 10.1016/S0041-0101(99)00138-5.
- 48) Guerrero-Vargas J.A., Rodríguez Buitrago J., Ayerbe S., Flórez Daza E., Beltrán Vidal J. 2013. Scorpionism and Dangerous Species of Colombia. In: Gopalakrishnakone P. (eds) *Toxinology*. Springer, Dordrecht

- 49) Guevara-Hernández, E., López-Zavala, A., Jiménez-Gutiérrez, L., & Sotelo-Mundo, R. 2013. Perspectivas actuales del uso de proteínas recombinantes y su importancia en la investigación científica e industrial. *Biotecnia*, 15(3), 8-17.
- 50) Haas BJ, Papanicolaou A., Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, Couger MB, Eccles D, Li B., Lieber M., Macmanes MD, Ott M, Orvis J, Pochet N, Strozzi F, Weeks N, Westerman R, William T, Dewey CN, Henschel R, Leduc RD, Friedman N, Regev A. *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the trinity platform for reference generation and analysis. *Nat Protoc.* 2013;8(8):1494–512
- 51) Harvey, A. L. (2001). Twenty years of dendrotoxins. *Toxicon*, 39(1), 15–26. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00162-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00162-8)
- 52) Hernández-Salgado, K., Estrada, G., Olvera, A., Coronas, F.I., Possani, L.D., Corzo, G., 2009. Heterologous expressed toxic and non-toxic peptide variants of toxin Cssl are capable to produce neutralizing antibodies against the soluble venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. *Immunol. Lett.* 125, 93e99. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.06.001>
- 53) Incamnoi, P., Patramanon, R., Thammasirirak, S., Chaveerach, A., Uawonggul, N., Sukprasert, S., Daduang, S. (2013). Heteromtoxin (HmTx), a novel heterodimeric phospholipase A2 from *Heterometrus laoticus* scorpion venom. *Toxicon*, 61(1), 62–71
- 54) Inceoglu B., Lango J., Rabinovich A., Whetstone P., Hammock B.D. The neutralizing effect of a polyclonal antibody raised against the N-terminal eighteen-aminoacid residues of birtoxin towards the whole venom of *Parabuthus transvaalicus*. *Toxicon.* 2006;47:144-149. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.08.018.
- 55) Jiménez-Vargas, J.M, Quintero-Hernández, V, L. González-Morales, E. Ortiz, L.D. Possani, Design and expression of recombinant toxins from Mexican scorpions of the genus *Centruroides* for production of antivenoms, *Toxicon*, Volume 128, 2017, Pages 5-14, ISSN 0041-0101. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.01.015>.
- 56) Johnson, T. M., Quick, M. W., Sakai, T. T., & Krishna, N. R. (2000). Expression of functional recombinant scorpion beta-neurotoxin Cssl II in *E. coli*. *Peptides*, 21(6), 767–772. [https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(00\)00206-0](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(00)00206-0)
- 57) Klint, J. K., Senff, S., Saez, N. J., Seshadri, R., Lau, H. Y., Bende, N. S., King, G. F. (2013). Production of Recombinant Disulfide-Rich Venom Peptides for Structural and Functional Analysis via Expression in the Periplasm of *E. coli*. *PLoS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063865>
- 58) Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680e685
- 59) Laustsen. A. H., José María Gutiérrez, Cecilie Knudsen, Kristoffer H. Johansen, Erick Bermúdez-Méndez, Felipe A. Cerni, Jonas A. Jürgensen, Line Ledsgaard, Andrea Martos-Esteban, Mia Øhlenschläger, Urska Pus, Mikael R. Andersen, Bruno Lomonte, Mikael Engmark, Manuela B. Pucca Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant

- antivenom development, *Toxicon*, Volume 146, 2018, Pages 151-175, ISSN 0041-0101. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.03.004>.
- 60) Legros C., Kaabi H., El Ayeb M., Céard B., Vacher H., Bougis P.E., Martin-Eauclaire M.-F. Use of fusion protein constructs to generate potent immunotherapy and protection against scorpion toxins. *Vaccine*. 2001;20:934–942. doi: 10.1016/S0264-410X(01)00379-6.
- 61) López A. Corzo G. Estrada K. 2022. Análisis transcriptómico comparativo de siete especies de escorpiones de importancia médica en Panamá. Tesis, http://intranet.lcg.unam.mx/files/egresados/archivos/TI_Analisis-Transcriptomico-Escorpiones-Panama_ALH.pdf
- 62) Loret, E.P., Sampieri, F., Roussel, A., Granier, C. and Rochat, H. (1990), Conformational flexibility of a scorpion toxin active on mammals and insects: A circular dichroism study. *Proteins*, 8: 164-172. <https://doi.org/10.1002/prot.340080206>.
- 63) Lourenço, W.R., 1986. *Tityus cerroazul*, nouvelle espece de Scorpion de Panama (Scorpiones, Buthidae). *Bull. Mus. Natn. Hist. Nat., Paris* 4, 637-641.
- 64) Lourenço, W.R., 2006. Nouvelle proposition de découpage sous-générique du genre *Tityus* C.L. Koch, 1836 (Scorpiones, Buthidae). *Bol Soc Entomol Aragonesa* 55-67.
- 65) Martin-Eauclaire, M.F., Bougis, P.E., de Lima, M.E., 2018. Ts1 from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*: A half-century of studies on a multifunctional beta like-toxin. *Toxicon* 152, 106–120. doi:10.1016/j.toxicon.2018.07.024
- 66) Masci, P.P., Whitaker, A.N., Sparrow, L.G., de Jersey, J., Winzor, D.J., Watters, D.J., Lavin, M.F., Gaffney, P.J., 2000. Textilins from *Pseudonaja textilis textilis*. Characterization of two plasmin inhibitors that reduce bleeding in an animal model. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 11, 385–393
- 67) Menaldo DL, Camacho E, Rosa JC, Escalante T, Rucavado A, Lomonte B, Gutiérrez JM, Sampaio SV. (2013) Proteomic analysis of *Bothrops pirajai* snake venom and characterization of BpirMP, a new P-I metalloproteinase. *J. Proteomics*. Mar 27;80:250-67. doi: 10.1016/j.jprot.2013.01.021
- 68) Micsonai, A., Wien, F., Bulyaki, E., Kun, J., Moussong, E., Lee, Y.H., Goto, Y., Refregiers, M., Kardos, J., 2018. BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic Acids Res* 46, W315-W322.
- 69) Ministerio de Salud, (2016). Guía para el Manejo Integral de la Picadura de Escorpión (alacrán) en la República de Panamá, primera ed.
- 70) Ministerio de Salud, (2017). Situación Epidemiológica de las Picaduras de Alacrán en la República de Panamá. Años: 2000-2016 (p) [WWW Document]. <http://www.minsa.gob.pa/informacion-salud/epidemiologia>
- 71) Miranda R. J., Bermúdez S., Flórez D. E., de Armas Luis F. (2020). A new species of *Tityus* from Panama and Costa Rica previously identified as *Tityus pachyurus* Pocock, 1897 (Scorpiones: Buthidae). *Revista Ibérica de Aracnología* ISSN. 1576-9518, nº 37 (31/12/2020): 197-204
- 72) Miranda, R. J., Armas, L. F. De. (2020)^a. A new species of *Ananteris* (Scorpiones: Buthidae) from Panama *Euscorpius*. February 297

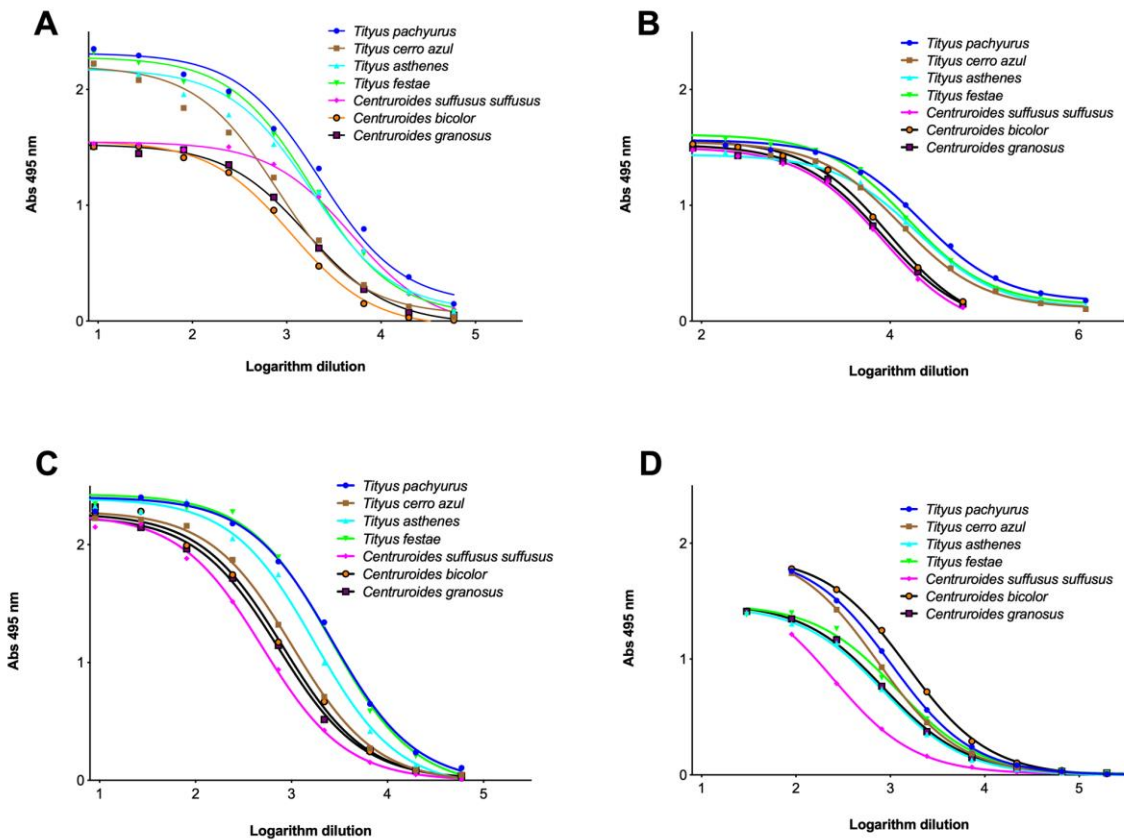
- 73) Morales R. A. V., Daly N. L., Vetter I., Mobli M., Napier I. A., Craik D. J., Durek, T. (2010). Chemical synthesis and structure of the prokineticin Bv8. *ChemBioChem*, 11(13), 1882–1888. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000330>
- 74) Otero R & Navío, Eufrasio & Céspedes, F.A. & Núñez, M.J. & Lozano, L & Moscoso, E.R. & Matallana, C & Arsuzá, N.B. & García, J & Fernández, D & Rodas, J.H. & J Rodríguez, O & Zuleta, J.E. & Gómez, J.P. & Saldarriaga, Monica & Quintana Castillo, Juan & Núñez, V & Cárdenas, S & Barona, Jacqueline & Lourenço, W.R. (2005). Scorpion envenoming in two regions of Colombia: Clinical, epidemiological and therapeutic aspects. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 98. 742-50. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2003.12.018>
- 75) Park, C. S., Hausdorff, S. F., & Miller, C., 1991. Design, synthesis, and functional expression of a gene for charybdotoxin, a peptide blocker of K⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(6), 2046–2050. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.6.2046>
- 76) Pocock, R., 1898. Descriptions of some new scorpions from Ecuador. *Ann. Mag. Nat. Hist.* 6, 413e422.
- 77) Pocock, R., 1893. A Contribution to the study of neotropical scorpions. *Ann. Mag. Nat. Hist.* 6, 77e103.
- 78) Poggioli De Scannone, J., 1996. Suero antiescorpiónico. Desarrollo y producción (Resumen). En: *I Taller los Escorpiones y sus Toxinas, Biología, Clínica y Toxinología*. Caracas, Venezuela. Ed. IVIC, pág. 11
- 79) Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J. 1999. Scorpion toxins specific for Nav channels. *Eur J Biochem.* 264(2):287–300
- 80) Possani, L. D., Corona, M., Zurita, M., & Rodríguez, M. H. (2002). From noxiustoxin to scorpine and possible transgenic mosquitoes resistant to malaria. *Archives of Medical Research*, 33(4), 398–404. [https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(02\)00370-3](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(02)00370-3)
- 81) Possani, L. D., Selisko, B., & Gurrola, G. B. (1999). Structure and function of scorpion toxins affecting K⁺-channels. *Perspectives in Drug Discovery and Design*, 15–16, 15–40. <https://doi.org/10.1023/A:1017062613503>
- 82) Quianzon, C. C., & Cheikh, I. (2012). History of insulin. *Journal of community hospital internal medicine perspectives*, 2(2), 10.3402/jchimp.v2i2.18701. <https://doi.org/10.3402/jchimp.v2i2.18701>
- 83) Rincón-Cortés CA, Reyes-Montaña EA, Vega-Castro NA. Purificación parcial de péptidos presentes en el veneno del escorpión *Tityus macrochirus* (Buthidae) y evaluación preliminar de su actividad citotóxica. *biomedica* [Internet]. 1 de junio de 2017 [citado 29 de septiembre de 2021];37(2):238-49. Disponible en: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/3265>
- 84) Safari Froushani N., Modarressi M.H., Behdani M., Torabi E., Pooshang Bagheri K., Shahbazzadeh D. Developing recombinant phospholipase D1 (rPLD1) toxoid from Iranian *Hemiscorpius lepturus* scorpion and its protective effects in BALB/c mice. *Toxicon*. 2018;152:30–36. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.07.003.

- 85) Salazar, M.H., Arenas, I., Corrales-García, L.L., Miranda, R., Vélez, S., Sánchez, J., Mendoza, K., Cleghorn, J., Zamudio, F.Z., Castillo A., Possani, L.D., Corzo G., Acosta H., (2018). Venoms of *Centruroides* and *Tityus* species from Panama and their main toxic fractions. *Toxicon*. doi:10.1016/j.toxicon.2017.11.013
- 86) Schoch CL, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)*. 2020: baaa062. PubMed: 32761142 PMC: PMC7408187.
- 87) Schwartz, E.F., (2012). Identification and Phylogenetic Analysis of *Tityus pachyurus* and *Tityus obscurus* Novel Putative Na⁺ Channel Scorpion Toxins 7. doi:10.1371/journal.pone.0030478
- 88) Srinivasan KN, Gopalakrishnakone P, Tan PT, Chew KC, Cheng B, Kini RM, Koh JL, Seah SH, Brusic V. SCORPION, a molecular database of scorpion toxins. *Toxicon*. 2002;40:23–31
- 89) Stehli, F. y Webb D. (1985). The great American biotic interchange. New York, Plenum Press
- 90) Tyanova S., Temu T., & Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature Protocols* 2016; 11(12): 2301-2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.136>
- 91) Tytgat J. Chandy K. Garcia M. Gutman G. Martin-Eauclaire M.-F. van der Walt J. Possani L. (1999). A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol. Sci.*; 20: 444-447
- 92) Uawonggul N., Sukprasert S., Incamnoi P., Patramanon R., Thammasirirak S., Preecharram S., Bunyatratthata W., Kuaprasert B., Daduang J., Daduang S. Bacterial Overexpression of Recombinant Heteroscorpine-1 (rHS-1), a Toxin from *Heterometrus laoticus* Scorpion Venom: Trends for Antibacterial Application and Antivenom Production. *Biochem. Genet.* 2014;52:459–473. doi: 10.1007/s10528-014-9660-y
- 93) WHO, 2017. World Health Organization Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins, in: Organization, W.H. (Ed.). World Health Organization, Geneva, Switzerland
- 94) Yang, F., Liu, S., Zhang, Y., Qin, C., Xu, L., Li, W., Cao, Z., Li, W., & Wu, Y. 2018. Expression of recombinant α -toxin BmKM9 from scorpion *Buthus martensii* Karsch and its functional characterization on sodium channels. *Peptides*, 99(September 2017), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.09.017>
- 95) Zenouaki I., Kharrat R., Sabatier J.-M., Devaux C., Karoui H., Van Rietschoten J., El Ayeb M., Rochat H. In vivo protection against *Androctonus australis* hector scorpion toxin and venom by immunization with a synthetic analog of toxin II. *Vaccine*. 1997;15:187–194. doi:10.1016/S0264-410X(97)00144-8.
- 96) Zeng, X. C., Corzo, G., & Hahin, R. (2005). Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *IUBMB life*, 57(1), 13–21. <https://doi.org/10.1080/15216540500058899>
- 97) Zhu, S., Gao, B., Aumelas, A., del Carmen Rodríguez, M., Lanz-Mendoza, H., Peigneur, S., Diego-García, E., Martin-Eauclaire, M. F., Tytgat, J., &

- Possani, L. D. (2010). MeuTXKbeta1, a scorpion venom-derived two-domain potassium channel toxin-like peptide with cytolytic activity. *Biochimica et biophysica acta*, 1804(4), 872–883. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.12.017>
- 98) Zhu, S., & Li, W. (2002). Precursors of three unique cysteine-rich peptides from the scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 131(4), 749–756. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(02\)00020-9](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00020-9)

ANEXO 1

Títulos de anticuerpos para el reconocimiento de varios venenos de escorpión por anticuerpos de diferentes antivenenos comerciales e IgG de conejo de este trabajo. A) Alacramyn® mexicano; B) antiveneno brasileño; C) antiveneno venezolano; D) IgGs de conejo (este trabajo). Cada punto representa el promedio de dos valores. Alacramyn® (Mex, México), Anti-Scorpion (Ven, Venezuela) y Anti-Scorpion (Bra, Brasil) son F(ab')₂ de caballos. Las IgGs de este trabajo son de conejo. La concentración de anticuerpos utilizada fue a= 37,1 mg/mL; b= 19,6 mg/mL; c= 80,8 mg/mL; d= 30 mg/mL.





Heterologous expression of four recombinant toxins from Panamanian scorpions of the genus *Tityus* and *Centruroides* for production of antivenom[☆]

Marcos H. Salazar^{a,b,c,**}, Herlinda Clement^c, Ligia L. Corrales-García^{c,d}, Jairo Sánchez^{a,b}, John Cleghorn^a, Fernando Zamudio^c, Lourival D. Possani^c, Hildaaura Acosta^a, Gerardo Corzo^{c,*}

^a Centro de Investigación e Información de Medicamentos y Tóxicos (CIIMET), Facultad de Medicina, Universidad de Panamá, Ciudad de Panamá, Panamá

^b Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, Universidad de Panamá, Ciudad de Panamá, Panamá

^c Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

^d Departamento de Alimentos, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, 050010, Colombia

ARTICLE INFO

Handling Editor: Glenn King

Keywords:

Animal venom
Centruroides
 Proteomics
 Recombinant protein
Tityus

ABSTRACT

Background: The development of more effective antivenoms remains a necessity for countries where scorpionism is a public health problem. Also, the regionalization of antivenoms may be important for some countries with special scorpionism characteristics.

Objective: Production of antibodies capable of neutralizing the lethal effect of the venom of three scorpion species from Panama.

Methods: The primary structures of two neurotoxins from *T. pachyurus*, one from *T. cerroazul* and another from *C. bicolor* were elucidated using N-terminal amino acid degradation and Sanger gene cloned sequencing. The obtained mRNA transcripts were cloned and expressed using *E. coli* vectors. Different bacterial expression conditions were tested and the best culture conditions for each expressed protein is reported. The expressed scorpion toxins were purified by chromatographic methods and used as immunogens in rabbits.

Results: The antibodies produced under the reported immunization scheme show better neutralization (ED₅₀) than other reported commercial antivenoms used to neutralize similar species scorpion venoms under similar LD₅₀ conditions.

Conclusion: The information reported here shows the proof of concept for selecting recombinant immunogens with the ability to produce antibodies for neutralizing the lethal effects of the most important medical species of scorpions in Panama.

1. Introduction

Currently, there are at least sixteen species of scorpions in Panama, of which the genera *Tityus* and *Centruroides* are considered the most dangerous species (Borges et al., 2012; Miranda and de Armas, 2020). In this country, the scorpions of the genus *Tityus* are known to produce serious clinical manifestations; for example, acute lung edema, pancreatitis or cardiac arrhythmias, and even death (Salazar et al., 2018). The species *Tityus pachyurus*, *T. festae*, *T. asthenes*, *T. championi* and *T. cerroazul* are considered of medical importance because they have been associated with cases of death (Ministerio de Salud, 2017). The

species *Tityus pachyurus* was described in 1897 by Reginald Pocok, and it is considered the species associated with more cases of mortality in Panama. It has a wide distribution in the country except for the province of Darién, a large forest and mountainous area of the Panama-Colombia border, where its presence has not been reported. Even though, *T. pachyurus* presence has also been reported in the middle sector of the Magdalena River Valley (center of Colombia), through the departments of Tolima, Cundinamarca, Boyacá, Antioquia and Huila (Guerrero-Vargas et al., 2015), where it is reported as a dangerous species and of medical interest in Colombia (Otero et al., 2004). The species *Tityus cerroazul* was described in 1986 by Wilson Laurenço, its name comes

[☆] Abbreviated title: Production of antivenom from Panama.

* Corresponding author.

** Corresponding author. Centro de Investigación e Información de Medicamentos y Tóxicos (CIIMET), Facultad de Medicina, Universidad de Panamá, Ciudad de Panamá, Panamá.

E-mail addresses: Marcos_h03@hotmail.com (M.H. Salazar), corzo@ibt.unam.mx (G. Corzo).

<https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2021.100090>

Received 2 September 2021; Received in revised form 13 December 2021; Accepted 15 December 2021

Available online 28 December 2021

2590-1710/© 2021 The Author(s).

Published by Elsevier Ltd.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

from the region of Cerro Azul in Panama (Laurenço, 1986). The venom of *Tityus cerroazul* has the lowest LD₅₀ compared to other *Tityus* venoms; therefore, it could be considered one of the most dangerous species in Panama (Salazar et al., 2018). It has a wide distribution in the forested areas of Panama, and also it has also been reported in Costa Rica (Viquez et al., 2005).

On the other hand, scorpion stings of the *Centruroides* genus in Panama cause high rates of morbidity, although no cases of deaths have been reported (Ministerio de Salud, 2017). The sting of *C. granosus*, *C. panamensis*, *C. bicolor*, and *C. limbatus* causes mild intoxication, generally presenting only local symptoms at the site of the sting (local pain or paresthesia). Within the genus *Centruroides*, the species *Centruroides bicolor* stands out for moderate clinical signs; for example nausea, vomiting, or tachycardia (Ministerio de Salud, 2017). *Centruroides bicolor* was described by Pocock in 1898, and its presence has also been reported in Costa Rica (Borges, 2015). In Panama, it is usually found in the provinces of Chiriquí and Veraguas.

Concerning the use of scorpion antivenoms, it is known that the early administration of antivenom (2 h after the accident) is considered the only therapy accepted by the World Health Organization (WHO) for the treatment of scorpion sting envenomings (WHO, 2016). However, scorpion antivenoms in Panama are difficult to obtain. Currently in America, Mexico produces antivenom against the sting caused by the genus *Centruroides* (Chippaux and Goyffon, 2008), Brazil against the genus *Tityus* (Candido and Lucas, 2004) as well as Argentina (de Roodt et al., 2003) and Venezuela (D'Suze et al., 2015). Panama had acquired Venezuelan antivenom (made using the venom of *Tityus discrepans*); however, data from the Universidad de Panamá (UP) in collaboration with the *Ministerio de Salud*, as well as other reports, have shown limited efficacy of such antivenom against *Tityus* species from Panama (Barona et al., 2004; Borges et al., 2012). This panorama has motivated us to assess the use of recombinant neurotoxins from the most medically important scorpions in Panama to evaluate them as immunogens to produce regional antivenoms. As background to this communication, Salazar et al. (2018) studied the venoms of four species of the genus *Tityus*, and four species of the genus *Centruroides* from Panama. The authors showed evidence that three species of *Tityus* (*T. pachyurus*, *T. festae* and *T. asthenes*) share similar toxic compounds of molecular mass around 7331.3 Da (Borges et al., 2020; Salazar et al., 2018). Similarly, studies of venom fractions of the species *T. cerroazul* and *C. bicolor* show the presence of major toxic neurotoxins with molecular masses of 6966.9 and 7485.7 Da, respectively (Salazar et al., 2018).

Therefore, in an effort to develop an antivenom for Panama, the primary structure of four neurotoxins (Sodium channel neurotoxin) was elucidated, and they were recombinantly expressed. Three neurotoxins were from the genus *Tityus*, and one was from the genus *Centruroides*. They were evaluated as immunogens for the production of antibodies capable of neutralizing the venoms of the most important medical species of the genus *Tityus* and *Centruroides* from Panama.

2. Material and methods

2.1. Venoms, venom glands and toxins

All scorpion venoms and venom glands were supplied by the *Centro de Investigación e Información en Medicamentos y Tóxicos de la Universidad de Panamá* (CIIMET-UP). Specimens were kept individually in optimal health conditions using plastic cages, at a constant temperature of 27 °C. Animals were fed with crickets and tap water *ad libitum*. Venom was extracted manually and immediately vacuum dried and stored at -20 °C until use. For transcriptomic analysis, the venom glands (48 h after venom extraction) were obtained from healthy specimens. Immediately after being removed, they were treated with RNAlater™ (ThermoFisher, Asheville, NC, USA) and stored at -70 °C until use. Toxin purification was performed according to Salazar et al. (2018). For the venom of *T. pachyurus*, the toxic peptides with molecular masses of 7331.3 Da and

7099.1 Da were named Tppa1 and Tppa2, respectively; for that of *T. cerroazul* the peptide with molecular mass of 6966.9 Da was named Tce3; and for that of *C. bicolor* the peptide with a molecular mass of 7485.7 Da was named Cbi1.

2.2. Mass spectrometry and N-terminal sequencing

The protein fractions (2–3 µg) were reconstituted in 20 µL of 60% acetonitrile with 0.1% acetic acid and directly applied to a Thermo Scientific LCQ Fleet ion trap mass spectrometer (San José, CA) using a Surveyor MS syringe pump delivery system. The eluate at 10 mL/min was split out in order to introduce only 5% of the sample into the nanospray source (0.5 mL/min). The spray voltage was set from 1.5 kV and the capillary temperature was set at 150 °C. The fragmentation source was operated at 25–35 V of collision energy, 35–45% (arbitrary units) of normalized collision energy and the scan with wide band was activated. All spectra were obtained in the positive-ion mode. The data acquisition and the deconvolution of data were performed on Xcalibur Windows NT PC data system. The average molecular masses values vary about ±1 Da, due to the limited resolution of this instrument. N-terminal Edman degradation was performed on a Shimadzu PPSQ-31 A (Shimadzu, Kyoto, Japan) automated gas-phase sequencer. Sample (60 µg) was dissolved in 10 mL of 37% CH₃CN (v/v) solution and applied to TFA-treated glass fiber membranes, pre-cycled with Polybrene (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA).

2.3. RNA extraction from *Tityus* and *Centruroides* species

The mRNA, from six pairs of venom glands from *Tityus* and the same number of glands from *Centruroides* species from Panama was extracted using an RNAeasy mini kit (Qiagen Inc., Germantown, MD) and the SV Total RNA Isolation System (Promega Co., Madison, WI) (Clement et al., 2019b).

2.4. Bacterial strains, enzymes and plasmids

XL1-Blue *Escherichia coli* strain was used for DNA cloning and plasmid propagation. The Shuffle® or Origami® *E. coli* strains were employed for the expression of recombinant scorpion toxins. Plasmids pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen, CA, USA), and pQE30 (Qiagen, CA, USA) were used for cloning the scorpion toxin genes, and for production of the 6His-tagged recombinant peptides, respectively. Restriction enzymes, Taq polymerase, Factor Xa protease (FXa) and T4 DNA ligase were purchased from New England Biolabs (New England Biolabs, MA, USA).

2.5. cDNA library, construction and gene cloning

The mRNA was used to synthesize the cDNA employing an adapter primer (AP) (3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The reaction was carried at 42 °C for 1 h in the presence of 200 enzymatic units of Reverse transcriptase (SuperScript II RT, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Since the N-terminal amino acid sequence of the toxic peptides (Tppa1, Tce3, and Cbi1) was obtained (Table S1), an oligonucleotide corresponding to its amino acid sequence was designed for gene cloning. The transcript corresponding to the N-terminal peptide from all fractions was amplified from the cDNA using Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in combination with a degenerated primer based on N-terminal sequencing of all fractions and an equimolar concentration of the AUAP primer (GGCCACGCGTCTGACTAGTAC) (3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

A Mastercycler Gradient thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) was used for PCR and the conditions for amplification were: 3 min denaturation at 94 °C, followed by 30 cycles at 94 °C for 40 s, 55 °C for 40 s and 72 °C for 40 s, with a final extension cycle at 72 °C for 10 min. PCR product was gel-purified from the agarose using the High Pure

PCR Product Purification Kit (Roche LifeScience, Penzberg, Germany). The resulting DNA fragment was ligated into PCR® 2.1-TOPO TA cloning vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The ligation reaction was used to transform *E. coli* XL1 Blue chemo-competent cells. The individual clones were analyzed by colony PCR using oligonucleotides M13-Forward (5'-GTTAAACGACGGCCAG-3') and M13-Reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). The colonies with the expected DNA size were sequenced at the facilities of the *Instituto de Biotecnología*, UNAM, México.

Table S2 shows the transcripts obtained after 3' RACE. The conditions for amplifications were optimized for each toxin. PCR product was gel-purified, ligated into PCR®2.1-TOPO TA cloning vector, transformed in *E. coli* cells and then sequenced, as described previously. Table S3 shows the oligonucleotides used for constructing the expression vectors. Both the amplified gene and the expression vector pQE30 were digested with *Bam*HI and *Pst*I (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). After purification, a ligation reaction (10 µL) was carried out with T4 DNA ligase (Fermentas, Charlotte, CA, USA) with a 5-fold gene excess over plasmid for 16 h at 16 °C. Ten microliters of the ligation reaction were used to transfect competent *E. coli* XL1 Blue cells. Some individual clones were analyzed by colony PCR using oligonucleotides pQE30-Forward (5'-GAGCGGATAACAATTATAA-3') and pQE30-Reverse (5'-GGTCATTACTGGATCTAT-3'). The colonies with the expected DNA size were sequenced at the facilities of the *Instituto de Biotecnología*, UNAM, México. The final sequences for each recombinant toxin were named HisrTppa1, HisrTppa2, HisrTce3 and HisrCbi1, respectively (Table S4).

2.6. Expression and purification of recombinant proteins

E. coli strain Shuffle® or Origami® (New England Biolabs® Inc. MA, USA) were transformed with each plasmid and grown overnight on LB agar plates with 100 µg/mL of ampicillin at 37 °C. An isolated colony was inoculated in 50 mL of LB medium supplemented with 50 µL of ampicillin and grown overnight at 37 °C in incubation with shaking overnight. To improve the yield of biologically active toxins some extra reagents were added to the expression culture media (Table S5). The culture was added to 1 L of medium Luria-Bertulli (LB1: Tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g or LB2: Peptone 20 g, yeast extract 30 g and NaCl 21 g). The culture was grown at 37 °C with shaking until obtaining an optical density of 0.7 units of absorbance at 600 nm (OD₆₀₀) and induced with isopropyl-βD-thiogalactopyranoside (IPTG, Promega, Madison, USA) to a final concentration of 0.05–0.075 mM. The culture was kept for 14–16 h at 16 °C and the cells were harvested by centrifugation at 4424 g in JA-10 rotor, 30 min at 4 °C. The cellular pellet was recovered in washing buffer (0.05 M Tris-HCl, pH 8.0), and lysed in a French press. This material was centrifuged again (12,096 g in JA-20 rotor, for 30 min at 4 °C) and the supernatant and the insoluble fraction (inclusion bodies) were recovered. The inclusion bodies were dissolved in 6 M GndHCl in a 0.05 M Tris-HCl buffer pH 8.8.

All recombinant toxins obtained from inclusion bodies were purified using Ni-NTA (Ni-nitrilotriacetic acid) affinity column chromatography according to manufacturer instructions (QIAGEN, USA). The Ni-NTA eluting fraction with the expected molecular mass was then purified RP-HPLC using a C₁₈ preparative column (Vydac, WR Grace & Co.-Conn, USA) including a buffer A 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water, and buffer B 0.1% TFA in acetonitrile (ACN), with a linear gradient ranging from 0 to 60% buffer B over 60 min. The eluting fractions with the expected molecular mass and biologically active were re-purified by RP-HPLC on analytical Biphenyl column Kinetex® 5 µm Biphenyl, 100 Å, 250 × 4.6 mm using a gradient from 0 to 20% over 5 min and 20%–60% of buffer B over 40 min at a flow rate of 1 mL/min. The presence of the recombinant protein was monitored at every step of the expression and purification processes by SDS polyacrylamide gel electrophoresis in reducing conditions (12% gel, data not shown). The molecular masses of the purified products were confirmed by mass spectrometry analysis using an LCQ Fleet apparatus from Thermo Fisher Scientific Inc. (San

Jose, CA, USA) (Fig. S1).

2.7. Secondary structure of recombinant toxins

The secondary structure of all four recombinant neurotoxins was evaluated by circular dichroism (CD). The measurement was carried out on a Jasco model J-720 spectropolarimeter (Jasco, Tokyo, Japan), from 260 to 190 nm in an aqueous solution of 60% trifluoroethanol (TFE), at room temperature, with a 1-mm pathlength cell. Data were collected at 1 nm with a scan rate of 50 nm/min, and a time constant of 0.5 s. The concentration of HisrTppa1, HisrTppa2, HisrTce3, and HisrCbi1 was 0.7, 0.7, 0.7, and 1.4 g/L, respectively. Data was the average of two separate recordings and analyzed by the software Bestsel (<http://bestsel.elte.hu/index.php>) (Micsonai et al., 2018). A table in Supplementary section shows the percentages of secondary structure obtained. The native scorpion neurotoxin Cbi1 was used as comparative controls under the same extent conditions.

2.8. Immunization

Rabbits (New Zealand, 2–2.5 kg body weight) were hyperimmunized subcutaneously with antigens HisrTppa1, HisrTppa2, HisrTce3, and HisrCbi1, for producing serum antibodies. The immunization protocols were initiated by administering a dose of 75 µg of protein mixture (HisrTppa1, HisrTppa2, and HisrTce3, 25 µg each) in PBS pH 7.2, and then a second administration of 25 µg of HisrCbi1 in PBS pH 7.2. Antigens were emulsified (1:1) with Freund's Incomplete Adjuvant (IFA, from Rockland Immunochemical Inc., Limerick, PA, USA) and alternating with aluminum hydroxide (Imject®, Thermo Scientific). The protein content of antigens for immunization had increasing doses to 2 mg in a period of twenty weeks (Table S7). The rabbit serum antibodies were purified from plasma by acid precipitation, using 5% caprylic acid (Rojas et al., 1994). A final solution of rabbit-derived immunoglobulins (IgG's) containing 30 mg/mL of protein was used for further experiments.

2.9. ELISA assay

The recognition titers of rabbit immunoglobulins were compared to commercial antivenoms by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the presence of antibodies against scorpion venoms from Panama following the protocol from (Clement et al., 2019a; de la Rosa et al., 2019). Flat bottom MaxiSorp plates (NUNC™, thermo scientific) were treated with 100 µL solution of 5 µg/mL of either *Centruroides* or *Tityus* venoms in 100 mM sodium carbonate buffer (pH 9.6). Following overnight incubation at 4 °C, wells were aspirated and washed three times with 200 µL of washing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, containing 0.5 mg/mL of Tween 20 and 150 mM NaCl). Subsequently, wells were filled with 200 µL of blocking buffer (5 mg/mL gelatin and 2 mg/mL between 20 and 50 mM Tris-HCl buffer, at pH 8). After 2 h of incubation at 37 °C, wells were washed as described above and filled with Anti-Tppa1/Tppa2/Tce3/Cbi1 were diluted 1:90 in the first column for all venoms and commercial antivenoms (Brazil 1:60 for *Tityus* venoms and 1:3 for *Centruroides* venoms, Mexican 1:3 and Venezuela 1:3 for all venoms) were diluted in the first column and 1:3 serial dilutions were made in subsequent columns using incubation buffer (50 mM Tris-HCl buffer at pH 8.0, containing 1 mg/mL gelatin, 0.5 mg/mL between 20 and 0.5 M NaCl). Finally, plates were incubated with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulins 1:30,000 (Cat N. A0545, Sigma-Aldrich®) and developed with ABTS Liquid Substrate (ABTS tablets ref 11112422001, Roche). The color development reaction was arrested by the addition of 25 µL of 20% SDS, and the plate was read at 495 nm in a Microplate Reader (Tecan Sunrise IVD version), and the results were plotted using GraphPad Prism v.8.0 with non-linear regression analysis. Conventional titers were calculated from the midpoint of the curve and correspond to the IgGs dilution for half of

maximal binding, which was considered as the half maximal effective concentration (EC₅₀).

2.10. Electrophoretic analysis and Western blotting

For electrophoretic analysis and Western blotting, venom pools from the species *C. panamensis*, *C. granosus*, *C. bicolor*, *T. pachyurus*, *T. cerroazul*, *T. asthenes* and *T. festae* were included. For electrophoresis analysis, a SDS-PAGE analysis, under reducing conditions, with 12.5% gels were done according to the method proposed by Laemmli (Laemmli, 1970), then protein staining was made with Coomassie Brilliant Blue. For Western Blotting analysis, venom samples were first separated by SDS-PAGE (12.5% gels), and then transferred to a polyvinylidene difluoride membrane using a transfer apparatus Owl semi-dry system for 1 h at 400 mA. After incubation with 5% nonfat milk in TBST (10 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% Tween 20) for 2 h at room temperature, the membrane was washed three times with TBST and incubated first with the rabbit IgG antibodies (1:50), washed again three times with TBST, and then the second antibody was added (goat anti-rabbit IgG coupled to alkaline-phosphatase at 1:2000). Membranes were washed once more with TBST three times and developed with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) ready-to-use solution (Invitrogen Antibodies, Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC, USA) according to the manufacturer's protocols.

2.11. Biological activities

2.11.1. Toxicity

The protocol used for assaying the activity of peptides *in vivo* was followed according to the guidelines of our Institute Committee of Animal Welfare guidelines, keeping the number of animals to a minimum. Groups of four male mice (CD-1, 18–20 g body weight) were tested by intracranial (ic) or intravenous injection (iv) (Salazar et al., 2018). Peptide fractions were diluted up to 50–100 µL, to achieve the desired concentration, with deionized water (dH₂O). The injection was performed mid-way between the left eye and the left ear (intracranial) with a 10 µL micro-syringe fitted with a glass capillary. Negative controls were performed with dH₂O only and positive controls with the neurotoxic scorpion peptide CssII isolated in our laboratory (Hernández-Salgado et al., 2009). The amounts of protein used were indicated in the headings of the table results.

2.11.2. Protecting activity of immunoglobulins

For neutralization experiments, 1.5 LD₅₀ of whole scorpion venom was pre-incubated 30 min at 37 °C with varying volumes of antiserum and then injected by iv route according to Barona et al. (2004). After 24 h, the median effective dose (ED₅₀) was calculated using the Spearman-Kärber method (Gutiérrez et al., 1990; WHO, 1981). The ED₅₀ is defined as the volume of antiserum able to protect 50% of the mice challenged. For the neutralization tests, respective venom pools of the species *T. cerroazul*, *T. pachyurus* and *C. bicolor* were used.

Table 1

Alignment of the mature amino acid sequences of the toxins used for the production of recombinant proteins.

Toxin	Amino acid sequence	Identity (%)
Tppa1	KDGYLVGNDGCKYSCLTRPGHYCASEC-SRVKGGKDGICYAW-MACYCYNMPNWKTSRSTNRCGR	100
Tppa2	KDGYLVGNDGCKYSCLTRPGHYCASEC-SRVKGGKDGICYAW-MACYCYMPDVKTSRSTNRCGR	93.5
Tce3	KDGYLIEHRGCKYSCFFGSSWCNKEC-TLKKGSSGYC-AW-PACWCYGLPDSVKIFDSSNNKCS-	56.4
Cbi1	KDGYPMDNKGCKIACVIN-NQYCETECVTLKGGKGYCYFWKLACYCEGLPNWAKVWDRATNKCR	48.3
	**** : * : * : * . . : * . * * * . * * * * * . * : * : * . . : * *	

The amino acid sequence of Tppa1 is listed in the first line and the amino acid sequences of Tppa2, Tce3 and Cbi1 follow. The last column indicates the percentage of identity with respect to Tppa1. The last line shows amino acid identity. Gaps marked by hyphens are inserted to optimize identity. Identical amino acids are indicated by asterisks, whereas those with high or low similarities are indicated by semicolons and dots. Alignment was prepared using MUSCLE algorithm for multiple sequence alignment by MEGAX.

2.12. Statistics

Results were expressed as mean and standard deviation, or as mean with 95% confidence intervals. For all statistical methods, the software Prism 4.0 was used (Graph Pad Inc., San Diego, CA).

3. Results

3.1. N-terminal sequencing and 3' RACE

For the N-terminal sequencing analysis, the Tppa1, Cbi1 and Tce3 toxins were purified and analyzed as indicated in Section 2.2. The amino acid sequence of Tppa1, Cbi1 and Tce3 were partially sequenced at the N-terminal region, as shown in Table S1. The amino acids underlined in this table were used to design primers for 3'RACE assays. For the RNA extraction, six pairs of venom glands, for each species, were used. Only the amplified transcripts by 3'RACE (Section 2.5) with the expected size in agarose gels were purified, and DNA sequenced. Using the N-terminal designed primer of Tppa1, we obtained an additional transcript, identified as Tppa2 from the venom of *T. pachyurus* (Salazar et al., 2018). The four RNA transcripts found for the four toxins are presented in Table S2. Table 1 shows the amino acid sequences deduced from the transcripts obtained. The transcripts translation to protein sequence was performed using the bioinformatics tool Translate from ExPasy (<https://web.expasy.org/translate/>). The transcripts of the *Tityus* species strongly suggested the presence of post-translational modifications; that is, C-terminal amidation (-GK or -KK). For this reason, in the alignment shown they were not included into the sequence. The accession numbers assigned for UniProtKB were C0HLZ0 for Tppa1, C0HLZ1 for Tppa2, C0HLZ2 for Tce3 and C0HLZ3 for Cbi1.

The amino acid sequences of the four neurotoxins were compared to known scorpion toxins (Table 2) to learn more about the function/classification of the elucidated sequences (Possani et al., 1999). The amino acid sequences of Tppa1 and Tppa2 showed high identity of 96.8 and 96.7% to the sodium channel alpha-toxin To3 (P60213.3) and to the sodium channel beta-toxin To11 (H1ZZI0.1), respectively. To3 and To11 are from the venom of the scorpion *Tityus obscurus* from Brazil. The amino acid sequence of Tce3 presented sequence identity to the sodium channel beta-toxin TdNa5 (C9X4K3.1) from the venom of the scorpion *Tityus discrepans* from Venezuela, and the amino acid sequence of Cbi1 was similar to the sodium channel beta-toxin CssIX (F1CGT6.1) from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus* from Mexico. The four toxins (Tppa1, Tppa2, Tce3, and Cbi1) showed to contain 8 cysteine amino acid residues each, responsible for making four disulfide bridges, known to be present in the sodium channel modifier scorpion toxins, and at least 16 other amino acids, which are highly preserved (Table 1). The importance of such highly conserved sixteen amino acid residues, in their primary structure, are assumed to be important for the recognition of voltage-gated sodium channels (Nav), and the consequent toxicity of these peptides.

Table 2

Alignment of the sequences from Table 1 with the amino acid sequences of the most identical reported toxins found in other scorpion venoms.

Toxin	Amino acid sequence	Identity ^a (%)
Tppa1	KDGYLVGNDGCKYSCLTRPGHYCASECSRVRKGD-GYCYAW-MACYCYSPDWVKTWSRSTNRCGR-NH ₂	96.8%
To3 NaTx14.2	KDGYLVGNDGCKYNYCLTRPGHYCANECRSVRKGD-GYCYAW-MACYCYSPDWVKTWSRSTNRC	
Tppa2	KDGYLVGNDGCKYSCLTRPGHYCASECSRVRKGD-GYCYAW-MACYCYNMPNWKVKTWSRATNKC-NH ₂	96.8%
To11 NaTx14.9	KDGYLVGNDGCKYNYCLTRPGHYCANECRSVRKGD-GYCYAW-MACYCYNMPNWKVKTWSRATNKC	
Tce3	KDGYIIEHRGCKYSCFPFGSSWCNKECTLKKGSS-GYC-AW-PACWCYGLPDSVKIFDSNNKCS-NH ₂	93.4%
TdNa5 -NaTx2.5	KDGYIIEHRGCKYSCFPFGTNSWCNTECTLKKGSS-GYC-AW-PACWCYGLPDNVKIFDSNNKCS	
Cbi1	KDGYPMDNKGCKIACVI-NNQYCETECVTLVKGKGYCYFWKLACYCEGLPNWAKVWDRATNKCRA	95.4%
CssIX	KDGYPMDHKGCKIISCVI-NNKYCETECVTLVKGKGYCYFWKLACYCEGLPNWAKVWDRATNKCRA	

^a To3 NaTx14.2 (P60213) and To11 NaTx14 (H1ZZIO) were obtained from venom and venom gland transcript, respectively, of the species *Tityus obscurus*. Their percentage of identities are reported based on the amino acid sequence of Tppa1 and Tppa2, respectively. TdNa5 -NaTx2.5 (C9X4K3) was obtained from venom gland transcripts of *Tityus discrepans*. Its percentage of identity is reported based on the amino acid sequence of Tce3. CssiX (F1CGT6) is from the venom of *Centruroides suffusus suffusus*. Its percentage of identity is reported based on the amino acid sequence of Cbi1. Gaps were introduced to align the Cys.

3.2. Construction of vectors and gene cloning

The cDNA coding regions for Tppa1, Tppa2, Tce3 or Cbi1 were amplified by PCR, cloned using each into a pCR®2.1-TOPO® plasmid, and then with the use of restriction enzyme cleavage sites *Bam*H1 and *Pst*1 into the expression vector pQE30, which was used to produce

recombinantly such scorpion toxins. Table S3 shows the oligonucleotides used for constructing the expression vectors. The pQE30 vector was employed to produce N-terminal 6His-tagged proteins, which facilitate a rapid purification of recombinant products by nickel affinity agarose columns (NiNTA). The FXa cleavage site between the 6His-tag and the mature toxin sequences (Tppa1, Tppa2, Tce3, or Cbi1) was added in case

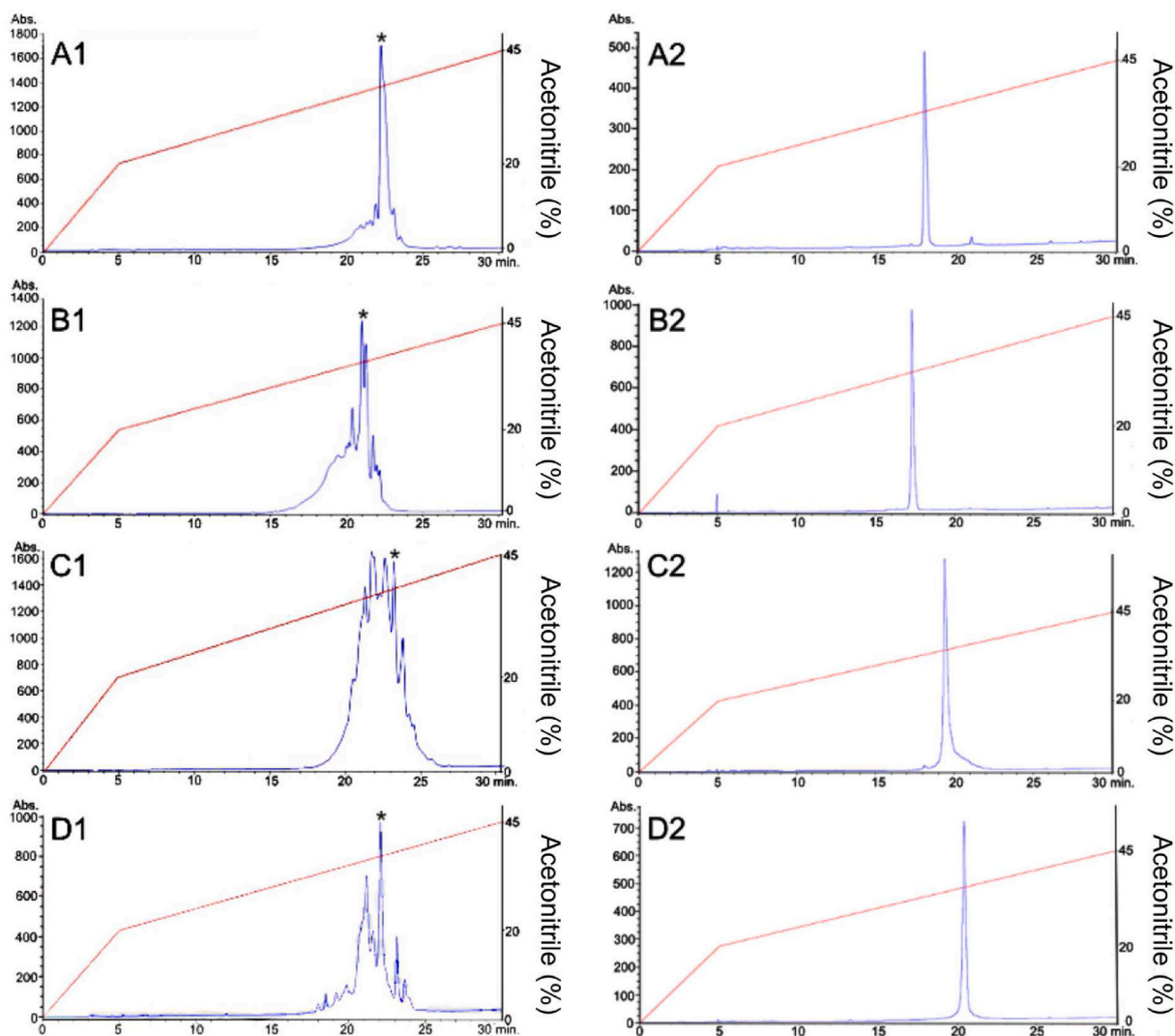


Fig. 1. Reverse phase-HPLC profiles of the purification of the recombinant proteins. HisrTppa1 (A1 and A2), HisrTppa2 (B1 and B2); HisrTce3 (C1 and C2); HisrCbi1 (D1 and D2). Reverse phase-HPLC profiles from A1 to D1 were separated using a semi preparative C₁₈ column, and reverse phase-HPLC profiles from A2 to D2 were separated using an analytical Biphenyl column. The red line depicts the acetonitrile gradient (see Materials and methods for details). The asterisk corresponds to the isoform that was active in mice.

of a harmful effect of the 6His-tag over the biological activity of toxins. The expressed proteins were named HisrTppa1, HisrTppa2, HisrTce3, and HisrCbi1, respectively. The resulting amino acid sequences, and their theoretical molecular masses are shown in Table S4. For HisrTppa2 an Arg residue was added to the C-terminal.

3.3. Expression system

Shuffle® or Origami® expression strains, different expression media, and incubation conditions were used to test the expression of the recombinant toxins. The best expression conditions found for each toxin are shown in Table S5. As a note, it was interesting to observe that toxins of the genus *Tityus* (HisrTppa1, HisrTppa2, and HisrTce3) were better expressed in the Shuffle® strain while the toxin of the genus *Centruroides* (HisrCbi1) was better expressed in the Origami® strain.

3.4. Purification and secondary structure of recombinant proteins

After protein expression, the culture medium was centrifuged at 4424 g (in JA-10 rotor) for 20 min, cells were resuspended in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 and homogenized in a French press (Constant Systems Ltd). The lysate was centrifuged at 12,096 g (in JA-20 rotor), and the pellet containing the recombinant toxins was purified from inclusion bodies using affinity chromatography to Nickel. The recombinant proteins were desalted using C₁₈ preparative columns in a HPLC system. Finally, the recombinant proteins were purified using a biphenyl reverse phased column under similar HPLC conditions (Fig. 1). Furthermore, the expressed neurotoxins showed similar content of α -helix and antiparallel β -sheet secondary structure, indirectly confirming analogous folding to

that of the α/β structures of scorpion neurotoxins (Fig. 2). The CD spectrum of HisrCbi1 was compared to that CD spectrum of the native Cbi1 (Fig. 2B). All CD spectra were evaluated using the deconvolution software Bestsel, in order to compare the percentages of secondary structure, pertaining to all recombinant peptides. Supplementary Table S6 shows the percentages of secondary structures among the recombinant peptides and the native Cbi1. The α -helix proportion was the most conserved secondary structure among all recombinant peptides. The molecular masses of the resulting fractions were confirmed by mass spectrometry (Fig. S1), and the lethal fractions to mice were used for immunization of rabbits.

3.5. Immunization, antibody purification, evaluation and neutralization assays

Two rabbits were immunized as described in Section 2.7, and they were boosted 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 98, 105, 112, 119, 126, and 133 days later with different amounts of recombinant toxins, alternating AIF and Alumina according to the protocol in Table S7.

The antibody titers were monitored by performing direct ELISA assays every 4 weeks after taking a blood sample according to Table S7. Once the immunization process was completed, the rabbits were bled and the rabbits' blood was allowed to clot at 37 °C for at least 2 h, chilled on ice for 1 h, and centrifuged at 3836 g (in JA-14 rotor, for 20 min at 4 °C). Serum was collected and stored frozen at -20 °C until used. Finally, rabbit immunoglobulins were purified by caprylic acid (Rojas et al., 1994), which is also described and recommended in the WHO guidelines for the production, control and regulation of antivenoms (WHO, 2016). The IgGs were lyophilized in vials containing 50 mg and stored at 4 °C. For titer quantification and neutralization assays an initial concentration of 30 mg/mL of IgGs was used.

Although ELISA assays do not predict antivenom neutralization, some interesting results were found. Table 3 compares the rabbit IgGs titers obtained from the immunization with the four recombinant neurotoxins (HisrTppa2, HisrTppa1, HisrTce3 and HisrCbi1) with other commercial antivenom antibodies (see also Fig. S2). The concentration of protein in the commercial antivenoms used was 37.1 mg/mL for the Mexican Alacramyn®, 19.6 mg/mL for the Venezuelan antivenom and 80.8 mg/mL for de Brazilian antivenom, which are in the range of previous reports (Sevcik and D'Suze, 2021; Vázquez et al., 2010; Venancio et al., 2013). Table 3 shows that the Brazilian antivenom had the best IC₅₀ (low μ g/mL) values compared to the other three antivenoms. Also, it had a better recognition for components of *Tityus* venoms than that of the *Centruroides* venoms. The antibody recognition for both types of venom components from *Tityus* and *Centruroides* confirms the presence of components with structural similarities in these scorpion venoms. Conversely, the Mexican antivenom Alacramyn® had the poorest IC₅₀ (high μ g/mL) values for the *Tityus* sp. venoms, and it also had poor recognitions for *Centruroides* sp. venoms from Panama. However, it had an acceptable recognition for the venom of *Centruroides suffusus suffusus*, which is one of the venom scorpion species used for producing this antivenom. The Venezuelan antibodies had a better recognition for *Tityus* venoms than that of the Mexican Alacramyn®. However, it should be noted that the rabbit IgGs obtained here are directed towards one or two components from the *Tityus* and *Centruroides* venoms, and the antibodies from commercial antivenoms are directed for several venom components with little or no role in venom lethality. Furthermore, the antibodies from this work are rabbit IgGs with a lower mass/valence ratio compared to that of the horses F(ab')₂ of the commercial antivenoms. Although the IC₅₀ values for the IgGs obtained in this work were larger than that of such commercial antivenoms, it is clear that the IC₅₀ values are not always correlated to the neutralization activity; therefore, the median effective dose (ED₅₀) for such IgGs was performed and compared to the reported ED₅₀ of such commercial antivenoms.

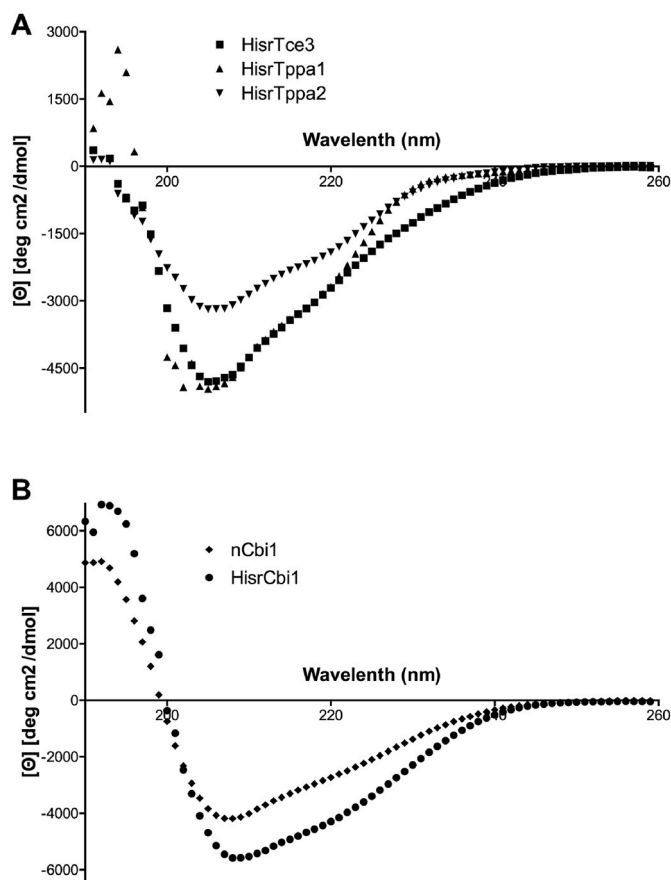


Fig. 2. Circular dichroism spectra of recombinant neurotoxins. A) Recombinant neurotoxins from the venom of *Tityus pachyurus* and *T. cerroazul*; B) Recombinant and native neurotoxin from the venom of *C. bicolor*.

Table 3IC₅₀ values for recognition of several scorpion venoms by antibodies from different commercial antivenoms and rabbit IgGs from this work.

Anti-venom	IC ₅₀ (µg/mL)						
	<i>C. s. suffusus</i>	<i>C. bicolor</i>	<i>C. granosus</i>	<i>T. pachyurus</i>	<i>T. cerroazul</i>	<i>T. asthenes</i>	<i>T. festae</i>
Alacramyn® (Mex) ^a	7.7 (6.3–9.4)	33.0 (26.8–40.7)	22.4 (18.6–27.0)	16.7 (9.9–28.1)	46.2 (29.6–72.0)	20.5 (11.9–35.3)	20.4 (14.3–29.2)
Anti-Scorpion (Ven) ^b	39.3 (32.5–47.7)	23.9 (19.4–29.5)	26.8 (21.4–33.8)	7.5 (5.8–9.6)	19.1 (17.0–21.4)	11.3 (8.7–14.5)	7.6 (6.0–9.6)
Anti-Scorpion (Bra) ^c	9.8 (7.8–12.3)	8.2 (6.5–10.4)	9.7 (7.7–12.3)	3.6 (2.9–4.5)	5.9 (4.9–7.2)	4.4 (3.5–5.6)	5.1 (4.3–6.1)
This work ^d	93.4 (87.0–101.0)	20.0 (18.5–21.5)	34.8 (30.8–39.3)	29.3 (28.5–30.2)	40.9 (39.9–41.8)	35.9 (31.9–40.5)	26.3 (21.6–32.0)

95% confidence intervals (CI) are shown in parentheses. Alacramyn® (Mex, Mexico), Anti-Scorpion (Ven, Venezuela) and Anti-Scorpion (Bra, Brazil) are F(ab')₂ from horses. The IgGs of this work are from rabbit. The antibody concentration used was a = 37.1 mg/mL; b = 19.6 mg/mL; c = 80.8 mg/mL; d = 30 mg/mL.

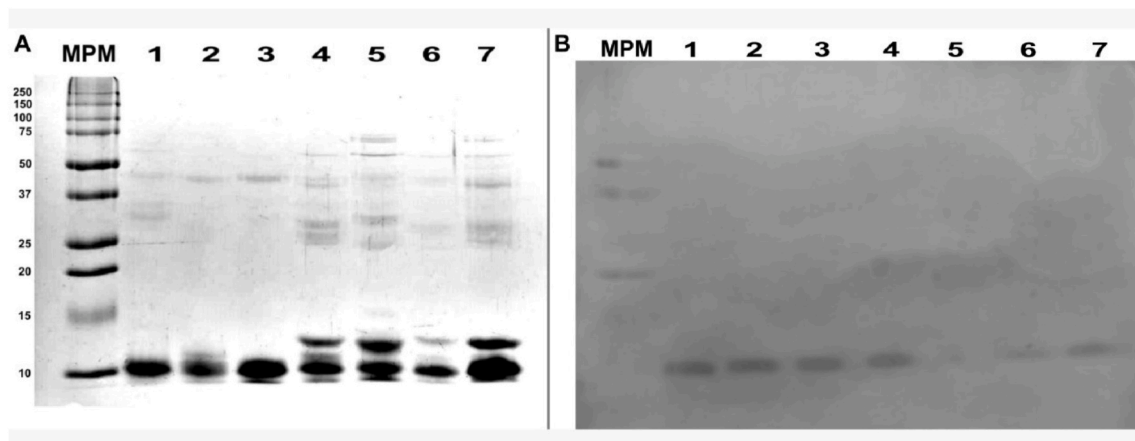


Fig. 3. SDS-PAGE of scorpion venoms from Panama and Western-blot developed with the obtained polyvalent rabbit IgGs (primary antibody). SDS-PAGE (A) and Western-blot (B) of scorpion venoms. MPM means the molecular mass markers (kDa); lanes 1 to 7 are venoms from 1 - *C. panamensis*; 2 - *C. granosus*; 3 - *C. bicolor*; 4 - *T. pachyurus*; 5 - *T. cerroazul*; 6 - *T. asthenes*; 7 - *T. festae*. The primary antibody used (1:50) was purified rabbit antibodies (IgGs), and then the second antibody was goat anti-rabbit IgG coupled to alkaline-phosphatase at 1:2000.

To evaluate the recognition of the rabbit IgGs to the Panamanian scorpion venoms, SDS-PAGE and Western-blot experiments were performed (Fig. 3). The SDS-PAGE gel shows the presence of venom components containing molecular weights of known enzymes, such hyaluronidases (band around 37–50 kDa) for all venoms, the presence of proteases (band around 25–37 kDa) for the venom of *C. panamensis*, *T. pachyurus*, *T. cerroazul*, *T. asthenes*, and *T. festae*, the presence of phospholipases (band around 13–17 kDa for *T. pachyurus*, *T. cerroazul*; *T. asthenes*, and *T. festae*). Yet, the Western blot experiments shows that the antibodies produced recognize the components that elute around the 10 kDa band (mostly NavToxins) different from that reported by Borges et al. (2020) where the Venezuelan antivenom weakly recognizes the bands around 10 kDa, but recognizes the bands with higher molecular weights with considerable intensity.

The median effective dose (ED₅₀) of the obtained IgGs was calculated (Fig. 4) for the venoms of *T. pachyurus*, *T. cerroazul* and *C. bicolor* by implementing the 3Rs in the preclinical evaluation of antivenom (Gutiérrez et al., 2017). The purified antibodies presented an ED₅₀ of 0.74 (0.54–1.02), 0.41 (0.30–0.57) and 0.61 (0.42–0.88) mg venom/mL antivenom for *T. pachyurus*, *T. cerroazul*, and *C. bicolor*, respectively (Fig. 4). For the Panamanian scorpion venoms, the effective doses of the Venezuela antivenom were calculated in CD-1 strain of mice using 1.5 LD₅₀ as challenge dose. The results were an ED₅₀ of 0.47 (0.36–0.62), 0.40 (0.29–0.48) and 0.16 (0.12–0.21) mg venom/mL antivenom for *T. pachyurus*, *T. cerroazul*, and *C. bicolor*, which shows that with only using two toxins present in the venom of *T. pachyurus*, a better neutralization is obtained than a commercial antivenom. For the venom of *T. pachyurus* and *C. bicolor*, the 100% survival group showed only mild intoxication symptoms in the first 30 min (Salazar et al., 2018). After

inoculation, the 100% survival group injected with *T. cerroazul* venom showed symptoms of moderate intoxication that were maintained after 1 h of inoculation but survived under the parameters of the experiment. This fact may lead to the need to include within the immunization pool a second toxin from the *T. cerroazul* venom, which may cause such intoxication symptoms and it is imperative to neutralize. This toxin could be either with a molecular mass of 6995.9 Da or 7046.0 Da, which were also previously described (Salazar et al., 2018).

4. Discussion

Panama has a diverse medical important scorpion fauna corresponding to species of the genus *Tityus* and *Centruroides*. From a clinical point of view, it is very difficult to differentiate the symptoms caused by the sting of these species, which may require the need of antivenom to neutralize the venom effects of such species of these two genera of scorpions (Borges et al., 2012).

The production of recombinant proteins as antigens has been described and its application to elaborate antivenoms for animal envenomation's has been depicted in recent years (Clement et al., 2019a; de la Rosa et al., 2019; Jiménez-Vargas et al., 2017; Olvera et al., 2006). The implementation of the use of recombinant toxins as a supplement or alternative to the use of complete scorpion venom in the production of antivenoms has become a reliable alternative to obtain a commercial product with the same, or perhaps better, level of neutralization than those currently produced (Mendes et al., 2008).

The primary structures of four scorpion toxins were elucidated (Tppa1, Tppa2, Tce3, and Cbi1). All four toxins have some significant identities to known toxic peptides from scorpion venoms from Brazil,

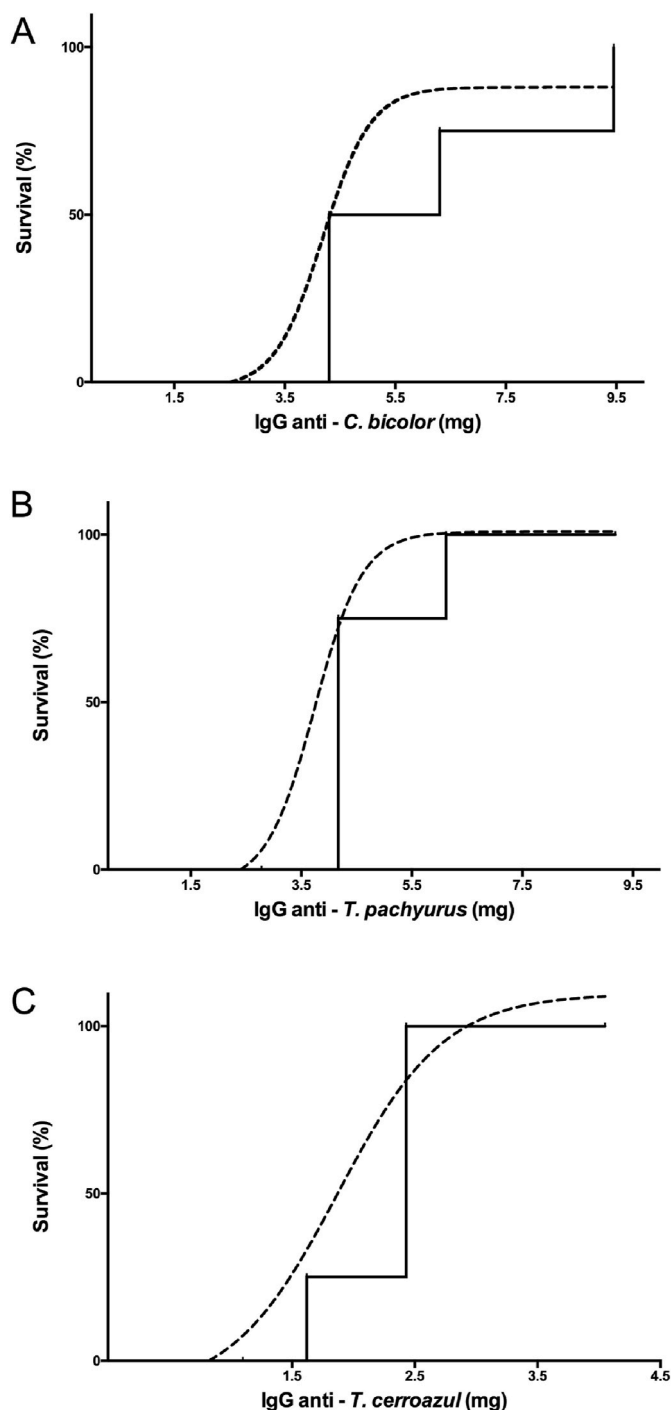


Fig. 4. Effective dose (ED_{50}) values of rabbit antibodies to neutralize *C. bicolor*, *T. pachyurus* and *T. cerroazul*. The graphs show the Kaplan-Meier survival curves (solid line) including the non-linear curves (dotted line) to calculate the ED_{50} s. The venom 1.5 LD_{50} from *C. bicolor*, *T. pachyurus* and *T. cerroazul* correspond to 94.5, 91.8 and 24.3 μ g of venom/mouse (18 g), respectively. The calculated ED_{50} for *C. bicolor* (A), *T. pachyurus* (B) and *T. cerroazul* (C) were 0.018, 0.024 and 0.013 μ g of venom/ μ g IgGs, respectively.

Venezuela and Mexico, which may be important for the molecular recognition of commercial antibodies towards the scorpion venoms from Panama. However, a good recognition of a complex antigen, like the entire venom of the scorpion, does not necessarily mean that the antibodies will neutralize the toxic effect of the venom.

All four toxins were recombinantly expressed taking in mind to obtain large amounts of toxin; however, because toxin isoforms were

generated, the yield of toxin with biological activity was very low. To improve the yield of biologically active toxins, different bacterial strains as well as modification of the expression media were tested (Table S5). These variable conditions were important for having enough material for immunization of rabbits. This is also an important point for immunization of large animals such as horses (de la Rosa et al., 2019), making possible to obtain from 2 to 5 mg of recombinant protein per liter of culture medium. The recovery was done from inclusion bodies. The expressed protein obtained from inclusion bodies was mainly aggregated and miss-folded protein that was dissolved with the help of a chaotropic agent and separated by reverse phase HPLC technique using C_{18} columns (Hernández-Salgado et al., 2012; Saucedo et al., 2012). However, with quantities of 100 μ g of protein in analytical C_{18} columns, a good separation (resolution) of the isoforms was not achieved. However, it was found that by replacing the type of the hydrophobic interaction of the stationary phase of the column (biphenyl column) a better separation was accomplished up to injection quantities of 300–350 μ g where it was possible to purify a worth quantity of a protein fraction with lethal activity (15–20 μ g ic in mice) (Fig. 1). Although other studies have shown that the use of the all protein expressed in inclusion bodies can generate neutralizing antibodies (Mendes et al., 2008), in this work, we purified the inclusion bodies and selected the toxic fraction to mice. Toxic fractions present structure epitopes, which are better immunogens than the non-active proteins (Calderon-Aranda et al., 1999).

Concerning the immunization protocol presented here, it was designed taking into account previous experience with another group of rabbits, which were immunized with all four recombinant toxins simultaneously. However, the resulting antibodies did not neutralize the lethal effect of *C. bicolor* venom but did neutralize only that of *T. pachyurus* and *T. cerroazul*. Therefore, we consider that there could be an immunodominance effect of the *Tityus* toxins in the production of antibodies, similar to that reported for *Lachesis stenophrys* venom, which reduces the equine antibody response towards *Bothrops asper* venom (Arroyo et al., 2015). For this reason, a change in the immunization protocol was considered that allowed us to obtain neutralizing antibodies for the four target neurotoxins and their respective scorpion venoms. After finishing the immunization protocol, the purified antibodies presented an ED_{50} of 0.74 mg/mL (0.54–1.02) for *T. pachyurus*, 0.41 mg/mL (0.30–0.57) for *T. cerroazul* and 0.61 mg/mL (0.42–0.88) for *C. bicolor*.

The Western blot and ELISA experiments show that the rabbit antibodies produced can recognize, besides the toxins from *T. pachyurus*, *T. cerroazul*, and *C. bicolor*, also components of the venoms from *T. festae*, *T. asthenes*, and *C. granosus* (Fig. 3). This may be due to the fact that Tppa1 is also present within the venoms of *T. asthenes* and *T. festae* (Borges et al., 2020; Salazar et al., 2018), and also it may be due to the significant sequence similarity of Tppa1 and Tppa2 to other *Tityus* sp. toxins. The cross-neutralization effect has already been studied previously for the venom of *T. pachyurus* from Colombia and the commercial antivenoms from Brazil (ED_{50} = 0.29 mg/mL (0.23–0.37), Mexico (ED_{50} 0.33 mg/mL (0.26–0.41 mg/mL) and Venezuela (ED_{50} not determined by low potency) (Barona et al., 2004). For Panamanian scorpion venoms, the effective doses of the Venezuela antivenom were calculated in CD-1 strain of mice using 1.5 LD_{50} as challenge dose. The results were an ED_{50} of 0.47 mg/mL (0.36–0.62) for *T. pachyurus* from Panama, an ED_{50} of 0.40 mg/mL (0.29–0.48) for *T. cerroazul* and an ED_{50} of 0.16 mg/mL (0.12–0.21) for *C. bicolor*, which shows that with only using two toxins present in the venom of *T. pachyurus*, a better neutralization is obtained than a commercial antivenom.

5. Conclusions

The data presented here demonstrate the proof of concept that the use of the most toxic neurotoxins present in scorpion venoms, obtained by recombinant means, and used as immunogens can produce neutralizing antibodies against the lethal effect caused by venoms of three

species of scorpions of medical importance in Panama. To improve the neutralization towards the venom of *T. cerroazul*, *T. asthenes* and *T. festae* with a view for producing IgGs in horses, it may be necessary to include more recombinant toxins from these scorpion venoms in the immunization process. According to our experience, they could be the neurotoxins either with molecular masses of 6995.9 Da or 7046.0 Da for *T. cerroazul*, 7073.6 Da for *T. festae* and 7101.5 for *T. asthenes* (Salazar et al., 2018). These IgGs produced in horses must be tested using challenge doses equivalent to at least 3 LD₅₀ of each venom. Future studies of the transcriptome or proteome of these Panamanian scorpions will be necessary to elucidate the sequences of the recommended toxins.

Ethical statement

No experiments with humans were performed. All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed, and procedures performed in the present study involving animals were done so in accordance with the bioethical standards at the “Instituto de Biotecnología - UNAM”.

Consent to participate

All researches listed voluntarily agree to participate in this research study.

Consent for publication

All researches agree for publication.

Availability of data and materials

All data generated during this study will be available upon request.

Credit author statement

Marcos H. Salazar: Conceptualization, Methodology and Formal analysis, Writing, Herlinda Clement: Methodology and Formal analysis, Ligia L. Corrales-García: Methodology and Formal analysis, Jairo Sánchez: Methodology and Formal analysis, John Cleghorn: Methodology and Formal analysis, Fernando Zamudio: Methodology and Formal analysis, Lourival D. Possani: Funding acquisition, Writing – review & editing, Hildauro Acosta: Writing – review & editing, Funding acquisition, Gerardo Corzo: Conceptualization, Writing, Writing – review & editing, Funding acquisition.

Funding statement

This work was financed by grants from Panamanian funds from SENACYT (COL10-045, INF10-051), Ministerio de Ambiente (UNDP-GEF ABS Global Project) and Vicerrectoría de Investigación y Postgrado, Universidad de Panamá; and Mexican funds from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) grant number IN202619 to LDP and grant number IT200321 to GC. Also, we acknowledge the funds from CONACyT-FORDECYT (grant number 303045) awarded to the Alagon-Becerril-Corzo-Possani research group consortium.

Marcos H. Salazar is a Ph.D. fellow from *Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB)* from Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and he was recipient of a PhD scholarship (#518494470) from CONACyT.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors acknowledge to M. Sc. Timoteo Olamendi-Portugal, Mr. Ricardo Mondragon, BSc. Felipe Olvera, and Dra. Gloria Saab for their help in protein enzymatic digestions, immunization of rabbits, IgGs purification, and circular dichroism experiments, respectively. The authors also thank Carolina Guevara and Maribel Barría for in field collection of scorpions, keeping them in captivity and venom extraction. The patent filling advice from M. Sc. Martin Patiño and MBA Mario Trejo is also greatly acknowledged. We thank the Instituto de Biotecnología of UNAM for giving us access to its computer cluster.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2021.100090>.

References

- Arroyo, C., Solano, S., Herrera, M., Segura, Á., Estrada, R., Vargas, M., Villalta, M., Gutiérrez, J.M., León, G., 2015. *Lachesis stenophrys* venom reduces the equine antibody response towards *Bothrops asper* venom used as co-immunogen in the production of polyspecific snake antivenom. *Toxicon* 103, 99–105.
- Barona, J., Otero, R., Núñez, V., 2004. Aspectos toxicológicos e inmunológicos del veneno del escorpión *Tityus pachyurus* Pocock de Colombia: capacidad neutralizante de antivenenos producidos en Latinoamérica. *Biomedica* 24, 42–49.
- Borges, A., 2015. Scorpionism and dangerous scorpions in Central America and the caribbean region. In: Gopalakrishnakone, P., Possani, L.D., F Schwartz, E., Rodríguez de la Vega, R.C. (Eds.), *Scorpion Venoms*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 215–244.
- Borges, A., Miranda, R.J., Pascale, J.M., 2012. Scorpionism in Central America, with special reference to the case of Panama. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 18, 130–143.
- Borges, A., Lomonte, B., Angulo, Y., Acosta de Patiño, H., Pascale, J.M., Otero, R., Miranda, R.J., De Sousa, L., Graham, M.R., Gómez, A., Pardal, P.P.O., Ishikawa, E., Bonilla, F., Castillo, A., de Avila, R.A.M., Gómez, J.P., Caro-López, J.A., 2020. Venom diversity in the Neotropical scorpion genus *Tityus*: implications for antivenom design emerging from molecular and immunochemical analyses across endemic areas of scorpionism. *Acta Trop.* 204, 105346.
- Calderon-Aranda, E.S., Selisko, B., York, E.J., Gurrola, G.B., Stewart, J.M., Possani, L.D., 1999. Mapping of an epitope recognized by a neutralizing monoclonal antibody specific to toxin Cn2 from the scorpion *Centruroides noxious*, using discontinuous synthetic peptides. *Eur. J. Biochem.* 264, 746–755.
- Candido, D.M., Lucas, S., 2004. Maintenance of scorpions of the genus *Tityus koch* (scorpiones, buthidae) for venom obtention at Instituto butantan, são paulo, Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 10, 86–97.
- Chippaux, J.P., Goyffon, M., 2008. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta Trop.* 107, 71–79.
- Clement, H., Corrales-García, L.L., Bolanos, D., Corzo, G., Villegas, E., 2019a. Immunogenic properties of recombinant enzymes from *Bothrops ammodytoides* towards the generation of neutralizing antibodies against its own venom. *Toxins* 11, 702.
- Clement, H., Corzo, G., Neri-Castro, E., Arenas, I., Hajos, S., de Roodt, A.R., Villegas, E., 2019b. cDNA cloning, heterologous expression, protein folding and immunogenic properties of a phospholipase A2 from *Bothrops ammodytoides* venom. *Protein Expr. Purif.* 154, 33–43.
- de la Rosa, G., Olvera, F., Archundia, I.G., Lomonte, B., Alagon, A., Corzo, G., 2019. Horse immunization with short-chain consensus alpha-neurotoxin generates antibodies against broad spectrum of elapid venomous species. *Nat. Commun.* 10, 3642.
- de Roodt, A.R., Garcia, S.L., Salomon, O.D., Segre, L., Dolab, J.A., Funes, R.F., de Titto, E. H., 2003. Epidemiological and clinical aspects of scorpionism by *Tityus trivittatus* in Argentina. *Toxicon* 41, 971–977.
- de Salud, Ministerio, 2017. Situación Epidemiológica de las Picaduras de Alacrán en la República de Panamá. Años: 2000-2016.
- D', Suze, G., Castillo, C., Sevcik, C., Brazón, J., Malave, C., Hernandez, D., Zerpa, N., 2015. Scorpionism and dangerous species of Venezuela. In: Gopalakrishnakone, P., Possani, L.D., F Schwartz, E., Rodríguez de la Vega, R.C. (Eds.), *Scorpion Venoms*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 273–298.
- Guerrero-Vargas, J.A., Rodríguez Buitrago, J.R., Ayerbe, S., Flórez Daza, E., Beltrán Vidal, J.T., 2015. Scorpionism and dangerous species of Colombia. In: Gopalakrishnakone, P., Possani, L.D., F Schwartz, E., Rodríguez de la Vega, R.C. (Eds.), *Scorpion Venoms*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 245–272.
- Gutiérrez, J.M., Rojas, G., Lomonte, B., Gené, J.A., Chaves, F., 1990. Evaluación de la capacidad neutralizante de los antivenenos en América. Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica, San José, CR, pp. 1–21.
- Gutiérrez, J.M., Solano, G., Pla, D., Herrera, M., Segura, Á., Vargas, M., Villalta, M., Sánchez, A., Sanz, L., Lomonte, B., León, G., Calvete, J.J., 2017. Preclinical evaluation of the efficacy of antivenoms for snakebite envenoming: state-of-the-art and challenges ahead. *Toxins* 9.

- Hernández-Salgado, K., Estrada, G., Olvera, A., Coronas, F.I., Possani, L.D., Corzo, G., 2009. Heterologous expressed toxic and non-toxic peptide variants of toxin CssII are capable to produce neutralizing antibodies against the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. *Immunol. Lett.* 125, 93–99.
- Hernández-Salgado, K., Possani, L.D., Corzo, G., 2012. 174. In vitro folding of a recombinant beta-scorpion neurotoxin: the influence of N-terminal hydrophobic regions. *Toxicon* 60, 185.
- Jiménez-Vargas, J.M., Quintero-Hernández, V., González-Morales, L., Ortiz, E., Possani, L.D., 2017. Design and expression of recombinant toxins from Mexican scorpions of the genus *Centruroides* for production of antivenoms. *Toxicon* 128, 5–14.
- Laurenço, W.R., 1986. *Tityus cerroazul*, nouvelle espèce de Scorpion de Panama (Scorpiones, Buthidae). *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat.* 8, 637–641.
- Mendes, T.M., Dias, F., Horta, C.C., Pena, I.F., Arantes, E.C., Kalapothakis, E., 2008. Effective *Tityus serrulatus* anti-venom produced using the Ts1 component. *Toxicon* 52, 787–793.
- Micsónai, A., Wien, F., Bulyaki, E., Kun, J., Moussong, E., Lee, Y.H., Goto, Y., Refregiers, M., Kardos, J., 2018. BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic Acids Res.* 46, W315–W322.
- Miranda, R.J., de Armas, L.F., 2020. A new species of *anateris* (scorpiones: buthidae) from Panama. *Euscorpium* 1–7.
- Olvera, A., Ramos-Cerrillo, B., Estevez, J., Clement, H., de Roodt, A., Paniagua-Solis, J., Vazquez, H., Zavaleta, A., Arroz, M.S., Stock, R.P., Alagon, A., 2006. North and South American *Loxosceles* spiders: development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens. *Toxicon* 48, 64–74.
- Otero, R., Navio, E., Cespedes, F.A., Nunez, M.J., Lozano, L., Moscoso, E.R., Matallana, C., Arsuza, N.B., Garcia, J., Fernández, D., Rodas, J.H., Rodriguez, O.J., Zuleta, J.E., Gómez, J.P., Saldarriaga, M., Quintana, J.C., Núñez, V., Cárdenas, S., Barona, J., Valderrama, R., Paz, N., Diaz, A., Rodriguez, O.L., Martinez, M.D., Maturana, R., Beltrán, L.E., Mesa, M.B., Paniagua, J., Flórez, E., Lourenço, W.R., 2004. Scorpion envenoming in two regions of Colombia: clinical, epidemiological and therapeutic aspects. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98, 742–750.
- Possani, L.D., Becerril, B., Delepiepierre, M., Tytgat, J., 1999. Scorpion toxins specific for Na-channels. *Eur. J. Biochem.* 264, 287–300.
- Rojas, G., Jimenez, J.M., Gutierrez, J.M., 1994. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon* 32, 351–363.
- Salazar, M.H., Arenas, I., Corrales-García, L.L., Miranda, R., Velez, S., Sanchez, J., Mendoza, K., Clegghorn, J., Zamudio, F.Z., Castillo, A., Possani, L.D., Corzo, G., Acosta, H., 2018. Venoms of *Centruroides* and *Tityus* species from Panama and their main toxic fractions. *Toxicon* 141, 79–87.
- Saucedo, A.L., del Rio-Portilla, F., Picco, C., Estrada, G., Prestipino, G., Possani, L.D., Delepiepierre, M., Corzo, G., 2012. Solution structure of native and recombinant expressed toxin CssII from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*, and their effects on Nav 1.5 sodium channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1824, 478–487.
- Sevcik, C., D'Suze, G., 2021. New insights on the pharmacokinetics of venoms and antivenoms. In: Gopalakrishnakone, P., Ferroni Schwartz, E., Possani, L.D., Rodríguez de la Vega, R.C. (Eds.), *Scorpion Venoms: Scorpion Venoms*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 1–25.
- Vázquez, H., Chávez-Haro, A., García-Ubbelohde, W., Paniagua-Solis, J., Alagón, A., Sevcik, C., 2010. Pharmacokinetics of a F(ab')₂ scorpion antivenom administered intramuscularly in healthy human volunteers. *Int. Immunopharm.* 10, 1318–1324.
- Venancio, E.J., Portaro, F.C.V., Kuniyoshi, A.K., Carvalho, D.C., Pidde-Queiroz, G., Tambourgi, D.V., 2013. Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of *Tityus* genus and the neutralisation potential of therapeutical antivenoms. *Toxicon* 69, 180–190.
- Viquez, C., de Armas, L.F., Lourenço, W.R., 2005. Presencia de *Tityus cerroazul* Lourenço, 1986 Scorpiones: buthidae en Costa Rica y descripción del macho. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa* 36, 93–96.
- WHO, 1981. Progress in the Characterization of Venoms and Standardization of Antivenoms. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO, 2016. In: Organization, W.H. (Ed.), *World Health Organization Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins*. World Health Organization, Geneva, Switzerland.