

Inmunógenos recombinantes tipo fosfolipasa A2 y toxina de tres dedos para la producción de antivenenos de interés clínico en Colombia

Luz E. Romero¹, Vitelbina Nuñez¹, Paola Rey¹, Sergio Pulido²,
Mónica Saldarriaga³, Jaime A. Pereañez¹

El envenenamiento ofídico es una enfermedad tropical desatendida de alto impacto en países de las zonas tropicales y subtropicales del mundo. Una amplia distribución de serpientes en todo el territorio nacional, especialmente en regiones densamente pobladas, constituye un riesgo de morbimortalidad en Colombia. Los géneros *Crotalus* y *Micrurus* causan el 1% y el 2% de los envenenamientos ofídicos en el territorio colombiano, respectivamente. La neurotoxicidad del veneno del género *Micrurus* se debe a las β -neurotoxinas que inhiben la liberación de acetilcolina a nivel presináptico, como la fosfolipasa A2 (PLA2), y las α -neurotoxinas, como las toxinas de tres dedos (3FTx), que bloquean la acción nicotínica. Cambiar el receptor nicotínico de la acetilcolina. Por su parte, la neurotoxicidad producida por el veneno del género *Crotalus* reside en las β -neurotoxinas como la PLA2 enzimáticamente activa.

En este contexto, el antiveneno es la inmunoterapia más eficaz para el tratamiento de víctimas de envenenamientos ofídicos. Sin embargo, la obtención y disponibilidad del veneno necesario para producir antígenos es difícil, esto se debe principalmente a la dificultad para obtener el veneno necesario de *Micrurus* para la producción de anticuerpos y a la baja neutralización del antiveneno polivalente contra el veneno de *Crotalus*. En este sentido, el objetivo de esta investigación es desarrollar inmunógenos recombinantes tipo PLA2 y 3FTxs para producir antivenenos de interés clínico en Colombia.

Para el diseño de las construcciones genéticas, se emplearon las secuencias de aminoácidos de las neuro-

toxinas α y β de los venenos con efecto neurotóxico de tres especies de serpientes: *Micrurus mipartitus*, *Micrurus dumerilii* y *Crotalus durissus terrificus*. Las secuencias se obtuvieron de la base de datos de proteínas UniProt (<http://www.uniprot.org>) y se optimizaron con el uso preferencial de codones en *Leishmania tarentolae* y *Spodoptera frugiperda* según la base de datos de <http://www.kazusa.or.jp/codon>. La construcción genética generada para cada neurotoxina incluyó codones de inicio y parada, secuencias de restricción específicas, una etiqueta de histidinas, un linker glicina-serina y una secuencia de reconocimiento de la proteasa TEV. Debido a la similitud del uso codónico entre *L. tarentolae* y *Escherichia coli*, las construcciones genéticas optimizadas para *L. tarentolae* también incluían secuencias para sitios de restricción de *E. coli*.

La síntesis de los constructos genéticos se contrató con General Biosystems empleando el vector de clonación comercial pUC57_BsaI_Free. Las neurotoxinas fueron clonadas en los vectores de expresión: pET28a y pFast-Bac, y su expresión, hasta el momento, se realizó en las cepas BL21 (DE3)-ArticExpress, BL21 (DE3)-RIPL, BL21 (DE3)-pLysS y BL21 (DE3) de *E. coli*. No obstante, también se expresará en células Sf9 de insecto y se establecerá el mejor modelo de expresión y de purificación de las proteínas recombinantes. Obtenidas las neurotoxinas recombinantes, se evaluará su función *in vivo* para determinar su letalidad, e *in vitro* para determinar su función fosfolipasa A2 y actividad miotóxica.

Posteriormente, se producirán sueros hiperinmunes anti-neurotoxina recombinante a partir de la generación de anticuerpos en un esquema de inmunización en conejos, con dosis crecientes de inmunógenos y, a intervalos de 20 días después de la primera inoculación, durante cinco meses. Los títulos de anticuerpos y el reconocimiento se analizarán mediante inmunoensayo enzimático de doble anticuerpo, que detectará los niveles de anticuerpos de cada antiveneno. Finalmente, para la neutralización de las neurotoxinas recombinantes por el suero hiperinmune específico, se utilizará la prueba de neutralización de letalidad. Como resultados preliminares, se seleccionaron las neurotoxinas B3EWF8 (3FTx-Mmip), C0HKB9 (PLA2-Mmip), C0HKB8 (PLA2-Mdum) y P0CG56 (PLA2-Cdt), con las cuales, se diseñaron ocho construcciones genéticas: cuatro optimizadas para *L. tarentolae* y cuatro para *S. frugiperda*.

¹ Grupo de Investigación en Toxinología, Alternativas Terapéuticas y Alimentarias. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

² Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales – PECET. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

³ Universidad Bernardo O'Higgins. Santiago de Chile, Chile.

Correo electrónico de contacto: andrespj20@gmail.com

Financiación del Proyecto: Proyecto COLCIENCIAS 11157757474

Se obtuvieron clones del tamaño esperado en pET28a y en pFastBac para cada neurotoxina.

Las 4 neurotoxinas clonadas en pET28a se expresaron como cuerpos de inclusión en cada una de las 4 cepas evaluadas de *E. coli*. El análisis de expresión usando SDS-PAGE 14% Tris-Tricina, permitió confirmar la presencia de la proteína recombinante con una masa molecular similar a la esperada. La cepa de *E. coli* que mejor expresó cada una de las α y β neurotoxinas recombinantes fue BL21 (DE3). Al final de este proyecto, se espera obtener: 1) Neurotoxinas recombinantes biológicamente activas. 2) Anticuerpos específicos para cada neurotoxina recombinante. De esta manera, el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante se utilizará para innovar en la producción de proteínas de relevancia clínica y en la generación de anticuerpos con nuevas propiedades, contribuyendo a la disminución de las tasas de morbilidad y mortalidad en el país.

BIBLIOGRAFÍA

1. Calvete JJ. Next-generation snake venomomics: protein-locus resolution through venom proteome decomplexation. *Exp. Rev. Proteomics*. 2014;11: 315e329.
2. De la Rosa, G., Corrales-García, L. L., Rodríguez-Ruiz, X., López-Vera, E., & Corzo, G. (2018). Short-chain consensus alpha-neurotoxin: a synthetic 60-mer peptide with generic traits and enhanced immunogenic properties. *Amino Acids*. 2018; 50(7), 885–895.
3. Gonzalez, A. Fillat, M. 2018. Aspectos metodológicos de la expresión de Proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista de Educación Bioquímica (REB)* 37(1):14-27.
4. Guerrero, J.F., Benard, M., Restano, R., Zamudio, F., Corzo, G., Alagon, A. Olvera, A. 2018. Cloning and sequencing of tree-finger toxins from the venom glands of four *Micrurus* species from Mexico and heterologous expression of an alpha-neurotoxin from *Micrurus diastema*. *Biochimie* 147: 114-121.
5. Jimenez, J., Quintero, V., Gonzalez, L, Ortiz, E. y Possani, L. 2017. Design and expression of recombinant toxins from Mexican scorpions of the genus *Centruroides* for production of antivenoms. *Toxicon* 128:5-14.
6. Kianmehr, A., Golavar, R., Rouintan, M., Mahrooz, A., Fard-Esfahani, P., Oladnabi, M., Khajeniazi, S., Mostafavi, S., Omidinia, E. 2016. Cloning and expression of codon-optimized recombinant darbeoetin alfa in *Leishmania tarentolae* T7-TR. *Protein Expression and Purification* 118: 120e125.
7. Marchi, D., Corre[^]a, L., Magro, A., Oliveira, C., Soares, A., Fontes, M. 2008. Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A2 formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Proteins* 72:883–891.
8. Mayo K., Martínez L.M., Palomares M. 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.
9. Ohmuro, Y., Yamaji, H. 2017. Modifications of a signal sequence for antibody secretion from insect cells. Springer Science+Business. *Cytotechnology*. DOI 10.1007/s10616-017-0109-0.
10. Osipov A, Utkin Y. Snake venom toxins targeted at the nervous system. In: Gopalakrishnakone P Inagaki H, Vogel CW, Mukherjee AK, Tarek Rashed Rahmy (eds), *Clinical Toxicology*. Springer Science Business Media. Dordrecht. 2017:196-198. ISBN 978-94-007-641-8.
11. Pereañez, J.A., Núñez, V., Huancahurie, S., Marangoni, S., Ponce, L.A. 2009. Biochemical and biological characterization of a PLA2 from crotoxin complex of *Crotalus durissus cumanensis*. *Toxicon*. 53(5):534-542.
12. Pereañez, J.A., Patiño, A.C., Henao-Castañeda, I.C. 2014. Toxinas provenientes de venenos de serpiente: blancos terapéuticos, herramientas en investigación biomédica y agentes con potencial terapéutico. *Curare*. 1(1): 49-60.
13. Pérez, N., Rojo, C., De Vicente M.L., y Encinas, M.T. 2008. Estudio del veneno de serpientes: tipos y tratamientos. Departamento de Toxicología y Farmacología, Universidad Complutense de Madrid. ISSN: 1988-2688RCCV Vol. 2 (2).
14. Rey, P, Acosta, C., Torres U., Saldarriaga, M., Lomonte B., Núñez, V. 2018. MipLAAO, a new L-amino acid oxidase from the redtail coral snake *Micrurus mipartitus*. *PeerJ* 6:e4924.
15. Rey, P, Núñez, V., Saldarriaga, M., Lomonte, B. 2017. Primary structures and partial toxicological characterization of two phospholipases A2 from *Micrurus mipartitus* and *Micrurus dumerillii* coral snake venoms. *Biochimie*. doi: 10.1016/j.biochi.2017.03.008.
16. Rey, P Saldarriaga, M., Torres, U., Marin, M., Lomonte, B., Núñez, V. 2019. Novel three-finger toxins from

Micrurus dumerilii and *Micrurus mipartitus* coral snake venoms: Phylogenetic relationships and characterization of Clarkitoxin-I-Mdum. *Toxicon* 170: 85–93.

17. Rey, P., Stuani, R. F., Rostelato, S., Núñez, V., Rodrigues, L., Lomonte, B. 2012. Mipartoxin-I, a novel three-finger toxin, is the major neurotoxic component in the venom of the redtail coral snake *Micrurus mipartitus* (Elapidae). *Toxicon* 60: 851–863.
18. Rojas, A. 2017. Instituto Nacional de Salud, Grupo Zoonosis, Informe Epidemiológico del comportamiento accidente ofídico, Colombia.
19. Russo, R., Nascimento dos Santos Júnior, N., Oliveira, A., Moraes, L., Vilela, S., Aquino, V. 2019. Expression, purification and virucidal activity of two recombinant isoforms of phospholipase A2 from *Crotalus durissus terrificus* venom. Springer Nature. *Archives of Virology* <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04172-6>
20. Sarmiento K, Rodríguez A, Quevedo-Buitrago W, Torres I, Ríos C, Ruiz L, Salazar J, Hidalgo-Martínez P Comparación de la eficacia, la seguridad y la farmacocinética de los antivenenos antiofídicos: revisión de literatura. *Univ.Med.* 2020;61(1). <https://doi.org/10.11144/Javeriana.umed.Vol.61-1.anti>.