

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y
DEL MEDIO NATURAL

**CARACTERIZACIÓN DE UN ANTIVENENO EXPERIMENTAL
GENERADO EN CONEJO CONTRA EL VENENO DEL COLÚBRIDO
Boiga irregularis Y ESTUDIO DE SU REACTIVIDAD CRUZADA
FRENTE A VENENOS DE ELÁPIDOS**



TRABAJO DE FIN DE GRADO CURSO 2016-2017

AUTOR: ELENA JUÁREZ BARBER

TITULACIÓN: GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

TUTOR ACADÉMICO: MARIA PILAR LÓPEZ GRESA

COTUTORES: JUAN JOSÉ CALVETE CHORNET Y DAVINIA PLA FERRER



VALENCIA, JUNIO 2017

Datos del trabajo

Título: Caracterización de un antiveneno experimental generado en conejo contra el veneno del colúbrido *Boiga irregularis* y estudio de su reactividad cruzada frente a venenos de elápidos.

Autor: Elena Juárez Barber.

Localidad y fecha: Valencia, Junio de 2017.

Tutor académico: Maria Pilar López Gresa.

Cotutores: Juan José Calvete Chornet y Davinia Pla Ferrer.

Tipo de licencia: Licencia Creative Commons. "Reconocimiento no Comercial Sin Obra Derivada".

Resumen

El envenenamiento por mordedura de serpiente es una patología desatendida y una causa importante de morbilidad y mortalidad que afecta particularmente a comunidades rurales y económicamente deprimidas en regiones tropicales de África sub-Sahariana, Asia, América Latina y Oceanía. La única terapia efectiva conocida es la utilización de antivenenos generados por hiperinmunización de grandes mamíferos (generalmente caballo, aunque también oveja, camello o dromedario). Una manera de optimizar la utilización de un antiveneno es el estudio de su inmunoreactividad homóloga (frente a la mezcla de venenos utilizados en su producción) y heteróloga (frente a venenos no utilizados en su generación).

El veneno de las serpientes es una de las armas bioquímicas más poderosas del reino animal y varía tanto espacialmente como temporalmente inter- o intra-especie. Aproximadamente, existen unas 3500 especies de serpientes que se agrupan en 26 familias y unos 400 géneros, de las cuales 600 son venenosas. Las serpientes venenosas se clasifican en 3 grandes familias: Elapidae (mambas, cobras, serpiente de coral), Viperidae (víboras, serpientes de cascabel) y Colubridae (serpientes comunes). La mayor parte de los colúbridos son completamente inofensivos porque su saliva no es lo bastante tóxica como para constituir un peligro para el ser humano y porque a pesar de tener glándula de Duvernoy activa en la producción de toxinas, carecen de un eficiente aparato para inocular el veneno.

Boiga irregularis es una serpiente de la familia Colubridae pero la secreción de su glándula de Duvernoy es rica en proteínas de la familia 3FTx ("three finger toxins"), típicas de la familia Elapidae. No obstante, estas proteínas, que en elápidos son potentes neurotoxinas, no presentan toxicidad en mamíferos, sino que son tóxicas específicamente para aves, sus presas habituales. Con esta premisa, el objetivo en este proyecto es el estudio de un antiveneno experimental generado en conejos frente al veneno de *B. irregularis*.

Utilizando el método denominado "antivenómica de segunda generación", se caracterizó el perfil de reconocimiento del antiveneno frente a veneno homólogo y frente a veneno de un individuo neonato de la misma especie, y se analizó su reactividad cruzada frente a venenos de serpientes de la familia Elapidae. Para ello se generaron columnas de inmunoafinidad, inmovilizando las IgGs del antiveneno en una matriz de Sepharose 4B activada con CNBr. Posteriormente se incubaron los diferentes venenos a analizar con la matriz y se recogieron las fracciones no retenidas (componentes del veneno frente a los que el antiveneno no presenta afinidad) y retenida de la columna de inmunoafinidad. Ambas fracciones se analizaron mediante cromatografía de alta eficiencia utilizando una columna C18 de fase reversa (RP-HPLC). La comparación cualitativa y cuantitativa de los perfiles cromatográficos del veneno completo y de las fracciones de la columna de inmunoafinidad nos permitió determinar el grado de inmunoreactividad homóloga y paraespecífica del antiveneno.

Los resultados obtenidos demuestran que el individuo neonato y adulto de *B. irregularis* tienen el mismo perfil inmunogénico. Además se comprobó que el antiveneno no reconoce las three finger toxins de elápidos por lo que se puede decir que existe variabilidad dentro de una misma familia de proteínas.

Palabras clave: antiveneno, colúbrido, *Boiga irregularis*, elápidos.

Abstract

Snakebite poisoning is an unattended pathology and an important morbidity and mortality cause that affects specially to rural and economically poor communities of tropical regions of Sub-Saharan Africa, Asia, Latin America and Oceania. The utilization of antivenoms that have been generated by hiper-immunization of large mammals (generally horses and sometimes sheep, camel or dromedary) is the unique effective therapy that it is known. A way in order to optimize the utilization of an antivenom is by studying its homologous (versus the pool of venoms that are used in its production) and heterologous immunoreactivity (versus venoms not used during its generation).

Snake venom is one of the most powerful biochemical weapons in the animal's world, and it varies spatially and temporally between species or between individuals of the same specie. There are known among 3500 snake species that are classified in 26 families and 400 genres, approximately. From those, 600 are venomous. When referring to venomous snakes, there exist 3 main families: Elapidae (mamba, cobra, coral snake), Viperidae (vipers, rattle snakes) and Colubridae (common snakes). Most colubrids are harmful due to its saliva which is not toxic enough in order to be dangerous for humans. Moreover, they are ophistoglyphas, so they do not have the machinery to inoculate the venom efficiently, despite of having Duvernoy gland.

Boiga irregularis is a snake of Colubridae family but its Duvernoy gland's secretion is rich in proteins of the 3FTx ("three finger toxins") family, that are common in Elapidae family. This proteins, in elapids, are potent neurotoxins, but in colubrids they do not show toxicity for mammals; they are specifically toxic for birds, that are their natural preys. By knowing this, the aim of this project is to study the experimental antivenom that was generated in rabbits by using *B. irregularis* venom.

With the "second generation antivenomics" methodology, the recognition profile of the antivenom versus the homologous venom and the venom from a newborn of the same specie were characterized, and the cross reactivity of this antivenom versus Elapidae snakes was analyzed. To do that, immunoaffinity columns were generated by immobilizing the antivenom IgGs in a Sepharose 4B matrix activated with CNBr. Lately, the venoms that were going to be analyzed were incubated with the chromatography matrix and the non retained (venom compounds that the antivenom does not shown affinity for) and retained and eluted fractions of the immunoaffinity column, were collected. Both fractions were analyzed by high efficiency chromatography by using a C18 reverse phase column (RP-HPLC). Quantitative and qualitative comparison of the chromatographic profiles of the complete venom and the fractions of the immunoaffinity column, were needed in order to determine the homologous and paraspecific antivenom immunoreactivity degree.

The results obtained showed that newborn and adult individuals of *B. irregularis* have the same immunogenic profile. Moreover, the antivenom could not recognize the proteins of the elapid venom, reflecting the variability that exists between the same family of proteins.

Key words: antivenom, colubrid, *Boiga irregularis*, elapids.

Índice

| | |
|--|-----------|
| 1. Introducción..... | 1 |
| 1.1. Serpientes..... | 1 |
| 1.2. Veneno: composición y sintomatología..... | 3 |
| 1.3. El problema del envenenamiento ofídico..... | 6 |
| 1.4. Generación de antivenenos..... | 7 |
| 1.5. Antivenómica..... | 8 |
| 1.6. <i>Boiga irregularis</i> | 9 |
| 2. Objetivo..... | 11 |
| 3. Materiales y métodos..... | 12 |
| 3.1. Materiales..... | 12 |
| 3.1.1. Venenos y antiveneno..... | 12 |
| 3.2. Métodos..... | 12 |
| 3.2.1. Antivenómica. | 12 |
| 3.2.2. Western-Blot. | 13 |
| 3.2.3. Identificación de las proteínas del veneno por espectrometría de masas (venómica)..... | 14 |
| 4. Resultados..... | 15 |
| 4.1. Antecedentes. | 15 |
| 4.2. Caracterización del antiveneno de <i>Boiga irregularis</i> adulto..... | 15 |
| 4.3. Caracterización de la paraespecificidad del antiveneno anti- <i>B. irregularis</i> frente a elápidos..... | 26 |
| 5. Discusión..... | 32 |
| 6. Bibliografía..... | 33 |

Índice de figuras.

Figura 1: Árbol filogenético de la familia Colubroidea (Pyron *et al.*, 2011).

Figura 2: Distribución de los envenenamientos de serpiente y la mortalidad que provocan en todo el mundo (Gutiérrez *et al.*, 2010).

Figura 3: Tipos de serpientes según su dentición. A: aglifa. B: opistoglifa. C: proteroglifa. D: solenoglifa (Bauchot *et al.*, 2005).

Figura 4: Diagrama de la antivenómica de segunda generación. El antiveneno a analizar es inmovilizado en la columna y posteriormente se realiza la incubación con el veneno para obtener la fracción de proteínas inmunoreconocidas y no inmunoreconocidas. En paralelo se realizan los controles de matriz y de especificidad para descartar posibles uniones inespecíficas (Biotox, 2015).

Figura 5: *Boiga irregularis* neonato (O'Brian, 2017).

Figura 6: Ensayo de inmunoafinidad CNBr AVBi vs *Boiga irregularis* adulto. Panel A: identificación de las proteínas de cada fracción de veneno total 0.1mg. Panel B: fracción de proteínas que han sido inmunoreconocidas (retenido) en 0.1mg de veneno. Panel C: porcentaje de la fracción de proteínas no inmunoreconocidas (no retenido) en 0.1mg de veneno. Abreviaturas. 3FTX: three finger toxins. PIII-SVMP: snake venom metalloproteinase de tipo III. CRISP: cysteine-rich secretory protein.

Figura 7: Ejemplo de cómo seleccionar los picos del veneno de *B. irregularis* adulto 0.1mg para su cuantificación.

Figura 8: Ensayo de inmunoafinidad CNBr Control matriz vs *Boiga irregularis* adulto. Panel A: veneno total 0.1mg. Panel B: fracción de proteínas que han sido retenidas por la matriz de 0.1mg de veneno y sus porcentajes. Panel C: fracción de proteínas no retenidas de 0.1mg de veneno. Abreviaturas. 3FTX: three finger toxins. PIII-SVMP: snake venom metalloproteinase de tipo III. CRISP: cysteine-rich secretory protein.

Figura 9: Cromatograma del veneno de *B. irregularis* adulto 0.2mg. Abreviaturas. 3FTX: three finger toxins. PIII-SVMP: snake venom metalloproteinase de tipo III. CRISP: cysteine-rich secretory protein.

Figura 10: Análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones cromatográficas separadas en la Figura

Figura 11: Análisis mediante Western-Blot de las fracciones cromatográficas separadas en la Figura 9.

Figura 12: Ensayo de inmunoafinidad CNBr AVBi vs *Boiga irregularis* neonato. Panel A: veneno total 0.1mg. Panel B: fracción de proteínas inmunoreconocidas. Panel C: fracción de proteínas no inmunoreconocidas. Abreviaturas. 3FTX: three finger toxins. PIII-SVMP: snake venom metalloproteinase de tipo III. CRISP: cysteine-rich secretory protein.

Figura 13: Ensayo de inmunoafinidad CNBr Control Matriz vs *Boiga irregularis* neonato. Panel A: veneno total 0.1mg. Panel B: fracción de proteínas retenidas. Panel C: fracción de proteínas no retenidas. Abreviaturas. 3FTX: three finger toxins. PIII-SVMP: snake venom metalloproteinase de tipo III. CRISP: cysteine-rich secretory protein.

Figura 14: Fracciones inmunoreconocidas en ensayos de inmunoafinidad de CNBr AVBi vs concentraciones crecientes de veneno de *B. irregularis*: 0.05 mg (Panel A), 0.075 (Panel B), 0.1 (Panel C), y 0.15 (Panel D). Abreviaturas. 3FTX: three finger toxins. CRISP: cysteine-rich secretory protein.

Figura 15: Fracciones no inmunoreconocidas en el ensayo de inmunoafinidad de CNBr AVBi vs concentraciones crecientes de veneno de *B. irregularis*: 0.05 mg (Panel A), 0.075 (Panel B), 0.1 (Panel C), y 0.15 (Panel D). Abreviaturas. 3FTX: three finger toxins. CRISP: cysteine-rich secretory protein.

Figura 16: Picos de la fracción no inmunoreconocida del veneno de *B. irregularis* neonato 0.150mg que fueron analizados por espectrometría de masas. Abreviaturas. 3FTX: three finger toxins.

Figura 17: Ensayo de inmunoafinidad CNBr AVBi vs *Naja haje* Egipto. Panel A: veneno total 0.1mg. Panel B: porcentaje de la fracción de proteínas que han sido inmunoreconocidas en 0.1mg de veneno. Panel C: fracción de proteínas no inmunoreconocidas en 0.1mg de veneno. Abreviaturas. 3FTX: three finger toxins. PIII-SVMP: snake venom metalloproteinase de tipo III. CRISP: cysteine-rich secretory protein. LAAO: L-amino acidoxidase.

Figura 18: Ensayo de inmunoafinidad CNBr Control Matriz vs *Naja haje* Egipto. Panel A: veneno total 0.1mg. Panel B: fracción de proteínas que han sido inmunoreconocidas en 0.1mg de veneno. Panel C: fracción de proteínas no inmunoreconocidas en 0.1mg de veneno. Abreviaturas. 3FTX: three finger toxins. PIII-SVMP: snake venom metalloproteinase de tipo III. CRISP: cysteine-rich secretory protein. LAAO: L-amino acidoxidase.

Figura 19: Ensayo de inmunoafinidad CNBr AVBi vs *Naja melanoleuca* Uganda. Panel A: veneno total 0.1mg. Panel B: fracción de proteínas inmunoreconocidas en 0.1mg de veneno. Panel C: fracción de proteínas no inmunoreconocidas en 0.1mg de veneno. Abreviaturas. 3FTX: three finger toxins. PLA₂: phospholipase A₂. PIII-SVMP: snake venom metalloproteinase de tipo III. CRISP: cysteine-rich secretory protein. LAAO: L-amino acidoxidase. VNGF: venom neural growth factor.

Figura 20: Ensayo de inmunoafinidad CNBr Control Matriz vs *Naja melanoleuca* Uganda. Panel A: veneno total 0.1mg. Panel B: fracción de proteínas inmunoreconocidas en 0.1mg de veneno. Panel C: fracción de proteínas no inmunoreconocidas en 0.1mg de veneno. Abreviaturas. 3FTX: three finger toxins. PLA₂: phospholipase A₂. PIII-SVMP: snake venom metalloproteinase de tipo III. CRISP: cysteine-rich secretory protein. LAAO: L-amino acidoxidase. VNGF: venom neural growth factor.

Figura 21: Ensayo de inmunoafinidad CNBr AVBi vs *Naja annulifera*. Panel A: veneno total 0.1mg. Panel B: fracción de proteínas inmunoreconocidas en 0.1mg de veneno.

Panel C: fracción de proteínas no inmunoreconocidas en 0.1mg de veneno. Abreviaturas. 3FTX: three finger toxins. PLA₂: phospholipase A₂. PIII-SVMP: snake venom metalloproteinase de tipo III. CRISP: cysteine-rich secretory protein. LAAO: L-amino acid oxidase. PDE fosfodiesterasa.

Figura 22: Ensayo de inmunoafinidad CNBr Control Matriz vs *Naja annulifera*. Panel A: veneno total 0.1mg. Panel B: fracción de proteínas inmunoreconocidas en 0.1mg de veneno. Panel C: fracción de proteínas no inmunoreconocidas en 0.1mg de veneno. Abreviaturas. 3FTX: three finger toxins. PLA₂: phospholipase A₂. PIII-SVMP: snake venom metalloproteinase de tipo III. CRISP: cysteine-rich secretory protein. LAAO: L-amino acid oxidase. PDE fosfodiesterasa.

Índice de tablas.

Tabla 1: Rendimiento del veneno en serpientes de 4 tamaños diferentes de la especie *B. irregularis* (Mackessy *et al.*, 2006).

Tabla 2: Identificación de las proteínas contenidas en los picos de la Figura 16 analizados por espectrometría de masas. Para cada proteína se determinó la relación masa/carga y la carga del pico monoisotópico y la masa total de la proteína sin reducir. Se calculó la masa de las proteínas reducidas para identificarlas mediante comparación con una base de datos de secuencias deducidas de un análisis del transcriptoma de la glándula del veneno de un adulto de *B. irregularis* (datos no publicados).

Abreviaturas utilizadas.

3FTXs: three finger toxins.

PLA₂: phospholipase A₂.

SVMP: snake venom metalloproteinase.

CRISP: cysteine-rich secretory protein.

LAAO: L-amino acid oxidase.

VNGF: venom neural growth factor.

PDE: fosfodiesterasa.

LD50: dosis letal media.

m/z: relación masa carga.

Z: carga.

M: masa.

1. Introducción.

1.1. Serpientes.

Las serpientes son organismos que pertenecen al reino Animalia, filo Chordata, clase Reptila, orden Squamata y suborden Serpentes. Hoy en día, existen alrededor de 3500 especies de serpientes (Figuroa *et al.*, 2016) que se encuentran distribuidas casi por todo el mundo, incluido océanos, exceptuando algunas islas, ambientes helados y elevadas altitudes. Las especies actuales de serpientes pueden agruparse en 8 superfamilias (clades), 26 familias y unos 400 géneros. En la superfamilia Colubroidea (Figura 1), que incluye a la mayor parte de las serpientes existentes actualmente, se encuentran 9 familias diferentes de entre las que destacan las familias Colubridae (857 especies), Elapidae (356 especies; donde se encuentran cobras, mambas y corales) y Viperidae (329 especies; serpientes de cascabel, 'lance-headed pit vipers' -serpientes crotalinas o víboras de fosea con cabeza de flecha- y víboras) (REPTILE DATABASE, 1995).

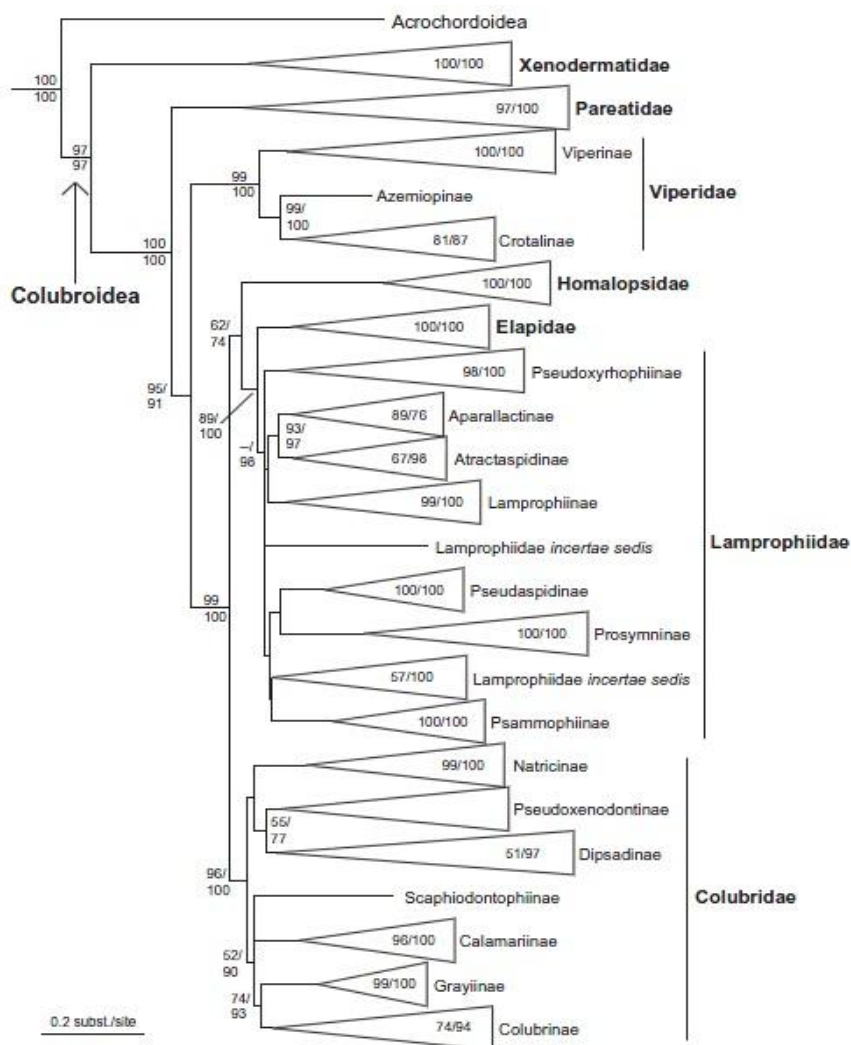


Figura 1: Árbol filogenético de la familia Colubroidea (Pyron *et al.*, 2011).

La mayoría de serpientes que existen pertenecen a la familia Colubridae, que no suelen clasificarse como venenosas para los humanos. De las 600 especies de serpientes venenosas existentes (REPTILE DATABASE, 1995), el mayor porcentaje pertenecen a las familias Viperidae y Elapidae, sin embargo, se ha demostrado que el veneno que producen algunas especies de colúbridos a veces presenta efectos clínicos significativos, incluso mortales, en humanos (Weinstein *et al.*, 2013).

La localización de las especies de serpientes venenosas a lo largo del mundo no es homogénea; se concentra en zonas tropicales y subtropicales de Asia, Australia, América y África. Los casos más graves de envenenamiento por mordedura de serpiente son producidos por serpientes de la familia Elapidae y de la familia Viperidae. Las especies responsables de la mayoría de mordeduras son *Echis sp.* en el norte de África (Warrell, 1995), *Bothrops asper* y *Bothrops atrox* en América central y SurAmérica (vipéridos) (Fan y Cardoso, 1995) *Naja sp.* y *Bungarus sp.* en Asia (elápidos)(Warrell, 1995) (Gutiérrez *et al.*, 2006), *Acanthopis*, *Notechis*, *Pseudechis*, *Pseudonaja* y *Oxyuranus* en Australia (Jackson *et al.*, 2013) (Figura 2).

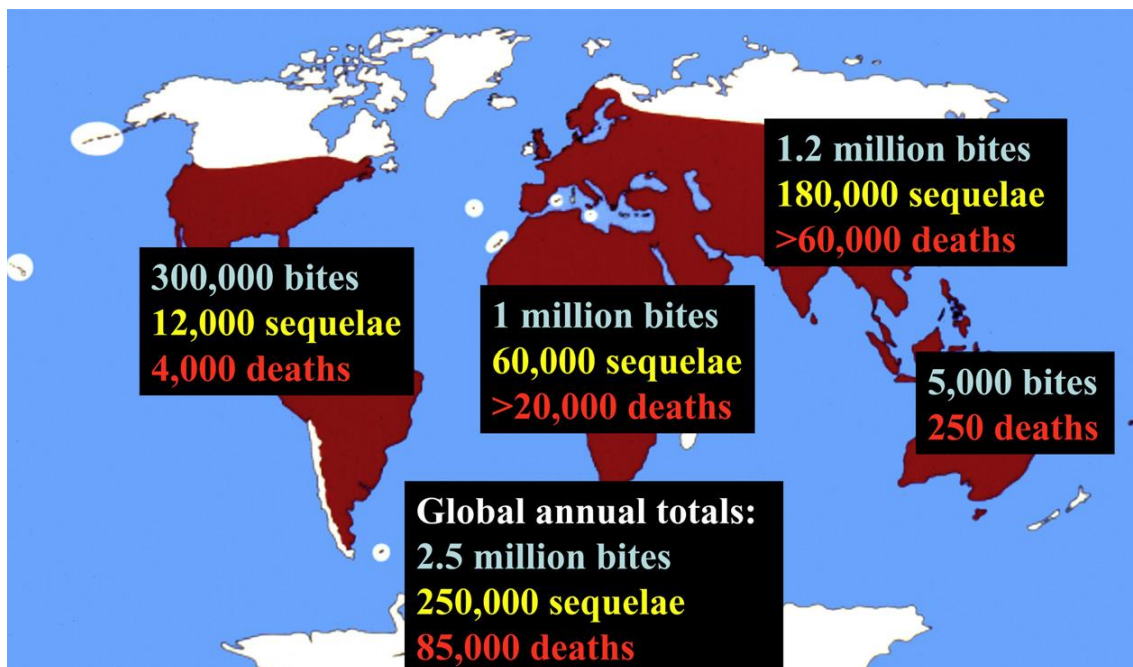


Figura 2: Distribución de los envenenamientos de serpiente y la mortalidad que provocan en todo el mundo (Gutiérrez *et al.*, 2010).

En cuanto a la producción del veneno, las serpientes poseen la glándula de veneno que es la encargada de sintetizar las toxinas y también poseen aparato inoculador y por tanto tendrán la capacidad de inyectar el veneno a su presa. Al morder a la presa, el veneno se introduce a través de los colmillos y según la posición de estos en el maxilar, es posible realizar una clasificación de las serpientes (Figura 3). Se denominan aglifas a las serpientes que tienen colmillos cortos por lo que no pueden inyectar su veneno. Las opistoglifas tienen sus colmillos en la parte posterior de la mandíbula. Las proteroglifas y solenoglifas tienen un mecanismo de acción más complejo: las proteroglifas tienen sus colmillos fijos en la parte anterior y están recubiertos por una membrana que está conectada directamente a la glándula de veneno para poder inyectar el veneno; las solenoglifas son las serpientes más especializadas porque poseen músculos capaces de mover los colmillos para colocarlos en posición de ataque al abrir

la boca y porque la glándula del veneno comunica con el exterior a través de un canal interno de los colmillos, de ahí que cuando muerden el mecanismo es parecido al de una aguja de inyección (Vonk *et al.*, 2008).

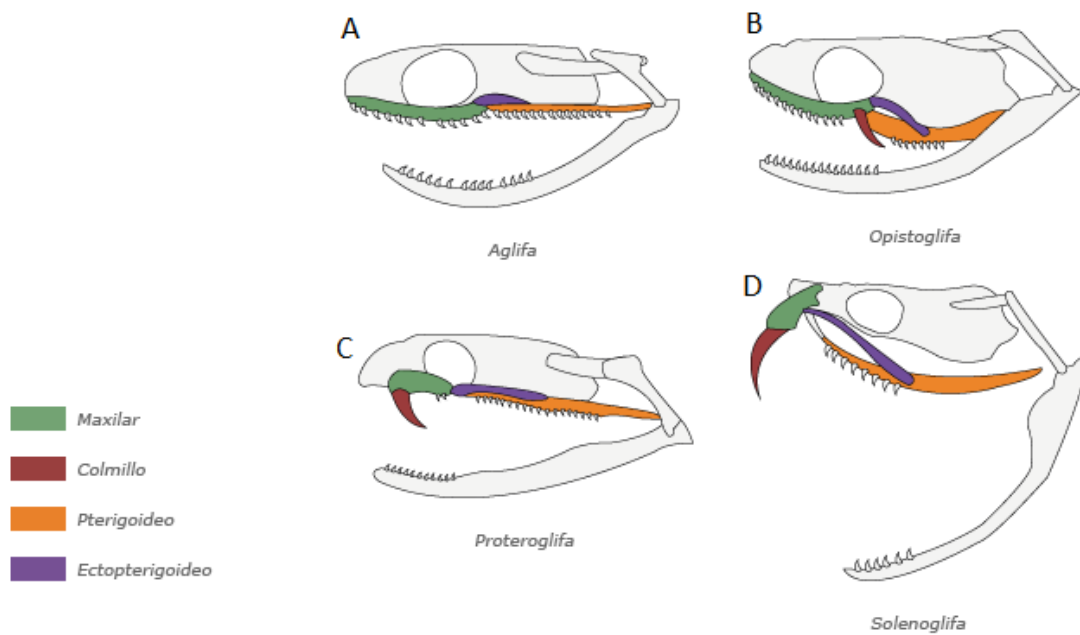


Figura 3: Tipos de serpientes según su dentición. A: aglifa. B: opistoglifa. C: proteroglifa. D: solenoglifa (Bauchot *et al.*, 2005).

De las serpientes consideradas venenosas, se clasifica a elápidos como proteroglifos y a vipéridos como solenoglifos. La mayor parte de los colúbridos son inofensivos, es decir, aglifas ya que su saliva no es lo suficientemente tóxica como para suponer un peligro para la presa que ha sido mordida. En cambio, algunos colúbridos sí que tienen aparato inoculador y son capaces de inyectar veneno en su presa, por tanto son opistoglifos (Juárez, 2007).

1.2. Veneno: composición y sintomatología.

El veneno se define como ‘sustancia que daña la salud, produce graves alteraciones funcionales o incluso puede provocar la muerte al ser ingerida, absorbida o inhalada por el organismo en cantidades pequeñas’ (ENCICLOPEDIA SALUD). En el reino animal, el veneno se utiliza con finalidad defensiva y con propósitos predatorios (Calvete, 2017). Los organismos venenosos están ampliamente distribuidos a lo largo de la Tierra y se encuentran representados en muchos taxones. Los animales terrestres más conocidos productores de veneno son las serpientes. Los venenos animales son mezclas complejas, en su mayoría de proteínas y péptidos, y su composición depende de cada especie. La toxicidad se consigue incluso a pequeñas dosis, pudiendo causar numerosos desórdenes e incluso la muerte de la presa (Utkin, 2015).

Composición del veneno.

El veneno de serpiente es una solución acuosa de naturaleza proteica y peptídica mayoritariamente, aunque también presenta pequeñas moléculas orgánicas e iones inorgánicos. Las toxinas del veneno tienen especificidad por una gran cantidad de receptores

en los tejidos (Warrell, 2010), por lo que provocan alteraciones en la homeostasis y en los sistemas muscular y nervioso (Utkin, 2015).

A la hora de analizar la composición de los venenos de las diferentes familias de serpientes, se realiza la distinción entre los elápidos y los vipéridos. El veneno de las serpientes elápidas tiene carácter neurotóxico, por tanto las neurotoxinas son las protagonistas. El veneno de las serpientes vipéridas tiene fundamentalmente carácter hemorrágico y miotóxico. Entre las familias de proteínas que componen los venenos se encuentran 3FTXs (three finger toxins), PLA₂ (phospholipase A₂), SVMP (snake venom metalloproteinase), CRISP (cysteine-rich secretory protein), LAAO (L-amino acid oxidase), factores de crecimiento como por ejemplo VNGF (venom neural growth factor), Kunitz (Kunitz-type serine protease inhibitors), PDE (fosfodiesterasas), 5'-nucleotidasas, alcalinas fosfomonoesterasas, hialuronidasas, lectinas tipo C, disintegrinas, miotoxinas, péptidos pequeños y pequeños compuestos orgánicos (purinas, pirimidinas y citrato) entre otros (Mackessy, 2008). Si bien debido a sus actividades biológicas se les atribuye el papel de toxinas, cabe destacar que los ortólogos de estas proteínas también desempeñan funciones importantes en los mamíferos: participando en la transducción de señales y en el mantenimiento de las membranas celulares (Six y Dennis, 2000). Algunas familias de proteínas (toxinas) que podemos destacar son:

Las **3FTXs** son una superfamilia de polipéptidos no enzimáticos (60-74 aminoácidos) que se caracterizan por tener una estructura conservada en todas las proteínas de esta familia, compuesta por tres bucles que contienen cuatro puentes disulfuro, lo que origina la estructura característica de tres dedos. Esta familia está integrada por proteínas entre las que realizan una gran variedad de funciones, como por ejemplo neurotoxinas, cardiotoxinas o dendrotoxinas (Kini y Doley, 2010).

Las **PLA₂** son proteínas cuya acción produce efectos neurotóxicos, miotóxicos y además reduce la activación plaquetaria. Hay diferentes tipos de PLA₂ dependiendo del aminoácido que se encuentre en la posición 49, cerca del centro activo donde se une el Ca²⁺ (Mackessy, 2008).

Las **SVMPs** son una familia de proteínas dependientes de Zn²⁺ causantes de la degradación de componentes de la matriz extracelular de las células endoteliales de los capilares. La acción de las SVMPs provoca un daño estructural principalmente a nivel de la membrana basal de los capilares de los vasos sanguíneos (Gutiérrez *et al.*, 2016). Esta degradación provoca la salida de sangre al exterior; es por eso que a las SVMP se les atribuye el papel de toxinas hemorrágicas. Todas las proteínas de esta familia contribuyen a la alteración de la homeostasis en la presa pero pueden hacerlo mediante diversos mecanismos: hemorragia, inflamación, apoptosis o inhibición plaquetaria (Markland y Swenson, 2013). Atendiendo a su estructura, las metaloproteinasas pueden clasificarse en tres tipos: PI, PII y PIII. Las metaloproteinasas de tipo PI (20-30 kDa) tienen un único dominio y baja actividad hemorrágica. Las PII (30-60 kDa) tienen un dominio metaloproteinasas similar al de las PI pero las PII en el extremo C-terminal presentan un dominio desintegrina. El procesamiento proteolítico de las PII libera las desintegrinas, que actúan inhibiendo la interacción de la integrina con su ligando. Las PIII (60-100 kDa) son las toxinas que tienen una mayor actividad hemorrágica (Takeda *et al.*, 2012). Estas presentan 3 dominios: dominio metaloproteinasas, dominio desintegrina y un dominio rico en cisteína (Calvete *et al.*, 2003). Las **disintegrinas**, como se ha mencionado anteriormente,

proceden del procesamiento de las metaloproteinasas de tipo PII. Presentan actividad inhibitoria de las integrinas porque muchas de ellas contienen el tripéptido RGD, que es el que las integrinas reconocen para desencadenar una respuesta de señalización (Carbajo *et al.*, 2015). Si las integrinas, en lugar de reconocer los residuos RGD de las moléculas adecuadas, reconocen los de las desintegrinas, no podrán desempeñar su función.

Sintomatología del envenenamiento.

Las dos familias principales de serpientes venenosas son la familia Elapidae y Viperidae, pero sin olvidar a los colúbridos. Los venenos de serpiente pueden clasificarse, según los efectos que provocan en el organismo, como hemorrágicos o neurotóxicos (Warrell, 2010).

El veneno de las serpientes de la familia Elapidae se caracteriza por su carácter neurotóxico; estas neurotoxinas producen efectos tanto pre- como post-sinapsis en las uniones neuromusculares. La interferencia de estas toxinas provoca parálisis progresiva descendente que, en el caso de que llegue a afectar a los músculos respiratorios y bulbares, puede poner en riesgo la vida. A pesar de la predominancia de la neurotoxicidad como característica principal de los venenos de la familia Elapidae (Jackson *et al.*, 2016), muchas serpientes pertenecientes a esta familia como algunas cobras (cobras escupidoras cobras asiáticas) también presentan otras toxinas no neurotóxicas que desencadenaran efectos de carácter hemorrágico (fosfolipasas A y metaloproteinasas dependientes de zinc) (Gutiérrez y Rucavado, 2000).

En cuanto al veneno de la familia Viperidae, presenta generalmente carácter hemorrágico (Sajevic *et al.*, 2011). Por tanto, cuando estas toxinas se introducen en el organismo de la presa producen hemorragia en diversos tejidos. También se caracteriza por provocar destrucción y necrosis del musculo esquelético. Por tanto, el veneno de la familia Viperidae provoca efectos tanto a nivel local como sistémico, lo que supone una amenaza para la vida del organismo que ha sido envenenado. Los efectos sistémicos provocan fallos a nivel de reparación tisular, en el sistema homeostático y en la cascada de coagulación. También implican defibrinogenización, vasodilatación y shock cardiovascular así como efectos directos en el miocardio. Ya que existe una gran complejidad a nivel de proteoma en los venenos de serpientes, hay muchos efectos clínicos que difieren de esta patología general; como por ejemplo fallos agudos renales y dificultad respiratoria aguda. Como consecuencia de esto, si la ayuda sanitaria se retrasa o no se consigue llegar a un hospital con cierta celeridad, los daños producidos en los tejidos suponen una minusvalía permanente (amputación de miembros) y si las toxinas interfieren con el funcionamiento de los órganos vitales, la muerte (Gutiérrez *et al.*, 2016).

No hay que caer en el error de no considerar peligrosos a los colúbridos. Si bien, por lo general, no son mortíferos para los humanos, existen excepciones y casos en los que la mordedura de ciertas especies de colúbridos ha sido letal. Dado que no son la familia más peligrosa por el simple hecho de que los mayores casos de envenenamientos corren a cargo de elápidos y vipéridos, y que por lo general no es posible obtener los venenos de colúbridos en grandes cantidades, han caído en el olvido. Por lo que el hecho de que no causen consecuencias en los humanos unido a su difícil recolección, han provocado el gran desconocimiento que existe sobre los venenos de la familia Colubridae (Saviola *et al.*, 2014). Poco a poco hasy más grupos que se están interesando en caracterizarlos.

La relevancia a nivel médico que puede tener el veneno de la mayoría de serpientes de esta familia todavía no se conoce, pero se sabe que al menos cinco especies han sido causantes de consecuencias letales en humanos (Weinstein *et al.*, 2013). Una de ellas, *Dispholidus typus*, causó la muerte de un famoso herpetólogo que no tuvo la precaución de considerar a esta especie peligrosa. Los síntomas que provocaron las toxinas presentes en el veneno de Boomslang (*D. typus*) fueron recopilados por el propio herpetólogo que se negó a ser tratado para que su trabajo fuera totalmente realista. El veneno provocó la muerte debido a hemorragias internas en ojos, pulmones, riñones, corazón y cerebro en las 24 horas siguientes a la mordedura (Pla *et al.*, 2017). Hoy en día, la boomslang está considerada como una de las especies africanas más mortíferas. Se han descrito los síntomas que provocan las toxinas de su veneno que, por lo general, interfieren con los mecanismos de coagulación a nivel del fibrinógeno, provocando que la persona afectada se desangre hasta morir. A nivel de proteínas del veneno de colúbridos, existe variación entre los distintos géneros. En el veneno de *D. typus* destacan las SVMP de tipo PIII, también 3FTX, PLA₂, CRISP y SVSP pero en menor proporción (Pla *et al.*, 2017), en cambio al comparar con el veneno de especies del género *Thelotornis* (colúbridos) se vio que los últimos mostraban mayor actividad de metaloproteasas y fosfolipasas y menor de serinproteasas. Dado que a nivel de síntomas se vio que los venenos de *Thelotornis* y *D. typus* eran clínicamente idénticos, se pensó que las toxinas responsables podrían ser las mismas ya que la composición del veneno de *Thelotornis* no se conoce todavía. Pero en la práctica se ha visto que los antivenenos hechos frente a *D. typus* son inefectivos a la hora de reconocer el veneno de *Thelotornis* (Weinstein *et al.*, 2013).

El veneno de colúbridos presenta especificidad de taxón dependiendo de la presa que haya sido mordida y en función de esto, sus toxinas podrán ser procoagulantes o anticoagulantes. En el caso de las especies mencionadas anteriormente (*D. typus* y especies del género *Thelotornis*), el veneno presenta carácter procoagulante cuando tiene como finalidad inmovilizar a la presa para que sea incapaz de huir o defenderse. Como sucede con pájaros o lagartos, las toxinas provocan la formación de coágulos a nivel de la circulación sanguínea; sin embargo, los humanos presentan un torrente sanguíneo con mucho mayor volumen, lo que provoca la dilución de las toxinas. Esta variación en la concentración es la causante de que las muertes en humanos se produzcan por hemorragias internas (Debono *et al.*, 2017).

1.3. El problema del envenenamiento ofídico.

El envenenamiento por mordedura de serpiente es un problema de salud pública a nivel mundial, al cual no se le ha prestado suficiente atención debido a que es una patología no infecciosa que afecta principalmente a personas que viven en zonas rurales de países subdesarrollados de África, Asia, Latinoamérica y zonas de Oceanía (Harrison *et al.*, 2009). Es por esto, por lo que la World Health Organization (WHO, Organización Mundial de la Salud) ha incluido el envenenamiento por mordedura de serpiente en su lista de enfermedades desatendidas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007).

Los primeros estudios realizados para conocer la incidencia de los envenenamientos por mordedura de serpiente a nivel mundial se realizaron basándose en la información proporcionada por los hospitales. A partir de estos datos obtenidos en diversos países, se extrapolaron los resultados y se estimaron unos valores anuales globales totales de 5.4

millones de mordeduras, de los cuales hubo 2.5 millones de casos de envenenamiento y alrededor de 125,000 víctimas mortales (Chippaux, 1998; Gutiérrez *et al.*, 2010). Al realizar cuestionarios en algunas regiones, se vio que tanto la incidencia, mortalidad y secuelas debidas a los envenenamientos eran mucho mayor que las sugeridas por las estadísticas. Esto se debe a que el estudio se basó en su mayoría en los registros de entrada de los hospitales y, dado que la mayoría de episodios se centran en zonas rurales de países tropicales en vías de desarrollo, las víctimas no tienen la opción de acudir a hospitales. De ahí que, en la mayoría de los casos, los afectados mueren o bien son tratados por los métodos tradicionales, no quedando constancia de ello. Encuestas mejor diseñadas a nivel poblacional, ofrecen unos resultados más precisos y alarmantes de la incidencia de mordeduras, tasa de morbilidad y tasa de mortalidad. En Asia, la mayor tasa de mortalidad recogida es de 162 muertes por mordeduras por cada 100000 habitantes al año, en el este de Terai (Nepal) (Sharma *et al.*, 2004). En África, los mayores valores son 497 mordeduras por cada 100000 habitantes al año, lo que supone una tasa de mortalidad del 12.2%, que corresponde a la región de Benue Valley (noreste de Nigeria) (Warrell y Arnett, 1976).

1.4. Generación de antivenenos.

El único tratamiento posible conocido hasta el momento para los envenenamientos por mordedura de serpiente es la administración de un antiveneno. Los antivenenos se producen y comercializan tanto a nivel público como a nivel privado, según los intereses que estén en juego y el país. Algunas regiones o países como Europa, EEUU, Brasil, México, Australia o Japón, (Gutiérrez *et al.*, 2010) fabrican antivenenos en cantidades suficientes como para autoabastecerse y abastecer a otros países. En cambio, los países o regiones más perjudicados vuelven a ser los que se encuentran en vías de desarrollo. Algunas zonas de América Latina, Asia, Papúa Nueva Guinea, Sri Lanka o África (especialmente de África subsahariana) no cuentan con las instalaciones adecuadas para la producción de antivenenos, tienen personal poco especializado y se ven envueltos en la necesidad de mejorar tanto sus técnicas como sus productos. Lo más común en estas regiones es que ni siquiera cuentan con instalaciones propias, por lo que los suministros se obtienen de otros países, de forma que estas regiones no depende de sí mismas. Lo que ha venido a suceder en el pasado es que los productores de otras regiones que se encargaban de fabricar antivenenos para las regiones con menos recursos, fueron reduciendo la producción debido a restricciones económicas y a la presión ejercida por parte de los accionistas cuando estas empresas entraron en el sector privado (Theakston y Warrell, 2000). Por tanto, urge la necesidad de seguir investigando y mejorando en el campo del desarrollo de los antivenenos para poder vencer estas barreras y conseguir que los más desfavorecidos puedan tener acceso a curar y tratamientos en la misma medida, o parecida, que el primer mundo (Williams *et al.*, 2011).

Los antivenenos se producen a nivel de laboratorio y la técnica ha ido evolucionando y mejorándose desde sus inicios en 1895 a cargo del Dr. Calmette (Hawgood, 1999). El proceso de inmunización con los denominados antivenenos de primera generación consistía en inyectar directamente en el individuo el suero extraído de los animales a los que se les había inoculado el veneno (Pla *et al.*, 2012). Por tanto, no solo se introducían IgGs frente a las proteínas del veneno, sino demás anticuerpos y componentes del plasma que el animal genera. Estas demás sustancias provocaban rechazo por parte del paciente. Los antivenenos

de segunda generación consisten en moléculas completas de IgG purificadas o productos de éstas después de sufrir una digestión enzimática. Si la digestión se realiza con pepsina los productos son Fab'2, si se realiza con papaína son Fab (Lalloo y Theakston, 2003). Los antivenenos de segunda generación se desarrollaron de cara a reducir la incidencia y severidad de las reacciones adversas asociadas al inyectar el suero crudo extraído del animal en la de primera generación (WHO, 2010).

Hay que tener en cuenta que la naturaleza de los antígenos usados para generar los anticuerpos varía según la especie de serpiente. Es aquí donde reside la complejidad y dificultad a la hora de producir un antiveneno que sea eficaz contra serpientes de regiones diferentes, ya que esta variación geográfica intraespecies (Warrell, 1997) puede ser lo suficientemente notoria como para afectar a la efectividad clínica de los antivenenos.

Hoy en día la tendencia es desarrollar antivenenos poliespecíficos polivalentes que neutralicen la mayor parte de los venenos de serpientes de una región determinada. De esta forma se intenta conseguir una mezcla de antiveneno en lugar de conseguir uno específico para cada especie de cada región. Esto se hace a partir del diseño de mezclas de veneno para realizar la inmunización de los animales a los que posteriormente se les extraerá el suero o juntando sueros de animales inmunizados con diferentes venenos. Por tanto, el avance en la tecnología de la producción de los antivenenos reside en varios aspectos que van desde la inyección del veneno (del cual es necesaria una mejora en la caracterización) hasta la producción final del antiveneno.

Como se ha dicho antes, el punto de partida para lograr estos avances es el correcto diseño de la mezcla de veneno, para lo que hay que prestar especial atención a la composición de los venenos. A la hora de seleccionar qué venenos se van a utilizar para la mezcla, es necesario identificar taxonómicamente las serpientes cuya mordedura provoca problemas más graves en cada región. Es importante evaluar experimentalmente la reactividad cruzada que podría existir entre los componentes de los diferentes venenos ya que es posible que si se utilizan serpientes de taxones cercanos, sus antígenos compartan epítomos comunes por lo que existirían efectos sinérgicos en la inmunización (Gutiérrez *et al.*, 2010).

Otra forma de abordar esta cuestión sería plantearse si es posible obtener fácilmente los venenos de las serpientes más mortíferas en cantidades suficientes. En este caso sería interesante comprobar si los anticuerpos generados frente a venenos más accesibles tienen la capacidad de reconocer a los primeros. Es decir, habría que determinar si ambos venenos comparten proteínas de la misma familia y, en caso afirmativo, si los anticuerpos generados contra estas proteínas de un veneno reconocerían los epítomos de las del otro veneno.

1.5. Antivenómica.

La antivenómica es una técnica proteómica desarrollada para el análisis a nivel cualitativo y cuantitativo de la inmunoreactividad de los antivenenos (Calvete *et al.*, 2009). A lo largo del tiempo, ha ido perfeccionándose para lograr un mejor análisis de cada uno de los componentes del veneno. La antivenómica de primera generación (Lomonte *et al.*, 2008) consistía en incubar el veneno con los anticuerpos para que inmunoprecipitase al añadir un anticuerpo secundario. De esta forma, los complejos antígeno anticuerpo contendrían las

toxinas que sí que son reconocidas, quedando en el sobrenadante las que el antiveneno no era capaz de reconocer o frente a las que se producían menos anticuerpos. La limitación de esta técnica era que solo lo no reconocido podía analizarse mediante RP-HPLC. La antivenómica de segunda generación (Pla *et al.*, 2012) consiguió mejorar esta limitación mediante la utilización de columnas de inmunoafinidad. En las columnas se acopla el anticuerpo a la matriz y, tras incubarse con el veneno, es posible obtener tanto las fracciones reconocidas como las que no, para que después sean analizadas y cuantificadas mediante RP-HPLC y espectrometría de masas. Esta segunda generación de antivenómica supuso la posibilidad de obtener un perfil de todas aquellas proteínas que contiene un veneno, bien sean reconocidas por un antiveneno o bien pasen desapercibidas frente a él (Pla *et al.*, 2012).

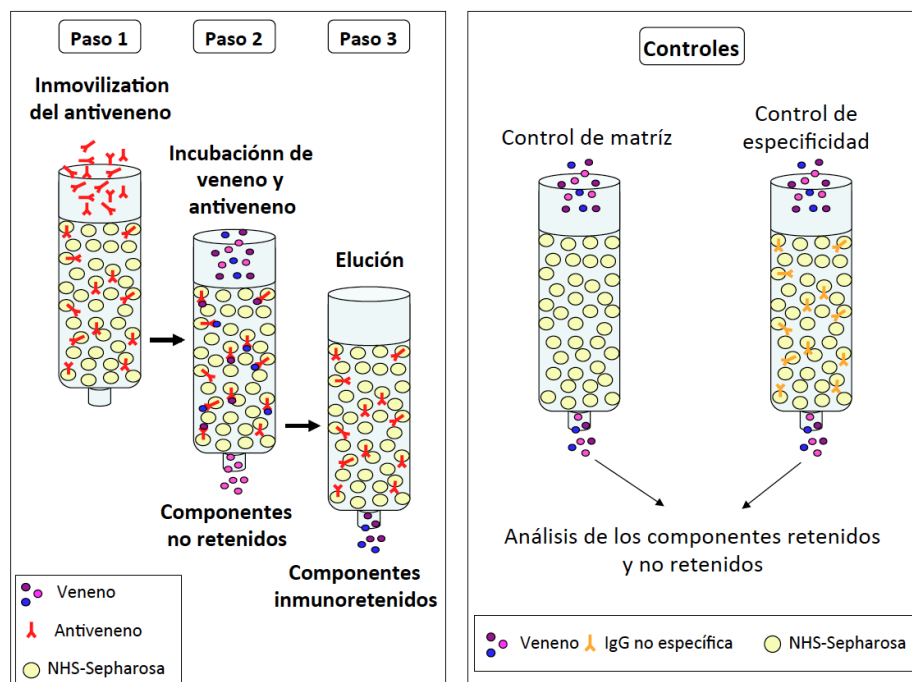


Figura 4: Diagrama de la antivenómica de segunda generación. El antiveneno a analizar es inmovilizado en la columna y posteriormente se realiza la incubación con el veneno para obtener la fracción de proteínas inmunoreconocidas y no inmunoreconocidas. En paralelo se realizan los controles de matriz y de especificidad para descartar posibles uniones inespecíficas (Biotox, 2015).

1.6. *Boiga irregularis*.

Boiga irregularis, también conocida como 'brown treesnake', es un colúbrido nocturno y arbóreo propio del norte y este de Australia, Nueva Guinea y las Islas Solomon, que poco a poco fue colonizando otras regiones de Hawaii y algunas islas del pacífico, en especial Guam. La población de *B. irregularis* en Guam se sospecha que supera el millón de ejemplares (Fritts, 1988) y que está acabando con especies indígenas de pájaros, murciélagos y lagartos (Wiles, 1987). Precisamente, su dieta se basa principalmente en estos animales aunque se han observado diferencias según la etapa del desarrollo en el que se encuentre la serpiente: los individuos juveniles y neonatos se alimentan de lagartos y los adultos incorporan a su dieta pájaros, pequeños mamíferos y ranas (Savidge, 1988). Estos cambios en la dieta están a menudo acompañados por un cambio en la cantidad y composición del veneno (Mackessy *et al.*, 2006). Al analizar el rendimiento del veneno extraído a serpientes de diferentes tamaños

de *B. irregularis* se pudo observar un volumen creciente acompañado de un mayor porcentaje proteico a medida que aumentaba el tamaño de la serpiente (Tabla 1).

Tabla 1: Rendimiento del veneno en serpientes de 4 tamaños diferentes de la especie *B. irregularis* (Mackessy et al., 2006).

| Size class (N) | Snout-Vent length (mm) | Snake mass (g) | Venom volume (µl) | Venom mass (mg) | Percent protein |
|------------------|------------------------|----------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| Neonate (9) | 461.4 ± 102.7 | 16.0 ± 5 | 20.6 ± 5.0 | 0.7 ± 0.19 | 47.5 ± 5.7 |
| Juvenile (6) | 909.0 ± 130.6 | 102.7 ± 45.4 | 92.2 ± 47.7 | 2.2 ± 0.14 | 74.9 ± 3.2 |
| Adult (17) | 1200.9 ± 97.4 | 284.6 ± 67.4 | 204.4 ± 89.7 | 10.2 ± 6.8 | 80.5 ± 8.1 |
| Large adult (20) | 1844.8 ± 232.8 | 1166.7 ± 319.2 | 517.5 ± 184.1 | 19.2 ± 3.0 | 90.2 ± 15.4 |

A pesar de que las serpientes de esta especie son menos peligrosas para los humanos, una serpiente adulta de gran tamaño podría producir cantidad de veneno suficiente para provocar un envenenamiento grave. Las mordeduras de *B. irregularis* están siendo cada vez más frecuentes y al observar la clínica de los casos, sugiere que el veneno provoca neurotoxicidad, pérdida de la coordinación, distrofia respiratoria y disminución del ritmo cardiaco; indicando que el veneno puede tener efectos sistémicos (Fritts y McCoid, 1999). Pero el veneno de *B. irregularis* es curioso puesto que es un veneno muy especializado en la presa y en mamíferos no produce los efectos anteriormente mencionados (Mackessy et al., 2006).

Siempre se ha especulado acerca de si las serpientes presentarían o no resistencia a su propio veneno. En relación a esto, se presenta a modo curiosidad, un caso muy reciente de auto-envenenamiento de *B. irregularis*. En Queensland (Australia) se llevó al veterinario a una serpiente que había quedado atrapada en una ratonera para que la curasen. Durante el manejo de la serpiente se le sujetó la cabeza firmemente para evitar incidencias y cuando la cola pasó por delante de su boca, se auto-mordió repetidas veces durante 10 segundos. La serpiente mostró pérdida de respuesta y de sensibilidad hasta que finalmente murió 12 horas después de la mordedura. Por tanto, se concluyó así, que el veneno de *B. irregularis* posee carácter neurotóxico frente a *B. irregularis* y que por tanto, esta especie podría no ser inmune a su propio veneno (Hill y McKillop, 2017).



Figura 5: *Boiga irregularis* neonato (O'Brian, 2017).

2. Objetivo

Como se ha mencionado anteriormente, el veneno de *B. irregularis* es un veneno que presenta una proporción muy elevada de 3FTx (McGivern *et al.*, 2014) y que además se caracteriza por estar muy focalizado al tipo de presa de esta serpiente, no siendo letal en mamíferos. En general, los elápidos también presentan una elevada concentración de 3FTx, lo que provoca efectos de carácter neurotóxico en la presa. En la generación de antivenenos frente a elápidos neurotóxicos se utilizan las especies problema, pero debido a la baja LD50 (dosis letal media, en mg ven/kg de animal; ej: 0.093 mg/kg para *Naja melanoleuca* vs 1.333 mg/kg de una serpiente de cascabel como es *Crotalus adamanteus*) que suelen presentar estas especies, no se puede añadir un cantidad muy elevada a la mezcla de inmunización sin que resulte perjudicial para el animal. En base a esto, en el laboratorio se planteó la hipótesis de utilizar un veneno rico en 3FTx y no tóxico para mamíferos, como es el de *B. irregularis* para inmunizar a los caballos, pudiendo utilizar una mayor concentración de veneno y en consecuencia generar una mayor respuesta inmunológica. Con esta hipótesis, los objetivos de este proyecto son:

- Caracterizar un antiveneno experimental generado frente a *B. irregularis*.
- Caracterizar la reactividad cruzada con elápidos del antiveneno hecho frente a *B. irregularis*.

Cabe matizar, que la generación del antiveneno fue hecha previamente a este trabajo.

3. Materiales y métodos.

3.1 Materiales

3.1.1 Venenos y antiveneno.

Los venenos que se utilizaron para la realización de este trabajo fueron:

- Veneno de *Boiga irregularis* adulto y neonato, procedentes de Guam (USA) y en formato de liofilizado.
- Veneno de *Naja haje* Egipto, procedente del animalario del LSTM (Liverpool School of Tropical Medicine).
- Veneno de *Naja melanoleuca* Uganda de LATOXAN (845 Avenue Pierre Brossolette, 26800 Portes-lès-Valence, Francia).
- Veneno de *Naja annulifera* de LATOXAN.

El antiveneno utilizado fue:

- Antiveneno experimental generado previamente en el laboratorio inmunizando conejos frente al veneno de *Boiga irregularis* adulto.

3.2. Métodos

3.2.1 Antivenómica.

Preparación de las columnas de inmunoafinidad.

Las columnas de inmunoafinidad se prepararon utilizando una matriz de CNBr-Activated Sepharose 4B (GE Healthcare; 17-0430-01). La matriz viene en un formato de matriz deshidratada por lo que primero se hidrataron 0.7g de matriz en 5 ml de 1mM HCl y posteriormente se empaquetó en una columna, quedando un volumen final de matriz hidratada de 3ml. Se lavó la columna con 10-15 volúmenes de columna (3ml) de 1mM HCl y seguidamente se equilibró con 3 volúmenes de columna de tampón de acoplamiento (0.2 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 8.3).

Por otro lado, se solubilizaron 70 mg del antiveneno frente a *B. irregularis* adulto en 4 ml de tampón de acoplamiento. Se determinó la concentración de proteína midiendo la absorbancia a 280nm en el espectrofotómetro y aplicando la ley de Lambert-Beer (ecuación 1).

$$A = \varepsilon * c * l$$

Ecuación 1: Ecuación de Lambert-Beer donde A es absorbancia, ε es el coeficiente de extinción molar y l la longitud de la celda (1 cm).

Se incubaron finalmente 60 mg de antiveneno con la matriz durante 4 horas a temperatura ambiente en una noria. Tras la incubación, se realizaron lavados de la matriz con tampón de bloqueo y se midió la A₂₈₀ hasta que la absorbancia fue menor de 0.005. Se determinó la concentración de anticuerpo unido a la columna midiendo la absorbancia a 280nm de los lavados. Se calculó que se habían acoplado 48 mg de anticuerpo, lo que supuso una concentración de 16 mg/ml.

La columna se dejó bloqueando (para que se bloquearan los sitios reactivos no utilizados en el acoplamiento del antiveneno) con 5ml de tampón de bloqueo (0.1M Tris-HCl, pH 8.0) en la noria a 4°C durante toda la noche. Se lavó la columna alternando pH alto y pH bajo, usando 3 volúmenes de columna de tampón acetato 0.1M (NaCl 0.5M, pH 4-5) y 3 volúmenes de columna Tris-HCl 0.1M (pH 8.5) durante 6 ciclos. Para guardar la matriz hasta su uso, se lavó con 4 volúmenes de columna de PBS (Phosphate Bicarbonate Solution) y se guardó en PBS+20% etanol.

Ensayo de inmunoafinidad

A partir de la matriz de inmunoafinidad generada se prepararon columnas con la matriz equivalente a 5 mg de anticuerpo acoplado, esto correspondería a 315µl de la matriz de partida. Se añadieron 0.1 mg (ó 0.05-0.075-0.15 mg en el ensayo de concentración dependiente) del veneno de *B. irregularis* adulto o neonato, resuspendido en PBS y se incubó en la noria durante 4 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se recogieron fracciones de no retenido y eluido. Para la fracción acuñada “fracción de no retenido”, se lavó la columna con 4 volúmenes de PBS y se juntaron el volumen de veneno incubado y los 2 primeros lavados de PBS, que es donde se concentran más del 90% de las proteínas no inmunoreconocidas. Tras lavar la columna, se eluyó con 5 volúmenes de columna de tampón de elución (0.1 M glicina-HCl, pH 2.0). La fracción de eluido corresponde a los 3 volúmenes de columna iniciales de tampón de elución que fueron neutralizados con 10x de tampón de neutralización (1M Tris-HCl, pH 9.0). Ambas fracciones se concentraron en un sistema de centrifugación a vacío Savant™ SpeedVac™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA) hasta un volumen de 40µl, que es el volumen máximo que permite cargar el sistema automático del HPLC. Tanto las fracciones no retenida como retenida, así como 100µg del veneno total se analizaron por HPLC de fase reversa usando un cromatógrafo Agilent LC 1100 High Pressure Gradient System (Santa Clara, CA, USA) equipado con una columna Discovery® BIO Wide Pore C₁₈ (15 cm x 2.1 mm, con un tamaño de partícula de 3 µm y un tamaño de poro de 300 Å), un detector DAD y un micro-auto-muestreador. El flujo se estableció en 0.4ml/min con un gradiente de concentración lineal de 0.1% TFA en agua MilliQ® (Merck-Millipore, Darmstadt, Alemania) (solución A) y de 0.1% TFA en acetonitrilo (solución B), isocrática (5% B) durante 1 min, seguida por 5-25% B durante 5 min, 25-45% B durante 35 min, y 45-70% B durante 5 min. La detección proteica se monitorizó a 215 nm y a 400 nm como longitud de onda de referencia (Pla *et al.*, 2017).

En paralelo a la columna de afinidad se realizó un control donde se utilizó la matriz sin anticuerpo unido, incubando con 0.1 mg de veneno. De este modo se pueden descartar posibles uniones inespecíficas.

3.2.2 Western-Blot.

Electroforesis

Las fracciones del veneno fueron analizadas en geles de poliacrilamida del 12% y del 14%, en condiciones no reductoras, mediante una electroforesis (SDS-PAGE). Previamente a cargar las muestras, se les añadió el tampón de carga concentrado al 4X y las muestras fueron calentadas a 100°C durante 5 minutos. La electroforesis se realizó en un sistema “protein Electrophoresis

System” de BioRad a un voltaje de 80V mientras la muestra avanzaba en el gel de apilamiento y se subió a 120V en el de resolución.

Tampón de electroforesis: 25mM Tris + 0.2M glicina + 0.1% SDS.

Tampón de carga: 1.250ml Tris 1M pH 6.8 + 5ml glicerol + 2ml SDS 20% + 0.8ml azul de bromofenol al 1% + 0.450ml agua; volumen total de 9.5ml.

Transferencia a membrana

La transferencia se realizó a una membrana de PVDF (polímero de polivinilidenedifluoruro) de Amersham™ Hybond™ 0.45µm (ref: 10600023) empleando un sistema semi-seco, por lo que hubo que activar la membrana con metanol. Se aplicó un voltaje de 200 mA durante dos horas. El bloqueo de los sitios reactivos de la membrana se realizó con leche desnatada al 5% en PBS a 4°C toda la noche. La incubación con el antiveneno hecho contra veneno de *Boiga irregularis* se hizo a una dilución 1:700 (en volumen) en leche desnatada al 5% en PBS, durante una hora a 37°C. Tras la incubación se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno de Tween 0.1% en PBS y seguidamente se incubaron las membranas con 1:1000 (en volumen) del anticuerpo secundario anti-IgGs de conejo (hecho en cabra) (A6154, Sigma Aldrich®) que lleva unido la enzima HRP (peroxidasa de rábano picante) durante 2 horas a temperatura ambiente. Previamente a la inmunodetección las membranas se lavaron de nuevo con 3 lavados de 5 minutos cada uno con Tween 0.1% en PBS y dos lavados de 5 minutos con PBS.

Como tampón de transferencia se utilizó 25mM Tris + 0.2M glicina + 0.1% SDS + 20% metanol.

Inmunodetección

La reacción de quimioluminiscencia se realizó utilizando el sistema Lumi-Light Western Blotting Substrate de Roche™ (ref: 12015200001), donde el anticuerpo secundario que lleva unido la enzima HRP cataliza la oxidación del sustrato Luminol, en presencia de peróxido de hidrógeno, generando luz. El revelado y análisis de la señal luminiscente se realizó mediante el sistema LAS 3000 (Fujifilm).

3.2.3. Identificación de las proteínas del veneno por espectrometría de masas (venómica).

Para el análisis de las masas moleculares de las proteínas no inmunoreconocidas por el anticuerpo de *B. irregularis* se utilizó un espectrómetro de masas híbrido de configuración nano UPLC-ESI-QTOF (nano-Acquity Ultra Performance Liquid Chromatography acoplado a un espectrómetro de masas SYNAPT G2 High Definition Mass Spectrometry System de Waters Corporation). La columna que se utilizó en la cromatografía fue una BEH130 de 100µm x 100mm con un tamaño de partícula de 1.7µm, trabajando a un flujo de 0.6µl/min y eluyendo con un gradiente lineal de 0.1% de ácido fórmico en agua (solución A) y 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo (Solución B), isocráticamente 1% B durante 1 min, seguido de 1%–12% B durante 1 min, 12%–40% B durante 15 min y 40%–85% B durante 2 min. La interpretación de los espectros de masas se realiza con el software MassLynx de Waters Corporation.

4. Resultados

4.1. Antecedentes.

Previamente, en el laboratorio de Venómica estructural y funcional de proteínas, se había generado un antiveneno experimental frente a *B. irregularis*. Para ello se utilizó el veneno de *B. irregularis* adulto para inmunizar conejos. A lo largo de 8 semanas se inyectó a los conejos 6 dosis de veneno; las dos primeras junto con un coadyuvante, las cuatro restantes únicamente veneno. Para obtener la fracción de inmunoglobulinas, se extrajo sangre a los conejos, se dejó coagular y se recuperó el suero (sobrenadante). El suero se precipitó con sulfato de amonio (1 volumen por 1 volumen de suero). Posteriormente se centrifugó y se recogió el precipitado, que fue redisolto y dializado frente a tampón fosfato (5mM pH 7.0; NaCl 40mM). Se realizó una cromatografía en DEAE-Sepharosa, eluyendo con un gradiente de NaCl en tampón fosfato. El pico mayoritario obtenido corresponde a las inmunoglobulinas de conejo purificadas.

4.2. Caracterización del antiveneno hecho en conejo frente al veneno de *Boiga irregularis* adulto.

En primer lugar, comprobamos que el antiveneno generado era capaz de reconocer el veneno de *Boiga irregularis* adulto, veneno que se había utilizado en la inmunización. Para ello, se realizó el ensayo de inmuoafinidad incubando 100 ug de veneno de *Boiga irregularis* adulto en la columna que tenía unido el antiveneno y se analizaron por RP-HPLC (cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa) las fracciones de retenido y no retenido que se compararon frente al veneno total.

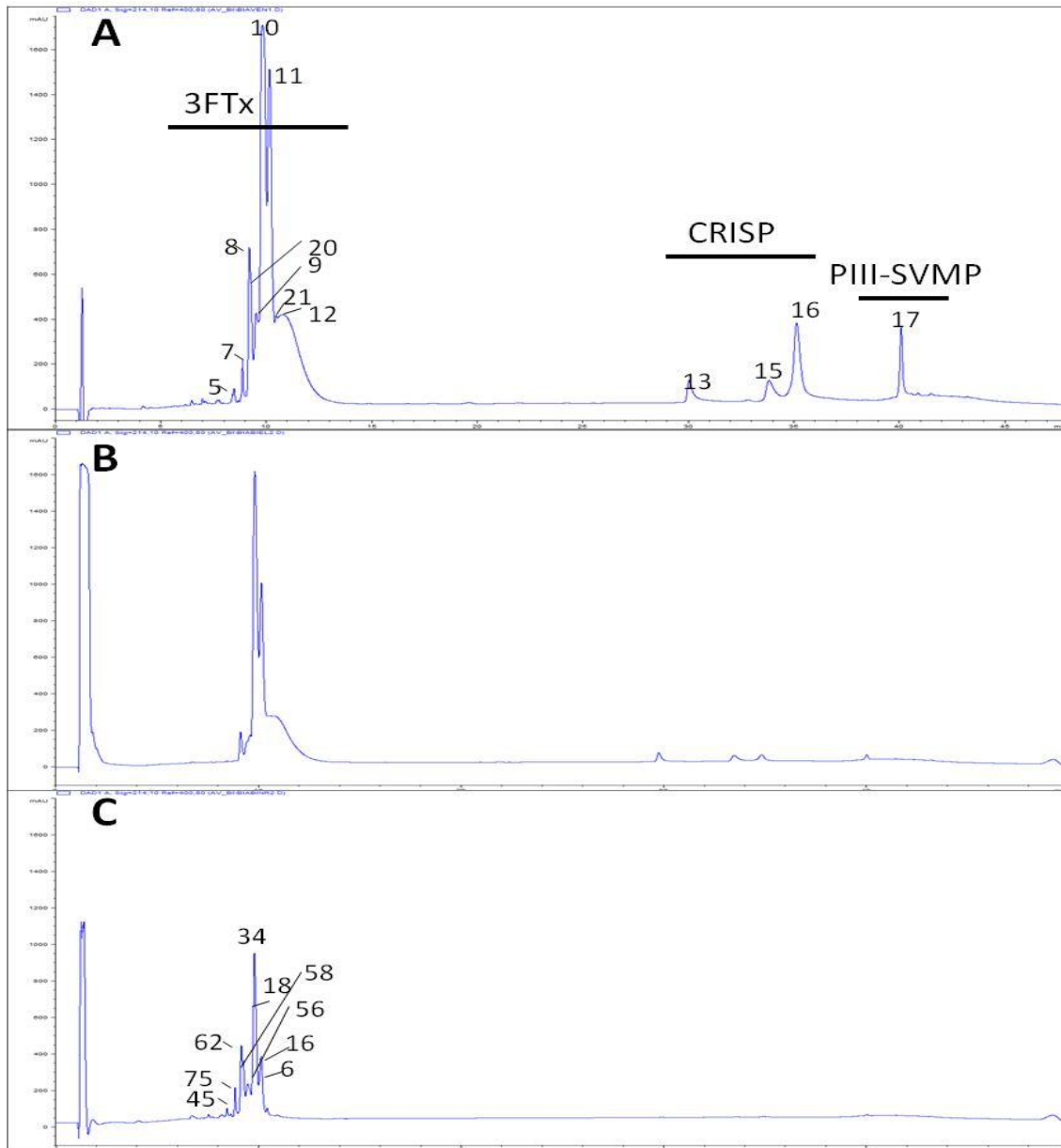


Figura 6: Ensayo de inmunoafinidad CNBr AVBi vs *Boiga irregularis* adulto. Panel A: identificación de las proteínas de cada fracción de veneno total 0.1mg. Panel B: fracción de proteínas que han sido inmunoreconocidas (retenido) en 0.1mg de veneno. Panel C: porcentaje de la fracción de proteínas no inmunoreconocidas (no retenido) en 0.1mg de veneno. Abreviaturas. 3FTX: three finger toxins. PIII-SVMP: snake venom metalloproteinase de tipo III. CRISP: cysteine-rich secretory protein.

Como podemos observar en el panel B de la Figura 6, el antiveneno reconoció en gran medida el veneno de *Boiga irregularis* adulto. Para poder determinar la cantidad de veneno que había sido reconocido y no reconocido, se cuantificaron las fracciones respecto al veneno total. Para realizar la cuantificación, se debe seleccionar separadamente cada pico y trazar una línea base desde su inicio a su final, tal y como muestra la Figura 7, de forma que el área debajo de la curva sea proporcional a la cantidad de proteína contenida en el pico.

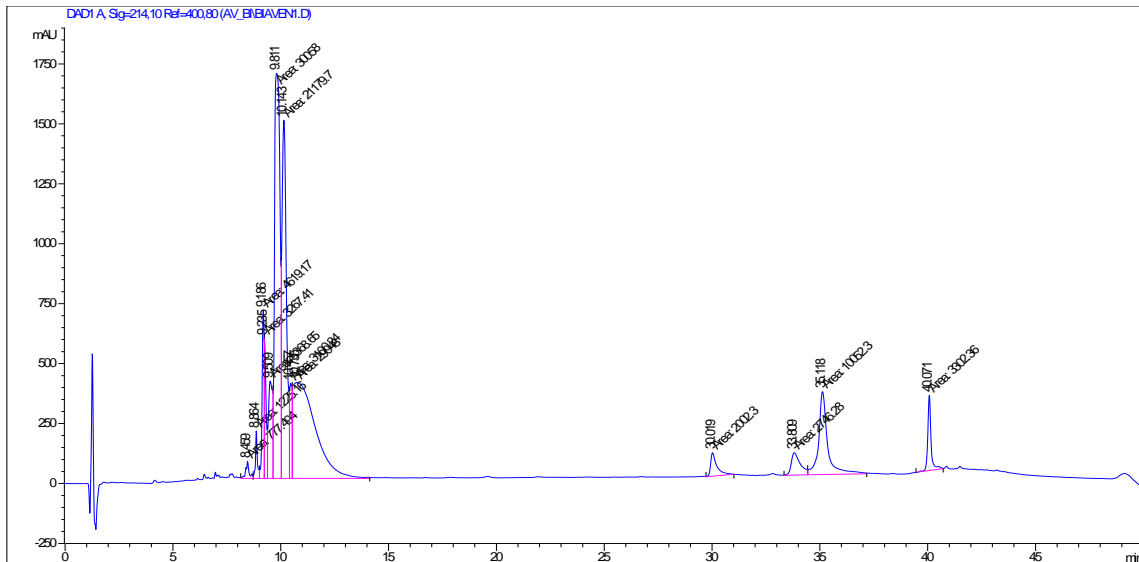


Figura 7: Ejemplo de cómo seleccionar los picos del veneno de *B. irregularis* adulto 0.1mg para su cuantificación.

Tal y como se puede observar en la Figura 6, la mayoría de proteínas aparecen en la fracción retenida exceptuando un porcentaje de los picos correspondientes a las 3FTx (5-12) que aparece también en el no retenido.

En paralelo al ensayo con la columna de afinidad, se llevó a cabo el control de matriz no funcionalizada para comprobar que toda la proteína que retenía el AV era efectivamente inmunoreconocida por él y no a que se quedaba retenida debido a uniones inespecíficas con la matriz.

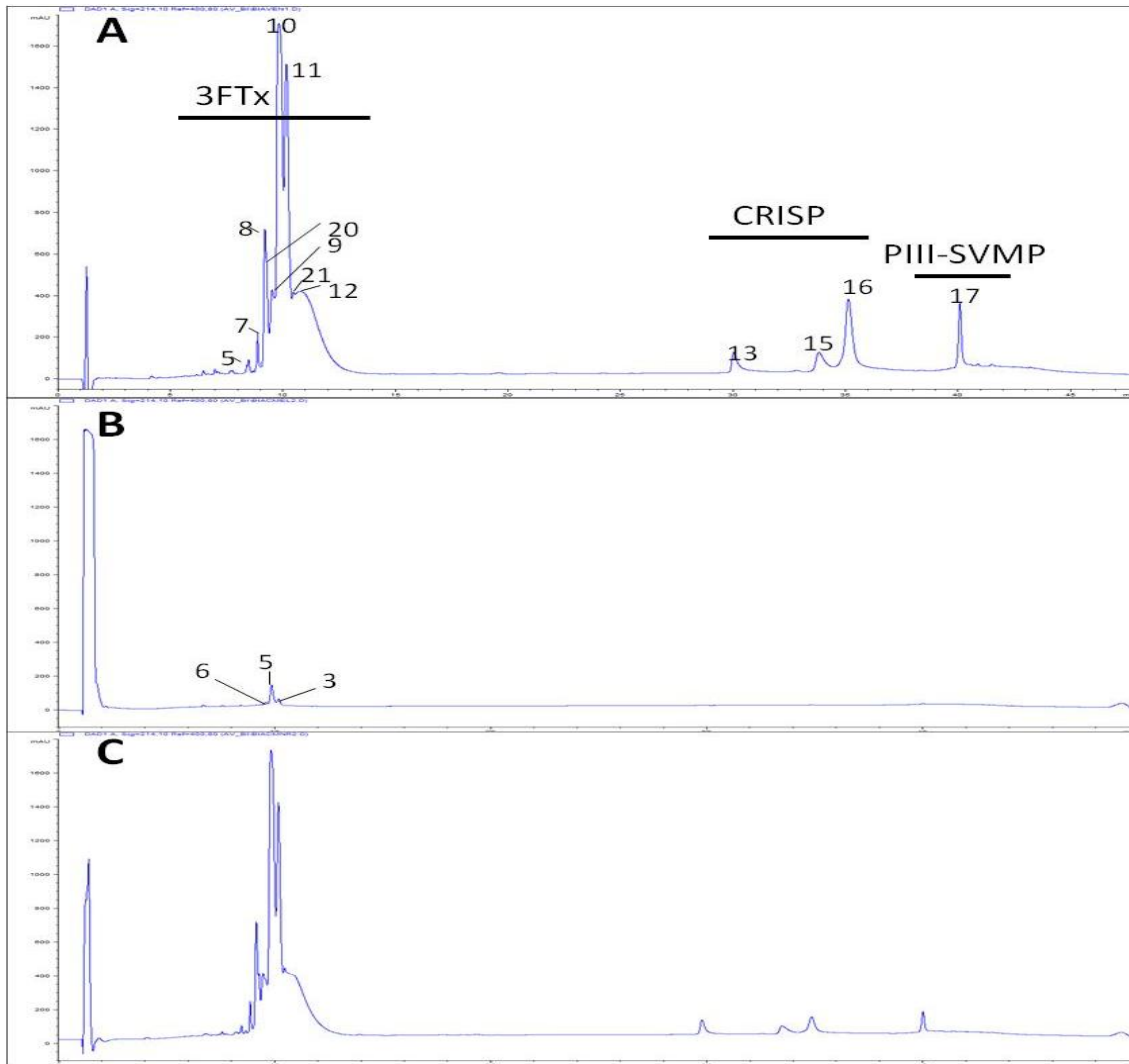


Figura 8: Ensayo de inmunoafinidad CNBr Control matriz vs *Boiga irregularis* adulto. Panel A: veneno total 0.1mg. Panel B: fracción de proteínas que han sido retenidas por la matriz de 0.1mg de veneno y sus porcentajes. Panel C: fracción de proteínas no retenidas de 0.1mg de veneno. Abreviaturas. 3FTx: three finger toxins. PIII-SVMP: snake venom metalloproteinase de tipo III. CRISP: cysteine-rich secretory protein.

Como se puede observar en la Figura 8, panel C, todos los picos aparecen en el no retenido, exceptuando una pequeña cantidad de los picos 9, 10 y 11 que se unieron inespecíficamente a la matriz (Figura 8, panel B).

En este tipo de ensayo, comparamos las fracciones retenida y no retenida respecto al veneno total (y posteriormente se ajustaron los datos respecto a la suma de retenido + no retenido), el cual no ha sufrido ningún tipo de manipulación, mientras que a lo largo del ensayo de inmunoafinidad las fracciones han podido sufrir pérdidas, de ahí que observemos una menor cantidad del veneno obtenido en las fracciones respecto al veneno total. Aun teniendo en cuenta esto, en la Figura 6 puede observarse que los picos 13, 15, 16 y 17 (que corresponden a las metaloproteasas) aparecen en la fracción retenida pero en menor cantidad respecto al veneno total que otras fracciones. Esto lleva a preguntarnos si estas fracciones han podido ser degradadas durante el proceso o puedan haber precipitado. Como observamos en el control Matriz (Figura 8, panel C), estas mismas fracciones aparecen en proporciones adecuadas en el no retenido, por lo que no se han degradado ni precipitado durante el desarrollo del ensayo.

Esto sugiere que lo que está ocurriendo es que se produce una fuerte unión de las proteínas al AV de forma que no pueden ser eluidas con el tampón de elución (Figura 6, panel B).

Para comprobar esta hipótesis se llevó a cabo un ensayo de Western-Blot que nos permite también observar la inmunoreactividad de un anticuerpo frente a proteínas. Para ello, las fracciones resultantes de la separación de 0.2 mg de veneno mediante RP-HPLC se analizaron separadamente por SDS-PAGE (Figura 10) y Western-Blot (Figura 11). Como puede comprobarse en la Figura 10, las fracciones 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16 y 17 son las que presentaban un componente proteico detectable por Coomassie.

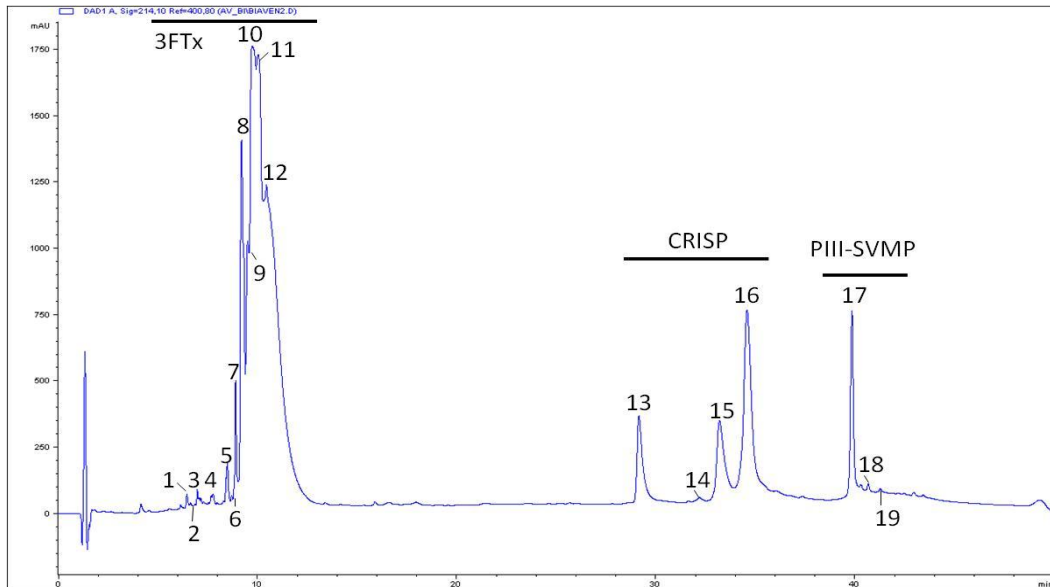


Figura 9: Cromatograma del veneno de *B. irregularis* adulto 0.2mg. Abreviaturas. 3FTX: three finger toxins. PIII-SVMP: snake venom metalloproteinase de tipo III. CRISP: cysteine-rich secretory protein.

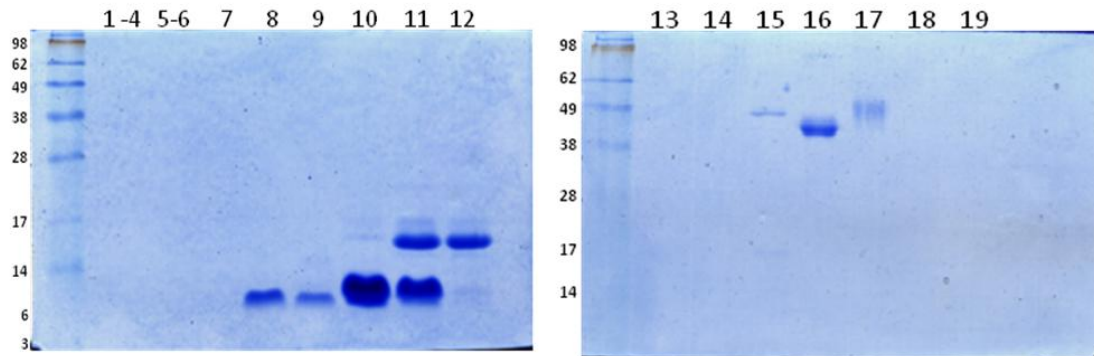


Figura 10: Análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones cromatográficas separadas en la Figura 9.

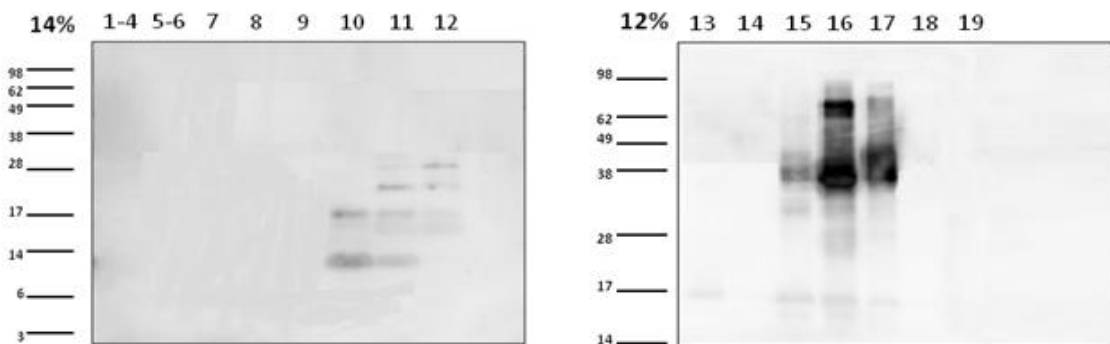


Figura 11: Análisis mediante Western-Blot de las fracciones cromatográficas separadas en la Figura 9.

Tal y como se observa en la Figura 11, el anticuerpo contra el veneno de *B. irregularis* reconoce fuertemente a las metaloproteasas que se encuentran en las fracciones 15-17 confirmando la fuerte unión del antiveneno a epítomos de estas proteínas lo que explicaría la difícil elución de la columna de inmunoafinidad.

La Figura 12 muestra un ensayo de antivenómica utilizando veneno de neonato de *B. irregularis*, con resultados similares a los obtenidos para el veneno de adulto (Figura 6).

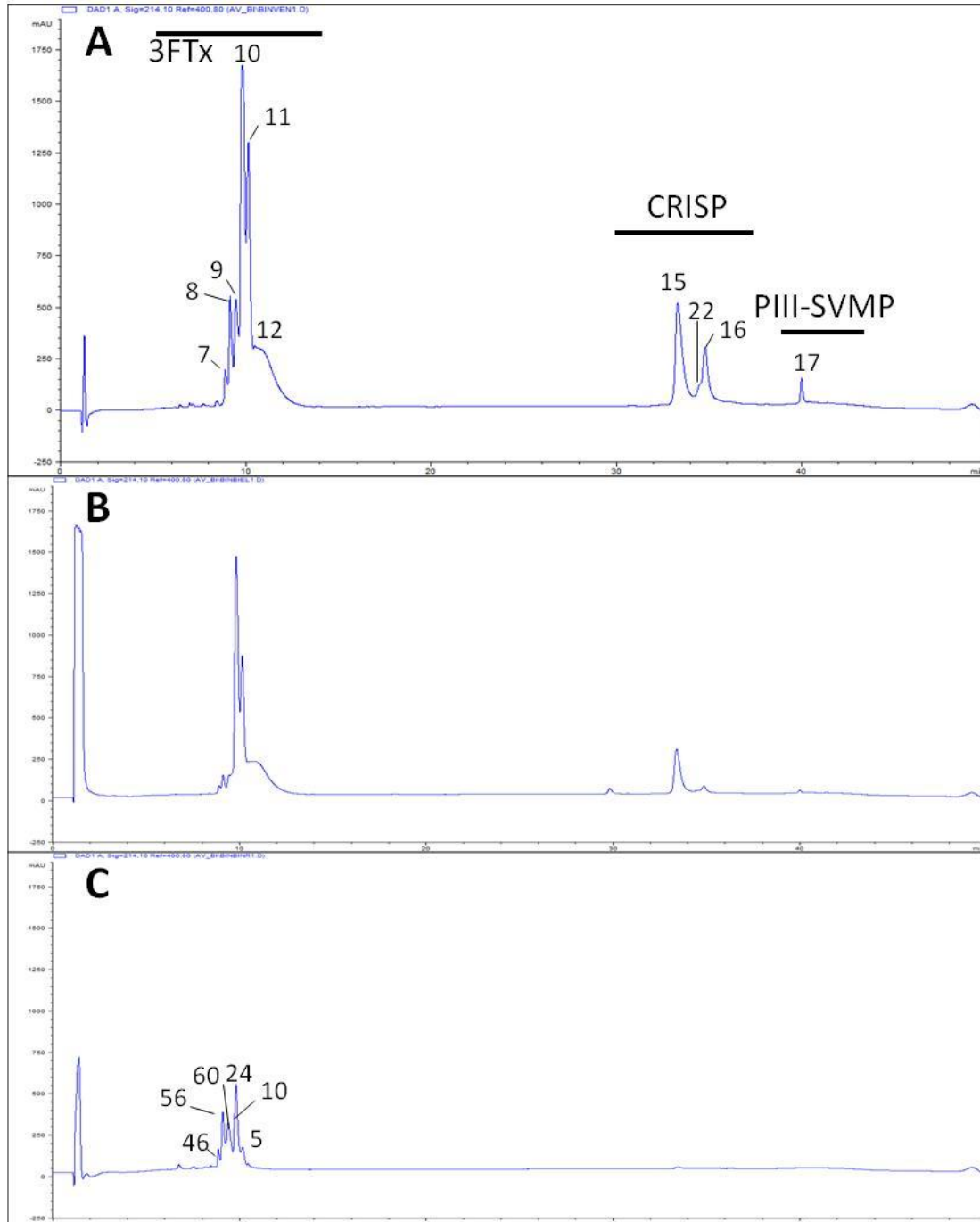


Figura 12: Ensayo de inmunoafinidad CNBr AVBi vs *Boiga irregularis* neonato. Panel A: veneno total 0.1mg. Panel B: fracción de proteínas inmunoreconocidas. Panel C: porcentaje de la fracción de proteínas no inmunoreconocidas. Abreviaturas. 3FTX: three finger toxins. PIII-SVMP: snake venom metalloproteinase de tipo III. CRISP: cysteine-rich secretory protein.

Al igual que se hizo con el ensayo de inmunofluorescencia con veneno de *B. irregularis* adulto, se realizó en paralelo un control de matriz sin el AV unido (Figura 13) para descartar uniones inespecíficas.

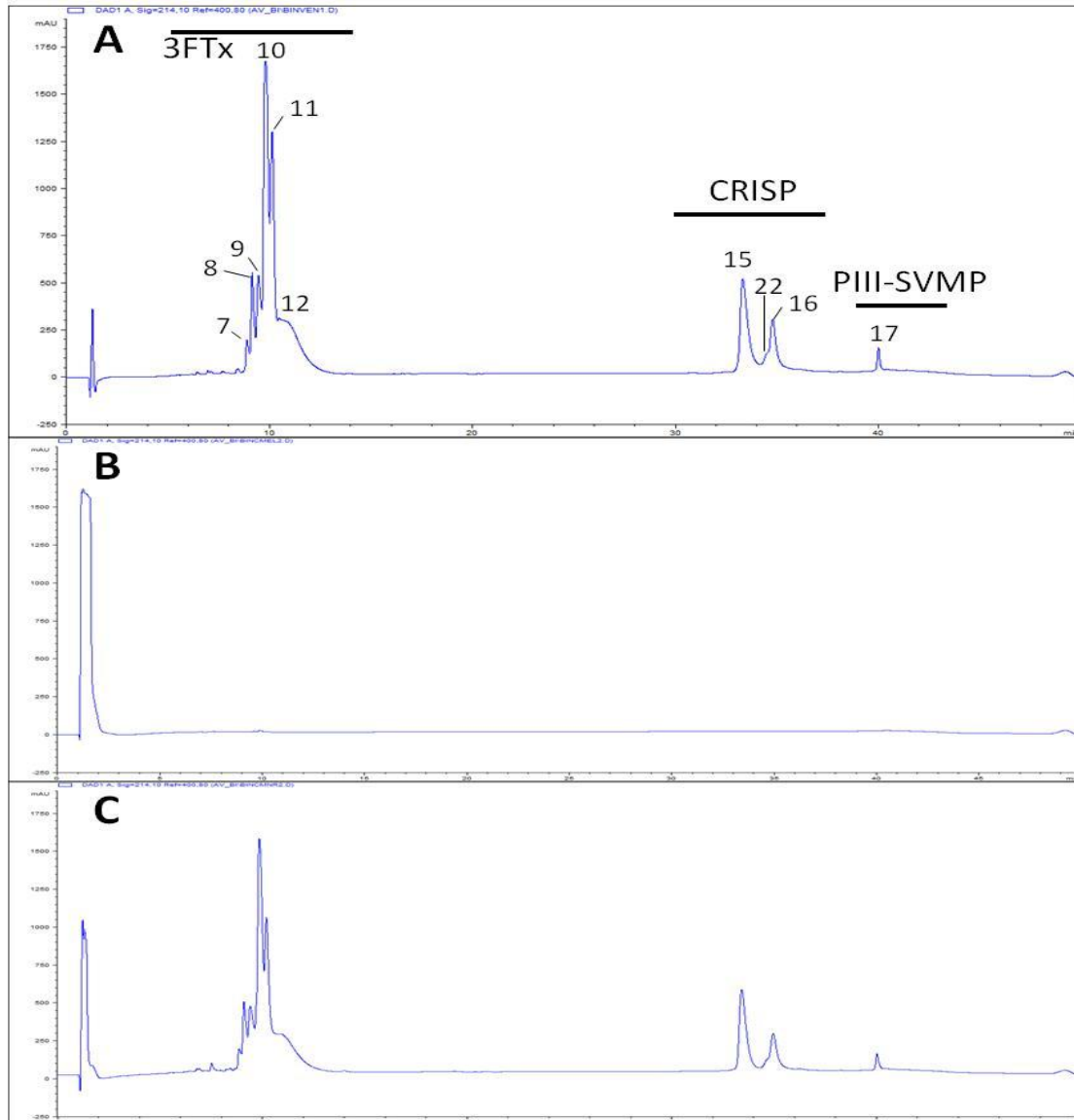


Figura 13: Ensayo de inmunofluorescencia CNBr Control Matriz vs *Boiga irregularis* neonato. Panel A: veneno total 0.1mg. Panel B: fracción de proteínas retenidas. Panel C: fracción de proteínas no retenidas. Abreviaturas. 3FTx: three finger toxins. PIII-SVMP: snake venom metalloproteinase de tipo III. CRISP: cysteine-rich secretory protein.

Los resultados mostrados en la Figura 12, muestran que el antiveneno generado frente a *B. irregularis* adulto es capaz de reconocer las proteínas del veneno del neonato con idéntica eficiencia que las del veneno de adulto. Es destacable que, igual que ocurría en el ensayo de antivenómica con veneno de adulto (Figura 6, panel C), también las proteínas de las fracciones 15-17 fueron pobremente recuperadas (Figura 12, panel C). Esto nos llevó a pensar en dos posibles explicaciones: o bien el AV no reconocía bien esas proteínas, o bien los anticuerpos generados frente a esas proteínas estaban saturados y ya no podían reconocer más cantidad de proteína. Realizamos una serie de ensayos con concentraciones crecientes (0.05-0.075-0.1-0.15 mg) de veneno. Los resultados, Figuras 14 y 15, mostraron que la baja eficiencia de recuperación de las fracciones 15-17 y 22, debe explicarse por la gran afinidad de la interacción de estas fracciones con el anticuerpo inmovilizado.

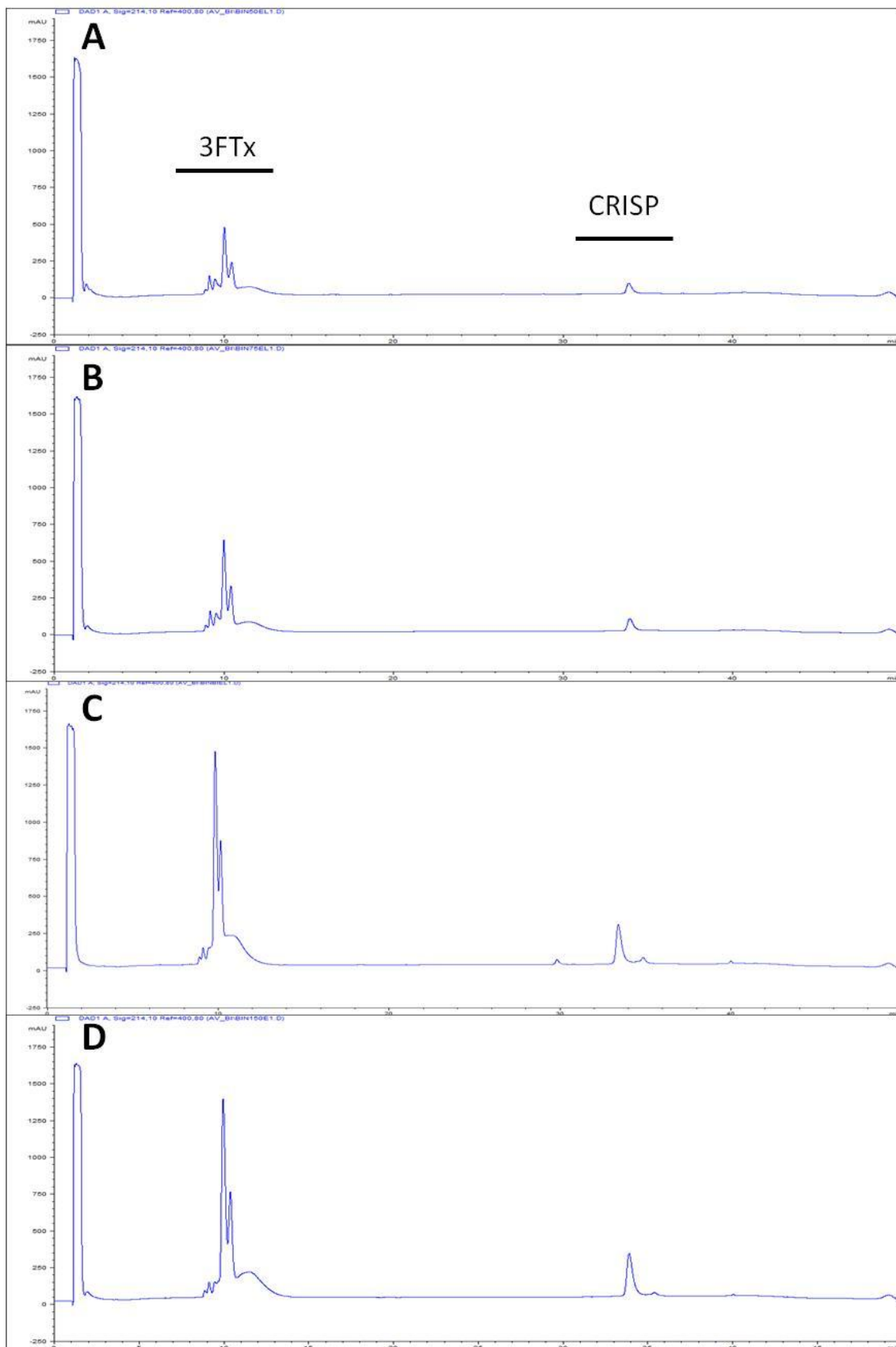


Figura 14: Fracciones inmunoreconocidas en ensayos de inmunoafinidad de CNBr *AVBi* vs concentraciones crecientes de veneno de *B. irregularis*: 0.05 mg (Panel A), 0.075 (Panel B), 0.1 (Panel C), y 0.15 (Panel D). Abreviaturas. 3FTx: three finger toxins. CRISP: cysteine-rich secretory protein.

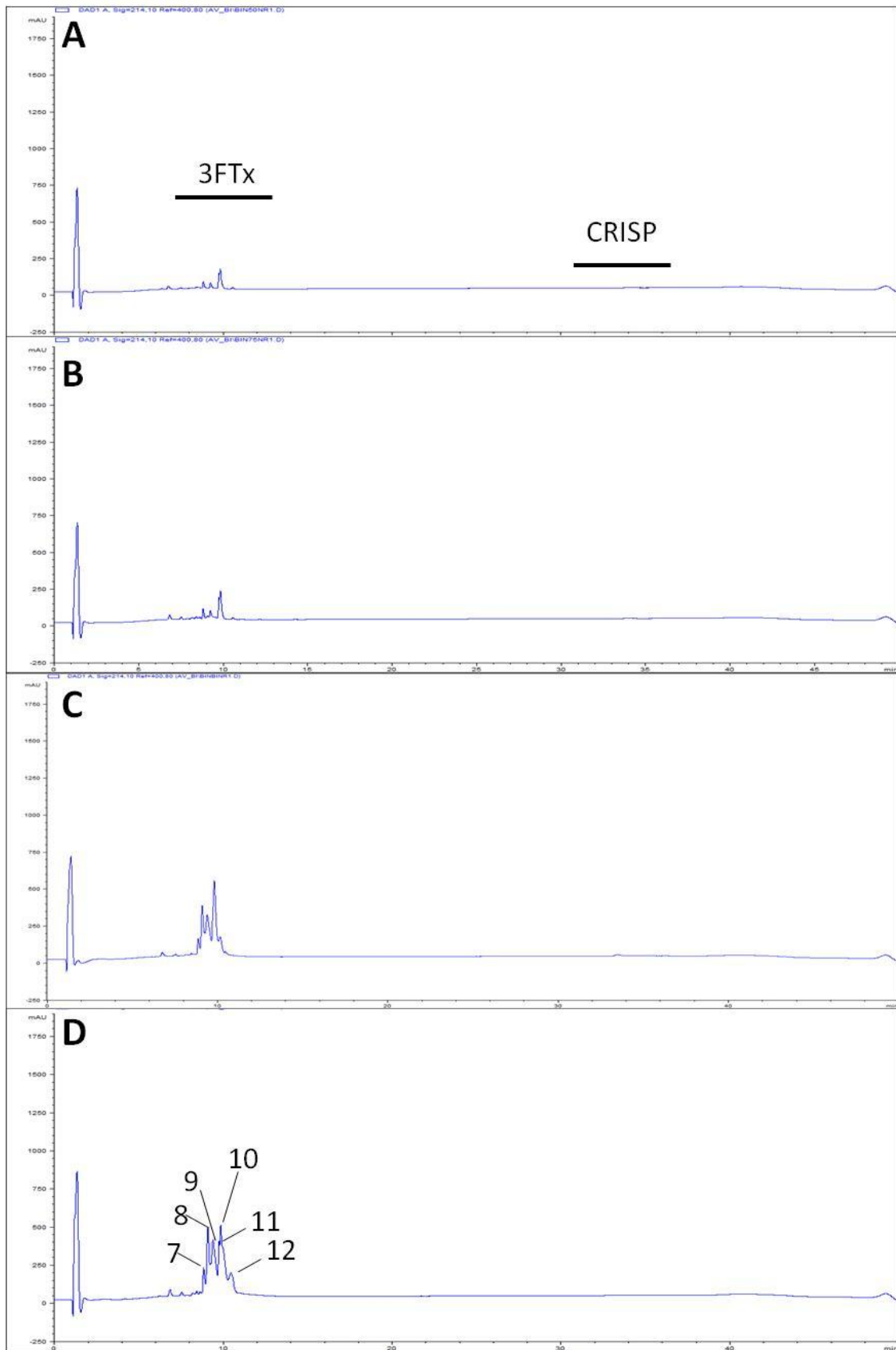


Figura 15: Fracciones no inmunoreconocidas en el ensayo de inmunoafinidad de CNBr *AVBi* vs concentraciones crecientes de veneno de *B. irregularis*: 0.05 mg (Panel A), 0.075 (Panel B), 0.1 (Panel C), y 0.15 (Panel D). Abreviaturas. 3FTX: three finger toxins. CRISP: cysteine-rich secretory protein.

La identificación de las proteínas no inmunoreconocidas en la columna de inmunoafinidad se realizó mediante espectrometría de masas de los picos cromatográficos de la fracción no retenida en la columna de afinidad (Figura 16, Tabla 2). La concentración 0.1mg no se analizó y las de 0.050mg y 0.075mg no mostraron ninguna coincidencia de sus masas con las proteínas identificadas en el laboratorio (en trabajos previos). Por ello en la Figura 16 y Tabla 2 se muestra la concentración de 0.15mg

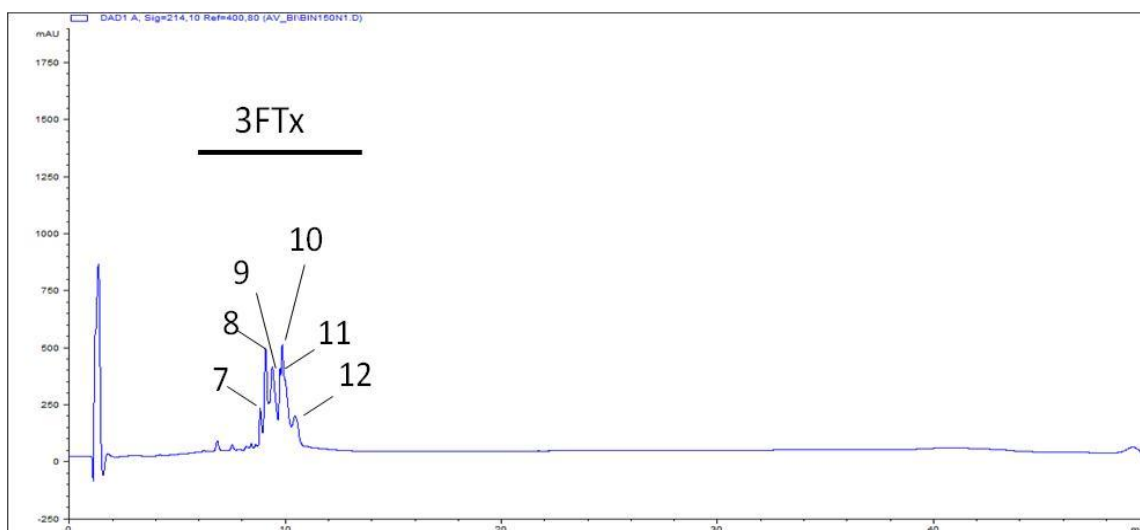


Figura 16: Picos de la fracción no inmunoreconocida del veneno de *B. irregularis* neonato 0.150mg que fueron analizados por espectrometría de masas. Abreviaturas. 3FTx: three finger toxins.

Tabla 2: Identificación de las proteínas contenidas en los picos de la Figura 16 analizados por espectrometría de masas. Para cada proteína se determinó la relación masa/carga y la carga del pico monoisotópico y la masa total de la proteína sin reducir. Se calculó la masa de las proteínas reducidas para identificarlas mediante comparación con una base de datos de secuencias deducidas de un análisis del transcriptoma de la glándula del veneno de un adulto de *B. irregularis* (datos no publicados).

| Fracción | m/z monoisotópica | z | M nativa experimental | M reducida calculada (+10 Da) | Identificación |
|-----------|-------------------|---|-----------------------|-------------------------------|--|
| BIN150_7 | 1378,6 | 6 | 8265,7 | 8275,7 | Variante de three-finger toxin 8 [Boiga irregularis] |
| BIN150_8 | 1373,9 | 6 | 8237,6 | 8247,6 | pdb 2H7Z A Chain A, Crystal Structure Of Irditoxin |
| | 1378,6 | 6 | 8265,6 | 8275,6 | Variante de three-finger toxin 8 [Boiga irregularis] |
| BIN150_9 | 1171,5 | 7 | 8193,6 | 8203,6 | Variante de three-finger toxin 8 [Boiga irregularis] |
| | 1173,9 | 7 | 8210,6 | 8220,6 | Variante de three-finger toxin 8 [Boiga irregularis] |
| | 1177,9 | 7 | 8238,5 | 8248,5 | Variante de three-finger toxin 7 [Boiga irregularis] |
| BIN150_10 | 1366,6 | 6 | 8193,6 | 8203,6 | Variante de three-finger toxin 8 [Boiga irregularis] |
| | 1374,1 | 6 | 8238,5 | 8248,5 | Variante de three-finger toxin 7 [Boiga irregularis] |

| | | | | | |
|-----------|--------|---|--------|--------|--|
| BIN150_11 | 1171,5 | 7 | 8193,6 | 8203,6 | Variante de three-finger toxin 8 [Boiga irregularis] |
| | 1177,8 | 7 | 8367,6 | 8247,6 | pdb 2H7Z A Chain A, Crystal Structure Of Irditoxin |
| | 1228,4 | 8 | 9819,5 | 9829,5 | ANN23941.1 three finger toxin 5 [Boiga irregularis] |
| | 1231,1 | 8 | 9840,5 | 9850,5 | ANN23940.1 three finger toxin 4 [Boiga irregularis] |
| | 1247,1 | 8 | 9968,5 | 9978,5 | ANN23940.1 three finger toxin 4 [Boiga irregularis] |
| BIN150_12 | 1366,6 | 6 | 8193,5 | 8203,5 | Variante de three-finger toxin 8 [Boiga irregularis] |
| | 1373,9 | 6 | 8237,6 | 8247,6 | pdb 2H7Z A Chain A, Crystal Structure Of Irditoxin |
| | 1425,8 | 7 | 9973,5 | 9983,5 | ANN23939.1 three finger toxin 3 [Boiga irregularis] |

4.3. Caracterización de la paraespecificidad del antiveneno de *Boiga irregularis* adulto frente a elápidos.

Una vez se comprobó que el veneno hecho frente a *B. irregularis* adulto era capaz de reconocer tanto el veneno de la especie adulta como el de neonato, se quiso profundizar más para establecer si existía cierta homología inmunológica entre las familias de proteínas del veneno de colúbridos y elápidos. Para ello, se realizó un ensayo de inmunoafinidad del antiveneno frente a los venenos de tres especies de elápidos: *Naja haje* Egipto, *Naja melanoleuca* Uganda y *Naja annulifera*. Como se ha hecho a lo largo de todo este trabajo, se llevaron a cabo además controles de la matriz en paralelo para cada uno de los venenos.

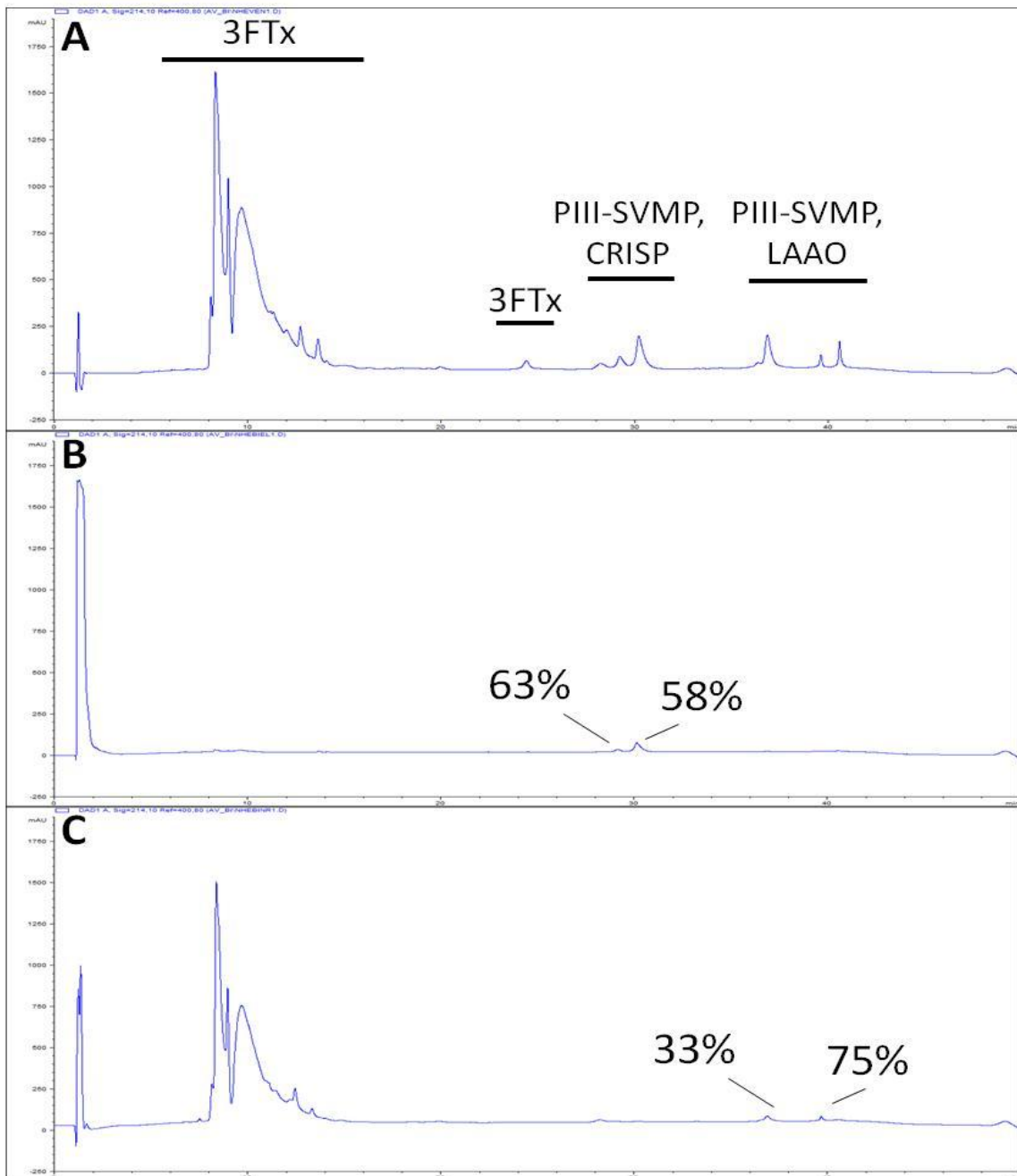


Figura 17: Ensayo de inmunoafinidad CNBr AVBi vs *Naja haje* Egipto. Panel A: veneno total 0.1mg. Panel B: fracción de proteínas que han sido inmunoreconocidas en 0.1mg de veneno. Panel C: fracción de proteínas no inmunoreconocidas en 0.1mg de veneno. Abreviaturas. 3FTx: three finger toxins. PIII-SVMP: snake venom metalloproteinase de tipo III. CRISP: cysteine-rich secretory protein. LAAO: L-amino acidoxidase.

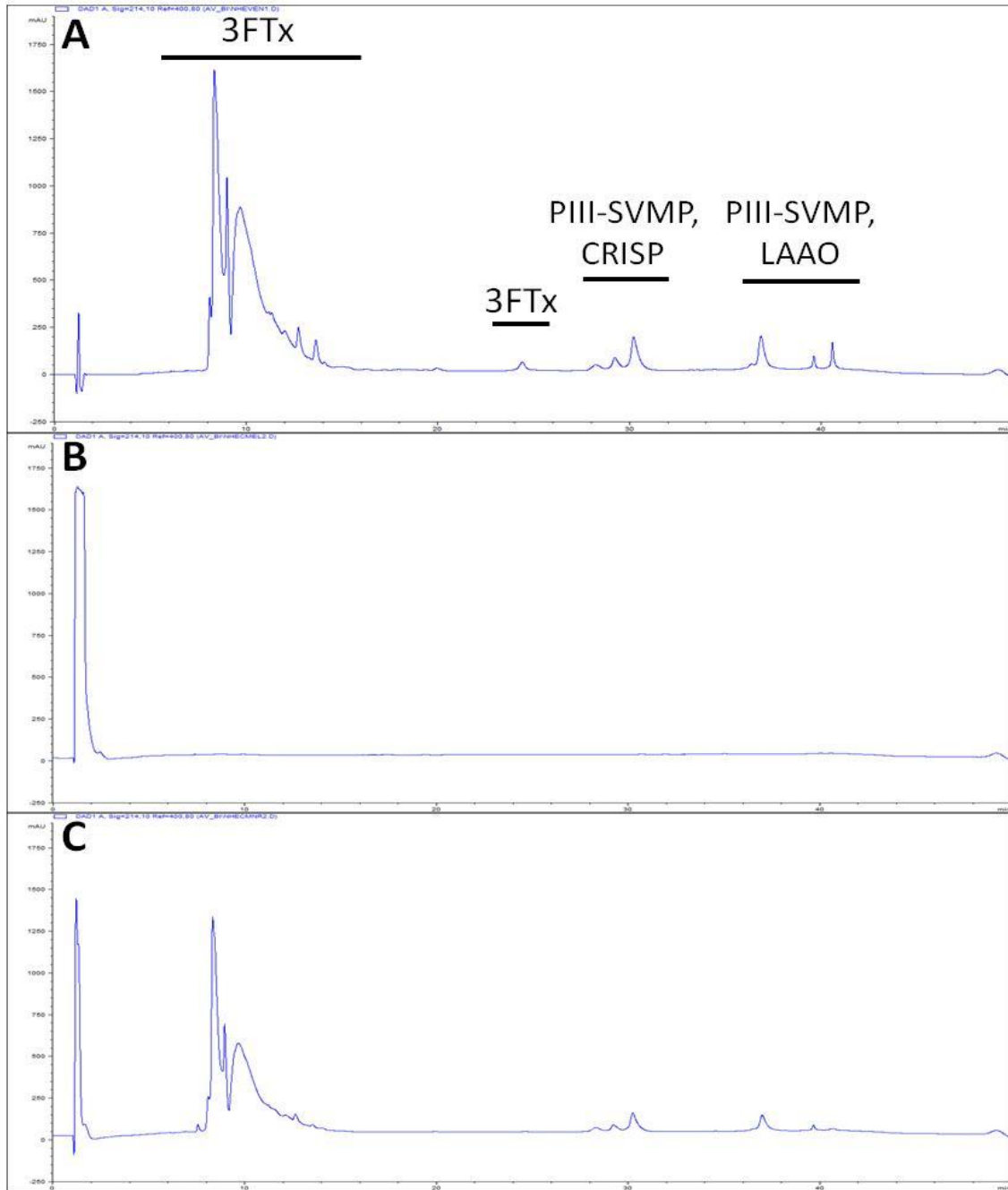


Figura 18: Ensayo de inmunoafinidad CNBr Control Matriz vs *Naja haje* Egipto. Panel A: veneno total 0.1mg. Panel B: fracción de proteínas que han sido inmunoreconocidas en 0.1mg de veneno. Panel C: fracción de proteínas no inmunoreconocidas en 0.1mg de veneno. Abreviaturas. 3FTx: three finger toxins. PIII-SVMP: snake venom metalloproteinase de tipo III. CRISP: cysteine-rich secretory protein. LAAO: L-amino acidoxidase.

Como se puede observar en la Figura 17 panel B, el antiveneno de *B. irregularis* muestra un porcentaje de reconocimiento frente a dos fracciones del veneno de *Naja haje* Egipto. Pero estas dos fracciones se encuentran en la parte del veneno que corresponde a las metaloproteasas y CRISPs, quedando así las 3FTx sin ser inmunoreconocidas. Además, en la Figura 17 panel C, se observa un porcentaje de metaloproteasas y LAAo no reconocidas que al compararlo con la fracción no retenida en el control matriz, podemos determinar que sí que hay cierta cantidad de proteína reconocida que no ha eluido debido a su fuerte unión con la matriz.

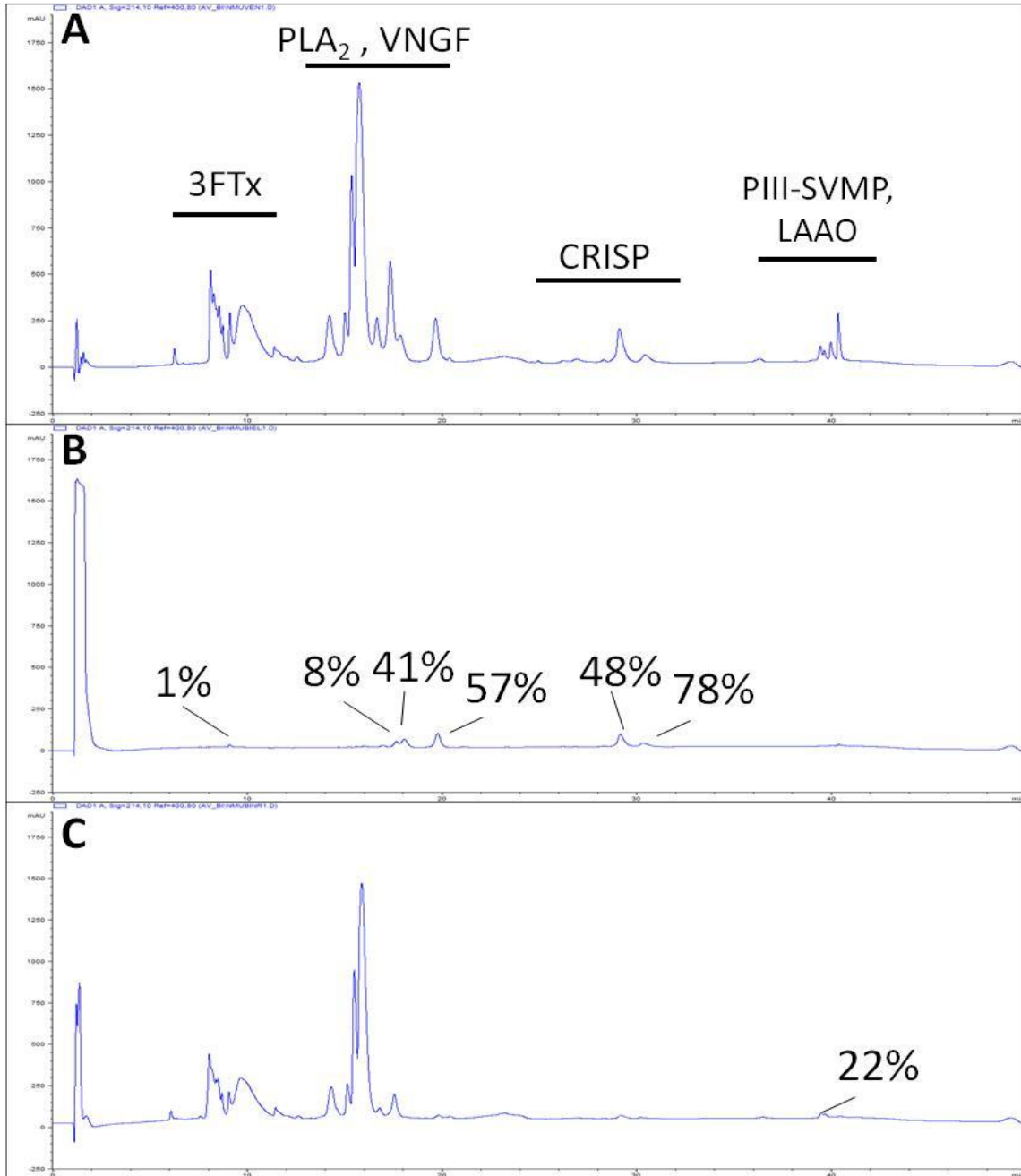


Figura 19: Ensayo de inmunoafinidad CNBr AVBi vs *Naja melanoleuca* Uganda. Panel A: veneno total 0.1mg. Panel B: fracción de proteínas inmunoreconocidas en 0.1mg de veneno. Panel C: fracción de proteínas no inmunoreconocidas en 0.1mg de veneno. Abreviaturas. 3FTx: three finger toxins. PLA₂: phospholipase A₂. PIII-SVMP: snake venom metalloproteinase de tipo III. CRISP: cysteine-rich secretory protein. LAAO: L-amino acidoxidase. VNGF: venom neural growth factor.

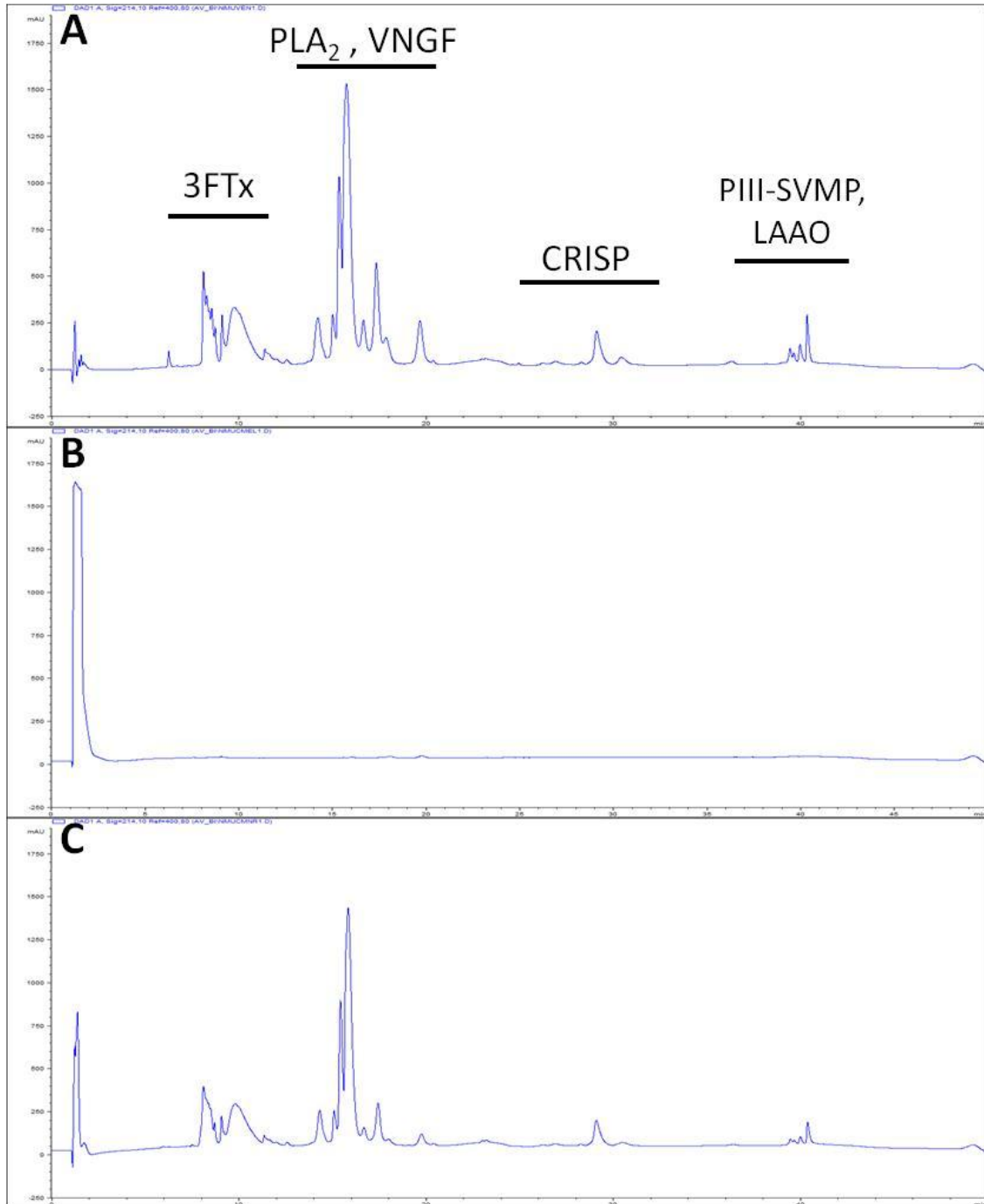


Figura 20: Ensayo de inmunoafinidad CNBr Control Matriz vs *Naja melanoleuca* Uganda. Panel A: veneno total 0.1mg. Panel B: fracción de proteínas inmunoreconocidas en 0.1mg de veneno. Panel C: fracción de proteínas no inmunoreconocidas en 0.1mg de veneno. Abreviaturas. 3FTx: three finger toxins. PLA₂: phospholipase A₂. PIII-SVMP: snake venom metalloproteinase de tipo III. CRISP: cysteine-rich secretory protein. LAAO: L-amino acidoxidase. VNGF: venom neural growth factor.

Como se puede observar en la Figura 19 panel B y C, el antiveneno hecho frente a *B. irregularis* muestra diferentes porcentajes de reconocimiento en la fracción del veneno de *Naja melanoleuca* Uganda que correspondería a las metaloproteasas y LAAO, fosfolipasas y VNGFs y CRISPs. Solo se observa un porcentaje de inmunoreconocimiento del 1% en un pico de 3FTx.

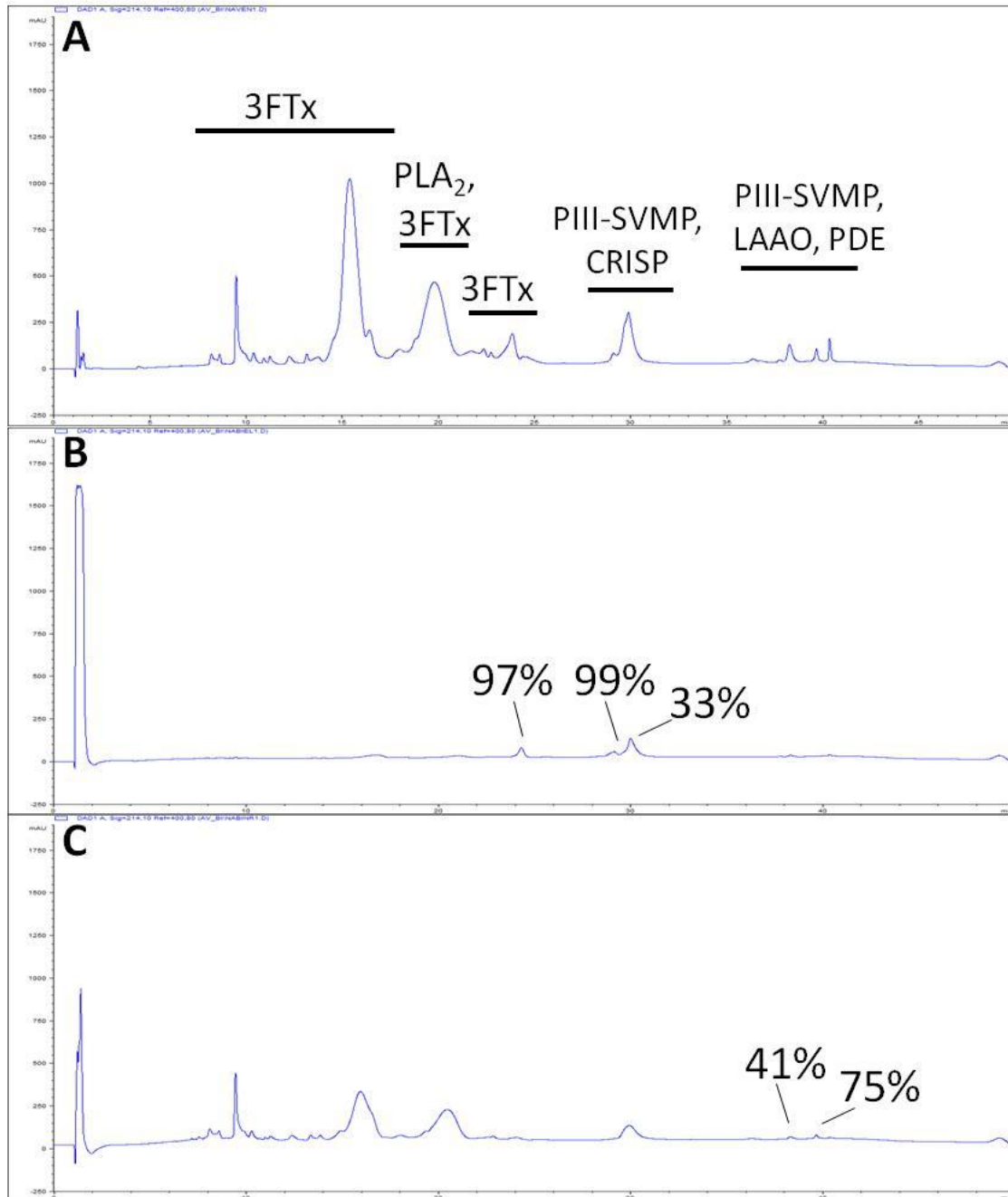


Figura 21: Ensayo de inmunoafinidad CNBr AVBi vs *Naja annulifera*. Panel A: veneno total 0.1mg. Panel B: fracción de proteínas inmunoreconocidas en 0.1mg de veneno. Panel C: fracción de proteínas no inmunoreconocidas en 0.1mg de veneno. Abreviaturas. 3FTX: three finger toxins. PLA₂: phospholipase A₂. PIII-SVMP: snake venom metalloproteinase de tipo III. CRISP: cysteine-rich secretory protein. LAAO: L-amino acidoxidase. PDE fosfodiesterasa.

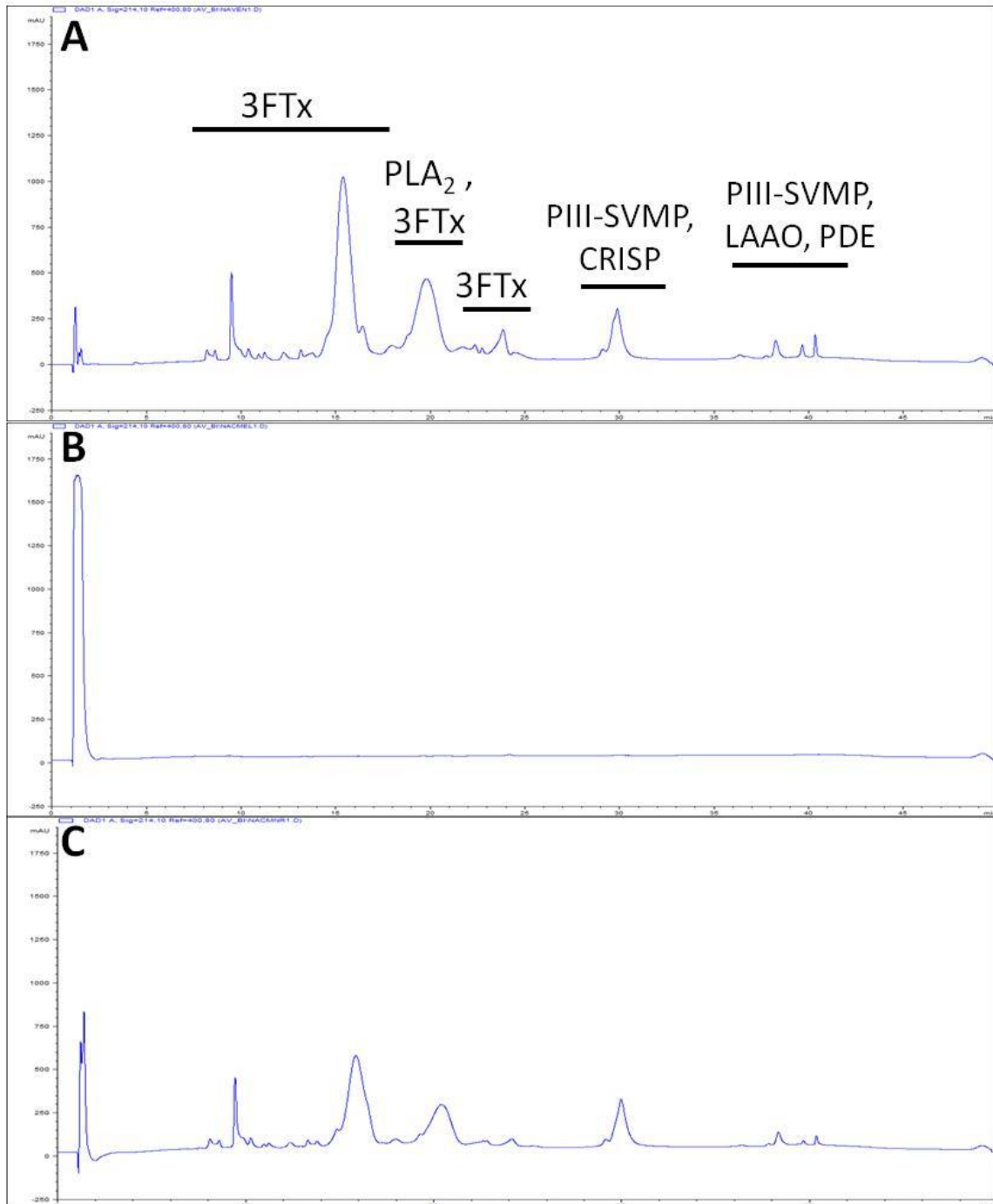


Figura 22: Ensayo de inmunoafinidad CNBr Control Matriz vs *Naja annulifera*. Panel A: veneno total 0.1mg. Panel B: fracción de proteínas inmunoreconocidas en 0.1mg de veneno. Panel C: fracción de proteínas no inmunoreconocidas en 0.1mg de veneno. Abreviaturas. 3FTx: three finger toxins. PLA₂: phospholipase A₂. PIII-SVMP: snake venom metalloproteinase de tipo III. CRISP: cysteine-rich secretory protein. LAAO: L-amino acidoxidase. PDE fosfodiesterasa.

En la Figura 21 panel B y C, se puede observar que el antiveneno de *B. irregularis* reconoce dos de los picos que corresponden a metaloproteasas y CRISPs del veneno de *Naja annulifera*. También muestra un cierto reconocimiento frente a la fracción de metaloproteasas, LAAO y fosfodiesterasas. Sin embargo, la fracción de 3FTx no fue inmunoreconocida en su totalidad por el antiveneno pero sí se reconoció un pico que eluye alrededor del minuto 20.

5. Discusión.

El veneno, en general, y el de serpientes en particular, representa un carácter multigénico adaptativo, cuya composición está sujeta a cambios geográficos, individuales, e incluso ontogenéticos. Por ejemplo, en el caso de *Crotalus simus simus*, el veneno de neonato y juvenil contiene gran cantidad de crotoxina (una PLA₂ heterodimérica neurotóxica) y una baja concentración de SVMPs, siendo por tanto un veneno neurotóxico. Por el contrario, la especie adulta muestra un alto contenido en SVMPs y su veneno es hemorrágico (Durban *et al.*, 2013). En el caso de *Boiga irregularis*, se ha descrito que el veneno de individuos adultos tiene un mayor contenido proteico respecto al veneno de individuos neonatos o juveniles (Mackessy *et al.*, 2006). En este trabajo hemos observado que no existen cambios significativos en el reconocimiento inmunológico de un antiveneno desarrollado contra las toxinas de veneno de individuos adultos cuando lo enfrentamos al veneno de adulto y de neonato (Figura 6 y Figura 12, Paneles B). Por tanto, se puede concluir diciendo que los individuos adulto y neonato de *B. irregularis* muestran el mismo perfil inmunogénico.

Por otra parte, se conoce que hay ciertas proteínas que son menos inmunogénicas y por tanto generar una menor respuesta del sistema inmune (Calvete, 2010). En este trabajo se ha comprobado que sucede algo similar con las 3FTx de *B. irregularis*, ya que a una determinada concentración de veneno, algunas toxinas las encontramos en la fracción no inmunoreconocida (Figura 16). Llegados a este punto cabría plantearse dos posibles hipótesis que intenten explicar este hecho. O bien estas proteínas son menos inmunogénicas que otras toxinas del veneno y eluyen porque los anticuerpos que las reconocen se encuentran saturados; o bien se trata de proteínas minoritarias que no originan respuesta del sistema inmune. En cualquier caso, se identificaron estas proteínas (Tabla 2) comparando sus masas obtenidas mediante espectrometría de masas frente a un listado de todas las proteínas del veneno de *B. irregularis* del cual se disponía en el laboratorio (datos no publicados).

En cuanto a la caracterización de la paraespecificidad del antiveneno de *B. irregularis* frente a elápidos, se ha visto en este trabajo (Figuras 17, 19, 21, Paneles B) que el antiveneno no es capaz de reconocer las 3FTx de elápidos. Esto se debe a la existencia de variabilidad intra- e inter-especie dentro de una misma familia de proteínas, tal y como se describió en las 3FTx al analizar el transcriptoma de seis especies diferentes de *Micrurus* (Aird *et al.*, 2017).

Como conclusión, podemos afirmar que la generación de un nuevo antiveneno no debe basarse en la filogenia o en la composición de las familias de proteínas para generar un antiveneno. Es necesario remarcar la importancia de caracterizar muy bien la composición de los venenos y estudiar su reactividad cruzada, puesto que la evolución juega un papel crucial a la hora de establecer diferencias entre los venenos.

6. Bibliografía.

- AIRD, S. D., da SILVA, N. J., QIU, L., VILLAR-BRIONES, A., SADDI, V. A., Pires de Campos Telles, M., ... & Mikheyev, A. S. (2017). Coralsnake Venomics: Analyses of Venom Gland Transcriptomes and Proteomes of Six Brazilian Taxa. *Toxins*, 9(6), 187.
- BAUCHOT, R., BON, C., & DAVID, P. (2005). *Serpents*. Editions Artémis. Figura 7, p 22. Imagen adaptada por Juanda Vásquez.
- BIOTOX (2015). *Estrategias y avances en el estudio de toxinas de interés para la biomedicina*. CYTED. Figura 3, p 88.
- CALVETE, J. J. (2010). Antivenomics and venom phenotyping: A marriage of convenience to address the performance and range of clinical use of antivenoms. *Toxicon*, 56(7), 1284-1291.
- CALVETE, J. J. (2017). Venomics: integrative venom proteomics and beyond. *Biochemical Journal*, 474(5), 611-634.
- CALVETE, J. J., MORENO-MURCIANO, M. P., THEAKSTON, R. D. G., KISIEL, D. G., & MARCINKIEWICZ, C. (2003). Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. *Biochemical Journal*, 372(3), 725-734.
- CALVETE, J. J., SANZ, L., ANGULO, Y., LOMONTE, B., & GUTIÉRREZ, J. M. (2009). Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS letters*, 583(11), 1736-1743.
- CARBAJO, R. J., SANZ, L., PEREZ, A., & CALVETE, J. J. (2015). NMR structure of bitistatin—a missing piece in the evolutionary pathway of snake venom disintegrins. *FEBS journal*, 282(2), 341-360.
- CHIPPAUX, J. P. (1998). Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bulletin of the World Health Organization*, 76(5), 515.
- DEBONO, J., DOBSON, J., CASEWELL, N. R., ROMILIO, A., LI, B., KURNIAWAN, N., ... & FRY, B. G. (2017). Coagulating Colubrids: Evolutionary, Pathophysiological and Biodiscovery Implications of Venom Variations between Boomslang (*Dispholidus typus*) and Twig Snake (*Thelotornis mossambicanus*). *Toxins*, 9(5), 171.
- DURBAN, J., PÉREZ, A., SANZ, L., GÓMEZ, A., BONILLA, F., CHACÓN, D., ... & CALVETE, J. J. (2013). Integrated “omics” profiling indicates that miRNAs are modulators of the ontogenetic venom composition shift in the Central American rattlesnake, *Crotalus simus simus*. *BMC genomics*, 14(1), 234.
- ENCICLOPEDIA SALUD. Definición de veneno. Consultado el 19 de mayo de 2017). *'enciclopediasalud.com'*.
- FAN, H. W., & CARDOSO, J. L. (1995). Clinical toxicology of snake bites in South America. *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons*, 667-688.
- FIGUEROA, A., MCKELVY, A. D., GRISMER, L. L., BELL, C. D., & LAILVAUX, S. P. (2016). A Species-Level Phylogeny of Extant Snakes with Description of a New Colubrid Subfamily and Genus. *PloS one*, 11(9), e0161070.
- FRITTS, T. H. (1988). The brown tree snake, *Boiga irregularis*, a threat to Pacific islands. *US Fish and Wildlife Service*. No. 88 (31).

FRITTS, T.H., MCCOID, M.J., 1999. The threat to humans from snakebite by snakes of the genus *Boiga* based on data from Guam and other areas. In: Rodda, G.H., Sawai, Y., Chiszar, D., Tanaka, H. (Eds.), *Problem Snake Management: The Habu and the Brown Treesnakes*. Cornell University Press, Ithaca, NY, pp. 116–127.

FRY, B. (Ed.). (2015). *Venomous reptiles and their toxins: evolution, pathophysiology and biodiscovery*. Oxford University Press.

GUTIÉRREZ, J. M., ESCALANTE, T., RUCAVADO, A., HERRERA, C., & FOX, J. W. (2016). A Comprehensive View of the Structural and Functional Alterations of Extracellular Matrix by Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs): Novel Perspectives on the Pathophysiology of Envenoming. *Toxins*, 8(10), 304.

GUTIERREZ, JM., RUCAVADO, A. (2000). Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 82: 841–850.

GUTIÉRREZ, J. M., THEAKSTON, R. D. G., & WARRELL, D. A. (2006). Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *PLoS Med*, 3(6), e150.

GUTIÉRREZ, J. M., THEAKSTON, R. D. G., & WARRELL, D. A. (2006). Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *PLoS Med*, 3(6), e150.

GUTIÉRREZ, J. M., WILLIAMS, D., FAN, H. W., & WARRELL, D. A. (2010). Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon*, 56(7), 1223-1235.

HARRISON, R. A., HARGREAVES, A., WAGSTAFF, S. C., FARAGHER, B., & LALLOO, D. G. (2009). Snake envenoming: a disease of poverty. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(12), e569.

HAWGOOD, B. J. (1999). Doctor Albert Calmette 1863–1933: founder of antivenomous serotherapy and of antituberculous BCG vaccination. *Toxicon*, 37(9), 1241-1258.

HILL, A. G., & MCKILLOP, L. (2017). Fatal self-envenomation in a brown tree snake, *Boiga irregularis*, from south-east Queensland. *Toxicon*, 126, 1-3.

JACKSON, T. N., SUNAGAR, K., UNDHEIM, E. A., KOLUDAROV, I., CHAN, A. H., SANDERS, K., ... & FRY, B. G. (2013). Venom down under: dynamic evolution of Australian elapid snake toxins. *Toxins*, 5(12), 2621-2655.

JACKSON, T. N., KOLUDAROV, I., ALI, S. A., DOBSON, J., ZDENEK, C. N., DASHEVSKY, D., ... & CIPRIANI, V. (2016). Rapid radiations and the race to redundancy: An investigation of the evolution of Australian elapid snake venoms. *Toxins*, 8(11), 309.

JUÁREZ, P. (2007). Tesis doctoral. *Venómica. Mecanismos moleculares y evolutivos de la diversificación estructural de la familia de las desintegrinas*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto de Biomedicina de Valencia..

KINI, R. M., DOLEY, R. (2010). Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets. *Toxicon*, 56(6), 855-867.

LALLOO*, D. G., & THEAKSTON, R. D. G. (2003). Snake Antivenoms: Antivenoms. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 41(3), 277-290.

LOMONTE, B., ESCOLANO, J., FERNÁNDEZ, J., SANZ, L., ANGULO, Y., GUTIÉRREZ, J. M., & CALVETE, J. J. (2008). Snake venomomics and antivenomics of the arboreal neotropical pitvipers *Bothriechis lateralis* and *Bothriechis schlegelii*. *Journal of proteome research*, 7(6), 2445-2457.

- MACKESSY, S. P. (2008). Venom composition in rattlesnakes: trends and biological significance. *The biology of rattlesnakes*, 495-510.
- MACKESSY, S. P., SIXBERRY, N. M., HEYBORNE, W. H., & FRITTS, T. (2006). Venom of the Brown Treesnake, *Boiga irregularis*: ontogenetic shifts and taxa-specific toxicity. *Toxicon*, 47(5), 537-548.
- MARKLAND, F. S., SWENSON, S. (2013). Snake venom metalloproteinases. *Toxicon*, 62, 3-18.
- MCGIVERN, J. J., WRAY, K. P., MARGRES, M. J., COUCH, M. E., MACKESSY, S. P., & ROKYTA, D. R. (2014). RNA-seq and high-definition mass spectrometry reveal the complex and divergent venoms of two rear-fanged colubrid snakes. *BMC genomics*, 15(1), 1061.
- PLA, D., GUTIÉRREZ, J. M., & CALVETE, J. J. (2012). Second generation snake antivenomics: comparing immunoaffinity and immunodepletion protocols. *Toxicon*, 60(4), 688-699.
- PLA, D., SANZ, L., WHITELEY, G., WAGSTAFF, S. C., HARRISON, R. A., CASEWELL, N. R., & CALVETE, J. J. (2017). What killed Karl Patterson Schmidt? Combined venom gland transcriptomic, venomomic and antivenomic analysis of the South African green tree snake (the boomslang), *Dispholidus typus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1861(4), 814-823.
- PYRON, R. A., BURBRINK, F. T., COLLI, G. R., DE OCA, A. N. M., VITT, L. J., KUCZYNSKI, C. A., & WIENS, J. J. (2011). The phylogeny of advanced snakes (Colubroidea), with discovery of a new subfamily and comparison of support methods for likelihood trees. *Molecular phylogenetics and evolution*, 58(2), 329-342.
- REPTILE DATABASE. Snakes. Snake taxonomy. Consultado el 18 de mayo de 2017. "<http://www.reptile-database.org/db-info/taxa.html#Ser>"
- SAJEVIC, T., LEONARDI, A., & KRIŽAJ, I. (2011). Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon*, 57(5), 627-645.
- SAVIDGE, J.A., 1988. Food habits of *Boiga irregularis*, an introduced predator on Guam. *Journal of Herpetology*. 22, 275–282.
- SAVIOLA, A. J., PEICHOTO, M. E., & MACKESSY, S. P. (2014). Rear-fanged snake venoms: an untapped source of novel compounds and potential drug leads. *Toxin Reviews*, 33(4), 185-201.
- SHARMA SK, CHAPPUIS F, JHA N, BOVIER PA, LOUTAN L, et al. (2004) Impact of snake bites and determinants of fatal outcomes in southeastern Nepal. *Am J Trop Med Hyg* 71: 234–238.
- SIX, D. A., DENNIS, E. A. (2000). The expanding superfamily of phospholipase A 2 enzymes: classification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488(1), 1-19.
- TAKEDA, S., TAKEYA, H., & IWANAGA, S. (2012). Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1824(1), 164-176.
- THEAKSTON, R.D.G., WARRELL, D.A., 2000. Crisis in antivenom supply for Africa. *The Lancet*, 356 (9247), 2104.

- THORPE, R. S., WÜSTER, W., & MALHOTRA, A. (Eds.). (1997). *Venomous Snakes: Ecology, Evolution, and Snakebite* (No. 70). Clarendon Press.
- UTKIN, Y. N. (2015). Animal venom studies: Current benefits and future developments. *World journal of biological chemistry*, 6(2), 28.
- VONK, F. J., ADMIRAAL, J. F., JACKSON, K., RESHEF, R., DE BAKKER, M. A., VANDERSCHOOT, K., & MIRTSCHIN, P. J. (2008). Evolutionary origin and development of snake fangs. *Nature*, 454(7204), 630-633.
- WARRELL DA (1995) Clinical toxicology of snakebite in Asia. In: Meier J, White J, editors. *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons*. Boca Raton (Florida): CRC Press. pp. 493–594.
- WARRELL DA (1995) Clinical toxicology of snakebite in Africa and the Middle East/Arabian peninsula. In: Meier J, White J, editors. *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons*. Boca Raton (Florida): CRC Press. pp. 433–492.
- WARRELL, D. A. (1997). 14 Geographical and intraspecies variation in the clinical manifestations of envenoming by snakes. In *Symposia of the Zoological Society of London* (Vol. 70, pp. 189-203). London: The Society, 1960-1999.
- WARRELL, D. A. (2010). Snake bite. *The Lancet*, 375(9708), 77-88.
- WARRELL, DA., ARNETT, C. (1976). The importance of bites by the saw-scaled or carpet viper (*Echis carinatus*) . *Epidemiological studies in Nigeria and a review of the world literature. Acta Trop* 33: 307–341.
- WEINSTEIN, S. A., WHITE, J., KEYLER, D. E., & WARRELL, D. A. (2013). Non-front-fanged colubroid snakes: a current evidence-based analysis of medical significance. *Toxicon*, 69, 103-113.
- WILES, G.J., 1987. The status of fruit bats on Guam. *Pac. Sci.* 41, 148–157.
- WILLIAMS, D. J., GUTIÉRREZ, J. M., CALVETE, J. J., WÜSTER, W., RATANABANANGKON, K., PAIVA, O., ... & O'SHEA, M. (2011). Ending the drought: new strategies for improving the flow of affordable, effective antivenoms in Asia and Africa. *Journal of proteomics*, 74(9), 1735-1767.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010. Neglected tropical diseases. Consultado el 18 de mayo de 2017. "http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/".
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010. WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. World Health Organization, Geneva. Consultado el 18 de mayo de 2017. 'http://www.who.int/bloodproducts/snake_antivenoms/snakeantivenomguide/en/'.