



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN Y EXPRESIÓN HETERÓLOGA
DE PROTEASAS Y FOSFOLIPASAS DEL VENENO DE
Bothrops ammodytoides Y SUS PROPIEDADES
INMUNOGÉNICAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES

P R E S E N T A

M. en Biotec. Herlinda Catalina Clement Carretero

Tutores:

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (CEIB-UAEM)

Dr. Gerardo Corzo Burguete (IBt-UNAM)



Cuernavaca, Morelos

Febrero, 2019

LA PRESENTE TESIS FUE REALIZADA EN

El Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos en el Laboratorio de Estructura-Función e Ingeniería de Proteínas, bajo la asesoría de la Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal y en,

El Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, bajo la asesoría del Dr. Gerardo A. Corzo Burguete.

AGRADECEMOS EL APOYO ECONÓMICO DE

La Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (DGAPA-UNAM) por el donativo No. IN203118

Agradecimientos

Agradezco de manera muy especial al Dr. Gerardo A. Corzo Burguete por el gran apoyo, libertad y oportunidad que me ha brindado siempre.

De manera muy especial agradezco al Dr. Adolfo de Roodt y la Dra Sivia Hajos por la disponibilidad que siempre me brindaron para la realización de esta tesis, ya que sin su ayuda no hubiera podido llevar a cabo este trabajo.

A los miembros de mi comité tutoral Dr. Gerardo Alfonso Corzo Buerguete, Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte, Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal, Dr. Alexis J. Rodríguez Solís y Dr. Humberto Lanz Mendoza.

A mi Jurado Evaluador para la obtención del título Dr. Gerardo Alfons Corzo Buerguete, Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte, Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal, Dr. Alexis J. Rodríguez Solís, Dr. Humberto Lanz Mendoza, Dr. Ramón Suárez Rodríguez y Dr. José Augusto Ramírez Trujillo por sus valiosas críticas en esta tesis.

Por el apoyo técnico y colaboración de la Dra. Ligia Luz Corrales García, Dr. Fernando Zamudio Zúñiga, M. en B. Timoteo C. Olamendi Portugal, del Biol. Felipe Olvera Rodriguez, M en Biotec. Edgar Neri Catro, Biol. Raúl Sánchez y Dr. Ivan Arenas Sosa

A la unidad de secuenciación del instituto de biotecnología (IBT).

A los técnicos de la planta piloto Ing. Verónica Albiter y Mario Alberto Caro.

Agradezco el apoyo administrativo en el laboratorio brindado por María del Carmen Martínez Segura, Ricardo Mondragón, Manuela Ávila y Angélica Linares.

Así como el invaluable apoyo otorgado por la Biol. Fernanda Cristina Barrera Garduño

A todos los miembros del consorcio “Estudio de componentes del veneno de animales: estructura y función, desarrollo de antivenenos e identificación de proteínas terapéuticas” del Instituto de Biotecnología Alagón- Becerril-Corzo-Possani.

A todos mis compañeros del laboratorio del Dr. Corzo porque sin su ayuda no hubiera podido realizar este trabajo: Dra. Ligia Luz Corrales, Dra. Francia García, Dr. Iván Arenas, Biol. Damaris Iyary Bolaños Guadarrama, M.C. Jesús Ángel Borrego, Samuel Cardoso, Biol. Germán Aguilar, Lic. Felix Santana, Biol. Raúl Sánchez, M.C. Marco Antonio Ibarra, Biol. David Villaseñor, Ing. Alondra Callejas, Lic. Diana Alvarado, Lic. Marcos Hugo Salazar M.C. Leydy Lorena Mendoza.

Agradecimientos personales

Con todo mi amor y cariño a mi esposo Uriel, por su paciencia y por siempre estar en los buenos momentos y sobre todo en los difíciles, por tu comprensión, paciencia, cariño y amor GRACIAS.

A mi persona favorita del mundo mundial Paulina, por ser mi fuente de motivación e inspiración para poder luchar día a día. Te quiero hasta la luna y más allá.

A mi Mamá por siempre estar ahí en las buenas y en las malas.

A Lilu, Damaris y Francia, gracias por compartir tantas risas y lindos momentos juntas.

A mi segunda familia los Corzos, gracias a cada uno de ustedes por hacer más fácil el trabajo en el laboratorio en especial al Dr. Corzo que siempre ha confiado en mí y me ha apoyado. Al Team Corzo: Lilu, Damaris, perdón Damaris, Francia, Chuy, Dr. Iván, Raúl, Marco Ibarra, Sam, Erika, Felix, Marcos, Alondra, German, Diana, David y a los que han estado por poco tiempo pero que también he aprendido mucho y he disfrutado buenos momentos Angel Ananda Pérez, Lorena Mendoza y María Jose.

Tabla de Contenido

| | |
|---|----|
| Resumen | 3 |
| Abstract | 4 |
| 1. Introducción y Antecedentes | 5 |
| 1.1. Componentes del veneno del género <i>Bothrops</i> | 5 |
| 1.1.1. Serinoproteasas de venenos de serpientes | 6 |
| 1.1.2. Metaloproteasas de venenos de serpiente (SVMP) | 8 |
| 1.1.3. Fosfolipasas (PLA2) de venenos de serpiente | 9 |
| 1.2. Usos biotecnológicos de algunas proteínas del veneno de vipéridos | 11 |
| 1.3. <i>Bothrops ammodytoides</i> : características y distribución..... | 13 |
| 1.4. Anticuerpos y alternativas para su mejoramiento..... | 15 |
| 2. Justificación..... | 16 |
| 3. Hipótesis | 16 |
| 4. Objetivo General | 16 |
| 4.1. Objetivos Particulares..... | 16 |
| 5. Diseño experimental | 17 |
| 5.1. Caracterización bioquímica de los componentes del veneno de <i>B. ammodytoides</i> : Purificación de serinoproteasa y PLA2 por diferentes pasos cromatográficos | 18 |
| 5.1.1. Extracción de veneno y glándulas venenosas..... | 18 |
| 5.1.2. Fraccionamiento del veneno completo de <i>B. ammodytoides</i> | 18 |
| 5.1.3. Repurificación de las fracciones obtenidas del veneno completo..... | 18 |
| 5.1.4. Determinación de secuencias por medio de Degradación de Edman y masa molecular por espectroscopía de masas | 18 |
| 5.2. Amplificación de las secuencias que codifican algunas enzimas del veneno de <i>B.</i> <i>ammodytoides</i> | 19 |
| 5.2.1. Extracción de RNA total de las glándulas venenosas..... | 19 |
| 5.2.2. Síntesis del cDNA 3'RACE (Invitrogen™) a partir del RNA total | 19 |
| 5.2.3. Diseño de oligonucleótidos para amplificación de las enzimas serinoproteasa, metaloproteasa y fosfolipasa | 20 |
| 5.2.4. Amplificación de los genes de serinoproteasa, metaloproteasa y fosfolipasa por medio de la reacción en cadena de la polimerasa PCR | 20 |
| 5.2.5. Inserción de genes en el vector de clonación..... | 21 |
| 5.2.6. Diseño de oligos para la subclonación en un vector de expresión | 23 |
| 5.2.7. Amplificación por PCR para la adición de los sitios de restricción..... | 24 |
| 5.2.8. Subclonación de genes con sitios de restricción en vector pCR2.1-TOPO..... | 24 |
| 5.2.9. Construcción del vector de expresión pQE-30 con los genes de serinoproteasa, metaloproteasa y fosfolipasa A2 | 24 |
| 5.3. Expresión heteróloga de la Serinoproteasa, Metaloproteasa y PLA2 | 25 |
| 5.4. Proceso de purificación de las proteínas expresadas en la fracción insoluble | 26 |
| 5.5. Plegamiento de proteínas..... | 27 |
| 5.6. Cambios en el gen de serinoproteasa..... | 27 |
| 5.7. Librería de cDNA de glándulas venenosas de <i>B. ammodytoides</i> | 29 |
| 5.8. Evaluación de actividades enzimáticas <i>in vitro</i> | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 5.8.1. Ensayo de actividad de fosfolipasa en placa rodamina-yema de huevo-agar | 30 |
| 5.8.2. Ensayo de actividad específica de fosfolipasa A2 | 31 |
| 5.8.3. Zimograma con gelatina de actividad de proteasa | 31 |
| 5.8.4. Actividad Fibrinogenolítica en SDS-PAGE | 32 |
| 5.9. Evaluación de actividades biológicas..... | 32 |
| 5.9.1. Actividad Coagulante en plasma sanguíneo humano | 32 |
| 5.9.2. Actividad Antimicrobiana por difusión radial en placa..... | 32 |
| 5.10. Actividades inmunológicas | 33 |
| 5.10.1. Determinación del reconocimiento inmunológico mediante ensayos por Western blot..... | 33 |
| 5.10.2. Cuantificación del nivel de reconocimiento por inmunoensayo enzimático ligado a enzima (ELISA) | 34 |
| 6. Resultados y Discusión | 35 |
| 6.1. Caracterización bioquímica de los componentes del veneno de <i>B. ammodytoides</i> | 35 |
| 6.1.1. Fraccionamiento del veneno completo de <i>B. ammodytoides</i> por cromatografía de exclusión molecular en gel | 35 |
| 6.1.2. Ensayo de actividad de fosfolipasa en placa con las fracciones de la exclusión molecular..... | 36 |
| 6.1.3. Ensayo de actividad de proteasa en gel SDS-PAGE con las fracciones de la exclusión molecular..... | 37 |
| 6.1.4. Repurificación de las fracciones obtenidas del veneno completo por cromatografía de fase reversa y análisis de fracciones..... | 38 |
| 6.1.5. Zimograma con gelatina para elucidar actividad de proteasas en las fracciones de la repurificación..... | 39 |
| 6.1.6. Zimograma con gelatina para determinar inhibición de la actividad de las proteasas de las fracciones de la repurificación | 39 |
| 6.1.7. Pruebas de coagulación sanguínea con las fracciones de la repurificación..... | 41 |
| 6.1.8. Actividad fibrinogenolítica..... | 42 |
| 6.1.9. Identificación de proteínas a partir de secuencias de péptidos obtenidos mediante MALDI-TOF MS/MS..... | 43 |
| 6.2. Clonaciones de los genes que codifican enzimas del veneno de <i>B. ammodytoides</i> | 44 |
| 6.2.1. Extracción RNA de glándulas venenosas de <i>Bothrops ammodytoides</i> | 44 |
| 6.2.2. Síntesis de cDNA y amplificación por RT-PCR para obtener los genes de la serinoproteasa, metaloproteasa y PLA2..... | 45 |
| 6.2.3. Construcción del Vector pCR2.1-TOPO con los genes de serinoproteasa, metaloproteasa y PLA2..... | 46 |
| 6.2.4. Selección de clonas que acarrean el inserto de interés..... | 47 |
| 6.2.5. Secuencias de plásmidos de Topo2.1-serinoproteasa, Topo2.1-metaloproteasa y Topo2.1-PLA2 | 47 |
| 6.3. Construcción de los vectores de expresión de la serinoproteasa, metaloproteasa y PLA2 ... | 52 |
| 6.3.1. Adición de los sitios de restricción a los genes de la serinoproteasa, metaloproteasa y PLA2..... | 52 |
| 6.3.2 Subclonación en vector pCR2.1-TOPO de los genes que codifican para serinoproteasa metaloproteasa y PLA2 con adición de los sitios de restricción <i>Bam</i> HI y <i>Pst</i> I..... | 52 |
| 6.3.3. Análisis de clonas de las construcciones en pCR2.1-Topo con la adición de sitios <i>Bam</i> HI y <i>Pst</i> I | 53 |

| | |
|--|------------|
| 6.3.4. Determinación de las secuencias de plásmidos de Topo2.1- <i>Bam</i> HI-FXa-Serinoproteasa-Stop-Stop- <i>Pst</i> I, Topo2.1- <i>Bam</i> HI-FXa-Metaloproteasa-Stop-Stop- <i>Pst</i> I y Topo 2.1 <i>Bam</i> HI-FXa-PLA2-Stop-Stop- <i>Pst</i> I..... | 54 |
| 6.3.5. Subclonación en el vector de expresión pQE-30 | 55 |
| 6.3.6. PCR de colonia de las clonas obtenidas de la ligación del inserto de serinoproteasa, metaloproteasa y fosfolipasa con pQE-30..... | 56 |
| 6.4. Expresión heteróloga y purificación de las proteínas de serinoproteasa, metaloproteasa y PLA2..... | 58 |
| 6.4.1. Expresión, purificación, plegamiento y pruebas de actividad de la serinoproteasa..... | 58 |
| 6.4.2. Expresión, purificación y plegamiento de la metaloproteasa | 67 |
| 6.4.3. Expresión, purificación, plegamiento y caracterización de la PLA2..... | 69 |
| 6.5. Librería de cDNA de la glándula venenosa de <i>B. ammodytoides</i>..... | 74 |
| 6.6. Reconocimiento inmunológico de proteínas recombinantes y venenos completos por IgG de caballos y anticuerpos de conejos..... | 76 |
| 6.6.1. Cuantificación del nivel de reconocimiento de los anticuerpos por los antígenos mediante inmunoensayo enzimático ligado a enzima (ELISA). | 76 |
| 6.6.2. Títulos de anticuerpos por ELISA de los antivenenos comerciales Bivalente argentino y Antivipmyn mexicano, usando como antígenos veneno de <i>B. ammodytoides</i> y proteínas recombinantes..... | 78 |
| 6.6.3. Evaluación por ELISA de los títulos de anticuerpos de conejo anti crotoxina, serinoproteasa y metaloproteasa de <i>Crotalus simus</i> , usando como antígenos veneno de <i>B. ammodytoides</i> y proteínas recombinantes. | 80 |
| 6.6.4. Análisis de las IgG de caballo anti PLA2 recombinante..... | 82 |
| 6.6.5. Análisis de las IgG de caballo anti serinoproteasa recombinante | 87 |
| 6.6.6. Evaluación de las IgG de conejo anti- enzimas recombinantes (serinoproteasa, metaloproteasa y PLA2)..... | 89 |
| 7. Conclusiones | 96 |
| 8. Perspectivas | 97 |
| 9. Referencias..... | 98 |
| Apéndice I | 103 |
| Apéndice II | 106 |

Resumen

En el continente americano los vipéridos (“víboras”) son los responsables de la mayoría de los accidentes ofídicos, principalmente por los géneros *Bothrops* y *Crotalus*¹. Los anticuerpos utilizados para los antivenenos con fines terapéuticos son preparados de caballos por inoculación de venenos completos. Sin embargo, los venenos de serpientes contienen una amplia mezcla de componentes farmacológicamente activos. Aunque, no todos los componentes son igualmente importantes para la producción de anticuerpos. Por lo tanto, la identificación de las proteínas con capacidad inmunógena, y además neutralizante, pueden ayudar a definir los inmunógenos, para el desarrollo de antivenenos más eficientes. Sin embargo, no siempre se cuenta con las cantidades deseadas de inmunógenos y es por esto que el uso de proteínas recombinantes para ser utilizadas como inmunógenos se vuelve importante.

Los objetivos principales en este trabajo fueron identificar y caracterizar bioquímicamente al menos una proteasa y una fosfolipasa del veneno de *Bothrops ammodytoides*, y expresarlas de forma heteróloga, para generar anticuerpos con capacidad de reconocimiento hacia dichas proteínas nativas.

Durante el desarrollo del trabajo se logró la clonación y la expresión de tres enzimas: PLA2, serinoproteasa, así como de una metaloproteasa utilizando el vector pQE30. La actividad biológica de las enzimas recombinantes fue de baja a nula; esto debido, a que no logró obtenerse un plegamiento satisfactorio de dichas enzimas. Esto es, la purificación de cada una de las enzimas mostró varias fracciones con masas moleculares similares, indicando indirectamente que cada fracción correspondía a un plegamiento diferente. Independientemente de estos resultados, se inmunizaron animales con el fin de obtener anticuerpos que reconocieran a las enzimas nativas.

Se obtuvieron IgG de caballos inmunizados con la PLA2 y serinoproteasa recombinante, siendo la PLA2 recombinante la que mejores títulos generó. Los anticuerpos anti-fosfolipasas recombinante redujeron la actividad de fosfolipasa y hemolítica en el veneno de *Bothrops ammodytoides*.

Por otro lado, se generaron anticuerpos de conejo inmunizados contra las tres proteínas recombinantes. Igualmente se encontró que la PLA2 y serinoproteasa recombinantes fueron mejores inmunógenos para la producción de anticuerpos en conejos. Como resultado general, se obtuvieron anticuerpos con poco reconocimiento a los venenos completos del género *Bothrops*, pero se concluye que se pueden obtener anticuerpos de proteínas recombinantes tanto en caballos como en conejos que reducen las actividades enzimáticas de venenos de *Bothrops*.

Abstract

In the American continent, the viperids ("vipers") are responsible for most of the ophidic accidents, mainly by the *Bothrops* and *Crotalus* genera ¹. Antibodies used for antivenoms toward therapeutic purposes are built in horses by inoculation of complete poisons. However, snake venoms contain a broad mixture of pharmacologically active components; at the same time, not all the components are equally important for the production of antibodies. Thus, the identification of proteins with immunogenic capacity, and also neutralizing, can help define immunogens, for the development of more efficient antivenoms. Nevertheless, the amounts of immunogens are not always available, and this is the reason for using recombinant proteins as immunogens.

Our purposes in this work were to identify and biochemically characterize, at least one protease and one phospholipase from *Bothrops ammodytoides* snake venom. Subsequently, obtain them in a recombinant way, in order to generate antibodies with recognition capacity towards their native proteins.

During the development of the work, the cloning and expression of three enzymes were achieved: PLA2, serine protease, as well as a metalloprotease using the pQE30 vector. The Biological activity of the recombinant enzymes was low to none; mainly due to inappropriate folding of those enzymes. After enzymes' purification, we could find some different fractions with similar molecular masses, indicating indirectly, that each fraction corresponded to a singular folding. Regardless of these results, animals were immunized in order to obtain antibodies that recognize native enzymes.

IgG from immunized horses with recombinant enzymes (PLA2 and serine protease) were obtained, being the PLA2 the one that better titles generated. Anti-phospholipases antibodies reduced hemolytic activity in *Bothrops ammodytoides* venom.

On the other hand, rabbit antibodies were obtained when the animal was immunized with all three recombinant proteins. It was also found that recombinants PLA2 and serine protease were better immunogens for the production of antibodies in rabbits. As a general result, antibodies were obtained but with little recognition toward the complete poisons of the genera *Bothrops*; however, we could obtain antibodies from recombinant proteins as well in horses as in rabbits, and those antibodies are able to reduce the enzymatic activities of *Bothrops*.

1. Introducción y Antecedentes

1.1. Componentes del veneno del género *Bothrops*

En el continente americano los vipéridos (“víboras”) son los responsables de la mayoría de los accidentes ofídicos, principalmente por los géneros *Bothrops* y *Crotalus* ¹. El envenenamiento por *Bothrops sp.*, se caracteriza por efectos cardiovasculares y actividades proteolíticas con un marcado efecto local que provoca mionecrosis, hemorragias y edemas ².

El veneno de *Bothrops sp.* es una secreción de toxinas producidas por un par de glándulas exocrinas conectadas por ductos a los colmillos. Dicho veneno es una compleja mezcla de moléculas con diferentes características bioquímicas; son principalmente de naturaleza proteica y tienen la capacidad de afectar sistemas fisiológicos vitales en animales, tales como la homeostasia. Sin embargo, las diferentes toxinas que constituyen el veneno pueden llegar a ser una fuente natural para uso en tratamientos terapéuticos o para el desarrollo de nuevos fármacos ³. Hoy en día se han aislado algunos componentes del veneno de especies de *Bothrops*, en los que se incluyen enzimas, como serinoproteasas, metaloproteasas, fosfolipasas A2 (PLA2), L-amino oxidasas, nucleotidasas y hialuronidasas; así como otras proteínas no enzimáticas, como desintegrinas y miembros de las familias de las lectinas tipo C, entre otras. En la Tabla 1 se describen algunos de los componentes antes mencionados ⁴.

Tabla 1. Componentes tóxicos de venenos de serpientes

| Componentes | Moléculas Blanco | Actividades | Órganos Blancos |
|---------------------------------|--|--|--|
| Serinoproteasas (SVSP) | -Factores de coagulación -Componentes de la matriz vascular | -Pro/anti-coagulante -Daño en vasos sanguíneos | -Homeóstasis -Sistema cardiovascular |
| Metaloproteasas (SVMP) | -Factores de coagulación -Componentes de la matriz vascular | -Pro/anti-coagulante -Daño en vasos sanguíneos | -Homeóstasis -Sistema cardiovascular |
| Desintegrinas | -Receptores de la matriz en células endoteliales | -Daño en los vasos sanguíneos | -Homeóstasis |
| PLA2 | -Fosfolípidos de la membrana celular | -Hematuria -Miotóxico -toxicidad celular | -Músculo -Riñones -Homeóstasis |
| Bloqueadores de canales iónicos | -Canales iónicos | -Bloqueo de la transmisión nerviosa -Miotóxicos -Bloqueo de la transmisión sináptico | -Músculo -Sistema nervioso central y periférico |
| Lectinas tipo C | -Factores de la coagulación | -Induce agregación plaquetaria | -Riñones -Homeóstasis |

1.1.1. Serinoproteasas de venenos de serpientes

Las serinoproteasas de venenos de serpientes (SVSPs) son enzimas hidrolíticas de estructura homogénea y bien caracterizadas, afectan el sistema homeostático, actuando sobre componentes de la cascada de coagulación, el sistema fibrinolítico y el sistema calicreína-cinina⁵.

Las serinoproteasas pertenecen a la familia S1 de la tripsina⁶. Presentan masas moleculares que van desde 26 a 67 kDa. La estructura secundaria de las serinoproteasas tipo trombina del veneno de serpientes (TL-SVSPs) está formada por dos barriles β con una hendidura catalítica entre estos dos barriles. Está estabilizada por seis puentes disulfuro, cinco de estos puentes (Cys22-Cys157, Cys42-Cys58, Cys136-Cys201, Cys168-Cys182 y Cys191-Cys220) son equivalentes en todas las serinoproteasas de la familia S1, mientras que el seis (Cys91-Cys 245) es único para las serinoproteasas de venenos de serpientes⁷.

Todas las TL-SVSPs presentan una triada catalítica común en su sitio activo compuesta por histidina (57), aspártico (102) y serina (195). La serina actúa como un nucleófilo, y la histidina puede ser donador o aceptor de protones. El aspartato se cree que orienta a la histidina correctamente dentro de la hendidura catalítica a través de enlaces de hidrógeno⁸.

Las enzimas tipo trombina, entre ellas las TL-SVSPs, son definidas por su capacidad para romper las cadenas α y β del fibrinógeno (en los enlaces entre la arginina y la lisina), convirtiéndolo así en fibrina y liberando fibrinopéptido A (FPA) o fibrinopéptido B (FPB) según la cadena que se corte. Basados en su actividad las TL-SVSPs han sido clasificadas en A, B o AB, aunque la mayoría de las TL-SVSPs aisladas son de la clase A⁹.

Un activador de plasminógeno directo en los venenos de serpiente fue descrito en el veneno de *Trimeresurus stejnegeri*. El activador de plasminógeno de *Trimeresurus stejnegeri* (TSV-PA) es una serinoproteasa de 33 kDa que activa plasminógeno rompiendo el enlace de Arg561-Val562, en el mismo sitio de los activadores naturales uPA y tPA para generar dos cadenas de plasmina, enzima clave en la fibrinólisis¹⁰.

La serinoproteasa de *Trimeresurus stejnegeri* (TSV-PA) es un activador de plasminógeno altamente específico y su estructura cristalográfica ha sido determinada con una resolución de 2.5 Å (PDB: AAC59686.1). La enzima presenta un plegamiento idéntico a las proteínas tipo tripsina. Una característica única en la estructura de serinoproteasa con actividad de plasminógeno es la presencia de un residuo de fenilalanina en la posición 193. Estudios previos de mutaciones en el residuo de Asp 97 han mostrado que es importante para el reconocimiento del plasminógeno. Además el Asp 97 se encuentra conservado en el

activador de plasminógeno de tipo tisular (tPA) y activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) en mamíferos ¹¹.

De las actividades de trombina que son imitadas por las serinoproteasas de veneno de serpiente es la activación de la proteína C. Es una glicoproteína dependiente de vitamina K que circula en la sangre como zimógeno de una serinoproteasa, activada por la trombina en la superficie endotelial en presencia de trombomodulina ⁶.

El activador de la proteína C del veneno de *Agkistrodon contortrix contortrix* (ACC-C), es una serinoproteasa de cadena sencilla y activa la proteína C sin depender de la trombomodulina. Las cargas positivas que rodean el sitio catalítico juegan un papel importante en el reconocimiento, la unión y la activación de la proteína C. La estructura cristalográfica de la enzima tipo trombina (TLE) del veneno de *Bothrops jararacussu* (Jararacussin-I) fue la primera de las TLE con una resolución de 2.48 Å (PDB: Q2PQJ3.1), la cual ha permitido la comparación con la estructura del activador de proteína C de *Agkistrodon contortrix contortrix* y del activador de plasminógeno de *Trimeresurus stejnegeri* ¹².

Jararacussin-I comprende una secuencia de 232 residuos de aminoácidos, contiene un barril beta con seis cadenas y una alfa hélice corta. La estructura terciaria está muy conservada entre las serinoproteasas de venenos de serpiente al igual que ACC-C y TSV-PA. Un análisis de la distribución de cargas muestra, que Jararacussin-I presenta en la superficie cargas altamente negativas alrededor del sitio activo, mientras que en ACC-C (PDB: P09872.2) son cargas positivas ¹³. Las principales diferencias entre las tres estructuras cristalográficas reportadas (ACC-C, TSV-PA y Jararacussin-I), están localizados en los *loops* alrededor del sitio activo. La secuencia de aminoácidos que comprenden estos *loops* son únicos para cada serinoproteasa de venenos de serpiente ¹³.

Las serinoproteasas de venenos de serpientes con capacidad de activar la proteína C han sido aisladas de varias especies de venos de serpiente como: *Agkistrodon contortrix contortrix* y *Agkistrodon halys halys*. Ellas prolongan el tiempo de coagulación y la formación de trombos. La rápida acción del activador de la proteína C Protac® del veneno de *Agkistrodon contortrix contortrix* se utiliza para diagnóstico en los trastornos de la vía de la proteína C. La función de Protac® es independiente de la presencia de trombomodulina ¹⁴.

Algunas enzimas de tipo trombina tales como Ancrod (Viprinex®, Knoll, Ludwigshafen-DE) aislados de *C. rhodostoma* y Batroxobin (Defibrase®, Pentapharm-CH) proveniente de *B. atrox* se han utilizado clínicamente en estudios terapéuticos e investigaciones sobre infartos de miocardio y accidentes cerebrovasculares isquémicos, entre otros desordenes vasculares ¹⁵.

Ancrod (nombre actual: Viprinex) es un agente desfibrinogenante derivado del veneno de la serpiente malaya *Calloselasma rhodostoma*. En 2005, la Food and Drug Administration (FDA) concedió el permiso para investigar el uso Ancrod en pacientes que sufren problemas cerebrovasculares isquémicos agudos, una condición potencialmente mortal causada por la obstrucción de los vasos sanguíneos que suministran sangre y oxígeno al cerebro. Sin embargo debido a la baja efectividad, el Ancrod fue rechazado en etapa III de ensayos clínicos para tratamientos de problemas cerebrovasculares y ya no se produce para su uso en seres humanos ¹⁶.

La Defibrase® es el nombre comercial que se ha dado a la batroxobin, la cual funciona como anticoagulante, ya que rompe específicamente el enlace de la Arg16-Gly17 de la cadena alfa del fibrinógeno, liberando fibrinopéptido A, evitando la formación de un coágulo estable ¹⁷. Batroxobin se ha utilizado en pacientes con trombosis, infarto de miocardio, angina e isquemia. Mientras que la batroxobina recombinante (rBAT) se ha utilizado en ensayos clínicos de fase II para uso en la prevención y tratamiento de sangrado quirúrgico ¹⁸.

1.1.2. Metaloproteasas de venenos de serpiente (SVMP)

Las SVMP se clasifican según su organización multidominio en cuatro clases de PI a PIV. Estas enzimas se sintetizan *in vivo* como proteínas multimodulares y presentan péptido señal, un prodominio y un dominio metaloproteasa (clase PI). Algunas SVMP también presentan dominios en el extremo C-terminal, como dominios: desintegrina (clase PII) o dominio similar a la disintegrina (clase PIII), el dominio rico en cisteína (clase PIII) y el dominio similar a lectina de tipo C (clase PIV) ¹⁹.

Las SVMP actúan principalmente como factores hemorrágicos, también llamados hemorraginas, ya que ejercen sus efectos en la degradación de las proteínas de la membrana basal endotelial. Sus blancos son también las proteínas de coagulación sanguínea, como fibrinógeno y el factor de von Willebrand. Estos efectos asociados con la digestión proteolítica de la membrana basal son el principal mecanismo de la hemorragia inducida por SVMP ²⁰.

Las metaloproteasas de venenos de serpientes son de interés farmacológico y de uso diagnóstico. Un ejemplo es la Ecarina aislada del veneno de una serpiente Indú *Echis carinatus*, la cual rompe selectivamente a la protrombina. La Ecarina no afecta otros factores de coagulación. Su acción en la protrombina es independiente de calcio, fosfolípidos o factor V. La Ecarina es utilizada para medir niveles de protrombina en sangre y es el reactivo primario en pruebas de tiempos de coagulación sanguínea ²¹.

Las SVMPs Fibrino(geno)líticas no hemorrágicas pueden ser exploradas como agentes trombolíticos para la disolución de trombos o para prevenir su formación. La fibrolasa, una metaloproteasa fibrinolítica de 23 kDa de *Agkistrodon contortrix contortrix*, se empleó en varias investigaciones preclínicas y clínicas. Su actividad α y β -fibrinolítica directa ha demostrado ser eficaz en la disolución de coágulos arteriales femorales, tras una sola administración intravenosa sin efectos adversos sobre la presión arterial o la frecuencia cardíaca, en comparación con la estreptocinasa, un agente trombolítico ampliamente utilizado. Las SVMP fibrinolíticas no hemorrágicas presentan ventajas prometedoras para el uso de trombólisis debido a su tamaño pequeño y el hecho de que no se ven afectados por los inhibidores de las serinoproteinasas sanguíneas. La protrombinasa y las enzimas activadoras del factor X ya se utilizan en la investigación y el diagnóstico de la coagulación^{22, 23, 24, 25}.

Aunque las SVMP son conocidas por sus capacidades proteolíticas celulares sólo pocos estudios han sido relacionados con actividades antimicrobianas directas. Se aisló y caracterizó una metaloproteasa de *Agkistrodon halys* (AHM), con el objetivo de entender cómo la permeabilidad de la membrana y las funciones antimicrobianas podrían estar relacionadas con tales proteínas. AHM mostró actividades inhibitorias contra *Burkholderia pseudomallei*, *Proteus vulgaris* y *Staphylococcus aureus*²⁶.

No obstante, más allá de las aplicaciones clínicas, estas enzimas pueden utilizarse como herramientas bioquímicas para estudios moleculares, aplicaciones de la industria biotecnológica, estudios del mecanismo de acción de venenos, diseño de inhibidores de proteasa y comprensión de otras características de metaloproteasas.

1.1.3. Fosfolipasas (PLA2) de venenos de serpiente

Las fosfolipasas A2 (PLA2) son enzimas dependientes de calcio que catalizan la hidrólisis del enlace éster sn-2 de los fosfoglicéridos, formando ácidos grasos libres y lisofosfolípidos²⁷.

Las PLA2 se clasifican en diferentes grupos de acuerdo con su estructura tridimensional, secuencia de aminoácidos, especificidad catalítica y lugar de expresión. Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza como fosfolipasas de secreción, citosólicas y las que son independientes de Ca^{2+} . Las fosfolipasas de secreción son de baja masa molecular (14-18 kDa), dependientes de Ca^{2+} y tienen en su sitio activo un residuo de histidina. En contraste las fosfolipasas citosólicas y las independientes de Ca^{2+} son enzimas de alta masa molecular (40-85 kDa), enzimas intracelulares, independientes de Ca^{2+} y tienen en su sitio activo un residuo de serina²⁸.

Las fosfolipasas de los venenos de las serpientes son similares en su estructura primaria y secundaria a las enzimas de mamíferos, pero las PLA2 de los venenos de serpientes se encuentran entre las proteínas altamente tóxicas y juegan un papel importante en la inmovilización y captura de la presa. Además de su participación en la digestión de su presa, ellas muestran una amplia variedad de efectos toxicológicos, interfiriendo en varios procesos fisiológicos de la víctima ²⁹.

En los venenos de serpientes se encuentran dos grupos de enzimas fosfolipasas A2, el I y II. El grupo I se encuentra en el páncreas de mamíferos, en el veneno de elápidos y de colúbridos. La PLA2 del veneno de cobra fue la primera de este grupo en ser caracterizada ³⁰. Estas enzimas contienen entre 115-120 residuos de aminoácidos con siete puentes disulfuro y el puente disulfuro entre el residuo 11 y 77 de cisteína, único en este grupo ³¹.

Las PLA2 de los venenos de las serpientes de la familia Viperidae pertenecen al grupo II. Estas enzimas contienen entre 120-125 residuos de aminoácidos con siete puentes disulfuro. El residuo cisteína en posición 133 del extremo C-terminal forma un puente disulfuro con el residuo cisteína en posición 50 cerca del sitio activo, el cual es único en el grupo II ³².

Las fosfolipasas de veneno de serpiente del grupo II también pueden ser divididas en diferentes subgrupos según el residuo de aminoácido de la posición 49. El Asp 49 juega un papel importante en la catálisis y está conservado en la mayoría de las PLA2 de los venenos de serpientes y por lo tanto estas enzimas son identificadas como D49 ³³. Sin embargo, en algunas PLA2 este residuo es reemplazado por lisina, serina o arginina y son identificadas como K49, S49 ³⁴, N49 o R49 ³⁵. La sustitución de Aspártico en la posición 49 impide la unión del Ca^{2+} al *loop* de unión a Ca^{2+} y por lo tanto estos cambios disminuyen la actividad hidrolítica ³⁶.

Además de la actividad de hidrólisis enzimática sobre fosfolípidos, las fosfolipasas A2 de venenos de serpiente poseen actividad anticoagulante, que fue descrita por primera vez en 1976, quienes reportaron la purificación de 26 fosfolipasas A2 con efecto sobre la coagulación. Dependiendo de su potencia anticoagulante se clasificaron como fuertes, débiles y enzimas no anticoagulantes ³⁷.

La actividad anticoagulante que es independiente de la actividad enzimática, interactúa directamente con los factores de la coagulación, inhibiendo la formación del complejo protrombinasa ³⁸. Las PLA2s que inhiben el complejo protrombinasa y evitan la formación del complejo de coagulación FXa/FVa, además del retraso del tiempo en que se forma la trombina, se han postulado como candidatos prometedores para el tratamiento de trastornos tromboembólicos ³⁹. Las fosfolipasas con una alta actividad anticoagulante se caracterizan porque presentan una región cargada positivamente entre el residuo 54 y 77 ⁴⁰.

Una de las actividades poco exploradas de las PLA2 son las antimicrobianas, las cuales pueden llegar tener aplicación médica. La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema terapéutico de magnitud creciente y es potencialmente una amenaza grave para la salud pública. La prevalencia de la resistencia bacteriana a los antibióticos convencionales ha llevado a una búsqueda intensiva de nuevos agentes terapéuticos incluyendo varios péptidos antimicrobianos de origen animal ⁴¹. Proteínas y péptidos con potente actividad antimicrobiana son evidentes en muchas secreciones de organismos incluyendo serpientes. Entre los diversos componentes del veneno de serpiente, la enzima fosfolipasa A2 (PLA2) exhibe diversas actividades biológicas además de la actividad catalítica ⁴².

Es así como las PLA2 de venenos de serpiente (svPLA2s), han sido reportadas como agentes antimicrobianos y se han considerado como candidatos terapéuticos, por ejemplo, Crotopotin, una PLA2 aislada del veneno de *Crotalus durissus terrificus*, muestra actividad antibacteriana, así como actividad antiviral contra el virus de la inmunodeficiencia humana ⁴³. Las PLA2s, tanto Asp49 como Lys49, pueden presentar actividad bactericida ⁴⁴. Una proteína catiónica aislada selectivamente del veneno del taipán (*Oxyuranus microlepidotus*) mata de forma dependiente a bacterias Gram-positivas a través de la ruptura de la membrana. Estas enzimas son muy atractivas debido a su diversidad bioquímica, es decir, amplio espectro de actividad frente a un gran número de bacterias. Sin embargo, una investigación más exhaustiva de este tipo de actividades permitiría considerar nuevos candidatos farmacológicos ⁴⁵.

El primer componente caracterizado del veneno de *B. ammodytoides* fue una fosfolipasa A2, la cual se obtuvo mediante diferentes métodos cromatográficos. Esta enzima pertenece a la PLA2 aspártico 49 (D49), contiene 122 residuos de aminoácidos, 7 puentes disulfuro presenta una masa molecular de 13,853 Da, y un punto isoeléctrico teórico de 6.13. En la caracterización general de esta enzima incluye un árbol filogenético, donde esta fosfolipasa segrega estrechamente con otras fosfolipasas de serpientes brasileñas del género *Bothrops* ⁴⁶.

1.2. Usos biotecnológicos de algunas proteínas del veneno de vipéridos

Las toxinas de los venenos de serpientes han evolucionado para afectar muchos sistemas fisiológicos de la presa, incluyendo la hemostasia y trombosis. Estas toxinas pertenecen a una diversa gama de familias de proteínas que pueden iniciar o inhibir múltiples etapas de la vía de coagulación o agregación plaquetaria con gran especificidad hacia dianas moleculares de vertebrados. Característica que ha sido extremadamente útil para el diagnóstico de enfermedades humanas o para estudios fisiológicos ⁵. Por ejemplo, al observar en los pacientes los primeros síntomas que ocasionan las mordeduras de serpientes del género *Bothrops*, se puede apreciar la generación de trombos, debido a que el veneno de estas

serpientes, contienen enzimas coagulantes y procoagulantes. La posibilidad de aislar y caracterizar tales enzimas, podría llegar a permitir el desarrollo de nuevos medicamentos ⁴⁷.

La especificidad y función de cada uno de los componentes en los venenos de serpientes han permitido el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades de tipo agudo crónico como son cáncer, hipertensión y trombosis, así como fármacos necesarios para el diagnóstico de problemas de la homeóstasis ⁴⁸.

El primer ejemplo de un fármaco desarrollado a partir de una toxina aislada del veneno de *Bothrops jararaca*, fue el medicamento conocido como Captopril®, un agente hipotensivo capaz de inhibir la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y por ende disminuir los niveles de presión sanguínea en mamíferos. Fue diseñado con base en la estructura de un péptido potenciador de bradicinina (BPP), aislados del veneno de *Bothrops jararaca*, hoy en día es la primera elección en el tratamiento para la hipertensión ⁴⁹. La Tabla 2 resume varios de los componentes de uso biotecnológico provenientes de venenos de serpientes.

Tabla 2. Fármacos y kits diagnóstico clínico a partir de veneno de serpientes.

| Fármaco | Blanco y Función | Tratamiento | Fuente | Referencia |
|---------------------------|--|---|--|--------------------------|
| Captopril, enalapril | Inhibidor de ACE | Hipertensión | <i>Bothrops jararaca</i> | Ondetti et al., 1971 |
| Integrilin (Eptifibatide) | Inhibidor de la agregación plaquetaria | Síndrome coronario | <i>Sistrurus milliarus</i> | Huang et al., 1987 |
| Aggrastat (Tirofiban) | Inhibidor de GPIIb-IIIa | Infarto al miocardio | <i>Echis carinatus</i> | Scarborough et al., 1993 |
| Ancrod (Viprinex) | Inhibidor de fibrinógeno | Anticoagulante | <i>Agkistrodon rhodostoma</i> | Samsa et al., 2002 |
| Defibrasa | Inhibidor de trombina y protrombina | Infarto cerebral, angina de pecho | <i>Bothrops moojeni</i> | Soares et al., 2003 |
| Hemocoagulasa | Efecto tipo trombina | Prevención y tratamiento de hemorragias | <i>Bothrops atrox</i> | Itoh et al., 1987 |
| Protac | Activador de proteína C | Diagnóstico clínico de desordenes homeostáticos | <i>Agkistrodon contortix contortix</i> | Zhou et al., 2000 |
| Ecarin | Activador de protrombina | Diagnóstico | <i>Echis carinatus</i> | Navdae et al., 2001 |
| Reptilase | Sistema homeostático | Diagnóstico de desordenes en la coagulación | <i>Bothrops jararaca</i> | White et al., 1977 |

Actualmente existen toxinas y drogas basadas en toxinas que se usan o están en desarrollo para ser utilizadas como fármacos o como pruebas diagnósticas de diversas enfermedades. Entre ellos una variedad de nuevas toxinas de venenos de serpiente están siendo analizados para usarse en el tratamiento de coagulopatías y enfermedades del corazón

50

1.3. *Bothrops ammodytoides*: características y distribución

Entre las especies más pequeñas de serpientes del género *Bothrops* está *B. ammodytoides* llamada comúnmente "yarára ñata", debido a su "nariz" respingada (por modificación de las escamas de esa zona). Es endémica de Argentina, con una amplia distribución en el país comparada con otros miembros del género. Habita ambientes muy diversos, tales como montañas (arriba de los 2,000 m), bosques y regiones donde la temperatura oscila entre 40°C en el día y -10°C durante la noche. Es la serpiente más austral del mundo (Figura 1) y se distingue de otras especies de *Bothrops* de Argentina, ya que el 40% de su dieta ésta basada principalmente por pequeños reptiles como lagartijas ⁵¹.



Figura 1. Distribución geográfica de *Bothrops ammodytoides* en Argentina

Se tiene como creencia popular en Argentina que debido a su tamaño pequeño, los accidentes causados por *B. ammodytoides* no son considerados como una amenaza para la vida. Sin embargo sus mordeduras causan envenenamientos desde moderados a severos, tanto en animales domésticos como en humanos ⁵². En tal medida, el veneno de *B. ammodytoides* se encuentra entre las más potentes comparado con otros venenos de especies del género *Bothrops*, presentando actividades letales altas ⁵³.

De tal manera que el envenenamiento por *Bothrops sp.*, se caracteriza por efectos cardiovasculares y actividades proteolíticas con un marcado efecto local que provoca mionecrosis, hemorragias y edemas ². En la Tabla 3, se muestran valores de las actividades biológicas de varias especies de *Bothrops* de Argentina y son explicados según los siguientes parámetros:

- a. Dosis Letal media (LD₅₀): cantidad de veneno (µg de veneno/g ratón) que mata a la mitad de un grupo de animales.
- b. Dosis mínima hemorrágica (DMH): cantidad de veneno que induce un área hemorrágica de 10 mm de diámetro, dos horas después de la inyección en ratones.
- c. Dosis Mínima Necrotizante (DMN): cantidad de veneno que genera en un área necrótica con un diámetro promedio de 0.5 cm en ratones.
- d. Dosis mínima procoagulante (DMP): concentración de veneno que induce la coagulación de 1 mL de sangre en 60 min.
- e) Actividad fosfolipasa (PLA2): es el consumo de 1.0 µEq de NaOH por minuto y está correlacionado con la liberación de ácidos grasos de fosfolípidos de membranas celulares.

Tabla 3. Valores de actividades biológicas y enzimáticas de varias especies de *Bothrops* ⁵³.

| | <i>B. alternatus</i> | <i>B. ammodytoides</i> | <i>B. jararaca</i> | <i>B. moojeni</i> | <i>B. neuwiedii</i> |
|------------------|----------------------|------------------------|--------------------|-------------------|---------------------|
| DL ₅₀ | 1 ± 0.2 | 0.5 ± 0.01 | 2.3 ± 0.1 | 2 ± 0.2 | 1.4 ± .1 |
| DMH | 14 ± 3 | 16.1 ± 6 | 12.7 ± 3 | 30 ± 4 | 10 ± 4.6 |
| DMN | 69 ± 14 | 31 ± 16 | 80 ± 14 | 50 ± 7.4 | 34 ± 7.4 |
| DMP | 4 ± 2.1 | 7.3 ± 3.4 | 11 ± 4.2 | 14 ± 3.5 | 6 ± 1.8 |
| PLA2 | 5.1 ± 2 | 110 ± 15 | 5.2 ± 4 | 66 ± 7 | 110 ± 20 |

Valores expresados en µg/g para DL₅₀, DMH, DMN, DMP, y en µEq/mg/min para PLA2.

Algunas características del veneno de la serpiente *B. ammodytoides*, indican que es letal y puede causar hemorragia, dermonecrosis, edema y miotoxicidad en ratones. A demás muestra actividad procoagulante en plasma humano.

Se han reportado algunas actividades enzimáticas como: proteólisis sobre gelatina, caseína y *p*-toluensulfonil arginina (TAME); actividad de fosfolipasa y actividad hemolítica indirecta, así como actividad de ADNasa ⁵⁴. Aunque la separación parcial del veneno demostró que algunas fracciones son letales para los ratones, aún no se cuenta con información referente a la identidad de todos los componentes del veneno ⁵⁵.

1.4. Anticuerpos y alternativas para su mejoramiento

A pesar de los avances en farmacología terapéutica en diferentes áreas de la medicina, la seroterapia sigue siendo el tratamiento de elección para las mordeduras de serpientes. Actualmente hay diferentes tipos de antivenenos, pero esencialmente son concentrados de inmunoglobulinas (o fragmentos de anticuerpos) con capacidad neutralizante a los efectos tóxicos del veneno que son obtenidos a partir de animales como caballos. Los protocolos de producción de antivenenos se centran en la estimulación progresiva del sistema inmune adaptativo. Por lo tanto, se debe comenzar con inyecciones periódicas de pequeñas cantidades de venenos, que luego se incrementan gradualmente, lo que alarga considerablemente el tiempo de producción. Se ha planteado que una posible solución a este problema sería la atenuación de toxinas a través de diferentes tratamientos como radiación, calor o modificaciones químicas, lo que permitiría inocular mayores cantidades de toxinas, sin embargo, no hay muchos avances con estas metodologías ya que se ha visto que estos procesos pueden afectar la inmunogenicidad de dichas toxinas⁵⁶. Por tanto, es importante investigar protocolos de inmunizaciones dirigido a mejorar la producción de antivenenos.

Hoy en día ocurren muchos accidentes mortales por mordeduras de serpientes principalmente debido a la falta de aplicación a tiempo de los antivenenos disponibles comercialmente. Las compañías farmacéuticas que preparan fragmentos de anticuerpos $F(ab')_2$ capaces de neutralizar toxinas y detener el proceso de intoxicación, necesitan mantener en cautiverio las especies que se utilizan para la elaboración de los antivenenos y periódicamente realizar ordeñas para la inmunización de los caballos. Uno de los problemas más comunes es que el extracto de veneno para la inmunización no es homogéneo y puede variar de un lote a otro. La composición y la concentración de los componentes pueden depender de varios factores, incluida la ubicación del lugar preciso en donde las serpientes son colectadas, cómo son mantenidos en cautiverio a los especímenes, la preparación del material inmunogénico, entre otras. Estas variables generan la necesidad de validar cada lote de producción para cada antiveneno. Un problema adicional es el hecho de que un veneno o extracto crudo se utiliza para la inmunización, y los caballos inmunizados producen anticuerpos contra todos los componentes inyectados, muchos de los cuales no son necesarios para la elaboración de los antivenenos, desviando así la parte de la respuesta inmune de los caballos en antígenos innecesarios⁵⁷.

Se ha propuesto que el material utilizado para la inmunización pudiera prepararse de forma homogénea con cantidades bien controladas de los componentes letales de los venenos, lo que daría como resultado una producción de mejores anticuerpos neutralizantes. Además, de mejorar la calidad y el título de los anticuerpos producidos en los caballos.

2. Justificación

Los venenos de vipéridos son una fuente natural y diversa de compuestos con un potencial biotecnológico y terapéutico importante, debido a que poseen moléculas bioactivas que han sido la base para el diseño de fármacos y métodos de diagnóstico, además de utilizarse como inmunógenos para la elaboración de antivenenos. Uno de los venenos más interesantes entre las especies del género *Bothrops* es *Bothrops ammodytoides* esto debido a las significativas actividades biológicas de sus componentes, y también a los pocos estudios moleculares realizados en el veneno de este vipérido. Aunque las moléculas constituyentes del veneno lleguen a tener potencial biotecnológico, es difícil demostrarlo usando muestras biológicas obtenidas directamente del veneno, ya que sus cantidades son limitadas y no permitirían llevar a cabo las diferentes pruebas de laboratorio. Es por esto que la expresión recombinante de las principales enzimas, involucradas en su toxicidad, será importante, y de interés, para determinar si dichas proteínas podrían ser inmunogénicas para generar anticuerpos que puedan utilizarse para neutralizar la actividad de sus partes o del propio veneno, así como de otros venenos relacionados.

3. Hipótesis

Las proteasas y fosfolipasas recombinantes provenientes de la información genética de la glándula venenosa de *Bothrops ammodytoides*, serán efectivas para producir anticuerpos capaces de reconocer proteínas en venenos completos de diferentes especies de vipéridos.

4. Objetivo General

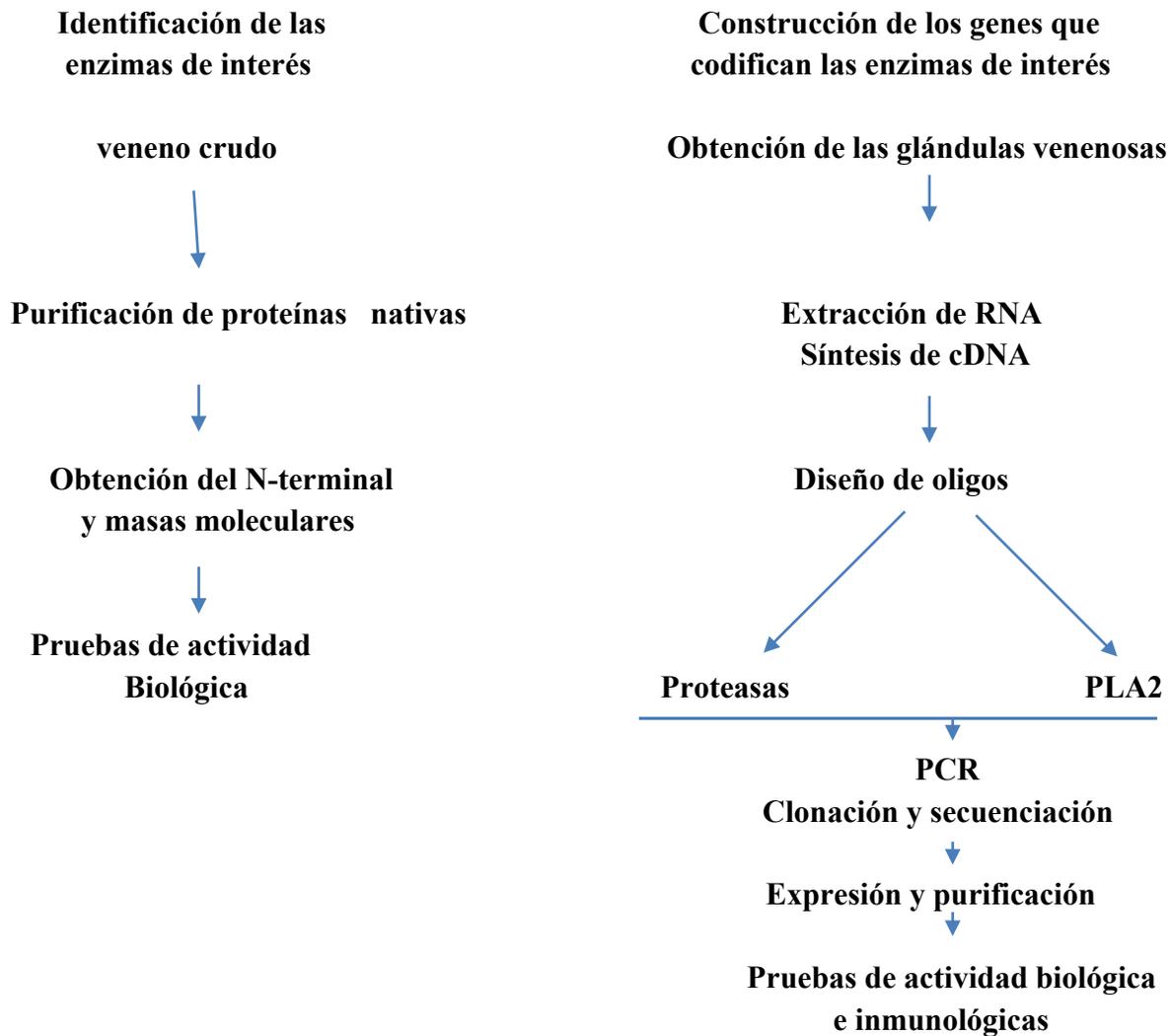
Caracterizar y expresar de manera heteróloga proteasas y fosfolipasas de la glándula venenosa de la serpiente *Bothrops ammodytoides* y evaluar sus propiedades inmunogénicas

4.1. Objetivos Particulares

- Identificar bioquímicamente proteasas en el veneno de *Bothrops ammodytoides*.
- Obtener los genes que codifican proteasas y una fosfolipasa de las glándulas venenosas de *Bothrops ammodytoides*.
- Expresarlas heterológamente y determinar sus actividades biológicas
- Evaluar las propiedades inmunogénicas de las enzimas recombinantes.

5. Diseño experimental

Se muestra a continuación un esquema de la metodología que se llevó a cabo en este trabajo.



5.1. Caracterización bioquímica de los componentes del veneno de *B. ammodytoides*: Purificación de serinoproteasa y PLA2 por diferentes pasos cromatográficos

5.1.1. Extracción de veneno y glándulas venenosas

El veneno y las glándulas venenosas de *B. ammodytoides* se extrajeron de ejemplares en cautiverio del Serpentario del Instituto Nacional de Producción de Biológicos ANLIS "Dr. C.G. Malbrán" (INPB) en colaboración con el Dr. Adolfo de Roodt, Argentina.

5.1.2. Fraccionamiento del veneno completo de *B. ammodytoides*

Por medio de la cromatografía de exclusión molecular en gel, que se basa en la separación por el tamaño molecular de las proteínas, se pueden separar macromoléculas de tamaños diferentes o eliminar contaminantes de baja masa molecular⁵⁸.

100 mg totales del veneno *B. ammodytoides* se purificaron por exclusión molecular en gel, y para ello se cargó la muestra en una columna de vidrio con capacidad de 120 mL de resina (200 x 1 cm), como fase estacionaria se utilizó resina de Sephadex G-75 (con un rango de fraccionamiento de 3 a 70 kDa) (Sigma Chemical Co.). La columna se equilibró con buffer 20 mM acetato de amonio, pH 4.7. El flujo fue de 15 mL/h. Las fracciones se colectaron de 2 mL y se determinó su concentración por absorbancia a 280 nm.

5.1.3. Repurificación de las fracciones obtenidas del veneno completo

La cromatografía en fase reversa de alta resolución (HPLC-RP), se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar y una fase estacionaria apolar. El efecto hidrofóbico disminuye con la adición de disolvente apolar a la fase móvil⁵⁹.

Algunas de las fracciones que mostraron un alto contenido de proteínas en la exclusión molecular en gel, se repurificaron por HPLC-RP usando una columna analítica C₄ (Vydac #214TP54, 5 µm 300 Å 4.6 x 250 mm). En el proceso se usó solvente A (0.1% de ácido trifluoroacético-TFA- en agua) y como solvente B (0.1% TFA en acetonitrilo) en un gradiente de 10-60% de acetonitrilo en 50 minutos y a un flujo de 1 mL/min. Las fracciones fueron colectadas manualmente por monitoreo a una absorbancia de 230 y 280 nm.

5.1.4. Determinación de secuencias por medio de Degradación de Edman y masa molecular por espectroscopía de masas

La degradación de Edman es un método de secuenciación de aminoácidos de una proteína. En este método, el residuo amino terminal se etiqueta y se separa del péptido sin afectar a los enlaces peptídicos entre los residuos. Una de las limitantes que existen es que los péptidos cuyo extremo N-terminal se encuentre bloqueado (grupo aminoacetilado, formilado, etc) no pueden secuenciarse⁶⁰.

Se utilizaron las facilidades de secuenciación y espectrometría de masas del consorcio “Estudio de componentes del veneno de animales: estructura y función, desarrollo de antivenenos e identificación de proteínas terapéuticas” del Instituto de Biotecnología de la UNAM, con la colaboración del Dr. Fernando Zamudio. El secuenciador de proteínas utilizado fue modelo LF 3000 Beckman (Palo Alto, CA).

5.2. Amplificación de las secuencias que codifican algunas enzimas del veneno de *B. ammodytoides*

5.2.1. Extracción de RNA total de las glándulas venenosas

El RNA total se obtuvo de glándulas venenosas de *B. ammodytoides*, utilizando el reactivo TRIzol®, método de isotiocianato guanidina/fenol originalmente descrito por Chomzynski y Sacchi. Una ventaja de este método es que el RNA se extrae en pocos pasos lo que da como resultado una mejor calidad y una menor degradación de la muestra ⁶¹.

A continuación, se enuncian los pasos para la extracción de RNA total, a partir de glándulas venenosas:

1. La glándula venenosa se extrajo por un procedimiento quirúrgico y se maceró en 1 ml de Trizol. Se incubó 10 min en hielo
2. Se adicionaron 200 µL de cloroformo, se incubó 10 min a temperatura ambiente
3. Se centrifugó a 14,000 rpm 10 min a 4°C
4. El sobrenadante se colocó en un tubo limpio y se agregó un mismo volumen de isopropanol se incubó 10 min a temperatura ambiente
5. Se centrifugó a 14,000 rpm 10 min a 4°C
6. Se descartó sobrenadante y la pastilla se dejó secar
7. Finalmente se resuspendió en 50 uL de H₂O/DPC

Todos los reactivos utilizados eran libres de RNAsas y el material que se utilizó era estéril. Para el análisis del RNA se utilizó un gel de agarosa al 1%.

5.2.2. Síntesis del cDNA 3'RACE (Invitrogen™) a partir del RNA total

RACE o rápida amplificación de los extremos de cDNA, es una técnica para la amplificación y caracterización de regiones de secuencias de ácidos nucleicos desconocidas a partir de un templado de mRNA, entre un sitio interno definido y una secuencia desconocida en cualquier extremo del mRNA, ya sea 3' o 5' ⁶².

A partir del RNA total obtenido de las glándulas venenosas de la serpiente *B. ammodytoides*, se obtuvo el cDNA por medio del Kit 3'RACE (Invitrogen™), proceso que se logra gracias a la etiqueta de adeninas que los RNA mensajeros (mRNA) poseen. En este procedimiento los mRNAs, son retrotranscritos a cDNA, usando una enzima transcriptasa

reversa, un oligo adaptador y un oligo dT (AP 5'- GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T-3'). Como resultado de esta primera amplificación se genera un híbrido RNA-DNA, y luego por la acción de la RNAsa H se degrada la hebra de RNA quedando una cadena sencilla de cDNA. Utilizando este cDNA como molde, un oligo específico que hibride con una secuencia conocida del gen de interés y un oligo adaptador que contiene la etiqueta de timinas, se busca tener un amplificado por medio de PCR. De esta manera se espera obtener los genes tanto de serinoproteasa, metaloproteasa como de fosfolipasa; para el caso de la metaloproteasa se usó un plásmido obtenido de la librería de cDNA de glándulas venenosas de *B. ammodytoides*, ver 5.7.

5.2.3. Diseño de oligonucleótidos para amplificación de las enzimas serinoproteasa, metaloproteasa y fosfolipasa

Para el diseño de oligonucleótidos específicos para cada una de las enzimas, se siguieron estrategias diferentes. En el caso de la serinoproteasa se tomó como base la secuencia N-terminal de la proteína nativa, previamente determinada, para el diseño del oligonucleótido directo y como oligonucleótido reverso se utilizó AUAP, proporcionado por el Kit comercial 3'RACE (Invitrogen™) y que contiene una secuencia homóloga a la región adaptadora del oligonucleótido adaptador (AP); para la metaloproteasa se diseñaron los oligonucleótidos con base en alineamientos de secuencias de metaloproteasas ya reportadas; y para PLA2 se usó la secuencia completa de PLA2 reportada por Clement et al. (2012)⁴⁶ para el diseño de los oligonucleótidos. Los oligonucleótidos diseñados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Oligonucleótidos para amplificar los genes de proteasas: serinoproteasa y metaloproteasa una y PLA2.

| Nombre | Secuencia 5' → 3' | Tm °C |
|------------------|---|-------|
| Oligo1 Fw Serino | GTCATTGGAGGTGATGAATGT _(21nt) | 60 |
| Oligo Fw Metalo | GAGCCCATCAAAAAGGCC _(18nt) | 56 |
| Oligo Rv Metalo | GGCATCGAAGCGATTTCT _(18nt) | 54 |
| Oligo1 Fw PLA2 | CACCTGATGCAATTTGAG _(18nt) | 52 |
| Oligo2 Rv PLA2 | GCATGGCTCTGACTCCTC _(18nt) | 58 |
| Oligo AUAP | GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC | - |

5.2.4. Amplificación de los genes de serinoproteasa, metaloproteasa y fosfolipasa por medio de la reacción en cadena de la polimerasa PCR

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR es un procedimiento efectivo para generar *in vitro* grandes cantidades de una secuencia específica de DNA. Para llevar a cabo esta técnica se requiere DNA de doble cadena que servirá como molde, dos oligonucleótidos sintéticos como iniciadores de la síntesis, una DNA polimerasa termoestable y finalmente los cuatro dNTPs⁶³.

El procedimiento cíclico de la PCR comprende tres etapas comenzando con la desnaturalización por calor que dará como resultado la separación de las hebras de DNA, seguida por renaturalización que implica la hibridación de los oligonucleótidos iniciadores con sus regiones específicas en el templado y en tercer lugar la elongación del DNA, en donde se generaran las dos hebras nuevas ⁶⁴.

Las condiciones del PCR para amplificar los diferentes genes fueron las siguientes:

- Gen de la serinoproteasa: 20 picomoles/ μL de cada uno de los oligonucleótidos (Oligo Fw serino y AUAP), 0.2 mM dNTPs, 1x *Buffer* de la taq polimerasa adicionado con magnesio, 1.25 unidades/50 μL de reacción de Taq polimerasa, y cDNA. La mezcla de PCR se sometió a 35 ciclos de desnaturalización (1 min, 94°C), hibridación (2 min, 60°C) y elongación (2 min, 72°C). El tamaño esperado para esta amplificación era aproximadamente de 900 pares de bases.
- Gen de la metaloproteasa: 20 picomoles/ μL de cada uno de los oligonucleótidos (Oligo Fw Metalo y Oligo Rv Metalo), 0.2 mM dNTPs, 1x *Buffer* de la taq polimerasa adicionado con magnesio, 1.25 unidades/50 μL de reacción de Taq polimerasa, y cDNA. La mezcla de PCR se sometió a 30 ciclos de desnaturalización (1 min, 94°C), hibridación (2 min, 55°C) y elongación (2 min, 72°C). El tamaño esperado para esta amplificación era aproximadamente de 800 pares de bases.
- Gen de la fosfolipasa: 20 picomoles/ μL de cada uno de los oligonucleótidos (Oligo Fw PLA2 y Oligo Rw PLA2), 0.2 mM dNTPs, 1x *Buffer* de la taq polimerasa adicionado con magnesio, 1.25 unidades/50 μL de reacción de Taq polimerasa, y cDNA. La mezcla de PCR se sometió a 30 ciclos de desnaturalización (1 min, 94°C), hibridación (2 min, 54°C) y elongación (2 min, 72°C). El tamaño esperado para esta amplificación era aproximadamente de 400 pares de bases.

5.2.5. Inserción de genes en el vector de clonación

Los insertos de tamaño esperado para cada gen, se extarjeron de un gel preparativo de agarosa (1%), y luego se purificaron usando el *Kit* de extracción de DNA Roche[®]. Ya con los insertos purificados, se procedió a la ligación en el vector de clonación plásmido TOPO 2.1 (pCR®2.1-TOPO®, invitrogen™) ⁶⁵ (Figura 2). Este vector permiten la clonación de manera rápida y eficaz, ya que por efecto de una topoisomerasa el vector está linearizado y tiene extremos cohesivos expuestos con Timina; dicha base nitrogenada resulta ser muy importante en el momento de la clonación debido a que por otro lado, la enzima Taq polimerasa empleada en la técnica de PCR adiciona el nucleótido de adenina (A) al final del fragmento de interés, de manera que al momento de la ligación se da una complementariedad de bases entre la timina del vector y la adenina del inserto (Figura 3).

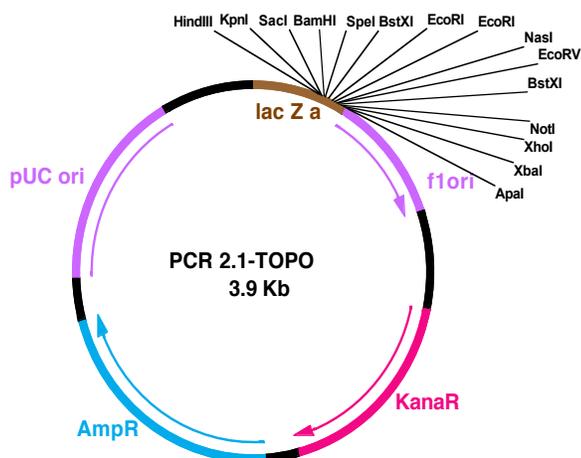


Figura 2. Vector de clonación pCR 2.1-TOPO.

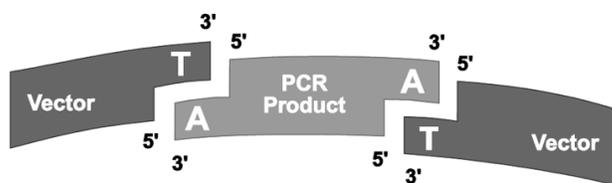


Figura 3. Diagrama de la ligación del producto de PCR y el vector pCR 2.1-TOPO, mediante complementariedad de bases, con el método TA Cloning®.

Para el proceso de ligación se usaron 5U de la enzima T4 DNA ligasa, 1x del *Buffer* T4 DNA ligasa, y una mezcla de vector-inserto, en una relación molar 1 a 3 en un volumen final de 10 μ L. La reacción se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente, la reacción de ligación se usó para transformar células hospederas de *Escherichia coli* XL1-Blue (quimiocompetentes). Las transformaciones se incubaron en medio Luria Broth (LB) sólido con 100 μ g/mL de ampicilina y 30 μ g/mL de X-gal a 37°C durante 16 h.

La presencia de colonias azules y blancas de la transformación, permitió elegir colonias blancas que eran positivas para la presencia de un inserto. Cada una de las colonias positivas se crecieron en 3 mL de medio líquido LB con 100 μ g/mL de ampicilina, luego de 16 h de incubación se purificaron los plásmidos con un *Kit* de purificación de plásmido (Roche®). Los plásmidos purificados se evaluaron por digestión con *EcoR*I para aquellos que llevaran el inserto de serinoproteasa y de PLA2. Para la detección de la presencia de metaloproteasa se hizo análisis por PCR de colonias.

Tanto los plásmidos que mostraron la liberación del inserto del tamaño esperado, como las colonias que mostraron amplificación de secuencia de tamaño esperados, se enviaron a secuenciación del DNA plasmídico, utilizando los oligonucleótidos (figura 4):

M13 Forward (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3')
M13 Reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')

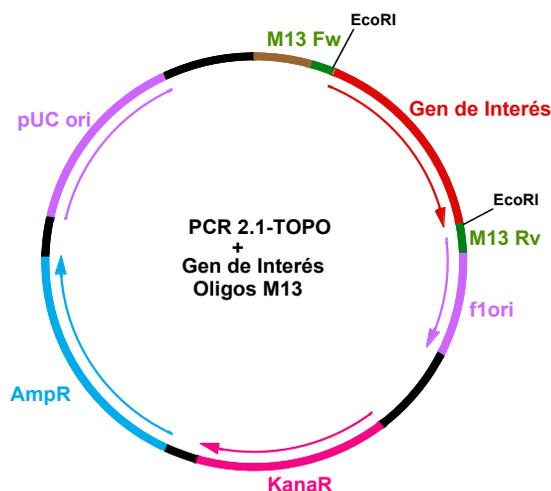


Figura 4. Vector de clonación en el que se muestran sitios como: Gen de interés, genes de resistencia y sitios de unión de oligonucleótidos para secuenciación, entre otros.

5.2.6. Diseño de oligos para la subclonación en un vector de expresión

Se diseñaron oligonucleótidos para cada uno de los genes tanto de las proteasas: serinoproteasa y metaloproteasa, así como para la PLA2, para generar construcciones dirigidas al vector de expresión pQE-30, con los sitios de restricción *Bam*HI y la secuencia que codifica para el factor de corte por la proteasa Factor Xa en el extremo 5' y el sitio de restricción *Pst*I y un par de codones de paro en el extremo 3' (Tabla 5).

Tabla 5. Oligonucleótidos para amplificar los genes de serinoproteasa, metaloproteasa y PLA2 con sitios de restricción, para la subclonación en el vector de expresión pQE-30

| Nombre Oligonucleótido | Secuencia de Oligonucleótidos (5' → 3') | Temperatura °C |
|--------------------------------|--|----------------|
| Oligo Fw BamHI-FXa-Serino | GGATCCATCGAGGGAAGGGTCATTGGAGGTGATGAATGT _(39nt) | 60 |
| Oligo Rv Stop-Stop-PstI-Serino | CTGCAGTTACTACGGGGGGCAGGTCACATC _(30nt) | 62 |
| Oligo Fw BamHI-FXa-Metalo | GGATCCATCGAGGGAAGGGGAACAACAAAGATATAACCCC _(39nt) | 56 |
| Oligo Rv Metalo | CTGCAGTTACTAGGCATCGAAGCGATTTCT _(30nt) | 54 |
| Oligo Fw BamHI-FXa-PLA2 | GGATCCATCGAGGGAAGGCACCTGATGCAATTTGAG _(36nt) | 60 |
| Oligo Rv Stop-Stop-PstI- PLA2 | CTGCAGTTACTAGCATGGCTCTGACTCCTC _(30nt) | 58 |

5.2.7. Amplificación por PCR para la adición de los sitios de restricción

Con el fin de obtener las construcciones de cada uno de los genes de proteasas y fosfolipasa en el vector pQE-30 se realizó la amplificación por PCR con los oligonucleótidos correspondientes. Las condiciones para cada una de las construcciones fueron las siguientes:

- Gen de la serinoproteasa: 20 picomoles/ μL de cada uno de los oligonucleótidos (ver Tabla 5), 0.2 mM dNTPs, 1x *Buffer* de la Taq polimerasa adicionado con magnesio, 1.25 unidades/50 μL de reacción de Taq polimerasa, y 50 ng de plásmido pTOPO-Serinoproteasa (de secuencia confirmada). La mezcla de PCR se sometió a 30 ciclos de desnaturalización (1 min, 94°C), hibridación (2 min, 60°C) y elongación (2 min, 72°C).
- Gen de la metaloproteasa: 20 picomoles/ μL de cada uno de los oligonucleótidos (ver Tabla 5), 0.2 mM dNTPs, 1x *Buffer* de la Taq polimerasa adicionado con magnesio, 1.25 unidades/50 μL de reacción de Taq polimerasa y 50 ng de plásmido pTOPO-Metaloproteasa (de secuencia confirmada). La mezcla de PCR se sometió a 30 ciclos de desnaturalización (1 min, 94°C), hibridación (2 min, 56°C) y elongación (2 min, 72°C).
- Gen de la PLA2: 20 picomoles/ μL de cada uno de los oligonucleótidos (ver Tabla 5), 0.2 mM dNTPs, 1x *Buffer* de la Taq polimerasa adicionado con magnesio, 1.25 unidades/50 μL de reacción de Taq polimerasa, y 50 ng de plásmido pTOPO-PLA2 (de secuencia confirmada). La mezcla de PCR se sometió a 30 ciclos de desnaturalización (1 min, 94°C), hibridación (2 min, 58°C) y elongación (2 min, 72°C).

5.2.8. Subclonación de genes con sitios de restricción en vector pCR2.1-TOPO

Cada gen amplificado por la reacción de PCR se purificó de un gel preparativo de agarosa al 1%, usando el *Kit* de purificación de productos de PCR (Roche). Ya con los insertos purificados, se procedió a la ligación en el vector de clonación plásmido TOPO 2.1 (pCR®2.1-TOPO®, invitrogen™) usando las condiciones y procedimientos de corroboración de secuencias anteriormente mencionadas (apartado 5.2.5).

5.2.9. Construcción del vector de expresión pQE-30 con los genes de serinoproteasa, metaloproteasa y fosfolipasa A2

Los plásmidos de clonación p-Topo que contenían los genes de serinoproteasa, metaloproteasa y PLA2, así como el vector de expresión pQE-30 (Figura 5), se digirieron usando las enzimas de restricción *Bam*HI para el extremo 5' y *Pst*I para el extremo 3', de tal forma que se obtuvieran extremos similares tanto en el vector como en los insertos, de manera que posteriormente pudieran ser ligados.

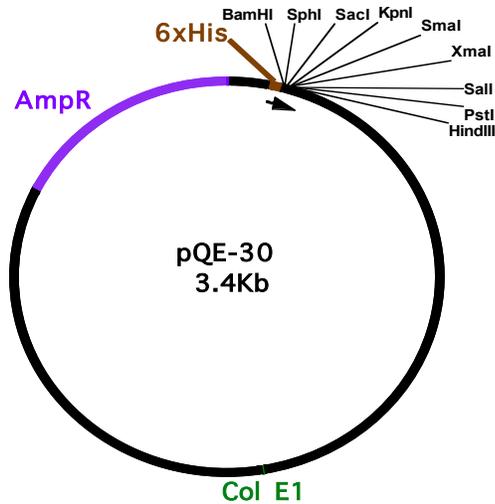


Figura 5. Vector de expresión pQE-30, en donde se resaltan sus características: resistencia a ampicilina, etiqueta de histidinas, sitio de multiclonación.

Para 16 μ L de reacción de ligación, se usaron 5U de la enzima T4 DNA ligasa, 1x del *Buffer* T4 DNA ligasa, y una mezcla conformada por el inserto y el vector, en una relación molar 5 a 1. La reacción se llevó a cabo a una temperatura de 16°C por 16 h. Pasado el tiempo de incubación, la reacción de ligación se usó para transformar en células hospederas de mantenimiento (quimiocompetentes) XL1-Blue de *Escherichia coli*. Las transformaciones se sembraron en medio LB sólido con 100 μ g/mL de ampicilina y se incubaron a 37°C durante 16 h. Las clonas obtenidas de la transformación fueron analizadas por PCR de colonia y aquellas que mostraran un tamaño de inserto similar al esperado, se crecieron en 3 mL de medio líquido LB con 100 μ g/mL de ampicilina, se les extrajo el plásmido que finalmente se verificó por secuencia.

5.3. Expresión heteróloga de la Serinoproteasa, Metaloproteasa y PLA2

Los plásmidos de secuencia corroborada con cada uno de los genes (serinoproteasa, metaloproteasa y PLA2), se usaron para transformar la cepa *E. coli* Origami y M15 [pREP4].

Se eligió una colonia producto de la transformación de cada uno de los genes de trabajo y se inoculó en 25 mL de LB con 100 μ g/mL de ampicilina + 30 μ g/mL de kanamicina, se incubó a 37°C por 16 horas y 180 rpm. De este cultivo se tomaron 10 mL y se adicionaron a 1 L de LB con los mismos antibióticos correspondientes, y se incubó por 2 horas a 37°C y 180 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.8 U (600 nm). En este punto se realizó la inducción de la expresión con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) en las siguientes condiciones:

- *E. coli* Origami/pQE30:serinoproteasa: 0.5 mM IPTG a 16°C durante 24 h y 180 rpm
- *E. coli* Origami/pQE30:metaloproteasa: 1 mM IPTG a 30°C durante 6 h y 180 rpm
- *E. coli* M15 [pREP4]/pQE30:PLA2: 1 mM IPTG a 16°C durante 24 h y 180 rpm.

Después de la inducción de cada cultivo las células fueron cosechadas por centrifugación a 8,000 rpm durante 20 minutos a 4°C en un rotor JA-14 (Modelo J2-21 Centrifuga, Beckman).

Para el caso de la serinoproteasa y PLA2, el rompimiento celular se realizó por un proceso químico, por medio de una lisis celular usando con lisozima a 200 µg/mL, Benzonasa 25 U/mL y el buffer “Bugbuster” 1X (Novagen), que es una mezcla de detergentes no iónicos capaces de perforar la pared celular sin desnaturalizar la proteína soluble. Las células se incubaron con la mezcla por 30 minutos a temperatura ambiente en agitación, posteriormente la fracción soluble y los cuerpos de inclusión se separaron por centrifugación a 10,000 rpm durante 20 min a 4°C en un rotor JA-20 (Modelo J2-21 Centrifuga, Beckman).

Para la metaloproteasa el rompimiento celular se realizó por un proceso mecánico, con el equipo “One Shot Cell Disrupters” (Constant Systems ^{LTD}) que está diseñado para romper selectivamente la pared celular permitiendo que los componentes intracelulares sean liberados y colectados. La presión ejercida sobre las células fue de 30 kpsi. Las fracciones solubles e insolubles se separaron por centrifugación a 8,000 rpm durante 20 min a 4°C en un rotor JA-20 (Modelo J2-21 Centrifuga, Beckman).

5.4. Proceso de purificación de las proteínas expresadas en la fracción insoluble

Debido a que las proteínas expresadas se encontraron en la fracción insoluble en forma de cuerpos de inclusión, se realizó el procedimiento descrito a continuación para la solubilización de las proteínas de las tres expresiones: en una solución 6M cloruro de guanidinio, 50 mM de Tris-HCl pH8, se incubó la fracción insoluble durante 2 h; la fracción insoluble; posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 min a 4°C en un rotor JA-20 (Modelo J2-21 Centrifuga, Beckman).

Una vez solubilizados los cuerpos de inclusión se purificaron mediante una cromatografía de afinidad a níquel (Ni-NTA, QIAGEN). El principio se basa en la interacción de la etiqueta de histidinas de la proteína expresada con los cationes divalentes del ion Ni^{+2} , en dos de sus seis puntos de coordinación los cuales se encuentran inmovilizados en la resina de la columna de afinidad. Las proteínas que presentan un pegado inespecífico se eliminan por diferentes lavados y las proteínas recombinantes de interés se eluyeron con Imidazol, reactivo que entra en competencia con las histidinas liberando así la proteína recombinante de interés ⁶⁶.

Para la purificación de las proteínas se utilizó una columna de 12 mL (Supelco) en donde se agregaron 4 mL de resina Ni-NTA, que se equilibró con 5 volúmenes de columna de 50 mM Tris-HCl pH 8 con 6 M cloruro de guanidinio (GndCl), una vez equilibrada, los cuerpos de inclusión solubilizados se dejaron pasar por la columna y se recirculó dos veces para asegurar que las histidinas fusionadas a las proteínas recombinantes de interés se unieran al níquel. La columna se sometió a dos lavados para remover el pegado inespecífico; el primer lavado se realizó con 20 mL de 50 mM Tris-HCl, 6 M GndCl pH 8, el segundo lavado se realizó con 20 mL de 50 mM Tris-HCl, 6 M GndCl, 30 mM de Imidazol pH 8. Finalmente, para obtener a las proteínas recombinantes se eluyó con 10 mL de 50 mM Tris-HCl, 6 M GndCl, 400 mM de Imidazol pH 8. Tanto en los lavados como en la elución, las muestras se recolectaron en fracciones de 1 mL. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), para el caso de las fracciones de serinoproteasa y metaloproteasa el gel separador fue al 12% y para el caso de las fracciones de la PLA2 el gel separador fue al 15%.

5.5. Plegamiento de proteínas

Una vez obtenidas las proteínas por purificación en NiNTA, se llevó a cabo el plegamiento *in vitro* en condiciones controladas. Las fracciones de la purificación se juntaron y se llevaron a una concentración final de 2 M de cloruro de guanidinio, en 50 mM de Tris-HCl pH 8, 10 mM L-Glutatión reducido (GSH) y 1 mM L-Glutatión oxidado (GSSG). La concentración final de imidazol fue de 0.133 M, y se incubó por 7 días a 4°C. Posteriormente se purificaron por HPLC-RP en una columna analítica C₄, y en las mismas condiciones mencionadas en el punto 5.1.3.

5.6. Cambios en el gen de serinoproteasa.

Debido a que el gen que codifica a la serinoproteasa obtenida en esta investigación presentó una asparagina en posición 43 en lugar de una histidina (aminoácido crucial para la actividad catalítica), se planteó realizar una mutagénesis sitio dirigida por PCR con la metodología del Megaoligo o "*Megaprimer*"⁶⁷ para reemplazar a dicha asparagina 43 por una histidina.

La mutagénesis se dividió en dos etapas; en la primera se amplificó un segmento del gen de la serinoproteasa con el oligonucleótido mutagénico RvH43NSerino más el oligonucleótido directo FwpQE-30, para generar el megaoligonucleótido H43NSerino; en la segunda etapa se utilizó el megaoligo H43NSerino y el oligonucleótido reverso H43NSerino (Tabla 6). Esta última amplificación dio como resultado el gen con la mutación deseada. La mutagénesis se realizó de acuerdo al esquema de la Figura 6.

Tabla 6. Oligonucleótidos para amplificar el gen de la serinoproteasa con la triada catalítica correcta, por medio de la técnica del *megaprimer*

| Nombre Oligonucleótido | Secuencia de Oligonucleótidos (5' → 3') | Tm °C |
|--------------------------------|--|-------|
| Oligo FwpQE-30 | GGATCGCATCACCATCACCATCAC _(24nt) | 62 |
| Oligo RvH43NSerino | TTTCCTGTCACAATGTGCAGC _(21nt) | 62 |
| Megaoligo H43N Serino | GGATCCATCGAGGGAAGGGTCATTGGAGGTGATGAATGTA ACATAAATGAACATCCTTTCCTTGTAGCCTTGTACACCTC | - |
| Oligo Rv Stop-Stop-Pst1-Serino | CTGCAGTTACTACGGGGGGCAGGTCACATC _(30nt) | 62 |

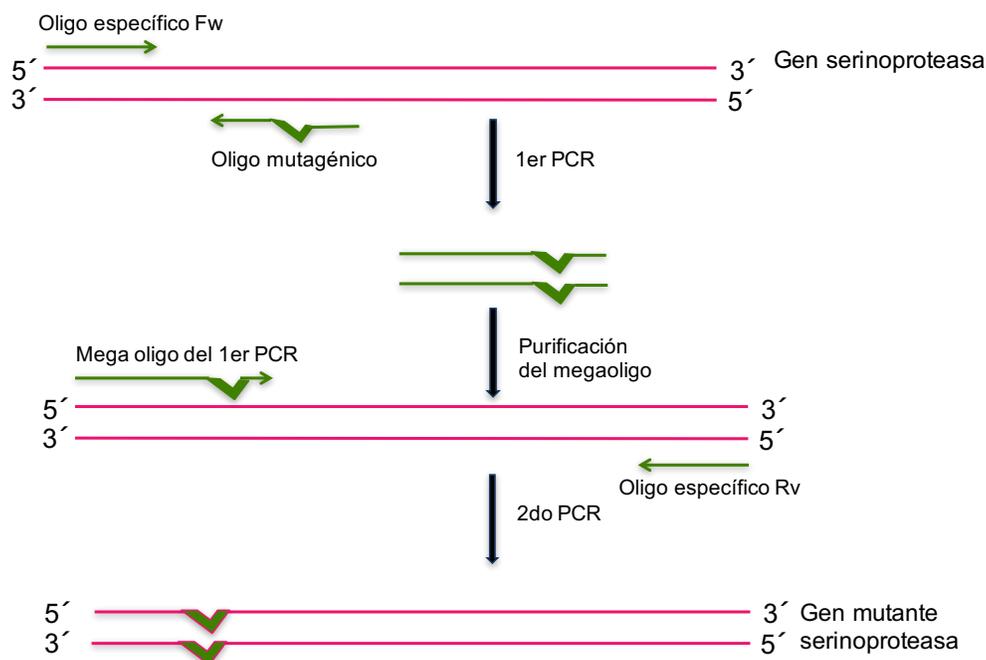


Figura 6. Esquema de la generación de las variantes por medio de mutaciones sitio dirigidas, con la metodología del Megaoligo o "*Megaprimer*".

Para los procesos de clonación, subclonación y expresión se continuó con la misma metodología mencionada en los puntos anteriores.

5.7. Librería de cDNA de glándulas venenosas de *B. ammodytoides*

Como se ha mencionado anteriormente, los venenos de las serpientes son una fuente rica de compuestos farmacológicamente activos y algunos han sido propuestos como candidatos para el tratamiento de algunas enfermedades o como pruebas diagnósticas. En este trabajo se analizan componentes que presenten tales características, por lo que para ampliar la búsqueda de moléculas bioactivas se realizó la construcción de una librería de cDNA, cuya finalidad es identificar nuevas secuencias de proteínas como posibles candidatos para la generación de agentes terapéuticos en serpientes poco estudiadas como es *B. ammodytoides*.

Para la construcción de la biblioteca de cDNA, se utilizó el mismo RNA del punto 5.2.1, usando el kit de construcción de la biblioteca de cDNA Creator SMART (CLONTECH Lab., Palo Alto, CA). En la síntesis de la primera cadena de cDNA, se utilizaron los oligonucleótidos del kit:

SMART IV (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG-3') y CDS III / 3' PCR (5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-d (T) 30N-1N-3')

Para la amplificación de cDNA se utilizaron los oligonucleótidos:

5' PCR Primer (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') CDS III / 3' PCR Primer.

En ambas reacciones, se siguieron las condiciones sugeridas por el fabricante. Luego de la amplificación, los sitios de restricción *Sfi*I (denominados sitios *Sfi*IA y *Sfi*IB) flanquean las moléculas de cDNA resultantes, permitiendo la clonación direccional. Después de la digestión con *Sfi*I, el cDNA se fraccionó en columnas CHROMA SPIN-400 lo cual ayuda a enriquecer los fragmentos de tamaño medio que corresponden al tamaño esperado de la codificación de péptidos de RNAs mensajeros. Las fracciones seleccionadas se agruparon y se concentraron por precipitación con etanol. El cDNA se ligó al plásmido pDNR-LIB (Figura 7) a través de los sitios *Sfi*IA y *Sfi*IB, y la ligación se usó para transformar en células de *Escherichia coli*-XL1Blue electrocompetentes.

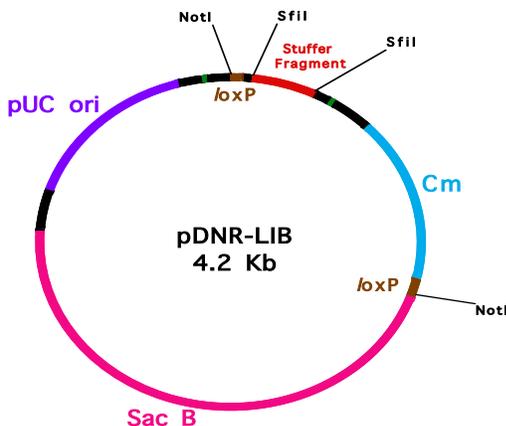


Figura 7. Esquema del vector de clonación pDNR-LIB, usado para la construcción de librerías de cDNA mediante la tecnología SMART.

5.8. Evaluación de actividades enzimáticas *in vitro*

5.8.1. Ensayo de actividad de fosfolipasa en placa rodamina-yema de huevo-agar.

Para visualizar la actividad de fosfolipasa, se usan emulsiones de yema de huevo de gallina. Dicha emulsión se mezcla en agar y rodamina y se deposita en una placa. Posteriormente sobre la placa se pone la muestra a analizar y si ésta contiene fosfolipasa, se observan zonas de hidrólisis producto de la acción enzimática sobre los fosfolípidos de la yema de huevo.

A continuación, se enuncia el procedimiento para el desarrollo de la prueba:

- 1.- Obtener una yema de huevo, completamente libre de la clara.
- 2.- Pesar y diluir la yema con 0.1 M Tris-HCl pH 8; 5 mM CaCl₂; 0.5% Triton X-100 en un volumen de 150 mL, para tener una concentración final de la yema del 20% (P/V) pH 8.
- 3.- Mezclar con un agitador magnético durante 10 min y se centrifugar a baja velocidad (1,500 rpm) por 5 min. Finalmente se tomar solo el sobrenadante.

Para preparar la placa de agarosa con rodamina-yema:

- 1.- Fundir 0.1 g de agarosa en 10 mL de 0.2 M Tris/HCl pH 8.
- 2.- Añadir 1 mL de 10 mM CaCl₂ a la agarosa
- 3.- Adicionar 8 mL de Rodamina 6G al 0.1%
- 4.- Adicionar 100 µL Triton X-100
- 5.- Finalmente añadir 2 mL del sobrenadante de yema de huevo preparada previamente
- 6.- Adicionar toda la mezcla a una caja Petri. Dejar gelificar la agarosa y hacer pozos para depositar en ellos las muestras.

Para la prueba de fosfolipasa, se cuantificaron 2 µg, tanto venenos completos como fracciones y se aplicaron en los pozos correspondientes. Como control positivo se utilizó el veneno rico en fosfolipasas de *Micrurus fulvius* (1 µg). Como control negativo se utilizó buffer 20 mM de acetato de amonio pH 4.7.

5.8.2. Ensayo de actividad específica de fosfolipasa A2

Se determinó la actividad específica de fosfolipasa A2 por medio de ensayo titulométrico utilizando como sustrato solución de yema de huevo al 10% (NaCl 0.1 M, CaCl 0.01 M, 0.1% Tritón X-100) y NaOH 50 mM para titular. La actividad se reporta en unidades específicas definidas como µmolas de NaOH consumidas por minuto por miligramo de veneno. Las µmolas de NaOH consumidas en el ensayo son directamente proporcionales a la cantidad de ácidos grasos liberados por acción de las PLA del veneno.

5.8.3. Zimograma con gelatina de actividad de proteasa

EL zimograma es una técnica electroforética que permite observar actividad de enzimas. Se realiza con poliacrilamida y a diferencia de las electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) se trata de utilizar condiciones suaves (sin agentes reductores) para evitar la pérdida de actividad de las enzimas estudiadas ⁶⁸.

La polimerización de la poliacrilamida se realiza en presencia de gelatina soluble. De esta manera el gel resultante contendrá gelatina (colágeno desnaturizado). Luego de realizar la corrida electroforética de las muestras el gel se lava en una solución con Tritón X100 y se incuba en un buffer apropiado que favorece la actividad de las proteasas. El resultado de este tipo de geles, es que en la zona donde se ubicó una proteasa la gelatina habrá sido degradada. Esta degradación se revela tiñendo el gel con colorantes que tengan afinidad por proteínas, observándose una zona blanca donde hubo degradación ⁶⁹.

Para ver actividad de proteasa en Zimograma se utilizó el sistema de electroforesis descrito por Laemmli, 1970, modificado sólo por la presencia de gelatina. La gelatina se copolimeriza con el gel separador a una concentración final de 1.5 mg/mL. Después de la electroforesis en las que se corrieron las diferentes muestras de proteínas el gel se procesó de la siguiente:

- 1.- Incubar el gel en 50 mL de buffer Tris/HCl a 0.1 M pH 8, 5% Tritón X-100, por 1 hora.
- 2.- Incubar el gel en 50 mL de buffer Tris/HCl a 0.1 M pH 8, 0.05% Tritón X-100, por 1 hora.
- 3.- Incubar el gel en 50 mL de buffer Tris/HCl a 0.1 M pH 8 por 1 hora.
- 4.- Incubar el gel toda la noche en cámara húmeda.
- 5.- Teñir el gel con azul brillante de coomassie 250 R por 1 hora.
- 6.- Finalmente destiñir el gel con una solución de ácido acético (10 %) e isopropanol (10%).

Cada uno de estos pasos debe realizarse en agitación rotatoria a temperatura ambiente.

Para la prueba de zimograma se usó veneno completo de *Bothrops ammodytoides* (10 µg/pozo) y las fracciones obtenidas de las diferentes purificaciones (5 µg/pozo); como control negativo se usó veneno completo rico en proteasas de *Bothrops asper* (10 µg/pozo).

5.8.4. Actividad Fibrinogenolítica en SDS-PAGE

Para determinar actividad fibrinogenolítica de serinoproteasa en gel SDS-PAGE, se utilizó fibrinógeno de plasma humano, a una concentración de 400 µg totales adicionado con CaCl₂ 100 mM, conteniendo 20 µg de serinoproteasa nativa y 100 µg de serinoproteasa recombinante, obtenida tanto de fracción soluble como de cuerpos de inclusión. Las muestras se incubaron a 37°C por 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 24 h. El perfil de degradación del fibrinógeno por acción de las serinoproteasas se observó en un gel SDS-PAGE 12%.

5.9. Evaluación de actividades biológicas

5.9.1. Actividad Coagulante en plasma sanguíneo humano

La actividad coagulante de las enzimas se puede determinar sobre el plasma sanguíneo, agregando diversas cantidades de veneno a plasma. El resultado de la acción de estas enzimas es la coagulación del plasma. La actividad se determina midiendo los tiempos de coagulación del plasma después de agregar diversas concentraciones de veneno. La dosis coagulante mínima sobre plasma (DCM-P) corresponde a la concentración de veneno que induce la coagulación en 60 segundos, basado en el método de coagulación de Lee-White⁷⁰.

Las condiciones para el desarrollo de la prueba son las siguientes:

En tubos de ensayo de vidrio de 7 cm se colocan 0.2 mL de plasma, que se incuban durante 3-5 min en baño maría a 37°C. A continuación, se adiciona la proteína a evaluar en diferentes concentraciones y en un volumen final de 0.1 mL. Finalmente, se monitorea el tiempo en que se forma el coágulo. La prueba se realiza por triplicado.

Para el control positivo se utilizó veneno completo de *B. asper* (5 µg) y como control negativo se usó PBS1x.

5.9.2. Actividad Antimicrobiana por difusión radial en placa.

Para determinar la actividad antibacteriana de la PLA₂, se llevaron a cabo ensayos de susceptibilidad bacteriana, mediante difusión radial en placa de agar. En los ensayos se utilizaron las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. El desarrollo del procedimiento implica realizar un pre-inoculo de cada una de las cepas, en el medio de cultivo Mueller-Hinton (DIFCO), incubando a 37°C por 18 a 24 h a 180 rpm. Posteriormente los cultivos se diluyen con Mueller-Hinton hasta a una densidad

óptica 0.08 U (600nm). En este punto se toma 1 mL de la solución celular y se mezcla con 19 mL de medio de cultivo Mueller-Hinton con agar, y la mezcla se deposita en una caja Petri. Una vez gelificado se adicionan las muestras a diferentes concentraciones en un volumen de 5 μ L; se incuban por un periodo de 24 h. Como control positivo se usó ampicilina a una concentración de 2.4 μ M.

5.10. Actividades inmunológicas

5.10.1. Determinación del reconocimiento inmunoquímico mediante ensayos por Western blot.

El Western blot es una técnica que combina la resolución de la electroforesis en gel con la especificidad de la detección inmunoquímica. En este tipo de ensayo el veneno es electro transferido a una membrana de nitrocelulosa y posteriormente por medio de anticuerpos, que están acoplados a una enzima que degrada al sustrato adicionado, se genera una señal que indica la presencia de los componentes reconocidos por los anticuerpos⁷¹. Por medio de esta técnica se podrán observar las bandas proteicas reconocidas por los anticuerpos y/o antivenenos. Los reactivos y soluciones del Western blot se encuentran en el Apéndice I.

El procedimiento para el reconocimiento inmunoquímico es el siguiente:

Las proteínas a evaluar se separan en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con corriente eléctrica 100 Volts. Al terminar la electroforesis, se saca de la cámara de electroforesis y se procede a transferirlo a una membrana de nitrocelulosa en una cámara semi-seca (Owl) de la siguiente manera:

- 1.- Poner 3 papeles filtro (3M) del tamaño del gel sobre la cámara.
- 2.- Poner el gel sobre los papeles filtro.
- 3.- Poner luego la membrana de nitrocelulosa y
- 4.- Finalmente, poner otros 3 papeles filtro.

Todo lo anterior debe estar previamente humedecido en buffer de transferencia.

- 5.- Cerrar la cámara y aplicar corriente constante a 400 mAmps, durante 1 h.

Una vez terminada la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, se siguen los siguientes pasos:

- 6.- Sumergir la membrana en solución de bloqueo: TBST 1X + 5 gr. de leche, durante 2 h en agitación
- 7.- Lavar 3 veces con TBST 1X. Cada lavado debe ser de 10 min.
- 8.- Incubar la membrana con el 1er anticuerpo (1 μ g/ml) en TBST 1X + 0.05% leche, durante 1 h.
- 9.- Lavar 3 veces con TBST 1X. Cada lavado debe ser de 10 min.

- 10.- Incubar la membrana con el 2do anticuerpo (acoplado a una enzima fosfatasa alcalina) en TBST 1X en una dilución 1:1000, durante 1 h.
- 11.- Lavar 3 veces con TBST 1X. Cada lavado debe ser de 10 min.
12. Revelar con el sustrato del kit BCIP/NBT 1:1 (Invitrogen).

Las soluciones del SDS-PAGE y Western blot se encuentran descritas en el Apéndice I al final del texto.

5.10.2. Cuantificación del nivel de reconocimiento por inmunoensayo enzimático ligado a enzima (ELISA)

La técnica de ELISA se basa en la detección de un antígeno inmovilizado en una fase sólida, mediante anticuerpos acoplados a una enzima, y que en el momento de adicionar el sustrato específico, se genera una señal (color) cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro (Abs 405 nm) ⁷². Por medio de esta técnica se cuantifica el nivel de reconocimiento de anticuerpos y/o antivenenos hacia los venenos de varias especies del género *Bothrops*, así como de las proteínas recombinantes obtenidas a partir de la información genética de la serpiente *B. ammodytoides*. El título de anticuerpo se define como la cantidad de antiveneno necesaria para alcanzar la mitad de la respuesta máxima (Abs 405 nm). Los reactivos y soluciones del ELISA se encuentran en el Apéndice I al final del texto.

Protocolo para la realización del ensayo:

- 1.- Sensibilizar placas de ELISA de 96 pozos a una concentración de 5 µg/mL de veneno o proteína recombinante reconstituido en buffer carbonato de sodio 0.1 M, pH 9.5, hasta la columna 11. Incubar toda la noche a 4°C.
- 2.- Lavar los pozos 3 veces con 200 µL/pozo de solución de lavado para ELISA.
- 3.- Bloquear las uniones inespecíficas con 150 µL de solución de bloqueo para ELISA. Incubar 2 h a temperatura ambiente o 4°C toda la noche.
- 4.- Colocar en la columna 1, 150 µl de antivenenos y/o anticuerpos a una dilución 1:10 en buffer de reacción para ELISA.
- 6.- Adicionar 100 µL/pozo de la solución de reacción para ELISA de la columna 2 a la 12 y realizar diluciones seriadas 1:3 de los antivenenos y/o anticuerpos hasta la columna 10, dejando la 11 y 12 como controles. Incubar 1 h a temperatura ambiente.
- 7.- Lavar 3 veces con 200 µL/pozo de solución de lavado para ELISA.
- 8.- Adicionar 100 µL/pozo del segundo anticuerpo IgG de caballo conjugado a la enzima peroxidasa diluido 1:1000 en buffer de reacción para ELISA; incubar 1 h a temperatura ambiente.
- 9.- Revelar con 100 µL/pozo de sustrato ABTS; incubar 10 min a temperatura ambiente.
- 10.- Detener la reacción con 25 µL/pozo de 20% SDS.
- 11.- Leer la absorbancia en un lector de ELISA a 405 nm.

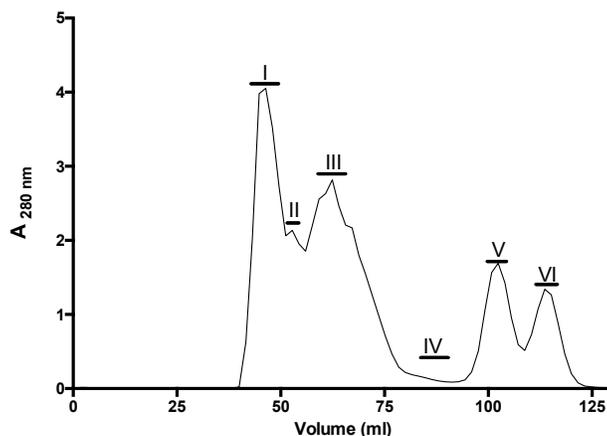
6. Resultados y Discusión

6.1. Caracterización bioquímica de los componentes del veneno de *B. ammodytoides*

6.1.1. Fraccionamiento del veneno completo de *B. ammodytoides* por cromatografía de exclusión molecular en gel

Para separar los componentes principales del veneno de *B. ammodytoides* en base a su masa molecular, se utilizó una cromatografía de exclusión molecular (Figura 8A). Los componentes de mayor masa molecular eluyen primero y los de menor masa al final.

A)



B)

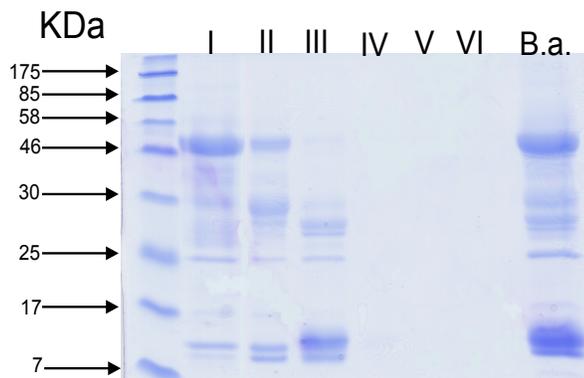


Figura 8. Cromatograma de las fracciones obtenidas por filtración en gel Sephadex G-75 (200 cm x 1 cm). A) Se aplicaron 100 mg totales del veneno de *B. ammodytoides* (B.a.). Se utilizó como fase móvil 20 mM acetato de amonio, pH 4.7. El flujo fue de 15 mL/h. Las fracciones se colectaron de 2 mL y se midió absorbancia a 280 nm. B) SDS-PAGE 12.5% mostrando las proteínas presentes en cada fracción obtenida en A). Se observan seis fracciones marcadas con números romanos.

Para conocer la complejidad y la masa molecular aparente de cada fracción obtenida por filtración en gel, se realizó un gel de poliacrilamida en presencia de SDS (Figura 8B). El porcentaje del gel fue de 12.5%, se emplearon condiciones reductoras y desnaturalizantes, se cargaron 50 µg/pozo. En el primer carril se muestran los marcadores moleculares (Bio Labs). Los carriles siguientes pertenecen a cada fracción obtenida de la filtración, se indica con número romano la fracción correspondiente. En el carril I, II y III se muestran componentes de masa molecular alto y mediano; se ha demostrado por estudios proteómicos que los componentes de mayor masa molecular en los venenos de los vipéridos son, principalmente enzimas hidrolíticas. Se observan bandas de masa molecular aparente alrededor de 50 kDa, las cuales podrían corresponder a metaloproteasas de tipo PIII (43-85 kDa). En la zona de entre 20-40 kDa puede que se encuentren metaloproteasas del tipo PII (25-30 kDa)¹⁹, serinoproteasas (23-54 kDa)⁷³. Las bandas que se muestran con un masa molecular aparente de 13 kDa, pueden ser fosfolipasas ya que estas presentan entre 13 y 15 kDa³².

Los carriles marcados con IV, V y VI, aparentemente no se observan bandas, esto puede deberse a que las fracciones son de masas moleculares bajas, ya que en el cromatograma estas fracciones salen al final, lo que corresponden a tamaños moleculares pequeños. En los venenos de la familia Viperidae se han reportado componentes orgánicos como: nucleótidos, citrato, aminas libres, entre otros de naturaleza no proteínica y de masa molecular baja⁷⁴.

6.1.2. Ensayo de actividad de fosfolipasa en placa con las fracciones de la exclusión molecular.

Para determinar que fracción contiene a la fosfolipasa, se realizó una prueba cualitativa de actividad de fosfolipasa, en una placa de agarosa con yema de huevo y rodamina, ensayo descrito en metodología en apartado 5.8.1.

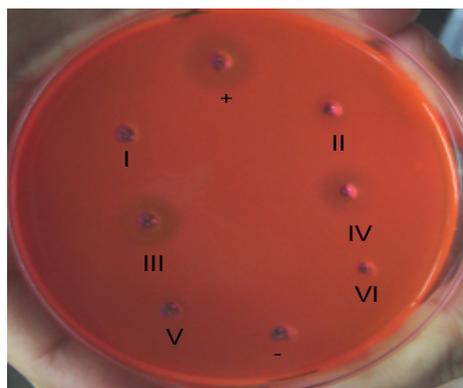


Figura 9. Actividad de fosfolipasa en placa de agar-yema de huevo rodamina, de las fracciones obtenidas de filtración en gel del veneno de *B. ammodytoides*. Fracciones I, II, III, IV, V y VI, de Filtación en gel Sephadex G75. Control positivo (+) veneno completo de *Micrurus fulvius* 1 µg/pozo. Control negativo (-) acetato de amonio 0.02M pH 4.7.

En la figura 9, se muestra que las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular en gel, que presentan actividad de fosfolipasa fueron la III y la IV, aunque la IV puede ser un remanente de la fracción III. Se depositaron 15 μg /pozo de cada una de las fracciones obtenidas por filtración en gel en una placa de agarosa con yema de huevo. Como control positivo (+) se utilizó veneno completo de *Micrurus fulvius* 1 μg /pozo. Como control negativo (-) se utilizó acetato de amonio 0.02M pH 4.7.

Se seleccionó yema de huevo como sustrato lipídico, debido a que tiene entre sus componentes lipídicos a la fosfatidilcolina, la cual es un elemento primordial de las bicapas lipídicas de las membranas celulares. Por lo tanto, la utilización de la yema de huevo como sustrato permitiría ver de manera directa la acción catalítica de la fosfolipasa. Tal acción estaría directamente relacionada con la posible desestabilización de membranas, lisis celular y liberación de lípidos que actúan como mensajeros secundarios.

6.1.3. Ensayo de actividad de proteasa en gel SDS-PAGE con las fracciones de la exclusión molecular

Para determinar que fracción obtenida por filtración en gel contenía la actividad de proteasa, se realizó un zimograma en gel SDS-PAGE 12.5%.

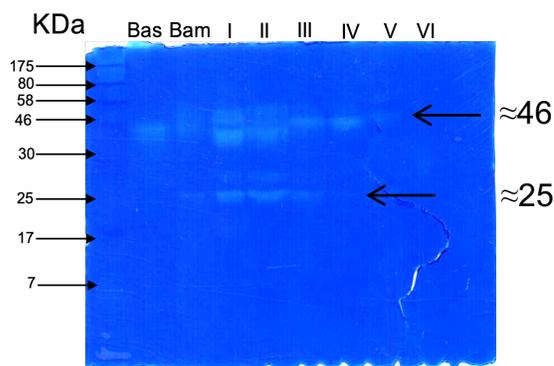


Figura 10. Zimograma (SDS-PAGE 12.5%) de actividad de proteasa. Fracciones obtenidas de filtración en gel con números romanos (I-VI). B.as. veneno completo de *Bothrops asper* (1 μg /pozo). B.am. veneno completo de *Bothrops ammodytoides* (1 μg /pozo). Fracciones de la I-VI (5 μg /pozo).

En la Figura 10 se observaron halos de degradación alrededor de 46 y 25 kDa, los cuales indican la presencia de proteasas en el veneno. El halo que se observa con una masa molecular aparente de 25 kDa de la Fracción I-III, por tamaño podría corresponder a serinoproteasas o metaloproteasas de tipo I¹⁹. El halo que se observa con una masa molecular aparente de 46 kDa de la Fracción I-V, por tamaño podría corresponder a metaloproteasas de tipo II y III⁷⁵.

Las enzimas hidrolíticas como serinoproteasas y metaloproteasas son algunos de los componentes principales que se han encontrado en venenos de serpientes del género *Bothrops* ⁷⁶, de tal forma que la presencia de los halos de degradación en el zimograma, pudieran corresponder a estos tipos de enzimas.

6.1.4. Repurificación de las fracciones obtenidas del veneno completo por cromatografía de fase reversa y análisis de fracciones.

La fracción FI de filtración en gel (Figura 8A), se eligió para ser repurificada por RP-HPLC, debido a que se encontró la presencia de actividad de proteasas, además de ser una de las fracciones más abundantes.

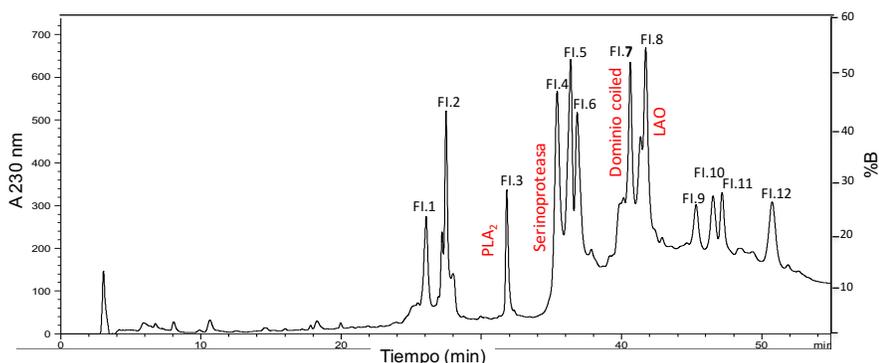


Figura 11. RP-HPLC de la fracción I de filtración en gel Sephadex G-75. Gradiente 10-60% en 50 min, flujo 1 mL/min, columna C₄ analítica 214TP54.

En la figura 11 se muestran 12 sub-fracciones, las cuales fueron procesadas mediante la degradación de Edman, y así obtener su secuencia N-terminal. Posteriormente mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), las secuencias N-terminal elucidadas mostraron identidad con secuencias reportadas en la base de datos *Protein Data Bank* (PDB) (Tabla 7).

Tabla 7. Secuencias N-terminal de fracciones obtenidas de RP-HPCL de la FI

| No. Fracción | N-terminal | masa molecular | Identidad |
|--------------|----------------------|----------------|----------------|
| FI.1 | ND | ND | ND |
| FI.2 | ND | ND | ND |
| FI.3 | HLMQXETLIKKIAGLS | ND | PLA2 |
| FI.4 | VIGGDECNVNEHRFL | ND | Serinoproteasa |
| FI.5 | ND | ND | ND |
| FI.6 | ND | ND | ND |
| FI.7 | AVIRNPLKFXXXK | 23,120 | Dominio coiled |
| FI.8 | GPPRNPLEEEFFDTDYEEFL | ND | LAO |
| FI.9 | ND | ND | ND |
| FI.10 | ND | ND | ND |
| FI.11 | ND | ND | ND |
| FI.12 | ND | ND | ND |

ND= No Determinada

6.1.5. Zimograma con gelatina para elucidar actividad de proteasas en las fracciones de la repurificación

Para determinar la masa molecular y la pureza de cada una de las fracciones obtenidas por HPLC (Figura 11) se realizó un gel SDS-PAGE al 12.5 % (Figura 12A), y un zimograma para determinar cuáles de las fracciones contenían a las proteasas (Figura 12B).

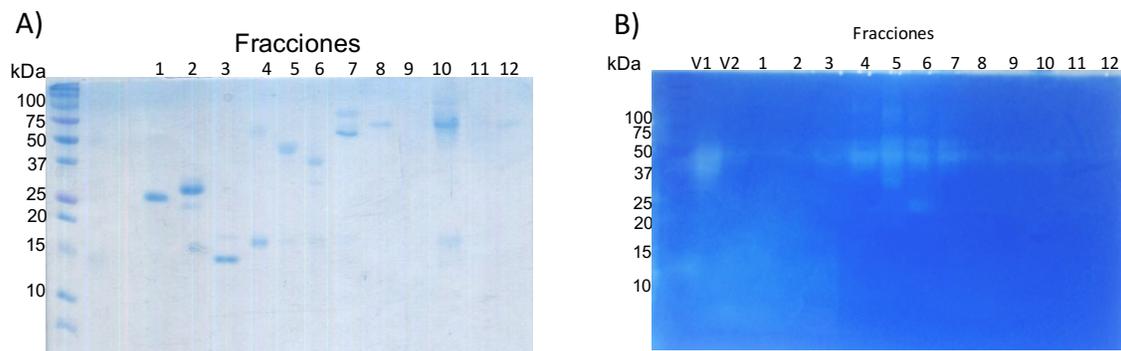


Figura 12. A) Gel SDS-PAGE 12.5 % y B) Zimograma de gelatina, de cada una de las fracciones obtenidas por RP-HPLC, fracciones de la 1-12 (5 $\mu\text{g/pozo}$). V1 control positivo veneno completo de *Bothrops asper* (1 $\mu\text{g/pozo}$). V2 veneno completo de *Bothrops ammodytoides* (1 $\mu\text{g/pozo}$).

Como puede observarse en el gel SDS-PAGE 12.5% (Figura 12A), las diferentes fracciones presentan más de una banda, por lo que sería necesario llevar a cabo más pasos de purificación. Sin embargo, las cantidades de proteína que se obtienen luego de realizar una purificación completa, están en el orden de nanogramos, lo cual dificultaría su posterior evaluación mediante ensayos biológicos. Aun así, se realizaron análisis de actividad de proteasas mediante un zimograma de gelatina, que se muestra en la figura 12B, en la que se muestran halos de degradación por arriba de 25 kDa en la mayoría de las fracciones. Los resultados de este experimento indicaron que dichas fracciones pueden presentar dos formas de proteasas del veneno, ya sea serinoproteasa o metaloproteasa.

6.1.6. Zimograma con gelatina para determinar inhibición de la actividad de las proteasas de las fracciones de la repurificación

Para determinar inhibición de metaloproteasas se utilizó un gel de actividad de proteasa en zimograma de gelatina (Figura 13), en el que se utilizaron 2 $\mu\text{g/pozo}$ de cada una de las 12 fracciones obtenidas del RP-HPLC (Figura 11). El zimograma se realizó en las mismas condiciones planteadas en el apartado 5.8.3.

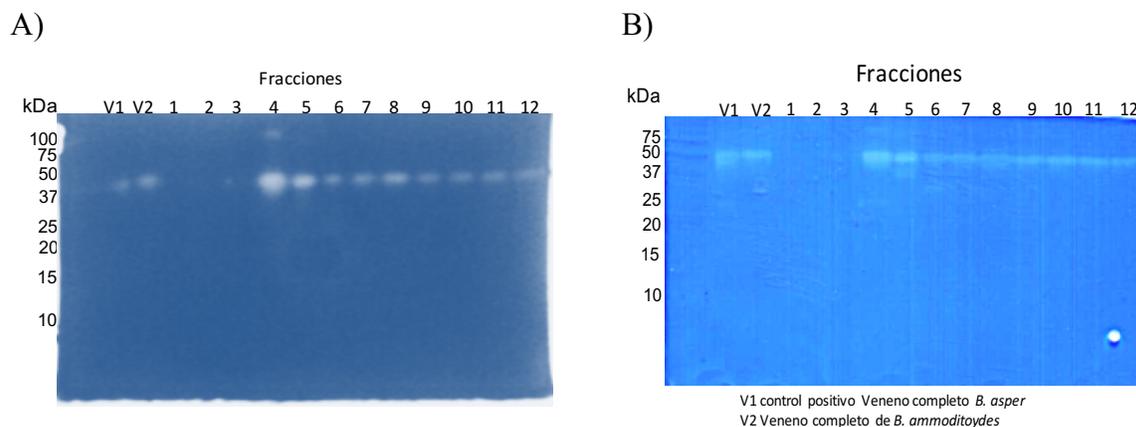


Figura 13. Zimograma de inhibición actividad de proteasa. A) Inhibición de actividad de metaloproteasa por EDTA; y B) Inhibición de actividad de serinoproteasa por PMSF. V1 control positivo veneno completo de *Bothrops asper* (1 μg /pozo). V2 veneno completo de *Bothrops ammoditoides* (1 μg /pozo).

Para inhibir de manera específica a las metaloproteasas, se adicionó a cada fracción, 10 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a pH 8, y se incubaron por 1 h a 37°C. El EDTA es una molécula que contiene 4 grupos carboxílicos ácidos con la capacidad de quelar metales. El EDTA inhibe las metaloproteasas por quelación del Zinc que requiere la enzima como cofactor ⁷⁷.

En la figura 13 A se muestra una ligera disminución de los halos de degradación en todas las fracciones analizadas, debido a que debe existir contaminación de las fracciones con serinoproteasas, ya que las fracciones no se obtuvieron completamente puras (Figura 11A).

Para inhibir de manera específica a las serinoproteasas, se adicionaron a cada fracción, 1 mM de fenil metil sulfonyl fluoruro (PMSF) y se incubaron por 1 h a 37 °C. El PMSF se une específicamente y de forma irreversible al residuo serina del sitio activo de la serinoproteasa, no uniéndose al resto de residuos de serina que presenta la proteína. La especificidad por este residuo se debe a las condiciones fisicoquímicas en las que éste se encuentra en el sitio activo de la proteína, lo cual impide la actividad enzimática ⁶.

De igual manera en la figura 13B se muestra una ligera disminución de los halos en todas las fracciones analizadas comparado con el zimograma de la Figura 11B, esto puede deberse a la existencia de contaminación de las fracciones con metaloproteasas.

Para confirmar que tipo de actividad proteasa contiene cada fracción se deberá realizar una purificación más exhaustiva, y así poder determinar que fracciones contienen metaloproteasas y cuales a serinoproteasas.

Sin embargo, en la fracción 6 del zimograma de inhibición en la Figura 13B, la banda de entre 20 y 25 kDa no disminuye, por lo que podría tratarse de una metaloproteasa de tipo I, ya que en la Figura 12A no presenta actividad.

6.1.7. Pruebas de coagulación sanguínea con las fracciones de la repurificación.

Debido a la poca disponibilidad de cada fracción obtenida por RP-HPLC, el ensayo de coagulación sanguínea no se realizó por triplicado, sin embargo los resultados ayudan conocer que fracciones son las que pueden presentar actividad anticoagulante (Tabla 8).

El método de coagulación de Lee-White, se basa en coleccionar sangre venosa en un tubo de vidrio con anticoagulante, y el tubo se debe inclinar suavemente para observar la formación del coágulo, y establecer así los diferentes niveles de coagulación, Figura 14.

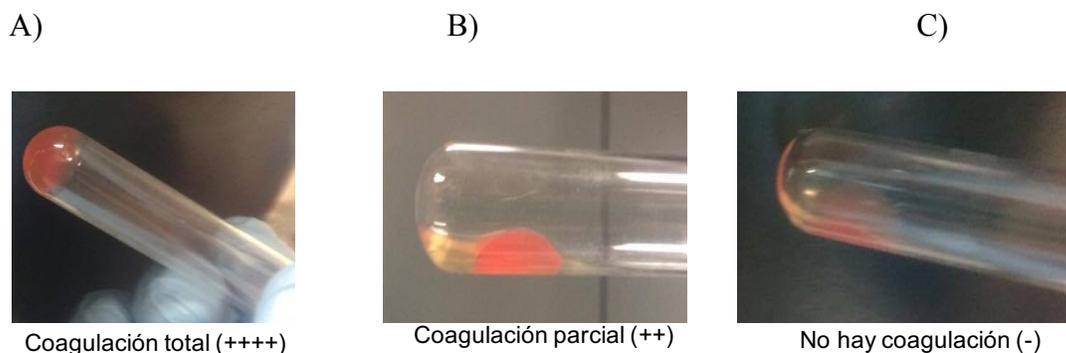


Figura 14. Fotografías de los diferentes niveles de la formación de los coágulos de plasma sanguíneo humano. A) coagulación total indicado con (++++), coagulación parcial indicado con (++) y no hay coagulación indicado con (-).

La coagulación total se define como la formación de un coágulo estable e insoluble, la coagulación parcial es la formación de un coágulo gelatinoso, fácilmente desprendible del tubo y finalmente la no coagulación es el plasma líquido.

Tabla 8. Evaluación de coagulación sanguínea de fracciones obtenidas de HPLC de FI

| No fracción | Concentración (μg) | Coagulación | Tiempo (s) |
|------------------------------------|------------------------------------|-------------|---------------|
| FI.1 | 10 | - | - |
| FI.2 | 5 | - | - |
| FI.3 | 5 | - | - |
| FI.4 | 10 | ++ | 30 |
| FI.5 | 10 | ++ | 30 |
| FI.6 | 10 | - | - |
| FI.7 | 10 | - | - |
| FI.8 | 10 | - | - |
| FI.9 | 5 | - | - |
| FI.10 | 5 | - | - |
| FI.11 | 5 | - | - |
| FI.12 | 5 | - | - |
| Veneno <i>B. ammoditoides</i> | 10 | ++++ | 20 |
| Fracción I | 10 | ++++ | 30 |
| Veneno <i>B. asper</i> (Control +) | 5 | ++++ | 10 |

En la tabla 8 se puede observar que la fracción 4 y 5 presenta una coagulación parcial, quizá si se aumenta la concentración de cada una de las fracciones se pueda llegar a una coagulación total. Se sabe que los venenos botrópicos son coagulantes sobre el plasma sanguíneo, paradójicamente, el sujeto envenenado posee sangre incoagulable. Esto se debe a la degradación de factores de la coagulación, y del fibrinógeno. Esta observación es clara en los casos de envenenamientos botrópicos donde la afibrinogenemia y la trombocitopenia son hallazgos característicos⁷⁸. Por otro lado, estos venenos poseen proteasas con una fuerte actividad fibrinolítica, las que pueden hidrolizar coágulos, agravando la hemorragia y alterando los mecanismos hemostáticos por la liberación de productos de degradación del fibrinógeno.

6.1.8. Actividad fibrinogenolítica

El mecanismo molecular de las serinoproteasas es la digestión de enlaces arginil, liberando fibrinopéptidos del fibrinógeno. La mayoría de las serinoproteasas liberan principalmente fibrinopéptidos tipo A. Sin embargo, algunas proteínas rompen específicamente fibrinopéptidos tipo B, o a ambos⁷⁹.

En la figura 15A se observa que la actividad proteolítica de FI (obtenida de la cromatografía de exclusión molecular en gel) a los 30 min degrada la cadena B β del fibrinógeno, lo cual indica que la mayoría de los componentes encontrados en esta fracción son de tipo B. En la figura 15 B la fracción FI.4 (repurificada por RP-HPLC) rompe a los 30 min la cadena A α , lo que indica que esta es una serinoproteasa tipo trombina de la clase A. Ambas fracciones rompen a las 4 h los dos tipos de fibrinopéptidos, esto debido al prolongado tiempo de incubación de la fracción con el sustrato, inclusive se ha visto que a tiempos prolongados de exposición hay rompimiento inespecífico para ambas cadenas. Estos resultados indican que la serinoproteasas tipo trombina en el veneno de *B. ammodytoides* presentan los dos tipos de actividades de fibrogenasa α y β .

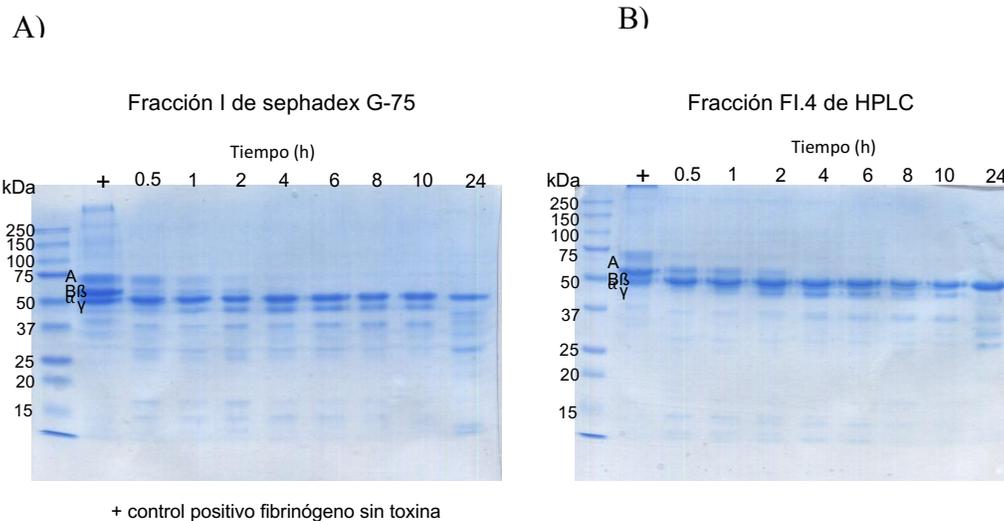


Figura 15. Gel SDS-PAGE 12 % de los productos de degradación de fibrinógeno. (A) Carril 1 (+), control (fibrinógeno sin FI), carriles 2 a 8, degradación del fibrinógeno por fracción FI después de 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h de incubación respectivamente a 37°C. (B) Carril 1(+), control (fibrinógeno sin FI.4); Carriles 2 a 8, degradación de fibrinógeno por fracción FI.4 después 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h de incubación, respectivamente a 37°C.

6.1.9. Identificación de proteínas a partir de secuencias de péptidos obtenidos mediante MALDI-TOF MS/MS

Con el fin de seguir analizando el veneno de *B. ammodytoides*, se realizó un gel SDS-PAGE al 15 % de la Fracción I proveniente de la purificación por cromatografía de exclusión molecular (Figura 8). Las bandas obtenidas se cortaron y a cada una se le hizo una digestión con tripsina, enzima que corta cadenas polipeptídicas en el extremo carboxilo en los residuos arginina y lisina.

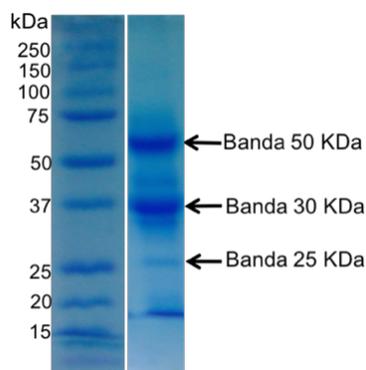


Figura 16. Gel SDS-PAGE 15% de la fracción de FI. Se señalan las bandas que fueron cortadas y digeridas con tripsina para la la obtención de secuencias polipeptídicas por MS/MS.

La digestión de cada una de las bandas señaladas en la Figura 16, se analizaron mediante MALDI-TOF, y se obtuvieron secuencias polipeptídicas con identidad a proteínas que corresponden a las ya reportadas en especies de *Bothrops* como puede verse en la tabla 9. Estas proteínas corresponden a las principales familias para el género *Bothrops*, como son serinoproteasas, metaloproteasas, fosfolipasas y L-aminooxidasas.

Tabla 9. Resumen de la identidad de secuencias encontradas en la base de datos del NCBI con secuencias polipeptídicas digeridas con tripsina de las bandas de 25, 30 y 50 kDa.

| Peso Molecular (Kda) | Identidad a proteína |
|----------------------|--|
| Banda de 25 | Serinoproteasa, Metaloproteasa, Fosfolipasa A2, L-aminooxidasas, Factor de crecimiento nervioso y Tripsinogeno |
| Banda de 30 | Serinoproteasa, Metaloproteasa, L-aminooxidasas y Crostatin 1 |
| Banda de 50 | Serinoproteasa, Metaloproteasa, L-aminooxidasas y proteína ribosomal |

6.2. Clonaciones de los genes que codifican enzimas del veneno de *B. ammodytoides*.

6.2.1. Extracción RNA de glándulas venenosas de *Bothrops ammodytoides*.

Una glándula de un espécimen de *B. ammodytoides* fue quirúrgicamente extraída y mantenida en una solución de RNA later (QUIAGEN®), este reactivo penetra rápidamente en los tejidos, estabilizando y protegiendo el RNA celular en muestras de tejido intacto; sin poner en riesgo la calidad o la cantidad de RNA obtenido tras el aislamiento posterior de RNA, por lo que elimina la necesidad de procesar inmediatamente muestras de tejido⁸⁰. El RNA total se obtuvo de glándulas venenosas de *B. ammodytoides*, utilizando el reactivo TRIzol®, ver 5.2.1.

El RNA total de la glándula venenosa se muestra en la Figura 17, se puede observar la integridad del RNA, ya que se muestran las bandas características del RNA ribosomal 28S y 18S.

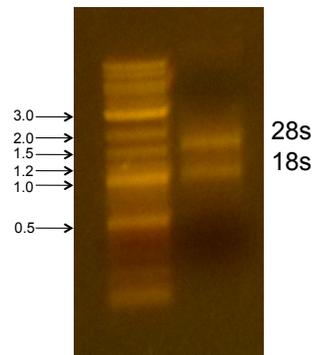


Figura 17. Extracción de RNA obtenido a partir de la glándula venenosa de *B. ammodytoides* y analizado en un gel de agarosa al 1%

6.2.2. Síntesis de cDNA y amplificación por RT-PCR para obtener los genes de la serinoproteasa, metaloproteasa y PLA2

El cDNA es una hebra de ADN de doble cadena una de las cuales constituye una secuencia totalmente complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado. Se suele utilizar para la clonación de genes propios de células eucariotas en células procariontas, debido a que, dada la naturaleza de su síntesis carece de intrones.

Se amplificaron por PCR los genes correspondientes a serinoproteasa, metaloproteasa y PLA2, de acuerdo a la secuencia N-terminal, los oligonucleótidos propios para cada amplificación y a las condiciones que se mencionaron previamente en la metodología (Apartados 5.2.3, 5.2.4 y 5.2.5). En la Figura 18 se muestran amplificaciones de DNA de tamaños esperados, de la siguiente manera: aproximadamente de 900 pb para serinoproteasa, (Figura 18 A), 4 bandas de 3,000, 1,200, 1,000 y 800 pb para metaloproteasa (Figura 18 B), y de 400 pb para PLA2 (Figura 18 C). Las diferentes amplificaciones de DNA, que corresponden a los tamaños de los genes según la masa molecular para serinoproteasas, metaloproteasas y PLA2 ya reportadas en la base de datos del NCBI.

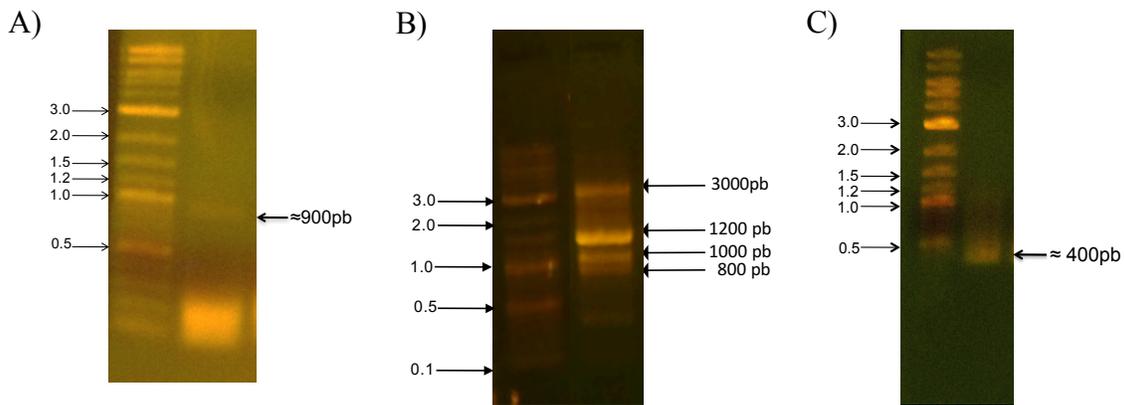


Figura 18. Amplificaciones por PCR de los genes que codifican para serinoproteasa (A); metaloproteasa (B); y PLA2 (C).

6.2.3. Construcción del Vector pCR2.1-TOPO con los genes de serinoproteasa, metaloproteasa y PLA2

Posterior a la amplificación por PCR y siguiendo el protocolo descrito en la metodología (Apartado 5.2.8), se procedió a la ligación de cada uno de los productos de PCR, de serinoproteasa, metaloproteasa y PLA2, en el vector Topo 2.1 (Figura 19). Dichas ligaciones se usaron para transformar células XL1Blue quimiocompetentes. Las células transformadas se eligieron en base a los marcadores de selección del plásmido Topo 2.1 que son: resistencia a ampicilina y expresión de la enzima β -galactosidasa (*lac Z*). La expresión de la enzima se detecta de manera indirecta por la formación de un precipitado de color azul en presencia del sustrato cromogénico X-gal. La ligación exitosa de la serinoproteasa, metaloproteasa y PLA2 en el vector Topo 2.1 se da en la región *lac Z*. De tal forma que la inserción del gen provoca la interrupción de *lac Z* y la bacteria no genera color.

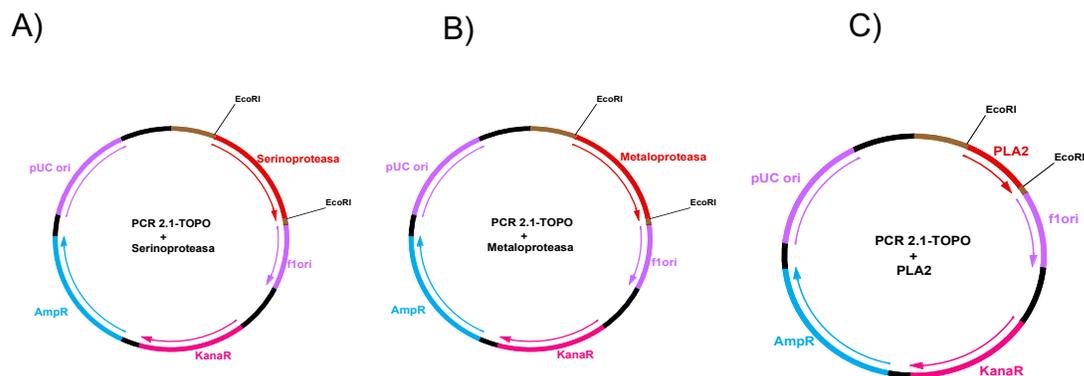


Figura 19. Construcciones en el vector Topo 2.1. A) serinoproteasa, B) metaloproteasa y C) PLA2.

6.2.4. Selección de clonas que acarrean el inserto de interés

Para determinar cuáles clonas contenían el plásmido con el inserto esperado, además de los marcadores de selección mencionados, se realizó una digestión con la Enzima *EcoRI*, para las construcciones de Topo 2.1-serinoproteasa y Topo 2.1- PLA2 (Figuras 20 A y 20 B, respectivamente); mientras que para el caso de Topo 2.1- metaloproteasa, se realizó PCR de colonia (Figura 20 C).

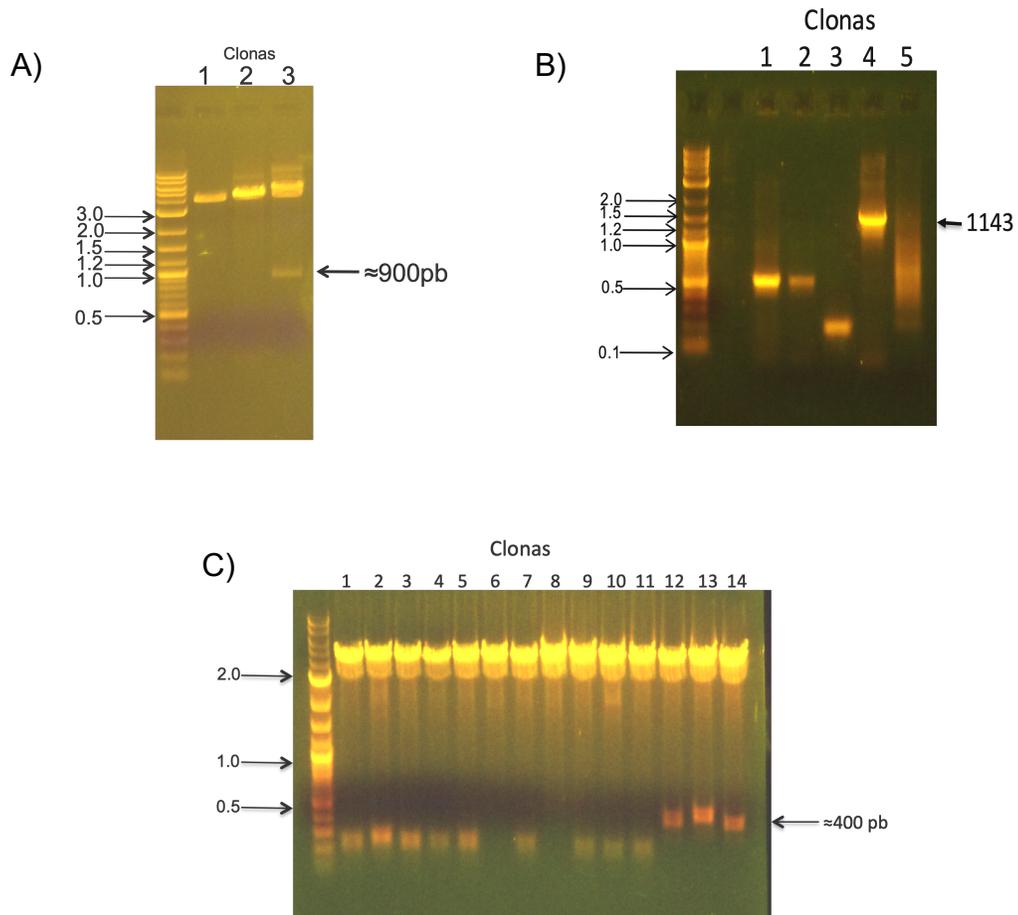


Figura 20. Análisis de clonas positivas obtenidas en Topo 2.1 mediante digestión enzimática y análisis por PCR de colonias, A) Clonas de la construcción Topo 2.1-serinoproteasa, B) Clonas de la construcción Topo 2.1-metaloproteasa C) Clonas de la construcción Topo 2.1-PLA2.

6.2.5. Secuencias de plásmidos de Topo2.1-serinoproteasa, Topo2.1-metaloproteasa y Topo2.1-PLA2

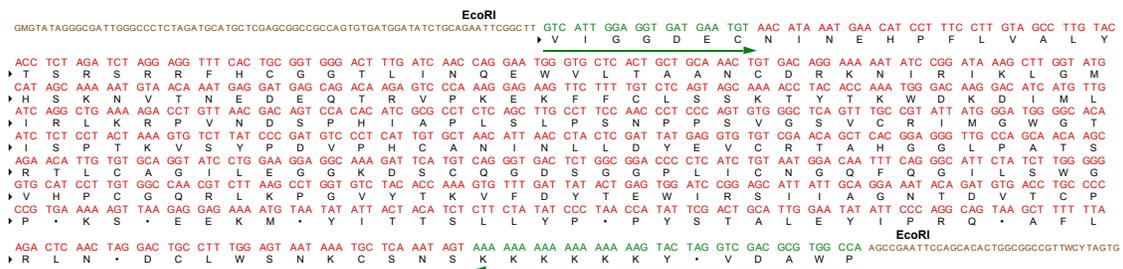
Los plásmidos purificados de aquellas clonas que mostraron las bandas de tamaños esperados para serinoproteasa de 900 pb (Figura 21A), para metaloproteasa de 1,200 pb (Figura 21B), y para PLA2 de 400 pb (Figura 21C), fueron secuenciados usando los oligonucleótidos M13 Forward y M13 Reverse (indicados en el apartado 5.2.6).

Para el caso de la secuencia de serinoproteasa (Figura 21 A) se obtuvo una secuencia de 708 nucleótidos, que en el marco de lectura correcto, corresponden 236 residuos de aminoácidos con una masa molecular teórica de 25,985.7 Da, que corresponde a la masa molecular reportada para serinoproteasas ²⁴.

Sin embargo, la banda de 900 pb de serinoproteasa, indico la presencia de una secuencia de 292 residuos de aminoácidos, la cual no corresponde con la masa molecular aparente de 25 kDa mostrada en el zimograma de la figura 9, que era de 25 kDa. Aquí se esperaba obtener una serinoproteasa de 236 aminoácidos (Figura 21A) con una banda de aproximadamente 700 pb. Los 200 pb extras correspondieron a una secuencia que no codifica para alguna proteína reportada ya que presenta varios codones de paro representando a la región traducida 3' (3'-UTR).

La secuencia se analizó por BLAST p®, la cual muestra la similitud que existe entre secuencias ya reportadas en la base de datos PDB. El servidor BLAST mostró que la secuencia del producto clonado en el vector Topo 2.1, correspondía a una serinoproteasa similar a tripsina (Figura 21B).

A)



El alineamiento (Figura 22) de la secuencia de serinoproteasa obtenida de la clonación en Topo 2.1, no muestra la triada catalítica común que presentan las serinoproteasas similares a trombina (Asp102, His57 y Ser195), ya que la posición 43 contiene una Asparagina en lugar de una Histidina.

En el veneno de *Macrovipera lebetina* se encontró una serinoproteasa que no presenta la triada catalítica común, ya que en la secuencia la His 57 es reemplazada por Arg 57, y además la Ser 195 es reemplazada por Asn195, por lo que se sugiere la existencia de isoformas sin actividad catalítica. Esto puede deberse a un empalme alternativo del gen o a alguna alteración del genoma ⁸¹.

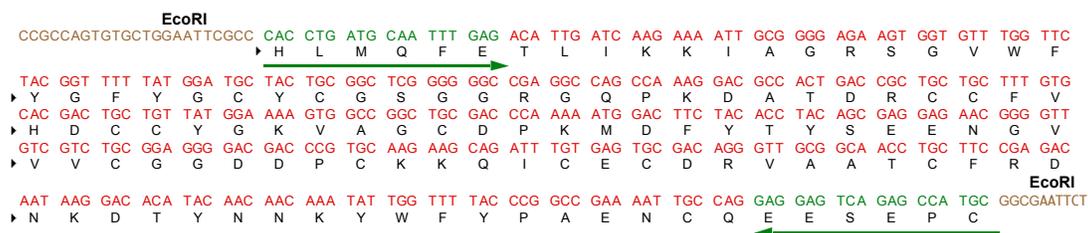
De igual manera, una serinoproteasa homóloga inactiva fue encontrada en el veneno de *Trimeresurus jerdonii*, esta serinoproteasa tiene identidad estructural de una serinoproteasa, pero sin actividad, debido a la sustitución del residuo His 57 por Arg57 en la triada catalítica ⁸².

| | | |
|-----------------------------|--|-----|
| Bothropsamodytoides | -----VIGGDE C NINEHPFLVALYTSRSRRF | 26 |
| Q9DF68Trimeresurus-jerdonii | MVLVRLANLLMLQLSYAQKSSSELIIGGDE C NINEHRFLVALYTFRSRRF | 50 |
| Q9PT40Macrovipera-lebetina | MVLIRVLANLLVQLSYAQKSSSELVIGGDE C NINEHPPVALHTARSKRF | 50 |
| AAA48553Batroxobin | MVLIRVIANLLILQVSYAQKSSSELVIGGDE C DINEHPFLAFMY--SPRY | 48 |
| | :*****:**** * . : : * * : | |
| Bothropsamodytoides | HCGGTLINQEWVLTAA N CDRKNIRIKLGMHSKNVTNEDEQTRVPKEKFFC | 76 |
| Q9DF68Trimeresurus-jerdonii | HCSGTLINEEWVLSAAR R CDRKNIRIQLGMHSTNVINEDVQTRVPKEKFFC | 100 |
| Q9PT40Macrovipera-lebetina | YCAGTLINQEWVLTAA R CDRKNIRIILGVHSKNVPNEEDQQIRVPKEKFFC | 100 |
| AAA48553Batroxobin | FCGMTLINQEWVLTAA H CNRRFMRIHLGNHAGSVANYDEVVRYPEKFFC | 98 |
| | .*. ****:****:*. * : * : ** * * : . * * * * * ***** * | |
| Bothropsamodytoides | LSSKTYTKWKD K IMLIRLKRPNVNDSPHIAPLSLPSNPPSVG S VC R IMGWG | 126 |
| Q9DF68Trimeresurus-jerdonii | LSSKTYTKWN K DIMLIRLKKPVNNSTHIAPVSLPSNPPTLG S VC R VMGWG | 150 |
| Q9PT40Macrovipera-lebetina | LSSKTYTRWD K DIMLIRLKKPVNDSITHIVPLSLPSSPPSVG S VC R IMGWG | 150 |
| AAA48553Batroxobin | PNKKNVITD K DIMLIRLDRPVKNSEHIAPLSLPSNPPSVG S VC R IMGWG | 148 |
| | . * . . : ***** . : * : * * * . * . * : * * * : * * * : * * * : | |
| Bothropsamodytoides | TISPTKVSYPDVPH C ANINLLDYE V CRTAHGGLPATSR T LCAGILEGGK D | 176 |
| Q9DF68Trimeresurus-jerdonii | TISATKETHPDV P LCANINILDYS V CRAAYARLPATSR T LCAGILEGG I D | 200 |
| Q9PT40Macrovipera-lebetina | TITTTKVYTPDVPH C ANINMFDYS V CRKVYRKLPEKSR T LCAGILQGG I D | 200 |
| AAA48553Batroxobin | AITTS E DYTPDVPH C ANINLFN T VCREAY N GLP--AK T LCAGV L QGG I D | 196 |
| | : * : : : * * * * * * : : * * . : * * : * * * * : * * * : * * * : | |
| Bothropsamodytoides | SCQGD S GGPL I CNGQFQGI L SWG V HP C GQRLKPGVYTKVFDY T EWIR S II | 226 |
| Q9DF68Trimeresurus-jerdonii | T C KGD S GGPL I CNGQFQGI V SWGSD P CA K PH E PGSYTKVFDHLN W IQ S II | 250 |
| Q9PT40Macrovipera-lebetina | S C KVD N GGPL I CNGQI V SWG H PC A Q P H K PALY T NVFDY T DW I Q S II | 250 |
| AAA48553Batroxobin | T C GGD S GGPL I CNGQFQGI L SWGSD P CA E PR K PAFYTKVFDY L PW I Q S II | 246 |
| | : * * *****:****:*** .***. : * . ** : * * : * * * * * : | |
| Bothropsamodytoides | AGNTD V T C PP | 236 |
| Q9DF68Trimeresurus-jerdonii | AGNT T AT C PP | 260 |
| Q9PT40Macrovipera-lebetina | AGN I TAT C PP | 260 |
| AAA48553Batroxobin | AGN K TAT C P- | 255 |
| | *** .*** | |

Figura 22. Alineamiento de la secuencia de serinoproteasa de *B. amodytoides* con secuencias de serinoproteasas de otras especies. Q9DF68 de *Trimeresurus jerdoni*, Q9PT40 de *Macrovipera lebetina* y AAA48553 Batroxobin de *B. asper*. Los aminoácidos marcados en azul corresponden a los aminoácidos que forman la triada catalítica y en rojo a las Cys

El plásmido Topo 2.1-metaloproteasa arrojó una secuencia nucleotídica que al ser traducida, muestra una secuencia de 237 residuos de aminoácidos (Figura 23A), lo que representa en una masa molecular teórica de 26,826.5 Da.

A)



B)

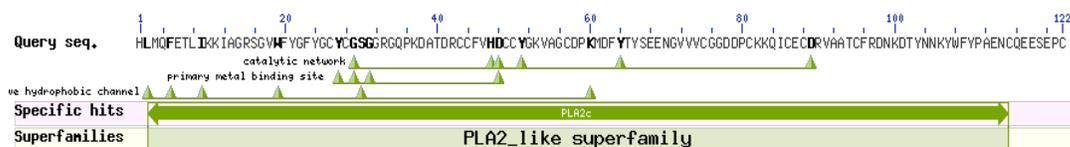


Figura 24. Secuencia de plásmido de la construcción Topo 2.1-PLA2, las flechas verdes indican la región de los oligonucleótidos (A) y Análisis por BLAST de la secuencia de PLA2 (B).

En el alineamiento de la secuencia de PLA2 nativa con la PLA2 clonada en Topo 2.1 (Figura 25), se muestra que existe diferencia en 6 aminoácidos (residuos en verde). Sin embargo, se observa que las cisteínas (residuos en rojo) se encuentran conservadas, al igual que los aminoácidos que están implicados en el sitio activo (residuos en azul), de manera que se confirma que se trata de una isoforma ⁴⁶.

| | | |
|-------------|--|-----|
| PLA2nativa | HLMQFETLIKKIAGRSVWFYGFYGCYCGSGGRGPKDATDRCCFVHDCYGKVGCDPK | 60 |
| PLA2clonada | HLMQFETLIKKIAGRSVWFYGFYGCYCGSGGRGPKDATDRCCFVHDCYGKVGCDPK | 60 |
| | *****:***** | |
| PLA2nativa | MDFYTYSEENGVVVCGGDDPCKKQICECDRVAATCFRDNKTYDNNKYWFYPAKNCQEASE | 120 |
| PLA2clonada | MDFYTYSEENGVVVCGGDDPCKKQICECDRVAATCFRDNKDTYNNKYWFYPAENCQEASE | 120 |
| | *****:***** | |
| PLA2nativa | PC | 122 |
| PLA2clonada | PC | 122 |
| | ** | |

Figura 25. Alineamiento de la secuencia de PLA2 nativa con la PLA2 clonada en Topo 2.1. En verde se indican a los aminoácidos diferentes entre la PLA2 nativa y la clonada, en azul los aminoácidos implicados en el sitio activo y en rojo las Cys.

6.3. Construcción de los vectores de expresión de la serinoproteasa, metaloproteasa y PLA2

6.3.1. Adición de los sitios de restricción a los genes de la serinoproteasa, metaloproteasa y PLA2

Considerando que ya se tienen las construcciones de secuencias corroboradas, de los genes de serinoproteasa, metaloproteasa y PLA2 en el plásmido Topo 2.1, se procedió mediante el uso de la técnica del PCR y con oligonucleótidos específicos, a adicionar los sitios de restricción *Bam*HI y *Pst*I a los genes de serinoproteasa, metaloproteasa y al de PLA2, de acuerdo con las condiciones mencionadas previamente en la metodología (Apartado 5.2.8).

En la figura 26 se muestra una banda amplificada del tamaño esperado de 737 pb para la serinoproteasa, de 947 pb para metaloproteasa, y de 395 pb para la PLA2, todos ellos con los nuevos oligonucleótidos.

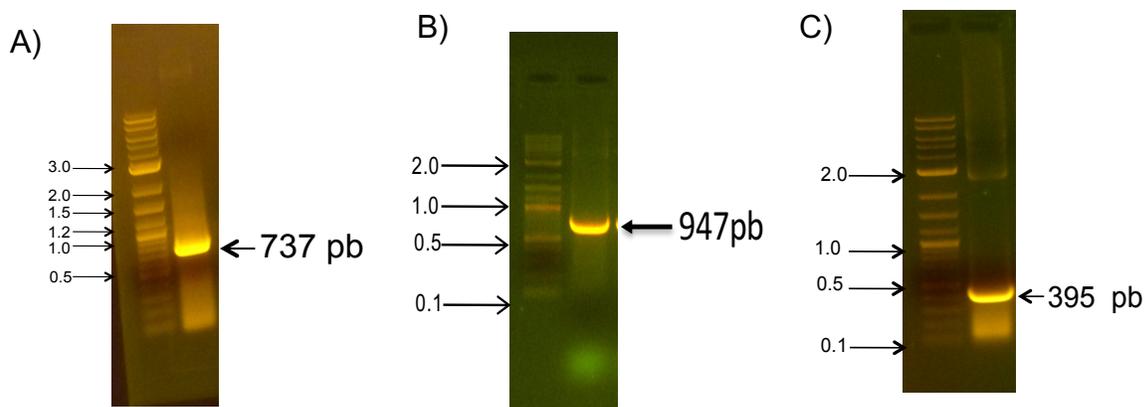


Figura 26. Amplificación por PCR de los genes que codifican para: serinoproteasa (A), metaloproteasa (B) y PLA2 (C) para la adición de sitios de digestión que permiten su posterior clonación en el plásmido de expresión pQE-30.

6.3.2 Subclonación en vector pCR2.1-TOPO de los genes que codifican para serinoproteasa metaloproteasa y PLA2 con adición de los sitios de restricción *Bam*HI y *Pst*I.

El procedimiento para la subclonación en el vector Topo 2.1 de los genes de serinoproteasa y PLA2 con los sitios *Bam*HI y *Pst*I se describe en la parte de metodología (Apartado 5.2.9). Estas construcciones se usaron para transformar en células *E. coli* XL1Blue de *E. coli* (Figura 27).

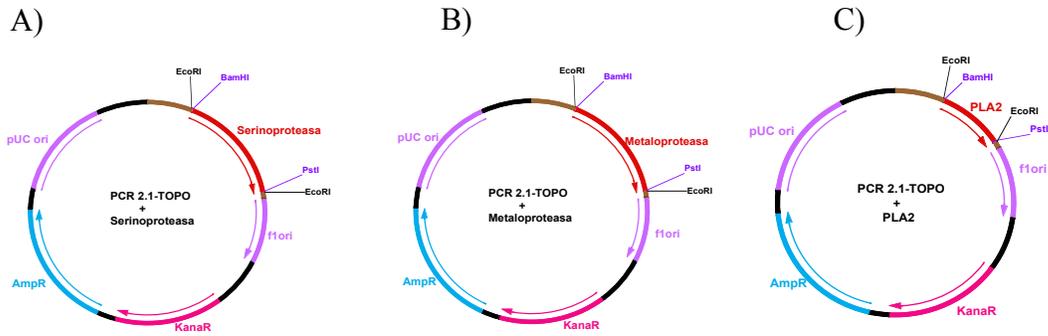


Figura 27. Construcción en el vector Topo 2.1 con sitios *Bam*HI y *Pst*I, del gen de serinoproteasa de 737 pb (A), metaloproteasa de 947 pb (B) y PLA2 395 pb (C).

6.3.3. Análisis de clonas de las construcciones en pCR2.1-Topo con la adición de sitios *Bam*HI y *Pst*I

Mediante PCR de colonia se determinó cuáles clonas del gen de serinoproteasa y metaloproteasa mostraban el tamaño esperado. Los resultados se analizaron en geles de agarosa al 1.2%. Los geles de agarosa debían arrojar resultados en los que se visualizara una banda de 737 pb para la construcción con serinoproteasa (Figura 28 A) y una banda de 888 pb para la metaloproteasa (Figura 28 B).

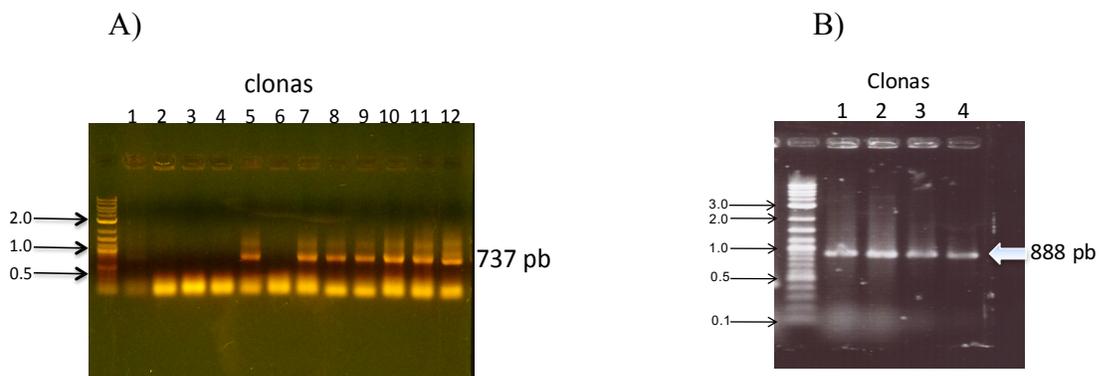


Figura 28. Análisis mediante PCR de colonia de clonas con el tamaño esperado. A) Clonas de la construcción Topo 2.1 *Bam*HI-FXa serinoproteasa-stop-stop-*Pst*I, y B) Clonas de la construcción Topo 2.1 *Bam*HI-FXa metaloproteasa-stop-stop-*Pst*I.

Para el caso de las clonas de PLA2, el análisis se realizó mediante digestión enzimática con *Eco*RI. El cual mostró una banda del tamaño esperado de las clonas de 395 pb (Figura 29).

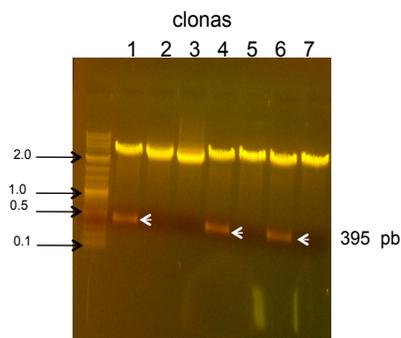


Figura 29. Gel de agarosa con los resultados de la digestión con *Eco* RI, de la construcción Topo 2.1 *Bam*HI-FXa PLA2-stop-stop-*Pst*I.

6.3.4. Determinación de las secuencias de plásmidos de Topo2.1-*Bam*HI-FXa-Serinoproteasa-Stop-Stop-*Pst*I, Topo2.1-*Bam*HI-FXa-Metaloproteasa-Stop-Stop-*Pst*I y Topo 2.1 *Bam*HI-FXa-PLA2-Stop-Stop-*Pst*I

Los plásmidos de las clonas de las tres construcciones, que mostraron las bandas de tamaños esperados y se purificaron, se verificaron por secuenciación (Figura 30). La finalidad era corroborar que los sitios de restricción *Bam*HI y *Pst*I se encontraran en las secuencias, de manera que posteriormente se pudiera digerir el plásmido y luego ligar el inserto obtenido en el plásmido de expresión pQE30.

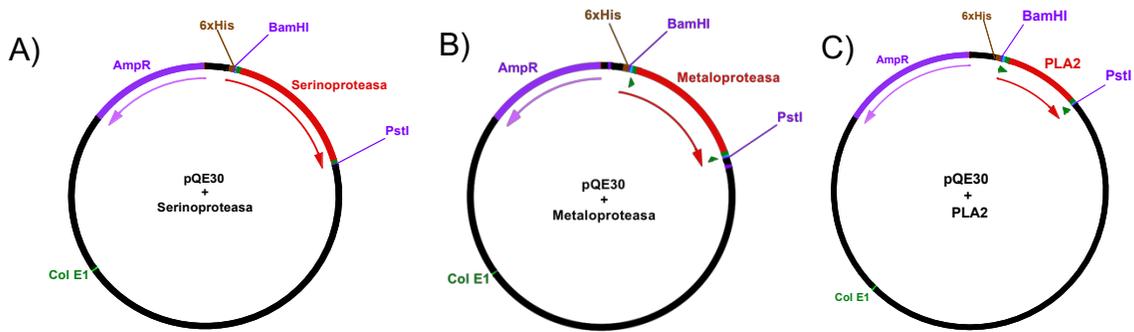
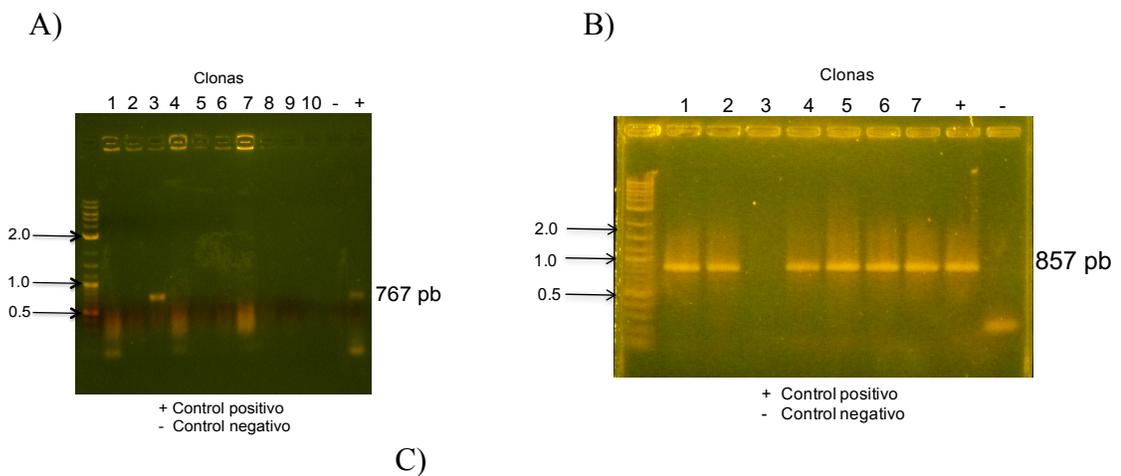


Figura 31. Construcciones de los tres genes en el vector de expresión pQE30. A) Construcción de serinoproteasa B) Construcción de metaloproteasa y C) Construcción de PLA2.

6.3.6. PCR de colonia de las clonas obtenidas de la ligación del inserto de serinoproteasa, metaloproteasa y fosfolipasa con pQE-30

Cada una de las ligaciones se usaron para transformar en células *E. coli* XL1-Blue quimiocompetentes, y las clonas de cada transformación se analizaron por PCR de colonia (Figura 32). Las clonas que mostraron bandas del tamaño esperado en el gel de agarosa se secuenciaron (Figura 33), y aquellas con la secuencia esperada se utilizaron para la expresión heteróloga de serinoproteasa, metaloproteasa y PLA2.



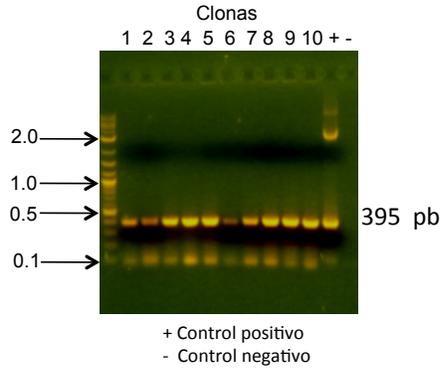


Figura 32. PCR de colonia de las clonas obtenidas de la ligación del inserto en pQE0-30. A) clonas con inserto de serinoproteasa, B) clonas con inserto de metaloproteasa, y C) clonas con inserto de PLA2.

A)

```

GAG AAA TTA ACT ATG AGA GGA TCG CAT CAC CAT CAC CAT CAC GGA TCC ATC GAG GGA AGG GTC ATT GGA GGT GAT GAA TGT AAC ATA AAT GAA CAT CCT TTC
▶ M R G S H H H H H H H G S I E G R V I G G D E C N I N E H P F
CTT GTA GCC TTG TAC ACC TCT AGA TCT AGG AGG TTT CAC TGC GGT GGG ACT TTG ATC AAC CAG GAA TGG GTG CTC ACT GCT GCA AAC TGT GAC AGG AAA AAT
▶ L V A L Y T S R S R R R F H C G G T L I N Q E W V L T A A N C D R K N
ATC CGG ATA AAG CTT GGT ATG CAT AGC AAA AAT GTA ACA AAT GAG GAT GAG CAG ACA AGA GTC CCA AAG GAG AAG TTC TTT TGT CTC AGT AGC AAA ACC TAC
▶ I R I K L G M H S K N V T N E D E Q T R V P K E K F F C L S S K T Y
ACC AAA TGG GAC AAG GAC ATG ATG TTG ATC AGG CTG AAA AGA CCT GTT AAC GAC AGT CCA CAC ATC CCG CCT CTC AGC TTG CCT TCC AAC CCT CCC AGT GTG
▶ T K W D K D I M L I R L K R P V N D S P H I A P L S L P S N P P S V
GGC TCA GTT TGC CGT ATT ATG GGA TGG GGC ACA ATC TCT CCT ACT AAA GTG TCT TAT CCC GAT GTC CCT CAT TGT GCT AAC ATT AAC CTA CTC GAT TAT GAG
▶ G S V C R I M G W G T I S P T K V S Y P D V P H C A N I N L D L D Y E
GTG TGT CGA ACA GCT CAC GGA GGG TTG CCA GCA ACA AGC AGA ACA TTG TGT GCA GGT ATC CTG GAA GGA GGC AAA GAT TCA TGT AAC GGT GAC TCT GGC GA
▶ V C R T A H G G L P A T S R T L C A G I L E G G K D S C Q G D S G G
CCC CTC ATC TGT AAT GGA CAA TTT CAG GGC ATT CTA TCT TGG GGG GTG CAT CCT TGT GGC CAA CGT CTT AAG CCT GGT GTC TAC ACC AAA GTG TTT GAT TAT
▶ P L I C N G Q F Q G I L S W G V H P C G Q R L K P G V Y T K V F D Y

ACT GAG TGG ATG CCG AGC ATT ATT GCA GGA AAT ACA GAT GTG ACC CCG TAG TAA CTG CAG CCA AGC TTA ATT AGC TGA GCT TGG ACT CCT GTT GAT
▶ T E W I R S I I A G N T D V T C G P P • • L Q

```

B)

```

AAA GAG GAG AAA TTA ACT ATG AGA GGA TCG CAT CAC CAT CAC CAT CAC GGA TCC ATC GAG GGA AGG GAA CAA CAA AGA TAT AAC CCC TAC AAA TAT
▶ M R G S H H H H H H H G S I E G R E Q Q R Y N P Y K Y
GTT GAG TTT TGC ATA GTT GTG GAC CAA GGA ACC GTC ACA AAA AAC AAT GGC GAT TTA GAT AAG ATA AAA ACA AGA ATA TAT GAA CTT GTC AAC ACT
▶ V E F C I V V D Q G T V T K N N G D L D K I K T R I Y E L V N T
GTG AAT GAG ATA TAC AGA TAC ATG TAT ATT CAT GTA CCA CTG GTT TGC CTA GAA ACT TGG TCC AAT GGA GAT AAG ATT ACC GTG AAG CCA GAC GTG
▶ V N E I Y R Y M Y I H V A L V C L E T W S N G D K I T V K P D V
GAT TAT ACT TGG AAA TCA TTT GCA GAA TGG ASA AAA ACA GTT TTG CTG ACT CCG AAA AAC CAT GAT AAT GGT CAG TTA CTC ACA GAA ATT GAC TTC
▶ D Y T W K S F A E W R K T V L L T R K N H D N A Q L L T A I D F
AGT GGA CCA ACT ATA GGA TAT GCT TAC ATA GCC ACA ATG TGT GAC CCG AAG AGT TCT GTA GGA ATT GTT CAG GAT TTT AGC CCA ATA AAT CTT TTG
▶ S G P T I G Y A Y I A T M C D P K S S V G I V Q D F S P I N L L
GTT GCA GTT ACA ATG GCC CAT GAG ATG GGT CAT AAT CTG GGC ATT CAT CAT GAC AGA GGT TCC TGT TCT TGC GGT GGT TAC CCA TGC ATT ATG GGT
▶ V A V T M A H E M G H N L G I H H D R G S C S C G G Y P C I M G
CCT GTG ATA AGC AAT GAA CCT TCG AAA TTT TTC AGC AAT TGT AGT TAT ATC CAA TGT TGG GAC TTT ATT ATG AAT CAC AAC CCA GAA TGC ATT GTC
▶ P V I S N E P S K F S N C S Y I Q C W D F I M N H N P E C I V

AAT GAA CCC TTG GGA ACA GAT ATT GTT TCA CCT CCA GTT TGT GGA AAT GAA CTT TTG TAG TAA CTG CAG CCA AGC TTA ATT AGC TGA GCT TGG ACT
▶ N E P L G T D I V S P P V C G N E L L • • L Q

```

C)

```

CTC GAG AAA TCA TAA AAA ATT TAT TTG CTT TGT GAG CCG ATA ACA ATT ATA ATA GAT TCA ATT GTG AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GAA TTC ATT AAA GAG GAG
▶ M R G S H H H H H H H G S I E G R H L M Q F E T L I K K I A G R S
AAA TTA ACT ATG AGA GGA TCG CAT CAC CAT CAC CAT CAC GGA TCC ATC GAG GGA AGG CAC CTG ATG CAA TTT GAG ACA TTG ATC AAG AAA ATT CGG GGG AGA AGT
▶ G V W F Y G F Y G C Y C G S G G R G Q P K D A T D R C C F V H D C C Y
GGT GTT TGG TAC GGT TTT TAT GGA TGC TAC TGC GGC TCG GGG GGC CAG GGC CAG CCA AAG GAC GCC ACT GAC CGC TGC TTT GTG CAC GAC TGC TGT TAT
▶ G K V A G C D P K M D F Y T Y S E E N G V V V C G G D D P C K K Q I C
GGA AAA GTG GCC GGC TGC CCA AAA ATG GAC TTT TAC ACC TAC AGC GAG GAG AAC GGG GTT GTC GTC TGC GGA GGG GAC GAC CCG TGC AAG AAG GAC ATT TGT
▶ E C D R V A A T C F R D N A G D T Y N N K Y W F Y P A E N C CAG GAG GAG TCA GAG CCA
GAG TGC GAC AGG GTT GCG ACA ACC TGC TTC CGA GAC AAT AAG CAC ACA TAT AAC AAA TAT TGG TTT TAC CCG GCC GAA AAT TGC CAG GAG GAG TCA GAG CCA
▶ C • • L Q
TGC TAG TAA CTG CAG CCA AGC TTA ATT AGC TGA GCT TGG ACT CCT GTT GAT AGA TCC AGT AAT GAC CTC AGA ACT CCA TCT GGA TTT GTT CAG AAC CGT GCT TTG
▶ C • • L Q

```

Figura 33. Secuencias de clonas obtenidas de la ligación en pQE0-30. A) Secuencia de serinoproteasa, B) Secuencia de metaloproteasa y C) Secuencia de PLA2.

6.4. Expresión heteróloga y purificación de las proteínas de serinoproteasa, metaloproteasa y PLA2

Debido al gran potencial terapéutico que se ha encontrado en las proteínas de los venenos de serpientes, y considerando la gran dificultad para obtener cantidad apreciable de proteínas purificadas de la glándula de veneno para estudios estructurales y funcionales, se han buscado alternativas como expresión heteróloga para obtener dichas proteínas del veneno.

Para expresar las proteínas serinoproteasa, metaloproteasa y PLA2, los plásmidos pQE30 con las diferentes construcciones, se usaron para transformar células *E. coli* cepa Origami y M15[pREP4]. El vector pQE30 tiene entre muchas características, el promotor T5/*lac*, y dos genes del operador *lac* el cuál a su vez, es regulado por la proteína represora Lac que es producida de manera constitutiva por el plásmido. Las proteínas clonadas en el vector pQE30 se inducen con IPTG que suprime el gen del represor *lacI* permitiendo la expresión. Las condiciones de expresión se mencionan en la parte de metodología (Apartado 5.3).

6.4.1. Expresión, purificación, plegamiento y pruebas de actividad de la serinoproteasa

Las condiciones de expresión de la serinoproteasa, sin la triada catalítica común, fueron 0.5 mM IPTG, 16°C durante 24 h y 180 rpm. La expresión de serinoproteasa se obtuvo en cuerpos de inclusión, por lo que se procedió a solubilizarlos con una solución 6M GndCl, en 50 mM Tris-HCl pH 8. Posteriormente la proteína se purificó por cromatografía de afinidad a níquel (Ni-NTA). Los resultados de los diferentes pasos de purificación se observaron en un gel SDS-PAGE 12% (Figura 34).

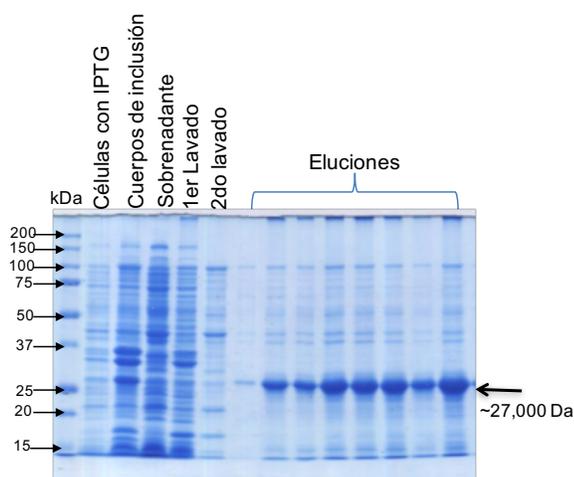


Figura 34. Gel SDS-PAGE 12 % de la expresión y purificación de la serinoproteasa recombinante de *B. ammodytoides*. En cada carril se muestran los diferentes pasos de purificación y con la flecha se marca la masa molecular aparente de 27,000 Da en las fracciones de la elución.

Debido a que la serinoproteasa se encuentra desnaturalizada por la acción del GndCl, fue necesario realizar ensayos de plegamiento *in vitro* para tratar de obtenerla en su forma nativa y funcional. Además del ensayo de plegamiento descrito en el Apartado 5.5 de la metodología, se realizaron varias condiciones de plegamiento con distintos aditivos (Tabla 10), para evaluar que condiciones de plegamiento pudieran generar la correcta formación de puentes disulfuro, y así tener activa a la serinoproteasa.

Tabla 10. Diferentes Condiciones de plegamiento

| | ----- | (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.2M | ----- | (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.2M |
|-------------|-----------------------|---|-----------------------|---|
| GndCl 2M | 1 | 2 | 5 | 6 |
| Urea 2M | 3 | 4 | 7 | 8 |
| | GSH/GSSG 1mM/0.1mM | | Cys/CySS 1mM/0.1mM | |

La cantidad de proteína recombinante utilizada para cada condición de plegamiento fue de 150 µg, además de los reactivos mencionados en la Tabla 10, el buffer de reacción utilizado fue 2 M Tris-HCl pH8. El tiempo de reacción fue de 72 h a temperatura ambiente^{83,84,85}. Después del tiempo de incubación con cada una de las condiciones de plegamiento se purificó la reacción por HPLC (datos no mostrados) usando las mismas condiciones que la metodología (Apartado 5.1.3).

Otro de los ensayos de plegamiento que se realizó fue por medio de diálisis en la que se ha logrado plegar a serinoproteasas provenientes de cuerpos de inclusión¹⁰, el procedimiento consistió de los siguientes recambios:

- 0.5M NaCl 20 mM Tris-HCl pH8, 6M Urea
- 0.5M NaCl 20 mM Tris-HCl pH8, 4M Urea
- 0.5M NaCl 20 mM Tris-HCl pH8, 2M Urea
- 0.5M NaCl 20 mM Tris-HCl pH8,
- 0.5M NaCl 20 mM Tris-HCl pH8, 1mM GSH/0.1mM GSSG

Cada uno de los pasos de diálisis fue incubado a 4°C, y en agitación constante durante 1 hora.

Se realizaron ensayos de actividad con las diferentes reacciones de plegamiento de la siguiente manera:

Zimogramas para determinar la actividad de proteasa, que para todos los casos no mostró actividad, solo el control positivo que fue veneno completo de *Bothrops asper*, que se sabe que presenta componentes con alta actividad de proteasa (datos no presentados).

Prueba de coagulación de plasma sanguíneo, se tomaron 0.2 mL de plasma sanguíneo anticoagulado con citrato, previamente incubado por 5 min a 37°C en baño María, luego se agregaron 20 µg de serinoproteasa recombinante plegada de cada una de las condiciones realizadas y se incubó por 1 min. Ninguna condición de plegamiento coaguló el plasma.

Por lo tanto, la serinoproteasa recombinante que no presenta la triada catalítica común de His, Asp y Ser, no presentó actividad tipo trombina.

De tal forma se procedió a utilizar técnicas que nos permitiera obtener una posible serinoproteasa recombinante activa. Por lo que se decidió cambiar la asparagina en posición 43 por la histidina, que es el aminoácido correcto de la triada catalítica. Este cambio se realizó por medio de mutagénesis sitio dirigida. La metodología se hizo de acuerdo al esquema de la figura 6.

El proceso se realizó en dos etapas: En la primera se amplificó un segmento del gen de la serinoproteasa con el oligonucleótido mutagénico N43H y con el oligonucleótido directo, para generar el megaoligo de 188 pb (Figura 35 A), en la segunda etapa se utilizó el megaoligo y el oligonucleótido reverso. Esta última amplificación da como resultado el gen con la mutación deseada con un tamaño esperado de 767 pb (Figura 35 B).

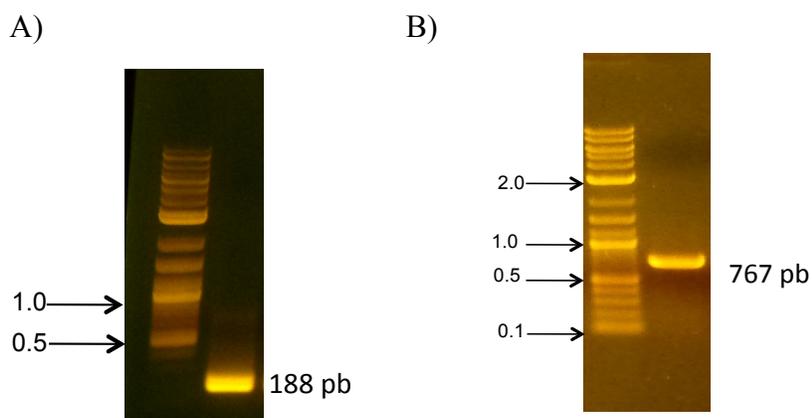
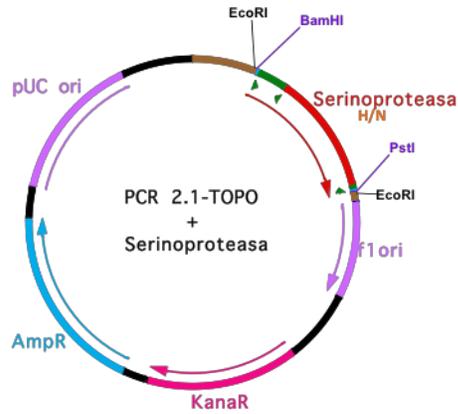


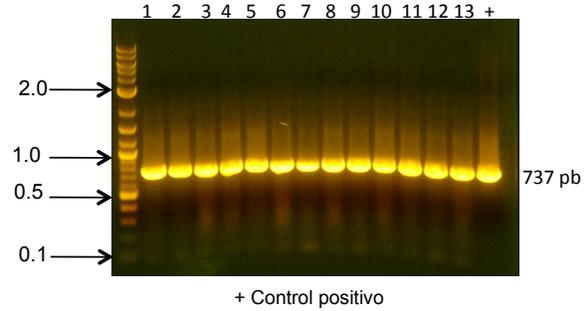
Figura 35. PCR para la obtención de la serinoproteasa con la mutación de Asparagina en posición 43 por Histidina. A) PCR para la obtención del megaoligo; y B) PCR para obtener el gen de la serinoproteasa con la mutación deseada.

La banda de PCR de 767 pb se clonó en el vector Topo 2.1 de acuerdo con las condiciones que se mencionaron previamente en la metodología.

A)



B)



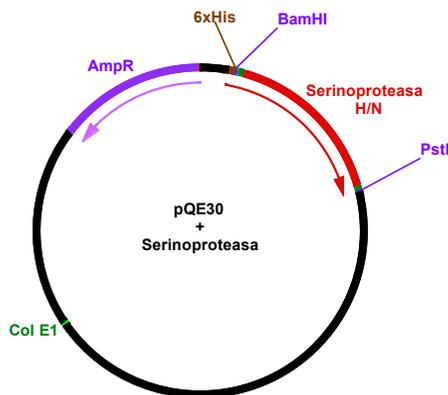
C)

**GSIEGRVIGGDECNINEHPFLVALYTSRSTRFHCGGTLINQEWVLTAAHCDRKNIRIKLGMHSK
NVTNEDEQTRVPKEKFFCLSSKTYTKWDKDIMLIRLKRPNVNDSPHIAPLSLPSNPPSVGSVCRIM
GWTISPTKVSYPDVPHCANINLLDYEVCRTAHGGLPATSRTLCAILEGGKDSCQGDSSGGPLI
CNGQFQGILSWGVHPCGQRLKPGVYTKVFDYTEWIRS IIAGNTDVTCP••LQ**

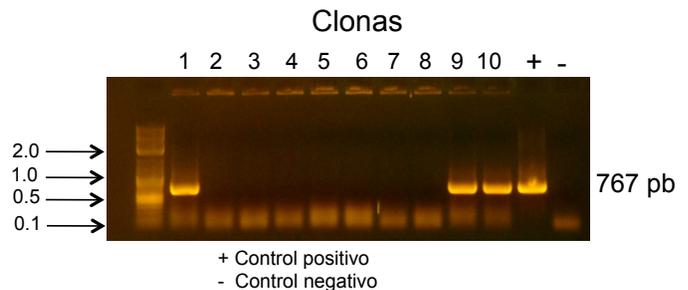
Figura 36. Clonación del gen de la serinoproteasa con la mutación deseada. A) Clonación en el vector Topo 2.1; B) Gel de clonas con inserto de serinoproteasa; y C). Secuencia de serinoproteasa con el cambio de asparagina por histidina. Los dos puntos en el C) es el codón de paro.

El clon con la secuencia esperada para serinoproteasa con la triada catalítica común de His, Asp y Ser se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Pst*I y luego se subclonó en vector pQE-30 (Figura 37).

A)



B)



C)

MRGSHHHHHHGSIEGRVIGGDECNINEHPFLVALYTSRSTRFHCGGTLINQEWVLTAAHCDRK
NIRIKLGMHSKNVTNEDEQTRVPKEKFFCLSSKTYTKWDKDIMLIRLKRPNVNDSPHIAPLSLPSN
PPSVGSVCRIMGWTISPTKVSYPDVPHCANINLLDYEVCRTAHGGLPATSRTLCA GILEGGKD
SCQGDSSGGPLICNGQFQGILSWG VHPGQRLKPGVYTKVFDYTEWIRS IIAGNTDVT CPP••LQ

Figura 37. Subclonación en el vector de expresión pQE-30 del gen de la serinoproteasa con la mutación deseada. A) Subclonación en el vector pQE-30; B) Gel de clonas con inserto de serinoproteasa; y C) secuencia de serinoproteasa con el cambio de asparagina por histidina. Los dos puntos en el C) es el codón de paro.

Para la expresión de la serinoproteasa con la triada catalítica común, se usaron las siguientes condiciones: 0.5 mM IPTG, a 16°C durante 8 h y 180 rpm. La expresión de serinoproteasa se obtuvo en la fracción soluble. El proceso de purificación se analizó por SDS-PAGE 12% y Western blot, utilizando anticuerpo anti-Histidinas, mostrando una banda de tamaño aparente de 27, 000 Da (Figura 38).

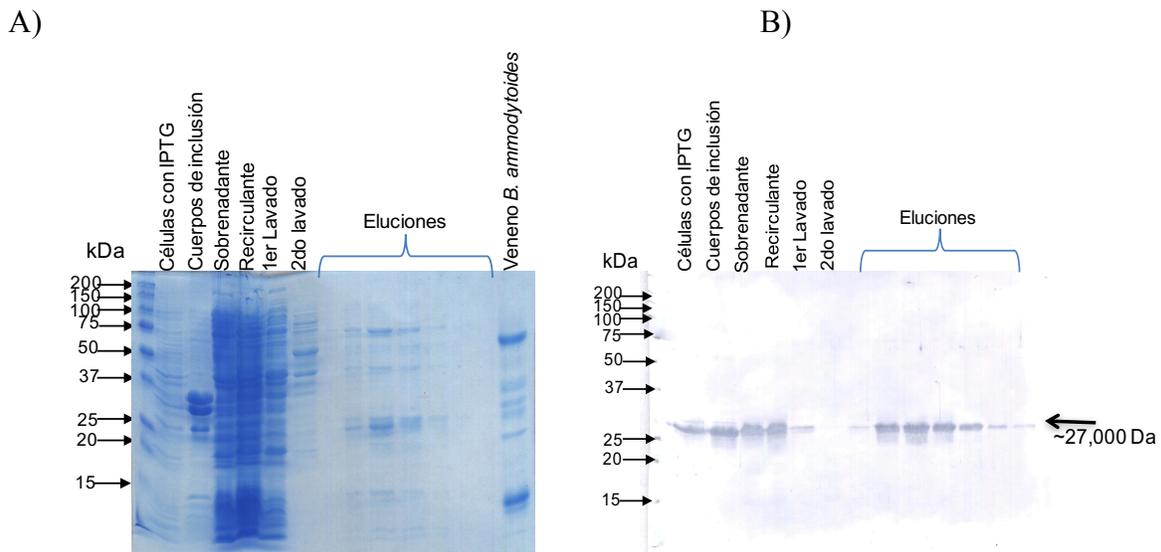


Figura 38. Análisis del proceso de purificación por NiNTa de la fracción soluble. A) Gel SDS-PAGE 12 % de la expresión y purificación de la serinoproteasa recombinante con la triada catalítica común de His, Asp y Ser de *B. ammodytoides*; B) Western blot usando como anticuerpo anti-histidina 1:5,000. En cada carril se muestran los diferentes pasos de purificación y con flecha se marca la masa molecular aparente de 27,000 Da en las fracciones de la elución.

Para determinar actividad de proteasa en las fracciones obtenidas de la purificación de la serinoproteasa recombinante con la triada catalítica, se realizó un zimograma utilizando como sustrato gelatina, (ver metodología apartado 5.8.3).

El resultado muestra un halo de degradación a la altura de la masa molecular esperada para la serinoproteasa recombinante (Figura 39).

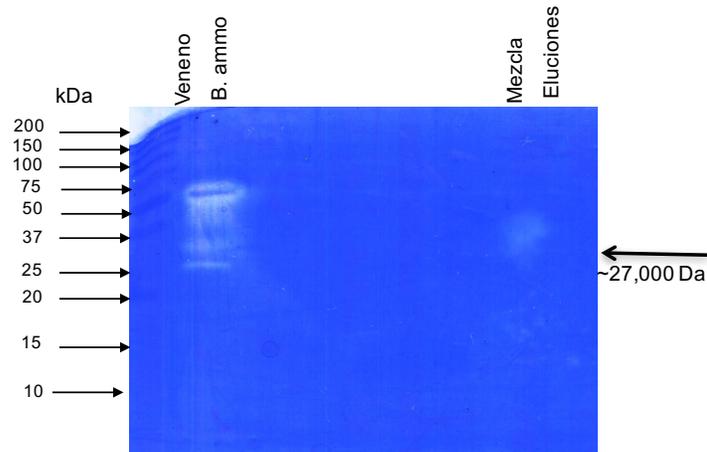


Figura 39. Zimograma de actividad de proteasa. Gel SDS-PAGE 12% con 1.5 mg/ml de gelatina. Veneno completo de *B. ammodytoides* 5 μ g, pool de elución de fracciones obtenidas de la purificación por NiNTa.

A la serinoproteasa obtenida en fracción soluble se realizó actividad fibrinogenolítica sobre fibrinógeno de plasma humano. En la figura 40 se observa que la serinoproteasa recombinante soluble tratada a diferentes tiempos. Sin embargo, no presentó degradación en ninguna de las cadenas de fibrinógeno. Aunque las proteínas recombinantes obtenidas de manera soluble pueden presentarse en su forma activa, en este caso la gran cantidad de puentes disulfuro que contienen estas proteínas pueden generar más de 10,000 conformaciones diferentes de puentes disulfuro, y que ninguna de estas sea la activa.

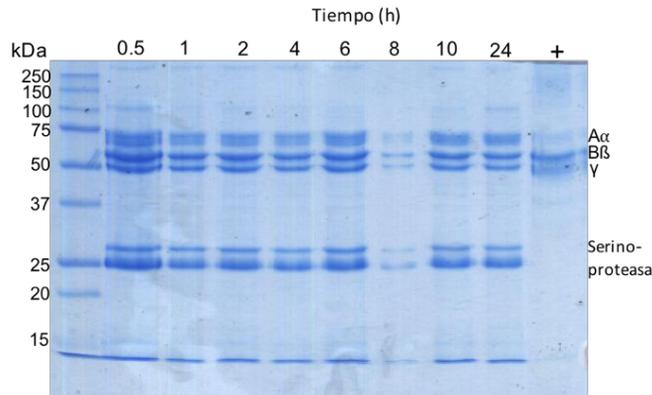


Figura 40. Gel SDS-PAGE 12 % de los productos de degradación de fibrinógeno carriles 2 a 8, degradación del fibrinógeno por serinoproteasa recombinante soluble después de 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h de incubación respectivamente a 37°C. Carril 10, control + (fibrinógeno sin serinoproteasa).

Las fracciones de elusión de la purificación por Ni-NTA (Figura 38 A) se unieron y a la mezcla se adiciono DTT 10 μ M 1 hora a 37°C. El producto se purifico por HPLC en una columna C4, la fracción marcada con asterisco en la figura 41, corresponde a la serinoproteasa reducida de la cual se obtuvo la masa molecular experimental que fue de 27,859 Da, que corresponde al valor teórico de 27,862 Da, el error de +/- 3 Da, es considerado como parte de las desviaciones del equipo.

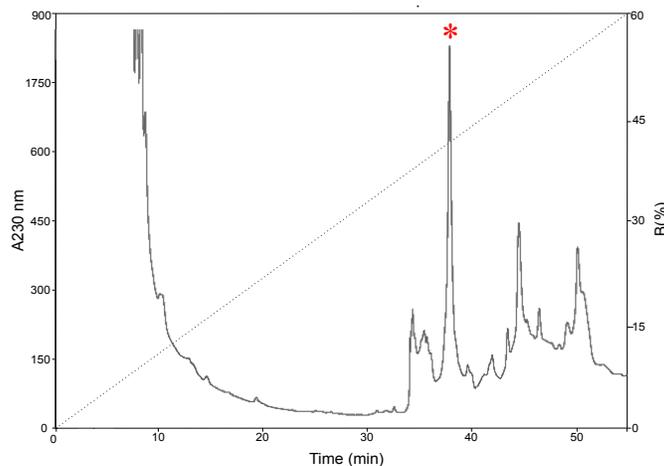


Figura 41. RP-HPLC de la reducción con DTT de la mezcla de fracciones de la purificación por afinidad a níquel. El asterisco en rojo indica la fracción reducida con la masa molecular experimental esperada de 27,859 Da.

Debido a que el 90% de la serinoproteasa recombinante con la triada catalítica correcta, se obtuvo como cuerpos de inclusión, se solubilizaron en 6M GndCl en 50 mM Tris-HCl pH 8, y posteriormente se purificaron por cromatografía de afinidad a níquel (Ni-NTA). En la figura 42 se muestra un gel SDS-PAGE 12% de los diferentes pasos de purificación.

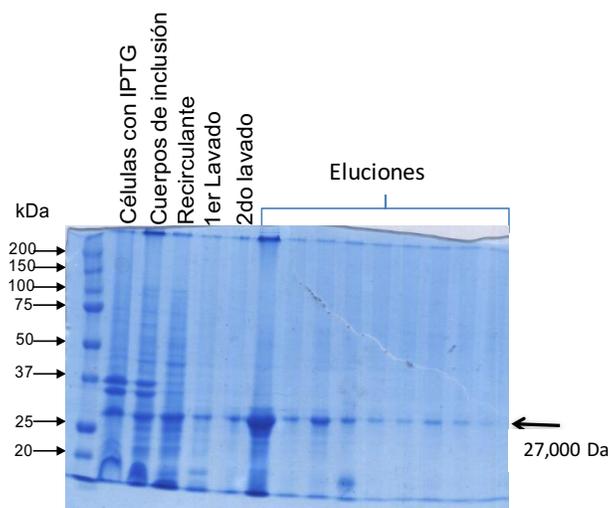


Figura 42. Gel SDS-PAGE 12 % de la expresión y purificación de la serinoproteasa recombinante de *B. ammodytoides*. En cada carril se muestran los diferentes pasos de purificación, y con flecha se marca la masa molecular aparente de 27,000 Da en las fracciones de la elución.

A los cuerpos de inclusión de la serinoproteasa, fue necesario realizar ensayos de plegamiento *in vitro* para obtenerla en su forma nativa y funcional. Se usaron las condiciones del punto 5.5 de la metodología. Después de los 7 días de incubación, la purificación se realizó por HPLC fase reversa. La fracción marcada con asterisco corresponde a la serinoproteasa, figura 43.

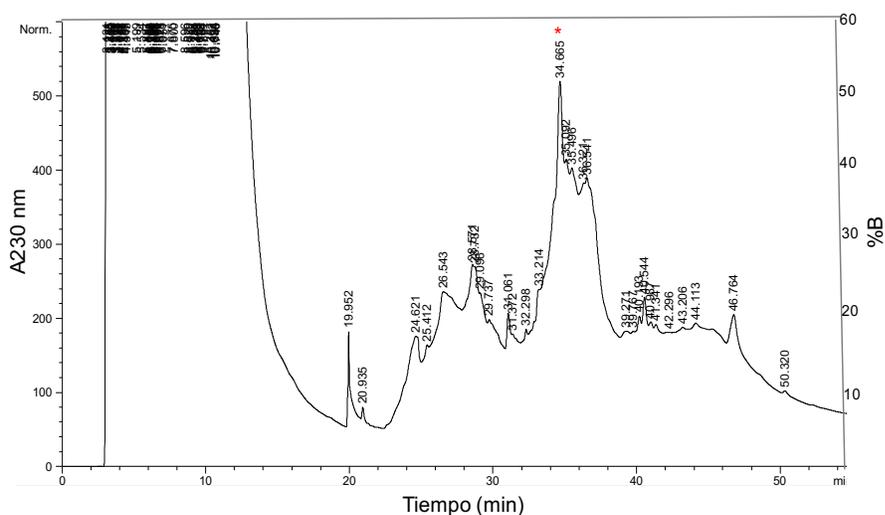


Figura 43. HPLC del ensayo de plegamiento de serinoproteasa obtenida de cuerpos de inclusión. Se utilizó una columna analítica C₄ (Vydac #214TP54, 5 μ m 300 Å 4.6 x 250mm) usando el solvente A (0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua) y el solvente B (0.1% TFA en acetonitrilo) en un gradiente de acetonitrilo de 10-60% en 50 minutos a un flujo de 1 mL/min. El asterisco en rojo indica la fracción mayoritaria del plegamiento utilizado para posteriores análisis.

A la fracción marcada con asterisco de la figura 43, que corresponde a la serinoproteasa, se usó para determinar actividad fibrinogenolítica sobre fibrinógeno de plasma humano. En la figura 44 se observa que la serinoproteasa recombinante de cuerpos de inclusión, tratada a diferentes tiempos no presentó degradación de ninguna de las cadenas de fibrinógeno.

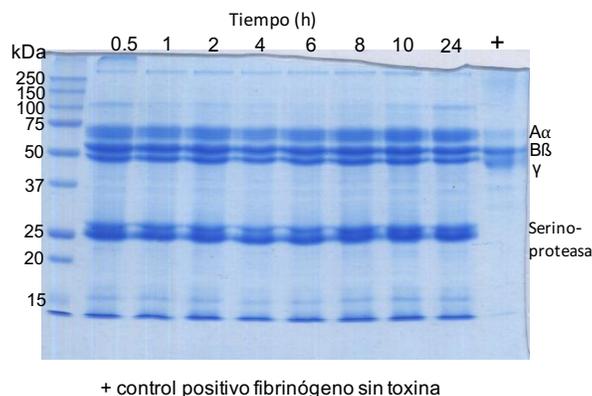


Figura 44. Gel SDS-PAGE 12 % de los productos de degradación de fibrinógeno. Los carriles 2 a 8 representan la degradación del fibrinógeno por la serinoproteasa recombinante plegada a partir de cuerpos de inclusión después de 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h de incubación respectivamente a 37°C. El carril 10 representa el control + (fibrinógeno sin serinoproteasa).

6.4.2. Expresión, purificación y plegamiento de la metaloproteasa

Las condiciones para la expresión de la metaloproteasa fueron 1 mM IPTG, 30°C durante 6 h y 180 rpm. La expresión de metaloproteasa se obtuvo en cuerpos de inclusión, que se solubilizaron en 6M GndCl en 50 mM Tris-HCl pH 8, y posteriormente la proteína se purificó por cromatografía de afinidad a níquel (Ni-NTA). Los resultados de los diferentes pasos de purificación se observaron en un gel SDS-PAGE 12% (Figura 45A).

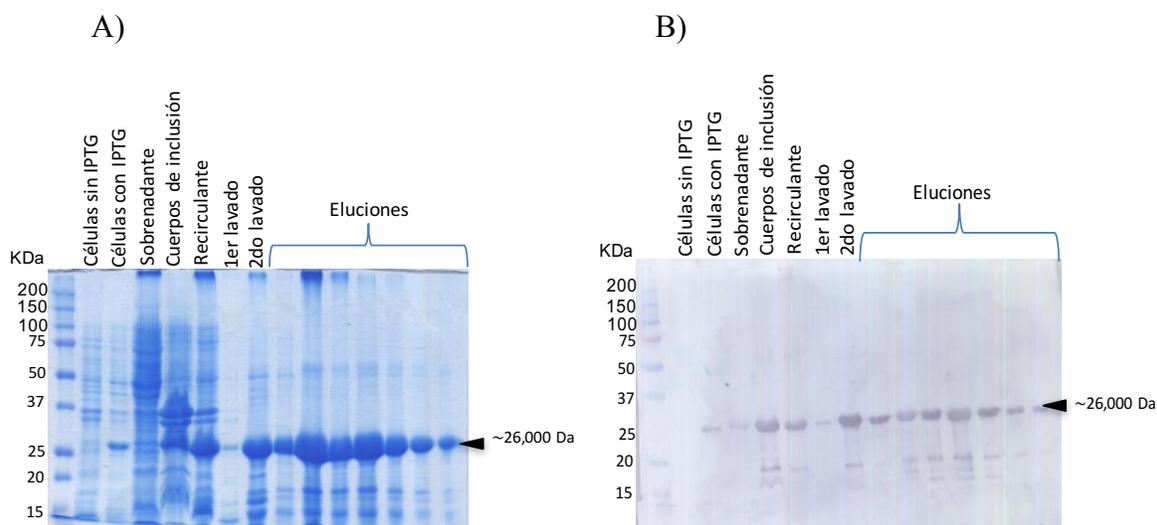


Figura 45. Análisis del proceso de purificación por NiNta. A) Gel SDS-PAGE 12 % de la expresión y purificación de la metaloproteasa recombinante de *B. ammodytoides*; y B) Western blot usando como anticuerpo anti-histidina 1:5,000. En cada carril se muestran los diferentes pasos de purificación y con flecha se marca la masa molecular aparente de 27,000 Da de las fracciones de la elución.

A las fracciones de la elución obtenidas de la purificación por Ni-NTA (Figura 45 A) se unieron y se redujeron con DTT 10 μ M 1 hora a 37°C. El producto se purificó por HPLC en una columna C4. La fracción marcada con asterisco, ver figura 46, se envió a espectrometría de masas para obtener la masa molecular experimental que fue de 26, 826.52 Da, la cual corresponde al valor teórico de 26,828.18 Da, el error de +/- 2 Da, es considerado como parte de las desviaciones del equipo.

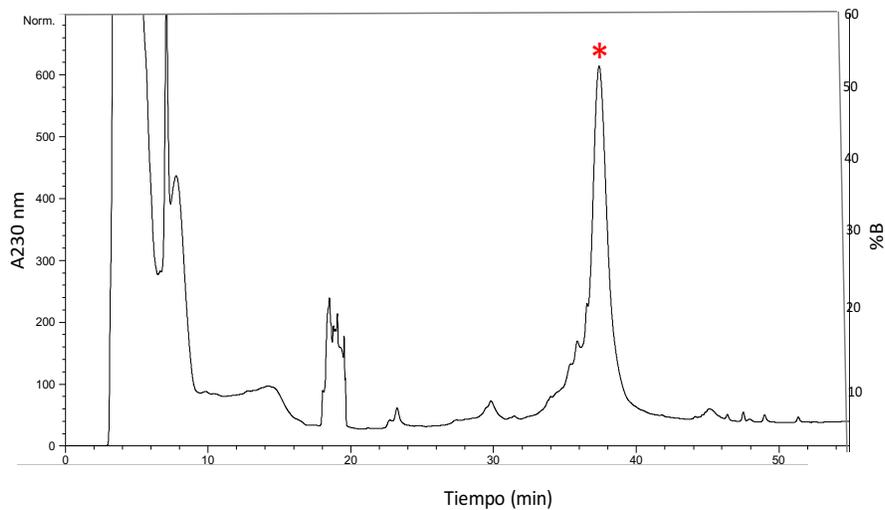


Figura 46. Purificación por RP-HPLC de la reducción con DTT de la mezcla de fracciones de la purificación por afinidad a níquel de metaloproteasa. El asterisco en rojo indica la fracción reducida con la masa molecular experimental esperada de 26,828.18Da.

Debido a que la metaloproteasa se encuentra desnaturalizada por la acción del GndCl, fue necesario realizar ensayos de plegamiento *in vitro* para obtener en su forma activa. Para ello se siguió el procedimiento planteado en el apartado 5.5 de la metodología. Después de los 7 días de incubación de la reacción de plegamiento, se realizó una cromatografía en HPLC fase reversa. (Figura 47).

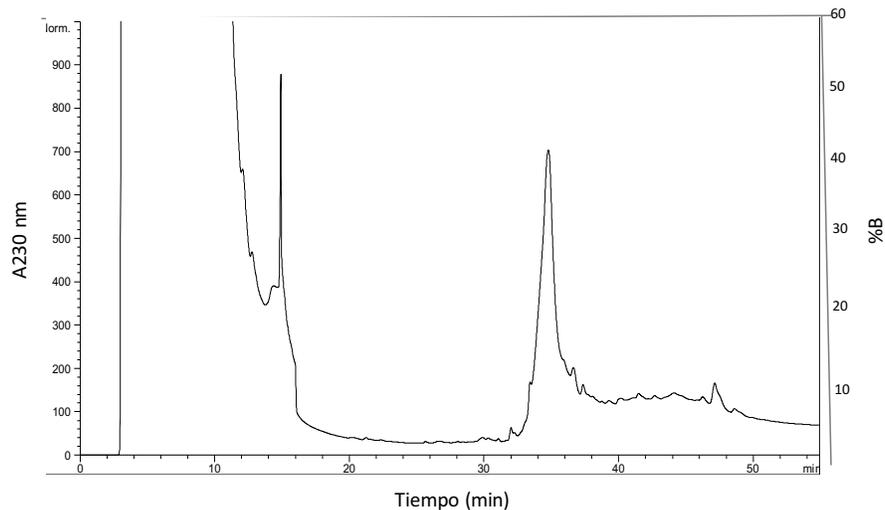


Figura 47. Purificación por HPLC del ensayo de plegamiento de metaloproteasa. Se utilizó una columna analítica C₄ (Vydac #214TP54, 5 μm 300 Å 4.6 x 250mm) usando el solvente A (0.1% de ácido trifluoroacético [TFA] en agua) y el solvente B (0.1% TFA en acetonitrilo) en un gradiente de acetonitrilo de 10-60% en 50 minutos a un flujo de 1 mL/min.

Para determinar actividad de proteasa del plegamiento de la metaloproteasa, se realizó un zimograma utilizando como sustrato gelatina. Sin embargo, no mostró un halo de degradación evidente (datos no mostrados). Se ha descrito que proteínas de tamaño mediano a grandes y con actividad enzimática, pueden desnaturalizarse fácilmente con las condiciones de separación en HPLC-RP, Las metaloproteasas son un ejemplo de que se inactivan por solventes orgánicos, comúnmente usados en la cromatografía de fase reversa, lo que imposibilita las pruebas de actividad. Por lo tanto, es necesario utilizar otras técnicas cromatográficas para la separación de las metaloproteasas²⁰

6.4.3. Expresión, purificación, plegamiento y caracterización de la PLA2

Las condiciones para la expresión de la PLA2 fueron 1 mM IPTG, 16°C durante 24 h y 180 rpm. La expresión de PLA2 se obtuvo en cuerpos de inclusión, por lo que se tuvieron que solubilizar en una solución 6M GndCl en 50 mM Tris-HCl pH 8, y posteriormente la proteína se purificó por cromatografía de afinidad a níquel (Ni-NTA). Los resultados de los diferentes pasos de purificación se observaron en un gel SDS-PAGE 15% (Figura 48A). Además, se realizó un Western blot de los diferentes pasos de purificación, utilizando un anticuerpo anti-histidinas, mostrando un reconocimiento evidente en un peso molecular aparente de 15,000 Da (Figura 48B).

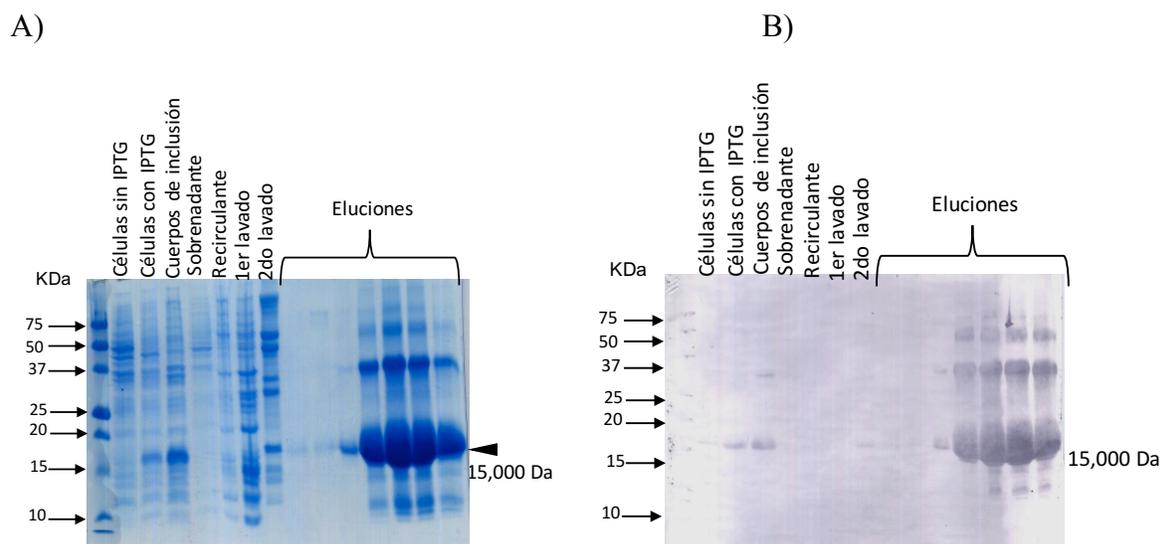


Figura 48. Análisis del proceso de purificación de la proteína PLA2 por NiNta. A) Gel SDS-PAGE 15 % de la expresión y purificación de la PLA2 recombinante de *B. ammodytoides*. B) Wester blot usando como anticuerpo anti-histidina 1:2,000. En cada carril se muestran los diferentes pasos de purificación y con flecha se marca la masa molecular aparente aproximada de 15,000 Da de las fracciones de la elución.

Debido a que la PLA2 se encuentra desnaturalizada por la acción del GndCl, fue necesario realizar ensayos de plegamiento *in vitro* para tratar de obtenerla en su forma activa.

Para ello se siguió el procedimiento planteado en el apartado 5.5 de la metodología. Después de las 48 h de incubación del plegamiento se realizó una cromatografía en HPLC fase reversa. Las fracciones fueron colectadas manualmente por monitoreo a una absorbancia de 230 nm (Figura 49).

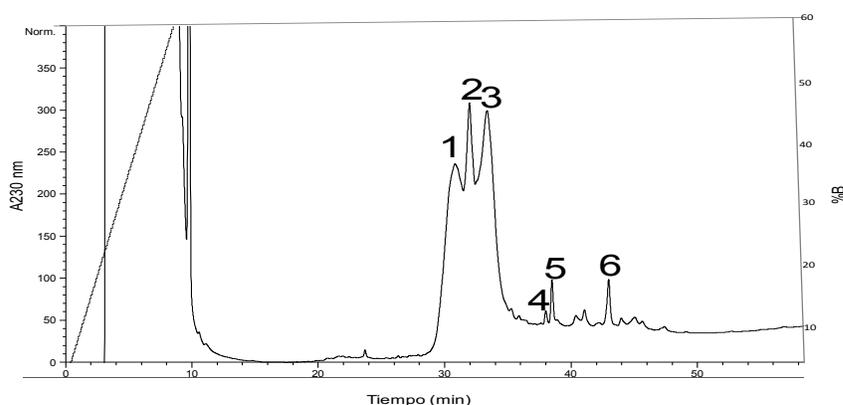


Figura 49. Purificación por RP-HPLC del ensayo de plegamiento de PLA2. Se utilizó una columna analítica C₄ (Vydac #214TP54, 5 μ m 300 Å 4.6 x 250mm) usando el solvente A (0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua) y el solvente B (0.1% TFA en acetonitrilo) en un gradiente de acetonitrilo de 10-60% en 50 minutos a un flujo de 1 mL/min.

Se obtuvieron seis fracciones de la purificación por HPLC después del plegamiento, las cuales se analizaron en ensayo de actividad de fosfolipasa en placa rodamina-yema de huevo-agar (Figura 50).

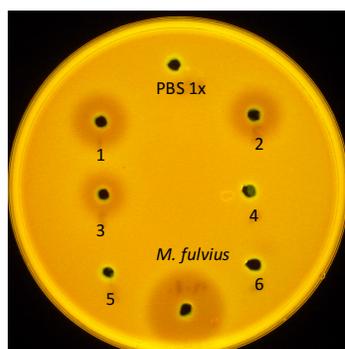


Figura 50. Ensayo de actividad de PLA2 en placa rodamina-yema de huevo-agar. Las fracciones 1,2,3,4,5, y 6 fueron obtenidas del HPLC del plegamiento de los cuerpos de inclusión de la PLA2 recombinante (2 μ g/pozo); Como control (+) se utilizó veneno completo de *Micrurus fulvius* 1.5 μ g/pozo y como control (-) PBS 1x.

Las PLA2 del veneno de serpientes, además de su actividad catalítica al hidrolizar el enlace éster sn-2 de los glicerofosfolípidos, las sPLA2 muestran una serie de acciones biológicas que puede ser dependiente o independiente de la catálisis. Presentan propiedades farmacológicas variadas que incluyen miotoxicidad, formación de edema, neurotoxicidad presináptica o post-sináptica, cardiotoxicidad y agregación plaquetaria⁸⁶.

Para conocer el contenido de las estructuras secundarias de las proteínas nativas y recombinantes se calculó mediante espectroscopia de dicroísmo circular (CD). Los espectros de la PLA2 nativa y las isoformas recombinantes se registraron a temperatura ambiente en celdas de cuarzo (1 mm), desde una longitud de onda que variaba de 190 a 260 nm usando un espectropolarímetro Jasco J-710 (Jasco, Japón). Los datos se registraron cada 1 nm a una velocidad de 20 nm / min. Cada proteína se disolvió en 60% de trifluoroetanol hasta una concentración de 0.6 mg / ml. Los valores de CD corresponden a la media de tres lecturas de CD. Finalmente, los porcentajes de estructura secundaria se analizaron usando los algoritmos alojados en línea en el servidor web K2D3 (<http://cbdm-01.zdv.uni-mainz.de/~andrade/k2d3/>).

Los espectros de CD de las fosfolipasas nativas y recombinantes mostraron una alta absorción de estructura secundaria de alfa hélice y un contenido relativamente bajo de hojas beta (Figura 51). De acuerdo con un programa de deconvolución de CD, el contenido de la estructura secundaria fue 90.2, 87.8, 90.1, 90.5% y 0.5, 0.4, 0.5, 0.5%, de α -hélice y β -hojas, respectivamente, para la PLA2 nativa y las tres isoformas de la PLA2 recombinante, respectivamente. Hasta ahora, todas las PLA2 del veneno de serpientes contienen una mayor proporción de α -hélice, que se caracteriza por tener una banda positiva a 198 nm y elipticidades negativas a 208-222 nm. Aquí, la isoforma 1 de PLA2, ver figura 49, mostró el porcentaje más bajo de α -hélice y, en función de su espectro de CD, su estructura secundaria podría ser ligeramente diferente de la PLA2 nativa. En general, las PLA2 recombinantes se asemejan a las estructuras secundarias canónicas de PLA2 de veneno de serpientes⁸⁷.

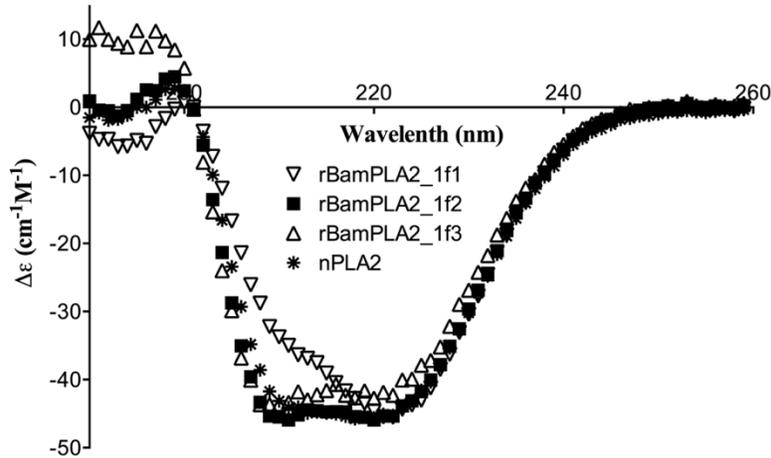


Figura 51. Dicroísmo circular de PLA2 nativa e isoformas de PLA2 recombinante. El análisis de la estructura secundaria reveló un contenido mayor de α -hélice que el de hojas- β .

Una de las actividades farmacológicas menos estudiadas es la actividad antibacteriana, por lo que se evaluó este tipo de actividad en la PLA2, realizando una mezcla de las tres isoformas obtenidas en el plegamiento, Figura 49. La hidrólisis de los componentes fosfolipídicos de la membrana celular bacteriana por acción de las PLA2s está involucrada en la muerte tanto de bacterias Gram-positivas como Gram-negativas. La eficacia antibacteriana de las PLA2s depende significativamente de las cargas positivas presentes en la superficie de la enzima, puesto que son estos cationes de las PLA2 los que tienen la capacidad de penetrar en la pared celular de bacterias Gram-positivas⁴². Por otro lado, la eficacia antibacteriana contra las bacterias Gram-negativas depende de la presencia de ciertos residuos de aminoácidos presentes en la región que abarca la hélice alfa en el extremo N-terminal y cerca de la estructura denominada alfa beta de la PLA2⁸⁸.

Se realizaron ensayos de susceptibilidad bacteriana con la PLA2 recombinante plegada, por medio de difusión radial en placas de agar Muller-Hinton, de acuerdo a la metodología en el apartado 5.9.2. Las pruebas se hicieron sobre la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y se utilizó la PLA2 recombinante en diferentes concentraciones, y en un volumen final de 5 μ l, utilizando como control positivo ampicilina a 2.9 μ M. En la figura 52 se observa que con una concentración de 250 μ M hay inhibición del crecimiento de la bacteria.

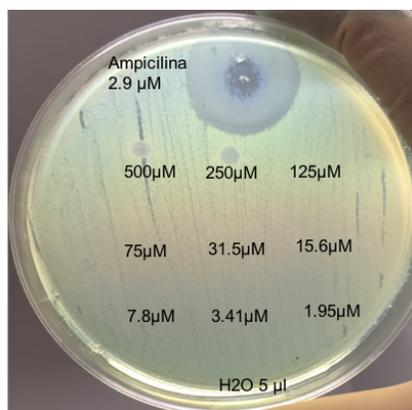


Figura 52. Determinación de susceptibilidad antimicrobiana de PLA2 recombinante, mediante ensayos de placa de agar Muller Hinton contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. PLA2 recombinante a diferentes concentraciones μM ; control positivo ampicilina $2.9 \mu\text{M}$ y control negativo H_2O $5 \mu\text{L}$.

Para conocer con que tipos de fosfolípidos interactúan las PLA2s nativa y recombinante, se utilizó una membrana hidrofóbica que fue tratada con 100 pmol de ocho fosfoinosítidos diferentes y otros siete lípidos de importancia biológica. Dichos fosfolípidos se utilizan para determinar cómo interactúa la proteína de interés con uno o más de estos fosfolípidos en un simple ensayo de superposición. La proteína unida se detecta mediante un anticuerpo contra la proteína.

En la figura 53A, se observa que la PLA2 recombinante interacciona muy fuertemente con ácido fosfatídico (PA), que es uno de los componentes principales de las membranas celulares con importantes funciones biofísicas, metabólicas y de señalización. También interacciona con los diferentes tipos de fosfatidil inositol. La PLA2 nativa, figura 53B, además de interaccionar con los mismos lípidos que la PLA2 recombinante, también lo hace con el ácido linfofosfatídico (LPA), que es un derivado de fosfolípido que puede actuar como una molécula de señalización.

Es importante recordar que la PLA2 nativa presenta seis aminoácidos diferentes con respecto a la PLA2 recombinante, (ver figura 25), por tal motivo la interacción con los fosfolípidos puede cambiar, ya que se tratan de dos fosfolipasas diferentes.

El mayor reconocimiento fue para los diferentes tipos de fosfatidilinositoles, los cuales forman parte de las membranas celulares, este fosfolípido es importante en el anclaje de varias proteínas.

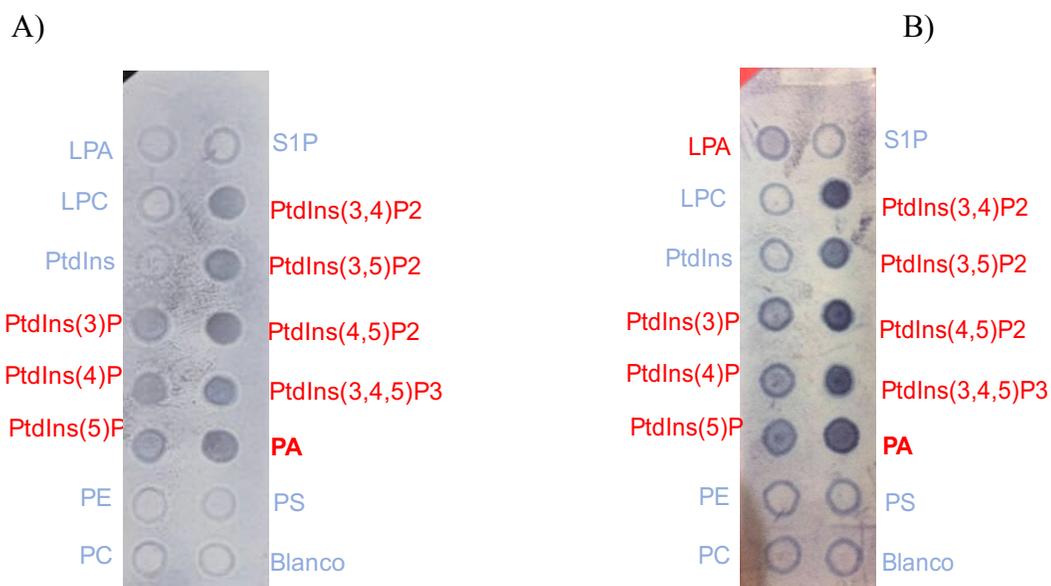


Figura 53. Membranas tratadas con diferentes tipos de lípidos, para determinar que tipo de fosfolípidos interactúan con las PLA2s. A) incubación de la membrana con PLA2 recombinante; y B) incubación de la membrana con PLA2 nativa. Se usó como anticuerpo primario IgG de caballo anti PLA2 recombinante y como anticuerpo secundario un anti caballo.

6.5. Librería de cDNA de la glándula venenosa de *B. ammodytoides*

En la última década, los análisis transcriptómicos de las glándulas de veneno han ayudado a comprender la composición de varios venenos de serpientes con gran detalle. El análisis transcriptómico es una poderosa herramienta para entender el perfil del veneno, la variación y su evolución. Estos análisis han contribuido de varias maneras como: 1) determinar la composición del veneno; 2) identificar nuevas toxinas que pueden ayudar en el desarrollo de herramientas de investigación y/o agentes terapéuticos; y 3) correlacionar síntomas patológicos específicos de envenenamiento con toxinas individuales⁸⁹.

Con el fin de conocer los diferentes genes que se expresan en las glándulas productoras del veneno de *B. ammodytoides*, se realizó una librería de cDNA de la glándula venenosa. Esta información permitiría identificar nuevos candidatos potenciales para ser utilizados como agentes terapéuticos contra diferentes enfermedades. En este trabajo, además de la expresión de proteasas y una fosfolipasa, se reporta la generación y caracterización de bibliotecas de cDNA correspondientes a *Bothrops ammodytoides*.

Se obtuvieron 1,556 clonas en la construcción de la librería, de las cuales se aislaron 350 para su análisis por PCR de colonias. 62 de ellas tuvieron un tamaño esperado, por encima de 800 pb, ya que bandas de 500 pb eran debidas a la auto ligación del vector que se

usó para la construcción de la librería. Se purificaron los plásmidos de las 62 colonias positivas, y se enviaron a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología UNAM. Las secuencias obtenidas se analizaron manualmente, usando la base de datos de NCBI mediante Blastx. El análisis arrojó información referente a 40 transcritos que codificaban para familias proteicas propias del veneno de serpientes, entre ellos un péptido sin actividad enzimática. La Tabla 11 muestra la identidad de cada clona, mostrando abundancia en transcritos para PLA2.

Una de las familias proteicas más abundantes en el análisis, fue la PLA2, con 36 transcritos, y es importante anotar que 8 de ellos mostraron secuencias diferentes. La abundancia de la familia PLA2 arrojado por el análisis de esta librería podría deberse a varios puntos:

1. El tiempo de extracción de la glándula, debido a que 4 días antes había sido ordeñado el veneno y muy probablemente en ese momento la mayor expresión de transcritos correspondía a las PLA2s
2. El almacenamiento de la glándula no fue la adecuada ya que fue transportada de Argentina a México, y el tiempo que se mantuvo a temperatura ambiente pudo afectar algunos transcritos de proteínas de mayor tamaño, ya que en algunas proteínas se ha reportado que algunas proteínas pueden presentar baja termoestabilidad.
3. Finalmente, el resultado de la librería pudiera indicar que la glándula de veneno de *B. ammodytoides*, si presenta un mayor porcentaje de transcritos que codifican para PLA2.

Tabla 11. Análisis de clonas individuales obtenidas de la librería de cDNA

| | | | | | |
|-------|-------------------------|-----|-------------------------------------|-----|--------------------------|
| Clona | Transcritos | 121 | Metaloproteasa | 281 | hemoglobina |
| | | 122 | PLA2 | 283 | hemoglobina |
| 9 | RNA ribosomal 16s | 124 | PLA2 | 285 | PLA2 |
| 10 | Catenin Beta 1 (CTNNB1) | 125 | Metaloproteasa | 292 | PLA2 |
| 11 | DNA mitocondrial | 126 | PLA2 | 293 | PLA2 |
| 18 | PLA2 | 128 | Metaloproteasa | 300 | PLA2 |
| 20 | PLA2 | 129 | Sentrin peptidasa | 306 | Translocasa |
| 29 | PLA2 | 130 | PLA2 | 335 | proteasoma subunidad 26S |
| 30 | PLA2 | 131 | Hemoglobina | | |
| 31 | Cadena ligera 5 miosina | 134 | Hemoglobina | | |
| 33 | PLA2 | 157 | PLA2 | | |
| 41 | PLA2 | 165 | PLA2 | | |
| 43 | Villin-like | 174 | Miosina | | |
| 44 | Hemoglobina | 175 | Miosina | | |
| 45 | Miosina | 176 | PLA2 | | |
| 46 | PLA2 | 177 | PLA2 | | |
| 48 | Hemoglobina | 181 | PLA2 | | |
| 53 | PLA2 | 191 | PLA2 | | |
| 94 | PLA2 | 196 | Hemoglobina | | |
| 100 | PLA2 | 199 | PLA2 | | |
| 107 | PLA2 | 218 | Miosina | | |
| 110 | PLA2 | 219 | PLA2 | | |
| 111 | PLA2 | 220 | PLA2 | | |
| 112 | Hemoglobina | 231 | PLA2 | | |
| 113 | PLA2 | 242 | PLA2 | | |
| 116 | Dominio L24ribosomal | 246 | Miosina | | |
| 118 | PLA2 | 268 | Péptido potenciador de bradiquinina | | |
| 119 | PLA2 | 276 | PLA2 | | |

6.6. Reconocimiento inmunológico de proteínas recombinantes y venenos completos por IgG de caballos y anticuerpos de conejos

6.6.1. Cuantificación del nivel de reconocimiento de los anticuerpos por los antígenos mediante inmunoensayo enzimático ligado a enzima (ELISA).

Varios estudios han determinado que los venenos de las diferentes especies de la familia Viperidae muestran variaciones bioquímicas, toxicológicas, así como inmunológicas, no solo a nivel de género o especie sino a nivel individual. Estas variaciones quizá estén relacionadas a factores ambientales tal como clima, geografía y disponibilidad de comida, entre otras. Sin embargo, en los venenos existen familias de proteínas con alta identidad, lo que permite la reactividad inmunológica no específica, que se observa en un antiveneno contra un veneno no usado como inmunógeno⁹⁰.

Los sueros utilizados para los antivenenos con fines terapéuticos son preparados de caballos por inoculación de veneno completo. Sin embargo, el veneno es una mezcla compleja de antígenos, de los cuales no todos son importantes para la producción de anticuerpos neutralizantes. Por lo tanto, la identificación de las proteínas principales en los venenos se vuelve primordial para desarrollar antivenenos más eficientes o su uso como antígenos para evaluar el nivel de reconocimiento en las interacciones antígeno-anticuerpo.

La expresión heteróloga podría resultar útil en la producción de toxinas activas y/o toxoides similares a los de venenos de animales ponzoñosos, los cuales podrían usarse para la inmunización de animales. Si estas proteínas recombinantes producen anticuerpos con capacidad de reconocimiento y además neutralizantes que sean idénticos a los obtenidos por la inmunización con venenos nativos, la producción y estandarización de antivenenos podría facilitarse enormemente, ya que uno de los pasos limitantes en la producción es la adquisición de cantidades suficientemente grandes de venenos de alta calidad y/o fracciones de veneno para inmunización, evaluación del título y pruebas de eficacia funcional ⁹¹.

Las proteínas recombinantes obtenidas en este trabajo se utilizaron para inmunizar tanto a caballos como a conejos para generar anticuerpos y probar su inmunogenicidad. Se realizaron ensayos de ELISA para evaluar el nivel de reconocimiento que presentan los anticuerpos contra las diferentes enzimas recombinantes, así como de venenos completos de otras especies de serpientes de la familia Viperidae.

La técnica de ELISA se basa en la detección de un antígeno inmovilizado en una fase sólida mediante anticuerpos acoplados a una enzima agregando un sustrato que genera una señal colorida cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro (Abs 405 nm).

Se sensibilizaron placas Maxisorb (NUNCTTM thermo scientific) con 100 μ L por pozo de una solución 5 μ g/mL (500 ng/pozo) de venenos tanto de *Bothrops ammodytoides* como de otras especies de *Bothrops* o proteína recombinante (PLA2, serinoproteasa o metaloproteasa) en amortiguador de carbonatos 100 mM pH 9.6. Los diferentes anticuerpos se diluyeron 1:10 en la primera columna y a partir de ahí se hicieron diluciones 1:3 hasta la columna 10.

Los valores fueron calculados utilizando el programa Graph Pad Prism (v. 6.0c). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 405 nm en un lector de microplacas (Tecan Sunrise IVD versión).

Los títulos se definieron como la dilución de anticuerpos a la cual se alcanza el 50% de la absorbancia máxima.

Los títulos absolutos se definen como los que se obtienen a partir de la dilución de los antivenenos, independientemente de la concentración de proteínas en los mismos. Son una medida de la actividad total de los anticuerpos por dosis. Los títulos indican el valor de la dilución en el punto medio de la máxima respuesta, dicho de otra manera, el punto de inflexión de la sigmoide resultante.

Los antivenenos comerciales utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

-El antiveneno argentino fue el *Bothrops* bivalente liofilizado, donde los inmunógenos utilizados fueron los venenos de *Bothrops alternatus* y *Bothrops diporus* (Instituto Nacional de Microbiología Dr. Carlos G. Malbrán, Industria Argentina, Buenos Aires, Argentina). Este antiveneno es utilizado en Argentina para el tratamiento por envenenamiento por mordedura de serpiente de la familia Viperidae y reconoce bien a los componentes del veneno de *B. ammodytoides*.

-El antiveneno mexicano Antivipmyn® Faboterápico® polivalente antiofídico liofilizado, donde los inmunógenos utilizados fueron los venenos de *B. asper* y *C. simus*. Fue utilizado para ver si existía reconocimiento de los anticuerpos con las proteínas recombinantes no utilizadas como inmunógenos.

Por otro lado, contábamos con anticuerpos de conejo específicos para crotolina serinoproteasa y metaloproteasa provenientes del veneno de la especie *Crotalus simus*, obtenidos por inmunopurificación en el desarrollo de la tesis doctoral, por el M. en Biotec. Edgar Neri. Dichos anticuerpos se utilizaron para evaluar el nivel de reconocimiento de las proteínas recombinantes y conocer la reacción cruzada entre distintos géneros.

Las IgG de caballo anti-PLA2 y serinoproteasa recombinantes, fueron fraccionadas por precipitación de ácido caprónico por el Dr. Adolfo de Roodt en el Instituto Nacional de Microbiología Dr. Carlos G. Malbrán, Industria Argentina, Buenos Aires, Argentina.

Finalmente, se generaron anticuerpos de conejo con la mezcla de proteínas recombinantes y las IgG fueron precipitadas del suero sanguíneo con ácido caprónico.

6.6.2. Títulos de anticuerpos por ELISA de los antivenenos comerciales Bivalente argentino y Antivipmyn mexicano, usando como antígenos veneno de *B. ammodytoides* y proteínas recombinantes

En la Figura 54 se observa que el antiveneno bivalente presenta un título de anticuerpos de 56,755 contra el veneno de *Bothrops ammodytoides*, veneno que no es utilizado como inmunógeno para la elaboración del antiveneno. Sin embargo, esto indica que existe una reacción cruzada con los epítopes de los componentes del veneno de *B. ammodytoides* con los venenos utilizados como inmunógenos en el antiveneno, debido a que fueron reconocidos por los anticuerpos no específicos. Para el caso de PLA2, serinoproteasa y metaloproteasa recombinantes los títulos fueron 976, 690 y 117, respectivamente. El reconocimiento con las proteínas recombinantes fue muy bajo; es probable que debido a que son componentes individuales, puede que no existan grandes cantidades de anticuerpos para estas proteínas y por lo tanto no haya un alto reconocimiento.

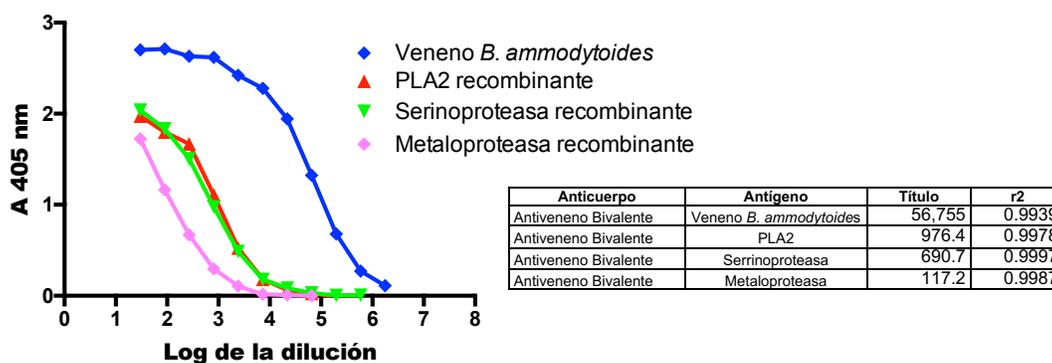


Figura 54. Títulos de anticuerpos del antiveneno Bivalente contra las diferentes proteínas recombinantes de *Bothrops ammodytoides* y su veneno completo.

En la Figura 55 se observan los títulos del antiveneno mexicano Antivipmyn con veneno completo de *B. ammodytoides* y proteínas recombinantes. Antivipmyn presenta un título de 22,285 contra el veneno de *B. ammodytoides*, estos resultados indican que existe reconocimiento cruzado hacia los componentes de dicho veneno, a pesar de que no es un veneno utilizado como inmunógeno para el antiveneno. Para el caso de la PLA2 recombinante, se mostró un buen reconocimiento por parte de Antivipmyn, el título fue de 9,455, lo que puede indicar que los anticuerpos producidos contra PLA2 de especies mexicanas presentan epítopes compartidos con la PLA2 recombinante de *B. ammodytoides*, una especie argentina, pese a que la proteína no está bien plegada. Para el caso de las proteasas recombinantes, el título fue de 130 para serinoproteasa y 69 para metaloproteasa, tales valores son bajos indicando que tal vez no haya reacción cruzada con los componentes de los venenos usados como inmunógenos en el antiveneno.

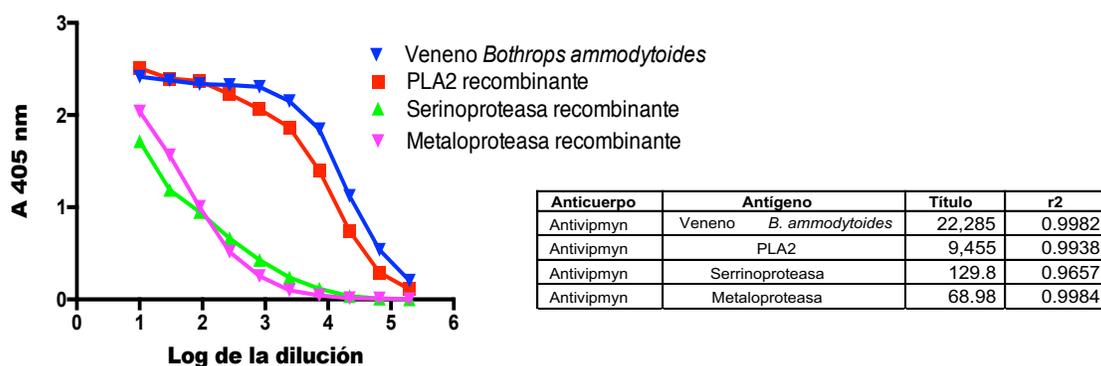


Figura 55. Títulos de anticuerpos del antiveneno Antivipmyn contra las diferentes proteínas recombinantes de *Bothrops ammodytoides* y su veneno completo.

6.6.3. Evaluación por ELISA de los títulos de anticuerpos de conejo anti crotoxina, serinoproteasa y metaloproteasa de *Crotalus simus*, usando como antígenos veneno de *B. ammodyoides* y proteínas recombinantes.

La figura 56 muestra los títulos de anticuerpos elaborados en conejo, específicos contra crotoxina, serinoproteasa y metaloproteasa provenientes de *Crotalus simus*. Se analizaron estos anticuerpos para conocer si existía reacción cruzada con los componentes del veneno completo de *Bothrops ammodyoides*, puesto que, aunque pertenecen a la misma familia (Viperidae), el género es diferente.

Para el caso de la anti-crotoxina se observa un título muy bajo de 33, o quizá es un valor inespecífico de la técnica. Lo que indica que los epítopes de las PLA2s no se comparten, y esto puede deberse a que PLA2 utilizada como inmunógeno es de tipo neurotóxica y la del veneno de *Bothrops ammodyoides* no presentan dicha actividad, de manera que los anticuerpos no presentan reacción cruzada con ellas.

Para el caso de los anticuerpos anti-serinoproteasa el título fue de 4,252. Es importante anotar que las serinoproteasas de diferentes especies de la familia Viperidae son muy conservadas entre si, presentando identidades por arriba del 75%, y que esto sea el motivo de los valores de títulos obtenidos.

Para los anticuerpos anti-metaloproteasas de *Crotalus simus*, el título fue de 23,955, lo cual indica que el reconocimiento de estos anticuerpos se debe a que pueden presentar epítopes compartidos hacia las metaloproteasas del veneno de *Bothrops ammodyoides*.

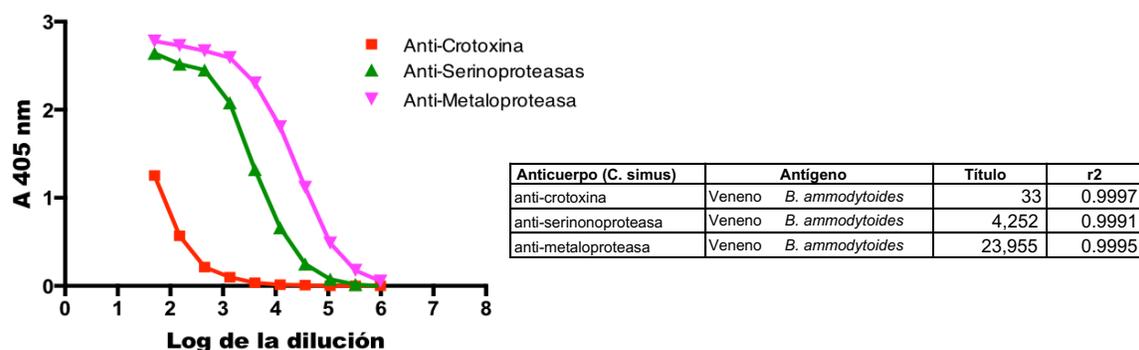


Figura 56. Títulos de anticuerpos de conejo anti-crotoxina, anti-serinoproteasa y anti-metaloproteasa específicos para *Crotalus simus* contra veneno completo de *Bothrops ammodyoides*.

En la figura 57 se muestran los títulos de 9,822 de los anticuerpos de conejo anti-crotoxina de *Crotalus simus* contra la crotoxina usada como inmunógeno. Para el caso de los anticuerpos anti-crotoxina no se presentó reconocimiento contra la PLA2 recombinante de *Bothrops ammodytoides*, esto puede deberse a que no comparten epítopes, a pesar de que la identidad de la crotoxina, y de la PLA2 recombinante es del 52%.

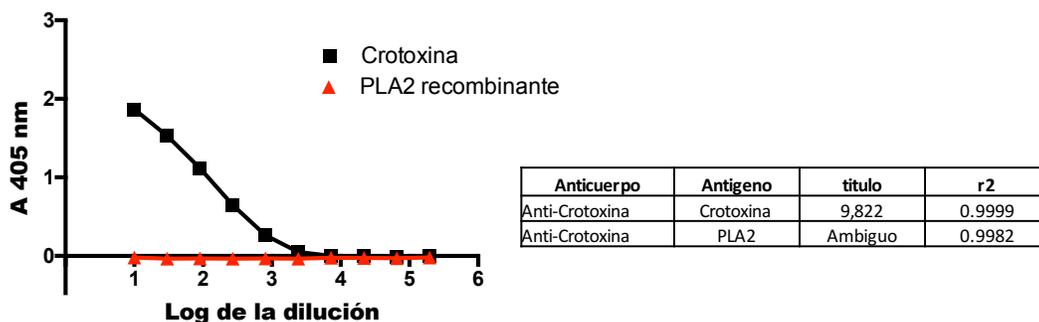


Figura 57. Títulos de anticuerpos de conejo anti-crotoxina. Contra la crotoxina de *C. simus* y PLA2 recombinante de *B. ammodytoides*.

En la figura 58 se muestra un ensayo de ELISA para determinar el reconocimiento de los anticuerpos de conejo específicos anti-serinoproteasa de *Crotalus simus*, hacia la serinoproteasa recombinante de *Bothrops ammodytoides*, como antígeno. El título de anticuerpos de conejo anti-serinoproteasa de *Crotalus simus* es de 146, es un título muy bajo considerando que la identidad de las proteínas está por arriba del 75%; sin embargo es probable que los epítopes de la serinoproteasa recombinante no se compartan con los de la serinoproteasa de *Crotalus simus*, debido a que en la producción de anticuerpos contra serinoproteasa de *Crotalus simus* se utilizó como inmunógeno proteína en su forma nativa, que posiblemente no va a reconocer a la serinoproteasa recombinante que se encuentra desnaturalizada y en su forma no nativa

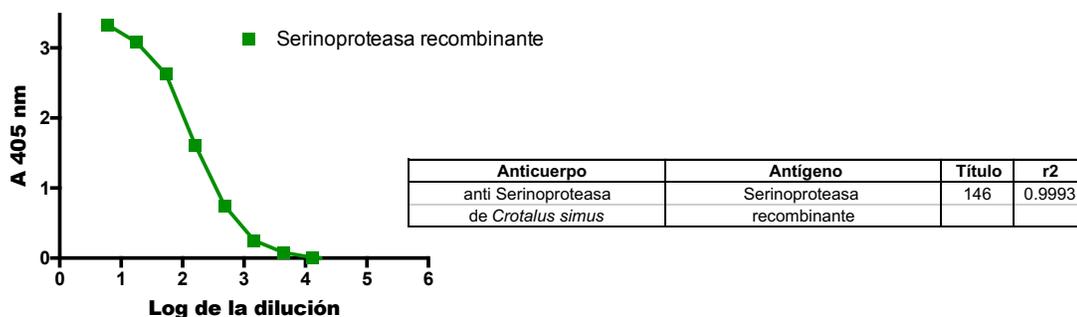


Figura 58. Títulos de anticuerpos de conejo anti-serinoproteasa de *Crotalus simus* contra serinoproteasa recombinante de *Bothrops ammodytoides*.

En la Figura 59 se muestra que no existió reconocimiento de la metaloproteasa recombinante de *Bothrops ammodytoides* utilizando anticuerpos anti-metaloproteasa de *Crotalus simus*. Lo que indica que esta metaloproteasa no presenta epítopes compartidos con la metaloproteasa recombinante de *B. ammodytoides* y la de *C. simus*.

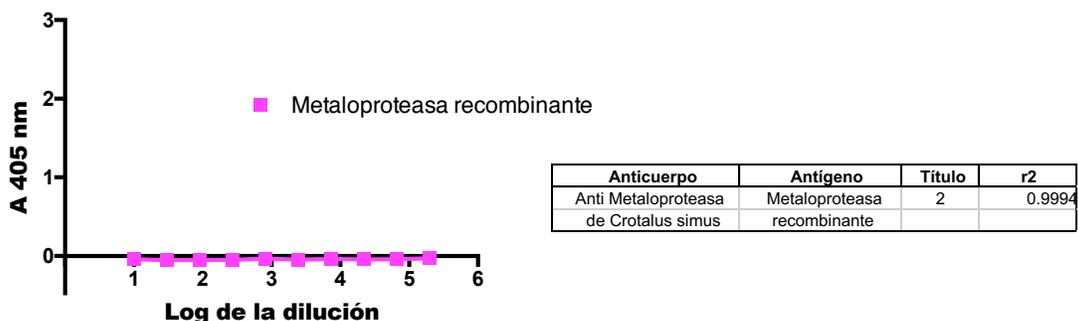


Figura 59. Títulos de anticuerpos de conejo anti-metaloproteasa de *Crotalus simus* contra metaloproteasa recombinante de *Bothrops ammodytoides*.

Las proteínas de ésta y otras especies de venenos son grandes mosaicos antigénicos, por lo que presentan diferentes epítopes que quizá no sean bien reconocidos por los anticuerpos y esto implica su baja afinidad. Estos resultados muestran que existe una gran diferencia entre las enzimas (serinoproteasas, metaloproteasas, fosfolipasas) de los venenos de los géneros *Bothrops* y *Crotalus*. Aunque ambas especies pertenecen a la familia Viperidae y las fosfolipasas, metaloproteasas y serinoproteasas son las proteínas más abundantes en esos venenos, hay que tener cuidado con las propiedades inmunogénicas de cada una de ellas, si es que se desea enriquecer a los antivenenos con estas enzimas.

6.6.4. Análisis de las IgG de caballo anti PLA2 recombinante.

Como se ha venido mencionando los venenos de las serpientes son mezclas complejas de moléculas con gran variedad de actividades biológicas. El 95% de los venenos son de naturaleza proteica. Para comparar los venenos de las diferentes especies sudamericanas y una mexicana, así como a la PLA2 recombinante, se realizó un gel de poliacrilamida al 15% (Figura 60 A), en el cual se observa el patrón electroforético de los venenos con bandas de baja, mediana y alta masa molecular. En el carril 1 se colocó la PLA2 recombinante, presenta una masa molecular aparente de 15,000 Da. La flecha roja indica a esa altura una banda de mayor intensidad lo cual puede corresponder a las PLA2 en venenos de la familia Viperidae. El patrón electroforético de los venenos de *B. ammodytoides* y *B. asper* presenta gran similitud entre los dos venenos. Las bandas que se encuentran en la masa molecular que corresponde a la PLA2 son en tamaño y proporción muy parecidas.

Para observar el reconocimiento de las PLA2s en los diferentes venenos de serpientes, se realizó un Western blot, utilizando como primer anticuerpo IgG de caballo anti PLA2 recombinante. En la figura 60 B) se observa que las PLA2s en los distintos venenos son altamente reconocidas por las IgG de caballo anti PLA2 recombinante, que es demostrado por la intensidad de las bandas.

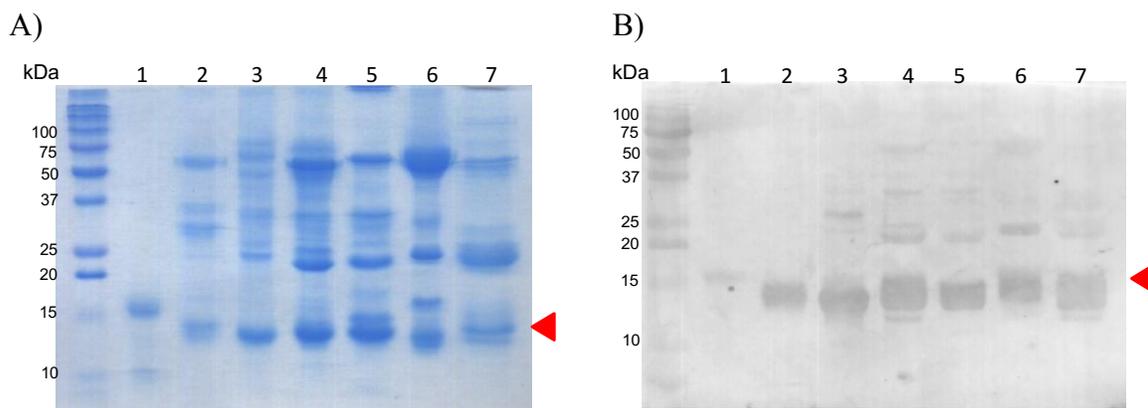


Figura 60. Identificación y reconocimiento de PLA2 en diferentes venenos de serpientes. A) Gel SDS-PAGE 15 % de diferentes venenos de serpiente y PLA2 recombinante B) Western blot usando como anticuerpo IgG de PLA2 recombinante 1:1,000. En cada carril se muestran los diferentes venenos 1. PLA2 recombinante 2. Veneno completo de *Bothrops ammodytoides* 3. Veneno completo de *Bothrops jararacussu* 4. Veneno completo de *Bothrops diporus* 5. Veneno completo de *Bothrops moojeni* 6. Veneno completo de *Bothrops alternatus* 7. Veneno completo de *Bothrops asper*. Con flecha se marca la masa molecular aparente de 14,000 Da para PLA2 recombinante y de 15,000 Da para las PLA2s en los distintos venenos.

En la figura 61, se observa que las IgG de caballo reconocen específicamente a la PLA2 recombinante usada como inmunógeno, con un título de 28,077. Para el caso del veneno de *Bothrops ammodytoides* el título obtenido fue de 803, con los venenos de otras especies del género *Bothrops* el reconocimiento es bajo lo que puede indicar que la PLA2 recombinante no presenta epítopes compartidos con otras especies del mismo género. No obstante, el título de anticuerpos contra el veneno de *Bothrops asper* es de 2,012, lo que podría sugerir que el reconocimiento de la PLA2 recombinante de *B. ammodytoides*, si comparte epítopes con la PLA2 de *B. asper*, siendo esta una especie de serpiente con una amplia distribución en México y Centro América.

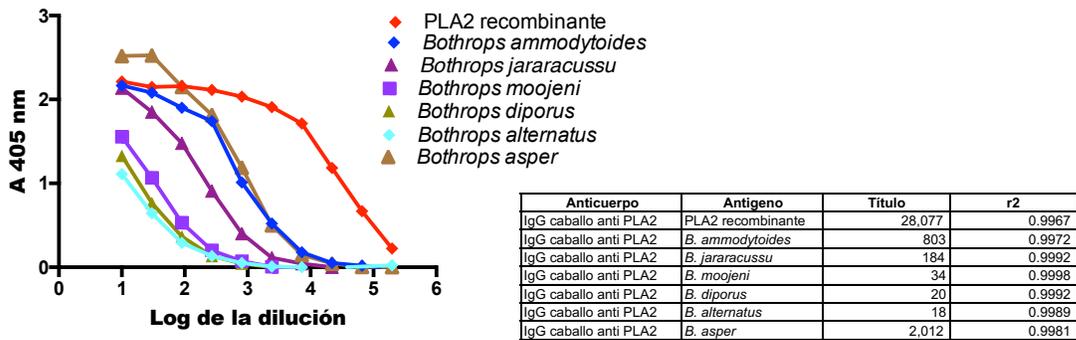


Figura 61. Títulos de anticuerpos de IgG de caballos anti-PLA2 recombinante contra diferentes venenos de especies del género *Bothrops*.

Considerando que no existe relación entre el nivel de reconocimiento de los anticuerpos anti PLA2 recombinante en el ensayo por Western blot y en ELISA, esto puede deberse a que en el caso de la técnica por Western blot, los venenos sufren un proceso de reducción con 2-Mercaptoetanol y desnaturalización por calor, es decir las proteínas se encuentran en su forma desplegada y los anticuerpos producidos contra la PLA2 recombinante se obtuvieron con proteína no bien plegada, por lo que para este caso los epítopes están más expuestos a los anticuerpos y son similares; por tal motivo en Western blot, si se muestra un alto nivel de reconocimiento. No obstante, en la técnica de ELISA los venenos se colocaron en sus condiciones nativas de plegamiento, en donde las proteínas muestran patrones distintos a las proteínas reducidas, por lo que quizá los epítopes no se encuentran expuestos y por lo tanto no son bien reconocidos por los anticuerpos. Para el caso de *B. asper* el título de 2,012 puede indicar que existe un epítipo expuesto muy similar al de la PLA2 recombinante.

Para un análisis más detallado de los anticuerpos se decidió explorar si las IgG de caballo anti PLA2 recombinante podían inhibir la actividad enzimática de la PLA2 en el veneno de *B. ammodytoides*. Por lo que se realizó un ensayo de actividad de fosfolipasa en placa rodamina-yema de huevo-agar (Figura 62).

El ensayo consistió en colocar una cantidad constante de veneno completo de *B. ammodytoides* (15µg) con diferentes concentraciones de IgG de caballo anti PLA2 recombinante. Las concentraciones de IgG fueron 50µg, 100µg, 150µg y 200 µg, se incubó por 1h a 37°C. El control positivo fue veneno completo de *B. ammodytoides*, en el pozo 1 se colocó veneno completo incubado por 1h a 37°C. El control negativo fue PBS1x. Después de una hora de incubación se midieron los halos de hidrólisis. Se observa que en los pozos 2, 3, 4 y 5 existe una disminución de el halo de hidrólisis, 1.2 cm, 1.1 cm, 1.1 cm y 1 cm de diámetro respectivamente, con respecto al control positivo y al pozo 1 que es veneno

completo de *B. ammodytoides* incubado a 37°C, en todos los casos los halos midieron 1.5 cm de diámetro, esto nos pudiera estar indicando que a pesar de que el título de anticuerpos fue bajo contra el veneno de *B. ammodytoides* apenas de 803, los anticuerpos que se encuentran están reconociendo a la parte catalítica de la PLA2, motivo por el cual se muestra disminución en la actividad enzimática de la PLA2 de *B. ammodytoides*.

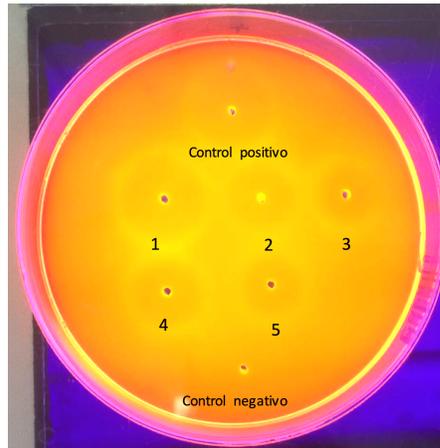


Figura 62. Ensayo de inhibición de PLA2 en placa rodamina-yema de huevo-agar utilizando IgG de caballo anti PLA2 recombinante. El control positivo fue veneno completo de *B. ammodytoides* y el negativo PBS1x

Debido al resultado anterior, se decidió realizar un ensayo de inhibición de actividad de PLA2 por el método titulométrico que consistió en colocar veneno completo de *B. ammodytoides* (15µg) con 200µg de IgG de caballo anti PLA2 recombinante. Se incubó por 1h a 37°C.

Los resultados mostraron que la actividad específica de fosfolipasa A2 del veneno de *B. ammodytoides* es de 51 U/mg y de la inhibición con IgG de caballo es de 27.6 U/mg (Figura 63). Esto indica que las IgG de caballo anti-PLA2 recombinante si están inhibiendo la parte catalítica de la PLA2.

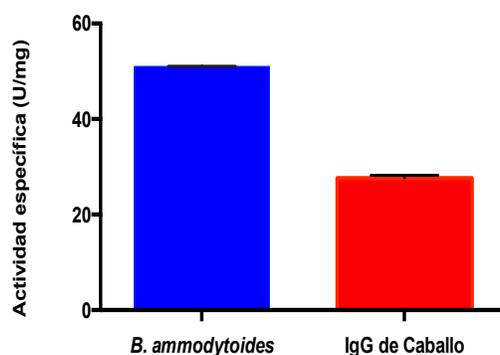


Figura 63. Ensayo titulométrico de actividad PLA2 del veneno de *B. ammodytoides* y de la inhibición del mismo veneno con IgG de caballo anti-PLA2 recombinante. La actividad específica se da en U/mg = μ moles de NaOH consumidos por minuto por miligramo de veneno. Las barras de error representan desviación estándar de tres experimentos.

Por otro lado, en la Figura 64 se muestra la neutralización hemolítica completa y parcial del veneno de *B. ammodytoides* en presencia del antiveneno Bivalente (*B. diporus* y *B. alternatus*), y en presencia de anti-PLA2 recombinante. Estos datos demuestran que la PLA2 recombinante podría ser un inmunógeno adecuado para aumentar los anticuerpos anti-PLA2, así como para disminuir la actividad hemolítica de las fosfolipasas bothrópicas al menos para el veneno de *B. ammodytoides*.

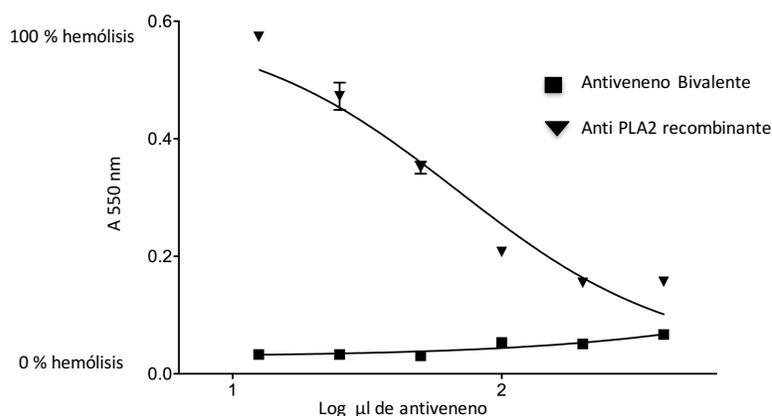


Figura 64. Neutralización hemolítica completa y parcial del veneno de *B. ammodytoides* en presencia del antiveneno bivalente de *Bothrops* (*B. diporus* y *B. alternatus*), y en presencia de anti-PLA2 recombinante.

6.6.5. Análisis de las IgG de caballo anti serinoproteasa recombinante

Para evaluar el reconocimiento de serinoproteasas en los diferentes venenos de serpientes, se realizó un western blot, utilizando como primer anticuerpo IgG de caballo anti serinoproteasa recombinante. En la figura 65 B) se observa que las serinoproteasas en los distintos venenos son altamente reconocidas por las IgG de caballo anti serinoproteasa recombinante.

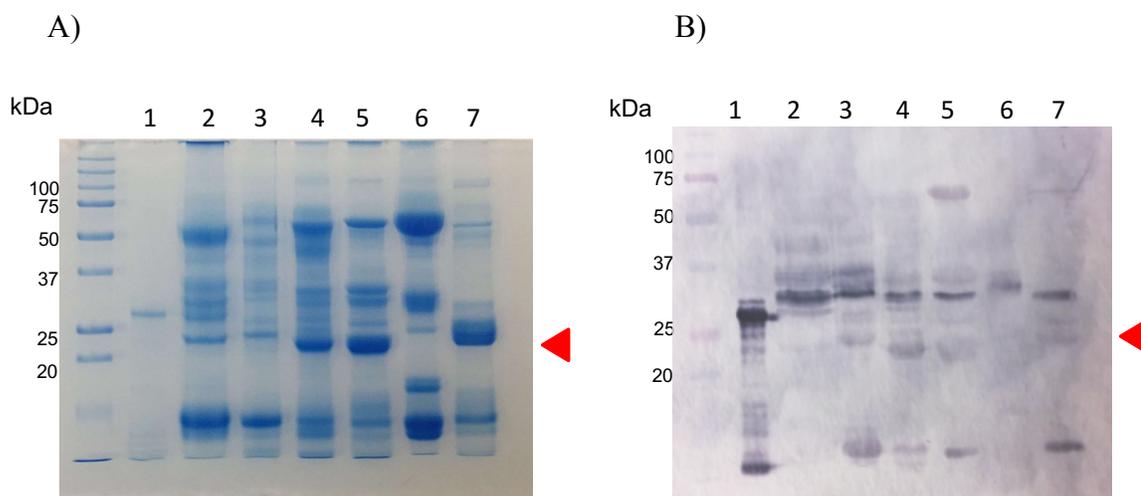


Figura 65. Identificación y reconocimiento de serinoproteasas en diferentes venenos de serpientes. A) Gel SDS-PAGE 12 % de diferentes venenos de serpiente y serinoproteasa recombinante B) western blot usando como anticuerpo IgG de serinoproteasa 1:1,000. En cada carril se muestran los diferentes venenos, 1. serinoproteasa recombinante 2. Veneno completo de *Bothrops ammodytoides* 3. Veneno completo de *Bothrops jararacussu* 4. Veneno completo de *Bothrops diporus* 5. Veneno completo de *Bothrops moojeni* 6. Veneno completo de *Bothrops alternatus* 7. Veneno completo de *Bothrops asper*. Con flecha se marca la masa molecular aparente de 25,000 Da para serinoproteasa recombinante.

En la figura 66, se observa que las IgG de caballo anti serinoproteasa presentan un título de 1,264 un título muy bajo considerando que se está utilizando a la serinoproteasa recombinante como inmunógeno. Para el caso de los venenos analizados no muestran reconocimiento ya que el valor del título es muy bajo. Este resultado puede estar indicando dos cosas:

- 1.- La serinoproteasas recombinante no es un buen inmunógeno para la generación de anticuerpos en caballos y,
- 2.- Que no existe reacción cruzada con la serinoproteasa recombinante, debido a que no presentan epítopes compartidos con las serinoproteasas de los distintos venenos analizados del género *Bothrops*.

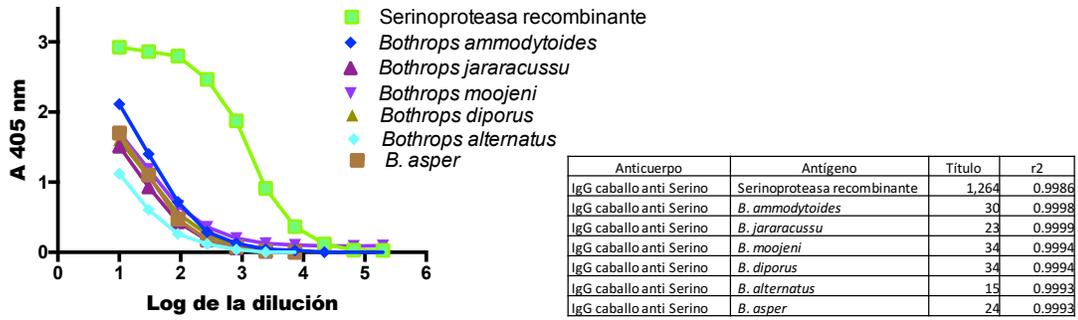


Figura 66. Títulos de anticuerpos de IgG de caballos anti-serinoproteasa recombinante contra venenos de diferentes especies del género *Bothrops*.

Para mostrar que las IgG de caballo anti serinoproteasa recombinante podían inhibir la actividad enzimática de la serinoproteasa en el veneno de *B. ammodytoides*, se realizó un zimograma de inhibición de proteasa con gelatina (Figura 67).

El ensayo consistió en colocar una cantidad constante de veneno completo de *B. ammodytoides* (15µg) a distintas concentraciones de IgG de caballo anti serinoproteasa recombinante. Las concentraciones de IgG fueron 50, 100, 150 y 200 µg, se incubó por 1h a 37°C. El control positivo (+) fue veneno completo de *B. ammodytoides*, en el pozo 1 se colocó veneno completo incubado por 1h a 37°C. El control negativo fue PBS1x. Después de una hora de incubación se cargó en el gel. Se observa que en los pozos 2, 3, 4 y 5 existe una disminución en el halo de hidrólisis, entre los 30 y 40 KDa, con respecto al control positivo y al pozo 1 que es veneno completo de *B.ammodytoides*, incubado a 37°C, esto pudiera indicar que a pesar de que el título de anticuerpos es muy bajo, ver Figura 66, las IgG deben estar interactuando en la parte catalítica de la serinoproteasa, motivo por el cual se muestra una disminución en la actividad enzimática de la serinoproteasa de *B. ammodytoides*.

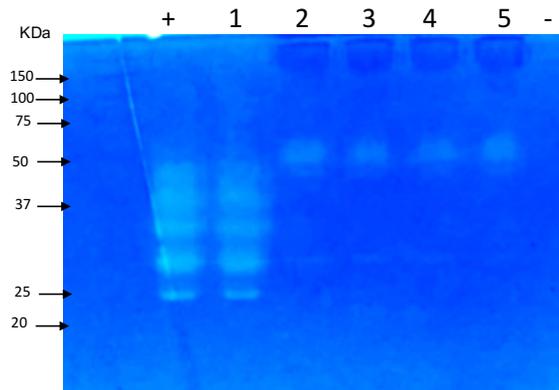


Figura 67. Zimograma de inhibición de proteasa. Gel SDS-PAGE 12% con 1.5 mg/ml de gelatina.

6.6.6. Evaluación de las IgG de conejo anti- enzimas recombinantes (serinoproteasa, metaloproteasa y PLA2)

Adicionalmente, para contar con un panorama más completo de cómo las proteínas recombinantes actuaban como inmunógenos, se decidió inmunizar conejos utilizando las tres proteínas recombinantes obtenidas en este trabajo PLA2, serinoproteasa y metaloproteasa.

Dos conejos blancos hembras Nueva Zelanda (2.5 Kg de peso corporal) fueron utilizados para evaluar la capacidad inmunogénica, usando una mezcla de las tres proteínas recombinantes. Los conejos fueron inmunizados con una mezcla de las tres proteínas recombinantes. Los conejos se inyectaron primero con una suspensión de las proteínas recombinantes (con 300 µg de cada proteína) en 1.2 mL de PBS 1x, emulsionadas con 1.2 mL de adyuvante incompleto de Freud. Para las inmunizaciones posteriores, se usaron los mismos volúmenes de reactivos alternando adyuvantes, el incompleto de Freud y Alúmina. Los conejos fueron inmunizados cada semana durante cuatro meses. Los animales fueron sangrados cada 14 días y los sueros se recuperaron para medir la titulación de los niveles de anticuerpos por ELISA contra las proteínas recombinantes: PLA2, serinoproteasa y metaloproteasa (Figura 68).

En la figura 68 se puede observar la evolución de los títulos de anticuerpos, donde se muestra que con el veneno completo de *B. ammodytoides* se mantuvieron los títulos por debajo de 2,000. No obstante, con las proteínas usadas como inmunógenos si se presentó un aumento en el reconocimiento de los anticuerpos.

Para la PLA2 recombinante se empezaron a incrementar los títulos a partir de la tercera sangría sin un aumento aparente hasta la sexta sangría con títulos por arriba de 8,000. En la séptima sangría hubo un aumento del título de 11,600. En la sangría octava se finalizó el esquema de inmunización, con el sangrado a blanco por punción cardiaca del conejo, verificando por ELISA que el aumento de títulos se incrementó hasta 17,148.

En el caso de los títulos con la serinoproteasa recombinante, aumentaron en la tercera sangría por arriba de 8,000, manteniéndose hasta la séptima sangría, al término del esquema de inmunización el título fue de 10,673.

Finalmente, para el caso de la metaloproteasa recombinante los títulos no se mantuvieron con un incremento constante, hubo variación incluso se presentó una disminución en la quinta sangría, solo pudiéndose recuperar ligeramente al final del esquema de inmunización, con un título de 2,653.

Con estos resultados podemos decir que las proteínas recombinantes usadas como inmunógenos, tuvieron la capacidad de inducir la respuesta inmunológica del conejo, siendo más eficiente como inmunógeno la PLA2 recombinante seguida de la serinoproteasa.

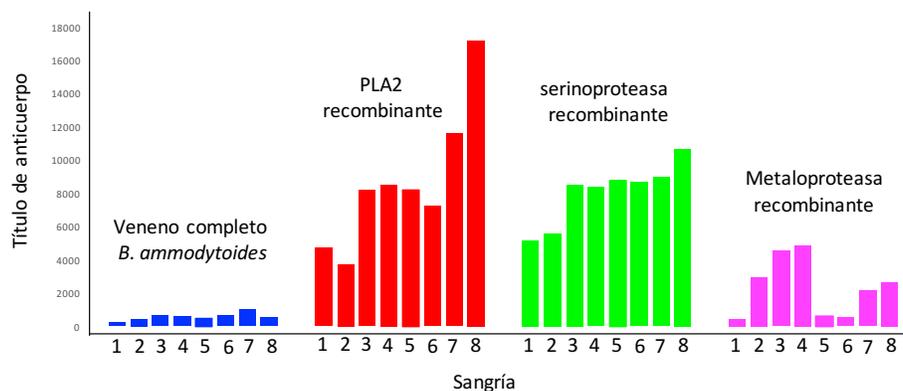


Figura 68. Títulos de anticuerpos de conejos contra las enzimas recombinantes (PLA2, serinoproteasa y metaloproteasa) y veneno completo de *B. ammodytoides*.

Para mostrar si existe reconocimiento cruzado hacia las PLA2, serinoproteasas y metaloproteasas de los diferentes venenos de serpientes con el suero de conejo inmunizado con las tres proteínas recombinantes (PLA2, serinoproteasa y metaloproteasa), se realizó un Western blot. En la figura 69 B) se observa que las tres proteínas recombinantes en los distintos venenos son reconocidas, en diferente intensidad, por el suero de conejo. En los venenos de *B. ammodytoides* y *B. asper* las bandas con una masa molecular aparente de 15,000 Da que correspondería a la PLA2, son más intensas que en los otros venenos analizados, lo que indica que si existe un alto reconocimiento de esta proteína por el suero de conejo. En el caso del veneno de *B. diporus* Figura 69 B) carril 3, la banda con una masa molecular aparente por arriba de 50,000 Da, no es bien reconocida por el suero de conejo, a esta altura podría tratarse de una serinoproteasa o metaloproteasa tipo III, lo que podría indicar que no existe la presencia epítopes compartidos hacia estas posibles proteínas utilizadas como inmunógenos para la producción de anticuerpos.

En el carril 6, que corresponde al veneno de *B. asper*, no existe una reacción cruzada en los componentes por arriba de los 25,000 Da, los cuales pueden corresponder tanto a serinoproteasas como metaloproteasas.

Las flechas en el inmunoblot (Figura 69 B) indican las masas moleculares aparentes de las enzimas PLA2, serinoproteasas y metaloproteasas.

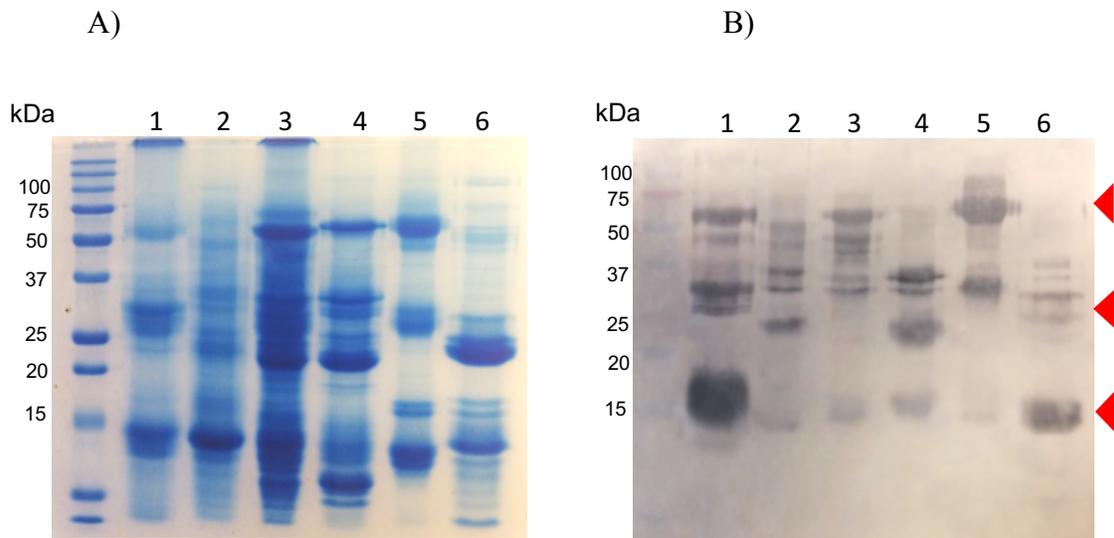


Figura 69. Identificación y reconocimiento de las proteínas en diferentes venenos de serpientes. A) Gel SDS-PAGE 15 % de diferentes venenos de serpientes. B) western blot usando como anticuerpo suero de conejo inmunizado con tres proteínas recombinantes 1:1,000. En cada carril se muestran los diferentes venenos 1. Veneno completo de *Bothrops ammodytoides* 2. Veneno completo de *Bothrops jararacussu* 3. Veneno completo de *Bothrops diporus* 4. Veneno completo de *Bothrops moojeni* 5. Veneno completo de *Bothrops alternatus* 6. Veneno completo de *Bothrops asper*. Con flecha se marca la masa molecular aparente de 15,000 Da para PLA2 recombinante y de 25,000 y 50,000 Da, para serinoproteasas y metaloproteasas en los distintos venenos.

En la Figura 70, se muestran los títulos de ELISA del suero de conejo anti enzimas recombinantes (PLA2, serinoproteasa y metaloproteasa), donde se observa que con las enzimas recombinantes utilizadas como inmunógenos como PLA2 y serinoproteasa hubo un alto reconocimiento por parte de los anticuerpos, los títulos fueron de 17,148 y 10,673 respectivamente, no así con la metaloproteasa cuyo título de anticuerpo fue de 2,653.

Además, se utilizaron los venenos de *B. ammodytoides*, *B. jararacá*, *B. moojeni*, *B. diporus*, *B. alternatus* y *B. asper* para ver el nivel de reconocimiento de anticuerpos contra estos venenos. Estas son las principales especies de serpientes de importancia médica para los humanos en Argentina, así como *B. asper* que es una de las especies más peligrosas en México.

El reconocimiento de los anticuerpos por los venenos de las especies de *B. ammodytoides* se obtuvo un título de 543 y para *B. moojeni* el título dio de 623.5, ambos venenos presentaron un mejor el reconocimiento de los anticuerpos, que en los venenos de *B. jararacussu*, *B. diporus*, *B. alternatus* y *B. asper*.

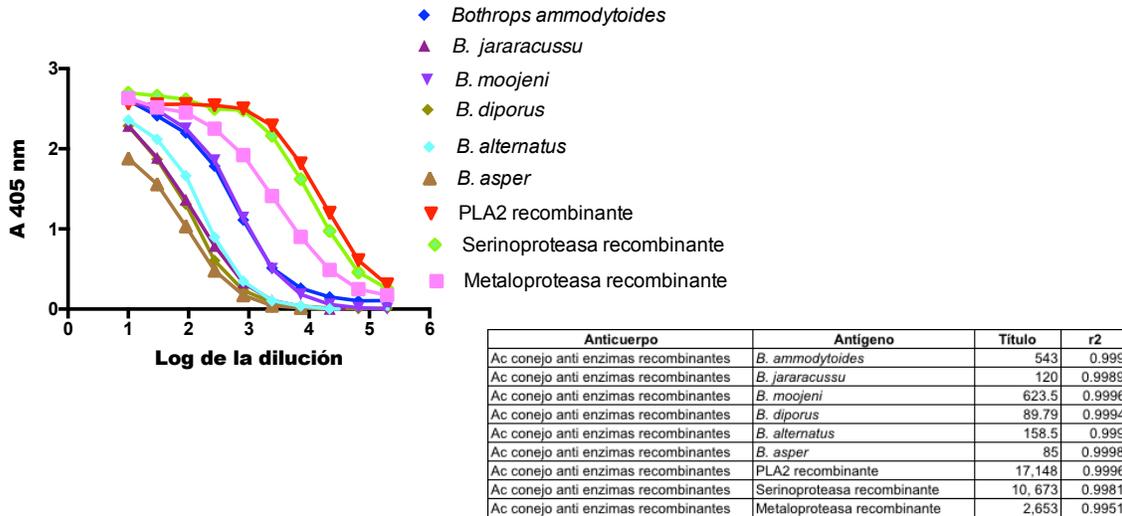


Figura 70. Títulos de anticuerpos de conejo anti-enzimas recombinantes (PLA2, serinoproteasa y metaloproteasa) contra diferentes venenos de especies del género *Bothrops*, además de las enzimas recombinantes utilizadas como inmunógenos.

Debido a que el título de anticuerpos de conejo más alto fue con la PLA2, se decidió explorar si este suero podía inhibir su actividad enzimática en el veneno de *B. ammodytoides*. Por lo que se realizó un ensayo de actividad de fosfolipasa en placa rodamina-yema de huevo-agar (Figura 71).

Para realizar las pruebas de inhibición de actividad, se realizó una purificación de inmunoglobulinas mediante precipitación con ácido caprílico, este método se usa para fines de purificación parcial de IgGs. Sus principales ventajas sobre otras técnicas más modernas son la simplicidad, el bajo costo, la rapidez, y el alto rendimiento. La utilización del ácido caprílico (octanoico) es notable, por la relativa pureza con la que se obtienen las inmunoglobulinas, con una contaminación mucho más baja de albúmina, en comparación con el uso de sales. El ácido caprílico causa la precipitación de la mayoría de las proteínas plasmáticas, con excepción de las inmunoglobulinas, las cuales quedan en solución. Se considera como un tratamiento menos drástico para las inmunoglobulinas, ya que no las desnatura⁹².

El ensayo consistió en colocar una cantidad constante de veneno completo de *B. ammodytoides* (15µg) con IgGs de conejo anti las tres proteínas recombinantes. Las concentraciones de IgGs fueron 50, 100, 150 y 200 µg, la reacción se incubó por 1h a 37 °C. Se colocaron dos controles, el positivo fue veneno completo de *B. ammodytoides* y en el pozo 1 se colocó veneno completo incubado por 1h a 37°C, esto con el propósito de saber si la incubación a 37°C podía interferir con la actividad de la enzima. El control negativo fue PBS1x. Después de una hora de incubación se midieron los halos de hidrólisis.

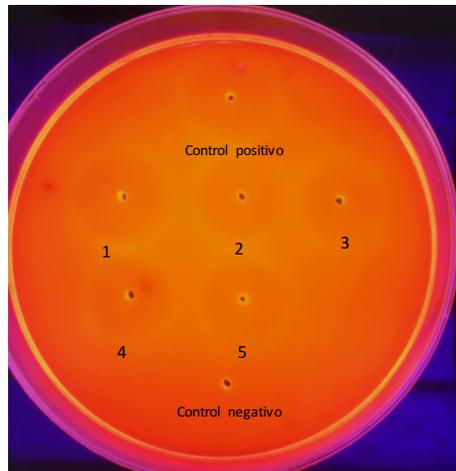


Figura 71. Ensayo de inhibición de la actividad de PLA2 en placa rodamina-yema de huevo-agar. Como control (+) se utilizó veneno completo de *B. ammodytoides* 15 µg/pozo en todos los casos. 1) veneno incubado 1h a 37°C. Para las muestras problemas el 2) veneno más 50 µg de IgG, 3) veneno más 100 µg de IgG, 4) veneno más 150 µg de IgG y 5) veneno más 200 µg de IgG. Como control (-) PBS 1x.

En la Figura 72 se observa que en los pozos 2, 3, 4 y 5 existe una ligera disminución de el halo de hidrólisis, 1.4 cm, 1.4 cm, 1.2 cm y 1.1 cm de diámetro respectivamente, con respecto a los controles positivo y pozo 1, en todos los casos midieron 1.5 cm de diámetro, esto nos pudiera estar indicando que a pesar de que el título de anticuerpos del suero fue bajo contra el veneno de *B. ammodytoides* apenas de 543, los anticuerpos pueden estar reconociendo inespecíficamente a la parte catalítica de la PLA2, motivo por el cual se muestra una ligera disminución en la actividad enzimática de la PLA2 de *B. ammodytoides*.

Debido al resultado anterior, se decidió realizar un ensayo de inhibición de actividad de PLA2 por el método titulométrico (Figura 73), que consistió en colocar veneno completo de *B. ammodytoides* (15 µg) con 200µg de IgG de conejo anti enzimas recombinantes. La reacción se incubó por 1h a 37°C.

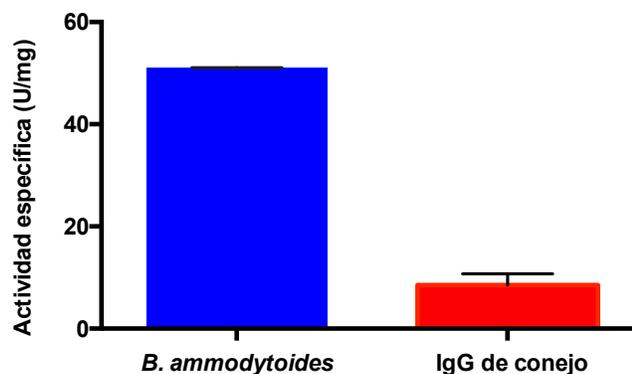


Figura 73. Ensayo titulométrico de actividad PLA2 del veneno de *B. ammodytoides* y de la inhibición del mismo veneno con IgG de conejo anti-proteínas recombinantes. La actividad específica se da en U/mg = μ moles de NaOH consumidos por minuto por miligramo de veneno. Las barras de error representan desviación estándar de tres experimentos.

Los resultados mostraron que la actividad específica de fosfolipasa A2 del veneno de *B. ammodytoides* es de 51 U/mg y de la inhibición con IgG de conejo es de 8.5 U/mg. Esto indica que las IgG de conejo enzimas recombinantes si están inhibiendo la parte catalítica de la PLA2.

De la misma manera se quiso determinar si existía inhibición de la actividad de proteasa (sea serinoproteasa o metaloproteasa), realizando un zimograma con gelatina (Figura 74).

El ensayo consistió en mezclar una cantidad constante de veneno completo de *B. ammodytoides* (15 μ g) en distintas concentraciones de IgG de conejo anti proteínas recombinantes. Las concentraciones de IgG fueron 50, 100, 150 y 200 μ g, se incubó por 1h a 37°C. El control positivo (+) fue veneno completo de *B. ammodytoides*, en el pozo 1 se colocó veneno completo incubado por 1h a 37°C. El control negativo fue PBS1x. Después de una hora de incubación se cargó en el gel. En la figura 74 se observa que en los pozos 2, 3, 4 y 5 existe una disminución en el halo de hidrólisis, de la banda de peso aparente de 60 KDa y en la banda con peso aparente de 25 KDa, con respecto al control positivo y al pozo 1 que es veneno completo de *B. ammodytoides*, incubado a 37°C, esto pudiera indicar que las IgGs de conejo anti tres enzimas recombinantes, deben estar interactuando en la parte catalítica de las serinoproteasas de 60 y 25 KDa. Además, de presentar epítopes compartidos, motivo por el cual se muestra una disminución en el halo de actividad.

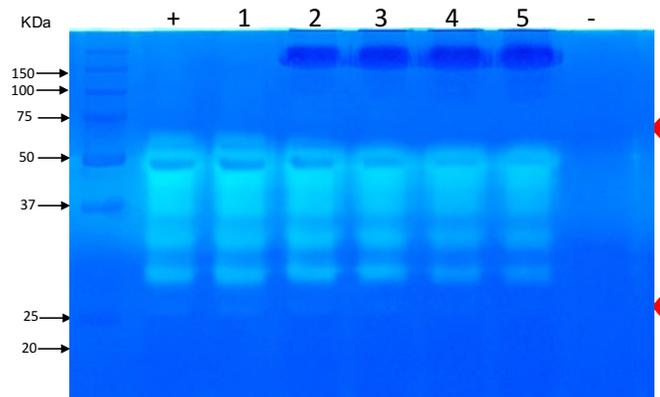


Figura 74. Zimograma de inhibición de proteasa. Gel SDS-PAGE 12% con 1.5 mg/ml de gelatina. Como control (+) se utilizó veneno completo de *B. ammodytoides* 15 µg/pozo en todos los casos. (+) veneno, 1) veneno incubado 1h a 37 °C. Para las muestras problemas el 2) veneno más 50 µg de IgG de conejo, 3) veneno más 100 µg de IgG de conejo, 4) veneno más 150 µg de IgG y 5) veneno más 200 µg de IgG de conejo. Como control (-) PBS 1x.

Finalmente, es importante conocer el nivel de reconocimiento y determinar si se neutralizan los componentes proteicos de las diferentes especies de vipéridos, antes de decidir si pueden ser una opción terapéutica en el tratamiento de los envenenamientos causados por estas especies.

Uno de los beneficios que se obtiene al generar anticuerpos contra las proteínas recombinantes obtenidas en este trabajo, es que se pueden utilizar para dilucidar la presencia de enzimas individuales en mezclas complejas, como son los venenos, y así obtener una mejor caracterización.

7. Conclusiones

En este trabajo se aislaron e identificaron, mediante secuencia N-terminal, proteínas que corresponden a componentes del veneno completo de *B. ammodytoides*, como fosfolipasas, serinoproteasas, metaloproteasa y L-aminooxidasas, entre otros.

Se caracterizaron bioquímicamente y de manera parcial las enzimas serinoproteasas, metaloproteasas y PLA2 del veneno de *B. ammodytoides*.

De igual forma se logró la clonación y expresión de las enzimas: serinoproteasa, metaloproteasa, y PLA2. La serinoproteasa recombinante se expresó de manera soluble, sin embargo, no fue biológicamente activa. Tanto la serinoproteasa como la metaloproteasa se obtuvieron en forma de cuerpos de inclusión y a pesar de varios intentos de plegamientos, no se logró tener proteínas recombinantes en su conformación nativa y funcional.

Mediante plegamiento *in vitro*, de la fracción insoluble proveniente de la expresión de la PLA2, se pudo obtener una enzima plegada con una actividad enzimática parcial y además se pudo evaluar su capacidad como componente antibacteriano.

Se encontró que anticuerpos comerciales de uso terapéutico (el Bivalente utilizado en Argentina, y el Antivipmyn utilizado en México), presentaron reconocimiento hacia las proteínas recombinantes expresadas en esta investigación. El mejor de ellos fue la PLA2 recombinante reconocida por el antiveneno mexicano y que presentó un título de 9,455.

Por otro lado, los anticuerpos específicos contra las enzimas de *C. simus*, también fueron evaluados en su nivel de reconocimiento con el veneno completo de *B. ammodytoides*, siendo los anticuerpos anti-serinoproteasa con un título de 4,252 y los anticuerpos anti-metaloproteasa con un título de 23,955, los que mejor reconocieron al veneno completo. Se concluye que al menos dichas proteasas si presentan epítopes compartidos con proteasas del género *Crotalus*, aún tratándose de géneros de serpientes diferentes. Sin embargo, los anticuerpos específicos contra las enzimas de *C. simus* no presentaron un buen reconocimiento con las proteínas recombinantes obtenidas en este trabajo.

En este sentido, se lograron generar anticuerpos anti PLA2 recombinante en caballos, siendo el título de anticuerpos con su homóloga de 28,077, lo que indica que la PLA2 si presentó una respuesta inmunológica que permitiera generar anticuerpos en caballos, capaces de reconocer fosfolipasas de especies como *B. asper*. Esto indicaría que la PLA2 recombinante presenta mayor similitud a PLA2 de una especie mexicana que a especies de su misma región geográfica. Además, los anticuerpos anti PLA2 pueden inhibir de manera parcial la actividad hemolítica del veneno de *B. ammodytoides*.

Los títulos de anticuerpos de caballo anti-serinoproteasa recombinante fueron muy bajos, apenas de 1,264, y no tuvieron la capacidad de reconocer serinoproteasas de otras especies de serpiente, sin embargo, si logró inhibir actividades biológicas *in vitro* de proteasas. De lo que se puede concluir que la serinoproteasa recombinante usada para generar los anticuerpos de caballo anti-serinoproteasa, es una molécula biológicamente activa.

Por otro lado, se generaron anticuerpos de conejo inmunizados contra las tres proteínas recombinantes, aquí la PLA2 y serinoproteasa recombinantes fueron mejores inmunógenos para la producción de anticuerpos en conejos. Además de que los anticuerpos reconocieron ligeramente a venenos completos como *B. ammodytoides* y *B. moojeni*. Además, Se lograron inhibir actividades biológicas *in vitro* de PLA2 y proteasas del veneno de *B. ammodytoides*. Por lo tanto, puede afirmarse que los anticuerpos generados en esta investigación son capaces de neutralizar actividades biológicas *in vitro*.

Finalmente, podemos concluir que los anticuerpos obtenidos tanto en caballos como en conejos, a partir de proteínas recombinantes producidas en esta investigación, pudieron inhibir algunas actividades biológicas como la de proteasa y fosfolipasa en el veneno completo de *B. ammodytoides*. Sin embargo, hay que prestar atención al momento de querer evaluar el reconocimiento de estos anticuerpos con venenos o enzimas de otras especies de serpientes.

8. Perspectivas

- Realizar pruebas de inhibición de la actividad biológica en organismos animales, como ratones.
- Realizar pruebas de neutralización *in vivo* utilizando las IgG de caballo y conejo.
- Obtener los anticuerpos de caballo anti-metaloproteasa

9. Referencias

1. De Roodt, A. R. et al. Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México. *Gac. Med. Mex.* **141**, 13–21 (2005).
2. Campos, L. B. et al. In vitro comparison of enzymatic effects among Brazilian Bothrops spp. venoms. *Toxicon* **76**, 1–10 (2013).
3. Angulo, Y. & Lomonte, B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake Bothrops asper. *Toxicon* **54**, 949–957 (2009).
4. Sajevic, T., Leonardi, A. & Križaj, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon* **57**, 627–645 (2011).
5. Markland, F. S. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: an updated inventory. Registry of Exogenous Hemostatic Factors of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb. Haemost.* **79**, 668–74 (1998).
6. Serrano, S. M. T. & Maroun, R. C. Snake venom serine proteinases: Sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon* **45**, 1115–1132 (2005).
7. Rypniewski, W. R., Perrakis, A., Vorgias, C. E. & Wilson, K. S. Evolutionary divergence and conservation of trypsin. *Protein Eng. Des. Sel.* **7**, 57–64 (1994).
8. Academy, H., Sciences, O. F. & Chemistry, O. F. The nature of general base-general acid catalysis in serine proteases by I. Polgaxr. (1969).
9. Kini, R. M. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* **34**, 200–204 (2005).
10. Zhang, J. et al. Expression, purification and characterization of recombinant plasminogen activator from *Gloydius brevicaudus* venom in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **91**, 85–90 (2013).
11. Parry, M. a et al. The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. *Structure* **6**, 1195–206 (1998).
12. Murakami, M. T. & Arni, R. K. Thrombomodulin-independent activation of protein C and specificity of hemostatically active snake venom serine proteinases: Crystal structures of native and inhibited Agkistrodon contortrix contortrix protein C activator. *J. Biol. Chem.* **280**, 39309–39315 (2005).
13. Ullah, A. et al. Crystal structure of Jararacussin-I: The highly negatively charged catalytic interface contributes to macromolecular selectivity in snake venom thrombin-like enzymes. *Protein Sci.* **22**, 128–132 (2013).
14. Müller, P. M. G. K. V. B. B. C. Protein C Activators from Snake Venoms and Their Diagnostic Use. 266–272 (2002).
15. Savanur, A. et al. Pharmacological and biochemical studies on the venom of a clinically important viper snake (*Echis carinatus*) of Pakistan. *Toxicon* **80**, 47–57 (2014).
16. Levy, D. E. et al. Ancrod in acute ischemic stroke: Results of 500 subjects beginning treatment within 6 hours of stroke onset in the ancrod stroke program. *Stroke* **40**, 3796–3803 (2009).
17. Methods, A. Assay on Bovine Fibrinogen Reagents Quantitative Estimation of Batroxobin in Serum (Micromethod). **109**, 214–223 (1965).

18. You, K. E. et al. The effective control of a bleeding injury using a medical adhesive containing batroxobin. *Biomed. Mater.* **9**, 25002 (2014).
19. Jia, L.-G., Shimokawa, K.-I., Bjarnason, J. & Fox, J. W. Snake Venom Metalloproteinases : Structure , Function and Relationship. *Toxicon* **34**, 1269–1276 (1996).
20. Takeda, S., Igarashi, T. & Mori, H. Crystal structure of RVV-X: An example of evolutionary gain of specificity by ADAM proteinases. *FEBS Lett.* **581**, 5859–5864 (2007).
21. Koh, D. C. I., Armugam, A. & Jeyaseelan, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 3030–3041 (2006).
22. Ahmed, T., Islam, M. S. & Haque, T. The Effect of Manufacturing Methods and Different Shapes on the Release Pattern of Diclofenac Sodium Matrix Tablet. **2**, 76–80 (2009).
23. Markland, F. S. Review Paper Snake Venoms and the Hemostatic System. **36**, (1998).
24. Swenson, S. & Markland, F. S. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. *Toxicon* **45**, 1021–1039 (2005).
25. Toombs, C. F. Alfimeprase : Pharmacology of a Novel Fibrinolytic Metalloproteinase for Thrombolysis. **91320**, 141–147 (2002).
26. Gutiérrez, J. M., Escalante, T., Rucavado, A. & Herrera, C. Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: A journey of discovery and understanding. *Toxins (Basel)*. **8**, (2016).
27. Fisher, A. B. & Jain, M. Phospholipases : Degradation of Phospholipids in Membranes and Emulsions. *Life Sci.* (2009).
28. Six, D. a & Dennis, E. a. The expanding superfamily of phospholipase A 2 enzymes: classification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell. Biol. Lipids* **1488**, 1–19 (2000).
29. Burke, J. E. & Dennis, E. A. Phospholipase A2 biochemistry. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **23**, 49–59 (2009).
30. Segelke, B. W., Nguyen, D., Chee, R., Xuong, N. H. & Dennis, E. a. Structures of two novel crystal forms of *Naja naja naja* phospholipase A2 lacking Ca²⁺ reveal trimeric packing. *J. Mol. Biol.* **279**, 223–232 (1998).
31. Gutiérrez, J. M. & Lomonte, B. Phospholipases A2: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon* **62**, 27–39 (2013).
32. Herna, M., Nieto, L. & Sa, M. Biological effects of group IIA secreted phospholipase A 2. **531**, 7–11 (2002).
33. Scott, D. L., Haven, N., White, S. P. & Sigler, P. B. NIH Public Access. **250**, 1541–1546 (2012).
34. Magnenat, E. M., Peitsch, M. C., Wells, T. N. C., Clemetson, K. J. & Polga, J. venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper). **968**, 961–968 (1996).
35. Tsai, I., Wang, Y., Chen, Y., Tsai, T. & Tu, M. Venom phospholipases A 2 of bamboo viper (*Trimeresurus stejnegeri*): molecular characterization, geographic variations and evidence of multiple ancestries. **223**, 215–223 (2004).
36. Maraganore, J. M. et al. A New Class of Phospholipases A2 with Lysine in Place of. **259**, (1984).
37. Boffa, M. C., Rothen, C., Verheij, H. M., Verger, R. & De Haas, G. H. Classification of Phospholipases a2 Based Upon Their Anticoagulant Activity and Penetration Ability Into Phospholipid Monolayers. *Natural Toxins (Pergamon Press Ltd, 1980)*.

38. Kini, R. M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant Phospholipase A2 enzymes from snake venoms. *Toxicon* **45**, 1147–1161 (2005).
39. Inadaso, M., Crow, R. M. & Augustus, C. Determinants of the Inhibitory Action of Purified 14-kDa Phospholipases. 26338–26343 (1994).
40. Kini, R. M. & Evans, H. J. Structure-function relationships of phospholipases. The anticoagulant region of phospholipases A2. *J. Biol. Chem.* **262**, 14402–14407 (1987).
41. Perumal Samy, R., Stiles, B. G., Franco, O. L., Sethi, G. & Lim, L. H. Animal Venoms as a Source of Natural Antimicrobials: An overview. *Biochemical Pharmacology* (2017).
42. De Oliveira Junior, N. G., E Silva Cardoso, M. H. & Franco, O. L. Snake venoms: Attractive antimicrobial proteinaceous compounds for therapeutic purposes. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 4645–4658 (2013).
43. Villarrubia, V. G., Costa, L. A. & Díez, R. A. Fosfolipasas A 2 segregadas (sPLA 2): ¿amigas o enemigas? ¿Actores de la resistencia antibacteriana y antiviral de la inmunodeficiencia humana? 749–757 (2004).
44. Buckland, A. G. & Wilton, D. C. The antibacterial properties of secreted Phospholipases A2. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1488**, 71–82 (2000).
45. Nair, D. G., Fry, B. G., Alewood, P., Kumar, P. P. & Kini, R. M. Antimicrobial activity of omwaprins, a new member of the waprins family of snake venom proteins. *Biochem. J.* **402**, 93–104 (2007).
46. Clement, H. et al. Isolation, amino acid sequence and biological characterization of an ‘aspartic-49’ phospholipase A2 from *Bothrops (Rhinoceros) ammodontoides* venom. *Toxicon* **60**, 1314–1323 (2012).
47. McCleary, R. J. R. & Kini, R. M. Non-enzymatic proteins from snake venoms: A gold mine of pharmacological tools and drug leads. *Toxicon* **62**, 56–74 (2013).
48. Vyas, V. K., Brahmabhatt, K., Bhatt, H. & Parmar, U. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: Current perspectives. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **3**, 156–162 (2013).
49. Cushman, D. W. & Ondetti, M. a. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Hypertension* **17**, 589–592 (1991).
50. Koh, C. Y. & Kini, R. M. From snake venom toxins to therapeutics - Cardiovascular examples. *Toxicon* **59**, 497–506 (2012).
51. Campinas, U. E. De. Ecological and Phylogenetic Correlates of Feeding Habits in Neotropical Pitvipers of the Genus *Bothrops*. *Biol. Vipers* **592**, 307–328 (1996).
52. de Roodt, A. R. et al. Some toxic and enzymatic activities of *Bothrops ammodontoides* (yará) venom. *Toxicon* **38**, 49–61 (2000).
53. De Roodt, A. R. et al. A comparison of different methods to assess the hemorrhagic activity of *Bothrops* venoms. *Toxicon* **38**, 865–873 (2000).
54. Queiroz, G. P., Pessoa, L. A., Portaro, F. C. V., Furtado, M. d F. D. & Tambourgi, D. V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. *Toxicon* **52**, 842–851 (2008).
55. De Roodt, A. R. et al. A study on the venom yield of venomous snake species from Argentina. *Toxicon* **36**, 1949–1957 (1998).
56. Fusco, L. S. et al. P9a(Cdt-PLA) from *Crotalus durissus terrificus* as good immunogen to be employed in the production of crotalic anti-PLA2 IgG. *Toxicol. Lett.* **238**, 7–16 (2015).

57. Quintero-hern, V., Gonz, L., Ortiz, E., Jim, J. M. & Possani, L. D. Toxicon Design and expression of recombinant toxins from Mexican scorpions of the genus *Centruroides* for production of antivenoms. **128**, 5–14 (2017).
58. Oh-ishi, M. & Maeda, T. Separation techniques for high-molecular-mass proteins. **771**, 49–66 (2002).
59. Ba, T. & Kaliszan, R. Quantitative structure r retention relationships in affinity chromatography. (2001).
60. Niall, H. D., Jacobs, J. W., Rietschoten, J. V. A. N. & Tregear, G. W. A new approach to microsequence analysis of proteins. **4**, 62–64 (1974).
61. Chomczynski, P. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Extraction. **159**, 156–159 (1987).
62. Manual, I. 3'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends. (2004).
63. Lodish, H. et al. y Molecular.
64. Sambrook_3ed.pdf.
65. Ta, T. & Kit, C. TOPO® TA Cloning® Kit User Guide (Pub. no MAN0000047, Rev A.0). 1–36
66. The QIA expressionist™ Manual. (2003).
67. Ke, S. & Madison, E. L. Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube 'megaprimer' PCR method. **25**, 3371–3372 (1997).
68. Oldak, E. & Trafny, A. Secretion of Proteases by *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Exposed to Ciprofloxacin. **49**, 3281–3288 (2005).
69. Heusseneugene, C. Electrophoretic Analysis of Plasminogen Activators in Polyacrylamide Gels Containing Sodium Dodecyl Sulfate and Copolymerized Substrates. **202**, 196–202 (1980).
70. Gené, J., Roy, A., Rojas, G., Gutiérrez, J. & Cerdas, L. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon* **27**, 841–848 (1989).
71. Bjerrum, O. J. & S, N. N. A. Western Blotting. *Life Sci.* **I**, 1–6 (2001).
72. Esser, P. Principles in Adsorption to Polystyrene. 1–6 (2010).
73. Hedstrom, L. Serine protease mechanism and specificity. *Chem. Rev.* **102**, 4501–4523 (2002).
74. Gutiérrez, J. M. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 Años de investigaciones en América Latina. *Rev. Biol. Trop.* **50**, 377–394 (2002).
75. Ramos, O. H. P. & Selistre-De-Araujo, H. S. Snake venom metalloproteases - Structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* **142**, 328–346 (2006).
76. Alape-Girón, A. et al. Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: Perspectives and applications. *Toxicon* **54**, 938–948 (2009).
77. Takeda, S., Takeya, H. & Iwanaga, S. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1824**, 164–176 (2012).
78. Kini, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. *Biochem. J.* **397**, 377–87 (2006).
79. Perona, J. J. & Craik, C. S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci.* **4**, 337–360 (1995).
80. Am, C. N. RNA later® Tissue Collection : RNA Stabilization Solution. 1–12

81. Siigur, E., Aaspõllu, A. & Siigur, J. Sequence diversity of *Vipera lebetina* snake venom gland serine proteinase homologs Result of alternative-splicing or genome alteration. *Gene* **263**, 199–203 (2001).
82. Wu, J. et al. A unique group of inactive serine protease homologues from snake venom. *Toxicon* **52**, 277–284 (2008).
83. Alibolandi, M. & Mirzahoseini, H. Chemical Assistance in Refolding of Bacterial Inclusion Bodies. **2011**, (2011).
84. Dechavanne, V. et al. A high-throughput protein refolding screen in 96-well format combined with design of experiments to optimize the refolding conditions. *Protein Expr. Purif.* **75**, 192–203 (2011).
85. Phan, J., Yamout, N., Schmidberger, J., Bottomley, S. P. & Buckle, A. M. Chapter 4 Refolding Your Protein with a Little Help from Refold. **752**, 3–5
86. Kini, R. M. & Chan, Y. M. Accelerated evolution and molecular surface of venom Phospholipase A2 enzymes. *J. Mol. Evol.* **48**, 125–132 (1999).
87. Gopalakrishnakone, P. & Calvete, J. J. Venom Genomics and Proteomics.
88. Nevalainen, T. J., Graham, G. G. & Scott, K. F. Antibacterial actions of secreted phospholipases A2. Review. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1781**, 1–9 (2008).
89. Calvete, J. J. Snake venomomics: From the inventory of toxins to biology. *Toxicon* **75**, 44–62 (2013).
90. Lalloo, D. G. & Theakston, R. D. G. Snake antivenoms. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **41**, 277-290-327 (2003).
91. Clement, H. et al. North and South American *Loxosceles* spiders : Development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens. **48**, 64–74 (2006).
92. Rica, U. D. E. C. Métodos Inmunológicos. (2007).

Apéndice I

Medios de cultivo y soluciones para medios

Medio SOB. 20 g de triptona o peptona, 5 g de extracto de levadura, 0.58 g de NaCl, 0.19 g de KCl y disolver en 800 mL de H₂O. Aforar a 1 L y esterilizar por autoclave 121 °C 15 lb/inc² durante 20 min. Agregar 10 mL de MgCl₂ 1M y 10 mL MgSO₄ 1M ambos estériles

Medio SOC. Agregar 1.8 mL de glucosa 20% filtrada a un medio SOB estéril de 100 mL. La concentración final será de 20 mM.

Medio Luria (Lb). Disolver 5 g de extracto de levadura, 10 g de bacto triptona y 10 g de cloruro de sodio. Aforar a 1 L con H₂O. Para cajas de Petri agregar 4.5 g de agar en 300 mL de medio Lb (previamente fundido) y adicionar 300 µL de ampicilina (verificando que el medio este tibio).

X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside). Preparar 20 mg/mL en dimetilformamida, cubrir con aluminio y almacenar a -20 °C.

IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) 1M. Disolver 2.38 g de IPTG en 8 mL de H₂O, ajustar el volumen a 10 mL y esterilizar por filtración (22 µm). Hacer alícuotas de 1 mL y almacenar a -20 °C.

Ampicilina 100 mg/mL (1000X). Disolver 1 g de ampicilina en 10 mL de agua destilada y esterilizar utilizando un filtro de 22 µm. Almacenar a -20 °C.

Kanamicina 5 mg/mL. Disolver 10 mg en 2 mL de agua destilada y esterilizar utilizando un filtro de 22 µm. Almacenar a -20 °C.

Buffers para cromatografía rpHPLC

Disolvente A (TFA 0.1% v/v). Diluir 1 mL de TFA en 999 mL de agua tetradestilada. Filtrar a través de una membrana de 0.22 micras.

Disolvente B (Acetonitrilo, TFA 0.1% v/v). Diluir 1 mL de TFA en 999 mL de acetonitrilo. Filtrar a través de una membrana de 0.22 micras.

Reactivos para plegamiento

Glutación reducido (GSH) 10 mM. Disolver 15.3 mg de GSH en la solución de plegamiento. Se debe preparar en el momento.

Glutación oxidado (GSSH) 1 mM. Disolver 3 mg de GSSH en la solución de plegamiento. Se debe preparar en el momento.

Reactivos para electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A. Solución de acrilamida (30 % Acrilamida +0.8 % bis- Acrilamida). Disolver 50 g de acrilamida y 1.2 g de bis-acrilamida en un volumen final de 165 mL de agua desionizada.

B. Amortiguador de abajo (1.5 M Tris + 0.4 % SDS). Disolver 18.17 g de Tris en 50 ml de agua desionizada y adicional 2 mL de SDS al 20 %. Ajustar a pH 8.8 con HCl concentrado. Aforar a 100 mL.

C. Amortiguador de arriba (0.5 M Tris +0.4 % SDS). Disolver 6.06 g de Tris base en 50 mL de agua desionizada y adicionar 2 mL de SDS al 20 %. Ajustar pH 6.8 con HCl concentrado. Aforar a 100 mL.

D. Amortiguador de corrida (0.25 M Tris + 0.19 M Glicina + 0.1% SDS) para una solución 10X, disolver 15.2 g de tris y 72.1 g de glicina en 300 mL de agua desionizada y adicionar 25 mL de SDS al 20%. Ajustar a pH 8.6 con 10 M NaOH. Aforar a 500 mL.

E. Persulfato de amonio al 10%. Disolver 0.1 g de persulfato de amonio en 1 ml de agua desionizada.

F. Solución de tinción de azul brillante de coomassie (25 % isopropanol + 10 % ácido acético + 0.1 % azul de coomassie R 250). Disolver 0.5 g de azul de coomassie R 250 en 125 ml de isopropanol y 50 ml de ácido acético y aforar a 500 ml con agua desionizada.

G. Solución de destinción para azul de coomassie (10 % Isopropanol + 10 % ácido acético). Mezclar 50 mL de isopropanol y 50 mL de ácido acético. Aforar a 500 mL.

H. N,N,N',N'- tetramethylenediamine (TEMED). Se usa tal cual como viene.

Reactivos para transferencia, desarrollo y visualización de los “western blot”.

A. Solución amortiguadora TBST 1x. (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20).

B. solución Bloqueadora TBST 1x + 5% leche “svelty”.

C. Amortiguador de Transferencia (39 mM Glicina, 48 mM Tris-base, SDS al 0.037 %, Metanol al 20 %).

D. Solución de revelado: Kit BCIP/NBT (Invitrogen). BCIP = 5-Bromo-4-Chloro-Indolyl phosphate y NBT Nitroblue Tetrazolium salt.

Reactivos para la técnica de ELISA.

A. Carbonato de sodio 0.1 M pH 9.5. Disolver 1.06 g en 100 mL de agua desionizada.

B. Solución de lavado (50 mM Tris/HCl pH 8.0 +150 mM NaCl + 0.05 % Tween 20). Disolver 25 mL de 1 M Tris/HCl pH 8.0, 50 mL de 1.5 M de NaCl 250 μ L Tween 20, aforar a 500 mL.

C. Solución de bloqueo (50 mM Tris/HCl pH 8.0 + 0.5% gelatina (marca BIO-RAD) + 0.2% Tween 20). Disolver 5 mL de 1 M Tris/HCl pH 8.0, 0.5 g de gelatina, 50 μ L de Tween 20 (entibiar para disolver). Aforar a 100 mL.

D. Solución de reacción (50 mM Tris/HCl pH 8 + 500 mM NaCl + 0.1 mg/mL Gelatina + 0.05% Tween 20). Disolver 5 mL de 1 M Tris/HCl pH 8, 33.3 mL de 1.5 M de NaCl, 0.1 g de gelatina y 50 μ L de Tween 20 (entibiar para disolver). Aforar a 100 mL.



Contents lists available at ScienceDirect

Protein Expression and Purification

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yprep



cDNA cloning, heterologous expression, protein folding and immunogenic properties of a phospholipase A₂ from *Bothrops ammodytoides* venom



Herlinda Clement^{a,b}, Gerardo Corzo^a, Edgar Neri-Castro^a, Ivan Arenas^a, Silvia Hajos^c, Adolfo R. de Roodt^{d,e}, Elba Villegas^{b,*}

^a Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca Mor, 62210, Mexico

^b Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 2001, Cuernavaca Mor, 62209, Mexico

^c Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica- IDEHU. UBA-CONICET, Buenos Aires, Argentina

^d Laboratorio de Toxinopatología, Centro de Patología Experimental y Aplicada, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina

^e Instituto Nacional de Producción de Biológicos, A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán", Ministerio de Salud, Buenos Aires, Argentina

ARTICLE INFO

Keywords:

Antibodies
Bothrops ammodytoides
 Phospholipase
 Protein expression
 Snake
 Venom
 Viper

ABSTRACT

A mRNA transcript that codes for a phospholipase (PLA₂) was isolated from a single venom gland of the *Bothrops ammodytoides* viper. The PLA₂ transcript was cloned onto a pCR^{2.1}-TOPO vector and subsequently expressed heterologously in the *E. coli* strain M15, using the pQE30 vector. The recombinant phospholipase was named **rBamPLA2_1**, and is composed of an N-terminal fusion protein of 16 residues, along with 122 residues from the mature protein that includes 14 cysteines that form 7 disulfide bonds. Following bacterial expression, **rBamPLA2_1** was obtained from inclusion bodies and extracted using a chaotropic agent. **rBamPLA2_1** had an experimental molecular mass of 15,692.5 Da that concurred with its theoretical molecular mass. **rBamPLA2_1** was refolded *in vitro* conditions and after refolding, three main protein fractions with similar molecular masses, were identified. Although, the three fractions were considered to represent different oxidized cysteine isoforms, their secondary structures were comparable. All three recombinant isoforms were active on egg-yolk phospholipid and recognized similar cell membrane phospholipids to be native PLA₂s, isolated from *B. ammodytoides* venom. A mixture of the three **rBamPLA2_1** cysteine isoforms was used to immunize a horse in order to produce serum antibodies (anti-**rBamPLA2_1**), which partially inhibited the indirect hemolytic activity of *B. ammodytoides* venom. Although, anti-**rBamPLA2_1** antibodies were not able to recognize crotoxin, a PLA₂ from the venom of a related but different viper genus, *Crotalus durissus terrificus*, they recognized PLA₂s in other venoms from regional species of *Bothrops*.

1. Introduction

Bothrops ammodytoides is the world's most southerly situated viper. This snake inhabits a geographical region that stretches from the warm desert regions of "El Gran Chaco" and the dry "Pampeana" region, as far as the cold Patagonia region of Argentina. It is a small viper, averaging 70 cm in length, able to inflict the typical complications resulting from *Bothrops* envenomations [1]. *B. ammodytoides* venom provokes hemorrhagic, dermonecrotic, and inflammatory-edematogenic effects in mice, potentially causing death [1]. Likewise it is myotoxic, showing pro-coagulant activity on human plasma, but manifests low or absent thrombin type activity over bovine fibrinogen [1]. The venom also manifests phospholipase and indirect hemolytic activity [1,2]. Previously, the isolation and identification of an aspartic-49 (D49)

phospholipase A₂ (PLA₂) was described as having low toxicity for mice (LD₅₀ = 117 µg/mouse of 20 g) [2] but to be similar to other PLA₂s such as myotoxin-I from *Bothrops moojeni* (LD₅₀ = 170 µg/mouse of 20 g) [3]. Although viper venoms represent complex mixtures of toxic proteins, including phospholipases, serine-proteases and metalloproteinases, the recombinant expression of these toxic enzymes may help to produce neutralizing antibodies for studying the toxic mechanisms of venom and anti-venom neutralization, related to these enzymes and eventually to improve the production of viper anti-venom. In this work, we describe the cDNA cloning and heterologous expression of a phospholipase A₂ from *B. ammodytoides*. Furthermore, the recombinant PLA₂, named **rBamPLA2_1**, was used as immunogen to produce anti-**rBamPLA2_1** antibody (anti-**rBamPLA2_1**), which reduces the indirect hemolytic activity of *B. ammodytoides* venom and recognizes venom

* Corresponding author.

E-mail address: elbav@uaem.mx (E. Villegas).

<https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.09.004>

Received 6 April 2018; Received in revised form 7 September 2018; Accepted 7 September 2018

Available online 08 September 2018

1046-5928/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

PLA₂s from other species of *Bothrops*. For the first time in this work, we describe a method for generating antibodies against PLA₂s from pit viper venoms, using recombinant PLA₂s as antigens; these are useful for anti-venom study.

2. Materials and methods

2.1. Venom and venom gland

Adult *B. ammodytoides* specimens were kept in optimal health conditions and in plastic cages, at a constant temperature of 27 °C. Animals were fed with a mouse every fortnight and tap water was provided *ad libitum*. Light-dark cycles consisted of 12 h. Venom was extracted manually and immediately vacuum dried and stored at –20 °C until use. To obtain one of the two venom glands, a healthy specimen was selected and after being anesthetized, a venomous gland was removed by surgical extraction with ketamine-xylazine. Immediately after being extracted, the venom gland was treated with RNAlater® (ThermoFisher, Asheville, NC, USA) and stored at –20 °C until use. After surgical intervention, the specimen recovered itself, and remained healthy.

2.2. Bacterial strains, enzymes and plasmids

We used XL1-Blue *Escherichia coli* strain for DNA cloning and plasmid propagation. The M15 *E. coli* strain was employed for the expression of recombinant PLA₂. Plasmids pCR^{2.1}-TOPO® (Invitrogen, CA, USA), and pQE30 (Qiagen, CA, USA) were used for cloning the PLA₂ gene, and for production of the 6His-tagged recombinant rBamPLA2_1, respectively. Restriction enzymes, *Taq* polymerase, Factor Xa protease (FXa) and T4 DNA ligase were purchased from New England Biolabs (New England Biolabs, MA, USA).

2.3. RNA extraction and gene assembly

As mentioned, total RNA was extracted from a single venom gland of *B. ammodytoides*, using the “Total RNA Isolation System” (Qiagen, CA, USA). Based on the N-terminal sequence of the previously reported PLA₂, specific oligonucleotides were designed to amplify the corresponding transcript (Clement et al., 2012). The oligonucleotides were named Oligo1 Fw PLA2 (CAC CTG ATG CAA TTT GAG, Tm 52 °C) and Oligo2 Rv PLA2 (GCA TGG CTC TGA CTC CTC, Tm 58 °C).

Positive clones were selected, based on the blue/white selection scheme, and the integrity of gene construction was verified by DNA sequencing of the plasmidic minipreps, obtained using the High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Basel, Switzerland).

2.4. Plasmid construction for expression

Gene construction made to express the rBamPLA2_1, included recognition sequences for restriction enzymes used for cloning (*Bam*HI and *Pst*I) and a sequence encoding for FXa cleavage site. The designed transcript was subcloned into the pQE30 expression vector, through the *Bam*HI and *Pst*I sites. The pQE30 vector introduces a polyhistidine-tag (6His) to facilitate purification of the product by affinity chromatography. The FXa cleavage sequence was conveniently placed between the 6His and the mature toxin to allow the cleavage of the full recombinant toxin, should this be necessary. The new pQE30-derived constructs were verified by sequencing from both sides. Competent *E. coli* M15 cells were transformed with the corresponding plasmids by incubation for 30 min on ice, heat-shocked for 1 min at 42 °C, followed by 5 min in ice, recovered for 30 min at 37 °C in SOC medium, and plated in LB, containing 100 µg/mL of ampicillin, and 30 µg/mL of kanamycin. The constructions were named pQE30rBamPLA2_1 and their expression product was abbreviated here to rBamPLA2_1.

2.5. Expression and purification of rBamPLA2_1

E. coli strain M15 expressing the plasmid pQE30rBamPLA2_1 was grown in Luria Broth (LB) medium. Once absorbance at 600 nm had reached 0.8 of absorption units, cultures were induced with 1 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) for 24 h at 16 °C. Cells were harvested by centrifugation (8000 rpm for 20 min in JA-14 rotor), using a Beckman centrifuge model J2-21, recovered in washing buffer (0.05 M Tris-HCl, pH 8.0), and lysed with a BugBuster® protein extraction reagent (Novagen, Germany). This material was centrifuged again (12,000 rpm for 20 min) and the supernatant was discarded.

The insoluble fraction was rinsed twice with washing buffer and centrifuged again at 12,000 rpm for 20 min. The insoluble fraction having the inclusion bodies were treated with the chaotropic agent guanidinium chloride (GndHCl) at 6M in a Tris-base 0.05 M buffer (pH 8.0) to extract the recombinant PLA₂. It was then centrifuged for 20 min, using a Beckman centrifuge model J2-21 (12,000 rpm for 20 min in a JA-20 rotor) to remove any insoluble material. The supernatant that contains the recombinant protein was purified by Ni-NTA (Ni-nitrilotriacetic acid) affinity column chromatography, which was performed according to manufacturer's instructions (Qiagen, CA, USA), using denaturing conditions with buffer A (6M GndHCl in a 0.05M Tris-base buffer, pH 8.0) and buffer B (6M GndHCl in 0.05M Tris-base buffer, containing 400 mM imidazole, pH 8.0). Buffer B was eliminated by applying a second purification step under reverse-phase HPLC (RP-HPLC). An analytical C₄ reversed-phase column (Vydac 214 TP 4.6 × 250 mm, USA) was run from solvent A (0.1% trifluoroacetic acid, TFA, in water) to solvent B (0.1% TFA in acetonitrile). The previously described HPLC system was used for this separation, and the gradient was run from 10 to 60% solvent B, for a 50 min period and after 1 mL/min, proteins were detected at 230 nm. The rBamPLA2_1 product was vacuum dried. The recombinant product was allowed to fold under controlled conditions using 2M GndHCl in 0.05M Tris-base buffer, pH 8.0, containing 1 mM reduced glutathione (GSH)/0.1 mM oxidized glutathione (GSSG).

2.6. Molecular mass determination

The molecular mass identities of the recombinant proteins and the enzymatically digested peptides were confirmed by mass spectrometry analysis. The protein fractions were reconstituted to a final concentration of 500 pmol/5 µL of 50% acetonitrile with 1% acetic acid and directly applied into a Thermo Scientific LCQ Fleet ion trap mass spectrometer (San Jose, CA) with a Surveyor MS syringe pump delivery system. The eluate at 10 µL/min was split out in order to introduce only 5% of the sample into the nanospray source (0.5 µL/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.

2.7. Phospholipase and hemolytic activity

The phospholipase activity of the purified enzyme was determined by the hydrolysis of egg-yolk phospholipids in agarose plates, as described by Bernheimer et al. [4]. The hemolytic activity of native phospholipases in presence of bivalent viper snake serum, and anti-rBamPLA2_1 antibodies were assayed, as described by Lanari et al. (2014) [5].

2.8. Protein-lipid interactions

Dot blots were carried out using P-6001 PIP Strips (2 × 6 cm nitrocellulose membranes, Echelon Biosciences, Salt Lake City, UT, USA),

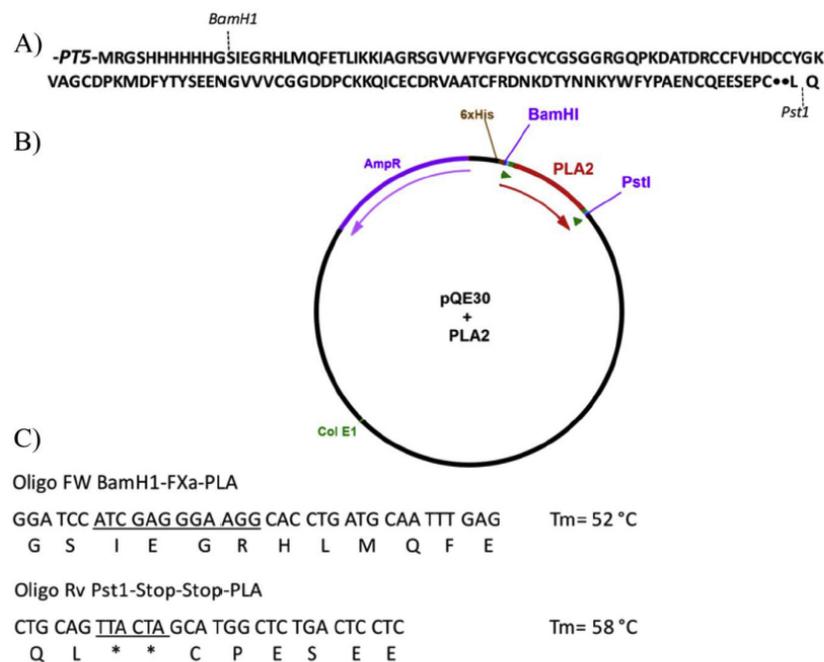


Fig. 1. Representation of the gene construction for the heterologous expression of rBamPLA2_1. (A) The primary structure of rBamPLA2_1. (B) The genetic construction used for the expression of the recombinant rBamPLA2_1. The 6His-coding sequence is part of the pQE30 vector and is located upstream of the BamHI/PstI-cloned gene, so the recombinant protein gets 6His-tagged at the amino terminus. Downstream of the BamHI site, the sequence coding for the FXa recognition site is introduced (IEGR is highlighted) right before the mature toxin's sequence. Two stop codons (asterisks) are included at the end of the sequence coding for the mature toxin, upstream of the PstI cloning site. (C) The first forward and the last reverse oligonucleotides used for rBamPLA2_1 assembly. The structural elements added to the sequence of the recombinant toxin are shown (the BamHI and PstI sites as well as the stop codons are underlined).

Table 1
Amino acid sequence of rBamPLA2_1 compared to the native PLA2.

| Protein | Amino acid sequence* | ID (%) |
|-------------|---|--------|
| PLA2 native | HLMQFETLIKKIAGRSGVWFYGFYGCYCGSGGRGKPKDATDRCCFVHDCCYGKVTGCDPKM | 100 |
| rBamPLA2_1 | HLMQFETLIKKIAGRSGVWFYGFYGCYCGSGGRGQPKDATDRCCFVHDCCYGKVAAGCDPKM *****;*****;***** | 95 |
| PLA2 native | DFYTYSEENGVVVCGGDDPCKKQICECDRVAATCFRDNKTYDNNKYWFYPAKNCQESESEPC | 100 |
| rBamPLA2_1 | DFYTYSEENGVVVCGGDDPCKKQICECDRVAATCFRDNKDTYNNKYWFYPAENCQESESEPC *****;*****;***** | 95 |

*The residues in bold black differ in both native PLA2 and rBamPLA2_1. The four highly conserved residues H48, D49, Y52 and D99 in blue represent the active site of elapid PLA₂s. The underlined C49 and C122 are distinctive for Type II phospholipases. ID means percentage of identity.

spotted with 100 pmol of phosphoinositides and other biologically important lipids. Interaction of rBamPLA2_1 with lipids was tested as follows; the membrane was blocked with 5 mL of blocking buffer, TBS-T (0.01M Tris-HCl + 0.15M NaCl + 0.05% of Tween-20, pH 7.5) plus 5% fat free milk and gently agitated for 1 h at room temperature (rt). The blocking buffer was discarded and final protein concentration of 5 µg/mL of rBamPLA2_1 was added to 5 mL of TBS-T buffer for 1 h at rt, with gentle agitation. After contact, the protein solution was discarded and the membrane washed three times with 5 mL TBS-T, with gentle agitation. Then, 5 mL of TBS-T containing horse anti-rBamPLA2_1 (0.1 mg) was added, and gently agitated for 1 h at rt. After washed again three times with 5 mL TBS-T with gentle agitation, 5 mL of TBST-

T containing anti-horse conjugated with alkaline phosphatase was included, and the phospholipid membrane was incubated again for 1 h at rt. Following these washing stages, membrane was developed using the BCIP/NTB substrate kit (Invitrogen Cat. 00-2209), according to manufacturer's instructions.

2.9. Biological activity

The protocol used for assaying the activity of rBamPLA2_1 *in vivo*, using the mice model, was followed according to the guidelines of our Institute Committee of Animal Welfare, maintaining the number of animals at a necessary minimum, in order to validate experiments. Male

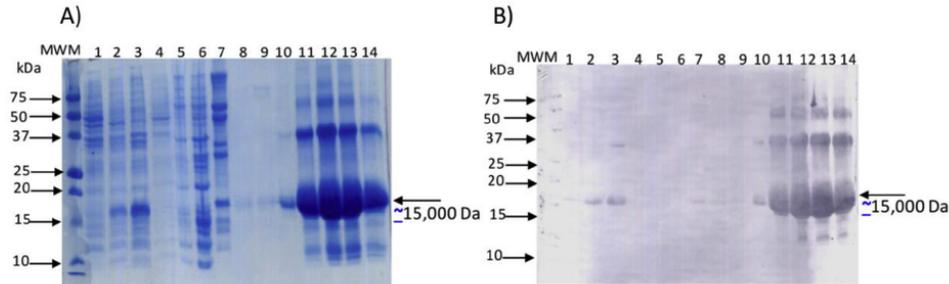


Fig. 2. SDS-PAGE and Western-blot of rBamPLA2_1 expressed in *E. coli* cells. A) SDS-PAGE; B) Western-blot. Right lane shows the molecular weight markers in kDa; Lane number 1 cells without IPTG induction; lane number 2, cells with IPTG induction; lane number 3, inclusion bodies; lane 4, supernatant; lane 5, recirculating; lanes 6 and 7, first and second wash with 30 mM Imidazole; lanes 8 to 14 corresponds to the expressed proteins after purification by affinity column the elution with 400 mM imidazole rBamPLA2_1.

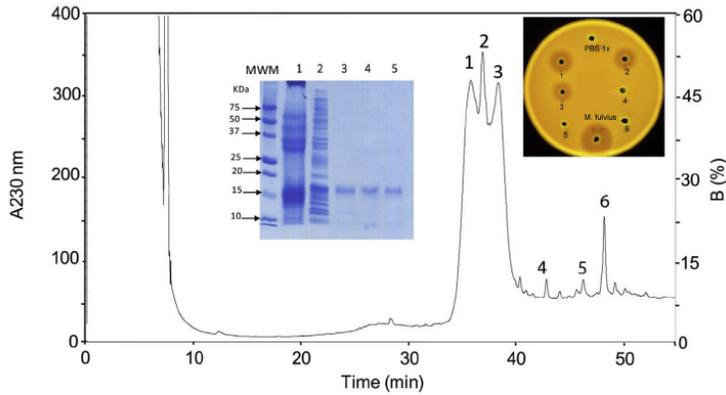


Fig. 3. Chromatographic separation of rBamPLA2_1. A) Chromatographic separation of rBamPLA2_1 from 400 mM imidazole fractions. B) The SDS-PAGE inside shows at the right lane the molecular weight markers in kDa; lane number 1, the complete venom from *B. ammodytoides*; lane number 2, inclusion bodies; lane 3, fraction 1 from HPLC after protein folding; lane 4, fraction 2 from HPLC after protein folding; lane 5 fraction 3 from HPLC after protein folding. C) Phospholipase assay on agarose egg yolk phospholipases.

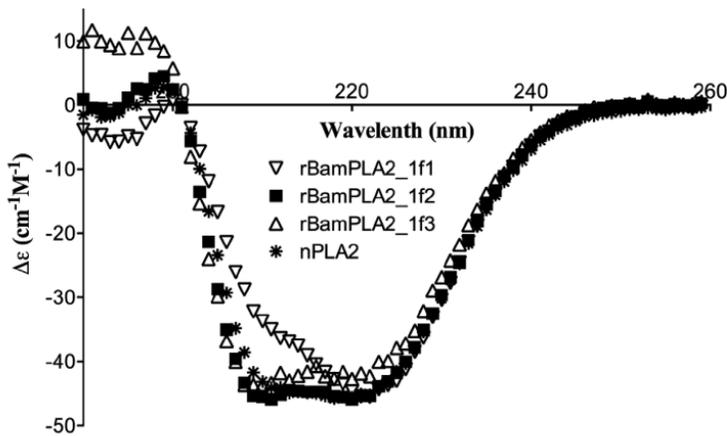


Fig. 4. Circular dichroism of native PLA₂ and rBamPLA2_1. The secondary structure analysis revealed higher content of α -helix than that of β -strands.

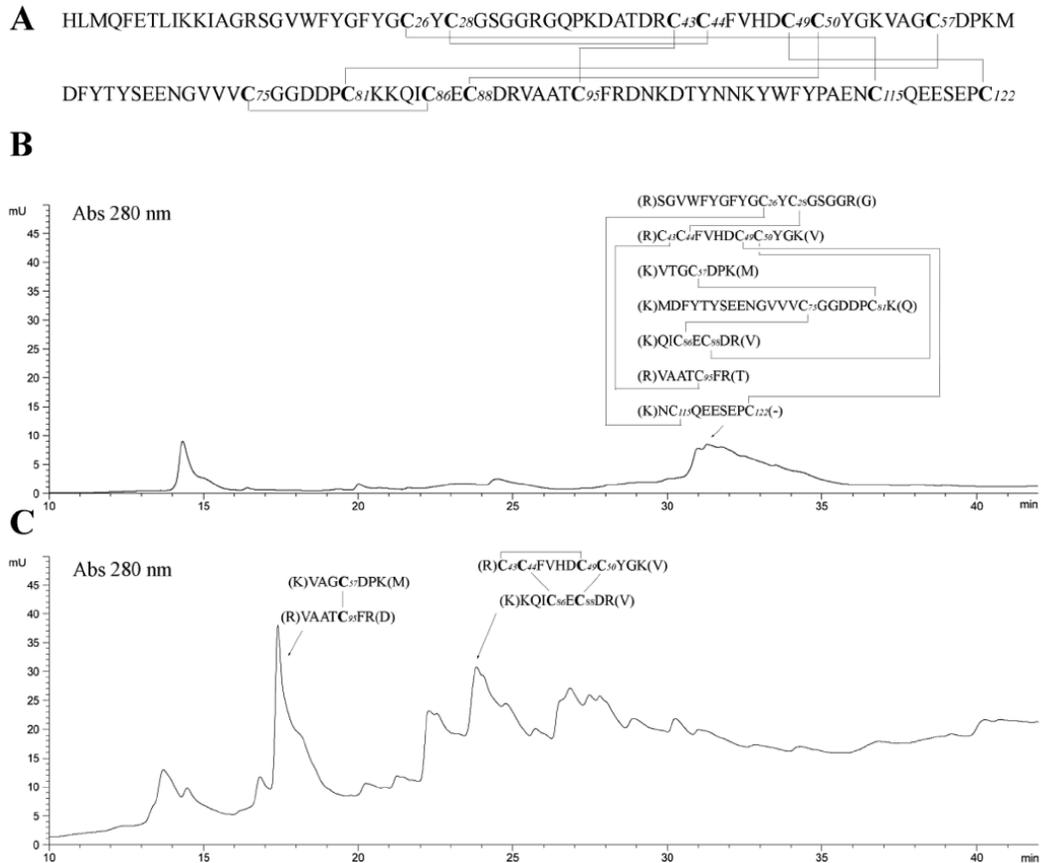


Fig. 5. RP-HPLC profiles of the enzymatically digested nPLA₂ and rBamPLA_{2.1}. A) proposed arrangement of disulfide bridges in native PLA₂. Both nPLA₂ (B) and rBamPLA_{2.1} isoform 3 (C) were enzymatically digested with trypsin. The peptide digested fractions were separated using an analytic C₁₈ reverse-phase column (Vydac 214 TP 4.6 × 250 mm, USA) using 0.1% trifluoroacetic acid, TFA, in water, as solvent A, and 0.1% TFA in acetonitrile as solvent B. The gradient was run from 20 to 60% solvent B, during 40 min at 1 mL/min, the peptide fragments were detected at 280 nm. The HPLC fractions collected were analyzed using mass spectrometry.

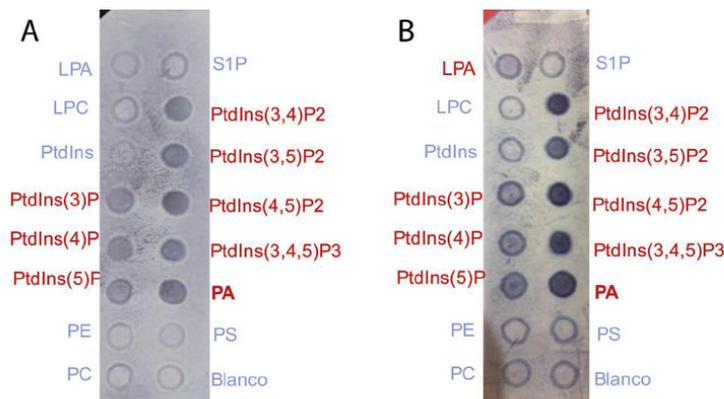


Fig. 6. Interaction of phospholipases to membrane lipids. A) Binding of recombinant rBamPLA_{2.1} and B) native PLA₂ from *B. amodytoides*. The binding of phospholipases to membrane lipids were revealed using anti IgG rBamPLA_{2.1} (0.1 mg/mL) as the first antibody and anti-horse coupled to alkaline phosphatase as the second antibody.

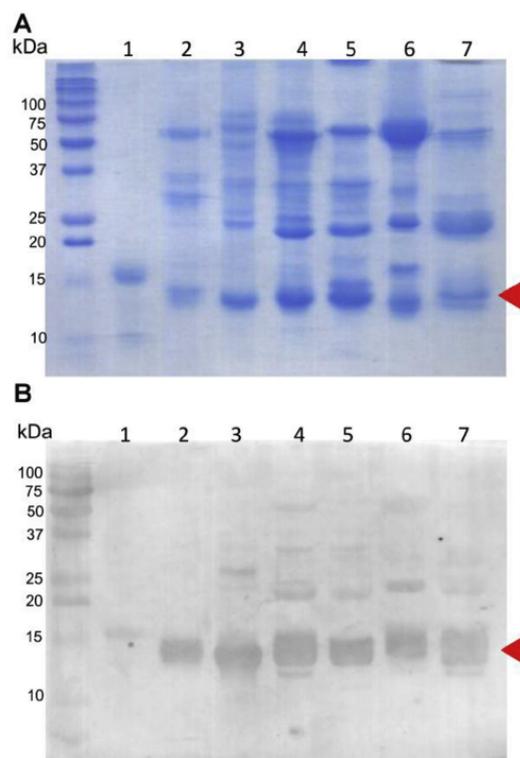


Fig. 7. Protein content of venoms from different species of *Bothrops* revealed by SDS-Gel and Western-blot. A and B. lanes, 1) rBamPLA2_1; 2) *B. ammodytoides*; 3) *B. jararacussu*; 4) *B. diporus*; 5) *B. moojeni*; 6) *B. alternatus*; 7) *B. asper*. The SDS-Gel had 50 µg per line, and the Western-blot had 10 µg per line (first antibody was horse IgG anti-rBamPLA2_1, and the second antibody was horse IgG coupled to alkaline-phosphatase).

of the previously isolated PLA₂ from *B. ammodytoides* (see Materials and Methods). The cDNA coding region for rBamPLA2_1 with a predicted size of 122 bp was enlarged by PCR, cloned into plasmid pCR^{2.1}-TOPO[®] and then into the bacterial vector pQE30 (Fig. 1). The amino acid sequence of the cloned rBamPLA2_1 differs from the one previously isolated, in 6 out of 122 amino acids; that is, rBamPLA2_1 is 95% identical to that isolated from the venom (Table 1). rBamPLA2_1 retains the four highly conserved residues His48, Asp49, Tyr52 and Asp99, pertaining to the common PLA₂ active site (here His47, Asp48, Tyr51 and Asp98); apparently a characteristic of type II phospholipases [6]. The designation of type I and type II, old world snakes (cobras and mambas) and new world snakes (rattlesnakes and pit vipers), respectively, refers to the six disulfide bonds they have in common, but an extra one (see underlined C in Table 1) is located in distinctly different locations for Type II phospholipases [7,8].

3.2. Expression, purification and protein folding of rBamPLA2_1

The gene encoding rBamPLA2_1 was assembled and cloned into the expression vector pQE30. This vector is used to produce N-terminal 6His-tagged proteins, which facilitate the rapid purification of the recombinant products by IMAC. We added a cleavage site for FXa between the 6His-tag and the mature sequence of the BamPLA2_1, in anticipation of a possible deleterious effect of the 6His-tag on the biological activity of BamPLA2_1, which could if necessary, then be

untagged from the mature protein. Heterologous expression of the rBamPLA2_1 peptide was achieved using the *E. coli* M15 strain (Fig. 2). rBamPLA2_1 was predominantly found in inclusion bodies (Fig. 2A, lane 3), and was recovered by using agarose nickel affinity (Fig. 2A, lanes 8–14). The heterologous expression of rBamPLA2_1 in inclusion bodies, as well as its purification from agarose nickel columns was confirmed by western-blot assays, using an anti-6His-tag antibody, coupled to alkaline phosphatase. rBamPLA2_1 was folded *in vitro* and purified by RP-HPLC. Three protein fractions with retention times ranging from 34 to 40 min (linear gradient, 0–60% of B in 60 min) were collected (Fig. 3). An analysis by 15% SDS-PAGE showed that all three fractions had similar apparent molecular mass, and also they were equally active on egg-yolk phospholipids (Fig. 3, inset). Furthermore, the three fractions showed an experimental molecular mass of 15,692.5 Da in its reduced form, which was obtained by mass spectrometry and corresponds to the expected molecular mass for the 6His-tagged rBamPLA2_1; this data may indicate that the three main components obtained from RP-HPLC, correspond to oxidized cysteine isoforms of rBamPLA2_1. There are reports of multiple cysteine-rich protein isoforms being generated during heterologous expression [9–12]. rBamPLA2_1 contains 14 cysteines and could theoretically form up to 135,135 isoforms, considering scrambling disulfide pairing possibilities. Clearly, the molecular machinery in the snake venom gland, in charge of PLA₂s expression, directs the formation of correct folding. The protein yield of the three rBamPLA2_1 fractions together was 0.5 mg/L.

3.3. Secondary structure of rBamPLA2_1 isoforms

Native and recombinant phospholipases were analyzed by CD, in order to compare the secondary structures of the three oxidized cysteine isoforms of rBamPLA2_1. They all showed high absorption for α -helix secondary structure, and relatively low content in terms of β -strands (Fig. 4). According to a CD deconvolution program, the secondary structure content was 90.2, 87.8, 90.1, 90.5% respectively and 0.5, 0.4, 0.5, 0.5%, of α -helix and β -strands, for the native PLA₂ and the three rBamPLA2_1 isoform, respectively. So far, all pit viper venom PLA₂s contain a greater proportion of α -helix, which is characterized as having a positive band at 198 nm and negative ellipticities at 208–222 nm [13]. Here, the rBamPLA2_1 isoform 1 showed the lowest percentage of α -helix, and based on its CD spectrum, its secondary structure could be slightly different to the native PLA₂. Overall, the three rBamPLA2_1 isoforms resemble the canonical secondary structures of viper venom PLA₂s [13].

3.4. Evidence of different disulfide pairings in rBamPLA2_1 isoforms

According to descriptions of the three-dimensional structures of pit viper type II PLA₂s (PDB codes IMG6 and 1PPA) snakes from the New World [14,15], disulfide pairings have been classified as Cys26–115, Cys28–44, Cys43–95, Cys49–122, Cys50–88, Cys57–81 and Cys75–86 (Table 2, Fig. 5A). However, as mentioned previously, it is important to note that a heterologously expressed PLA₂, which contains 14 cysteines could theoretically form up to 135,135 isoforms, if only the disulfide pairing possibility is considered. This means that the number of possible structural forms for a protein rich in cysteines increases with the number of cysteines in the molecule; consequently, in order to obtain a structural, long-standing and *in vivo* functional recombinant protein with *n* number of half-cysteines, the correct structure must be one of the $N!/PD! A^{PD}$ structural forms, where *N* is the number of half-cysteines, *PD* is the number of cysteines, and *A* is 2 (a disulfide arrangement). To show that the three rBamPLA2_1 obtained were different oxidized cysteines having different disulfide pairing, the native PLA₂ and the rBamPLA2_1 isoform 3, were enzymatically digested with trypsin (Fig. 5B and C). The digested fractions were separated by RP-HPLC, and the most prominent protein fractions were analyzed using mass spectrometry. The

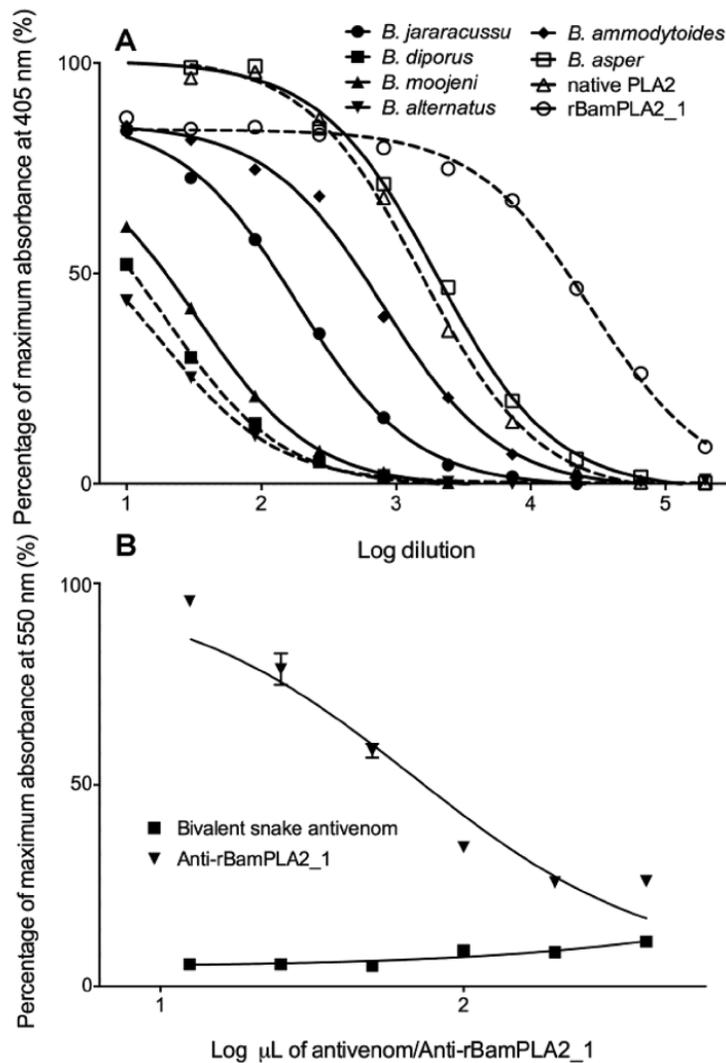


Fig. 8. Antibody recognition of horse anti-rBamPLA2_1 to venoms from *Bothrops* species. A) Anti-rBamPLA2_1 recognition to venoms from different species of *Bothrops*. B) Inhibition of the hemolytic activity of *B. ammodytoides* venom by a bivalent snake antivenom and anti-rBamPLA2_1.

HPLC elution profiles display different digested fraction patterns for both the native PLA2 and the rBamPLA2_1 isoform 3, which may be a consequence of their different disulfide pairings. Fig. 5B shows a HPLC fraction of the enzymatically digested native PLA₂ that elutes after an extended retention time (31 min). This fraction had a molecular mass of 9048.8 Da, which probably corresponds to the theoretical molecular mass of 9048.0 Da of all viable covalently linked peptide fragments, connected by their disulfide bridges (see amino acid sequences inside Fig. 5B). These linked peptide fragments concur with the proposed disulfide pairing for pit viper PLA₂s. In contrast, Fig. 5C shows a HPLC fraction at 17.5 min, of the enzymatically digested rBamPLA2_1 isoform 3, with an experimental molecular mass of 1454.3 Da, which may correspond to the theoretical molecular mass of 1453.7 Da of peptide

fragments with amino acid sequences, covalently linked by Cys57-Cys95. Moreover, Fig. 5C also shows a HPLC fraction at 26.9 min, of the same enzymatically digested rBamPLA2_1 isoform 3, with an experimental molecular mass of 2264.6 Da, which may correspond to the covalently linked peptide fragments Cys44-Cys86, Cys50-Cys88 and Cys43-Cys49, with a theoretical molecular mass of 2265.4 Da (Fig. 5C, inset). Therefore, the molecular masses obtained for the digested rBamPLA2_1 isoform 3 differ from those of the proposed disulfide arrangement for pit viper PLA₂s, indicating that rBamPLA2_1 isoform 3 has a different disulfide arrangement, when compared to that of native PLA₂.

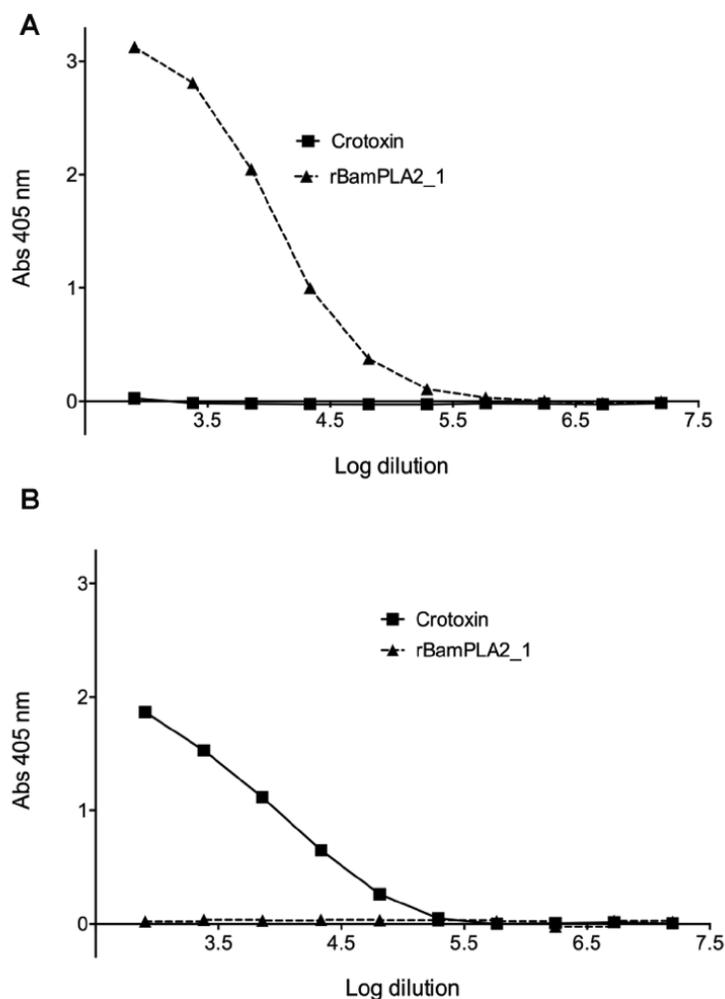


Fig. 9. Antibody recognition between rBamPLA2_1 and crotoxin. A) Recognition of anti-rBamPLA2_1 to crotoxin. B) Recognition of anti-crotoxin to rBamPLA2_1.

elapids (*Micrurus*, *Dendroaspis*, *Naja*) and spiders (*Loxocles*) has been already reported [17–19]. In the same way, recombinant PLA₂s could be used to generate anti-PLA₂ antibodies to reduce the toxic activities related to phospholipases, such as myotoxicity and platelet alterations, caused by *Bothrops* viper envenomation.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding information

The mass spectrometry determination conducted by Dr. Fernando Zamudio is greatly acknowledged. Authors are grateful with BSc. Laura C. Lanari and Silvana Litwin, from the INPB-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” for their technical assistance in the immunization procedures to obtain the anti-recombinant PLA₂ antibodies. Also, we acknowledge

BSc., DVM Vanessa Costa de Oliveira and DVM Pablo Regner for their help during the extraction of the venom gland. We additionally acknowledge to Dr. Paul Gaytán, M.C. Eugenio López-Bustos and Q.I. Santiago Becerra from Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN at Instituto de Bioecnología. This work received funding from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) grant number IN203118, and from SEP-CONACyT grant number 240616 awarded to GC. This work has been also supported by the bilateral cooperation between Argentina (CONICET D729/15) and México (CONACyT #207091).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.09.004>.

References

- [1] A.R. de Roodt, J.A. Dolab, S.E. Hajos, E. Gould, H. Dinapoli, J.C. Troiano, J. Gould, J.C. Dokmetjian, J.C. Carfagnini, T. Fernandez, M. Amoroso, L. Segre, J.C. Vidal, Some toxic and enzymatic activities of *Bothrops ammodytoides* (yarara nata) venom, *Toxicon* 38 (2000) 49–61.
- [2] H. Clement, V. Costa de Oliveira, F.Z. Zamudio, N.R. Lago, N.A. Valdez-Cruz, M. Bernard Valle, S.E. Hajos, A. Alagon, L.D. Possani, A.R. de Roodt, Isolation, amino acid sequence and biological characterization of an "aspartic-49" phospholipase A(2) from *Bothrops (Rhinoceros) ammodytoides* venom, *Toxicon* 60 (2012) 1314–1323.
- [3] A.M. Soares, S.H. Andriao-Escarso, Y. Angulo, B. Lomonte, J.M. Gutierrez, S. Marangoni, M.H. Toyama, R.K. Arni, J.R. Giglio, Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom, *Arch. Biochem. Biophys.* 373 (2000) 7–15.
- [4] A.W. Bernheimer, R. Linder, S.A. Weinstein, K.S. Kim, Isolation and characterization of a phospholipase B from venom of Collett's snake, *Pseudechis colletti*, *Toxicon* 25 (1987) 547–554.
- [5] L.C. Lanari, A. Alagon, V. Costa de Oliveira, R.D. Laskowicz, I. Boyer, N.R. Lago, A. Alejandro, A.R. de Roodt, Intraspecific differences in the immunochemical reactivity and neutralization of venom from Argentinean *Bothrops (Rhinoceros) alternatus* by specific experimental antivenoms, *Toxicon* 85 (2014) 31–45.
- [6] J.M. Gutierrez, B. Lomonte, Phospholipases A2: unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins, *Toxicon* 62 (2013) 27–39.
- [7] F.F. Davidson, E.A. Dennis, Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A2 from snake venom to human secreted forms, *J. Mol. Evol.* 31 (1990) 228–238.
- [8] F.F. Davidson, M.D. Lister, E.A. Dennis, Binding and inhibition studies on lipocortins using phosphatidylcholine vesicles and phospholipase A2 from snake venom, pancreas, and a macrophage-like cell line, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 5602–5609.
- [9] H. Clement, V. Flores, G. De la Rosa, F. Zamudio, A. Alagon, G. Corzo, Heterologous expression, protein folding and antibody recognition of a neurotoxin from the Mexican coral snake *Micrurus laticorallus*, *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 22 (2016) 25.
- [10] H. Clement, V. Flores, E. Diego-García, L. Corrales-García, E. Villegas, G. Corzo, A comparison between the recombinant expression and chemical synthesis of a short cysteine-rich insecticidal spider peptide, *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 21 (2015) 19.
- [11] H. Clement, A. Olvera, M. Rodriguez, F. Zamudio, L.A. Palomares, L.D. Possani, G.V. Odell, A. Alagon, R. Sanchez-Lopez, Identification, cDNA cloning and heterologous expression of a hyaluronidase from the tarantula *Brachypelma vagans* venom, *Toxicon* 60 (2012) 1223–1227.
- [12] G. Estrada, B.I. Garcia, E. Schiavon, E. Ortiz, S. Cestele, E. Wanke, L.D. Possani, G. Corzo, Four disulfide-bridged scorpion beta neurotoxin CsxII: heterologous expression and proper folding in vitro, *Biochim. Biophys. Acta* 1770 (2007) 1161–1168.
- [13] A.M. Scanu, L.L. van Deenen, G.H. de Haas, Optical rotatory dispersion and circular dichroism of phospholipase A2 and its zymogen from porcine pancreas, *Biochim. Biophys. Acta* 181 (1969) 471–473.
- [14] D.R. Holland, L.L. Clancy, S.W. Muchmore, T.J. Ryde, H.M. Einspahr, B.C. Finzel, R.L. Henrikson, K.D. Watenpaugh, The crystal structure of a lysine 49 phospholipase A2 from the venom of the cottonmouth snake at 2.0-Å resolution, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 17649–17656.
- [15] J.B. Harris, T. Scott-Davey, Secreted phospholipases A2 of snake venoms: effects on the peripheral neuromuscular system with comments on the role of phospholipases A2 in disorders of the CNS and their uses in industry, *Toxins* 5 (2013) 2533–2571.
- [16] R.P. Emptage, M.A. Lemmon, K.M. Ferguson, Molecular determinants of KA1 domain-mediated autoinhibition and phospholipid activation of MARK1 kinase, *Biochem. J.* 474 (2017) 385–398.
- [17] K. Hernandez-Salgado, G. Estrada, A. Olvera, F.I. Coronas, L.D. Possani, G. Corzo, Heterologous expressed toxic and non-toxic peptide variants of toxin CsxII are capable to produce neutralizing antibodies against the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*, *Immunol. Lett.* 125 (2009) 93–99.
- [18] G. de la Rosa, L.L. Corrales-García, X. Rodríguez-Ruiz, E. López-Vera, G. Corzo, Short-chain consensus alpha-neurotoxin: a synthetic 60-mer peptide with generic traits and enhanced immunogenic properties, *Amino Acids* 50 (2018) 885–895.
- [19] A. Olvera, B. Ramos-Cerrillo, J. Estevez, H. Clement, A. de Roodt, J. Paniagua-Solis, H. Vazquez, A. Zavaleta, M.S. Arruz, R.P. Stock, A. Alagon, North and South American *Loxosceles* spiders: development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens, *Toxicon* 48 (2006) 64–74.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 17/12/18

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor)
Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete (Co Tutor)
Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís
Dr. Humberto Lanz Mendoza
Dr. Ramón Suárez Rodríguez
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Tesis: "Caracterización y expresión heteróloga de proteasas y fosfolipasas del veneno de *Bothrops ammodytoides* y sus propiedades inmunogénicas"

Alumno que la presenta a revisión: HERLINDA CATALINA CLEMENT CARRETERO

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 17/12/18

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor)
Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete (Co Tutor)
Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís
Dr. Humberto Lanz Mendoza
Dr. Ramón Suárez Rodríguez
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Tesis: "Caracterización y expresión heteróloga de proteasas y fosfolipasas del veneno de *Bothrops ammodytoides* y sus propiedades inmunogénicas"

Alumno que la presenta a revisión: HERLINDA CATALINA CLEMENT CARRETERO

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. GERARDO ALFONSO CORZO BURGUETE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 19/12/18

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor)
Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete (Co Tutor)
Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís
Dr. Humberto Lanz Mendoza
Dr. Ramón Suárez Rodríguez
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Tesis: "Caracterización y expresión heteróloga de proteasas y fosfolipasas del veneno de *Bothrops ammodytoides* y sus propiedades inmunogénicas"

Alumno que la presenta a revisión: HERLINDA CATALINA CLEMENT CARRSTERO

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. MARIA DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 21/12/18

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor)
Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete (Co Tutor)
Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís
Dr. Humberto Lanz Mendoza
Dr. Ramón Suárez Rodríguez
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Tesis: "Caracterización y expresión heteróloga de proteasas y fosfolipasas del veneno de *Bothrops ammodytoides* y sus propiedades inmunogénicas"

Alumno que la presenta a revisión: HERLINDA CATALINA CLEMENT CARRETERO

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR, ALEXIS JOAVANY RODRIGUEZ SOLIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 21/12/18

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor)
Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete (Co Tutor)
Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís
Dr. Humberto Lanz Mendoza
Dr. Ramón Suárez Rodríguez
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Tesis: "Caracterización y expresión heteróloga de proteasas y fosfolipasas del veneno de *Bothrops ammodytoides* y sus propiedades inmunogénicas"

Alumno que la presenta a revisión: HERLINDA CATALINA CLEMENT CARRETERO

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE


DR, HUMBERTO LANZ MENDOZA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 21/12/18

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor)
Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete (Co Tutor)
Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís
Dr. Humberto Lanz Mendoza
Dr. Ramón Suárez Rodríguez
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Tesis: "Caracterización y expresión heteróloga de proteasas y fosfolipasas del veneno de *Bothrops ammodytoides* y sus propiedades inmunogénicas"

Alumno que la presenta a revisión: HERLINDA CATALINA CLEMENT CARRETERO

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR, RAMON SUAREZ RODRIGUEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 19/12/18

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor)
Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete (Co Tutor)
Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís
Dr. Humberto Lanz Mendoza
Dr. Ramón Suárez Rodríguez
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Tesis: "Caracterización y expresión heteróloga de proteasas y fosfolipasas del veneno de *Bothrops ammodytoides* y sus propiedades inmunogénicas"

Alumno que la presenta a revisión: HERLINDA CATALINA CLEMENT CARRETERO

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO