



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
CENTRO UNIVERSITARIO UAEM AMECAMECA
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES
OBTENIDOS UTILIZANDO COMO INMUNÓGENO LAS
FRACCIONES TÓXICAS DE *Centruroides* UNIDAS A
CARBOXIMETIL-CELULOSA**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

JULIA QUIROZ SOLÍS

DIRECTORA

DRA. VIRGINIA GUADALUPE GARCÍA RUBIO

CODIRECTOR

DR. ALEJANDRO ALAGÓN CANO

AGOSTO, 2021

*“Considero más valiente al que conquista sus deseos,
que al que conquista a sus enemigos,
ya que la victoria más dura es sobre uno mismo.”*

Aristóteles

“Dedico este trabajo a quienes no solo están cuando hay arcoíris, sino que desde un principio bailan conmigo bajo la lluvia. Gracias a la vida por haberlos puesto en mi camino”.



Instituto de Biotecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

La presente tesis de Licenciatura fue realizada bajo la dirección del Dr. Alejandro Alagón Cano, en el laboratorio a su cargo, perteneciente al Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en Cuernavaca, Morelos.

Se agradece el apoyo financiero otorgado a los siguientes programas:

- **DAGAPA-PAPIIT IN211621 Caracterización del veneno de tres serpientes de importancia médica en México: investigación básica y mejoramiento de antivenenos.**
- **CONACyT 303045 VENENOS Y ANTIVENENOS**

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Características generales de <i>Centruroides</i> y su veneno.....	3
2.2 El alacranismo como problema de salud pública en México.....	5
2.3 Características del veneno y su mecanismo de acción sobre los canales dependientes de voltaje	7
2.3.1 Toxinas que actúan en canales de sodio (Na ⁺)	8
2.3.2 Toxinas que actúan en canales de potasio (K ⁺).....	11
2.4 Producción de antivenenos.....	13
2.4.1 Generación de la respuesta inmune humoral inducida por las proteínas de los venenos.....	13
2.4.2 Antivenenos	18
2.4.3 Uso de la resina catiónica carboximetil celulosa.....	20
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
IV. JUSTIFICACIÓN	24
V. OBJETIVOS DE CAPÍTULO	25
5.1 Objetivo general.....	25
5.2 Objetivos particulares	25
VI. HIPÓTESIS	26
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	27
7.1 Tipo de estudio	27
7.2 Localización	27
7.3 Metodología	29
7.3.1 Obtención de las fracciones tóxicas a mamíferos unidas a CM-32	29
7.3.1.1 Preparación de las soluciones de veneno y su cuantificación proteica por absorbancia (A _{280nm})	29
7.3.1.2 Acoplamiento de los venenos de <i>Centruroides</i> a la resina CM-32	30
7.3.2 Caracterización de la fracción unida y la no unida a CM-32.....	30
7.3.2.1 Toxicidad de las fracciones obtenidas de la mezcla de venenos de <i>Centruroides</i>	31

7.3.2.2	Análisis por SDS-PAGE	32
7.3.2.3	Fraccionamiento por HPLC en fase reversa	32
7.3.2.4	Determinación de masa moleculares.....	33
7.3.2.5	Determinación de la dosis letal media	33
7.3.3	Inmunización de conejos con la fracción tóxica unida a CM-32.....	34
7.3.3.1	Preparación de inmunógeno.....	34
7.3.3.2	Esquema de inmunización.....	35
7.3.3.3	Medición de la respuesta inmune humoral	37
7.3.3.4	Medición de la potencia neutralizante de los sueros de conejo hacia la mezcla de venenos de <i>Centruroides</i>	38
7.3.4	Inmunización de equinos con la fracción tóxica unida a CM-32	39
7.3.4.1	Preparación de inmunógeno.....	39
7.3.4.2	Esquema de inmunización.....	40
7.3.4.3	Medición de la respuesta inmune humoral	42
7.3.4.4	Medición de la potencia neutralizante de los sueros de equinos hacia la mezcla de venenos de <i>Centruroides</i>	42
7.3.5	Análisis de datos.....	42
VIII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
8.1	Cuantificación de la proteína y obtención de las fracciones tóxicas a mamíferos enriquecidas con CM-32	44
8.2	Caracterización de la mezcla de venenos de <i>Centruroides</i> y sus fracciones	48
8.2.1	Obtención y análisis de las fracciones de la mezcla de venenos de <i>Centruroides</i> por HPLC en fase reversa.....	51
8.2.2	Letalidad de la mezcla de venenos y su fracción tóxica	56
8.3	Evolución de los títulos de anticuerpos de sueros de los grupos de conejos hacia la mezcla de venenos de <i>Centruroides</i> , su fracción tóxica y su fracción no tóxica	58
8.4	Evolución de los títulos de anticuerpos de sueros de los grupos de caballos hacia la mezcla de venenos de <i>Centruroides</i> , su fracción tóxica y su fracción no tóxica	62
8.5	Potencia neutralizante del suero de conejos y caballos inmunizados con la mezcla de venenos de <i>Centruroides</i> y con la fracción tóxica enriquecida con CM-32.....	65

IX. CONCLUSIONES	69
X. PERSPECTIVAS	70
XI. BIBLIOGRAFÍA	71
XII. ANEXOS	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Segmentos en los que se divide el cuerpo del alacrán y las estructuras que se encuentran en el telson.	3
Figura 2. <i>Centruroides limpidus</i> (Karsch, 1879).	4
Figura 3. <i>Centruroides noxius</i> (Hoffman, 1932).....	4
Figura 4. Morbilidad por alacranismo en México.	6
Figura 5. Esquema del canal de sodio dependiente de voltaje y los sitios que son afectados por las toxinas α y β	9
Figura 6. Esquema de una de las subunidades α que constituyen al canal de potasio dependiente de voltaje.	11
Figura 7. Esquema del sitio de acción de las toxinas de alacrán sobre el canal de potasio dependiente de voltaje.....	12
Figura 8. Estructura de una inmunoglobulina.	14
Figura 9. Concentración e isotipo de anticuerpos séricos presentes después de la inmunización primaria y secundaria con el antígeno.....	16
Figura 10. Proceso actual para la producción de antivenenos en caballos contra la picadura de alacrán.....	19
Figura 11. Estructura de la resina catiónica carboximetil celulosa.	21
Figura 12. Localización del IBT.	28
Figura 13. Ubicación del municipio de Cuernavaca.....	28
Figura 14. Diagrama de flujo de la metodología general.	29
Figura 15. Esquema de ELISA indirecto.....	37
Figura 16. Cromatograma de las fracciones recolectadas al lavar la CM-32 con los venenos de <i>Centruroides</i> acoplados.	45
Figura 17. Perfil electroforético de la mezcla de venenos de <i>Centruroides</i> y sus fracciones.....	49
Figura 18. Perfiles cromatográficos de la separación de la mezcla de venenos de <i>Centruroides</i> y sus fracciones por HPLC en fase reversa.....	52
Figura 19. Secuencias de las toxinas de <i>Centruroides</i> que afectan a mamíferos.....	54
Figura 20. Ajuste sigmoideo dosis-respuesta calculado para la determinación de la dosis letal media de la mezcla de venenos de <i>Centruroides</i> y su fracción tóxica.	57
Figura 21. Reconocimiento de los anticuerpos de conejos.	59
Figura 22. Reconocimiento de los anticuerpos de caballos.....	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución geográfica de distintas especies de alacranes del género <i>Centruroides</i>	5
Tabla 2. Alineamiento de las secuencias de algunas de las toxinas específicas de <i>Centruroides</i> que afectan los canales de Na ⁺	10
Tabla 3. Esquema de inmunización de conejos del grupo 1 con la fracción tóxica enriquecida con CM-32.	35
Tabla 4. Esquema de inmunización de conejos del grupo 2 con la mezcla de venenos de <i>Centruroides</i>	36
Tabla 5. Esquema de inmunización de caballos del grupo 1 con la fracción tóxica enriquecida con CM-32.	40
Tabla 6. Esquema de inmunización de caballos del grupo 2 con la mezcla de venenos de <i>Centruroides</i>	41
Tabla 7. Fracciones de los venenos de <i>Centruroides</i> no retenidas por la resina..	45
Tabla 8. Separación y masa molecular de la fracción tóxica.....	53
Tabla 9. Separación y masa molecular de la fracción no tóxica.....	53
Tabla 10. Comparación de la potencia neutralizante de los sueros de conejos y caballos.	66

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
A_{280nm}	Absorbancia a 280 nanómetros
ALUM	Hidróxido de aluminio
Ca²⁺	Calcio
CFA	Adyuvante completo de Freund
Cl⁻	Cloro
CM-32	Carboximetil-celulosa
COOH	Grupo carboxilo
CPA	Células presentadoras de antígenos
Da	Dalton
DE₅₀	Dosis efectiva media
DL₅₀	Dosis letal media
EC₅₀	Concentración efectiva media
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
F(ab')₂	Dos fragmentos de inmunoglobulina G unidos
Fc	Región constante
gr	Gramo
HRP	Enzima peroxidasa de rábano
IBT	Instituto de Biotecnología
IFA	Adyuvante incompleto de Freund
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina de tipo G
IgM	Inmunoglobulina de tipo M
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IC	Intracraneal
IM	Intramuscular
IP	Intraperitoneal
IV	Intravenosa
K⁺	Potasio
kDa	Kilo Dalton
K_v	Canales de potasio dependientes de voltaje
L	Litro
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm³	Milímetro cúbico
mM	Milimolar
Mm	Masa molecular
M	Molar
µg	Microgramos
µL	Microlitros
NaCl	Cloruro de sodio
Na_v	Canales de sodio dependientes de voltaje
Na⁺	Sodio

PBS	Buffer fosfato salino
pH	Potencial de hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
R²	Coefficiente de determinación
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SC	Subcutánea
Sy.x	Error estándar
TFA	Ácido trifluoroacético
UA_{280nm}	Unidades de absorbancia a 280 nanómetros de longitud de onda

RESUMEN

La intoxicación por picadura de alacrán en seres humanos se debe principalmente a péptidos con actividad neurotóxica presentes en cantidades <5% dentro del veneno, actuando sobre los canales de Na⁺ dependientes de voltaje expresados en células excitables. En México, el tratamiento específico disponible es un antiveneno obtenido de caballos hiperinmunizados con una mezcla de venenos de alacranes del género *Centruroides* (*C. limpidus*, *C. noxius*, *C. tecomanus* y *C. suffusus*).

En el presente trabajo, se obtuvieron las fracciones tóxicas a mamíferos de la mezcla de venenos mediante su interacción con CM-32, dentro de éstas se identificaron las toxinas Cn2 y CII1m, principales componentes tóxicos de los venenos de *C. noxius* y *C. limpidus*, respectivamente. Mientras que dentro de los componentes que no fueron afines a la resina ni tóxicos en ratones, se identificó la toxina Ct16, del alacrán *C. tecomanus*. La letalidad generada por la fracción tóxica fue aproximadamente 3.2 veces más potente que la del veneno completo.

Se produjeron anticuerpos policlonales en conejos y caballos utilizando como inmunógeno la fracción tóxica enriquecida con la resina CM-32. Las características de reconocimiento y neutralización de los sueros hiperinmunes obtenidos fueron comparadas con las de sueros de conejos y caballos hiperinmunizados con la mezcla de venenos de *Centruroides*. Las evaluaciones *in vitro* de todos los sueros hiperinmunes revelaron que hubo reconocimiento hacia los componentes de la mezcla de venenos de *Centruroides*, y en los análisis *in vivo* mostraron su capacidad al neutralizar los síntomas de intoxicación y la letalidad generada por la mezcla de venenos en ratones. No obstante, la DE₅₀ conferida por los anticuerpos producidos en los animales inmunizados con la fracción tóxica enriquecida con CM-32 fue menor que la obtenida al inmunizar con la mezcla de venenos.

El uso de carboximetil celulosa para separar y aislar toxinas de alacranes ha demostrado ser eficiente, sin embargo, al ser utilizada como parte del inmunógeno (con las fracciones tóxicas acopladas), los resultados obtenidos fueron inferiores a los que se obtienen utilizando la mezcla de venenos de *Centruroides*.

ABSTRACT

Scorpion sting poisoning in humans is mainly due by peptides with neurotoxic activity present in amounts <5% within the venom, acting on voltage-gated Na⁺ channels expressed in excitable cells. In Mexico, the specific treatment available is an antivenom obtained from hyperimmunized horses with a mixture of venoms from scorpions of the genus *Centruroides* (*C. limpidus*, *C. noxius*, *C. tecomanus* and *C. suffusus*).

In the present work, the mammalian toxic fractions of the venom mixture were obtained through its interaction with CM-32, within these the toxins Cn2 and CII1m were identified, they are the main toxic components in the venoms of *C. noxius* and *C. limpidus*, respectively. While within the components that were not related to the resin or toxic in mice, the Ct16 toxin, from the scorpion *C. tecomanus*, was identified. The lethality generated by the toxic fraction was approximately 3.2 times more potent than that of the complete venom.

Polyclonal antibodies were produced in rabbits and horses using the toxic fraction enriched with CM-32 as immunogen. The recognition and neutralization characteristics of the hyperimmune sera obtained were compared with those of sera from rabbits and horses hyperimmunized with the *Centruroides* venom mixture. The *in vitro* evaluations of all the hyperimmune sera revealed that there was recognition towards the components of the *Centruroides* venom mixture, and in the *in vivo* analysis they showed their ability to neutralize the symptoms of intoxication and the lethality generated by the venom mixture in mice. However, the ED₅₀ conferred by the antibodies produced in the animals immunized with the toxic fraction enriched with CM-32 was lower than that obtained when immunizing with the venom mixture.

The use of carboxymethyl cellulose to separate and isolate toxins from scorpions has proven to be efficient, however, when used as part of the immunogen (with the toxic fractions bound), the results obtained were lower than those obtained using *Centruroides* venom mixture.

I. INTRODUCCIÓN

La picadura de alacrán y su subsecuente intoxicación debido al veneno administrado, es considerado uno de los principales problemas en varias partes del mundo, incluyendo a México, donde se considera la primera causa de intoxicación por animales ponzoñosos, ya que alberga una gran cantidad de especies de alacranes, muchas de ellas de importancia médica. Hasta la fecha se han registrado 9 familias, 38 géneros y 281 especies diferentes, lo cual representa el 12% de la diversidad que hay en todo el mundo. Sin embargo, la única familia considerada de importancia para la salud pública es la Buthidae (Koch, 1837), que está representada por el 21% de la diversidad de escorpiones mexicanos y, dentro de la cual se incluye el género *Centruroides* (Marx, 1860), con 42 especies.

Debido a la importancia de estas especies, los componentes de sus venenos han sido estudiados y caracterizados desde 1960, con el fin de determinar las toxinas relevantes en la intoxicación generada en humanos. Se ha encontrado que más del 73% de estos componentes corresponden a péptidos que afectan canales iónicos dependientes de voltaje, ya sea modificando su mecanismo de apertura, como es el caso de los canales de sodio (Na^+), o bloqueándolos, en el caso de los de potasio (K^+), y como consecuencia de ello, se desencadena el cuadro clínico de intoxicación.

Por lo tanto, el desarrollo de los antivenenos para tratar las intoxicaciones a consecuencia de la picadura de alacrán ha evolucionado rápidamente, dado que la primera generación, compuesta de suero hiperinmune equino crudo, provocaba reacciones de hipersensibilidad, debido a la presencia de altas concentraciones de proteínas extrañas, los científicos se vieron obligados a buscar soluciones, dando lugar a los antivenenos de segunda generación conformados por inmunoglobulinas (Ig) purificadas del suero de los caballos, sin embargo, el problema no cesó, por lo que se realizaron las investigaciones pertinentes y se determinó que la causa del problema era un fragmento que componía a las inmunoglobulinas, el fragmento cristalizante, este fragmento fue eliminado mediante precipitación con sal y digestión con pepsina, logrando así, eliminar las reacciones adversas, dando lugar a los

faboterápicos (antivenenos de tercera generación) constituidos por fragmentos $F(ab')_2$, dirigidos contra todos los componentes del veneno (incluyendo componentes no tóxicos).

En México, los pacientes intoxicados por picadura de alacrán son tratados con el faboterápico Alacramyn[®], fabricado por la empresa Bioclon, constituido por fragmentos $F(ab')_2$, obtenidos a partir de la hiperinmunización de caballos con una mezcla de venenos de cuatro especies de alacrán (*Centruroides limpidus*, *C. suffusus*, *C. noxius* y *C. tecomanus*), con una capacidad neutralizante de 150 dosis letales medias (DL_{50}), equivalente a 1.8 mg de veneno de alacrán del género *Centruroides*.

Es importante reiterar que para lograr una adecuada neutralización de los componentes tóxicos de los venenos, es necesario administrar el antiveneno, lo cual implica introducir altas concentraciones de anticuerpos extraños al organismo, y dado que muchos de ellos no son terapéuticamente relevantes, como parte del mejoramiento del antiveneno actual, en el presente trabajo se propone utilizar la fracción enriquecida con las toxinas letales a mamíferos (de la mezcla de venenos de las cuatro especies antes mencionadas) que han sido ya reportadas, como inmunógenos, para generar únicamente anticuerpos específicos contra las fracciones relevantes de los venenos y mejorar la potencia neutralizante del antiveneno.

II. ANTECEDENTES

2.1 Características generales de *Centruroides* y su veneno

Los alacranes son artrópodos quelicerados de la clase Arachnida, pertenecientes al orden Scorpiones, están considerados entre los artrópodos más antiguos del mundo, hasta el momento, se han reportado 2,231 especies, clasificadas en 20 familias diferentes, de las cuales nueve habitan en México, siendo una de ellas Buthidae, representada por el género *Centruroides*, único de importancia para la salud pública (Santibáñez-López, *et al.*, 2015; Ponce-Saavedra *et al.*, 2016).

Morfológicamente, el cuerpo del alacrán está cubierto por un exoesqueleto, constituido principalmente por quitina, dividido en tres segmentos (prosoma, mesosoma y metasoma), unidos por un tejido conjuntivo. En el último segmento, el metasoma, se encuentra el telsón, que contiene dos glándulas de veneno en su interior, y debajo de éste, se encuentra el aguijón (Zavala *et al.*, 2004) (figura 1). La regulación del veneno expulsado es voluntaria, y está dada por una capa muscular estriada que recubre la base del telsón, esta capacidad puede justificar la variación en la intensidad de los síntomas en las personas intoxicadas después de la picadura, y a su vez, la posibilidad de picaduras sin inoculación de veneno (Chippaux, 2012).

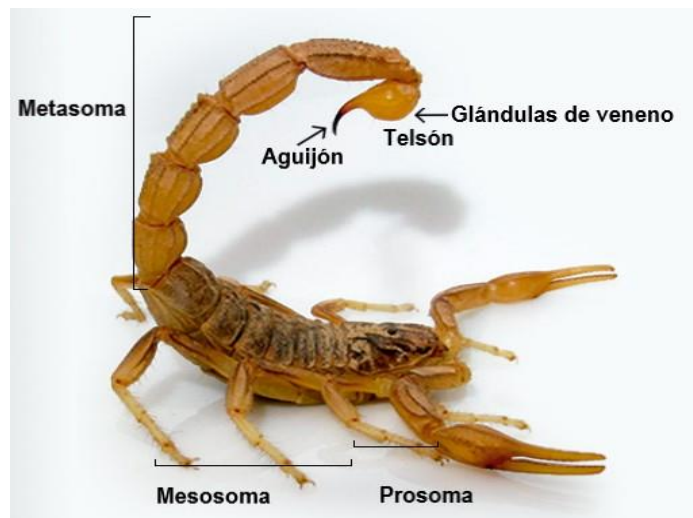


Figura 1. Segmentos en los que se divide el cuerpo del alacrán y las estructuras que se encuentran en el telsón (Fotografía tomada y modificada de: UNAM al día, 2015).

Las especies del género *Centruroides* son de color amarillo claro (alacrán güero), tienen en el dorso líneas longitudinales bien definidas de color café oscuro o negro (figura 2). No obstante, existe una excepción, el alacrán de Nayarit (*Centruroides noxius*), que es de color rojizo oscuro (Possani, 2005) (figura 3), considerado uno de los más letales, dado el potente efecto de su veneno, el cual, tiene una DL_{50} de 5 μ g por 20 g de peso corporal de ratón de la cepa CD1 (Dent *et al.*, 1980). Sin embargo, es una especie que normalmente no cohabita con los humanos, a diferencia de *Centruroides limpidus* que se puede encontrar frecuentemente en los techos, grietas y pisos de las casas, provocando así un mayor número de intoxicaciones.



Figura 2. *Centruroides limpidus* (Karsch, 1879) (Fotografía tomada de: Peralta, 2016).



Figura 3. *Centruroides noxius* (Hoffman, 1932) (Fotografía tomada de: Jumalero, 2018).

En la tabla 1 se muestran las especies de alacranes de importancia médica y su distribución geográfica.

Tabla 1. Distribución geográfica de distintas especies de alacranes del género *Centruroides*.

Especie	Distribución	Referencia
<i>Centruroides limpidius</i> (Karsch, 1879).	Morelos, Guerrero, Michoacán, Estado de México, Querétaro, Hidalgo y Puebla.	(Cid Uribe <i>et al.</i> , 2019)
<i>Centruroides suffusus</i> (Pocock, 1902).	Durango, Zacatecas y este de Sinaloa.	
<i>Centruroides tecomanus</i> (Hoffmann, 1932).	Sureste de Jalisco, Nayarit y Colima.	(Armas <i>et al.</i> , 2003)
<i>Centruroides elegans</i> (Thorell, 1877).	Parte occidental de Jalisco, las costas de Nayarit y el sur de Sinaloa.	
<i>Centruroides meisei</i> (Hoffman, 1939).	Costa de Guerrero y Oaxaca.	
<i>Centruroides noxius</i> (Hoffmann, 1932).	Nayarit, Sinaloa y Jalisco.	

En cuanto al veneno que producen estos artrópodos cabe destacar, que la función principal es facilitar su alimentación y posteriormente, su defensa de ser necesario, la acción del veneno irrumpe las funciones vitales de las presas al reconocer los canales iónicos e interferir con la comunicación celular, lo cual, les ha permitido subsistir a lo largo del tiempo (Fry *et al.*, 2009; Casewell *et al.*, 2013).

2.2 El alacranismo como problema de salud pública en México

Debido a la amplia distribución de las especies de alacranes de interés en salud pública, la gran mayoría de los estados de la República mexicana se ven afectados por numerosas intoxicaciones cada año, de acuerdo con el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) de la Secretaría de Salud, entre los años de 2008 a 2017, se registraron un total de 2,922,027 casos por alacranismo, siendo el 2013 el año con mayor número de casos registrados (figura

4), y Jalisco el estado más afectado, seguido de Guerrero, Guanajuato, Michoacán y Morelos (Secretaría de Salud, 2019).

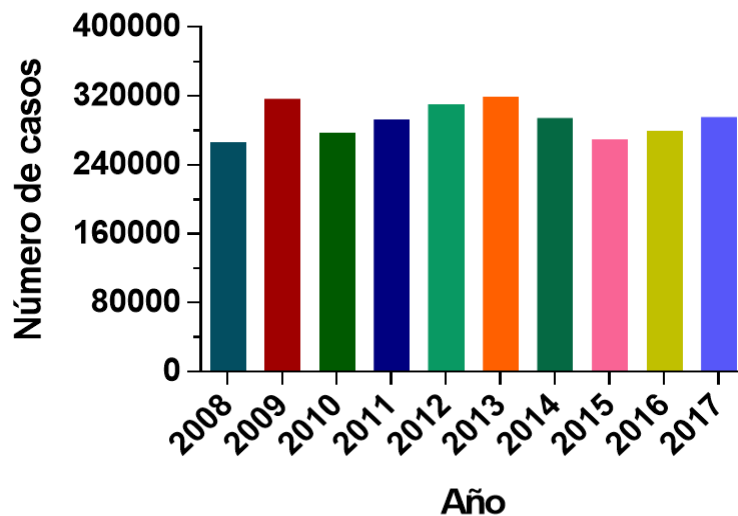


Figura 4. Morbilidad por alacranismo en México, se muestra la incidencia del año 2008 al año 2017 (Datos tomados de: Secretaría de Salud, 2019).

La mortalidad por la picadura de alacrán a nivel nacional varía, de acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) se ha presentado una tendencia decreciente, en comparación con los años de 1990 a 1995, donde se registraron un total de 1,495 casos, mientras que durante los años de 2009 a 2018 en total se registraron solo 405 casos, siendo Nayarit, Guerrero y Jalisco, los estados con mayor número de defunciones (INEGI, 2018).

La sintomatología clínica ocasionada después de la picadura de alacrán es variada, y dependiente de varios factores, principalmente, la especie del alacrán y la cantidad de veneno inoculada, así como la edad, peso y la condición de salud del paciente, siendo los niños y los adultos de la tercera edad los que corren mayor riesgo (Ghalim *et al.*, 2000; Chippaux, 2012).

Antes de proceder con el tratamiento, lo ideal es que el alacrán sea identificado, sin embargo, es complicado, por lo que el diagnóstico se basa principalmente en los síntomas clínicos que presenta el paciente, los cuales inician con dolor, parestesia y cambio de temperatura en el sitio de la picadura, posteriormente, se puede manifestar sialorrea, prurito nasal y faríngeo, sensación

de un cuerpo extraño en la faringe, lagrimeo, fasciculaciones linguales, nistagmus, distensión abdominal y en casos más severos, bradicardia, disnea, taquicardia, vómito, ataxia, dificultad para enfocar imágenes, convulsiones, edema pulmonar e incluso la muerte; el veneno afecta tanto el sistema nervioso simpático como el parasimpático (Erickson y Cheema, 2017), por consiguiente, con el tratamiento se busca detener el efecto tóxico que causa el veneno en el organismo lo antes posible, para así evitar que éste se pueda unir con su receptor, mediante la administración de fragmentos $F(ab')_2$ de inmunoglobulinas del isotipo G de origen equino, los cuales poseen las regiones necesarias para neutralizar a los componentes proteicos responsables de la intoxicación. Los efectos secundarios que se pudieran manifestar al administrar el antiveneno se disminuyen mediante la purificación de las IgG, sin embargo, está estrictamente establecido que para la administración del antiveneno en pacientes es necesario que haya síntomas presentes (Şahin *et al.*, 2018).

2.3 Características del veneno y su mecanismo de acción sobre los canales dependientes de voltaje

El veneno de los alacranes está compuesto por una gran variedad de componentes como mucopolisacáridos, sales, aminoácidos, lípidos, proteínas (algunas de éstas son enzimas) y péptidos de bajo peso molecular (3-7 kDa). Entre las enzimas destacan las fosfolipasas, proteinasas y hialuronidasas, éstas últimas hidrolizan el ácido hialurónico, promoviendo una rápida difusión del veneno inoculado en los tejidos, así mismo facilitando su absorción (Chippaux, 2012). Por otra parte, se ha demostrado que los causales del cuadro de intoxicación son principalmente los péptidos de bajo peso molecular, los cuales reconocen, modifican y bloquean los canales iónicos dependientes de voltaje de crustáceos, insectos, peces o mamíferos, incluyendo al hombre.

Los canales iónicos dependientes de voltaje son una superfamilia compuesta por 143 proteínas, que se encuentran en la membrana celular de forma transmembranal, son consideradas como uno de los grupos más grandes de proteínas de traducción de señales, permiten y controlan el paso de iones tales

como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- a través de la membrana plasmática, por lo tanto, intervienen en el funcionamiento de diversos procesos fisiológicos mediante impulsos eléctricos, con los cuales se controla la contracción del músculo, la secreción de hormonas, el procesamiento de información en el cerebro y su salida hacia los tejidos periféricos (Yu y Catterall, 2004; Callado, 2011).

Para los venenos del género *Centruroides* se han identificado cuatro familias de toxinas que afectan a mamíferos, clasificadas de acuerdo con el canal sobre el que ejercen su acción: canales de Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{2+} , siendo las principales y más estudiadas las que afectan a los canales K^+ y Na^+ . La primera familia, compuesta de 20-43 residuos de aminoácidos unidos por 3 o 4 puentes de disulfuro, bloquea los canales de potasio dependientes de voltaje, y la segunda, que es la más relevante desde el punto de vista médico, está formada por 58-76 aminoácidos unidos por 4 puentes disulfuro, la cual afecta los canales de sodio dependientes de voltaje retardando su activación y modificando su activación hacia potenciales más negativos (Possani y Rodríguez de la Vega, 2006; Laraba-Djebari *et al.*, 2015).

2.3.1 Toxinas que actúan en canales de sodio (Na^+)

El canal de sodio dependiente de voltaje en mamíferos está compuesto de proteínas transmembranales responsables de la iniciación y propagación del potencial de acción en las células excitables, como las musculares, neuronales, esqueléticas y neuroendocrinas (Goldin, 2001). Hasta ahora, se han descrito nueve distintas subunidades α (Nav1.1 a Nav1.9), las cuales se expresan en distintos sitios: Nav 1.1, Nav 1.2, Nav 1.3 y Nav 1.6 en el sistema nervioso central, Nav 1.7, Nav 1.8 y Nav 1.9 en el sistema nervioso periférico, Nav 1.4 en músculo esquelético y Nav 1.5 en músculo cardíaco y gastrointestinal (Goldin, 2001; Panigel y Cook, 2011).

Su estructura consiste en un ensamblaje de subunidades α (260 kDa) que forman el poro y diversas subunidades β (33-36 kDa) las cuales modifican la dependencia de voltaje de la activación del canal. Las subunidades α se organizan en cuatro dominios homólogos (DI-DIV), cada uno con seis segmentos

transmembrana alfa helicoidales (S1-S6) y un asa entre los segmentos S5 y S6, el cual determina la selectividad del poro, los segmentos S4 en cada dominio cargados positivamente actúan como sensores de voltaje y se mueven a través de la membrana para iniciar la activación del canal en respuesta de la despolarización de la membrana. La inactivación está dada por el asa intracelular corta que conecta a DIII y DIV, la cual funciona como compuerta de inactivación durante la despolarización (Guy y Seetharamulu, 1986; Yu y Catterall, 2004; Pedraza *et al.*, 2013) (figura 5).

Se han caracterizado dos toxinas (α y β) que afectan a este canal, las cuales se clasifican dependiendo las características de unión al canal y su mecanismo de acción. Las α -toxinas, reportadas principalmente en alacranes del género *Androctonus* o *Leiurus*, interactúan con el sitio 3 del canal, ubicado en el DIV sobre el segmento S3-S4, bloqueando la inactivación de los canales y generando una corriente persistente (Bosmans y Tytgat, 2007; Martin-Eauclaire *et al.*, 2019). Mientras que las β -toxinas, encontradas especialmente en alacranes del género *Centruroides*, se unen al sitio 4, en los segmentos S3-S4 del DII, modificando el proceso de activación del canal, haciendo que cambie la dependencia de voltaje a potenciales más negativos (Cestèle *et al.*, 1998; Cestèle y Catterall, 2000) (Figura 5).

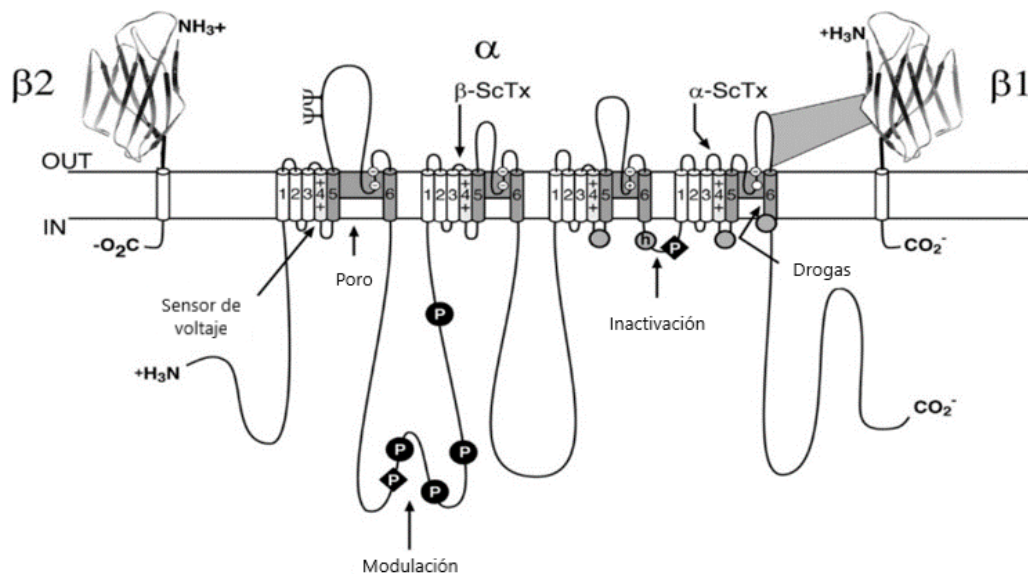


Figura 5. Esquema del canal de sodio dependiente de voltaje y los sitios que son afectados por las toxinas α y β (Imagen tomada y modificada de: Catterall *et al.*, 2005).

Sin embargo, aunque los alacranes mexicanos son considerados una rica fuente de β -toxinas, hasta ahora, los efectos electrofisiológicos de muchas de ellas solo se han caracterizado parcialmente (Schiavon *et al.*, 2012). Se ha observado que actúan de forma preferencial, pero no exclusiva, sobre las subunidades α expresadas en el sistema nervioso central (Na_v 1.1, Na_v 1.2 y Na_v 1.6), particularmente sobre Na_v 1.6, lo que se atribuye a su composición aminoacídica, la cual, provoca que haya una mejor manifestación de los efectos de las toxinas (Catterall *et al.*, 2007). Esta subunidad α (Na_v 1.6) específicamente se expresa en una distribución somatodentrítica, en el córtex cerebral, el cerebelo y el hipocampo (Solé y Tamkun, 2020).

Por otro lado, se han descrito estructuralmente, algunas de las toxinas existentes en el veneno de las diferentes especies de *Centruroides*, siendo sus secuencias de aminoácidos, sus masas moleculares teóricas (MW) y sus puntos isoeléctricos (pI) muy similares entre sí (tabla 2), así mismo se ha determinado que las toxinas CII1m, CII2, CssiI y Cn2, pertenecientes a las especies *C. limpidus*, *C. suffusus* y *C. noxius*, respectivamente, se unen con alta especificidad a los Na_v 1.6, mientras que la CssiIV afecta a los Na_v 1.2 y 1.6 (Possani y Wanke, 2006; Schiavon *et al.*, 2012). Es importante mencionar que las pequeñas diferencias estructurales entre estas toxinas pueden modificar la especificidad sobre las subunidades, y como consecuencia, producir distintos efectos.

Tabla 2. Alineamiento de las secuencias de algunas de las toxinas específicas de *Centruroides* que afectan los canales de Na^+ (Consortium, 2019).

Especie	Toxina	Secuencia aminoacídica de las toxinas	Mm ^a (Da)	pI ^b
<i>C. limpidus</i>	CII1m	KEGYINVLSTGCKYECYKLGDNNDYCLRECKQQYGKGAGGYCYAFGCWCTHLYEQAVVWPLPKKTCT	7541.6	8.15
	CII2	KEGYLVNHSTGCKYECFKLGDNDYCLRECKQQYGKGAGGYCYAFGCWCNHLYEQAVVWPLPKKTCN	7575.6	8.15
<i>C. tecomanus</i>	Ct1a	KEGYLVNHSTGCKYECFKLGDNDYCLRECRQQYGKGAGGYCYAFGCWCTHLYEQAVVWPLPNKTCs	7549.5	7.69
<i>C. noxius</i>	Cn2	KEGYLVDKNTGCKYECCLKLGDNDYCLRECKQQYGKGAGGYCYAFACWCTHLYEQAIWVWPLPNKRCS	7589.7	8.15
	Cn3	KEGYLVELGTGCKYECFKLGDNDYCLRECKARYGKGAGGYCYAFGCWCTQLYEQAVVWPLKNKTCR	7544.7	8.44
	Cn4	-EGYLVNSYTGCKYECFKLGDNDYCLRECKQQYGKGAGGYCYAFGCWCTHLYEQAVVWPLKNKTCN	7477.4	7.74
<i>C. suffusus</i>	CssiI	KEGYLVSKSTGCKYECCLKLGDNDYCLRECKQQYGKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNKTCN	7538.6	8.15
	CssiIV	KEGYLVNSYTGCKFECFKLGDNDYCLRECRQQYGKSSGGYCYAFGCWCTHLYEQAVVWPLPNKTCN	7602.6	7.68
	CssiVI	KEGYLVNSYTGCKFECFKLGDNDYCKRECKQQYGKSSGGYCYAFGCWCTHLYEQAVVWPLPNKTCN	7619.6	8.15

^a Masa molecular; ^b Punto isoeléctrico

2.3.2 Toxinas que actúan en canales de potasio (K⁺)

Los canales de potasio dependientes de voltaje son clasificados en 12 subfamilias diferentes (K_v1-K_v12), cada una formada por subunidades α y β , las cuales determinan la función y cinética, respectivamente; dentro de las funciones están, mantener el potencial de membrana en reposo y controlar el potencial de acción de las células excitables (Kuzmenkov *et al.*, 2015; Nerbonne, 2016).

El canal está constituido por cuatro subunidades α , cada una con seis segmentos (S1-S6), siendo la región S5-S6 donde se forma el poro del canal, y la región entre los segmentos S1-S4 donde se detecta el voltaje (figura 6). Estos canales son activados mediante la despolarización de la membrana celular, y posteriormente, repolarizada al iniciar el transporte de iones de K⁺ para finalizar el potencial de acción (Possani y Rodríguez de la Vega, 2006; Jiménez-Vargas *et al.*, 2017).

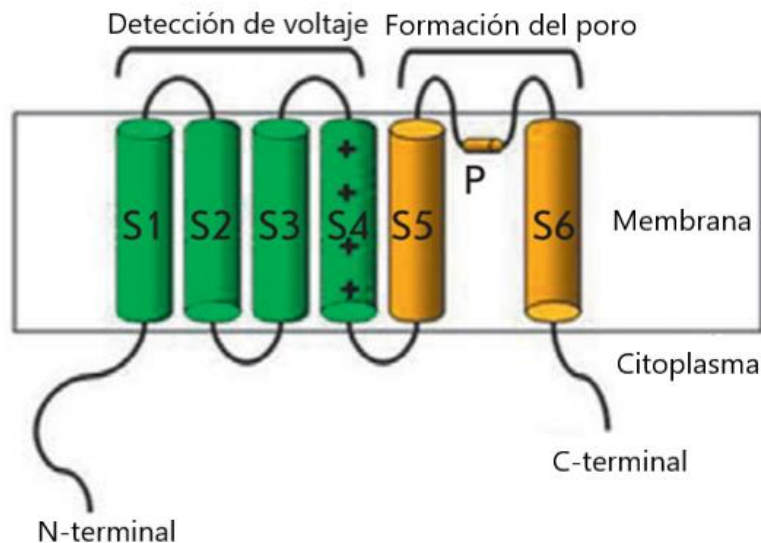


Figura 6. Esquema de una de las subunidades α que constituyen al canal de potasio dependiente de voltaje (Imagen tomada y modificada de: Grizel *et al.*, 2014).

Uno de los ligandos de los canales de K⁺ son las toxinas de alacrán (KTx), las cuales tienen unos pesos moleculares estimados de menos de 4,000 Da y actúan bloqueando los poros del canal impidiendo el paso de los iones (Smith *et al.*, 2011) (figura 7). Estas toxinas se dividen en seis familias α , β , γ , κ , λ y ϵ , las cuales

interactúan con los diferentes subtipos de canales, siendo los más afectados K_v1 , K_v3 , K_v4 , K_v7 , K_v11 y K_{Ca} (Bergeron y Bingham, 2012; Kuzmenkov *et al.*, 2015).

El mecanismo de acción de las toxinas sobre los canales, se lleva a cabo mediante tres mecanismos, el interno, el intermedio y el externo, en los cuales se involucran distintas partes del canal (Rodríguez De la Vega *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2012).

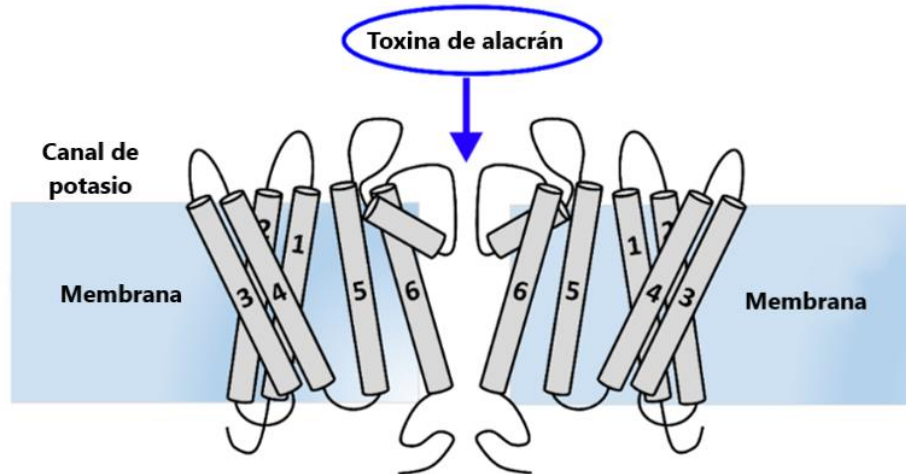


Figura 7. Esquema del sitio de acción de las toxinas de alacrán sobre el canal de potasio dependiente de voltaje (Imagen tomada y modificada de: Zhao *et al.*, 2019).

Hasta ahora se han identificado aproximadamente 400 ligandos polipeptídicos de canales de K^+ en venenos de animales (caracoles cono, anémonas de mar, serpientes, entre otros), de los cuales 250 de ellos pertenecen a venenos de alacranes, lo que representa cerca del 0.5% del número total de componentes potencialmente activos (Sifi *et al.*, 2016). Sin embargo, ninguna de estas toxinas está asociada exclusivamente con una determinada especie animal (Panyi *et al.*, 2006).

Los primeros estudios que revelaron la unión de toxinas a los canales K_v dependientes de voltaje se realizaron en membranas sinaptosomáticas de cerebro de rata y de ratón, utilizando distintas toxinas obtenidas de venenos de escorpiones; la caribdotoxina (ChTX) del veneno del escorpión *Leiurus quinquestriatus* (Miller *et al.*, 1985), la margatoxina (MgTX) del veneno de *Centruroides margaritatus* (Knaus

et al., 1995) y la noxiustoxina (NTX) del veneno de *Centruroides noxius* (Valdivia *et al.*, 1988).

La importancia de estas toxinas radica principalmente en su utilidad para la investigación, ya que han jugado un papel clave en la comprensión estructural y funcional de los canales de K⁺ (Bergeron y Bingham, 2012). Asimismo, se ha contemplado la posibilidad de su aplicación en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de trastornos neurológicos en los que están implicados estos canales (Nerbonne, 2016).

2.4 Producción de antivenenos

2.4.1 Generación de la respuesta inmune humoral inducida por las proteínas de los venenos

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son las moléculas efectoras de la inmunidad humoral, se encuentran en el plasma de la sangre y se distribuyen por todo el organismo, son secretadas por los linfocitos B y, se encargan de reconocer antígenos externos de microorganismos y sus toxinas, así como también de mediar las funciones efectoras para neutralizarlos o eliminarlos de ser necesario (Kindt *et al.*, 2007; Owen *et al.*, 2014a).

Su estructura está dada por cuatro cadenas polipeptídicas, dos ligeras y dos pesadas (cada una de ellas idénticas entre sí) unidas mediante enlaces disulfuro, formando una “Y”, cada cadena posee regiones variables y regiones constantes, las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas se encuentran yuxtapuestas para formar el sitio de unión al antígeno, por lo que en cada inmunoglobulina presenta dos sitios de unión y reconocimiento antigénico (constituidos por dos fragmentos Fab’); por otra parte, la región constante (Fc), constituida por los extremos carboxilo terminal (COOH) de las cadenas pesadas, determina el isotipo de la inmunoglobulina, es capaz de unirse a los receptores de las células efectoras inmunitarias y activar el complemento, considerada como la región más inmunogénica de toda la inmunoglobulina (García Merino, 2011; Owen *et al.*, 2014a) (figura 8).

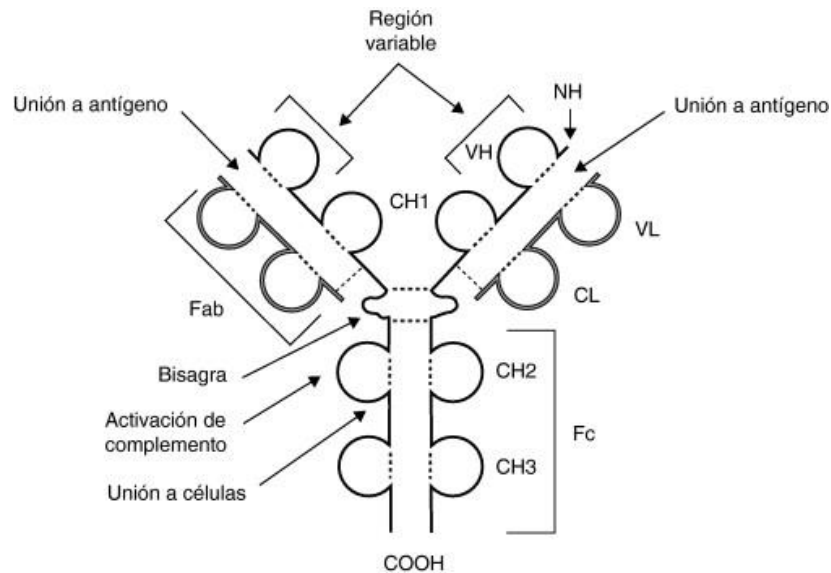


Figura 8. Estructura de una inmunoglobulina. Las cadenas pesadas se muestran en color negro y las ligeras en color gris claro. CH: dominios de la región constante de la cadena pesada; CL: dominio constante de la cadena ligera; NH: extremo amino terminal; VH: dominio variable de la cadena pesada; VL: dominio variable de la cadena ligera; - - -: puentes disulfuro. (Imagen tomada de: García Merino, 2011).

Por medio de enzimas proteolíticas, es posible obtener distintos fragmentos de la inmunoglobulina, por ejemplo, para la obtención del fragmento $F(ab')_2$ utilizado en la producción de antivenenos se utiliza la pepsina, que corta la molécula a la altura de la región bisagra, dejando la región variable intacta y unida; mientras que con la papaína la molécula es digerida más arriba, dejando tres fragmentos, dos Fab y uno constante (García Merino, 2011).

La producción de anticuerpos neutralizantes para la fabricación de antivenenos es realizada en animales, se administran dosis muy bajas al inicio del esquema de inmunización, éstas son crecientes a lo largo de distintos tiempos (dependiendo de muchos factores), con el fin de que el animal desarrolle una respuesta inmune específica contra el antígeno administrado. Además, para garantizar un antiveneno polivalente (mezcla de venenos de varias especies) efectivo y que sea capaz de neutralizar la actividad neurotóxica de los venenos de varias especies del mismo género, es necesario seleccionar como inmunógeno componentes tóxicos del veneno de individuos que representen una determinada población de alacranes, que puedan reaccionar de forma cruzada con algunas de las toxinas presentes en otros venenos (Dehesa-Dávila y Possani, 1994; Espino-

Solis *et al.*, 2009). También se debe considerar que, la inmunogenicidad y la concentración de las moléculas contenidas en el veneno crudo varía significativamente entre ellas, sin embargo, los componentes tóxicos como los no tóxicos participan en la estimulación del sistema inmune del animal, dando lugar a la producción de anticuerpos, provenientes de diferentes clonas de linfocitos B, con diferente especificidad, ya que reconocen distintas regiones (epítopes) de un mismo antígeno, dando lugar a anticuerpos séricos heterogéneos cada uno específico para un epítope, de los que solo un pequeño porcentaje son neutralizantes (León *et al.*, 2011; Owen *et al.*, 2014a).

Tras inocular el veneno se genera una reacción inflamatoria en el tejido dañado, con una subsecuente infiltración celular que en primera instancia, está constituida en su mayoría por neutrófilos, los cuales son células fagocíticas con actividad microbicida encargados de eliminar tejido necrótico, sin embargo, no son células presentadoras de antígenos (CPA), por lo que posteriormente, son reemplazados por un infiltrado compuesto de células dendríticas y macrófagos, que fragmentan por acción proteolítica las proteínas de los venenos a péptidos, los cuales se unen al complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC II), para formar el complejo péptido-MHC II, que posteriormente, es expresado en la superficie celular de las CPA y transportado a los linfonodos, para que pueda ser reconocido por los receptores de membrana de los linfocitos T cooperadores, en interacción con el correceptor CD4+. Posteriormente, se lleva a cabo la proliferación y diferenciación en linfocitos T de memoria y T efectores, así como también la liberación de algunas citocinas como la interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10), derivadas de linfocitos del tipo Th, linfocitos B, mastocitos, eosinófilos y algunas por macrófagos (IL-6), éstas son necesarias para estimular a los linfocitos B a proliferar y diferenciarse en linfocitos B de memoria y en células plasmáticas secretoras de anticuerpos clono específicos (Dias da Silva y Tambourgi, 2011; León *et al.*, 2011; Owen *et al.*, 2014a).

La primera vez que el antígeno entra en contacto con el organismo solo las células con un receptor apropiado serán capaces de unirse, generando una respuesta mínima, donde el isotipo de anticuerpos secretados en más abundancia son las IgM de baja afinidad, y en menor proporción las IgG. Sin embargo, tras inmunizaciones continuas, la capacidad para generar la respuesta será más rápida y estará determinada por la estimulación de los clones previamente expandidos de linfocitos B de memoria, lo cual se ve reflejado en un incremento en la cantidad de anticuerpos del isotipo IgG de alta afinidad (figura 9). A este incremento en la calidad de anticuerpos en el suero centrada hacia a la respuesta inmune de un antígeno en particular, se le llama maduración de la afinidad (Abbas *et al.*, 2012).

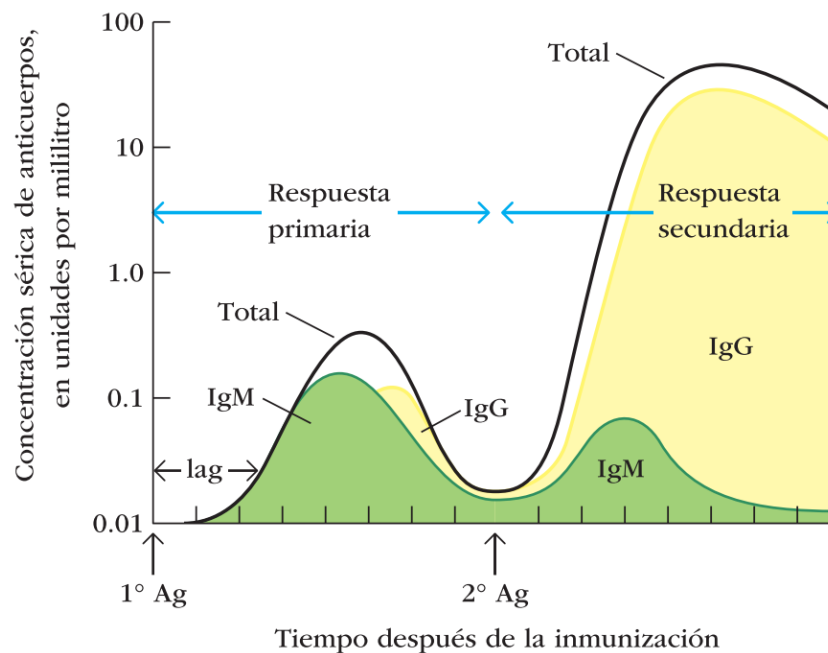


Figura 9. Concentración e isotipo de anticuerpos séricos presentes después de la inmunización primaria y secundaria con el antígeno (Imagen tomada de: Owen *et al.*, 2014).

El diseño de un protocolo de inmunización adecuado dependerá de varios factores, principalmente del objetivo que se tiene sobre los anticuerpos que se generarán, de esta manera se deberá seleccionar el modelo animal que será inmunizado, tomando en cuenta que sea de fácil manejo y mantención, así como la duración del protocolo, las propiedades fisicoquímicas de los inmunógenos, las dosis, los adyuvantes, la vía y los sitios de administración, las fechas de inoculación, el monitoreo y cuantificación de la respuesta inmune, etc. En la actualidad, los

caballos son la especie selecta cuando se requiere obtener un gran volumen de plasma con anticuerpos neutralizantes, la duración de los protocolos varía de 9 a 12 meses (Dias da Silva y Tambourgi, 2011; León *et al.*, 2011).

Se ha reportado que la vía de administración del inmunógeno tiene una gran influencia en los órganos y las poblaciones celulares que participaran en la respuesta inmune, por ejemplo, si la administración es intravenosa el inmunógeno se ubicará en primera instancia en el bazo, mientras que si es por vía subcutánea, en los linfonodos retrofaríngeos, submandibulares, preescapulares, subescapulares o prefemorales; asimismo, al ser inoculado en múltiples sitios, se disminuye la reacción inflamatoria y se aumenta la superficie de contacto entre el antígeno y el área anatómica del animal inmunizado, optimizando la respuesta (Dias da Silva y Tambourgi, 2011; León *et al.*, 2011).

Con respecto a las dosis de inmunógeno a administrar, es bien sabido que dosis muy pequeñas pueden resultar indetectables y dosis elevadas pueden causar daños en el animal, por lo que se recomienda iniciar con dosis pequeñas e ir incrementando, en conjunto con sustancias adyuvantes, las cuales son esenciales para generar una respuesta inmune más eficiente. Éstos adyuvantes garantizan la liberación paulatina del inmunógeno, aumentan su inmunogenicidad y, a su vez, disminuyen la cantidad necesaria de éste para inducir la respuesta inmune requerida. Además, generan una respuesta inflamatoria en el sitio de inoculación, que promueve la infiltración celular, facilitando el paso de macrófagos y células dendríticas, responsables de captar y presentar los antígenos a los linfocitos (Batista-Duarte *et al.*, 2013; Siel *et al.*, 2014).

Entre los adyuvantes de elección para la producción de antivenenos están las sales de aluminio, como el hidróxido, el fosfato y el sulfato potásico de aluminio, donde la sal precipita al antígeno, lo cual le confiere una lenta liberación e incremento de tamaño, facilitando la fagocitosis, luego, están los adyuvantes compuestos de agua y aceite que forman emulsiones, como el adyuvante incompleto de Freund (IFA), que contiene un agente emulsificador como el monooleato de manida, el cual dispersa el aceite en gotas pequeñas que rodean al

antígeno para luego ser liberado lentamente, y el adyuvante completo de Freund (CFA), que fue el primer adyuvante formulado eficaz, que adicionalmente, contiene micobacterias inactivadas, mediante las cuales tiene la capacidad de producir una respuesta potente, y a su vez, altamente dañina en el sitio de inoculación, por lo cual las pautas internacionales han prohibido su uso, dando como alternativa el uso de IFA en su lugar, el cual se debe administrar en pequeños volúmenes y múltiples sitios para reducir el daño local (Kindt *et al.*, 2007; León *et al.*, 2011; Batista-Duharte *et al.*, 2013).

La evaluación de los anticuerpos generados se puede hacer mediante diversas técnicas, tanto *in vivo* como *in vitro*, en las primeras se evalúa la capacidad que tienen los anticuerpos para neutralizar los efectos neurotóxicos inducidos por las toxinas inoculadas en animales, principalmente en ratones, y las segundas están enfocadas a la capacidad que pudieran tener los anticuerpos para formar inmunocomplejos.

2.4.2 Antivenenos

Debido a la alta incidencia de mortalidad a consecuencia de la picadura de alacrán desde tiempos inmemorables, la búsqueda de un tratamiento efectivo basado en la transferencia de inmunidad pasiva fue necesario. El inicio de dicha búsqueda comenzó en 1909, cuando mediante la maceración del telsón del alacrán *Buthus quinquestriatus* se obtuvo veneno, se resuspendió, centrifugó y utilizó para inmunizar caballos, sin embargo, estos presentaron signos clínicos de intoxicación, y para contrarrestarlos se añadió yodo a la mezcla antes de inmunizar (Todd, 1909), luego, en 1915 Maurano repitió el método utilizando el veneno de *Tityus bahiensis* para generar el primer antiveneno contra esa especie, sin embargo, al no ser eficaz, éste fue mejorado en 1917 por Vilela y producido a gran escala en 1918, los sucesos anteriores dieron inicio al periodo de producción de antivenenos de primera generación, los cuales estaban constituidos de anticuerpos que reconocían a los componentes del veneno con el que se inmunizaba a los animales, pero también las proteínas usuales que componían al suero, las cuales eran irrelevantes para que se llevara a cabo la neutralización y resultaban contraproducentes, provocando

reacciones de hipersensibilidad después de su administración. A partir de esto el mejoramiento de los antivenenos fue uno de los objetivos principales de los científicos y laboratorios (Alvarenga *et al.*, 2014). Así, en 1927 se dio paso a la segunda generación de antivenenos, donde las inmunoglobulinas contenidas en el plasma de caballos eran purificadas, para disminuir las reacciones de hipersensibilidad, a pesar de ello, las reacciones persistieron, ya que uno de los fragmentos que componen a las inmunoglobulinas, el fragmento cristalizante, resultaba altamente inmunogénico al ingresar al organismo humano. Razón por la cual surgieron los antivenenos de tercera generación, compuestos de fragmentos $F(ab')_2$ purificados mediante una digestión enzimática con pepsina de las inmunoglobulinas equinas, obtenidas para eliminar el fragmento cristalizante, reduciendo así su inmunogenicidad y manteniendo su capacidad neutralizante, posterior a su obtención, éstas son liofilizadas para ser conservadas por un periodo de tiempo razonable (Carmo *et al.*, 2015) (figura 10).

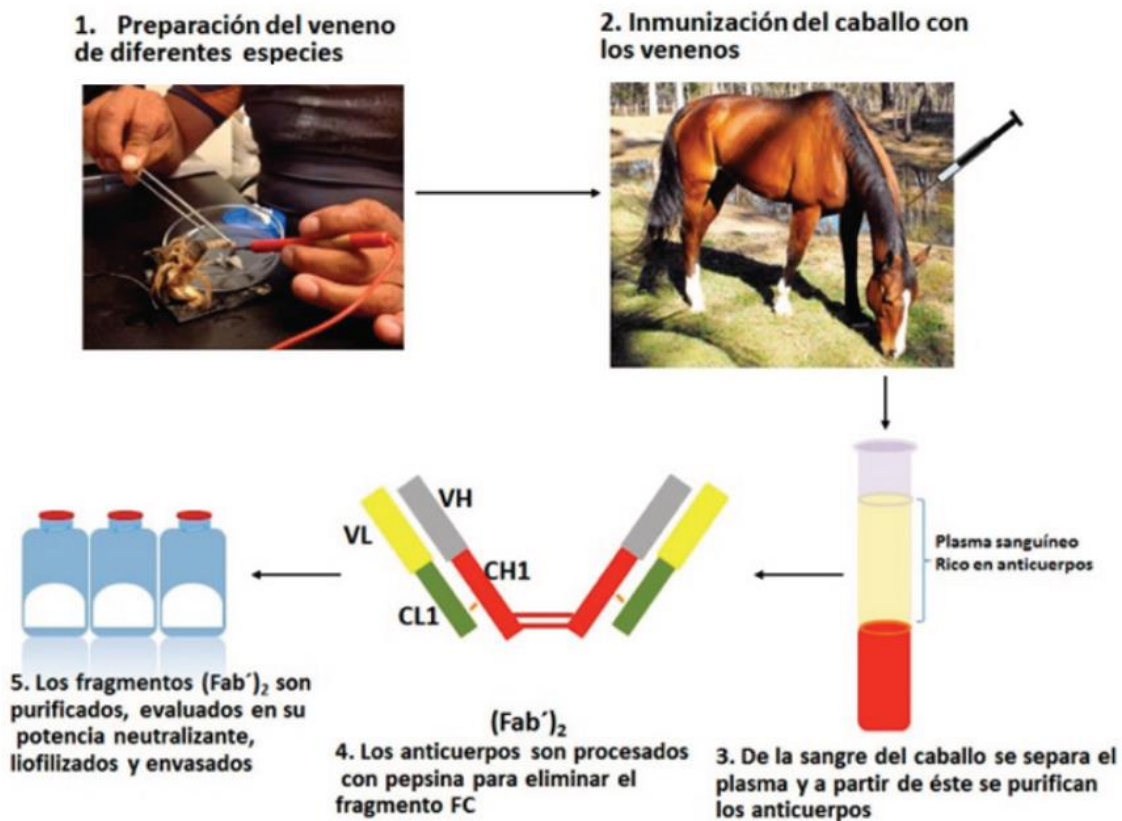


Figura 10. Proceso actual para la producción de antivenenos en caballos contra las toxinas de alacranes (Imagen tomada de: Luján *et al.*, 2014).

En México el antiveneno distribuido actualmente llamado Alacramyn[®], de carácter polivalente, se genera mediante la inmunización de equinos con el veneno de cuatro especies diferentes de alacranes del mismo género: *Centruroides limpidus*, *C. tecomanus*, *C. noxius* y *C. suffusus*, por lo tanto, éste tiene la capacidad de neutralizar de forma cruzada el veneno de diferentes especies de *Centruroides*, lo cual, se asocia con lo similar que son en su estructura y conformación las toxinas que componen los venenos de este género. La administración de este antiveneno es imprescindible para reducir los efectos neurotóxicos causados por péptidos contenidos en el veneno del alacrán (Possani, 2005; Luján *et al.*, 2014).

2.4.3 Uso de la resina catiónica carboximetil celulosa

Generar una respuesta inmune lo suficientemente potente y específica para que se produzcan anticuerpos que sean capaces de reconocer y neutralizar las proteínas tóxicas de los venenos es el elemento clave en la producción de antivenenos efectivos en animales (León *et al.*, 2011), por el momento se ha demostrado que la terapia con fragmentos F(ab')₂ es efectiva e inocua, incluso cuando se utiliza repetidamente (Padilla *et al.*, 2005), a pesar de ello, continuamente se busca mejorar el protocolo clásico de inmunización, donde se utilizan los venenos crudos como inmunógenos, con la finalidad de optimizar la potencia neutralizante de los anticuerpos, desarrollando así métodos que utilizan venenos detoxificados, toxinas recombinantes, péptidos sintéticos, entre otros. No obstante, hasta donde se sabe, ninguno de estos inmunógenos se ha utilizado en la producción de antivenenos comerciales (Carmo *et al.*, 2015).

Aunado a ello, se encontró que la resina catiónica de ácido débil carboximetil celulosa, empleada como matriz en la cromatografía de intercambio iónico para la purificación de proteínas, fue utilizada en 1963 para mejorar la actividad inmunogénica de la neurotoxina contenida en el veneno de la víbora de Palestina (*Vipera palestinae*), con la finalidad de obtener un suero neutralizante en conejos contra el veneno completo, utilizando como inmunógenos la neurotoxina acoplada a la resina, seguido del veneno completo también acoplado a la resina, ambos mezclados con CFA, para generar anticuerpos que permitieran reconocer tanto a la

fracción neurotóxica, como al resto de los componentes del veneno. Posteriormente, basándose en el esquema anterior, en 1966, fue producido en caballos (Kochwa *et al.*, 1959; Moroz *et al.*, 1963; Moroz *et al.*, 1966). Una de las ventajas obtenidas al utilizar este esquema, fue la optimización del tiempo de producción, razón por la cual, más tarde, Liao (1978) utilizó el mismo método, para producir un suero contra las toxinas del veneno de la cobra china o cobra de Taiwán (*Naja atra*) en conejos, obteniendo como resultado que 1 mL de suero era capaz de neutralizar 445 DL₅₀ del veneno completo y luego al hacerlo en caballos, el antiveneno mejoró considerablemente (Liao *et al.*, 1982). Cabe destacar que la resina empleada es un compuesto orgánico polimérico derivado de la celulosa, caracterizado principalmente por la presencia del grupo carboxilo –COOH como grupo funcional (figura 11), el cual le confiere la capacidad de unión a proteínas cargadas positivamente (Cummins *et al.*, 2011; Mayolo-Deloisa *et al.*, 2012).

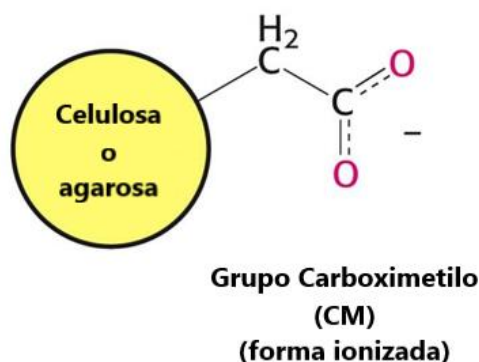


Figura 11. Estructura de la resina catiónica carboximetil celulosa (Imagen tomada de y modificada de: Berg *et al.*, 2008).

La resina también ha sido empleada con venenos de alacranes, en 1980, con la finalidad de purificar y caracterizar las toxinas del veneno de *Centruroides tecomanus* que afectaban a mamíferos, Possani y colaboradores, reportaron que luego de separar el veneno completo por cromatografía de exclusión molecular y obtener la fracción tóxica para mamíferos, ésta fue purificada por cromatografía de intercambio iónico en una columna de carboximetil celulosa microgranular, comercializada por Whatman Inc., con lo cual se observó una alta afinidad de las toxinas hacia la resina, ya que se acoplaron con facilidad, y al ser eluidas con el contraión NaCl en un gradiente lineal de 0 a 0.4 M, de esta manera se recuperó la

fracción tóxica en varias subfracciones (Possani *et al.*, 1980). Luego, en 1988 y 1994 utilizando el mismo método para caracterizar las toxinas de los venenos de *Centruroides limpidus limpidus* y *Centruroides noxius*, se obtuvieron ocho subfracciones al eluir la columna de CM-32 en un gradiente lineal de NaCl 0 a 0.55 M a un flujo de 40 mL/h, de las cuales solo cinco fueron letales en ratones (Alagón *et al.*, 1988) y catorce distintas subfracciones al eluir con un gradiente de NaCl de 0 a 0.5 M, respectivamente, en éste último solo las subfracciones que requirieron una alta fuerza iónica para ser eluidas fueron tóxicas para los ratones (Valdivia *et al.*, 1994).

Los antecedentes descritos anteriormente, sugieren que las toxinas de alacranes del género *Centruroides* que son letales a mamíferos pueden unirse a la resina CM-32 para ser utilizadas como inmunógenos y de esta manera favorecer la respuesta por anticuerpos. Contribuyendo así con la mejora en la potencia neutralizante del antiveneno distribuido actualmente, al generar anticuerpos específicos hacia las toxinas que causan el cuadro clínico de intoxicación en humanos.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los alacranes están considerados entre los animales (artrópodos) ponzoñosos de mayor importancia en la República mexicana, ya que son los agentes responsables de un número considerable de intoxicaciones (292,203 casos) (Secretaría de Salud, 2019) y defunciones (un promedio de 84.6) (INEGI, 2018), afectando en su mayoría a niños y personas de la tercera edad. Razón por la cual, el conocimiento que se tiene sobre la composición de sus venenos, especialmente de los componentes médicamente relevantes, es amplio.

Actualmente, el tratamiento de elección que es administrado a las personas con síntomas de intoxicación es el antiveneno Alacramyn[®], el cual se comenzó a comercializar a partir de 1994 y marcó una notable disminución en el número de defunciones que se presentaban por año (INEGI, 2018). Este antiveneno está compuesto por fragmentos F(ab')₂ purificados, a partir de inmunoglobulinas G, las cuales se producen al inmunizar equinos con una mezcla de 4 venenos de distintas especies de alacranes del género *Centruroides* (*C. limpidus*, *C. noxius*, *C. suffusus* y *C. tecomanus*), este antiveneno es capaz de neutralizar 150 DL₅₀ o 1.8 mg de veneno de alacrán del mismo género.

Sin embargo, al utilizar venenos completos como inmunógenos, existe gran diversidad en los anticuerpos producidos en caballos, ya que reconocen a todos los componentes de los venenos, siendo únicamente una pequeña porción de ellos los asociados con las intoxicaciones en humanos (péptidos neurotóxicos de entre 4.5 y 8 kDa) (Venancio *et al.*, 2013), por lo tanto, es probable que la potencia neutralizante del antiveneno se vea afectada.

Teniendo este contexto, la propuesta de este trabajo estuvo basada en la inmunización de animales exclusivamente con los componentes tóxicos de cada veneno acoplados a la resina catiónica CM-32, con la intención de generar anticuerpos específicos contra los componentes médicamente relevantes que afectan los canales iónicos de mamíferos, capaces de neutralizar el cuadro clínico intoxicación en humanos causado por el veneno completo de *Centruroides*, mejorando así la potencia neutralizante del antiveneno actual.

IV. JUSTIFICACIÓN

La obtención de los fragmentos F(ab')₂ de inmunoglobulinas equinas mediante digestión enzimática con pepsina le ha conferido al antiveneno actual, tolerancia y eficacia en la neutralización de las toxinas letales a mamíferos, sin embargo, la búsqueda nuevos métodos de inmunización, purificación y uso de las inmunoglobulinas y sus fragmentos continua, dado que es de vital importancia mejorar la potencia neutralizante de los anticuerpos.

Al inmunizar a los animales con los 4 venenos de *Centruroides* completos (*C. limpidus*, *C. noxius*, *C. suffusus* y *C. tecomanus*), los anticuerpos policlonales que se obtienen son heterogéneos en términos de isotipo, afinidad y epítopes reconocidos; y tan solo un pequeño conjunto de éstos tiene valor terapéutico, ya que el veneno de los alacranes contiene otros compuestos aparte de las neurotoxinas, que no son tóxicos, induciendo la producción de anticuerpos poco relevantes que pueden reducir la potencia neutralizante del antiveneno. Por lo tanto, es necesario centrar la respuesta inmune en los componentes tóxicos.

V. OBJETIVOS DE CAPÍTULO

5.1 Objetivo general

Caracterizar los anticuerpos policlonales obtenidos utilizando como inmunógeno las fracciones tóxicas de *Centruroides* enriquecidas con carboximetil celulosa en caballos y conejos.

5.2 Objetivos particulares

1. Obtener las fracciones tóxicas a mamíferos mediante su pegado diferencial a carboximetil celulosa (CM-32).
2. Caracterizar tanto la fracción unida a CM-32 como la no unida a través de SDS-PAGE, cromatografía en fase reversa (incluyendo análisis de masas de algunos de los componentes separados) y determinar su letalidad en ratones.
3. Medir la respuesta inmune humoral y la potencia neutralizante de los sueros obtenidos de conejos, así como de caballos hiperinmunizados con la fracción obtenida.

VI. HIPÓTESIS

El suero polivalente de conejos y caballos hiperinmunizados con las fracciones tóxicas a mamíferos acopladas a CM-32 reconocerá y neutralizará la mezcla de venenos de *Centruroides*, con lo cual se espera mejorar la potencia neutralizante de los sueros obtenidos con la mezcla de estos venenos.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Tipo de estudio

Cuantitativo, prospectivo y experimental.

Los conejos de la cepa Nueva Zelanda y los ratones de la cepa CD-1 que se utilizaron para los experimentos de este proyecto fueron proporcionados por el bioterio del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM.

Por otra parte, los caballos utilizados para la producción de anticuerpos fueron proporcionados y manejados por el Rancho Ojo de Agua, Venustiano Carranza, Puebla.

El proyecto fue aprobado por el comité de bioética del IBT, con número de registro 345.

7.2 Localización

El estudio se realizó en las instalaciones del IBT (figura 12), ubicado en el municipio de Cuernavaca (figura 13), en la colonia Chamilpa, en el Estado de Morelos. El municipio cuenta con una temperatura media anual de 21.1°C, siendo abril y mayo, los meses en los que se presenta una mayor temperatura, que varía de los 24°C a los 28°C, y los meses que desciende diciembre y enero, donde la temperatura llega hasta menos de 15°C. Asimismo, presenta una temporada de lluvias que comienza desde mediados de mayo y finaliza en el mes de octubre, alcanzando una precipitación pluvial promedio anual de 1,021 mm³ al año.



Figura 12. Localización del IBT (Imagen tomada de: Instituto de Biotecnología UNAM, 2019).

E) Entroque 1 (Libramiento o Autopista #95d), 1) Glorieta de "La Paz", 2) Distribuidor vial Emiliano Zapata, 3) Estadio "Centenario", 4) Entrada Universidad Autónoma del Edo. de Morelos (UAEM) (glorieta), 5) Edificio principal de la Universidad Autónoma del Edo. de Morelos (UAEM), cuadros anaranjados: gasolineras.



Figura 13. Ubicación del municipio de Cuernavaca (Imagen tomada de: Battroid, 2013).

7.3 Metodología

En la figura 14 se muestra la metodología general realizada para cumplir con los objetivos establecidos de este proyecto.

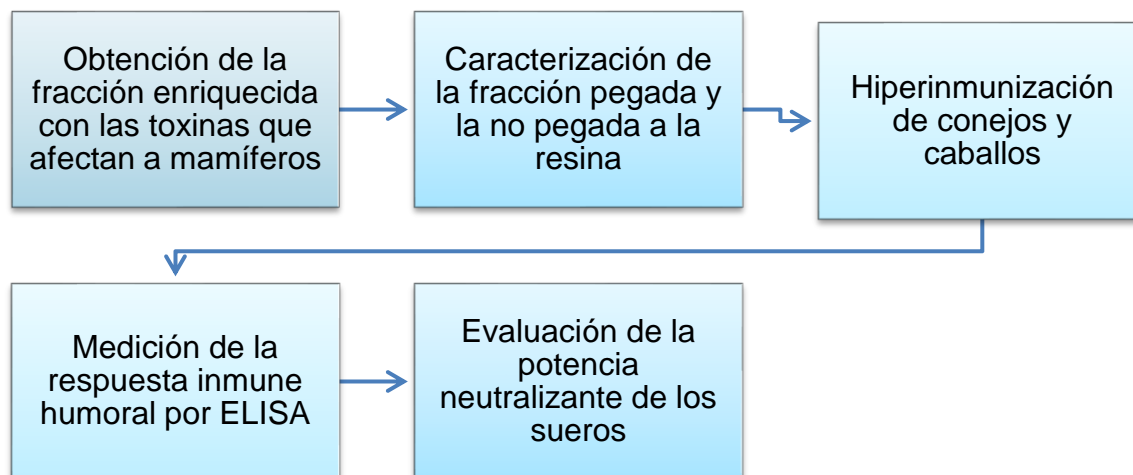


Figura 14. Diagrama de flujo de la metodología general (Imagen de: elaboración propia).

7.3.1 Obtención de las fracciones tóxicas a mamíferos unidas a CM-32

7.3.1.1 Preparación de las soluciones de veneno y su cuantificación proteica por absorbancia ($A_{280\text{nm}}$)

Cada uno de los venenos que se emplearon en este proyecto, fueron proporcionados por el banco de venenos del laboratorio perteneciente al Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del IBT de la UNAM, a cargo del Dr. Alejandro Alagón Cano; estos se encontraban liofilizados y correspondían a una mezcla de varios individuos de las especies de alacranes *C. limpidus*, *C. suffusus*, *C. noxius* y *C. tecomanus*.

Se pesaron 100 mg de cada uno de los venenos en una balanza analítica (Adventure Ohaus™), y posteriormente, se mezclaron (400 mg) en un tubo para centrífuga de 50 mL (marca Falcon) y se resuspendieron en 8 mL de agua destilada, para quedar a una concentración final de 50 mg/mL.

La concentración de proteína de esta solución fue determinada por absorbancia a 280 nanómetros ($A_{280\text{nm}}$) mediante un espectrofotómetro BioMate

(Thermo Scientific™) y una celda de cuarzo (marca Beckman) de 1 cm de longitud. Esta técnica está basada en la presencia de 3 aminoácidos aromáticos (tirosina, triptófano y fenilalanina) cuya absorbancia es a esa longitud de onda.

Para ello, la solución de los 4 venenos fue centrifugada a 3,000 rpm por 15 min a temperatura ambiente utilizando la centrifuga TJ-6 (marca Beckman). El sobrenadante fue recuperado, se realizó una dilución 1:50 en agua destilada y se leyó la concentración de proteína, utilizando agua como blanco analítico. Su valor fue estimado considerando que de acuerdo con la ley de Lambert-Beer una unidad de absorbancia (UA) corresponde a 1mg/mL de proteína y multiplicándolo por el factor de dilución. La mezcla de venenos fue etiquetada y almacenada a -20°C hasta su utilización.

7.3.1.2 Acoplamiento de los venenos de *Centruroides* a la resina CM-32

La resina carboximetil celulosa en forma microgranular (Whatman Chemical Separation Ltd.) utilizada para acoplar la mezcla de venenos de las cuatro especies de *Centruroides* fue preparada mediante el protocolo que se muestra en el anexo 1, posteriormente, se equilibró con buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 6.0, se centrifugó a 3,000 rpm por 15 min a temperatura ambiente utilizando la centrífuga TJ-6 (marca Beckman), se retiró el líquido y se adicionó 1 volumen de agua, para obtener una suspensión 1:1.

A continuación, en un tubo para centrífuga (marca Falcon) de 50 mL se agregaron 8 mL de la suspensión de CM-32, y se adicionaron 3.8 mL de la mezcla de venenos de *Centruroides* (equivalentes a 190 mg/205.2 UA_{280nm}), 2.6 mL de agua destilada y 1.6 mL de buffer de fosfatos de sodio 0.2 M, pH 6.0, se colocaron en agitación suave durante 60 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo, se etiquetaron y almacenaron a -20°C hasta su utilización (anexo 2).

7.3.2 Caracterización de la fracción unida y la no unida a CM-32

Con la finalidad de conservar únicamente las moléculas de la mezcla de venenos de *Centruroides* que son afines a la resina, se tomaron 14.6 mL de la suspensión de la resina con los venenos acoplados anteriormente (equivalentes a

23.75 mg/mL), y se cargaron en una columna, donde se lavaron con buffer de fosfatos de sodio 0.02 M pH 6.2. Las fracciones obtenidas fueron recolectadas para ser caracterizadas y posteriormente, fueron cuantificadas. Para ello, fue utilizado un colector (modelo 2128) y tubos de ensayo, en cada tubo se recolectaron 40 gotas (1.9 mL). Se determinó y registró la concentración de cada fracción, continuando con el lavado de la resina hasta que la A_{280nm} llegó a menos de 0.05. Se obtuvieron un total de 135 fracciones.

Posteriormente, tomando en cuenta los valores de las lecturas de A_{280nm} de las fracciones recolectadas, se seleccionaron y combinaron distintas de ellas, formando varios grupos, los cuales se denominaron con las letras del alfabeto (A, B, C D, E, F y G), a continuación, se determinó nuevamente la concentración de cada mezcla de fracciones, los valores obtenidos se registraron y graficaron mediante el software GraphPad Prism Versión 6.01. Todas las mezclas fueron etiquetadas y almacenadas a $-20^{\circ}C$ hasta su utilización.

Por otro lado, con la finalidad de cuantificar el porcentaje de veneno que quedo acoplado a la resina, se tomaron 0.7 mL de la resina lavada y se colocaron en una columna de centrifugado, donde se eluyeron con buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.7 + NaCl 0.5 M hasta que la A_{280nm} llegó a menos de 0.05. Una vez finalizada la elución, el porcentaje fue determinado mediante una regla de tres. Posteriormente, de las fracciones obtenidas al eluir, se seleccionaron y combinaron aquellas que contenían una mayor concentración de proteína, se determinó su concentración nuevamente, se etiquetaron y almacenaron a $-20^{\circ}C$ hasta su utilización.

El resto de la resina lavada fue etiquetada y almacenada a $-20^{\circ}C$ para su posterior uso como inmunógeno.

7.3.2.1 Toxicidad de las fracciones obtenidas de la mezcla de venenos de *Centruroides*

Para evaluar si las fracciones obtenidas de la mezcla de venenos de *Centruroides* producían un cuadro clínico de intoxicación o muerte en mamíferos,

se realizaron ensayos de toxicidad en ratones de la cepa CD-1 de sexo indistinto de 18 a 20 g de peso. Se inoculó un ratón por dosis, de la siguiente manera: fracción A, se inocularon 100 y 150 µg; fracciones B y C, se inocularon 100 µg; y fracciones E, F y G, se inocularon 20 y 50 µg. La administración fue realizada por vía intravenosa en la vena caudal del ratón.

Los animales se monitorearon durante 24 h, se registró la ausencia o presencia del cuadro clínico de intoxicación y el número de muertes.

7.3.2.2 Análisis por SDS-PAGE

De las fracciones obtenidas previamente, se seleccionaron las más relevantes para el estudio, es decir, aquellas que produjeron toxicidad o mortalidad en los ratones, o en su defecto, las que contenían una mayor concentración de proteína. Posteriormente, se utilizó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de detergente dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), descrita por Laemmli en 1970. Con la finalidad de identificar y comparar los componentes proteicos de las fracciones de interés con la mezcla de venenos de *Centruroides* sin fraccionar. En esta técnica las proteínas se separan en función de su peso molecular (PM), el cual posteriormente es determinado al comparar su movilidad relativa con proteínas de PM conocido.

Para ello, se prepararon en geles al 15% y se corrieron en condiciones reductoras (con β-mercaptoetanol) en una cámara de electroforesis BIO-RAD®, cargando previamente con una jeringa microliter (marca Hamilton) 15 µg de la mezcla de venenos de *Centruroides*, y 15 µg de las fracciones de interés en los diferentes carriles. Al finalizar la separación, los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 y se destiñeron con solución de destinción. El peso molecular se estimó con marcadores de 8 a 140 kDa (marca Bio-Rad) (anexo 3).

7.3.2.3 Fraccionamiento por HPLC en fase reversa

Con la finalidad de separar los componentes de la mezcla de venenos de *Centruroides* y las fracciones de interés se utilizó la técnica de cromatografía líquida

de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC, por sus siglas en inglés), utilizando un equipo marca Varian PROSTAR 210® y una columna C₁₈ analítica (250 x 4.6 mm, con tamaño de partícula de 5 µm) marca ZORBAX®. Se inyectó 1 mg de cada fracción o veneno seleccionado disuelto en 500 µL de agua destilada más ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% (solución A), previamente centrifugado a 14,000 rpm durante 5 min, para eliminar los residuos insolubles existentes. La columna fue eluída con un gradiente de solución B (acetonitrilo más 0.1% de ácido trifluoroacético) de 0-80% a un flujo de 1 mL/min por 80 min (anexo 4).

Las fracciones fueron monitoreadas a 214 nm y colectadas manualmente en tubos para microcentrífuga (marca eppendorf) de 1.5 mL, y posteriormente, sometidas a un proceso de secado en un savant (Speedvac Savant SDP1010, Thermo Scientific), con la finalidad de eliminar los solventes contenidos. Cada fracción fue etiquetada y almacenada a -20°C hasta su uso posterior.

Por otro lado, los perfiles cromatográficos obtenidos se compararon y se seleccionaron las fracciones más relevantes, las cuales, fueron resuspendidas en 20 µL de agua destilada y cuantificadas a una longitud de onda de 280nm en el sistema NanoDrop (1000 Spectrophotometer Thermo Scientific), estos datos dieron a conocer las concentraciones de cada fracción.

7.3.2.4 Determinación de masa moleculares

La determinación de las masas moleculares de las fracciones de interés fue realizada mediante el espectrofotómetro de masas (ESI-MS Finnigan LCQ^{DUO} ion trap mass spectrometer) con la asistencia técnica del Dr. Fernando Zamudio.

7.3.2.5 Determinación de la dosis letal media

Para conocer el grado de toxicidad de la mezcla de venenos de *Centruroides* y su fracción tóxica se determinó la dosis letal media (DL₅₀), definida como la dosis de veneno capaz de producir la muerte del 50% del total de una población representativa de animales bajo experimentación (expresada en µg/ratón o mg/kg).

Se utilizaron grupos de tres ratones de sexo indistinto de 18 a 20 g de peso de la cepa CD-1. Cada grupo se inoculó con diferentes cantidades de la mezcla de venenos (5 a 20 μg) y de la fracción tóxica (2 a 15 μg) en un volumen final de 0.5 mL de cloruro de sodio (NaCl) 0.15 M por ratón (anexo 5). La administración se realizó por vía intravenosa en la vena caudal del ratón. A las 24 h posteriores a la inoculación se registró el porcentaje de mortalidad de cada grupo.

7.3.3 Inmunización de conejos con la fracción tóxica unida a CM-32

Para evaluar la capacidad inmunogénica de la fracción tóxica de *Centruroides* unida a CM-32 en conejos se utilizaron como unidades experimentales dos grupos con tres conejos hembras de la cepa Nueva Zelanda con la clave de bioterio 70, 71, 72, 73, 74 y 75, seleccionados por conveniencia.

7.3.3.1 Preparación de inmunógeno

Para preparar el inmunógeno, se tomaron 0.7 mL de la suspensión con los venenos acoplados a la resina (equivalente a 16.6 mg de la mezcla de venenos de *Centruroides*) y se colocaron en una columna de centrifugado, donde se lavaron con buffer de fosfatos de sodio 0.02 M pH 6.2, hasta que la $A_{280\text{nm}}$ llegó a menos de 0.05, lo cual, fue determinado mediante un espectrofotómetro BioMate (Thermo Scientific™) y una celda de cuarzo (marca Beckman) de 1 cm de longitud, con la finalidad de obtener únicamente las fracciones que se acoplaron a la resina. A continuación, la resina lavada fue resuspendida en un volumen total de 3.3 mL de agua destilada para alcanzar una concentración equivalente a 5 mg/mL, esta suspensión con la fracción tóxica enriquecida con CM-32 se utilizó para inmunizar al grupo 1 (70, 71 y 72).

Por otro lado, como método de comparación, el grupo 2 (73, 74, 75) se inmunizó con la mezcla de venenos de *Centruroides* sin fraccionar, para ello se tomaron 350 μL del stock de la mezcla de venenos a una concentración de 50 mg/mL y se les adicionaron 3.15 mL de agua destilada para alcanzar un equivalente de 5 mg/mL.

7.3.3.2 Esquema de inmunización

El diseño de los esquemas de inmunización fue realizado con base en la experiencia del laboratorio que está bajo la dirección del Dr. Alejandro Alagón Cano (Calderón, 2011; Pérez, 2019), perteneciente al Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos en el IBT de la UNAM. A continuación, en las tablas 3 y 4 se muestran dichos esquemas.

Tabla 3. Esquema de inmunización de conejos del grupo 1 con la fracción tóxica enriquecida con CM-32.

No. inmunización	Día	Dosis de veneno ($\mu\text{g}/\text{conejo}$)	Adyuvante	Ruta (2 a 4 puntos)	Sangría (mL)
	0		Preimmune		2
1	1	5	IFA	SC	-
2	7	5	IFA	SC	1
3	14	10	ALUM	SC	1
4	21	15	IFA	SC	1
5	28	25	Sin adyuvante	SC	1
6	35	50	ALUM	SC	1
7	49	200	IFA	SC	1
8	63	400	Sin adyuvante	SC	1
9	77	700	ALUM	SC	1
10	91	1000	IFA	SC	1
11	105	1250	ALUM	SC	1
12	119	1500	Sin adyuvante	SC	1
	126		Sangría a blanco		

IFA: Adyuvante incompleto de Freund; ALUM: Hidróxido de Aluminio; SC: vía subcutánea.

Tabla 4. Esquema de inmunización de conejos del grupo 2 con la mezcla de venenos de *Centruroides*.

No. inmunización	Día	Dosis de veneno ($\mu\text{g}/\text{conejo}$)	Adyuvante (mL)	Ruta (2 a 4 puntos)	Sangría (mL)
	0		Preimmune		2
1	1	10	IFA	SC	-
2	7	10	IFA	SC	1
3	14	20	ALUM	SC	1
4	21	30	IFA	SC	1
5	28	50	Sin adyuvante	SC	1
6	35	100	ALUM	SC	1
7	49	200	IFA	SC	1
8	63	400	Sin adyuvante	SC	1
9	77	700	ALUM	SC	1
10	91	1000	IFA	SC	1
11	105	1250	ALUM	SC	1
12	119	1500	Sin adyuvante	SC	1
	126		Sangría a blanco		

IFA: Adyuvante incompleto de Freund; ALUM: Hidróxido de Aluminio; SC: vía subcutánea.

La duración de ambos esquemas de inmunización fue de 119 días, donde se inocularon los inmunógenos en cantidades crecientes partiendo de 5 $\mu\text{g}/\text{conejo}$ para el grupo 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{conejo}$ para el grupo 2, hasta alcanzar una dosis de 1,500 $\mu\text{g}/\text{conejo}$. Cada aplicación fue realizada en un volumen total de 1.0 a 1.2 mL por conejo, empleando el adyuvante incompleto de Freund e hidróxido de aluminio de manera alterna; y en algunas ocasiones se inoculó el antígeno sin adyuvante. La inoculación se realizó por vía subcutánea en 4 diferentes puntos del lomo de los conejos.

En cada inmunización se obtuvieron muestras de sangre mediante punción de la vena marginal de la oreja, las cuales se colocaron en tubos (marca Eppendorf) sin anticoagulante, y se centrifugaron en la centrífuga 5418 (marca Eppendorf) a

13,000 rpm por 5 min a temperatura ambiente para obtener el suero. Posteriormente, una semana después de la 12^a inmunización (día 126), se realizó la sangría a blanco de ambos grupos de conejos, mediante punción cardiaca, administrando previamente Xilacina (PROCIN[®]) y Ketamina (ANESKET[®]) como parte del protocolo de anestesia establecido por el bioterio del IBT.

Todos los sueros obtenidos se etiquetaron por fecha y se almacenaron en congelación a -20°C para su uso posterior en las pruebas *in vitro* e *in vivo*.

7.3.3.3 Medición de la respuesta inmune humoral

Para determinar el nivel de producción de anticuerpos generados por los conejos hiperinmunizados se llevó a cabo el ensayo inmunoenzimático (ELISA) de tipo indirecto con el diseño mostrado en la figura 15. La preparación de los buffers y soluciones empleadas se muestran en el anexo 6.

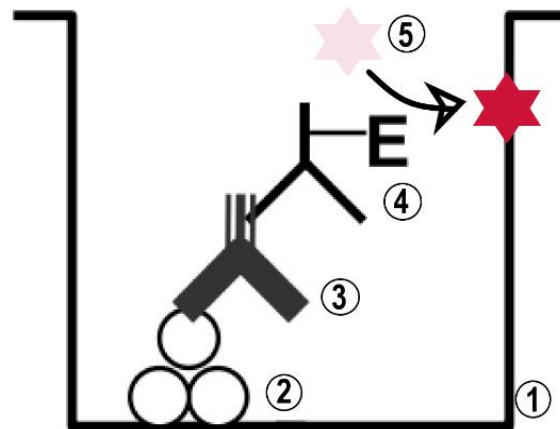


Figura 15. Esquema de ELISA indirecto para detección de anticuerpos (Imagen tomada y modificada de: Lomonte, 2007). 1. Microplaca para el ELISA; 2. Antígeno: mezcla de venenos de *Centruroides*, fracción tóxica o fracción no tóxica; 3. Ig's de conejo; 4. Anti-IgG de conejo producido en cabra conjugado con HRP (Goat anti-rabbit IgG HRP); 5. Sustrato ABTS.

Para este ensayo se sensibilizaron microplacas de poliestireno con fondo plano (marca Thermo Scientific[®]) de 96 pozos con una solución de la mezcla de venenos de *Centruroides*, su fracción tóxica o su fracción no tóxica a una concentración de 5 µg/mL en 100 µL/pozo de buffer de carbonatos (0.1 M de NaHCO₃ pH 9.5) durante 2 h a 37°C, con excepción de la 12^a columna que fungió como blanco. Concluida la incubación, las placas fueron lavadas con 200 µL/pozo

de solución de lavado (0.05 M Tris-HCl pH 8, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20) por triplicado y se bloquearon los sitios en donde pudiese haber uniones inespecíficas con 200 μ L/pozo de solución de bloqueo (5 mg/mL de gelatina y 0.2% Tween 20 en 0.05 M Tris/HCl pH 8) por 2 h a 37°C.

Después del lavado de las microplacas, en la primera columna se colocaron por duplicado 150 μ L de los sueros de conejo correspondientes a las sangrías obtenidas en una dilución 1:30 en buffer de reacción (0.05 M Tris-HCl pH 8, 5 M NaCl, 0.2 mg/mL de gelatina y 0.2% Tween 20). En los pozos restantes se dispensaron 100 μ L de buffer de reacción y se realizaron diluciones seriadas 1:3 hasta la 10^a columna de las microplacas en un volumen final de 100 μ L; las columnas 11 y 12 fungieron como blancos, y se incubaron por 1 h a 37°C.

Para la aplicación del anticuerpo secundario, tras haber lavado las placas, se añadieron 100 μ L/pozo de suero anti-IgG de conejo producido en cabra acoplado a peroxidasa (marca GeneTex), en una dilución 1:2000 en solución de reacción y se incubaron 1 h a 37°C. Por último, posterior al lavado de las placas, para detectar la interacción antígeno-anticuerpo, se añadieron 100 μ L/pozo de solución de revelado (0.07 M buffer citrato-fosfato pH 4.2, solución de ABTS 50 mg/mL y 0.04% de H₂O₂), la cual contiene un sustrato (ABTS) que al ser degradado por la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) produce una reacción de color, se dejó que la reacción prosiguiera durante 15 min a temperatura ambiente, y se detuvo mediante la adición de 25 μ L/pozo de solución de paro (SDS al 20%). A continuación, se procedió a la lectura de absorbancia en el lector de microplacas Tecan, de la línea Sunrise a una longitud de onda de 405 nm.

7.3.3.4 Medición de la potencia neutralizante de los sueros de conejo hacia la mezcla de venenos de *Centruroides*

Para conocer la potencia neutralizante de los sueros de conejo se determinó la dosis efectiva media (DE₅₀), definida como la dosis de suero mezclada con 3 DL₅₀ de veneno necesaria para la sobrevivencia del 50% del total de una población representativa de animales bajo experimentación. Se utilizaron grupos de tres ratones de sexo indistinto de 18 a 20 g de peso de la cepa CD-1. Se administraron

por vía intravenosa diferentes volúmenes de la mezcla de sueros del día 126 de ambos grupos (véase en el anexo 8, inciso 1 y 2) incubados previamente, a 37°C por 30 min, con 3 DL₅₀ de la mezcla de venenos de *Centruroides*, en un volumen final de 0.5 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) por ratón (anexo 5). A las 24 h posteriores a la administración, se registró el porcentaje de sobrevivencia de cada grupo. Por otro lado, como control positivo, con la finalidad de asegurar que la sobrevivencia observada correspondió al efecto neutralizante de los sueros, se inyectó un ratón por vía intravenosa, únicamente con el equivalente a 3 DL₅₀ de la mezcla de venenos de *Centruroides*, ajustada a 0.5 mL con PBS, y como control negativo, se administró únicamente el pool de suero que fue probado en cada ensayo.

7.3.4 Inmunización de equinos con la fracción tóxica unida a CM-32

Para evaluar la capacidad inmunogénica de la fracción tóxica de *Centruroides* unida a CM-32 en caballos fueron utilizados dos grupos con tres caballos cada uno, designados con los números 304, 306, 310, 311, 312 y 313, seleccionados por conveniencia.

7.3.4.1 Preparación de inmunógeno

En la preparación del inmunógeno se utilizó como stock la CM-32 previamente lavada, en la cual se encontraba acoplada la fracción tóxica de la mezcla de venenos de *Centruroides* (12.83 mg/mL en suspensión de agua). Se tomaron 1600 µL del stock y se les agregaron 2.5 mL de agua destilada para alcanzar un equivalente de 5 mg/mL para las inmunizaciones de la 1 a la 8, y de la 9 a la 13 se utilizó el stock a 12.83 mg/mL en agua destilada, y se tomó la cantidad de microlitros necesaria para cada una de las inmunizaciones. Este inmunógeno (fracción tóxica enriquecida con CM-32) fue utilizado para inmunizar al grupo 1 (306, 312 y 313).

Por otro lado, como método de comparación, se inmunizó el grupo 2 (304, 310, 311) con la mezcla de venenos de *Centruroides* sin fraccionar, utilizando un stock con una concentración de 50 mg/mL. Para las inmunizaciones de la 1 a la 8

se tomaron 400 µL del stock de la mezcla de venenos, y se agregaron 3.6 mL de agua para alcanzar un equivalente de 5 mg/mL. Posteriormente, para las inmunizaciones de la 9 a la 11 se tomaron 1120 µL del stock de la mezcla de venenos y se agregaron 1.7 mL de agua destilada para alcanzar una concentración equivalente a 20 mg/mL, y para las inmunizaciones de la 12 a la 13, únicamente se utilizó el stock de la mezcla de venenos.

7.3.4.2 Esquema de inmunización

Los esquemas de inmunización se muestran a continuación en las tablas 5 y 6.

Tabla 5. Esquema de inmunización de caballos del grupo 1 con la fracción tóxica enriquecida con CM-32.

No. inmunización	Día	Dosis de veneno (µg/caballo)	Adyuvante (mL)	Ruta (2 a 4 puntos)	Sangría (mL)
	0		Preimmune		50
1	1	50	IFA	ID	-
2	7	50	IFA	SC	50
3	14	100	ALUM	SC	50
4	21	250	IFA	SC	50
5	28	500	Sin adyuvante	SC	50
6	35	1000	ALUM	SC	50
7	49	1500	IFA	SC	50
8	63	3000	Sin adyuvante	SC	50
9	77	4500	ALUM	SC	50
10	91	6000	IFA	SC	50
11	105	7500	Sin adyuvante	SC	50
12	119	9000	ALUM	SC	50
13	133	11500	IFA	SC	50
	140		Sangría		250

IFA: Adyuvante incompleto de Freund; ALUM: Hidróxido de Aluminio; ID: vía intradérmica; SC: vía subcutánea.

Tabla 6. Esquema de inmunización de caballos del grupo 2 con la mezcla de venenos de *Centruroides*.

No. inmunización	Día	Dosis de veneno ($\mu\text{g}/\text{caballo}$)	Adyuvante (mL)	Ruta (2 a 4 puntos)	Sangría (mL)
	0		Preimmune		50
1	1	50	IFA	ID	-
2	7	50	IFA	SC	50
3	14	100	ALUM	SC	50
4	21	250	IFA	SC	50
5	28	500	Sin adyuvante	SC	50
6	35	1000	ALUM	SC	50
7	49	1500	IFA	SC	50
8	63	3000	Sin adyuvante	SC	50
9	77	4500	ALUM	SC	50
10	91	6000	IFA	SC	50
11	105	7500	Sin adyuvante	SC	50
12	119	9000	ALUM	SC	50
13	133	11500	IFA	SC	50
	140		Sangría		250

IFA: Adyuvante incompleto de Freund; ALUM: Hidróxido de Aluminio; ID: vía intradérmica; SC: vía subcutánea.

La duración de ambos esquemas de inmunización fue de 133 días, donde se inocularon los inmunógenos en cantidades crecientes partiendo de 50 $\mu\text{g}/\text{caballo}$ en ambos grupos, hasta alcanzar una dosis de 11,500 $\mu\text{g}/\text{caballo}$. La primera inmunización se realizó por vía intradérmica, en un volumen total de 2 mL/caballo, en 10 puntos distintos a lo largo del cuello del animal, con el fin de maximizar el área de superficie de contacto con el inmunógeno, mejorando la interacción con las células presentadoras de antígeno y la respuesta inmune. Posteriormente, las inmunizaciones fueron realizadas por vía subcutánea en 2 o 4 puntos diferentes.

Cada aplicación fue realizada en un volumen total de 1 a 2 mL/caballo, empleando el adyuvante incompleto de Freund e hidróxido de aluminio de manera alterna; y en algunas ocasiones se inoculó el inmunógeno sin adyuvante. En cada inmunización se obtuvieron muestras de sangre mediante punción de la vena yugular, las cuales fueron colectadas en matraces estériles, donde se dejaron reposar durante 1.5 h aproximadamente, para permitir la formación del coágulo, posteriormente se obtuvo el suero y se centrifugó a 13,000 rpm para colectar un suero libre de células.

Todos los sueros obtenidos se etiquetaron por fecha y se almacenaron en congelación a -20°C para su uso posterior en las pruebas *in vitro* e *in vivo*.

7.3.4.3 Medición de la respuesta inmune humoral

La respuesta inmune humoral de los caballos también fue evaluada por el ensayo inmunoenzimático de tipo ELISA indirecto, para ello, se realizaron los mismos pasos descritos en la sección 7.3.3.3 (medición de la respuesta inmune humoral de los conejos). Con las siguientes excepciones: como anticuerpo primario se utilizó la mezcla de sueros de los caballos y como anticuerpo secundario, el suero comercial de cabra anti-IgG de caballo (marca GeneTex), acoplado a HRP, en una dilución 1:2000 (anexo 7).

7.3.4.4 Medición de la potencia neutralizante de los sueros de equinos hacia la mezcla de venenos de *Centruroides*

La determinación de la DE₅₀ de los sueros de caballo fue llevada a cabo bajo el mismo esquema que la de los conejos. Con excepción de que, los diferentes volúmenes de la mezcla de sueros que se incubaron previamente con las 3 DL₅₀ de la mezcla de venenos de *Centruroides*, fueron del día 140, de ambos grupos (véase en el anexo 8, inciso 3 y 4). De igual manera, se llevó a cabo un control positivo y un control negativo.

7.3.5 Análisis de datos

Para determinar las DL₅₀ y las DE₅₀ en este trabajo, los datos obtenidos fueron procesados utilizando el software GraphPad Prism Versión 6.01, mediante el

cual, se realizó un análisis de regresión no lineal a través de una curva sigmoide dosis-respuesta, graficando el porcentaje de mortalidad (DL_{50}) o la supervivencia (DE_{50}) en función del logaritmo de la dosis de veneno o suero inoculado.

Por otro lado, los valores obtenidos en el ELISA indirecto fueron procesados para calcular el título de anticuerpos (EC_{50}), el cual, fue determinado como la dilución de suero a la cual se obtiene el 50 % del máximo de reconocimiento ($A_{405\text{ nm}}$). Para ello, se graficaron los valores obtenidos en función del logaritmo de la dilución de la mezcla de sueros evaluado para obtener una curva sigmoide dosis-respuesta utilizando de igual manera el software GraphPad Prism Versión 6.01.

Los títulos de anticuerpos de cada microplaca fueron normalizados utilizando como control la mezcla de sueros del último día (día 126 en los grupos de conejos y día 140 en los grupos de caballos). De esta manera, se promediaron los títulos del suero control de cada microplaca y se calculó el factor de corrección para cada microplaca, el cual fue determinado al dividir el promedio de los títulos del suero control entre el título del suero control de cada microplaca. A continuación, se determinaron los títulos de anticuerpos normalizados de cada mezcla de sueros al dividir el título de anticuerpos entre el factor de corrección de cada microplaca.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Cuantificación de la proteína y obtención de las fracciones tóxicas a mamíferos enriquecidas con CM-32

Aunque existen muchos componentes en el veneno de los alacranes, las toxinas que se unen a los canales de Na^+ dependientes de voltaje son consideradas las más importantes en lo que respecta a mamíferos, en particular, los seres humanos (Chippaux, 2012; Laustsen *et al.*, 2016); estas toxinas están presentes en un porcentaje inferior al 5% del peso seco del veneno (Miranda *et al.*, 1970; Chippaux y Goyffon, 2008). En el presente trabajo para la obtención de estas toxinas se emplearon los venenos de *C. limpidus*, *C. tecomanus*, *C. suffusus* y *C. noxius*.

Una vez pesados y resuspendidos los 4 venenos de *Centruroides* se midió la concentración de la proteína, por $A_{280\text{nm}}$, el valor obtenido fue de 54 mg/mL, por lo que se realizó el ajuste de la concentración por peso para quedar a una concentración de 50 mg/mL.

Posteriormente, de la solución de venenos anterior, un total de 190 mg (equivalentes a 205.2 $\text{UA}_{280\text{nm}}$), fueron acoplados a la resina CM-32 mediante uniones electrostáticas, bajo las condiciones antes descritas.

Para conservar únicamente los componentes de la mezcla de venenos afines a la CM-32, se tomaron 14.6 mL (equivalentes a 187.24 $\text{UA}_{280\text{nm}}$) de la suspensión anterior, y fueron cargados en una columna, donde se lavaron con un buffer de fosfatos de sodio 0.02 M pH 6.2, obteniendo un total de siete fracciones, denominadas A, B, C, D, E, F y G (figura 16).

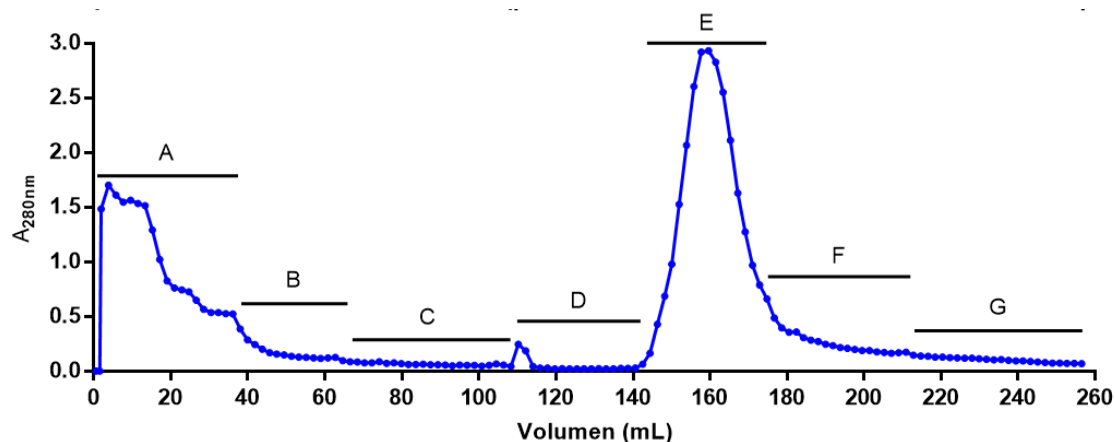


Figura 16. Cromatograma de las fracciones recolectadas al lavar la CM-32 con los venenos de *Centruroides* acoplados. Se cargaron en una columna 187.7 UA_{280nm} de la mezcla de venenos de *Centruroides* acoplados a la resina CM-32 y se lavaron con buffer de fosfatos de sodio 0.02 M pH 6.2. En el eje X se muestra el volumen recolectado de cada fracción, y en el eje Y la A_{280nm}. Lo recolectado se separó en siete fracciones, siendo la A y la E las que contenían una mayor concentración de proteína.

En lo que respecta al porcentaje de veneno recuperado, el total fue de 55.7%, siendo las fracciones A y E las más abundantes con un 18.7% y 24.9%, respectivamente (tabla 7).

Tabla 7. Fracciones de los venenos de *Centruroides* no retenidas por la resina. Las UA_{280nm} iniciales fueron 187.24, de manera que, el porcentaje recuperado en las siete fracciones fue de 55.7%.

Fracción	Número de tubos	Volumen colectado (mL)	A _{280nm}	UA _{280nm}	Recuperación (%)
A	1-19	36.1	0.969	34.98	18.7
B	20-34	26.6	0.158	4.20	2.2
C	35-57	43.7	0.063	2.75	1.5
D	58-75	33.5	0.043	1.44	0.8
E	76-91	29	1.608	46.63	24.9
F	92-111	38	0.253	9.61	5.1
G	112-135	46.5	0.101	4.70	2.5
Total	135	253.4	-	104.31	55.7

A continuación, se realizó la cuantificación del veneno que quedó acoplado a la resina mediante la elución de 0.7 mL (equivalentes a 8.9 UA_{280nm} de la mezcla de

venenos) con buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.7 + 0.5 M NaCl, obteniendo cinco fracciones, recuperando con ellas un total de 2.7 UA_{280nm}, lo cual representa el 30% del total de veneno acoplado a la resina.

Posteriormente, las fracciones fueron combinadas y se determinó la A_{280nm}, obteniendo un valor de 1.719 mg/mL. Se evaluó su toxicidad por vía intravenosa en un ratón de la cepa CD1 de 18 a 20 gr, administrando 20 µg, los cuales resultaron letales, el ratón murió en los primeros 3 minutos post-inoculación, lo que indica que las toxinas que afectan a mamíferos están presentes dentro de los componentes que se retuvieron en la resina. Los signos clínicos observados fueron hiperexcitabilidad, sialorrea, disnea, disfagia y distensión abdominal. Esta fracción se denominó “Fracción tóxica”.

Por otro lado, ninguna de las fracciones no retenidas por la resina resultó tóxica y/o letal para los ratones al ser inoculadas por vía intravenosa con dosis de 20 a 150 µg, lo cual sugiere que dentro de estos componentes no se encuentran los péptidos de interés.

Se sabe que una proteína que no tiene carga neta a un pH equivalente a su punto isoeléctrico (pI), no interactuará con un medio cargado. Sin embargo, a un pH por encima de su pI, la proteína se unirá a un medio con carga positiva y, a un pH por debajo de su pI, se unirá a un medio con carga negativa (Cummins *et al.*, 2011). Por lo tanto, al seleccionar un pH de fase móvil se garantiza que la carga neta de las proteínas de interés dentro de una mezcla sea opuesta a la del grupo funcional de la matriz (en este caso, el grupo carboxilo –COOH), asegurando que desplazará al contraíón del grupo funcional y se unirá a la matriz (Xu *et al.*, 2013). En cambio, las proteínas con carga opuesta, no se retendrán.

Las toxinas de interés en este trabajo tienen puntos isoeléctricos que van de 7.68 a 8.44 (véase en la tabla 2, pág. 10), por lo que se trata de proteínas ligeramente básicas. Este carácter básico ha sido encontrado en varias toxinas aisladas de otros venenos de alacrán, lo cual ha resultado útil, ya que estas

proteínas han podido ser separadas utilizando cromatografía de intercambio catiónico (Borges *et al.*, 1990; Escobar *et al.*, 2002).

Con base en ello, mediante lavados a pH 6.2 se desplazaron aquellas proteínas no específicas de la mezcla de venenos cargadas inicialmente en la CM-32, recuperando un 55.7% del total del veneno en siete fracciones, de las cuales ninguna de ellas fue tóxica para los ratones. De acuerdo con lo reportado por varios autores, los componentes de los venenos de *C. tecomanus*, *C. limpidus* y *C. noxius* que afectan a mamíferos requieren una fuerza iónica considerable para eluirse de la CM-32, así mismo, se ha reportado que al separar la fracción II (~65% del veneno soluble) que contiene dichos componentes, mediante su elución con gradientes lineales de NaCl, se recupera del 89 al 99% de la proteína cargada (Alagón *et al.*, 1988; Lebreton y Delepierre, 1994; Valdivia *et al.*, 1994; Dehesa-Davila *et al.*, 1996). La elución en gradiente permite que las moléculas se vayan desplazando en forma secuencial de acuerdo con la fuerza de unión que posean hacia los grupos funcionales de la resina (Bährle-Rapp, 2007).

No obstante, según lo reportado por Borges y colaboradores (1990), en la separación del veneno de *T. discrepans* (12.5 mg) (DL_{50IC} 0.32 μ g/ratón (20 g)), cuya estrategia no incluyó una separación previa del veneno, también se obtuvieron resultados satisfactorios, con un porcentaje de recuperación de proteína (A_{280nm}) del 77.7%, en nueve fracciones (TdI-TdIX), de las cuales, únicamente las más básicas (TdIV, TdV, TdVI, TdVII, TdVIII y TdIX), eluidas tras aplicar el gradiente de concentración (bicarbonato de amonio de 0,05 M a 1,0 M a pH 8,1), resultaron tóxicas para ratones, siendo la fracción TdVIII la más tóxica (DL_{50IC} 0.158 μ g/ratón (20 g)), es decir, 2 veces más tóxica que el veneno completo. En el presente trabajo, el porcentaje de proteína recuperada tras el lavado y la elución de la CM-32, se aproxima a lo reportado para los venenos de *Centruroides* y *T. discrepans*, ya que fue del 85.7%.

Por otro lado, la toxicidad producida por la fracción de la mezcla de venenos eluída con 0.5 M NaCl, en ratones, fue mayor que la reportada por Possani y colaboradores (1980) para las subfracciones II-8 (8.7%), II-9 (10.5%) y II-10 (9.4%)

del veneno de *C. tecomanus*, que fueron letales para ratones (20 g) a dosis mayores de 40 µg por vía intraperitoneal.

Por su parte, Olamendi-Portugal y colaboradores (2017), reportaron que tras finalizar la elución en gradiente (0 a 0.55 M NaCl) del veneno de *C. limpidus*, y lavar la columna con 1 M NaCl se obtuvo una subfracción tóxica para crustáceos, semejante a la toxina 1 obtenida por Dehesa-Davila y colaboradores (1996) del veneno de *C. noxius* (los valores de toxicidad no están reportados). Sin embargo, a pesar de que dichas toxinas no fueron parte de los objetivos de este trabajo, es importante considerar que dentro de los componentes que se acoplaron a la CM-32 es posible que se encuentren algunos péptidos que afecten a invertebrados.

De cualquier manera, todo parece indicar que la obtención de las fracciones tóxicas a mamíferos a través de su pegado diferencial a CM-32 fue satisfactoria, no obstante, es necesaria su caracterización para determinar y confirmar el tipo de componentes contenidos, así como la toxicidad generada, para realizar una comparación más precisa.

8.2 Caracterización de la mezcla de venenos de *Centruroides* y sus fracciones

Debido a que ninguna de las fracciones obtenidas al lavar la resina tuvo toxicidad en ratones, se seleccionaron las fracciones con mayor concentración de proteína (A, E), y la fracción que se acopló a la resina, que fue letal en ratones (Ft), para su análisis mediante SDS- PAGE al 15% bajo condiciones reductoras, con la finalidad de comparar los componentes presentes en las fracciones con los de la mezcla de venenos de *Centruroides* (figura 17).

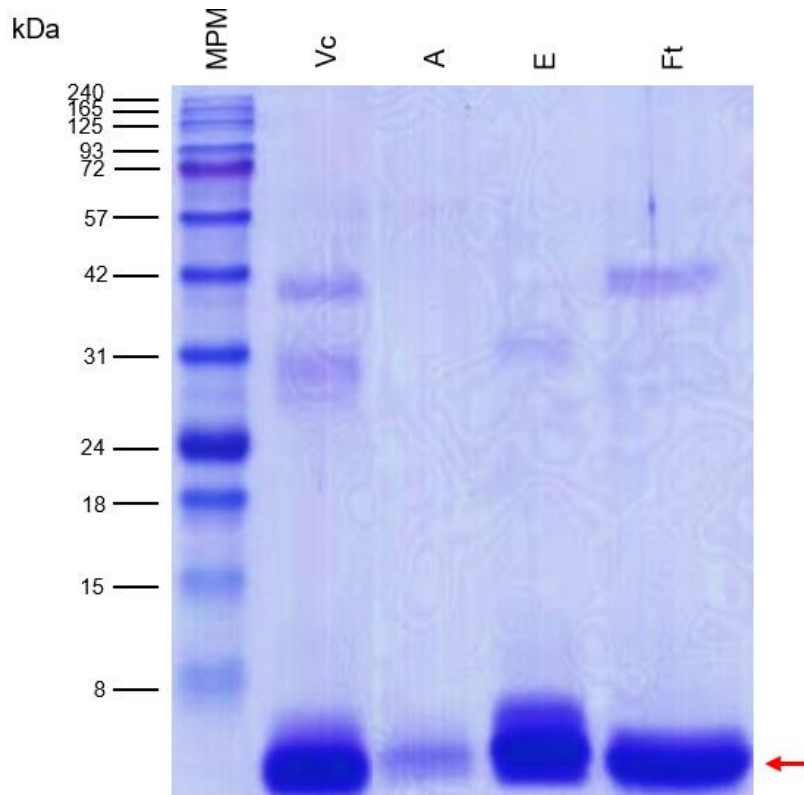


Figura 17. Perfil electroforético de la mezcla de venenos de *Centruroides* y sus fracciones. SDS-PAGE 15% en condiciones reductoras, 15 μg /carril. Marcador de peso molecular (MPM); veneno completo (Vc); fracciones no tóxicas (A y E) y fracción tóxica (Ft). Lo que se indica con la flecha son los componentes de bajo peso molecular, presentes tanto en el veneno completo como en sus fracciones, en diferentes proporciones, en lo cual, posiblemente se encuentran las toxinas que afectan canales de Na^+ dependientes de voltaje.

Los resultados del SDS-PAGE mostraron que tanto en el veneno completo como en sus fracciones estaban presentes componentes de bajo peso molecular de entre 3 y 7 kDa, en diferentes proporciones, dados los distintos grados de tinción. Por otro lado, se observaron dos bandas más en el veneno completo, de mediano y alto peso molecular, de 24 a 31 kDa y de 41 kDa, respectivamente. Ésta última banda, también estuvo presente en la fracción tóxica en una proporción similar, por su parte, en la fracción E se observó una banda con una tinción muy tenue por encima de los 31 kDa. La fracción A, a pesar de ser una de las fracciones en las que se obtuvo más proteína, únicamente presentó una banda en muy baja proporción correspondiente a componentes de bajo peso molecular de entre 3 y 4 kDa.

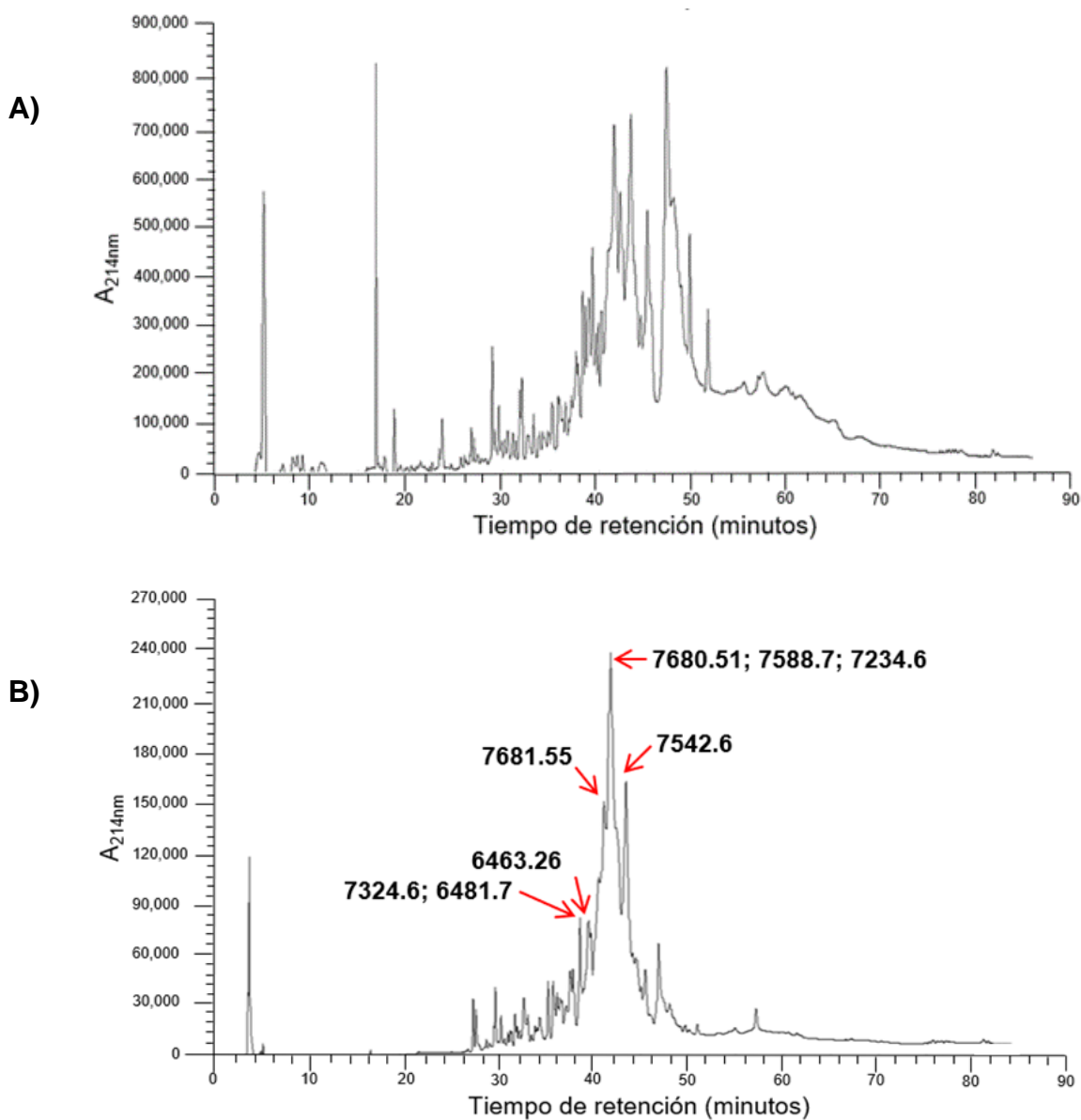
Dentro de los componentes que contiene el veneno, hay dos grupos peptídicos principales, uno que va de 3,001 a 4,500 Da y otro, de 6,001 a 7,500 Da, los cuales corresponden con el rango de masas de las toxinas que bloquean canales de potasio y modulan canales de sodio, respectivamente (Rodríguez de la Vega *et al.*, 2010); se sabe que las últimas son las que causan la muerte en diferentes modelos animales experimentales (Possani, 1984). Por lo que, en la banda que se observa por debajo de los 8 kDa, presente tanto en el veneno completo como en sus fracciones se podrían encontrar los grupos peptídicos antes mencionados. Existiendo la probabilidad de que en la fracción A se encuentren toxinas que bloquean canales de potasio, y en la fracción tóxica, ambos tipos de toxinas, siendo las más abundantes las que afectan canales de sodio, particularmente porque dicha fracción fue letal en ratones.

Por otro lado, se ha reportado que componentes con pesos moleculares de 31 a 45 kDa podrían corresponder a enzimas, como fosfolipasas y metaloproteinasas (enzimas hidrolíticas) (Estrada-Gómez *et al.*, 2017; Cid Uribe *et al.*, 2019). De igual manera, se han identificado las hialuronidasas, las cuales, no son tóxicas por sí mismas, pero potencian indirectamente la toxicidad de los venenos (Costal-Oliveira *et al.*, 2012; Venancio *et al.*, 2013), y cuyo peso molecular puede oscilar entre 45 y 82 kDa (Bordon *et al.*, 2015). Estas enzimas son consideradas difíciles de aislar, dado que se encuentran en pequeñas cantidades dentro de los venenos y su actividad enzimática se elimina con mucha facilidad (Stern y Csóka, 2000). En el alacrán *C. limpidus* se observó que las hialuronidasas tienen un peso molecular de 47.5 kDa (Cevallos *et al.*, 1992), mientras que en los alacranes del género *Tityus* se encontró un componente de 44.8 kDa con la actividad de la misma (Batista *et al.*, 2007).

También se ha demostrado que las hialuronidasas desempeñan un papel esencial en la distribución del veneno desde el torrente sanguíneo a los órganos diana (Oliveira-Mendes *et al.*, 2019), dado que alteran la integridad de la matriz extracelular y los tejidos conectivos que rodean los vasos sanguíneos en el punto de picadura.

8.2.1 Obtención y análisis de las fracciones de la mezcla de venenos de *Centruroides* por HPLC en fase reversa

En la figura 18 se muestran los perfiles cromatográficos resultantes de la separación de la mezcla de venenos de *Centruroides*, su fracción tóxica y su fracción no tóxica (fracción E), la cantidad aplicada de cada uno fue de 1 mg. Todas las fracciones fueron recolectadas manualmente mediante la visualización de los cromatogramas obtenidos a una longitud de onda de 214 nm.



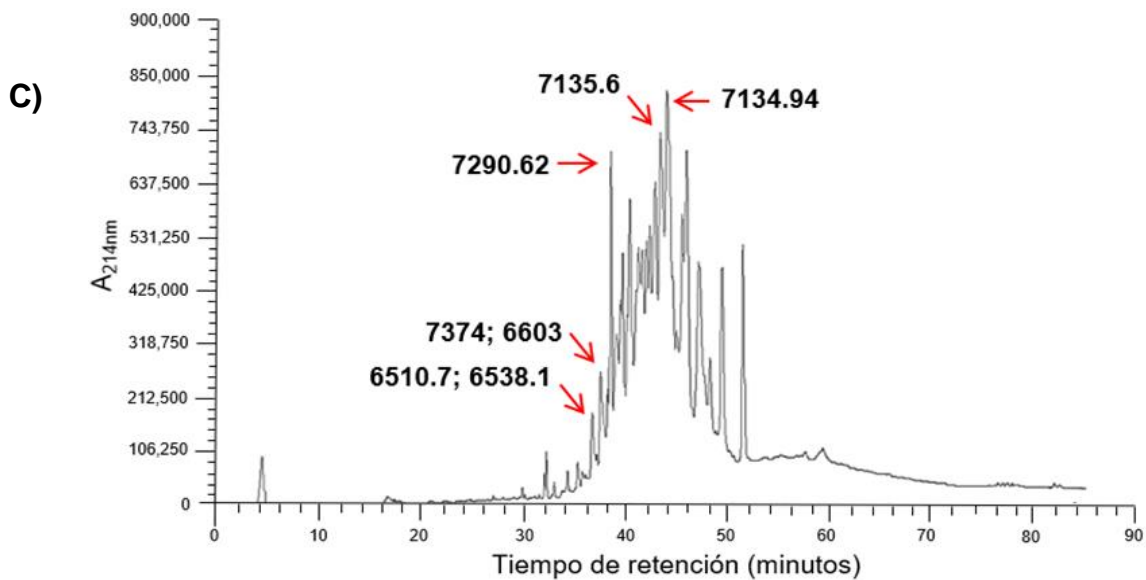


Figura 18. Perfiles cromatográficos de la separación de la mezcla de venenos de *Centruroides* y sus fracciones por HPLC en fase reversa. A) Veneno completo; B) Fracción tóxica; C) Fracción no tóxica. Se aplicó 1 mg de cada uno en una columna C18, el monitoreo del veneno y sus fracciones fue a 214 nm, a un gradiente de 0-80% acetonitrilo con 0.1 % TFA en 80 minutos. Se determinó la masa molecular de los picos señalados con las flechas.

Se recolectaron un total de 78 fracciones para el veneno completo, 60 subfracciones para la fracción tóxica y 41 subfracciones para la fracción no tóxica, la comparación visual de los tres perfiles cromatográficos indica claramente que existen diferencias, sin embargo, se puede observar que los componentes más abundantes se eluyeron entre los 35 y 50 minutos.

Por consiguiente, se enviaron 2 g de los picos considerados los más relevantes, tanto de la fracción tóxica como de la no tóxica, para su análisis mediante un espectrofotómetro de masas (ESI-MS Finnigan LCQ^{DUO} ion trap mass spectrometer). Los picos se seleccionaron mediante la sobreposición de los cromatogramas de las fracciones con el del veneno completo, obteniendo así los picos de las fracciones presentes también en el veneno completo, eluidos dentro de los 35 y 45 minutos, ya que se ha observado que las fracciones de los venenos de *Centruroides* que son eluidos en ese lapso de tiempo corresponden a péptidos que afectan la función de canales de Na⁺, siendo algunos de ellos tóxicos para mamíferos, y otros para invertebrados (Salazar *et al.*, 2018). Además, se sabe que de los 20 a los 31 minutos los componentes que se encuentran frecuentemente

corresponden con toxinas que afectan canales K^+ dependientes de voltaje, con masas moleculares de entre 3,000 a 5,000 Da (Batista *et al.*, 2004; Batista *et al.*, 2007), mientras que dentro de los componentes eluidos después de los 50 minutos están enzimas como hialuronidasas y proteasas (Salazar *et al.*, 2018).

A continuación, en las tablas 8 y 9 se muestran los tiempos de retención y las masas moleculares obtenidas por espectrometría de masas a partir de los componentes colectados en la separación de la fracción tóxica y no tóxica por RP-HPLC.

Tabla 8. Separación y masa molecular de la fracción tóxica.

TR (min)	MM (Da)
38.68	7,324.6; 6,481.7
39.53	6,463.26
41.15	7,681.55
41.84	7,680.51; 7,588.7; 7,234.6
43.47	7,542.6

Tabla 9. Separación y masa molecular de la fracción no tóxica.

TR (min)	MM (Da)
36.41	6,510.7; 6,538.1
37.19	7,374; 6,603
38.15	7,290.22
42.97	7,135.6
43.61	7,134.94

TR: tiempo de retención; MM: masa molecular.

Se identificaron un total de 15 componentes (ocho para la fracción tóxica y siete para la fracción no tóxica) de los picos seleccionados, cuyo rango de masas moleculares va de 6,463.26 a 7,681.55 Da. Los componentes con una masa molecular de alrededor de 6,000 Da se eluyeron de la columna a los 36-39 minutos, mientras que los de 7,000 se eluyeron entre 38 y 43 minutos. En algunos casos, se obtuvieron más de dos componentes por pico, lo cual de acuerdo con Olamendi-Portugal y colaboradores (2005), se debe a que el tiempo de elución de ciertos péptidos se comparte comúnmente dentro de picos cromatográficos cercanos.

Se ha observado en la separación por RP-HPLC del veneno de un alacrán de la familia Buthidae que los componentes con masas moleculares alrededor de 3,000 a 5,000 Da corresponden a péptidos específicos de canales de K^+ , mientras que los componentes de entre 6,000 y 8,000 Da se sabe que contienen péptidos específicos de canales de Na^+ (Batista *et al.*, 2004). De modo que, los valores de

las masas moleculares obtenidas experimentalmente están dentro del rango que se supone corresponde a péptidos que afectan canales de sodio dependientes de voltaje.

Por consiguiente, se calcularon las masas moleculares teóricas de las toxinas letales para mamíferos, que componen los venenos de las 4 especies de *Centruroides*, con la finalidad de identificar si dentro de las masas obtenidas experimentalmente se encontraban algunas de ellas (figura 19).

Figura 19. Secuencias de las toxinas de *Centruroides* que afectan a mamíferos (Consortium, 2019).

Especie	Toxina	Secuencia	Mmcal ^a (Da)	Mmexp ^b (Da)
<i>C. limpidus</i>	C111m	KEGYINVLSTGCKYECYKLGDN ^D YCLRECKQYGKGAGGYCYAFGCW ^C THLYEQAVVWPLPKKTCT	7541.6	7542.6
	C112	KEGYLVNHSTGCKYECFKLGDNDYCLRECKQYGKGAGGYCYAFGCW ^C NHLYEQAVVWPLPKKT ^C N	7575.6	NE
<i>C. tecomanus</i>	Ct1a	KEGYLVNHSTGCKYECFKLGDNDYCLRECRQYGKGAGGYCYAFGCW ^C THLYEQAVVWPLPNKT ^C S	7549.5	NE
<i>C. noxius</i>	Cn2	KEGYLVDKNTGCKYECCLKLGDNDYCLRECKQYGKGAGGYCYAFGCW ^C THLYEQAI ^V WPLPNK ^R CS	7589.7	7588.7
	Cn3	KEGYLVELGTGCKYECFKLGDNDYCLRECKARYGKGAGGYCYAFGCW ^C TQLYEQAVVWPLKNKT ^C R	7544.7	NE
	Cn4	-EGYLVNSYTGCKYECFKLGDNDYCLRECKQYGKGAGGYCYAFGCW ^C THLYEQAVVWPLKNKT ^C N	7477.4	NE
<i>C. suffusus</i>	CssII	KEGYLVSKSTGCKYECCLKLGDNDYCLRECKQYGKSSGGYCYAFGCW ^C THLYEQAVVWPLPNKT ^C N	7538.6	NE
	CssIV	KEGYLVNSYTGCKFECFKLGDNDYCLRECRQYGKSSGGYCYAFGCW ^C THLYEQAVVWPLPNKT ^C N	7602.6	NE
	CssVI	KEGYLVNSYTGCKFECFKLGDNDYCKRECKQYGKSSGGYCYAFGCW ^C THLYEQAVVWPLPNKT ^C N	7619.6	NE

^a Masa molecular calculada; ^b Masa molecular experimental; NE: No encontrada. En color rojo se muestran las cisteínas responsables de la formación de puentes disulfuro.

De manera que, uno de los componentes de la fracción tóxica eluido aproximadamente a los 41 min cuya masa molecular fue de 7,588.7 Da, coincidió con la toxina Cn2, cuya masa teórica calculada con base a la secuencia de sus aminoácidos fue de 7,589.7 Da. La Cn2 representa el principal componente tóxico dentro del veneno del alacrán *C. noxius*, constituye aproximadamente el 6.8% del veneno completo (Possani *et al.*, 1981; Riaño-Umbarila *et al.*, 2011). Por el contrario, las toxinas Cn3 y Cn4 cuyas masas teóricas calculadas fueron de 7,544.7 Da y 7,477.4 Da, respectivamente, no coincidieron con ninguna de las masas obtenidas experimentalmente.

De manera similar, se encontró otro componente con una masa molecular correspondiente a la de la toxina C11m1 (7,541.6 Da) del alacrán *C. limpidus*, éste fue eluido a los 43.47 min y se obtuvo una masa molecular de 7,542.6 Da. La toxina

CII1, junto con la toxina CII2 están consideradas dentro de los componentes principales del veneno, constituyen un 0.5% y 1.5%, respectivamente (Riaño-Umbarila *et al.*, 2013; Olamendi-Portugal *et al.*, 2017).

En cuanto a las toxinas que contienen los venenos de las demás especies de alacranes, se ha reportado que al separar el veneno de *C. suffusus* por RP-HPLC en condiciones similares, las toxinas CII y CIIIV se eluyen alrededor de los 42-46 min, conteniendo masas moleculares de 7,537.6 y 7,601.6 Da, respectivamente (Espino-Solis *et al.*, 2011). Cabe mencionar que la toxina CII es considerada uno de los componentes más abundantes y más importantes en términos de letalidad (Martin *et al.*, 1987; Estrada-Gómez *et al.*, 2017), constituye el 2.8% del total del veneno (Riaño-Umbarila *et al.*, 2011). No obstante, con referencia a la toxina CIIIV, se ha reportado que puede o no estar presente en el veneno, lo cual, podría deberse a variaciones en el contenido de toxinas dentro de las muestras de veneno de especies recolectadas en distintos lugares (Espino-Solis *et al.*, 2011). En el veneno del alacrán *Androctonus australis hector* se encontró que inclusive, las proporciones de las toxinas AaH I, II y III variaban de acuerdo con el origen geográfico de los especímenes (Miranda *et al.*, 1970; El Ayeb y Rochat, 1985).

Por otro lado, al separar el veneno de *C. tecomanus* mediante la misma técnica, se encontró que el 19% de sus componentes correspondían a péptidos que afectan canales de potasio, mientras que el 29% a péptidos que afectan canales de sodio, dentro de los cuales, se identificó un componente que probablemente correspondía a la toxina Ct1a o también conocida como II.20.3.4, descrita como un péptido de 66 residuos de aminoácidos que afecta a mamíferos (Ramírez *et al.*, 1988), presente en un 1.8% dentro del veneno (Riaño-Umbarila *et al.*, 2019), dicho componente fue eluído de la columna a los 35.19 minutos (Valdez-Velázquez *et al.*, 2013). Adicionalmente, se identificó otra de las toxinas de *C. tecomanus*, llamada Ct16 con una masa teórica reportada de 7,292.2 Da (Consortium, 2019), en uno de los componentes obtenidos en la separación de la fracción no tóxica, cuyo tiempo de retención fue 38.15 minutos, con una masa de 7,290.22 Da. En 2016 Valdez-Velázquez y colaboradores al separar varias fracciones del veneno de *C.*

tecomanus, dentro de uno de los componentes obtenidos, identificaron la misma toxina, contenida en la fracción VI, con una masa molecular de 7,294 Da, dicha toxina causó síntomas de intoxicación al inocularse en ratones, sin embargo, no resultó letal; por otro lado, los mismos autores observaron que componentes de entre 6,300 y 7,450 Da fueron letales para camarones, y que de 6,300 a 7,550 Da hubo componentes letales a grillos.

Los datos obtenidos sugieren que las toxinas que no fueron encontradas dentro de los componentes analizados podrían tener otro tiempo de retención mayor o menor al del rango seleccionado (36.41 a 43.61 minutos).

8.2.2 Letalidad de la mezcla de venenos y su fracción tóxica

Con la finalidad de evaluar la letalidad y los signos clínicos que se presentan en mamíferos tras la intoxicación, se determinó la dosis letal media (DL_{50}) de la mezcla de venenos de *Centruroides* y su fracción tóxica. Para ello, se inocularon grupos de tres ratones CD-1 con diferentes dosis, por vía intravenosa (véase en las tablas del anexo 7). Los signos clínicos observados en los ratones durante ambos ensayos fueron sialorrea, hiperactividad, distensión abdominal y disnea. El tiempo de mortalidad osciló de 5 a 10 min posterior a la inoculación. La DL_{50} obtenida para para la fracción tóxica fue aproximadamente 3.2 veces más baja que la del veneno completo tal como se esperaba, pues las toxinas importantes están enriquecidas en esta fracción (figura 20).

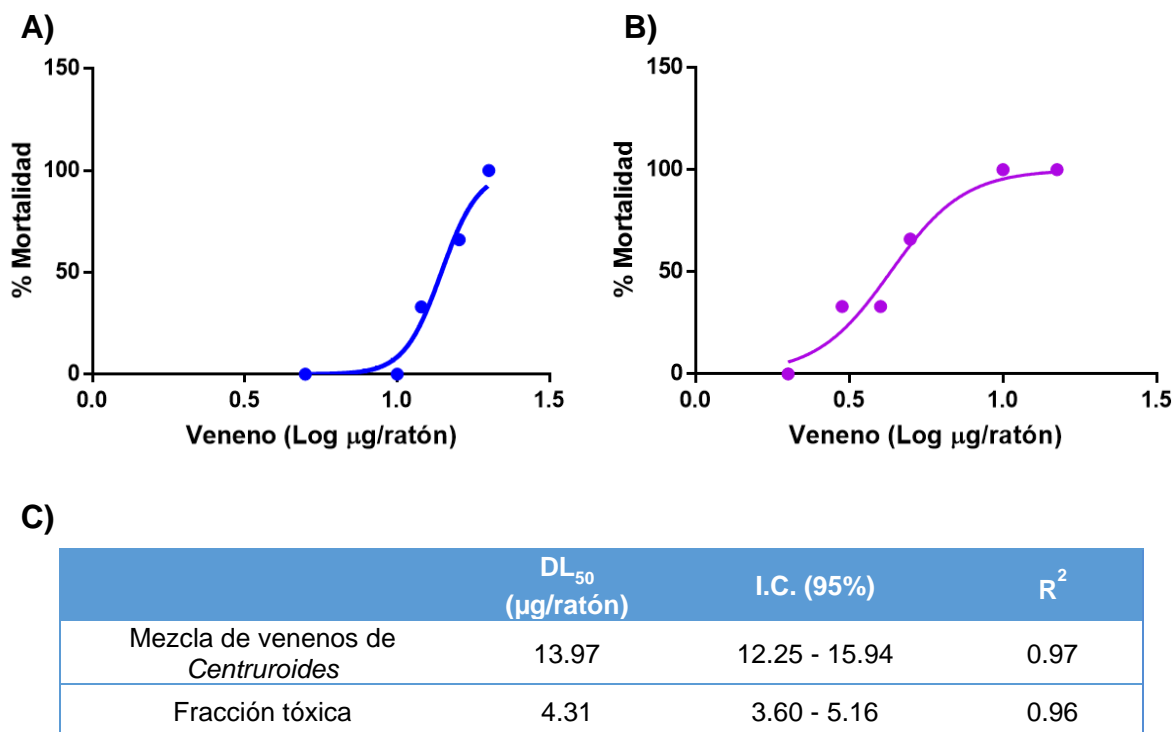


Figura 20. Ajuste sigmoideo dosis-respuesta calculado para la determinación de la dosis letal media de la mezcla de venenos de *Centruroides* A) y su fracción tóxica B). C) Valores de DL₅₀ obtenidos con su respectivo intervalo de confianza (I.C.) y coeficiente de determinación (R²).

Es importante destacar que, dentro de la literatura revisada, no se encontró ningún reporte previo de las DL₅₀ que fueron determinadas en el presente trabajo. Sin embargo, se sabe que, en su mayoría, los venenos de las especies de alacranes del género *Centruroides* presentan una toxicidad de entre 10 y 15 µg/ratón (20 g), dependiendo de la vía de administración empleada, siendo 1.1 a 1.3 veces menos tóxicos cuando se inyectan por vía intraperitoneal en comparación con la vía intravenosa, lo cual es atribuido a fenómenos relacionados con la absorción y la distribución de los componentes del venenos en el torrente sanguíneo, incluido el tamaño de las moléculas que son letales (Oukkache *et al.*, 2014).

Únicamente, para las especies de *C. noxius* (5 µg/ratón (20 g)) (Dent *et al.*, 1980) y *C. suffusus* (8.75 µg/ratón (20 g)), cuyos venenos son considerados los más tóxicos, se han reportado DL₅₀ inferiores, calculadas por vía intraperitoneal. Por el contrario, para *C. limpidus* la DL₅₀ oscila entre 13 y 15 µg/ratón (20 g), y para *C. tecomanus* va de 10.2 a 13 µg/ratón (20 g) (Riaño-Umbarila *et al.*, 2017).

El resultado que se obtuvo para la fracción tóxica (4.31 µg/ratón), podría deberse a la abundante presencia de componentes de bajo peso molecular, donde se sabe que se encuentran los componentes tóxicos responsables de la neurotoxicidad que producen los venenos de *Centruroides* (Catterall *et al.*, 2007). Además, se ha observado que al tratarse de moléculas pequeñas, el tiempo de residencia en el sitio de inoculación es más corto, y la biodisponibilidad más rápida (Oukkache *et al.*, 2014). Adicionalmente, Miranda y colaboradores (1970) reportaron que al mezclar diferentes fracciones tóxicas puede haber presencia de fenómenos sinérgicos, y dependiendo de la toxicidad y cantidad de cada fracción, la toxicidad puede aumentar hasta un 60%. En lo que respecta a los signos clínicos observados en los ratones durante los ensayos, éstos coinciden con los reportados por otros autores, entre ellos Vergara (2010), cuya investigación fue realizada con el veneno de *C. limpidus*.

8.3 Evolución de los títulos de anticuerpos de sueros de los grupos de conejos hacia la mezcla de venenos de *Centruroides*, su fracción tóxica y su fracción no tóxica

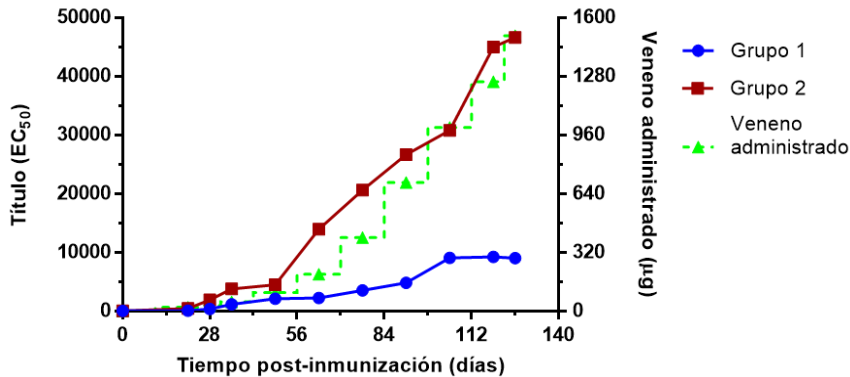
La respuesta inmune generada tras la exposición continua a los venenos de alacrán depende tanto de las diferencias anatómicas, fisiológicas y del sistema inmunológico entre especies, como de la estructura y masa molecular de cada toxina, y la cantidad en la que están representadas dentro del veneno (Schunk y Macallum, 2005; León *et al.*, 2011).

Para evaluar el nivel de reconocimiento de los anticuerpos presentes en los sueros hacia los distintos componentes de la mezcla de venenos de *Centruroides*, se realizaron ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) de tipo indirecto. Los títulos de anticuerpos se determinaron como la dilución de suero a la cual se obtiene el 50% del máximo de reconocimiento (Absorbancia a 405 nm).

En la figura 21 se muestra la evolución de los títulos de anticuerpos de los sueros de conejo hacia la mezcla de venenos de *Centruroides* y sus fracciones. Los títulos fueron determinados en 13 muestras colectadas a lo largo de 126 días.

A)

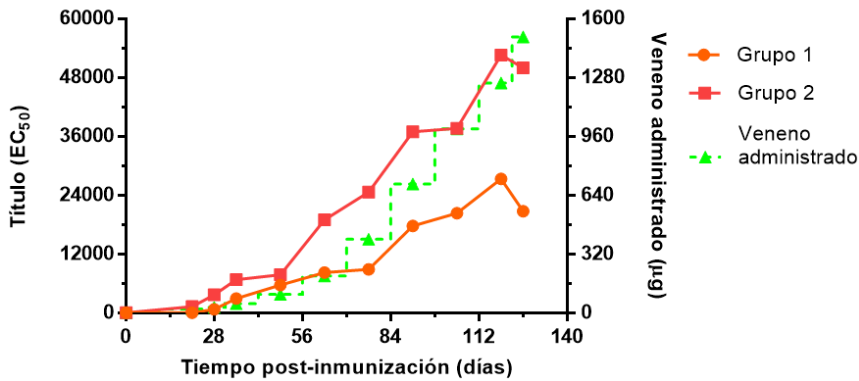
Reconocimiento de anticuerpos de conejo hacia la mezcla de venenos de *Centruroides*



Día	EC ₅₀ Grupo 1	EC ₅₀ Grupo 2
0	21	19
21	61	456
28	336	1913
35	1134	3752
49	2104	4462
63	2245	13932
77	3507	20608
91	4816	26643
105	9084	30769
119	9245	44964
126	9018	46600

B)

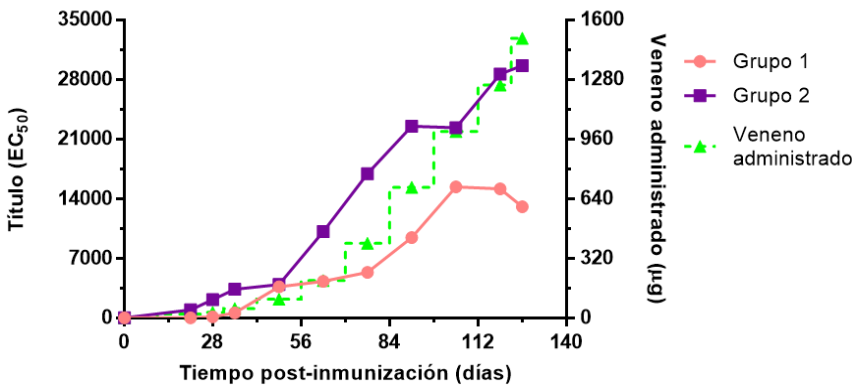
Reconocimiento de anticuerpos de conejo hacia la fracción tóxica de la mezcla de venenos de *Centruroides*



Día	EC ₅₀ Grupo 1	EC ₅₀ Grupo 2
0	13	8
21	5	1295
28	727	3678
35	2930	6779
49	5698	7756
63	8212	18972
77	8857	24611
91	17721	36906
105	20325	37601
119	27344	52598
126	20703	49986

C)

Reconocimiento de anticuerpos de conejo hacia la fracción no tóxica de la mezcla de venenos de *Centruroides*



Día	EC ₅₀ Grupo 1	EC ₅₀ Grupo 2
0	16	23
21	11	939
28	139	2148
35	601	3355
49	3653	3937
63	4293	10131
77	5355	16932
91	9448	22499
105	15376	22318
119	15156	28615
126	13041	29635

Figura 21. Reconocimiento de los anticuerpos de conejos hacia: A) la mezcla de venenos de *Centruroides*; B) la fracción tóxica; C) la fracción no tóxica. Cada punto representa el título de anticuerpos determinado por el ELISA en los sueros de conejos inmunizados con la fracción tóxica enriquecida con CM-32 (grupo 1) y la mezcla de venenos de *Centruroides* (grupo 2). *La línea punteada indica la cantidad de veneno o fracción administrada a lo largo del esquema de inmunización.

Al inicio (día 0), se evaluaron los sueros preinmunes de ambos grupos, en los cuales no se generó reconocimiento alguno hacia los componentes de la mezcla de venenos de *Centruroides* y sus fracciones.

En el grupo inmunizado con la fracción tóxica enriquecida con CM-32 se observó que los títulos aumentaron significativamente a partir del día 49, lo cual coincidió con un incremento de la cantidad de veneno empleado para inmunizar. Posterior a esto, como se muestra en el inciso A, los títulos se mantuvieron a un nivel similar hasta el día 91, luego, incrementaron alcanzando su nivel máximo el día 119, y a partir de ello, decrecieron ligeramente hasta el día 126.

En el inciso B, se observó que posterior al día 49 los títulos continuaron aumentando significativamente hasta el día 77, ya que para la siguiente sangría (día 91), hubo un aumento en el reconocimiento de casi el doble, y a continuación, se observó una tendencia similar al inciso anterior, dado que el mayor reconocimiento se alcanzó el día 119. En cambio, en el inciso C, el día 91 aumentó el reconocimiento notablemente, y en seguida, en el día 105 se alcanzó el nivel máximo, y a partir de esto, los títulos decrecieron ligeramente para las siguientes dos sangrías.

Como se esperaba, el reconocimiento del grupo anterior (inmunizado con la fracción tóxica enriquecida con CM-32) hacia la fracción tóxica fue significativamente alto, con un valor de 20,703. Por su parte, los títulos obtenidos hacia el veneno completo y la fracción no tóxica también fueron importantes, se obtuvieron valores de 9,018 y 13,041, respectivamente. Lo anterior, sugiere que dentro de lo que se acopló a la resina, podría haber otros componentes aparte de las fracciones de interés, para las que se generaron anticuerpos o que el hecho de contener resina contribuyó a un mejor efecto antigénico.

Por el contrario, en el grupo de conejos que fue inmunizado con la mezcla de venenos de *Centruroides*, se observó que a partir de la sangría tomada el día 21, ya se estaba generando un reconocimiento hacia la mezcla de venenos y sus fracciones, lo cual indica que los componentes que conforman los venenos con los

que se inmunizó son altamente inmunogénicos, y como consecuencia, los títulos obtenidos por este grupo fueron superiores desde el principio, respecto a los alcanzados por el grupo 1; de manera que para el día 63 ya se había generado un aumento importante en el título de anticuerpos, con variación en la intensidad de reconocimiento hacia los distintos antígenos, siendo los más altos hacia la fracción tóxica (18,972), luego hacia la mezcla de venenos de *Centruroides* (13,932) y por último, hacia la fracción no tóxica (10,131). Esta tendencia continuó, alcanzándose el pico más alto en la última sangría hacia el veneno completo (46,600) y hacia la fracción no tóxica (29,635), mientras que hacia la fracción tóxica (52,598) se alcanzó el día 119.

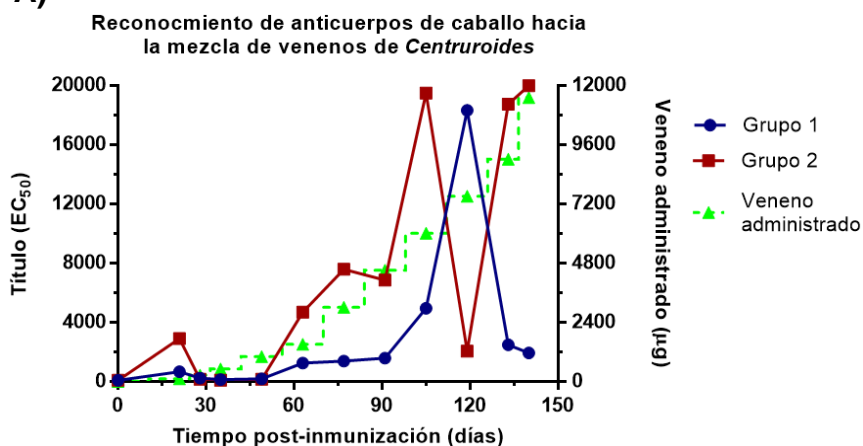
Como puede observarse la respuesta inmune humoral generada por los conejos hacia los diferentes antígenos fue aumentando como respuesta al incremento gradual de los inmunógenos administrados a lo largo del periodo de inmunización. A este respecto, Schunk y Macallum (2005) han observado resultados óptimos con dosis de refuerzo de al menos 4 semanas después de la primera inmunización, también se ha indicado que inmunizaciones demasiado frecuentes pueden disminuir la producción de anticuerpos, y una concentración demasiado alta puede generar tolerancia.

Por otra parte, en cuanto al modelo animal utilizado, Jiménez-Vargas y colaboradores (2017) sugieren el uso de conejos para la producción de anticuerpos, ya que tras la obtención de sueros neutralizantes al inmunizar conejos utilizando cuatro proteínas híbridas purificadas que contenían toxinas recombinantes de los venenos de *C. noxius*, *C. suffusus* y *C. limpidus* en conjunto con adyuvantes, reportaron que a partir de la 6ª inmunización se observó un aumento significativo en los títulos de anticuerpos, similar a la respuesta obtenida en este trabajo por los grupos de conejos inmunizados con la mezcla de venenos de *Centruroides* y la fracción tóxica enriquecida con CM-32. Además, se sugiere que la mezcla de inmunógenos que incluyen toxinas de diferentes especies de alacranes puede producir un cierto grado de reactividad cruzada, que mejora el tipo de anticuerpo producido.

8.4 Evolución de los títulos de anticuerpos de sueros de los grupos de caballos hacia la mezcla de venenos de *Centruroides*, su fracción tóxica y su fracción no tóxica

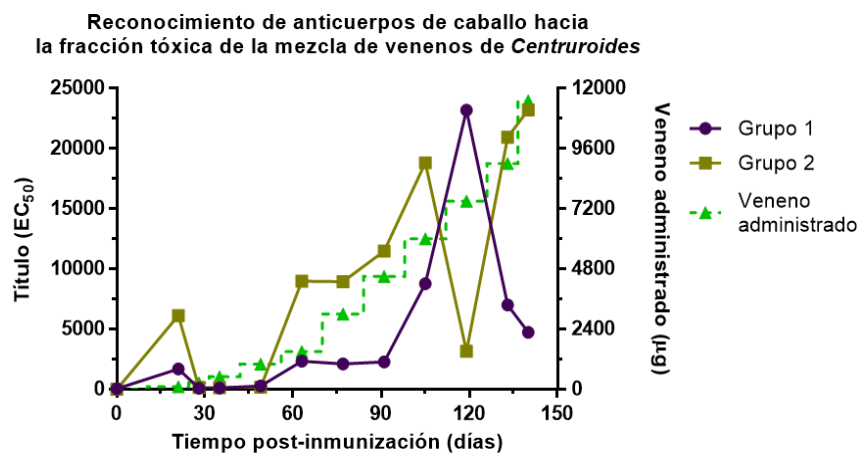
La respuesta inmune humoral de los caballos fue determinada en 14 muestras colectadas a lo largo de 140 días, periodo de duración del esquema de inmunización; con la titulación de dichas muestras se obtuvo el título de anticuerpos específicos hacia la mezcla de venenos de *Centruroides* y sus fracciones. La evolución de la respuesta se muestra en la figura 22.

A)



Día	EC ₅₀ Grupo 1	EC ₅₀ Grupo 2
0	71	77
21	657	2899
28	217	138
35	130	78
49	183	148
63	1237	4669
77	1381	7571
91	1569	6839
105	4939	19467
119	18308	2042
133	2470	18730
140	1933	19969

B)



Día	EC ₅₀ Grupo 1	EC ₅₀ Grupo 2
0	44	6
21	1705	6138
28	100	150
35	122	131
49	291	169
63	2336	8995
77	2121	8958
91	2271	11486
105	8783	18829
119	23200	3159
133	7009	20940
140	4737	23209

C)

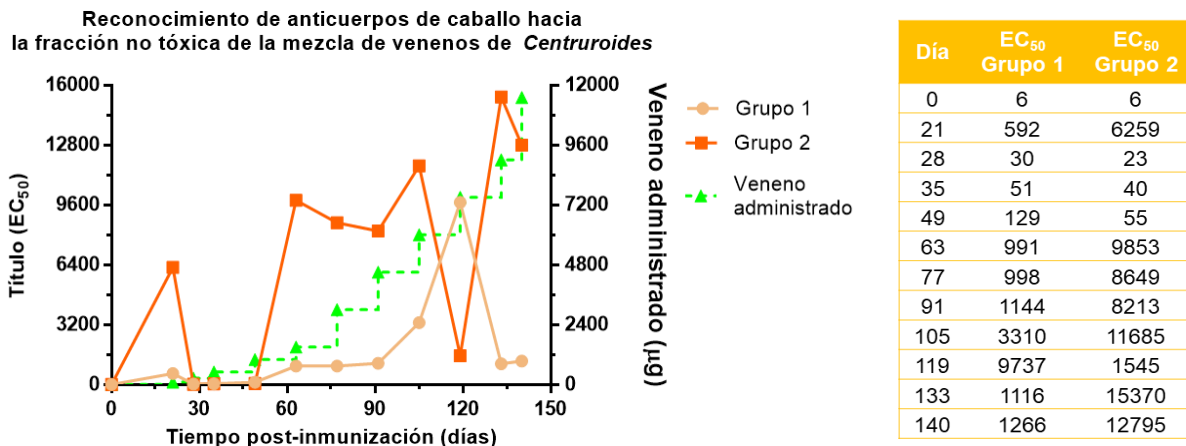


Figura 22. Reconocimiento de los anticuerpos de caballos hacia: A) la mezcla de venenos de *Centruroides*; B) la fracción tóxica; C) la fracción no tóxica. Cada punto representa el título de anticuerpos determinado por el ELISA de los sueros de caballos inmunizados con la fracción tóxica enriquecida con CM-32 (grupo 1) y la mezcla de venenos de *Centruroides* (grupo 2). *La línea punteada indica la cantidad de veneno o fracción administrada a lo largo del esquema de inmunización.

Al igual que en los conejos, el resultado obtenido para las primeras muestras de suero (preinmune) de los grupos de caballos, se observó la ausencia de anticuerpos capaces de reconocer los componentes de la mezcla de venenos de *Centruroides* y sus fracciones. No obstante, en las sangrías tomadas el día 21, se observó un aumento en los títulos de anticuerpos bastante significativo, tanto hacia el veneno completo como hacia las fracciones. Este patrón estuvo presente en el suero de ambos grupos, en distintas intensidades; el grupo inmunizado con la mezcla de venenos de *Centruroides* mostró títulos más altos, respecto al grupo inmunizado con la fracción tóxica enriquecida con CM-32, por parte del primero el valor más alto fue hacia la fracción no tóxica (6,259), mientras que en el segundo fue hacia la fracción tóxica (1,705).

Posteriormente, los títulos de anticuerpos comenzaron a decrecer, hasta el día 63, en donde se observó incremento importante en la intensidad del reconocimiento hacia los tres antígenos evaluados.

Para el día 105, se obtuvieron los siguientes títulos de anticuerpos hacia la mezcla de venenos 4,939 en el grupo 1 y 19,467 en el grupo 2; hacia la fracción

tóxica 8,783 en el grupo 1 y 18,829 en el grupo 2; y hacia la fracción no tóxica 3,310 en el grupo 1 y 11,685 en el grupo 2.

En la sangría posterior, tomada el día 119, se registró una disminución súbita en el título de anticuerpos por parte del grupo 2 hacia la mezcla de venenos y las fracciones evaluadas. En cambio, en el grupo 1 se registró el efecto contrario, lo cual se atribuye a un problema técnico relacionado con la obtención y etiquetado de las muestras, dado que, en las sangrías posteriores para ambos grupos, los valores regresaron nuevamente a la tendencia en la que se encontraban. Al finalizar el esquema de inmunización, los títulos obtenidos para ambos grupos fueron mayores que los iniciales como se esperaba, por lo que se puede afirmar que, después de haber realizado inmunizaciones continuas con la fracción tóxica enriquecida con CM-32 y con la mezcla de venenos de *Centruroides*, se propició un incremento en el grado de afinidad de los anticuerpos.

A este respecto, algunos autores mencionan que la maduración por afinidad está dada por un proceso de hipermutación somática, el cual ocurre en las células B tras la exposición continua con el antígeno, por lo tanto, al producirse anticuerpos con regiones variables con una mayor afinidad por el antígeno, se forman complejos antígeno-anticuerpo que inducen señales que originan una disminución en la diferenciación de las células B, y a su vez, una disminución en el nivel de anticuerpos secretados (Abbas *et al.*, 2012; Owen *et al.*, 2014a; Prieto Martín *et al.*, 2017).

Según lo observado por Calderón (2011) la respuesta inmune que se genera por caballo es distinta, incluso cuando se utiliza el mismo esquema de inmunización, lo cual está influenciado por la edad, el peso y las predisposiciones genéticas de cada animal, lo que explica la variación en los títulos obtenidos. León y colaboradores (2011) y Xu y colaboradores (2017) mencionan que las inmunizaciones no garantizan una generación proporcional de anticuerpos específicos hacia cada componente que se está inoculando, particularmente al utilizar una mezcla conformada por 4 venenos distintos como es el caso, lo que

afecta mayormente la forma en la que se estimula el sistema inmunológico de cada animal, promoviendo en algunos de los individuos una mejor respuesta.

Por otro lado, Calderón (2011) afirma que la adición de adyuvantes promueve la elevación de los títulos de anticuerpos, ya que con ellos se garantiza que los antígenos se liberen lenta y prolongadamente, contribuyendo con el desarrollo de una respuesta inmunitaria más efectiva, al ayudar en la activación de células B y T específicas para los antígenos, mediante la activación del sistema inmunitario innato (Heegaard *et al.*, 2011; Batista-Duharte *et al.*, 2013; Owen *et al.*, 2014b).

8.5 Potencia neutralizante del suero de conejos y caballos inmunizados con la mezcla de venenos de *Centruroides* y con la fracción tóxica enriquecida con CM-32

La evaluación de la potencia neutralizante de los sueros de conejos y caballos inmunizados con la mezcla de venenos de *Centruroides* (grupo 2) y su fracción tóxica enriquecida con CM-32 (grupo 1) se realizó mediante la determinación de la dosis efectiva media (DE₅₀). Para este ensayo se administraron diferentes volúmenes de la mezcla de suero obtenidos de la última sangría de los conejos y caballos incubados previamente con 3 DL₅₀ de la mezcla de venenos de *Centruroides*, equivalentes a 41.91 µg (véase en el anexo 8). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Comparación de la potencia neutralizante de los sueros de conejos y caballos contra 3 DL₅₀ de la mezcla de venenos de *Centruroides*. La DE₅₀ se determinó como la dosis de suero mezclada con 3 DL₅₀ de veneno necesaria para que sobreviva el 50% del total de la población de ratones inyectados por vía intravenosa.

	Grupo	Inmunógeno	DE ₅₀ (μL suero/3 DL ₅₀)	I.C. 95%
Conejos	1	Fracción tóxica-CM32	224.7	214.5 a 235.4
	2	Veneno completo	120	118.5 a 121.6
Caballos	1	Fracción tóxica-CM32	45.96	45.65 a 46.28
	2	Veneno completo	16.28	16.26 a 16.30

Los sueros de todos los grupos experimentales fueron capaces de neutralizar la letalidad de 3 DL₅₀ de la mezcla de venenos de *Centruroides*, sin embargo, aquellos pertenecientes a los grupos inmunizados con el veneno completo tuvieron una mayor potencia neutralizante. En conejos, la DE₅₀ del grupo 2 fue de 120 μL suero/3 DL₅₀, es decir, aproximadamente 1.8 veces mejor que la obtenida por el grupo 1 (224.7 μL suero/3 DL₅₀). Por su parte, en los caballos se obtuvo algo similar, siendo la DE₅₀ del grupo 2 (16.28 μL suero/3 DL₅₀), alrededor de 2.8 veces superior a la alcanzada por la del grupo 1 (45.96 μL suero/3 DL₅₀). De manera que, al realizar la comparación entre las DE₅₀ de los caballos versus las de los conejos, se observó una notable mejora en la respuesta producida por los caballos.

La preparación de inmunógenos utilizando una mezcla de fracciones tóxicas parcialmente purificadas para efectuar la neutralización de la letalidad, ha dado buenos resultados, como lo mencionan Calderón-Aranda y colaboradores (1993) quienes generaron sueros en ratones utilizando como inmunógeno la fracción II del veneno de *C. noxius*, obtenida mediante cromatografía de exclusión molecular, con una capacidad neutralizante 1.6 veces más efectiva (83 DL₅₀/mL suero) que la obtenida al inmunizar con el veneno soluble (50 DL₅₀/mL suero). Del mismo modo, los sueros generados en conejos por García Y Pérez (1988), al utilizar como inmunógeno la fracción tóxica de *C. suffusus*, fueron capaces de neutralizar tanto la misma fracción, como también las de otros venenos de *Centruroides*, con casi la

misma eficacia (70-55 DL₅₀/mL suero), no obstante, se reportó una capacidad neutralizante ligeramente inferior contra el veneno de *C. suffusus* al utilizar su fracción tóxica como inmunógeno (60 DL₅₀/mL suero) en comparación con la obtenida tras inmunizar con el veneno completo (70 DL₅₀/mL suero). Estos resultados fueron similares a los del presente trabajo, donde la potencia neutralizante obtenida por los sueros de los grupos inmunizados por la fracción tóxica unida a CM-32 fue inferior a la obtenida por los grupos inmunizados con la mezcla de venenos de *Centruroides*.

Por su parte, el uso de la carboximetil celulosa como vehículo de moléculas poco inmunogénicas ha sido satisfactorio. Liau y colaboradores (1982) obtuvieron un antiveneno en caballos capaz de neutralizar el veneno de la cobra *Naja atra*, bajo un esquema de inmunización que incluyó inmunizaciones con el veneno acoplado a la resina y con la neurotoxina acoplada a la resina, obteniendo así un antiveneno 22 veces más potente que el generado inmunizando únicamente con el veneno. A diferencia del esquema de inmunización utilizado en este trabajo para inmunizar a los caballos y conejos del grupo 1, el cual únicamente incluyó inmunizaciones con la fracción tóxica unida a CM-32, dando como resultado sueros capaces de neutralizar los venenos de *Centruroides*.

Los sueros obtenidos tras la última inmunización de los grupos de conejos y caballos con la fracción tóxica unida a CM-32 utilizados para determinar la DE₅₀ fueron capaces de neutralizar la mezcla de venenos de *Centruroides*, a pesar de que los títulos de anticuerpos no fueron tan altos como los obtenidos por los del grupo 2. A este respecto, De la Rosa y colaboradores (2019) mencionan que no existe relación directa entre el título de anticuerpos y la potencia neutralizante.

No obstante, se sugiere que la razón por la cual los sueros del grupo 1 no fueron tan eficientes como los del grupo 2, fue que la presencia de anticuerpos contra moléculas no tóxicas (confirmado mediante los ensayos *in vitro*) dentro de dicho inmunógeno pudieron causar una merma en la producción de los anticuerpos neutralizantes. León (2011) menciona que, si los componentes de relevancia

toxicológica están presentes en concentraciones bajas, se complica la generación de una respuesta inmune neutralizante adecuada.

Además, algunos autores reportan que durante la inmunización puede ocurrir una competencia antigénica y como consecuencia, la producción de anticuerpos contra las toxinas pueda reducirse por otros componentes (Liau *et al.*, 1982; Calvete *et al.*, 2009), particularmente por la existencia de epítopes compartidos entre las toxinas que bloquean los canales de Na⁺ dependientes de voltaje, resultado de la gran similitud estructural que presentan (Calderón-Aranda *et al.*, 1993). Como consecuencia, es necesario administrar volúmenes considerables de suero para efectuar la neutralización, que a su vez puede desencadenar algún efecto adverso (Boyer *et al.*, 2013).

Por otro lado, la potencia neutralizante generada por los sueros de caballos fue mayor a la de los conejos, Gowtham y colaboradores (2014) señalan que la respuesta inmunológica en animales puede variar tanto individualmente, como entre especies. En 2016 Tanaka y colaboradores reportaron que los caballos, en comparación con ratones y conejos, generan una mejor respuesta. Por su parte, los antivenenos producidos en ovejas contienen una mayor concentración de anticuerpos específicos que los producidos en caballos, además de que estas son de fácil manejo e inmunización y la producción es menos costosa (Sjostrom *et al.*, 1994).

En términos generales, al utilizar como inmunógeno la fracción tóxica enriquecida con CM-32, se obtuvieron sueros de conejos y caballos capaces de neutralizar la mezcla de venenos de *Centruroides*, sin embargo, el esquema utilizado actualmente para producir el antiveneno comercializado en México, empleando como inmunógeno los venenos de *C. limpidus*, *C. noxius*, *C. tecomanus* y *C. suffusus* continúa siendo la mejor opción. No obstante, este trabajo ha generado más conocimiento respecto al uso de las fracciones tóxicas contenidas en los venenos como inmunógenos, y sobre la considerable afinidad que tienen las toxinas de alacrán hacia la resina carboximetil celulosa.

IX. CONCLUSIONES

Se caracterizaron los anticuerpos policlonales obtenidos utilizando como inmunógeno las fracciones tóxicas de *Centruroides* enriquecidas con carboximetil celulosa en caballos y conejos.

- Las fracciones con actividad tóxica a mamíferos de los venenos de *C. limpidus*, *C. noxius*, *C. tecomanus* y *C. suffusus* se obtuvieron mediante su pegado diferencial a CM-32.
- Los componentes que se acoplaron a la resina fueron en su mayoría de bajo peso molecular, y se identificaron mediante espectrometría de masas las toxinas Cn2 de *C. noxius* y CII1m de *C. limpidus*.
- Las fracciones no afines a la resina presentaron componentes de alto y bajo peso molecular, y se identificó la toxina Ct16 de *C. tecomanus*.
- La DL₅₀ determinada para la fracción acoplada a CM-32 fue de 4.31 µg/ratón, aproximadamente 3.2 veces más letal que la obtenida con el veneno completo (13.97 µg/ratón).
- El suero polivalente que se obtuvo de conejos y caballos hiperinmunizados con las fracciones tóxicas reconoce y neutraliza la mezcla de venenos de *Centruroides*, sin embargo, no mejora la potencia neutralizante del suero obtenido con la mezcla de estos venenos.

X. PERSPECTIVAS

- ⇒ Evaluar la especificidad de los anticuerpos obtenidos mediante la inmunización de los animales con la fracción tóxica enriquecida con CM-32 a los componentes de los cuatro venenos de *Centruroides* mediante ensayos de inmunoblot.
- ⇒ Determinar la producción de anticuerpos contra los venenos de *Centruroides* utilizando otros modelos animales con intención de obtener una mejor producción de anticuerpos con un mejor efecto neutralizante.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., y Pillai, S. (2012). Activación del linfocito B y producción de anticuerpos. In A. K. Abbas, A. H. Lichtman, y S. Pillai (Eds.), *Inmunología celular y molecular* (Séptima, pp. 243–257). México: Elsevier.
- Alagón, A. C., Guzmán, H. S., Martín, B. M., Ramírez, A. N., Carbonet, E., y Possani, L. D. (1988). Isolation and characterization of two toxins from the mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 89(1), 153–161. ([https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90300-X](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90300-X))
- Alvarenga, L. M., Zahid, M., di Tommaso, A., Juste, M. O., Aubrey, N., Billiald, P., y Muzard, J. (2014). Engineering Venom's toxin-neutralizing antibody fragments and its therapeutic potential. *Toxins*, 6(8), 2541–2567. (<https://doi.org/10.3390/toxins6082541>)
- Armas, L. F., Martín-Frías, E., y Estévez-Ramírez, J. (2003). Lista anotada de las especies mexicanas del género *Centruroides* Marx, 1890 (Scorpiones: Buthidae). *Revista Ibérica de Aracnología*, 8, 93–98. Recuperado de <http://entomologia.rediris.es/gia>
- Bährle-Rapp, M. (2007). Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(3), 474–474. (https://doi.org/10.1007/978-3-540-71095-0_8857)
- Batista-Duharte, A., Lastre, M., y Pérez, O. (2013). Adyuvantes inmunológicos. Determinantes en el balance eficacia-toxicidad de las vacunas contemporáneas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 1–9. (<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.11.012>)
- Batista, C. V.F., Román-González, S. A., Salas-Castillo, S. P., Zamudio, F. Z., Gómez-Lagunas, F., y Possani, L. D. (2007). Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: Biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 146, 147–157. (<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.12.004>)
- Batista, Cesar V.F., Del Pozo, L., Zamudio, F. Z., Contreras, S., Becerril, B., Wanke, E., y Possani, L. D. (2004). Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 803(1), 55–66. (<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.09.002>)
- Battroid. (2013). Ubicación de Cuernavaca, Morelos. Recuperado el 25 de agosto de 2020, de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mexico_Morelos_Cuernavaca_location_map.svg

- Berg, J. M., Stryer, L., y Tymoczko, J. L. (2008). Investigación en proteínas y proteomas. In J. M. Berg, L. Stryer, y J. L. Tymoczko (Eds.), *Bioquímica* (Sexta, pp. 70–71). Barcelona: Reverté.
- Bergeron, Z. L., y Bingham, J. P. (2012). Scorpion toxins specific for potassium (K+) channels: A historical overview of peptide bioengineering. *Toxins*, *4*(11), 1082–1119. (<https://doi.org/10.3390/toxins4111082>)
- Bolton, F. M. S., Casewell, N. R., y Landon, J. (2014). Paper Production and assessment of ovine antisera for the manufacture of a veterinary adder antivenom. *Veterinary Record*, *174*(16), 406–406. (<https://doi.org/10.1136/vr.102286>)
- Bordon, K. C. F., Wiezel, G. A., Amorim, F. G., y Arantes, E. C. (2015). Arthropod venom Hyaluronidases: Biochemical properties and potential applications in medicine and biotechnology. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, *21*(43), 1–12. (<https://doi.org/10.1186/s40409-015-0042-7>)
- Borges, A., Arantes, E. C., y Giglio, J. R. (1990). Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Venezuelan scorpion *Tityus discrepans* (Karsch). *Toxicon*, *28*(9), 1011–1017. ([https://doi.org/10.1016/0041-0101\(90\)90139-X](https://doi.org/10.1016/0041-0101(90)90139-X))
- Bosmans, F., y Tytgat, J. (2007). Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion α -toxins. *Toxicon*, *49*(2), 142–158. (<https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2006.09.023>)
- Boyer, L., Degan, J., Ruha, A.-M., Mallie, J., Mangin, E., y Alagón, A. (2013). Safety of intravenous equine F(ab')₂: Insights following clinical trials involving 1534 recipients of scorpion antivenom. *Toxicon*, *76*, 386–393. (<https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2013.07.017>)
- Calderón-Aranda, E. S., Horbor, D., y Possani, L. D. (1993). Neutralizing Capacity of Murine Sera. *Toxicon*, *31*(3), 327–337.
- Calderón, A. (2011). *Caracterización de la respuesta inmune humoral en caballos contra el veneno de *Micrurus tener**. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Callado, L. F. (2011). Sistema gabaérgico y canales iónicos. In J. J. Zarranz, J. Meana, y J. González-Menacho (Eds.), *Neurofarmacología Contemporánea* (1st ed., pp. 71–94). (<https://doi.org/10.1016/B978-84-8086-875-4.50004-5>)
- Calvete, J. J., Sanz, L., Angulo, Y., Lomonte, B., y María, J. (2009). *Venoms, venomics, antivenomics*. *583*, 1736–1743. (<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.029>)
- Carmo, A. O., Chatzaki, M., Horta, C. C. R., Magalhães, B. F., Oliveira-Mendes, B. B. R., Chávez-Olórtegui, C., y Kalapothakis, E. (2015). Evolution of alternative methodologies of scorpion antivenoms production. *Toxicon*, *97*, 64–74.

(<https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2015.02.007>)

- Casewell, N. R., Wüster, W., Vonk, F. J., Harrison, R. A., y Fry, B. G. (2013, April). Complex cocktails: The evolutionary novelty of venoms. *Trends in Ecology and Evolution*, Vol. 28, pp. 219–229. (<https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.10.020>)
- Catterall, W. A., Cestéle, S., Yarov-yarovoy, V., Yu, F. H., Konoki, K., y Scheuer, T. (2007). Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, 49, 124–141. (<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.09.022>)
- Catterall, W. A., Goldin, A. L., y Waxman, S. G. (2005). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels. *Pharmacological Reviews*, 57, 397–409. (<https://doi.org/10.1124/pr.57.4.4>)
- Cestèle, S., y Catterall, W. A. (2000). Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie*, 82, 883–892. ([https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)01174-3](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01174-3))
- Cestèle, S., Qu, Y., Rogers, J. C., Rochat, H., Scheuer, T., y Catterall, W. A. (1998). Voltage sensor-trapping: Enhanced activation of sodium channels by β -scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neuron*, 21, 919–931. ([https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80606-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80606-6))
- Cevallos, M. A., Navarro-Duque, C., Varela-Julia, M., y Alagon, A. C. (1992). Molecular mass determination and assay of venom hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Toxicon*, 30(8), 925–930. ([https://doi.org/10.1016/0041-0101\(92\)90392-1](https://doi.org/10.1016/0041-0101(92)90392-1))
- Chen, Z. Y., Zeng, D. Y., Hu, Y. T., He, Y. W., Pan, N., Ding, J. P., y Wu, Y. L. (2012). Structural and functional diversity of acidic scorpion potassium channel toxins. *PloS One*, 7(4), 1–10. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035154>)
- Chippaux, J. P., y Goyffon, M. (2008). Epidemiology of scorpionism: A global appraisal. *Acta Tropica*, 107(2), 71–79. (<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.05.021>)
- Chippaux, Jean Philippe. (2012). Emerging options for the management of scorpion stings. *Drug Design, Development and Therapy*, 6, 165–173. (<https://doi.org/10.2147/DDDT.S24754>)
- Cid Uribe, J. I., Menesses, E. P., Batista, C. V, Ortíz, E., y Possani, L. D. (2019). Dissecting Toxicity: The Venom Gland Transcriptome and the Venom Proteome of the Highly Venomous Scorpion *Centruroides limpidus* (Karsch, 1879). *Toxins*, 11, 247.
- Consortium, T. U. (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D506–D515.

- Costal-Oliveira, F., Duarte, C. G., Machado de Avila, R. A., Melo, M. M., Bordon, K. C. F., Arantes, E. C., y Chávez-Olórtegui, C. (2012). General biochemical and immunological characteristics of the venom from Peruvian scorpion *Hadruroides lunatus*. *Toxicon*, 60(5), 934–942. (<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.06.013>)
- Cummins, P. M., Dowling, O., y O'Connor, B. F. (2011). Ion-exchange chromatography: basic principles and application to the partial purification of soluble mammalian prolyl oligopeptidase. In D. Walls y S. T. Loughran (Eds.), *Protein Chromatography* (Vol. 681, pp. 215–228). (https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_12)
- De la Rosa, G. De, Olvera, F., Archundia, I. G., Lomonte, B., y Alagón, A. (2019). Horse immunization with short-chain consensus α -neurotoxin generates antibodies against broad spectrum of elapid venomous species. *Nature Communications*, 10(3642), 1–8. (<https://doi.org/10.1038/s41467-019-11639-2>)
- Dehesa-Dávila, M., y Possani, L. D. (1994). Scorpionism and serotherapy in Mexico. *Toxicon*, 32(9), 1015–1018. ([https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90383-2](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90383-2))
- Dehesa-Davila, M., Ramirez, A. N., Zamudio, F. Z., Gurrola-Briones, G., Liévano, A., Darszon, A., y Possani, L. D. (1996). Structural and Functional Comparison of Toxins from the Venom of the Scorpions *Centruroides infamatus infamatus*, *Centruroides limpidus limpidus* and *Centruroides noxius*. In *Biochemistry and Physiology* (Vol. 13).
- Dent, M. A. R., Possani, L. D., Ramírez, G. A., y Fletcher, P. L. (1980). Purification and characterization of two mammalian toxins from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon*, 18(3), 343–350. ([https://doi.org/10.1016/0041-0101\(80\)90015-X](https://doi.org/10.1016/0041-0101(80)90015-X))
- Dias da Silva, W., y Tambourgi, D. V. (2011). The humoral immune response induced by snake venom toxins. *Inflammation and Allergy - Drug Targets*, 10(5), 343–357. (<https://doi.org/10.2174/187152811797200623>)
- El Ayeb, M., y Rochat, H. (1985). Polymorphism and quantitative variations of toxins in the venom of the scorpion *Androctonus australis Hector*. *Toxicon*, 23(5), 755–760. ([https://doi.org/10.1016/0041-0101\(85\)90005-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(85)90005-4))
- Erickson, T. B., y Cheema, N. (2017). Arthropod Envenomation in North America. *Emergency Medicine Clinics of North America*, 35(2), 355–375. (<https://doi.org/10.1016/j.emc.2017.01.001>)
- Escobar, E., Rivera, C., Tincopa, L., y Rivera, D. (2002). Purificación parcial de las toxinas HI1, HI2 Y HI3 del veneno del escorpión *Hadruroides lunatus* Koch, 1867 (Scorpionida: Vejovidae). *Revista Peruana de Biología.*, 9(1), 3–10.

- Espino-Solis, G. P., Riaño-Umbarila, L., Becerril, B., y Possani, L. D. (2009). Antidotes against venomous animals: State of the art and prospectives. *Journal of Proteomics*, 72, 183–199. (<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.020>)
- Espino-Solis, Gerardo Pavel, Estrada, G., Olamendi-Portugal, T., Villegas, E., Zamudio, F., Cestele, S., y Corzo, G. (2011). Isolation and molecular cloning of beta-neurotoxins from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. *Toxicon*, 57(5), 739–746. (<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.02.006>)
- Estrada-Gómez, S., Gomez-Rave, L., Vargas-Muñoz, L. J., y van der Meijden, A. (2017). Characterizing the biological and biochemical profile of six different scorpion venoms from the Buthidae and Scorpionidae family. *Toxicon*, 130, 104–115. (<https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2017.02.007>)
- Fry, B. G., Roelants, K., Champagne, D. E., Scheib, H., Tyndall, J. D. A., King, G. F., y Rodríguez De La Vega, R. C. (2009). The Toxicogenomic Multiverse: Convergent Recruitment of Proteins Into Animal Venoms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 10, 483–511. (<https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164356>)
- García Merino, A. (2011). Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. *Neurología*, 26(5), 301–306. (<https://doi.org/10.1016/j.nrl.2010.10.005>)
- García Y Pérez, G., Martin, M. F., y RoCHAT, H. (1988). Preparation of a polyvalent antivenom against various Mexican scorpion *Centruroides* species. *Toxicon*, 26(11), 1102–1106. ([https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90211-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90211-5))
- Ghalim, N., El-Hafny, B., Sebti, F., Heikel, J., Lazar, N., Moustansir, R., y Benslimane, A. (2000). Scorpion envenomation and serotherapy in Morocco. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(2), 277–283.
- Goldin, A. L. (2001). Resurgence of Sodium Channel Research. *Annual Review of Physiology*, 63(1), 871–894. (<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.63.1.871>)
- Gowtham, Y. J., Mahadeswaraswamy, Y. H., Girish, K. S., y Kemparaju, K. (2014). Cross-reactivity and neutralization of Indian King cobra (*Ophiophagus hannah*) venom by polyvalent and monovalent antivenoms. *International Immunopharmacology*, 21(1), 148–155. (<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.04.012>)
- Grizel, A. V., Glukhov, G. S., y Sokolova, O. S. (2014). Mechanisms of Activation of Voltage Gated Potassium Channels. *Acta Nature*, 6(23), 10–26.
- Guy, H. R., y Seetharamulu, P. (1986). Molecular model of the action potential sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 508–512. (<https://doi.org/10.1073/pnas.83.2.508>)

- Heegaard, P. M. H., Dedieu, L., Johnson, N., Le Potier, M. F., Mockey, M., Mutinelli, F., y Sørensen, N. S. (2011, February). Adjuvants and delivery systems in veterinary vaccinology: Current state and future developments. *Archives of Virology*, Vol. 156, pp. 183–202. (<https://doi.org/10.1007/s00705-010-0863-1>)
- INEGI. (2018). Mortalidad por contacto traumático con escorpión. Recuperado de https://www.inegi.org.mx/sistemas/olap/consulta/general_ver4/MDXQueryDatos.asp?#Regreso&c=11144
- Instituto de Biotecnología UNAM. (2019). Recuperado el 17 de marzo de 2020, de <http://www.ibt.unam.mx/server/PRG.base?alerno:0,clase:base,tipo:doc,tit:Localizaci%F3n,dir:ibt.localizacion-nuevo.html>
- Jiménez-Vargas, J. M., Quintero-Hernández, V., González-Morales, L., Ortiz, E., y Possani, L. D. (2017). Design and expression of recombinant toxins from Mexican scorpions of the genus *Centruroides* for production of antivenoms. *Toxicon*, 128, 5–14. (<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.01.015>)
- Jiménez-Vargas, Juana María, Possani, L. D., y Luna-Ramírez, K. (2017). Arthropod toxins acting on neuronal potassium channels. *Neuropharmacology*, 127, 139–160. (<https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2017.09.025>)
- Jumalero. (2018). Alacrán de Nayarit. Refcuperado el 5 de agosto de 2020, de la página Naturalista (<https://www.inaturalist.org/photos/24254897>)
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., y Osborne, B. A. (2007). Antígenos y anticuerpos. In T. J. Kindt, R. A. Goldsby, y B. A. Osborne (Eds.), *Inmunología de Kuby* (Sexta, pp. 76–104). (<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>)
- Knaus, H. G., Koch, R. O. A., Eberhart, A., Kaczorowski, G. J., Garcia, M. L., y Slaughter, R. S. (1995). Margatoxin, an Extraordinarily High Affinity Ligand for Voltage-Gated Potassium Channels in Mammalian Brain. *Biochemistry*, 34(41), 13627–13634. (<https://doi.org/10.1021/bi00041a043>)
- Kochwa, S., Gitter, S., Strauss, A., De Vries, A., y Leffkowitz, M. (1959). Immunologic Study of *Vipera xanthina palestinae* Venom and Preparation of Potent Antivenin in Rabbits. *The Journal of Immunology*, 82, 107–115. Recuperado de <http://www.jimmunol.org/>
- Kuzmenkov, A. I., Grishin, E. V., y Vassilevski, A. A. (2015). Diversity of Potassium Channel Ligands: Focus on Scorpion Toxins. *Biochemistry (Moscow)*, 80(13), 1764–1799. (<https://doi.org/10.1134/S0006297915130118>)
- Laraba-Djebari, F., Adi-Bessalem, S., y Hammoudi-Triki, D. (2015). Scorpion Venoms: Pathogenesis and Biotherapies. In P. Gopalakrishnakone, L. D. Possani, E. F. Schwartz, y R. C. Rodríguez De La Vega (Eds.), *Scorpion Venoms* (2015th ed., pp. 63–85). (<https://doi.org/10.1016/B0-44-451924-6/00089-2>)

- Laustsen, A., Solà, M., Jappe, E., Oscoz, S., Lauridsen, L., y Engmark, M. (2016). Biotechnological Trends in Spider and Scorpion Antivenom Development. *Toxins*, 8(8), 226. (<https://doi.org/10.3390/toxins8080226>)
- Lebreton, F., y Delepierre, M. (1994). Primary and N M R Three-Dimensional Structure Determination of a Novel Crustacean Toxin from the Venom of the Scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. *Biochemistry*, 33, 11135–11149.
- León, G., Sánchez, L., Hernández, A., Villalta, M., Herrera, M., Segura, Á., y Gutiérrez, J. M. (2011). Immune response towards snake venoms. *Inflammation and Allergy - Drug Targets*, 10(5), 381–398. (<https://doi.org/10.2174/187152811797200605>)
- Liau, M.-Y. (1978). Preparation of highly potent *Naja naja atra* (Formosan Cobra) Antivenin. *Chinese Journal Microbiology Immunology*, 11, 117–121.
- Liau, M.-Y., Huang, E.-J., y Chen, S.-W. (1982). Enhancement of *Naja naja atra* Antivenin Production in Horses. *Chinese Journal Microbiology Immunology*, 15, 294–299. Recuperado de <http://www.oclc.org/resourcesharing/features/articleexchange/default.htm>
- Lomonte, B. (2007). *Métodos Inmunológicos* (p. 138). p. 138. Universidad de Costa Rica.
- Luján, B. B., Riaño, L., y Possani, L. (2014). Bancos de anticuerpos recombinantes de origen humano: una fuente ideal de anti-venenos modernos contra la picadura de alacrán. *Revista Digital Universitaria. UNAM.*, 15(11), 1–14. Recuperado de <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num11/art84/>
- Martin-Eauclaire, M. F., Adi-Bessalem, S., Hammoudi-Triki, D., Laraba-Djebari, F., y Bougis, P. E. (2019). Serotherapy against voltage-gated sodium channel-targeting α -toxins from *Androctonus* scorpion venom. *Toxins*, 11(2), 63. (<https://doi.org/10.3390/toxins11020063>)
- Martin, M. F., Garcia y Perez, L. G., El Ayeb, M., Kopeyan, C., Bechis, G., Jover, E., y Rochat, H. (1987). Purification and chemical and biological characterizations of seven toxins from the Mexican scorpion, *Centruroides suffusus suffusus*. *Journal of Biological Chemistry*, 262(10), 4452–4459.
- Mayolo-Deloisa, K., Matínez, L. M., y M., R.-P. (2012). Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y repliegamiento de proteínas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(3), 415–429. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62029966013>
- Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R., y Phillips, M. (1985). Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca^{2+} -activated K^{+} channels from mammalian skeletal muscle. *Nature*, 313(6000), 316–318. (<https://doi.org/10.1038/313316a0>)

- Miranda, F., Kupeyan, C., Rochat, H., Rochat, C., y Lissitzky, S. (1970). Purification of Animal Neurotoxins: Isolation and Characterization of Eleven Neurotoxins from the Venoms of the Scorpions *Androctonus australis hector*, *Buthus occitanus tunetanus* and *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. *European Journal of Biochemistry*, 16(3), 514–523. (<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1970.tb01111.x>)
- Moroz, C., De Vries, A., y Goldblum, N. (1966). Preparation of an antivenin against *Vipera palestinae* venom with high antineurotoxic potency. *Toxicon*, 4, 205–208. ([https://doi.org/10.1016/0041-0101\(66\)90051-1](https://doi.org/10.1016/0041-0101(66)90051-1))
- Moroz, C., Goldblum, N., y De Vries, A. (1963). Preparation of *Vipera palestinae* Antineurotoxin using Carboxymethyl-cellulose-bound Neurotoxin as Antigen. In *Nature* (Vol. 200).
- Nerbonne, J. M. (2016). Functional and Molecular Diversity of Native Neuronal K⁺ Channels. *ELLS*, (May), 1–12. (<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000049>)
- Olamendi-Portugal, T., Restano-Cassulini, R., Riaño-Umbarila, L., Becerril, B., y Possani, L. D. (2017). Functional and immuno-reactive characterization of a previously undescribed peptide from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus*. *Peptides*, 87, 34–40. (<https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2016.11.008>)
- Olamendi-Portugal, T., Somodi, S., Fernández, J. A., Zamudio, F. Z., Becerril, B., Varga, Z., y Possani, L. D. (2005). Novel α -KTx peptides from the venom of the scorpion *Centruroides elegans* selectively blockade Kv1.3 over IKCa1 K⁺ channels of T cells. *Toxicon*, 46, 418–429. (<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.06.001>)
- Oliveira-Mendes, B. B. R., Miranda, S. E. M., Sales-Medina, D. F., de Freitas Magalhães, B., Kalapothakis, Y., de Souza, R. P., y Horta, C. C. R. (2019). Inhibition of *Tityus serrulatus* venom hyaluronidase affects venom biodistribution. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(4), 1–17. (<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007048>)
- Oukkache, N., El Jaoudi, R., Ghalim, N., Chgoury, F., Bouhaouala, B., El Mdaghri, N., y Sabatier, J. M. (2014). Evaluation of the lethal potency of scorpion and snake venoms and comparison between intraperitoneal and intravenous injection routes. *Toxins*, 6(6), 1873–1881. (<https://doi.org/10.3390/toxins6061873>)
- Owen, J. A., Punt, J., y Stranford, S. A. (2014a). Receptores y señalización: receptores de célula B y de célula T. In J. A. Owen, J. Punt, y S. A. Stranford (Eds.), *Inmunología de Kuby* (Séptima, pp. 80–90). Recuperado de http://www.ghbook.ir/index.php?name=فرهنگ و رسانه های نوین&option=com_dbook&task=readonline&book_id=13650&page=73&chkhas hk=ED9C9491B4&Itemid=218&lang=fa&tmpl=component

- Owen, J. A., Punt, J., y Stranford, S. A. (2014b). Sistemas y métodos experimentales. In S. S. J. Owen, J. Punt (Ed.), *Inmunología de Kuby* (Séptima, pp. 654–655). México: Mc Graw-Hill.
- Padilla, A., Govezensky, T., Possani, L. D., y Larralde, C. (2005). Mortality and antibody responses of mice to three successive episodes of experimental scorpion (*Centruroides limpidus limpidus*) envenomation and immunological rescue. *Toxicon*, 46(2), 142–149. (<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.03.003>)
- Panigel, J., y Cook, S. P. (2011). A point mutation at F1737 of the human Nav1.7 sodium channel decreases inhibition by local anesthetics. *Journal of Neurogenetics*, 25(4), 134–139. (<https://doi.org/10.3109/01677063.2011.629702>)
- Panyi, G., Possani, L. D., Vega, R. C. R. de, Gáspár, R., y Varga, Z. (2006). K + Channel Blockers : Novel Tools to Inhibit T Cell Activation Leading to Specific Immunosuppression. *Current Pharmaceutical Desing*, 12, 2199–2220.
- Pedraza Escalona, M., y Possani, L. D. (2013). Scorpion beta-toxins and voltage-gated sodium channels: interactions and effects. *Frontiers in Bioscience*, 18, 572–587.
- Peralta, Z. (2016). Alacrán del Balsas. Recuperado el 5 de agosto de 2020, de la página NaturaLista (<https://www.inaturalist.org/photos/4482207>)
- Ponce-Saavedra, J., Francke B, O. F., Quijano-Ravell, A. F., y Cortés Santillán, R. (2016). Alacranes (Arachnida: Scorpiones) de importancia para la salud pública en México. *Sociedad Mexicana de Entomología*, 2(3), 45–70.
- Possani, L.D. (1984). Structure of scorpion toxins. In *Handbook of natural toxins*. Recuperado de <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19850070255>
- Possani, Lourival D. (2005). El alacrán y su piquete. In *Gobierno del Distrito Federal y Dirección General de Divulgación de la Ciencia*. UNAM. Recuperado de http://www.dgdc.unam.mx/assets/cienciabolet/cb_01.pdf
- Possani, Lourival D., Fletcher, P. L., Alagón, A. B. C., Alagón, A. C., y Juliá, J. Z. (1980). Purification and characterization of a mammalian toxin from venom of the Mexican scorpion, *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffmann. *Toxicon*, 18(2), 175–183. ([https://doi.org/10.1016/0041-0101\(80\)90071-9](https://doi.org/10.1016/0041-0101(80)90071-9))
- Possani, Lourival D., y Rodríguez De La Vega, R. C. (2006). Scorpion Venom Peptides. In A. J. Kastin (Ed.), *Handbook of Biologically Active Peptides* (1st ed., pp. 339–354). San Diego: Academic Press.
- Possani, Lourival D, y Wanke, E. (2006). Resurgent current and voltage sensor trapping enhanced activation by a β -Scorpion toxin solely in nav 1.6 channel. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(29), 20326–20337.

(<https://doi.org/10.1074/jbc.M600565200>)

- Possani, Lourival Domingos, Dent, M. A. R., Martin, B. M., y Maelicke, A. (1981). The amino terminal sequence of several toxins from the venom of the mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Research Communications*, 46, 207–214.
- Prieto Martín, A., Barbarroja Escudero, J., Haro Girón, S., y Monserrat Sanz, J. (2017). Respuesta inmune adaptativa y sus implicaciones fisiopatológicas. *Medicine (Spain)*, 12(24), 1398–1407. (<https://doi.org/10.1016/j.med.2016.12.008>)
- Ramírez, A. N., Gurrola, G. B., Martin, B. M., y Possani, L. D. (1988). Isolation of several toxins from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffmann. *Toxicon*, 26(9), 773–783. ([https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90318-2](https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90318-2))
- Riaño-umbarila, L., Olamendi-portugal, T., Morelos-juárez, C., Corzo, G., Possani, L. D., Becerril, B., y Morelos-jua, C. (2011). Exploiting cross-reactivity to neutralize two different scorpion venoms with one single chain antibody fragment. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(8), 6143–6151. (<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.189175>)
- Riaño-Umbarila, L., Olamendi-Portugal, T., Morelos-Juárez, C., Gurrola, G. B., Possani, L. D., y Becerril, B. (2013). A novel human recombinant antibody fragment capable of neutralizing Mexican scorpion toxins. *Toxicon*, 76, 370–376. (<https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2013.09.016>)
- Riaño-Umbarila, L., Rodríguez-Rodríguez, E. R., Santibañez-López, C. E., Güereca, L., Uribe-Romero, S. J., Gómez-Ramírez, I. V., y Becerril, B. (2017). Updating knowledge on new medically important scorpion species in Mexico. *Toxicon*, 138, 130–137. (<https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2017.08.022>)
- Riaño-umbarila, L., V, G.-R. I., Ledezma-Candanoza, L. M., Olamendi-portugal, T., Remi, E., Fernández-Taboada, G., y Becerril, B. (2019). Generation of a broadly cross-neutralizing antibody fragment against several Mexican scorpion venoms. *Toxins*, 11(32), 1–18. (<https://doi.org/10.3390/toxins11010032>)
- Rodriguez de la Vega, R. C., Merino, E., Becerril, B., y Possani, L. D. (2003). Novel interactions between K⁺ channels and scorpion toxins. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(5), 222–227. ([https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(03\)00080-4](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(03)00080-4))
- Rodríguez de la Vega, R. C., Schwartz, E. F., y Possani, L. D. (2010). Mining on scorpion venom biodiversity. *Toxicon*, 56(7), 1155–1161. (<https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2009.11.010>)

- Şahin, A., Arıcı, M. A., Hocaoğlu, N., Kalkan, Ş., y Tunçok, Y. (2018). Antivenom use in bite and sting cases presenting to a public hospital. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, 24(4), 343–350. (<https://doi.org/10.5505/tjtes.2017.99692>)
- Salazar, M. H., Arenas, I., Corrales-García, L. L., Miranda, R., Vélez, S., Sánchez, J., y Acosta, H. (2018). Venoms of *Centruroides* and *Tityus* species from Panama and their main toxic fractions. *Toxicon*, 141, 79–87. (<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.11.013>)
- Santibáñez-López, C. E., Francke, O. F., Ureta, C., y Possani, L. D. (2015). Scorpions from Mexico: From species diversity to venom complexity. *Toxins*, 8(1), 2. (<https://doi.org/10.3390/toxins8010002>)
- Schiavon, E., Pedraza-Escalona, M., Gurrola, G. B., Olamendi-Portugal, T., Corzo, G., Wanke, E., y Possani, L. D. (2012). Negative-shift activation, current reduction and resurgent currents induced by β -toxins from *Centruroides* scorpions in sodium channels. *Toxicon*, 59(2), 283–293. (<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.12.003>)
- Schunk, M. K., y Macallum, G. E. (2005). Applications and optimization of immunization procedures. *ILAR Journal*, 46(3), 241–257. (<https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.241>)
- Secretaría de Salud. (2019). *Boletín epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica*. Recuperado de <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico>
- Siel, D., Vidal, S., y Sáenz, L. (2014). Principales sistemas de entrega de antígenos en medicina veterinaria y humana. *Avances En Ciencias Veterinarias*, 29(1), 50–69. (<https://doi.org/10.5354/acv.v29i1.32410>)
- Sifi, N., Martin-Eauclaire, M. F., y Laraba-Djebari, F. (2016). K⁺ channel blocker-induced neuroinflammatory response and neurological disorders: immunomodulatory effects of astaxanthin. *Inflammation Research*, 65(8), 623–634. (<https://doi.org/10.1007/s00011-016-0945-y>)
- Sjostrom, L., Al-Abdulla, I., Rawat, S., Smith, D., y Landon, J. (1994). A comparison of ovine and equine antivenoms. *Toxicon*, 32(4), 427–433.
- Smith, J. J., Hill, J. M., Little, M. J., Nicholson, G. M., King, G. F., y Alewood, P. F. (2011). Unique scorpion toxin with a putative ancestral fold provides insight into evolution of the inhibitor cystine knot motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(26), 10478–10483. (<https://doi.org/10.1073/pnas.1103501108>)
- Solé, L., y Tamkun, M. M. (2020). Trafficking mechanisms underlying Nav channel subcellular localization in neurons. *Channels*, 14(1), 1–17. (<https://doi.org/10.1080/19336950.2019.1700082>)
- Stern, R., y Csóka, A. B. (2000). Mammalian Hyaluronidases. *Glycoforum*, 4, A6.

- Tanaka, G. D., Sant'anna, O. A., Marcelino, J. R., Lustoza Da Luz, A. C., Teixeira Da Rocha, M. M., y Tambourgi, D. V. (2016). *Micrurus* snake species: Venom immunogenicity, antiserum cross-reactivity and neutralization potential. *Toxicon*, 117, 59–68. (<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.03.020>)
- Todd, C. (1909). Anti-serum for Scorpion Venom. *J. Hyg.*, 9(1), 69–85.
- UNAM al día. (2015). Recuperado el 5 de agosto de 2020, de la página Fundación UNAM (<https://www.fundacionunam.org.mx/unam-al-dia/aumentan-picaduras-de-alacran/>)
- Valdez-Velázquez, L. L., Quintero-Hernández, V., y Romero-Gutierrez, M. T. (2013). Mass Fingerprinting of the Venom and Transcriptome of Venom Gland of Scorpion *Centruroides tecomanus*. *PLOS ONE*, 8(6), 1–8. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066486>)
- Valdez-Velazqu ez, L. L., Romero-Gutierrez, M. T., Delgado-Enciso, I., Dobrovinskaya, O., Melnikov, V., Quintero-Hern andez, V., y Possani, L. D. (2016). Comprehensive analysis of venom from the scorpion *Centruroides tecomanus* reveals compounds with antimicrobial, cytotoxic, and insecticidal activities. *Toxicon*, 118, 95–103. (<https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2016.04.046>)
- Valdivia, H. H., Martin, B. M., Ramirez, A. N., Fletcher, P. L., y Possani, L. D. (1994). Isolation and pharmacological characterization of four novel Na⁺ channel-blocking toxins from the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. In *Journal of Biochemistry* (Vol. 116). Recuperado de <https://academic.oup.com/jb/article-abstract/116/6/1383/836702>
- Valdivia, H. H., Smith, J. S., Martin, B. M., Coronado, R., y Possani, L. D. (1988). Charybdotoxin and noxiustoxin, two homologous peptide inhibitors of the K⁺(Ca²⁺) channel. *FEBS Letters*, 226(2), 280–284. ([https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)81439-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)81439-X))
- Venancio, E. J., Portaro, F. C. V., Kuniyoshi, A. K., Carvalho, D. C., Piddo-Queiroz, G., y Tambourgi, D. V. (2013). Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of *Tityus* genus and the neutralisation potential of therapeutical antivenoms. *Toxicon*, 69, 180–190. (<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.02.012>)
- Vergara, I. (2010). *Influencia de la v ia de administración en la capacidad neutralizante in vivo de dos venenos*. Universidad Autónoma de México.
- Xu, J., Zhang, X., Guo, Z., Yan, J., Yu, L., Li, X., y Liang, X. (2013). Orthogonal separation and identification of long-chain peptides from scorpion *Buthus martensi* Karsch venom by using two-dimensional mixed-mode reversed phase-reversed phase chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analyst*, 138(6), 1835–1843. (<https://doi.org/10.1039/c2an36704a>)

- Xu, N., Zhao, H. Y., Yin, Y., Shen, S. S., Shan, L. L., Chen, C. X., y Ji, X. (2017). Combined venomomics, antivenomics and venom gland transcriptome analysis of the monocoled cobra (*Naja kaouthia*) from China. *Journal of Proteomics*, 159, 19–31. (<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.02.018>)
- Yu, F. H., y Catterall, W. A. (2004). The VGL-kanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*, Vol. 2004, pp. 1–18. (<https://doi.org/10.1126/stke.2532004re15>)
- Zavala, J. T., Díaz, J. G., Sánchez, V., Castillo, L., Ruíz, D., y Calderón, L. (2004). Picaduras por alacranes y arañas ponzoñosas de México. *Revista de La Facultad de Medicina UNAM*, 47(1), 6–12.
- Zhao, Y., Chen, Z., Cao, Z., Li, W., y Wu, Y. (2019). Diverse structural features of potassium channels characterized by scorpion toxins as molecular probes. *Molecules*, Vol. 24, pp. 1–16. (<https://doi.org/10.3390/molecules24112045>)

XII. ANEXOS

12.1 Anexo 1

Preparación de intercambiador catiónico CM-32

Pesar 2 g de CM-32 y resuspender en 100 mL de NaOH 0.5 M, en un vaso de precipitado; agitar intermitentemente, con una espátula durante 15 min. Posteriormente remover el NaOH 0.5 M mediante filtración, utilizando un filtro Buckner y un matraz Kitasato. En seguida, lavar con 300 mL de agua destilada utilizando el filtro Buckner, finalizado esto, transferir la CM-32 a un vaso de precipitado limpio y agregar 100 mL de HCl 0.5 M, agitar intermitentemente con una espátula durante 15 min. Luego, lavar nuevamente con 300 mL de agua destilada utilizando el filtro Buckner. Colocar la CM-32 lavada en una probeta y aforar a 100 mL con agua destilada, dejar reposar hasta que se sedimente. Remover los "finos" con una pipeta Pasteur conectada a la manguera de bomba de vacío y dejar reposar toda la noche.

Soluciones para preparación de CM-32

- ❖ Hidróxido de sodio 0.5 M (100 mL).

Pesar y disolver 2 g en 100 mL de agua destilada. Etiquetar y almacenar a 4°C.

- ❖ Ácido clorhídrico 0.5 M (100 mL).

Diluir 4.3 mL de ácido clorhídrico en 80 mL de agua destilada y aforar a 100 mL. Etiquetar y almacenar a 4°C.

12.2 Anexo 2

Buffers para cromatografía de intercambio iónico

Preparar las siguientes soluciones stock:

- Fosfato de sodio monobásico 0.2 M: Pesar y disolver 2.76 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua destilada. Etiquetar y almacenar a 4°C.
- Fosfato de sodio dibásico 0.2 M: Pesar y disolver 2.84 g de Na_2HPO_4 en 100 mL de agua destilada. Etiquetar y almacenar a 4°C.

La preparación de ambos stocks se repetirá cada vez que sea necesario.

- ❖ Buffer de fosfatos de sodio 0.2 M pH 6.0 (100 mL).
Mezclar 87.6 mL de fosfato de sodio monobásico con 12.3 mL de fosfato de sodio dibásico. Etiquetar y almacenar a 4°C.
- ❖ Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 6.0 (40 mL).
Diluir 20 mL de buffer de fosfatos 0.2 M pH 6.0 en 20 mL de agua destilada. Etiquetar y almacenar a 4°C.
- ❖ Buffer de fosfatos de sodio 0.02 M pH 6.0 (400 mL).
Diluir 40 mL de buffer de fosfatos 0.2 M pH 6.0 en 360 mL de agua destilada. Ajustar pH a 6.2 con potenciómetro. Etiquetar y almacenar a 4°C.
- ❖ Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.7 + NaCl 0.5 M (100 mL).
Mezclar 10 mL de fosfato de sodio monobásico con 90 mL de fosfato de sodio dibásico y agregar 2.9 g de NaCl. Etiquetar y almacenar a 4°C.

12.3 Anexo 3

Soluciones para SDS-PAGE

- ❖ Solución de acrilamida/bis-acrilamida (100 mL).
Pesar y disolver 30 g de acrilamida y 0.8 g de bis-acrilamida en 50 mL de agua destilada. Aforar a 100 mL con agua destilada. Etiquetar y almacenar a 4°C.
- ❖ Buffer inferior (100 mL).
Disolver 18.17 g de tris-base en 50 mL de agua destilada y adicionar 2 mL de SDS al 20%. Ajustar el pH a 8.8 con HCl concentrado y aforar a 100 mL con agua destilada. Etiquetar y almacenar a 4°C.
- ❖ Buffer superior (100 mL).
Disolver 6.06 g de tris-base en 50 mL de agua destilada y adicionar 2 mL de SDS 20%. Ajustar el pH a 6.8 con HCl concentrado y aforar a 100 mL con agua destilada. Etiquetar y almacenar a 4°C.
- ❖ Buffer de corrida 10x (500 mL).
Disolver 15.2 g de tris-base y 72.1 g de glicina en 300 mL de agua destilada y adicionar 25 mL de SDS al 20%. Ajustar el pH a 8.6 con 10 M NaOH. Aforar a 500 mL con agua destilada. Etiquetar y almacenar a 4°C.

- ❖ Buffer de muestra desnaturante 5X (10 mL).

En un tubo para centrífuga de 15 mL (marca Falcon), mezclar 2.5 mL de glicerol, 3.13 mL de SDS al 20%, 1.25 mL de tris-HCl pH 6.8, 1.25 mL de 2-β- mercaptoetanol y 0.5 mL de azul de bromofenol al 1%. Aforar a 10 mL con agua destilada, mezclar y preparar alícuotas de 1 mL. Etiquetar y almacenar a -20°C.

- ❖ Persulfato de amonio al 10% (1 mL).

Disolver 0.1 g de persulfato de amonio en 1 mL de agua destilada. Etiquetar y almacenar a 4°C.

- ❖ Solución de tinción (500 mL).

Disolver 1 g de azul de Coomasie R-250 en 125 mL de isopropanol, añadir 50 mL de ácido acético y aforar a 500 mL con agua destilada. Etiquetar y almacenar a 4°C.

- ❖ Solución para destinción (500 mL).

Mezclar 50 mL de isopropanol con 50 mL de ácido acético y aforar a 500 mL con agua destilada. Etiquetar y almacenar a temperatura ambiente.

Geles separadores de diferentes concentraciones

Reactivos	4%	6%	10%	11%	12%	12.5%	15%	17%	20%
Buffer inferior (mL)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Sol. Acrilamida (mL)	0.8	1.2	1.95	2.2	2.4	2.5	3	3.4	4.05
Agua destilada (mL)	3.7	3.3	2.55	2.3	2.1	2	1.5	1.1	0.45
TEMED (μL)	20	20	20	20	20	20	20	20	20
10% PSA (μL)	40	40	40	40	40	40	40	40	40

Gel concentrador 4%

Reactivos	Volumen
Buffer superior	0.63 mL
Agua destilada	1.54 mL
Sol. Acrilamida	0.33 mL
TEMED (μL)	15
10% PSA (μL)	30

12.4 Anexo 4

Soluciones para HPLC en fase reversa

- ❖ Solución A (TFA 0.1%) (1 L).

En 1 L de agua destilada añadir 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA) y filtrar utilizando un filtro hidrofílico. Etiquetar y almacenar a temperatura ambiente.

- ❖ Solución B (acetonitrilo con 0.1% TFA) (1 L)

En 1 L de acetonitrilo añadir 1 mL de TFA y filtrar utilizando un filtro hidrofóbico. Etiquetar y almacenar a temperatura ambiente.

12.5 Anexo 5

Soluciones para dosis letal media y potencia neutralizante

- ❖ Solución de cloruro de sodio 0.15 M (100 mL).

Diluir 3 mL de NaCl 5 M con 97 mL de agua destilada. Etiquetar y almacenar a 4°C.

- ❖ Solución stock de PBS 10x (1 L).

Pesar y disolver 80 g de NaCl (1.4 M), 2 g de KCl (0.03 M), 14.4 g de Na_2HPO_4 (0.1 M) y 2.4 g de KH_2PO_4 (0.017 M) en 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7.2 con NaOH (10 N) y aforar a 1 L con agua destilada.

- ❖ Solución de PBS 1x (1 L).

Tomar 100 mL de PBS 10x y diluir en 900 mL de agua destilada. Etiquetar y almacenar a 4°C.

12.6 Anexo 6

Soluciones para el ELISA

- ❖ Buffer Tris-HCL 1 M pH 8.0 (1 L).

Pesar 121.1 g de tris-base y disolver en 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 8.0 con HCl bajo agitación constante y aforar a 1 L con agua destilada. Etiquetar y almacenar a temperatura ambiente.

- ❖ Buffer de carbonatos (500 mL).

Pesar y diluir 4.2 g de NaHCO_3 en agua destilada. Ajustar pH a 9.5 con NaOH 5 N bajo agitación constante y aforar a 500 mL con agua destilada. Etiquetar y almacenar, en uso rutinario a 4°C, de lo contrario a -20°C.

- ❖ Solución de bloqueo (500 mL).

Mezclar 25 mL de Tris-HCl 1 M pH 8.0 con 2.5 g de gelatina previamente predisuelta en 100 mL de agua caliente (50-60°C) y atemperada. Agregar 1 mL de Tween 20 y aforar con 500 mL de agua destilada. Etiquetar y almacenar, en uso rutinario a 4°C, de lo contrario a -20°C.

- ❖ NaCl 5 M (1 L).

Pesar y disolver 292.2 g de NaCl en 750 mL de agua destilada. Aforar a 1 L con agua destilada. Etiquetar y almacenar a temperatura ambiente.

- ❖ Solución de lavado 10x (1 L).

Mezclar 500 mL de Tris-HCl 1 M pH 8.0 con 300 mL de NaCl 5 M. Aforar a 1 L con agua destilada, etiquetar y almacenar a 4°C.

- ❖ Solución de lavado 1x (1 L).

Tomar 100 mL de solución de lavado 10x y diluir en 900 mL de agua destilada, agregar 500 μL de tween 20. Etiquetar y almacenar a 4°C.

- ❖ Solución de reacción (500 mL).

Mezclar 25 mL de Tris-HCl 1 M pH 8.0 con 50 mL de NaCl 5 M y 100 mg de gelatina previamente predisuelta en 100 mL de agua caliente (50-60°C) y atemperada. Agregar 1 mL de Tween 20 y aforar a 500 mL con agua destilada. Etiquetar y almacenar a 4°C.

- ❖ Solución stock ABTS.

Pesar 50 mg de ABTS y disolver en 1 mL de agua destilada. Etiquetar y almacenar a 4°C.

❖ Buffer para ABTS (500 mL).

Preparar las siguientes soluciones stock:

- a) Solución A (ácido cítrico anhidro 0.1 M): Pesar y disolver 3.8 g de ácido cítrico anhidro en 100 mL de agua destilada. Aforar a 200 mL, etiquetar y reservar.
- b) Solución B (fosfato de sodio dibásico 0.2 M): Pesar y disolver 10.7 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua destilada. Aforar a 200 mL, etiquetar y reservar.

Mezclar 147 mL de Solución A con 103 mL de Solución B. Aforar a 500 mL con agua destilada. Alicuotar y almacenar a -20°C.

❖ Solución de revelado.

Para cada placa de ELISA, se deben mezclar 10 mL de buffer para ABTS (buffer de citrato-fosfato 0.07 M pH 4.2) con 75 μL de ABTS (solución de ABTS 50 mg/mL) y agregar 4 μL de H_2O_2 .

12.7 Anexo 7

Determinación de la DL_{50} de la mezcla de venenos de *Centruroides* y su fracción tóxica

a) DL_{50} de la mezcla de venenos de *Centruroides*

Grupo	μg veneno/ratón	No. De muertos	% Mortalidad
1	20	3/3	100
2	16	2/3	66
3	12	1/3	33
4	10	0	0
5	5	0	0

DL_{50} : 13.97
Intervalo de confianza: 12.25 a 15.94

Se utilizaron grupos de tres ratones por cada dosis administrada. El veneno se infectó por vía intravenosa en un volumen final de 0.5 mL de NaCl 150 mM.

b) DL₅₀ de la fracción tóxica

Grupo	µg veneno/ratón	No. De muertos	% Mortalidad
1	15	3/3	100
2	10	3/3	100
2	5	2/3	66
4	4	1/3	33
5	3	1/3	33
6	2	0	0

DL₅₀: 4.31
Intervalo de confianza: 3.60 a 5.16

Se utilizaron grupos de tres ratones por cada dosis administrada. El veneno se infectó por vía intravenosa en un volumen final de 0.5 mL de NaCl 150 mM.

12.8 Anexo 8

Determinación de la DE₅₀ de los sueros de los conejos y caballos

- 1) Conejos inmunizados con la fracción tóxica de *Centruroides*
 Veneno por probar: mezcla de venenos de *Centruroides*
 DL₅₀ del veneno: 13.97

Grupo	µl suero/ratón	% Supervivencia
1	150	0
2	200	0
2	215	33.3
4	230	66.6
5	245	66.6
6	250	100

DE₅₀: 224.7 µl/ratón
Intervalo de confianza: 214.5 a 235.4

Se utilizaron tres ratones en cada grupo. La dosis administrada de veneno por ratón fue de 3DL₅₀ (41.91 µg/ratón)

- 2) Conejos inmunizados con la mezcla de venenos de *Centruroides*
 Veneno por probar: mezcla de venenos de *Centruroides*
 DL₅₀ del veneno: 13.97

Grupo	µl suero/ratón	% Supervivencia
1	50	0
2	100	0
2	115	33.3
4	125	66.6
5	145	100
6	150	100

DE₅₀: 120 µl/ratón
Intervalo de confianza: 118.5 a 121.6

Se utilizaron tres ratones en cada grupo. La dosis administrada de veneno por ratón fue de 3DL₅₀ (41.91 µg/ratón)

- 3) Caballos inmunizados con la fracción tóxica de *Centruroides*
 Veneno por probar: mezcla de venenos de *Centruroides*
 DL₅₀ del veneno: 13.97

Grupo	µl suero/ratón	% Supervivencia
1	30	0
2	40	0
2	45	33.3
4	47	66.6
5	50	100
6	100	100

DE₅₀: 45.96 µl/ratón
Intervalo de confianza: 45.69 a 46.28

Se utilizaron tres ratones en cada grupo.

La dosis administrada de veneno por ratón fue de 3DL₅₀ (41.91 µg/ratón)

- 4) Caballos inmunizados con la mezcla de venenos de *Centruroides*
 Veneno por probar: mezcla de venenos de *Centruroides*
 DL₅₀ del veneno: 13.97

Grupo	µl suero/ratón	% Supervivencia
1	15	0
2	16	0
2	16.25	33.3
4	16.31	66.6
5	16.37	100
6	16.50	100
7	17	100

DE₅₀: 16.28 µl/ratón
Intervalo de confianza: 16.26 a 16.30

Se utilizaron tres ratones en cada grupo.

La dosis administrada de veneno por ratón fue de 3DL₅₀ (41.91 µg/ratón).