



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Caracterización del veneno de *Micrurus fulvius* y biodistribución  
*in vivo* de su principal toxina radiomarcada con  $^{67}\text{Galio}$

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Irene Vergara Bahena

TUTOR PRINCIPAL

[Dr. Alejandro Alagón Cano IBT-UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

[Dr. Luis Alberto Medina Velázquez, Instituto de Física-UNAM](#)

[Dr. Jean Louis Charli Casalonga, IBT-UNAM](#)

MÉXICO, D. F. enero, 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Alejandro Alagón Cano.

Se agradece el apoyo financiero otorgado por DGAPA a través de los proyectos: IN205214 y IN225014; a CONACyT a través de los proyectos No. C382-08, No. 154557 y del proyecto INFR-2014 No. 224494. A la Universidad de Arizona a través de proyecto P-346 para la realización del presente trabajo. También se agradece a CONACyT por la beca No. 215022 otorgada para estudios de posgrado y al Tecnológico de Monterrey a través del premio Luis Elizondo 2014, por haber proporcionado parte del apoyo económico para la escritura de esta tesis.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Alejandro Alagón Cano por darme la oportunidad de desarrollar el proyecto de mi tesis en su grupo de investigación, por su valiosa instrucción académica y por impulsarme en mi crecimiento académico.

A los miembros de mi comité tutorial:

Dr. Jean Louis Charli Casalonga

Dr. Luis Alberto Medina Velázquez

Porque gracias a sus observaciones y sugerencias el proyecto se enriqueció y se lograron resultados valiosos de gran aporte en el área de los venenos y antivenenos.

A los miembros del Jurado:

Dra. Liliana Pardo López

Dr. Christopher Wood

Dra. Leslie V. Boyer

Dra. Patricia García López

Dra. Rosa María Uribe Villegas

Por su importante aportación en la revisión de este trabajo, ya que gracias a sus comentarios y observaciones se enriqueció el contenido de esta tesis.

Al Instituto de Biotecnología de la UNAM por las facilidades otorgadas en la realización de esta tesis y por mi formación académica.

Al laboratorio de Física médica del Instituto Nacional de Cancerología por facilitarme el uso de sus instalaciones y del equipo de imagen molecular micro-PET/SPECT/CT.

Al Q.F.B Erick Yahir Castillo Ochoa, la M en C. Itzel M. Torres Víquez, al Técnico Radiólogo Mario Esau Romero Piña y la Q.F.B Josefina García Rojas, por el apoyo técnico en los experimentos de radiomarcaje, imagen molecular y radio-farmacocinética.

Al Venom Immunochemistry, Pharmacology and Emergency Response (VIPER) Institute y Lymphology Laboratories de la Universidad de Arizona, por el apoyo técnico en el estudio del sistema linfático de ratas.

Al Biólogo Felipe Olvera Rodríguez, al M en C. Alejandro Olvera Rodríguez y la M en C. Herlinda Clement por el apoyo técnico en los experimentos bioquímicos.

A la Dra. Martha Pedraza por el apoyo técnico en el estudio proteómico del veneno.

A la Dra. Rita Restano Cassulini por el apoyo técnico en los experimentos de electrofisiología.

Al Dr. Fernando Zamudio por el apoyo en la determinación de masas moleculares.

Al Dr. Domingos Lourival Possani Postay por el apoyo para la realización de algunos experimentos en su laboratorio y por el apoyo académico brindado.

Al Dr. Gerardo Corzo Burguete por el apoyo académico y asesoría para la realización de algunos experimentos.

A la Dra. Dayanira S. Paniagua Meza por el apoyo en la realización de los análisis farmacocinéticos.

A Ricardo Mondragón, Angélica Linares y Daniel Gama por el apoyo logístico en la realización de esta tesis.

Al Ing. Jalil Saab Hassanille, al Lic. José Antonio Bolaños Guillen y a Gloria Villa Herrera. De la unidad de docencia, por su apoyo administrativo.

## **DEDICATORIA**

Esta tesis representa la culminación de un proyecto de vida que inició hace doce años, por lo cual está dedicada a mi familia, amigos, compañeros de laboratorio y profesores, quienes me acompañaron durante este trayecto, y que con su apoyo moral, emocional y académico fueron el soporte y la fuerza que me impulso para no rendirme en los momentos difíciles.

Está dedicada especialmente a mis hijos Mitzi y Guillermo por creer siempre en mi persona, por regalarme su amor, paciencia y apoyo incondicional en todo momento.



**“Cuando creíamos que teníamos todas las respuestas,  
de pronto, cambiaron todas las preguntas.”**

Mario Benedetti

## Contenido

Índice de Figuras .....	9
Índice de Tablas .....	10
Resumen .....	13
Abstract .....	15
1. Antecedentes .....	17
2. Marco teórico .....	21
2.1 Veneno .....	21
2.2 <i>Micrurus fulvius</i> .....	21
2.3 Espacio subcutáneo.....	23
2.4 Sistema linfático .....	24
2.5 Farmacocinética .....	28
2.6 Imagen molecular SPECT-CT .....	29
2.7 Agentes quelantes bifuncionales .....	30
2.8 Radionúclidos.....	31
3. Hipótesis.....	33
4. Objetivo principal.....	33
4.1 Objetivos particulares.....	33
5. Metodología .....	34
5.1 Caracterización del veneno completo de <i>Micrurus fulvius</i> .....	34
5.1.1 Determinación de la dosis letal media (DL <sub>50</sub> ) .....	34
5.1.2 Actividad fosfolipasa A <sub>2</sub> (PLA <sub>2</sub> ) .....	34
5.1.3 Actividad hialuronidasa.....	34
5.1.4 Electroforesis de dos dimensiones (2D-PAGE) .....	35
5.1.5 Identificación de proteínas por espectrometría de masas .....	35
5.1.6 Fraccionamiento del veneno por HPLC de fase reversa .....	36
5.2 Caracterización de las fracciones del veneno de <i>M. fulvius</i> .....	36
5.2.1 DL <sub>50</sub> y actividad PLA <sub>2</sub> .....	36
5.2.2 Electrofisiología .....	37
5.2.3 Refraccionamiento de la fracción E por HPLC de intercambio catiónico .....	37

5.2.4	Secuenciación amino terminal.....	38
5.3	Farmacocinética y biodistribución de la principal $\beta$ -neurotoxina de <i>M. fulvius</i> .....	38
5.3.1	Bioconjugación de la $\beta$ -neurotoxina y albúmina sérica bovina con DTPA .....	38
5.3.2	Evaluación de la actividad biológica de la $\beta$ -neurotoxina-DTPA .....	39
5.3.3	Radiomarcaje, pruebas de pureza radioquímica y estabilidad.....	39
5.3.4	Tiempo de residencia de la $\beta$ -Neurotoxina en el sitio de inoculación.....	40
5.3.5	Biodistribución por Imagen.....	41
5.3.6	Cinéticas plasmáticas .....	41
6.	Resultados y discusión .....	42
6.1	Caracterización del veneno completo.....	42
6.1.1	Dosis Letal media.....	42
6.1.2	Actividad fosfolipasa A <sub>2</sub> .....	42
6.1.3	Actividad hialuronidasa.....	43
6.1.4	Electroforesis de dos dimensiones (2D-PAGE) .....	43
6.1.5	Fraccionamiento del veneno por HPLC de fase reversa y caracterización de las fracciones aisladas.....	48
6.1.6	Letalidad de las fracciones aisladas.....	49
6.1.7	Actividad PLA <sub>2</sub> y alfa neurotóxica .....	50
6.1.8	Electrofisiología de las fracciones con peso molecular de 6-7.5 kDa.....	52
6.1.9	Secuenciación amino terminal.....	55
6.2	Farmacocinética y biodistribución de la principal $\beta$ -NTx de <i>M. fulvius</i> .....	55
6.2.1	Bioconjugación de la $\beta$ -NTx o BSA con el quelante DTPA .....	55
6.2.2	Actividad biológica de la $\beta$ -NTx-DTPA .....	56
6.2.3	Eficiencia del radiomarcaje y pureza radioquímica .....	57
6.2.4	Evaluación de la estabilidad en suero.....	57
6.3	Tiempo de residencia de la <sup>67</sup> Ga-DTPA- $\beta$ -NTx en el sitio de inoculación.....	58
6.4	Biodistribución por imagen .....	59
6.5	Biodistribución en órganos .....	60
6.6	Radiofarmacocinética.....	63
7.	Resumen de resultados .....	71
8.	Conclusión.....	71

9. Perspectivas.....	72
10. Referencias.....	73

## Índice de Figuras

Figura 1.	Esquema de la unión neuromuscular y los sitios de acción de las neurotoxinas.....	22
Figura 2.	Esquema de los vasos linfáticos iniciales.....	24
Figura 3.	Esquema de los vasos linfáticos colectores.....	25
Figura 4.	Esquema del sistema linfático humano.....	26
Figura 5.	Relación entre el peso molecular y la absorción linfática.....	27
Figura 6.	Estructura química del quelante DTPA.....	30
Figura 7.	Perfil electroforético de <i>M. fulvius</i> en gel de dos dimensiones.....	45
Figura 8.	Perfil cromatográfico de <i>M. fulvius</i> en RP-HPLC.....	49
Figura 9.	Inhibición del nAChR en células TE-671.....	52
Figura 10.	Cromatograma de la fracción E separada por HPLC-catiónico.....	53
Figura 11.	Determinación de la IC50 para cada componente de la fracción E.....	53
Figura 12.	Proporción de componentes de diferentes venenos de <i>Micrurus sp.</i> .....	54
Figura 13.	Perfil electroforético de dos dimensiones de la $\beta$ -neurotoxina nativa y bioconjugada.....	56
Figura 14.	Biodistribución del $^{67}\text{Ga}$ libre por SPECT/CT.....	59
Figura 15.	Biodistribución de la $\beta$ -Neurotoxina-DTPA- $^{67}\text{Ga}$ por SPECT/CT.....	60
Figura 16.	Biodistribución en órganos 24 h después de la inyección.....	62
Figura 17.	Cinética plasmática de la NTx radiomarcada y administrada vía IV.....	63
Figura 18.	Cinética plasmática de la NTx radiomarcada y administrada vía SC.....	64
Figura 19.	Comparativo de la farmacocinética de la NTx radiomarcada e inyectada por vía IV y SC.....	65
Figura 20.	Cinética plasmática del $^{67}\text{Ga}$ administrado vía IV.....	67
Figura 21.	Cinética plasmática del $^{67}\text{Ga}$ administrado vía SC.....	68
Figura 22.	Comparativo del comportamiento farmacocinético de $^{67}\text{Ga}$ después de la administración IV y SC.....	69

## Índice de Tablas

Tabla 1. Grupos experimentales para los estudios farmacocinéticos.....	41
Tabla 2. Secuencias identificadas en el proteoma del veneno de <i>M. fulvius</i> .....	46
Tabla 3. Caracterización de los componentes del veneno de <i>M. fulvius</i> .....	51
Tabla 4. Secuencias amino terminal por degradación de Edman.....	55
Tabla 5. Biodistribución en órganos 24 h post-inyección.....	61
Tabla 6. Parámetros farmacocinéticos de $^{67}\text{Ga}$ -DTPA- $\beta$ -NTx.....	66
Tabla 7. Parámetros farmacocinéticos del $^{67}\text{Ga}$ -libre.....	70

## Índice de abreviaturas

DTPA	Ácido Dietilen-Triamino-Pentaacético
BFC	Agente quelante bifuncional
BSA	Albúmina sérica bovina
AUC	Área bajo la curva
AUMC	Área bajo la curva del primer momento
Bq	Bequerel
$\beta$ -NTx	Beta-Neurotoxina
F	Biodisponibilidad
$C_z$	Concentración final
$CI_{50}$	Concentración inhibitoria media
$C_{p_{max}}$	Concentración plasmática máxima
$\lambda_z$	Constante de decaimiento
CT	Tomografía computarizada
Itlc	Cromatografía instantánea en capa fina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
LC/MS/ESI	Cromatografía líquida/Espectometría de masas/Ionización por electrospray
Ci	Curie
Da	Dalton
CL	Depuración
SDS-PAGE	Dodecil-sulfato de sodio gel electroforético de poliacrilamida
$DL_{50}$	Dosis Letal Media
PK	Farmacocinética
$PLA_2$	Fosfolipasa $A_2$
$^{67}\text{Ga}$	Galio-67
$^{111}\text{In}$	Indio-111
IM	Intramuscular
IV	Intravenosa
keV	Kilo electron Volt
nAChR	Receptor nicotínico para acetilcolina

SC	Subcutánea
$^{99m}\text{Tc}$	Tecnecio-99 metaestable
$t_{\text{max}}$	El tiempo en el que se alcanza $C_{\text{max}}$
$t_z$	Tiempo final del experimento
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media
MAT	Tiempo promedio de absorción
MRT	Tiempo promedio de retención
SPECT	Tomografía computarizada por emisión de fotón único
3FTx	Toxina de tres dedos
$V_d$	Volumen de distribución inicial
$V_{ss}$	Volumen en estado estacionario
$^{125}\text{I}$	Yodo-125

## Resumen

En este trabajo se presenta la caracterización del veneno de *Micrurus fulvius*, así como la cinética y biodistribución de la principal fosfolipasa A<sub>2</sub> neurotóxica, radiomarcada con el radionúclido de emisión gamma Galio-67 (<sup>67</sup>Ga).

La Dosis Letal media (DL<sub>50</sub>) intravenosa del veneno medida en ratones, resultó de 0.3 µg/g. El fraccionamiento del veneno por HPLC en una columna C-18 separó 22 fracciones; de las cuales en términos de abundancia, el 58.3% corresponde a componentes de 13–14 kDa y el 24.9% está conformado por moléculas de 6–7 kDa. El veneno contiene dos fracciones que representan el 33.4% del veneno completo, éstas fueron las más letales en ratones y las que tienen mayor actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). *In vitro*, las fracciones de bajo peso molecular (<7000 Da) bloquearon parcialmente y en forma reversible al receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) tipo muscular, de la línea celular TE-671, a excepción de la fracción E la cual lo bloqueó completamente. La fracción E presentaba dos componentes, los cuales fueron separados y se les determinó la curva dosis-respuesta en las células TE-671; la concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) fue de 13 ± 1 y 9.5 ± 0.3 nM. A pesar de que los componentes de bajo peso tuvieron efecto sobre el nAChR, ninguno de ellos resultó letal en ratones con 1 µg/g, ni se presentaron síntomas visibles de envenenamiento.

A partir de la caracterización proteómica del veneno, se identificaron catorce isoformas de PLA<sub>2</sub>, cuatro lectinas tipo-C, tres zinc-metaloproteasas, y una fosfodiesterasa. La secuencia amino terminal se obtuvo sólo para las fracciones que mostraron actividad biológica.

El 70% de la PLA<sub>2</sub> neurotóxica radiomarcada e inyectada por vía subcutánea (SC) desapareció de sitio de inyección después tres horas; posteriormente, la absorción fue más lenta y 48 h más tarde aún quedaba el 10% en el sitio de inoculación. Esto demuestra que el sitio de inyección funciona como un depósito desde donde se absorbe la toxina por largo tiempo. La acumulación máxima de la PLA<sub>2</sub> en los órganos ocurrió 3 h post-inyección, los principales sitios de captación fueron los ganglios poplíteos y lumbares, los riñones y en menor proporción la vejiga.

El tiempo de vida media de la PLA<sub>2</sub> radiomarcada e inyectada vía SC fue cinco veces mayor comparado con la intravenosa. El volumen de distribución cercano al 150% sugiere que la neurotoxina se distribuye en el espacio intersticial y tejido profundo. La dosis de la PLA<sub>2</sub> inyectada por vía SC se absorbe casi por completo a las 48 h, dado que a este tiempo

la biodisponibilidad fue de 93%. El Galio-67 libre mostró un comportamiento cinético completamente distinto al de la PLA<sub>2</sub> radiomarcada por lo cual no interfiere en el análisis cinético.

Los resultados que aquí se presentan contribuyen a entender mejor el desarrollo del envenenamiento causado por el veneno de *M. fulvius*, y aportan información útil para el diseño y mejoramiento de los antivenenos.

## Abstract

This work characterizes of coral snake *Micrurus fulvius* venom, and the biodistribution and kinetics of the main Phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxin (PLA<sub>2</sub>) radiolabeled with the gamma emitter radionuclide, Gallium-67 (<sup>67</sup>Ga).

The intravenous media Lethal Dose (LD<sub>50</sub>) of the venom tested in mice was 0.3 µg/g. The HPLC fractionation on a C-18 column yielded 22 fractions; which in terms of abundance, featured 58.3% proteins of 13-14 kDa, and 24.9% of proteins in the 6-7 kDa range. Two fractions with phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) activity represented 33.4% of the whole venom and were the most lethal fractions in mice. *In vitro*, fractions with low molecular mass (<7000 Da) partially and reversibly blocked the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) expressed in TE-671 cells, where fraction E blocked nAChR completely. Fraction E contained two proteins, which were separated and dose–response determined; the media inhibitor concentrations (IC<sub>50</sub>s) were 13 ± 1 and 9.5 ± 0.3 nM. Despite the effects of the low molecular mass fractions on nAChR, none of these fractions were lethal to mice at concentrations of 1 µg/g, with the mice showing no visible envenomation symptoms.

Proteomic characterization identified fourteen protein isoforms of PLA<sub>2</sub>, four of C-type lectin, three of zinc metalloproteinases, and one phosphodiesterase. The N-terminal amino acid of fractions with biological interest obtained.

A high amount (70%) of radiolabeled PLA<sub>2</sub> was absorbed from the injection site 3 h after subcutaneous (SC) injection and 10% of the toxin remains by 48 hours; it demonstrates that the inoculation site works as a “depot”. The biodistribution of this PLA<sub>2</sub> showed that the high accumulation in organs occurred 3 h after subcutaneous injection with principal regions of accumulation occurring in the local popliteal and lumbar nodes, kidneys and bladder. Biodistribution analysis confirmed the participation of the lymphatic system in the absorption process and renal elimination.

Subcutaneous kinetics of radiolabeled PLA<sub>2</sub> showed that the half life time, is five times greater compared with the intravenous administration. Distribution volume at the stationary state (150%) suggests that the PLA<sub>2</sub> is distributed in the interstitial space and deep tissues. At 48 h post-injection, high bioavailability was found (93%). Intravenous and subcutaneous kinetics of the <sup>67</sup>Ga were completely different relative to PLA<sub>2</sub> kinetics, thus <sup>67</sup>Ga does not affect the kinetic analysis of radiolabeled PLA<sub>2</sub>.

The results reported here contribute to our understanding of envenomation development and could help improve antivenom design and production in the future.

## 1. Antecedentes

Los accidentes por mordedura de coralillos en humanos son escasos debido a su conducta no agresiva y a sus hábitos nocturnos, éstos representan solo el 4.5% de las mordeduras por serpientes venenosas en Estados Unidos (Kitchens y Van Mierop, 1987; Walter et al., 1999). Existen diversos factores que hacen complicado el diagnóstico de envenenamiento por coralillos, tales como: (1) confundirlas con serpientes no venenosas conocidas como falsas coralillo; (2) no siempre se presenta la marca de los colmillos; (3) la cantidad de veneno inoculado es variable y la aparición de los síntomas no es inmediata (Walter et al., 1999).

En 1967, la farmacéutica Wyeth comenzó a comercializar el antiveneno llamado NACSA (North American Coral Snake Antivenin), desarrollado contra el veneno de las especies norteamericanas: *M. fulvius* y *M. tener*; a partir de que se comercializó este antiveneno ya no hubo registros de muerte por mordedura de coralillos en E.U. (Sánchez et al., 2008). Sin embargo, desde 2006 Wyeth dejó de producir el NACSA, por lo que a partir de esa fecha en E.U. se busca tener un nuevo antiveneno con la misma efectividad. México ha sido líder en el desarrollo y producción de antivenenos que se usan en nuestro país, en Latinoamérica y en otras partes del mundo; por lo cual, el estudio de la principal especie de coral en E.U (*M. fulvius*) podría contribuir al desarrollo de un nuevo antiveneno contra coralillos en ese país, además de generar información científica útil en el análisis de venenos de corales mexicanas.

Anterior a este trabajo el veneno de la especie *M. fulvius* había sido poco estudiado; sin embargo, se conocía de su neurotoxicidad por la sintomatología presentada en casos clínicos y por los estudios en otros venenos del mismo género (Kitchens y Van Mierop, 1987; de Roodt et al., 2012). En este veneno se han encontrado componentes con actividad enzimática como: PLA<sub>2</sub>, hialuronidasa, fosfomonoesterasa alcalina, 5' nucleotidasa, fosfodiesterasa, L-aminoácido oxidasa y acetilcolinesterasa (Aird y Da Silva, 1991; Cecchini et al., 2005; Norris y col., 2009; Tanaka y col., 2010; Tan y col., 1992).

La toxicidad de *M. fulvius in-vivo* fue analizada por Weis y Mc Issac en 1971, ellos analizaron el envenenamiento en gatos a los cuales les inyectaron el veneno por vía intravenosa. Los efectos que reportaron fueron, depresión neuromuscular y respiratoria

progresiva, así como posible daño al miocardio e hipotensión que no responde a vasoconstrictores. Los autores sugieren que la hipotensión fue la principal causa de muerte en los gatos. Además, analizaron distintos efectos tóxicos del veneno *in vitro*, sobre preparaciones de nervio frénico y diafragma de ratas; lo que observaron fue que ocurre bloqueo neuromuscular en respuesta a la estimulación directa, que es irreversible y no antagonizada por neostigmina o edrofonio (inhibidores de la acetilcolinesterasa). En preparaciones de fibras musculares de sóleo, observaron la despolarización de membrana y la degeneración hialina; y en preparaciones de ventrículo cardiaco encontraron una reducción en la contracción muscular, independiente de concentración. En éste trabajo, se concluye que el veneno actúa de manera análoga a la cardiotoxina de cobra y se sugiere la existencia de un componente tóxico que bloquea los receptores de acetilcolina.

En 1972, Ramsey y colaboradores analizaron el envenenamiento en perros anestesiados inyectando el veneno por vía intravenosa. Los autores reportaron alteración severa en la dinámica cardiovascular y en la contracción del miocardio; ellos concluyen que ésta fue la causa de la muerte en los animales.

En 2012, de Roodt et al., realizaron un estudio con seis especies de coralillos (*M. altirostris*, *M. balyocoriphus*, *M. fulvius*, *M. nigrocinctus*, *M. phyrrocriptus* y *M. surinamensis*), en el cual evaluaron la letalidad, actividad PLA<sub>2</sub>, miotoxicidad y nefrotoxicidad. Todos los venenos fueron altamente letales en ratones, con DL<sub>50</sub>s desde 0.24 hasta 2.34 µg/g, típica de venenos neurotóxicos. En cuanto a la actividad de PLA<sub>2</sub>, el veneno de *M. fulvius* presentó la más alta. En el envenenamiento experimental con *M. fulvius* y *M. nigrocinctus* en ratas, encontraron incrementó en la uremia y coloración marrón de la orina, así como el aumento de más de 10 veces los niveles de creatina cinasa (CK) en sangre. Los autores concluyen que *M. fulvius* y *M. nigrocinctus* son venenos miotóxicos y nefrotóxicos en roedores. El aumento significativo en los niveles de CK en sangre también se ha reportado en algunos casos clínicos atribuidos a *M. fulvius* (Kitchens y Van mierop, 1987).

En nuestro grupo de investigación, hemos observado que durante el envenenamiento experimental en roedores con los venenos de *M. fulvius*, *M. laticollaris* y *M. tener*, aparece orina de color marrón aproximadamente 30 min después de la inoculación del veneno; esto

sugiere que podría causar mitotoxicidad, sin embargo, es necesario realizar experimentos más específicos para obtener resultados concluyentes.

Además de estudiar el veneno y sus componentes, otro aspecto importante es el comportamiento que tiene al entrar al organismo; es decir, su farmacocinética (PK). Típicamente, la farmacocinéticas reportadas para distintos venenos y/o toxinas se han realizado midiendo únicamente lo que llega a sangre (Ismail y Abd-Elslam, 1998; Sevcik *et al.*, 2004; Vázquez *et al.*, 2005; Hammoudi-Triki *et al* 2007., Vázquez *et al.*, 2010); sin embargo, en el caso de venenos de serpiente, el análisis en sangre no está totalmente apegado a la realidad, debido a que de manera natural la serpiente inyecta el veneno por vía subcutánea (SC) o intramuscular (IM), y dado que los componentes tóxicos son de naturaleza proteica, podrían absorberse tanto por el sistema circulatorio como por vía linfática.

En las últimas dos décadas la participación de la vía linfática en la absorción de proteínas inyectadas por vía subcutánea ha sido ampliamente demostrada (Charman *et al.*, 2000). La participación del sistema linfático en el proceso de absorción de venenos fue sugerida desde 1939 por Fidler *et al.*, y en 1941 por Barnes y Trueta; sin embargo, no se le dio la importancia necesaria.

Recientemente, nuestro grupo de investigación, realizó el análisis PK de *M. fulvius* en un modelo experimental de borrego, en el cual se analizó por primera vez el papel del sistema linfático en el proceso de absorción del veneno. En este estudio PK el veneno se inyectó por vía SC, se tomaron muestras de sangre, linfa y orina a distintos tiempos durante seis horas, y se cuantificó el veneno mediante un inmunoensayo de ELISA. Los resultados mostraron que el 69% de la dosis inyectada se distribuye en sangre y linfa, y mostraron por primera vez la importancia del sistema linfático en la absorción del veneno. Sin embargo, debido a las limitaciones del modelo animal y al método de cuantificación, que no permite detectar el veneno metabolizado, no fue posible determinar dónde quedó el otro 31% del veneno inyectado (Paniagua *et al.*, 2012); por lo cual, se sugirió buscar una alternativa que permita estudiar la cinética en tiempo largos, determinar la cantidad en el sitio de inoculación y los órganos de eliminación.

Una estrategia para estudiar la cinética de venenos o toxinas aisladas es el marcaje con radioactividad. Existen algunos trabajos donde se ha estudiado la PK de venenos o toxinas radiomarcadas con Yodo-125 ( $^{125}\text{I}$ ) y que han aportado información relevante en el área de venenos (Ismail y Abd-Elsalam, 1998; Krifi, 2004).

En 2002 Nunan et al., reportaron el radiomarcaje de la tityustoxina, una toxina aislada del veneno del alacrán *Tityus serrulatus*, con Tecnecio-99 metaestable ( $^{99\text{m}}\text{TC}$ ), para analizar la biodistribución. Posteriormente, se publicó el estudio de la biodistribución de un veneno de abeja marcado con  $^{99\text{m}}\text{TC}$ , en el cual se demuestra que el radiomarcaje no afectó su actividad tóxica y que fue adecuado para marcar el veneno completo (Yonamine et al., 2005). Por último, en 2006 se reportó la crotoxina aislada de *Crotalus durissus terrificus* marcada también con  $^{99\text{m}}\text{TC}$  (Novais et al., 2006).

En este trabajo se realizó la caracterización del veneno de *M. fulvius* con la finalidad de ampliar el conocimiento sobre sus componentes y comprender mejor el envenenamiento. Además, con el objetivo de complementar los resultados obtenidos en el modelo de borrego, en este trabajo planteamos el estudio cinético y la biodistribución de la principal neurotoxina de *M. fulvius* radiomarcada.

## 2. Marco teórico

### 2.1 Veneno

Los venenos son un mecanismo de defensa de los animales ponzoñosos y en algunos casos participan también en la digestión de la presa. En general, son mezclas heterogéneas de moléculas biológica y toxicológicamente activas que actúan a distintos niveles; por ejemplo, sobre el sistema de transmisión colinérgica o como moduladores de canales iónicos (Doley, 2010).

### 2.2 *Micrurus fulvius*

La familia Elapidae agrupa a las serpientes venenosas comúnmente conocidas como cobras, mambas, serpientes marinas y coralillos. Los elápidos se distribuyen en regiones tropicales y subtropicales alrededor de todo el mundo, excepto en Europa (Roze, 1996).

Los elápidos de América se agrupan en tres géneros *Micrurus*, *Micruroides* y *Leptomicrurus*; de los cuales, se conocen al menos sesenta especies distribuidas desde el sur de los Estados Unidos hasta Argentina (Campbell y Lamar, 2004).

La especie *Micrurus fulvius* se distribuye en el sureste de los Estados Unidos de América, desde el sur de Carolina del Norte, parte de Carolina del Sur, Florida, Georgia, Alabama, Mississippi y Louisiana (Norris y col., 2009).

Los venenos del género *Micrurus* se distinguen por causar cuadros neurotóxicos y gracias a la caracterización de distintos venenos de éste género, sabemos que la toxicidad la causan esencialmente las alfa y beta neurotoxinas.

Las alfa-neurotoxinas ( $\alpha$ -NTx) tienen un peso molecular aproximado de 6-7.5 kDa, actúan a nivel postsináptico en la placa neuromuscular bloqueando los receptores de acetilcolina (Figura 1) y se ha reportado que son el principal componente neurotóxico en el veneno de corales Sud-Americanos (Nirthanan y Gwee, 2004; Olamendi-Portugal y col., 2008; Norris y col., 2009; Ciscotto y col., 2011; Correa-Netto y col., 2011; Fernandez y col., 2011).

Por otra parte, las beta-neurotoxinas ( $\beta$ -NTx) con masa molecular de 13-19 kDa, actúan a nivel presináptico inhibiendo la liberación de acetilcolina en la placa neuromuscular

(Figura 1) y poseen actividad enzimática de fosfolipasa A<sub>2</sub> (Rosso et al., 1996; Arroyo et al., 1987; Pungercar y Krizaj, 2007; Montecucco et al., 2008; Dokmetjian et al., 2009).

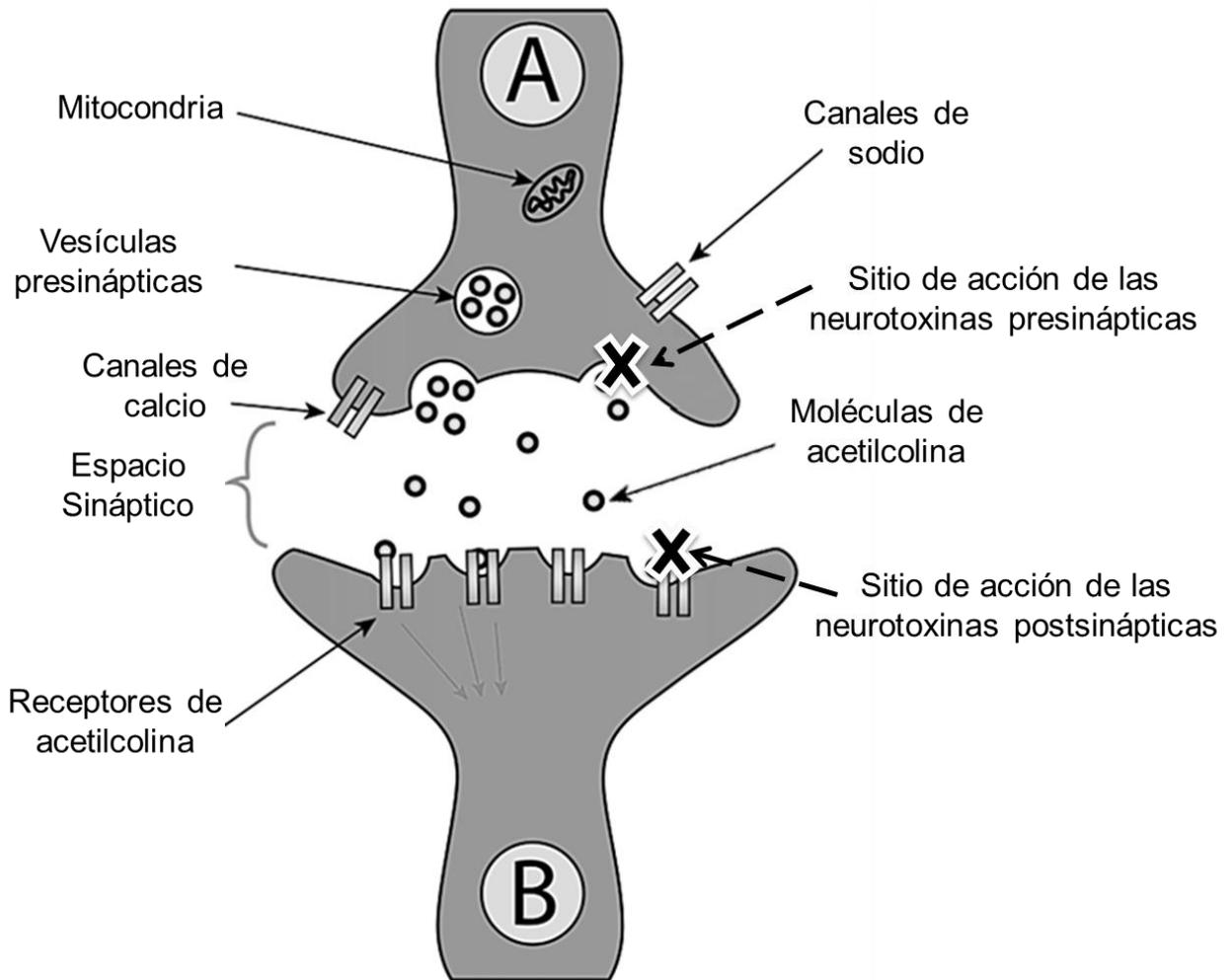


Figura 1. Esquema de la unión neuromuscular en el cual se muestran los sitios donde actúan las neurotoxinas pre y post sinápticas; las presinápticas ( $\beta$ -NTx) impiden la liberación de acetilcolina en la membrana de la neurona presináptica (marcada con la letra A), por un mecanismo aún desconocido. Las postsinápticas ( $\alpha$ -NTx) se unen al receptor para acetilcolina localizado en la membrana de la neurona postsináptica (marcada con la letra B), impiden la unión de la acetilcolina en su receptor y evitan así la propagación del impulso nervioso.

El tratamiento más efectivo para revertir el envenenamiento por *M. fulvius* es la administración de su respectivo antiveneno. Los antivenenos, se componen de anticuerpos neutralizantes completos o fragmentos de ellos, que se obtienen de animales hiperinmunizados con el veneno de interés (Chippaux, 1997).

En la clínica, el tratamiento del envenenamiento por *M. fulvius* puede complementarse con terapia de soporte, como la respiración asistida. En casos más graves, es necesario intubar endotraquealmente a la persona para evitar que se establezca la parálisis respiratoria (Walter et al., 1999). Aunque cabe destacar, que el esquema de dosificación del antiveneno y la terapia de soporte es a criterio del médico tratante, debido a la falta de conocimiento sobre la cinética del veneno.

### 2.3 Espacio subcutáneo

Cuando muerde una serpiente de coral se piensa que el veneno se libera en el espacio subcutáneo, debido a que el tamaño de los colmillos es aproximadamente de 3 a 5 mm (Comunicación personal, M en C. Melissa Bénard). Para que el veneno pueda llegar al torrente sanguíneo y ejercer su efecto, los componentes deben absorberse y distribuirse a todos los órganos y tejidos.

El espacio subcutáneo o hipodermis une a la piel con las estructuras subyacentes; está formado por el tejido conjuntivo blando y tejido adiposo. En este espacio se encuentran los capilares sanguíneos y linfáticos, células fibroblásticas, macrófagos y la matriz extracelular (Guyton y Hall, 2001).

La matriz extracelular tiene un papel relevante en el espacio subcutáneo, debido a que da soporte a las células, ayuda a la proliferación y participa en la migración de diversas moléculas (Aukland y Read, 1993). Esta estructura se compone de distintos tipos de colágeno, ácido hialurónico, elastina y glucosaminoglicanos (Bosman y Stamenkovic, 2003). Algunos venenos de serpientes contienen toxinas que dañan la matriz extracelular y/o degradan el ácido hialurónico con el fin de promover la rápida absorción del veneno (Girish et al., 2004).

## Líquido intersticial

Las proteínas exógenas que son administradas por vía subcutánea llegan al espacio extracelular donde se encuentra un fluido llamado líquido intersticial, compuesto por agua y una variedad de solutos. Este fluido se encarga de transportar nutrientes, desechos celulares y moléculas de señalización desde y hacia las células, así como a los vasos sanguíneos y linfáticos. El volumen del líquido intersticial se mantiene constante y en un adulto sano se estima que es el 18% del peso corporal (Guyton y Hall, 2001; Swartz, 2001).

### 2.4 Sistema linfático

El sistema linfático es una red de vasos y capilares que transportan la linfa de forma unidireccional hasta desembocar en el sistema circulatorio venoso (Figura 4). La red linfática comienza con los vasos iniciales, los cuales están formados por células endoteliales ancladas a la matriz extracelular por los filamentos de anclaje; los capilares iniciales tienen uniones celulares laxas a través de las cuales penetra el líquido intersticial, moléculas grandes (>16 kDa) e incluso células completas (Swartz, 2001) (Figura 2). Los capilares iniciales se expanden cuando la presión intersticial aumenta, permitiendo así, el paso del fluido intersticial a los capilares linfáticos y vuelven a su estado basal cuando la presión intersticial disminuye (Figura 2).

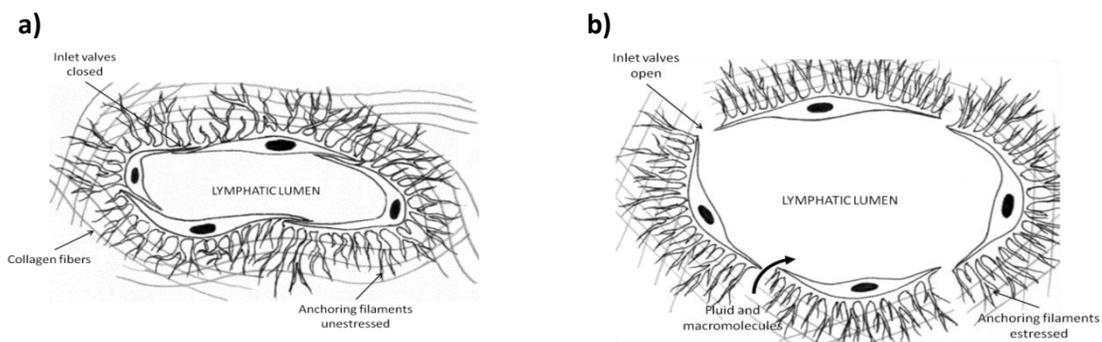


Figura 2. (a) Esquema que muestra la estructura de los vasos linfáticos iniciales. (b) Apertura entre las uniones celulares cuando aumenta la presión intersticial (Paniagua et al., 2014).

La linfa que fluye a través de los vasos linfáticos iniciales, pasa después a los vasos colectores, formados por células endoteliales y músculo liso. Los vasos colectores se conforman de segmentos llamados linfagiones, que tienen válvulas bicúspides en cada extremo, las cuales se abren para dar paso a la linfa y se cierran cuando están llenos, para evitar el flujo retrógrado, generando así el flujo peristáltico de la linfa (Figura 3) (Swartz, 2001).

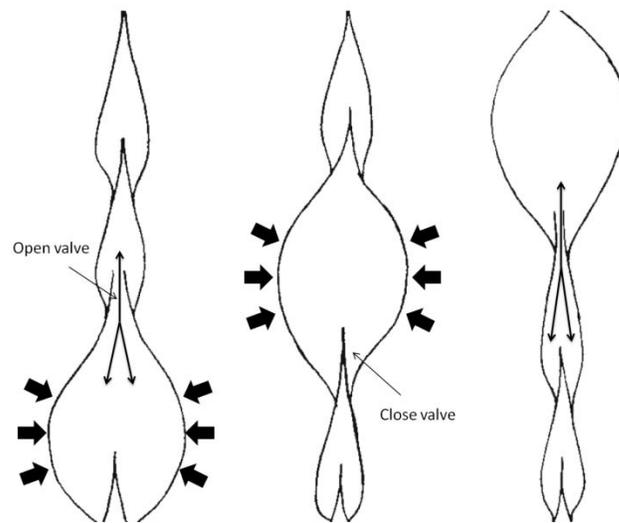


Figura 3. Esquema que muestra la propulsión peristáltica de la linfa a través de los vasos colectores (Paniagua et al., 2014).

A lo largo de la red linfática se encuentran distribuidos los ganglios, los cuales forman parte del sistema inmune, se encargan de reconocer elementos extraños que entraron al organismo y de promover la respuesta inmune. En los humanos existen aproximadamente 600 ganglios linfáticos distribuidos por todo el cuerpo, agrupados en las axilas, la ingle, el cuello, el tórax, detrás de las rodillas y el abdomen. En las extremidades el primer ganglio de la red linfática eferente es el ganglio poplíteo, éste se localiza detrás de la rodilla en la fosa poplíteo (Figura 4) (Guyton y Hall, 2001).

Entre los vasos linfáticos de la parte inferior y superior del cuerpo, se localiza una estructura llamada “cisterna del quilo” (Figura 4), en la cual converge la linfa que se recoge de las extremidades y la que proviene de los linfáticos intestinales. La linfa que se acumula en la “cisterna del quilo” fluye por el ducto torácico hasta desembocar en la vena yugular izquierda para incorporarse al torrente sanguíneo (Swartz, 2001).

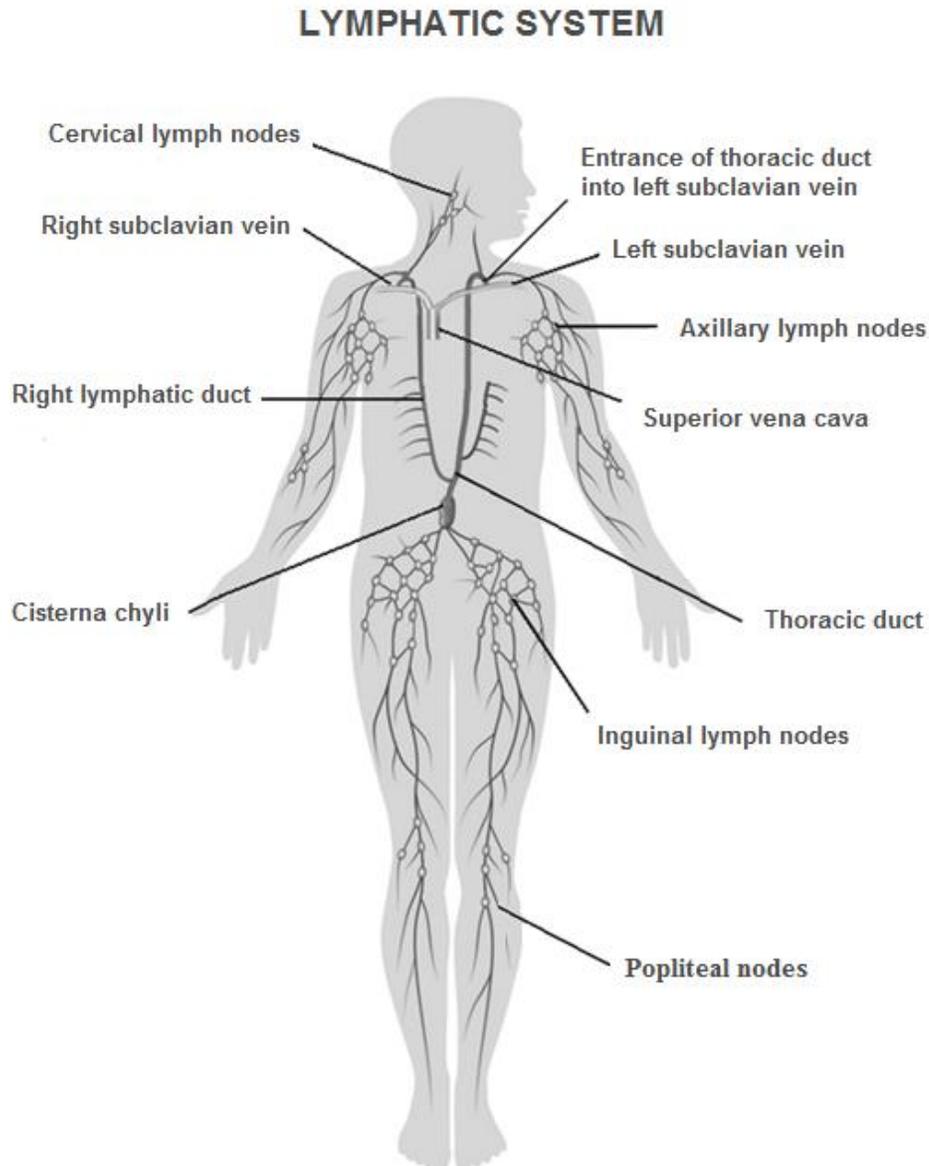


Figura 4. Esquema del sistema linfático en el humano (Paniagua et al., 2014).

La función principal de la vía linfática es regresar el exceso de fluidos, proteínas, desechos celulares y otras moléculas que se encuentran en el espacio intersticial (Swartz, 2001). En el caso de proteínas exógenas que se administran de forma subcutánea se ha demostrado que tiene un papel muy importante en el proceso de absorción (Supersaxo et al., 1990).

La absorción de moléculas inyectadas por vía SC puede ser a través de capilares sanguíneos o linfáticos e incluso por ambos, y está determinada principalmente por el tamaño molecular aunque también intervienen las propiedades fisicoquímicas (Supersaxo et al., 1990). Las moléculas que por su tamaño pueden entrar en ambas estructuras capilares se absorben preferentemente por vasos sanguíneos (Porter y Charman, 2000; Swartz, 2001). Conforme aumenta el peso molecular la permeabilidad de los capilares sanguíneos disminuye (Guyton y Hall, 2001), y es entonces, cuando el sistema linfático tiene una participación importante en la absorción de moléculas grandes que se encuentran en el espacio intersticial (Guyton y Hall, 2001; Swartz, 2001). En 1990 Supersaxo y colaboradores inyectaron moléculas de distintos tamaños por vía subcutánea en borregos, y demostraron que el porcentaje de la dosis que se absorbe por sistema linfático, aumenta de manera lineal conforme aumenta el peso molecular (Figura 5), los autores sugieren que las proteínas mayores a 16 kDa se absorberán principalmente por sistema linfático.

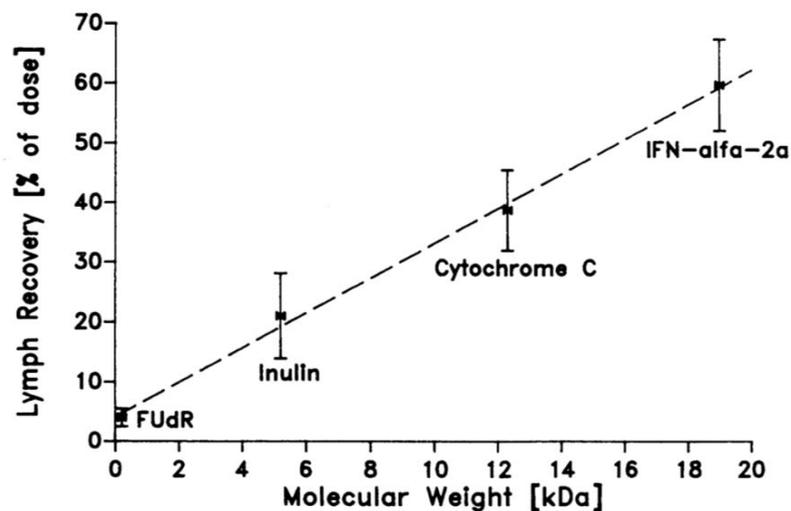


Figura 5. Relación entre el peso molecular (PM) y el porcentaje de dosis recuperada en linfa. El PM de las moléculas analizadas es: FUDR 0.246 KDa; Inulina 5.2 KDa; Citocromo C 12.3 KDa; IFN-alfa-2a 19.0 KDa (Supersaxo et al., 1990).

## 2.5 Farmacocinética

La farmacocinética se encarga de estudiar *in vivo* los procesos que sufre un fármaco al entrar al organismo tales como la absorción, distribución, metabolismo y eliminación (Goodman y Gilman, 1996).

La absorción es el movimiento de un fármaco a través de alguna barrera fisiológica hasta alcanzar el torrente sanguíneo. Este proceso puede ocurrir por difusión simple, difusión facilitada, transporte activo o endocitosis (Goodman y Gilman, 1996).

Una vez que el fármaco se encuentra en circulación sanguínea comienza la distribución, primero a los órganos altamente perfundidos, como el hígado, corazón y riñones; después en el espacio intersticial y tejidos poco profundos como el músculo; y finalmente en tejidos profundos como los huesos. En la distribución intervienen factores asociados al fármaco, como el peso molecular, la solubilidad, el pH, la unión a proteínas plasmáticas y/o tisulares, entre otros.

El metabolismo se refiere a la modificación química que se lleva a cabo por las enzimas, con la finalidad de eliminar el fármaco del organismo. Los órganos principales que participan en el metabolismo son el hígado y los riñones. En el caso de proteínas, el metabolismo puede ocurrir también en sangre y otros tejidos, debido a que hay enzimas proteolíticas distribuidas en todo el organismo (Tang y Meibohm, 2006).

Finalmente el fármaco sufre el proceso de eliminación, que se refiere a su remoción irreversible del organismo (Shargel y Yu., 1999). Los factores determinantes en la velocidad y mecanismo de eliminación de proteínas, son el peso molecular, hidrofobicidad, patrones de glicosilación, grupos funcionales, estructura y tendencia a la agregación. El riñón es el principal órgano de eliminación para proteínas preferentemente con carga neutra y de masa molecular menor a 60 kDa, que fueron administradas por alguna vía parenteral (Tang y Meibohm, 2006).

Los análisis farmacocinéticos permiten determinar parámetros para los procesos antes descritos (absorción, distribución, metabolismo y eliminación), los cuales, típicamente se determinan a partir de la cinética en sangre. La biodistribución en órganos y/o tejidos específicos se infiere planteando modelos mono o multi-compartamentales. Estos modelos

consideran al organismo como una “caja negra” donde la sangre es el compartimento uno o el central, y según el comportamiento cinético observado ahí, se pueden proponer dos o más compartimentos, que se refieren a otros órganos o tejidos. Otro modelo, aunque menos empleado, es el no compartimental en el cual simplemente se determinan todos los parámetros cinéticos en sangre y se infiere su distribución utilizando algoritmos (Goodman y Gilman, 1996; Sevcik et al., 2004).

## 2.6 Imagen molecular SPECT-CT

Actualmente, existen novedosas técnicas de imagen molecular que permiten el seguimiento *in vivo* y en tiempo real de moléculas marcadas radioactivamente que podrían ser útiles para estudiar la biodistribución de venenos, toxinas aisladas y antivenenos.

La tomografía por emisión de fotón único o SPECT, por sus siglas en inglés, y la tomografía computarizada (CT), pertenecen a una rama de la medicina conocida como imagenología, la cual comprende todo tipo de exámenes diagnósticos y terapéuticos en los que se utilizan equipos que reproducen imágenes del organismo ([www.oms.org](http://www.oms.org)). Las imágenes y datos funcionales se obtienen con el uso de rayos X (utilizados en el CT) o rayos gamma, que se emiten de moléculas marcadas con núcleos radioactivos, las cuales tienen afinidad por receptores o componentes celulares en el organismo y que se utilizan en SPECT (Liu, 2004).

El SPECT es una técnica que proporciona información funcional y metabólica de un organismo, a través de imágenes que se obtienen tras la administración de un radiofármaco (Groch y Erwin, 2000). La adquisición de imágenes con equipos SPECT se hace rotando una cámara detectora de rayos gamma (cámara gamma) alrededor del organismo en estudio, la cual registra una proyección en cada intervalo de avance previamente programado, generalmente cada 2-6 grados, hasta recorrer los 360 grados (Groch y Erwin, 2000). Las proyecciones se registran en equipos computacionales y estos realizan la reconstrucción de la imagen utilizando algoritmos matemáticos.

Actualmente los equipos modernos SPECT están acoplados a un CT (técnica que permite visualizar la regiones anatómicas con alta resolución) con la finalidad de tener mayor

información sobre la ubicación anatómica específica donde se está registrando la emisión del radiofármaco y por ende, la actividad metabólica que se desea estudiar (Labbe, 2003).

## 2.7 Agentes quelantes bifuncionales

En general, el marcaje de las biomoléculas con radionúclidos se realiza mediante dos estrategias: la primera es con marcaje directo, en el cual, la biomolécula se pone en contacto directo con el radionúclido y este se coordina por medio de enlaces covalentes con los azufres de los puentes disulfuro (Liu y Scott, 1999). Esta estrategia no es útil cuando la biomolécula depende de estos puentes para ejercer su acción biológica, además de que no se puede establecer a ciencia cierta la química del marcaje. La segunda, se realiza utilizando agentes quelantes bifuncionales o BFCs, por sus siglas en inglés, con características químicas bien definidas (Liu, 2004). Estos, tienen grupos funcionales que forman enlaces covalentes estables con la biomolécula y por otra parte, cuentan también con grupos reactivos en donde se coordina el radionúclido (generalmente aminas o ácidos carboxílicos). Actualmente, la segunda estrategia de marcaje es la más utilizada, debido a que se tienen mejor controladas las condiciones para el marcaje y a que se conocen las características químicas de los grupos reactantes (Liu, 2004).

EL Ácido Dietilen-Triamino-Pentaacético (DTPA) es uno de los BFCs más utilizados debido a que se conoce muy bien su química, no requiere intermediarios para la reacción, el tiempo de incubación que requiere para acomplejar al radioisótopo es corto (15-60 min) y es de bajo costo (Krejcarek et al., 1977).

En este trabajo se utilizó como BFC el ácido dietilen-triamino-pentaacético (DTPA) dianhídrido, para bioconjuguar la principal  $\beta$ -neurotoxina de *M. fulvius* (Figura 6).

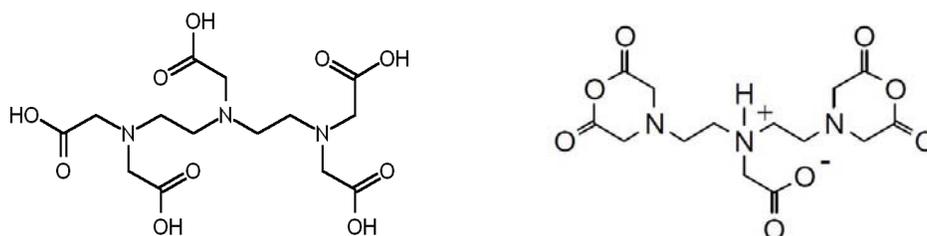


Figura 6. Estructura del agente quelante bifuncional ácido dietilen-triamino-pentaacético (DTPA) (Izquierda). Estructura del DTPA en su forma dianhídrido (Derecha).

## 2.8 Radionúclidos

Los radionúclidos son isótopos "inestables" que mantienen un estado excitado en su núcleo y que para alcanzar un estado fundamental de estabilidad, necesitan perder energía (Fischman et al., 1993). La energía liberada es característica de cada radioisótopo y tiene por unidad de medida el electrón-volt (eV); mientras que la actividad radioactiva es el número de transformaciones (decaimientos energéticos) que ocurren en determinado tiempo (dps) y se mide en curies ( $1\text{Ci} = 3.7 \times 10^{10}$  dps) o bequerels ( $1\text{Bq} = 1$  dps). Los radionúclidos que se utilizan en el SPECT tienen generalmente tiempos de vida media larga (de horas a días) ideales para el estudio cinético de veneno y antivenenos; deben ser emisores gamma y la energía deseable para su detección debe ser de 30 a 300 keV (Liu, 2008). El radionúclido que más se utiliza es el  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , ya que se emplea en aproximadamente el 80% de los estudios clínicos realizados con SPECT (Ferro-Flores y Arteaga de Murphy, 2007), debido a que presenta tiempo de vida media relativamente corto (6 h), energía de 140 keV, buena disponibilidad y bajo costo. Otros radionúclidos comúnmente usados en imagen molecular por SPECT, son el Indio-111 ( $^{111}\text{In}$ ) y el Galio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ) (Hughes, 2003; Liu, 2004). El  $^{67}\text{Ga}$  tiene un tiempo de vida media de 78.3 h y cuenta con tres energías principales de radiación gamma: 300 (17%), 184 (20%) y 93 (40%) keV (Hughes, 2003; Liu, 2004).

En este trabajo se utilizó el  $^{67}\text{Ga}$ , debido a que por su vida media, energías de emisión, costo y disponibilidad fue el más útil para marcar y estudiar la biodistribución de la principal neurotoxina de *M. fulvius*.

El radiomarcaje de la principal  $\beta$ -neurotoxina ( $\beta$ -NTx) de *M. fulvius* con  $^{67}\text{Ga}$  y el estudio de la biodistribución mediante técnicas de imagen molecular como SPECT/CT, es una estrategia novedosa en el área de venenos que podría sentar el precedente de futuros estudios con toxinas de animales venenosos.

## Planteamiento del problema

A pesar de los estudios realizados sobre el veneno y el cuadro de envenenamiento, el diagnóstico y manejo de los casos clínicos debidos a *M. fulvius* sigue siendo complicado, debido a diversos factores tales como: la variabilidad en la aparición de los síntomas, que pueden manifestarse desde los primeros 30 minutos o hasta 12 horas después de la mordedura (Kitchens and Van Mierop, 1987), la cantidad de veneno inoculado, confusión entre verdaderas y falsas corales y a que no se conocía de manera detallada la composición, farmacocinética y biodistribución del veneno.

En este trabajo se presenta la caracterización del veneno de *M. fulvius* y de sus componentes, así como el estudio cinético y la biodistribución *in vivo* por imagen molecular de la principal  $\beta$ -NTx radiomarcada con  $^{67}\text{Ga}$ ; ambos enfoques contribuyen de manera significativa a entender el envenenamiento y aportan información importante que puede ayudar en el diagnóstico, tratamiento y en el desarrollo de los antivenenos.

### 3. Hipótesis

La toxicidad del veneno de *Micrurus fulvius* está asociada principalmente a las  $\beta$ -neurotoxinas, siendo el sitio de inoculación el depósito desde donde se liberan y se absorben gradualmente con la participación del sistema linfático.

### 4. Objetivo principal

Caracterizar el veneno de *M. fulvius*, analizar el papel de los componentes tóxicos en el envenenamiento y estudiar la cinética y biodistribución de la principal  $\beta$ -NTx.

#### 4.1 Objetivos particulares

- 4.1.1 Determinar la actividad biológica del veneno completo de *M. fulvius*
- 4.1.2 Aislar y caracterizar los componentes del veneno
- 4.1.3 Realizar la bioconjugación y el radiomarcaje de la principal  $\beta$ -NTx.
- 4.1.4 Determinar el efecto de la bioconjugación sobre la actividad biológica de la  $\beta$ -NTx.
- 4.1.5 Medir el tiempo de residencia de la  $\beta$ -NTx en el sitio de inoculación por imagen molecular.
- 4.1.6 Medir y analizar la cinética plasmática de la  $\beta$ -NTx radiomarcada.
- 4.1.7 Determinar la biodistribución de  $\beta$ -NTx por imagen molecular.

## 5. Metodología

### 5.1 Caracterización del veneno completo de *Micrurus fulvius*

#### 5.1.1 Determinación de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>)

La DL<sub>50</sub> se determinó en grupos de cinco ratones a los cuales se les inyectaron distintas cantidades del veneno por vía intravenosa, en la vena caudal de la cola. Los diferentes grupos se aislaron en jaulas independientes con agua y comida *ad libitum*, la lectura de mortalidad se tomó a las 48 h post-inyección. La DL<sub>50</sub> se determinó a partir de las curvas dosis-respuesta utilizando el software Grad Pad Prism 4.0.

#### 5.1.2 Actividad fosfolipasa A<sub>2</sub>

La actividad enzimática de PLA<sub>2</sub> se cuantificó de manera indirecta por un método titulométrico. En este ensayo se midió la cantidad de NaOH necesaria para neutralizar los ácidos grasos liberados por la actividad enzimática en el veneno, a pH 8 y temperatura ambiente. Para esta determinación se utilizó como sustrato una solución de yema de huevo al 10% en un buffer que contiene 100 mM de NaCl, 10mM de CaCl<sub>2</sub> y tritón X 100 al 0.5%. Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de veneno capaz de producir 1 μmol de ácido graso por minuto, bajo las condiciones aquí descritas.

#### 5.1.3 Actividad hialuronidasa

Esta actividad enzimática se midió por turbidimetría con base en el método de Tolksdorf (1949). En este experimento se midió la turbidez de las muestras, la cual está dada por el complejo insoluble que se forma entre el cetilpiridinio y el ácido hialurónico no degradado por la enzima. Para esta determinación, se prepararon cinco tubos con el sustrato (266 μg/mL de ácido hialurónico) usando como buffer de reacción fosfato de sodio 0.1 M pH 5.8 y 0.15 M de NaCl, a cada tubo se le añadió una cantidad creciente de veneno y se aforó a 150 μL con el buffer de reacción. Los tubos se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente (T.A) y después se colocaron en un baño de agua hirviendo durante cinco minutos. Al final, se añadieron 500 μL de cetilpiridinio en cada tubo para precipitar el

ácido hialurónico no degradado y se incubaron durante 10 minutos a T.A, la turbidez se determinó leyendo la absorbancia a 540 nm.

La actividad hialuronidasa se reportó en unidades por mg de veneno (U/mg); una unidad se definió la cantidad de enzima necesaria para reducir la turbidez de 1mg/150 mL del sustrato al 50% de la concentración inicial.

#### 5.1.4 Electroforesis de dos dimensiones (2D-PAGE)

Este análisis se realizó con el contenido proteico del veneno, el cual se obtuvo mediante un método de precipitación con metanol-cloroformo y se determinó la concentración utilizando el Kit 2D Quant (GE Healthcare).

La primera dimensión se realizó sobre tiras secas de poliacrilamida de 13 cm con gradiente de pH no lineal (3-11) (GE Healthcare); las tiras se incubaron por 16 horas en solución de rehidratación con tiourea y 250 µg de las proteínas del veneno. El enfoque isoeléctrico (IEF) se hizo a 20 °C en el equipo Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare), en donde el voltaje fue linealmente incrementado de 1000 a 8000 V por 2.5 h, seguido por un voltaje constante de 8000 V hasta alcanzar 15 000 V/h. Antes de la segunda dimensión, las tiras fueron incubadas por 15 min en solución amortiguadora de equilibrio SDS Laemmli con 1% de DTT y después con 2.5% de iodoacetamida por 10 min. La segunda dimensión se desarrolló en geles SDS-PAGE al 12.5 y 17% de bis-acrilamida, para el veneno y las fracciones, respectivamente. Al final de la corrida electroforética los geles fueron incubados 20 minutos en una solución con 40% de metanol y 10% de ácido acético para fijar las proteínas. La tinción de los geles se hizo con Coomassie coloidal, después fueron escaneados en un densitómetro Typhoon 9400 (GE Healthcare) y se le asignó un número a cada spot (mancha proteica) utilizando el programa PDQuest (Bio Rad).

#### 5.1.5 Identificación de proteínas por espectrometría de masas

Los spots más abundantes en el proteoma del veneno de *M. fulvius* se escindieron del gel, se destiñeron en 50% de etanol y 5% de ácido acético y se rehidrataron en acetonitrilo. Con base en el protocolo de Shevchenko y col., (1996), cada spot se sometió a un proceso de

reducción de cisteínas con DTT, alquilación con iodoacetamida y digestión enzimática con tripsina. Posteriormente, las muestras se pasaron por una columna C18 Zips Tips (Millipore) para retirar las sales. La determinación de la masa de cada spot se hizo utilizando el sistema LTQ Orbitrap XL ETD (Thermo Scientific). Los parámetros establecidos para la obtención de datos fueron: tolerancia de péptidos MS/MS de 0.8 Da y 20 ppm, iones peptídicos con cargas +2 y +3. Los resultados se compararon contra la base de datos del transcriptoma de *M. fulvius*, utilizando la plataforma del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y el software Mascot (Matrix Science, Boston, MA).

#### 5.1.6 Fraccionamiento del veneno por HPLC de fase reversa

Con la finalidad de aislar los componentes del veneno de *M. fulvius* se fraccionaron 13 mg del veneno completo solubilizado en buffer de fosfatos (PBS), divididos en tres corridas, en un equipo HPLC Agilent 1100. Se utilizó una columna C-18 (Grace Vydac 250 x 10 mm. Tamaño de partícula, 5 µm), la cual fue equilibrada con agua bi-destilada/ácido trifluoroacético (TFA) 0.1%. La elución se realizó con gradiente lineal de acetonitrilo/TFA 0.1% de cero a 60% en 60 minutos con flujo de 1 mL/min. La detección de las fracciones se estableció a 214, 230 y 280 nm, se colectaron manualmente y se secaron en una centrifuga de vacío marca Savant. Las fracciones secas se reconstituyeron en 100 µL de NaCl 150 mM y se determinó la concentración por absorbancia a 280 nm. La masa molecular de cada fracción fue determinada por la unidad de proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM mediante espectrometría de masas, con la modalidad de LC-MS/ESI (Cromatografía líquida/Espectrometría de Masas/Ionización por Electrospray).

### 5.2 Caracterización de las fracciones del veneno de *M. fulvius*

#### 5.2.1 DL<sub>50</sub> y actividad PLA<sub>2</sub>

La prueba de letalidad de las fracciones aisladas se realizó en grupos de tres ratones, inyectando 20 µg de cada fracción por vía intravenosa. La DL<sub>50</sub> se determinó solo para aquellas fracciones que fueron letales con 20 µg.

A las fracciones aisladas que presentaron peso molecular similar al reportado para otras fosfolipasas de elápidos (13-17 kDa), se les midió la actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> siguiendo la metodología descrita anteriormente para el veneno completo.

### 5.2.2 Electrofisiología

En este experimento se evaluó la actividad de las fracciones con peso molecular de 6-7.5 kDa (similar al de otras  $\alpha$ -neurotoxinas publicadas en la literatura) sobre el receptor muscular nicotínico de acetilcolina (nAChR). El ensayo de electrofisiología Patch-clamp se realizó con la modalidad de célula completa en la línea celular de rabdomiosarcoma TE671, con base en lo reportado por (Olamendi-Portugal et al., 2008). Las células se cultivaron en medio DMEM complementado con 4.5 g/L de glucosa y 10% de suero fetal bovino, a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Para medir la respuesta normal de la célula al estímulo acetilcolina (Ach) el voltaje se estableció a -60 mV y se midió la corriente después de aplicar 10  $\mu$ M de Ach durante cuatro a seis segundos, en tres intervalos de 90 segundos. La molécula de prueba se añadió al medio, se incubó por 1 minuto, se dio un pulso de Ach 10  $\mu$ M y se registró la respuesta, este procedimiento se realizó por triplicado. En este experimento se utilizó como control positivo a la  $\alpha$ -bungarotoxina (50 nM), la cual es un inhibidor irreversible del receptor de acetilcolina, el control negativo fue el buffer de trabajo.

### 5.2.3 Refraccionamiento de la fracción E por HPLC de intercambio catiónico

La fracción identificada con la letra E presentó dos masas (6945.9 y 6887.8 Da), por lo cual se sometió al refraccionamiento por HPLC de intercambio catiónico para evaluar la actividad  $\alpha$ -neurotóxica de cada componente. La cromatografía se hizo en un equipo HPLC Waters con la columna TSK 5PW, se utilizó acetato de sodio 20 mM pH 4.5 como buffer de corrida (buffer A) y se aplicó gradiente lineal de cero a 100% de NaCl 0.5 M en buffer A, en 55 minutos. El perfil cromatográfico se registró a 280 nm y los picos se colectaron de forma manual.

#### 5.2.4 Secuenciación amino terminal

Con la finalidad de hallar la secuencia amino terminal de las fracciones N, O, E.1 y E.2, éstas fueron reducidas con DTT, alquiladas con iodoacetamida y sometidas a degradación de Edman automatizada. Posteriormente, la fracción E.1 fue digerida con la endoproteasa Glu-C (Roche) y después con CNBr, los péptidos de la digestión se purificaron por RP-HPLC, se sometieron a degradación de Edman y se determinó otro fragmento de la secuencia.

### 5.3 Farmacocinética y biodistribución de la principal $\beta$ -NTx de *M. fulvius*

#### 5.3.1 Bioconjugación de la $\beta$ -NTx y albúmina sérica bovina (BSA) con el quelante DTPA

La bioconjugación se realizó con base en el método publicado por Hnatowich et al., (1983); para esta reacción todos los buffers se prepararon con agua milli-Q ultrapura (18.2 M $\Omega$ ·cm a 25 °C) y se pasaron a través de la resina Chelex 100 (Bio-Rad) para retirar los metales traza. La proteínas se solubilizaron en el buffer de reacción compuesto de bicarbonato de sodio 0.1 M pH 8.3, después se añadió el DTPA (Sigma-Aldrich) solubilizado en DMSO, en proporción molar 1:10. La mezcla de reacción se incubó durante una hora a temperatura ambiente con agitación suave. Posteriormente se hicieron dos diálisis, la primera contra buffer de bicarbonato de sodio 0.1 M pH 8.3 (tres volúmenes) y la segunda contra acetato de amonio 0.25 M pH 4.7 pasado por Chelex (cinco volúmenes). Por último, se estimó la concentración proteica por absorbancia a 280 nm.

##### 5.3.1.1 Evaluación de la bioconjugación

###### a) Electroforesis 2D-PAGE:

En esta prueba se determinó el cambio en el punto isoeléctrico de la  $\beta$ -NTx antes y después de la bioconjugación con DTPA. Con este propósito, se realizó la electroforesis de dos dimensiones con la metodología antes descrita, utilizando en este caso, geles de bis-acrlamida al 17% para la segunda dimensión.

## b) Espectroscopia de absorción atómica

El número de quelantes unidos por mol de proteína (BSA ó  $\beta$ -NTx) se determinó de manera indirecta mediante espectroscopia de absorción atómica. En este experimento la reacción se hizo por duplicado, colocando 200  $\mu$ g de la proteína-DTPA en AcONH<sub>4</sub> 0.25 M pH 4.7 con CuSO<sub>4</sub> en relación molar 1:10 y con incubación a 37 °C durante una hora. Después, la mezcla de reacción fue dializada exhaustivamente contra acetato de sodio 0.1 M pH 6.7. En este experimento el control negativo fue la  $\beta$ -NTx, sin bioconjuguar, y tratada con el mismo procedimiento aquí descrito. El análisis de absorción atómica para Cu<sup>2+</sup> lo realizó la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación en la Facultad de Química de la UNAM. Para determinar el número de quelantes (DTPA) unidos a la toxina, nosotros asumimos que el número de átomos de Cu<sup>2+</sup> que hay en cada muestra es lo correspondiente al número de quelantes unidos covalentemente a la neurotoxina, después de restar la cantidad encontrada en el control negativo.

### 5.3.2 Evaluación de la actividad biológica de la $\beta$ -NTx-DTPA

Los cambios en la actividad biológica después de la bioconjugación fueron evaluados midiendo la letalidad en ratones y la actividad fosfolipasa A<sub>2</sub>, de la misma forma en que se realizó para el veneno completo.

### 5.3.3 Radiomarcaje, pruebas de pureza radioquímica y estabilidad

Típicamente en cada radiomarcado se usaron 200  $\mu$ g de la  $\beta$ -NTx-DTPA y 1 mCi de <sup>67</sup>GaCl<sub>3</sub>, ajustado a pH 5.5 con 1 M de acetato de amonio (AcONH<sub>4</sub>) pH 6.7/chelex, la reacción se incubó a 37 °C durante una hora. El <sup>67</sup>Ga no unido a la toxina se separó del complejo radiomarcado por filtración, con filtros Amicon ultracel filter (10 kDa, 500  $\mu$ L), la muestra se centrifugó por 4 min a 11, 300 g, este procedimiento se utilizó también para hacer el cambio de buffer a PBS. En los experimentos donde se utilizó BSA-DTPA marcada con <sup>67</sup>GaCl<sub>3</sub> se siguió el mismo procedimiento descrito para la  $\beta$ -NTx-DTPA.

La pureza radioquímica del complejo  $\beta$ -NTx-DTPA radiomarcada se determinó por duplicado mediante cromatografía en capa fina (iTLC). Esta prueba se hizo sobre tiras

comerciales de papel impregnadas con silica gel (iTLC-SG 50), en cada tira de 10 cm se colocaron 2  $\mu\text{L}$  del complejo radiomarcado y se utilizó como fase móvil  $\text{AcONH}_4$  0.25 M pH 4.7 + EDTA 1  $\mu\text{M}$ . Después las tiras se cortaron por la mitad y se midieron las cuentas de cada segmento utilizando un contador de centelleo de tipo pozo (Marca LUDLUM, modelo 2200, Measurements Texas). Como control, en este experimento se desarrolló la cromatografía del  $^{67}\text{Ga}$ -libre bajo las mismas condiciones que para el complejo  $^{67}\text{Ga}$ -DTPA- $\beta$ -NTx. Con esta metodología la toxina radiomarcada se mantiene en el inicio de la tira mientras que el  $^{67}\text{Ga}$  forma complejos con el DTPA y se mueve con el frente del disolvente.

Con base en lo reportado por Hnatowich et al., (1983), la estabilidad *in vitro* del complejo radiomarcado ( $^{67}\text{Ga}$ -DTPA- $\beta$ -NTx) se evaluó midiendo la disociación de  $^{67}\text{Ga}$  por iTLC a distintos intervalos de tiempo durante 48 h. Para ello se incubaron 50  $\mu\text{L}$  del complejo en 1 mL de suero humano a 37 °C y después se analizaron 5  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción a los tiempos establecidos.

#### 5.3.4 Tiempo de residencia de la $^{67}\text{Ga}$ -DTPA- $\beta$ -NTx en el sitio de inoculación

El tiempo que permanece la  $\beta$ -NTx o la albúmina radiomarcada en el sitio de inyección, se midió durante 48 h en un grupo de ratas macho (n = 3) de la cepa Wistar (250 - 280 g). La anestesia en las ratas se indujo con isoflurano al 3% y se mantuvo al 2% durante la toma de las imágenes. La temperatura de los animales se controla durante todo el experimento, utilizando placas térmicas. Las proteínas radiomarcadas (aproximadamente 100  $\mu\text{g}$  con actividad específica de 2 mCi/mg) se administraron por vía subcutánea, en la almohadilla plantar de las patas traseras. En la pata derecha se inyectó  $\beta$ -NTx y en la pata izquierda BSA. Después de la inyección se dio un suave masaje durante un minuto para favorecer la absorción de las proteínas.

Las imágenes del sitio de inyección se tomaron a las 0, 1, 1.5, 3, 5, 26 y 48 h, con el equipo micro-PET/SPECT/CT de la marca Albira, equipado con dos minicámaras gamma con cristal centelleo de CsI(Na) y colimador en la modalidad de pin-hole con 1mm de apertura y punto focal de 3.2 cm. La cantidad remanente en cada tiempo se determinó cuantificando la radiactividad en la región de interés (ROI, por sus siglas en inglés) con respecto a un estándar de actividad conocida y se realizó la corrección por el decaimiento del  $^{67}\text{Ga}$ .

### 5.3.5 Biodistribución por Imagen

Las imágenes de cuerpo entero se tomaron a las 0, 1, 3, 5 y 24 h post-inyección, en el micro-SPECT/CT con la modalidad de imagen estática 2D, usando tres camas (5 minutos cada una) con un Field of View (FoV) de 60 mm de diámetro para cubrir la totalidad del cuerpo de la rata, con una matriz de 128 x 128 píxeles. La reconstrucción de las imágenes se realizó mediante el algoritmo Iterativo OSEM con 2 iteraciones para 4 subconjuntos. Las adquisiciones tomográficas de SPECT se hicieron 3 h post-inyección con 60 proyecciones de 30 segundos por campo, para un total de 3 campos de 60 mm cada uno.

Con la finalidad de identificar claramente los órganos blanco, 12 horas antes de experimento se les suministró a las ratas alimento impregnado con medio de contraste Iodado (Optiray 320 de Mallinckrodt) el cual contiene Ioversol (320 mg/ml).

### 5.3.6 Cinéticas plasmáticas

Las cinéticas se midieron en diferentes grupos de ratas macho (n = 4), cepa Wistar, de 250-300 g que se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Grupos experimentales para los estudios farmacocinéticos

Grupo	Molécula administrada	Vía de administración	Dosis (µg)	Actividad específica* (mCi/mg)
1	<sup>67</sup> Ga-DTPA-β-NTx	IV	50	3.0 - 3.4
2	<sup>67</sup> Ga-DTPA-β-NTx	SC	100	3.0 - 3.4
3	<sup>67</sup> Ga	IV	-	-
4	<sup>67</sup> Ga	SC	-	-
5	<sup>67</sup> Ga-DTPA-BSA	SC	100	3.0 - 3.4

\* La actividad inyectada del <sup>67</sup>Ga libre por individuo fue de 59 (± 8) µCi.

La inyección IV se hizo en la vena caudal de la cola y la SC en la almohadilla plantar de la pata trasera. Las muestras sanguíneas se tomaron haciendo una pequeña incisión en la cola y colectando la muestra con un capilar de vidrio (10 µL), a tiempos previamente establecidos (0, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75, 90, 115, 120, 150, 180 min; 24 h) Para

las cinéticas de la neurotoxina administrada por vía SC se tomaron las muestras en los mismos tiempos que para la intravenosa y además a los 240, 300, 360, 420, 540 min y 30 h. La cuantificación de las muestras se hizo en el contador de centelleo de tipo pozo. Los animales se mantuvieron en cajas metabólicas durante 48 h con agua y comida ad libitum. La biodistribución en órganos, heces y orina se cuantificó después de sacrificar a los animales por dislocación cervical, bajo sedación con isoflurano al 4%.

## 6. Resultados y discusión

### 6.1 Caracterización del veneno completo

#### 6.1.1 Dosis Letal media

La DL<sub>50</sub> IV de *M. fulvius* fue de 0.3 mg/kg, cercana a la reportada para otros elápidos de América como *M. nigrocinctus* y *M. surinamensis*, con DL<sub>50</sub>s de 0.85 y 0.38 (mg/kg), respectivamente (de Root et al., 2004). La potencia letal de *M. fulvius* es también comparable con la de algunos elápidos del viejo mundo, como las cobras *Walterinnesia aegyptia* (0.3 mg/kg) y *Naja atra* (0.34 mg/kg); o la mamba *Dendroaspis polylepis* (0.25 mg/kg) ([www.snakedatabase.org](http://www.snakedatabase.org)). Además de que la potencia letal de *M. fulvius* es alta, la mordedura se considera una emergencia médica, por los casos clínicos documentados y porque en un estudio realizado por Roze (1996) se estimó que un ejemplar adulto puede inyectar hasta cuatro veces la dosis letal en humano (5 mg).

#### 6.1.2 Actividad fosfolipasa A<sub>2</sub>

La medición de la actividad PLA<sub>2</sub> *in vitro* resultó de 492 ± 137 U/mg, la cual, comparada con lo reportado para otras especies de *Micrurus sp* (de Root et al., 2004) es una de las más altas, y sin duda, juega un papel importante en la toxicidad del veneno.

Los estudios sobre la toxicidad de las β-NTxs indican que la actividad PLA<sub>2</sub> es necesaria puedan ejercer el efecto neurotóxico, y aunque el mecanismo de acción no se ha elucidado completamente, se propone que estas toxinas se unen a la membrana plasmática

presináptica, inhiben la exocitosis de la acetilcolina y promueven el daño axonal, lo cual se traduce en neurotoxicidad presináptica (Rossetto y Montecucco, 2008; Rigoni et al., 2008).

### 6.1.3 Actividad hialuronidasa

La actividad hialuronidasa en el veneno de *M. fulvius* fue baja (25 U/mg), comparada con la reportada para venenos de alacrán, avispas y arañas (Kemeny et al., 1984; Girish et al., 2007; Clement et al., 2012). En nuestro grupo de investigación, se determinó la actividad hialuronidasa de la tarántula *Braquipelma Vagans* (Clement et al., 2012) y ésta fue casi 30 veces mayor que la de *M. fulvius* (705.7 U/mg). Por otra parte, Tan y colaboradores (1991) midieron la actividad hialuronidasa de distintas especies de *Micrurus*, entre ellas *M. fulvius*; los autores reportaron que la actividad hialuronidasa entre ellas es variable y moderada.

La enzima hialuronidasa facilita la absorción de moléculas inyectadas por vía subcutánea, debido a que degrada el ácido hialurónico y reduce la viscosidad de la matriz extracelular (Girish et al., 2007). En el caso de venenos, se ha demostrado que esta enzima facilita la absorción de las toxinas y que tiene un papel importante en el envenenamiento (Girish et al., 2004); sin embargo, la baja actividad en el veneno de *M. fulvius* sugiere que esta enzima no tiene gran impacto en el proceso de absorción.

### 6.1.4 Electroforesis de dos dimensiones (2D-PAGE)

La separación de las proteínas del veneno por electroforesis de dos dimensiones dio como resultado 40 spots bien definidos (Figura 7). Los spots más abundantes (22), se escindieron del gel y se analizaron por espectrometría de masas como se describe en la metodología. La secuencias de los péptidos encontrados se comparó con los datos publicados en el transcriptoma de *M. fulvius* (Margres et al., 2013). A partir del análisis proteómico, se encontró que el veneno contiene cuatro isoformas de lectina tipo 1b, 14 isoformas de fosfolipasas A<sub>2</sub>, una fosfodiesterasa y tres isoformas de metaloproteasas tipo 1 dependientes de Zinc (Tabla 2). Los resultados de nuestro análisis muestran que el componente más abundante en el veneno de *M. fulvius* son las fosfolipasas del tipo A<sub>2</sub> cuya masa molecular va de 13 a 16 kDa y son de naturaleza básica.

Por otro lado, el spot 9201 no se encontró en la base de datos del transcriptoma por lo cual se hizo un análisis escrupuloso utilizando el software MASCOT, en el cual se determinó que tiene similitud con un precursor de toxina de tres dedos (3FTx) (29% de cobertura y 128 MASCOT score) el precursor fue encontrado en la especie *M. corallinus* por Leao y col., (2009).

Los resultados que se obtuvieron mediante el análisis proteómico del veneno de *M. fulvius* son consistentes con los datos del transcriptoma, dado que se reportó que el 64.9% de los transcritos en la glándula de veneno corresponden a PLA<sub>2</sub> y 21.1% para 3FTxs (Margres y col., 2013). En el transcriptoma se hallaron también transcritos poco abundantes para proteínas que no encontramos en el proteoma tales como el inhibidor tipo Kuniz, L-aminooxidasa, nucleotidasa, factor de crecimiento endotelial vascular y péptido natriurético. Con respecto a la hialuronidasa, la secuencia no se halló en el análisis proteómico pero sabemos que se encuentra en el veneno por la medición de la actividad enzimática, aunque es muy probable que la concentración en el veneno sea baja. Las razones de que algunas proteínas reportadas en el transcriptoma no se hayan encontrado en el análisis proteómico son las siguientes:

1. El estudio del transcriptoma de *M. fulvius* fue hecho con la glándula de veneno de un solo individuo mientras que el análisis proteómico aquí mostrado se realizó con un pool de veneno de 10 individuos adultos.
2. Está bien documentado en el estudio proteómico y transcriptómico de otras serpientes del género *Micrurus* (Correa-Netto et al., 2011), que pueden existir transcritos con expresión transiente, temporal o nula y que además se pueden encontrar componentes celulares de glándulas secretoras de veneno o saliva.
3. La baja resolución en el gel de dos dimensiones para las proteínas de bajo peso molecular (6-9 kDa) no permitió hacer un análisis apropiado de ellas.
4. El análisis proteómico se limitó a 23 de los 40 spots resueltos en el gel 2D, por lo que varias proteínas reportadas en el transcriptoma que están en baja proporción podrían haberse quedado embebidas en el gel.

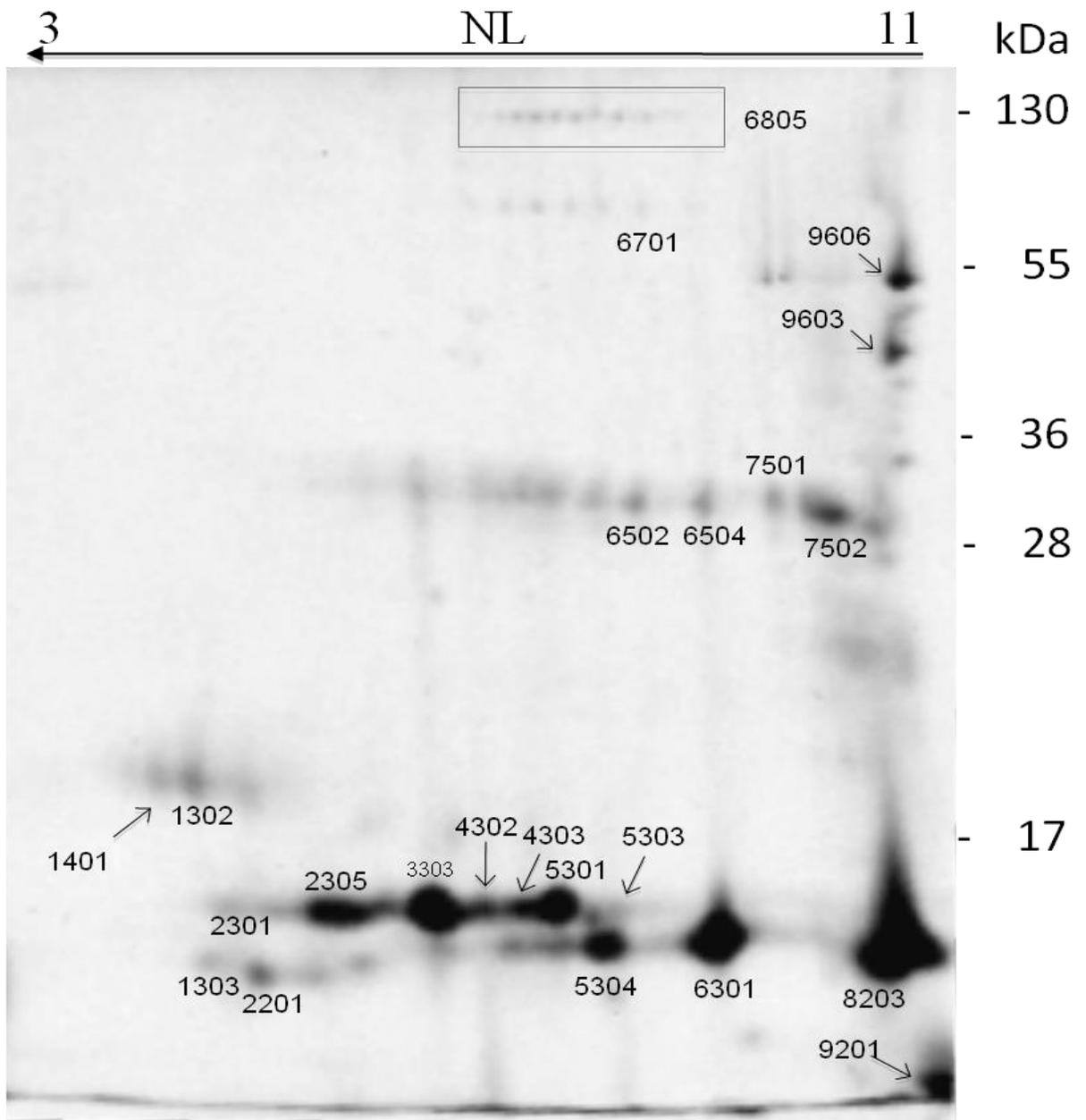


Figura 7. Perfil electroforético en gel de dos dimensiones (2D-PAGE) del veneno de *M. fulvius*, con gradiente no-lineal de pH de 3-11, gel de bis-acrilamida al 12.5%.

Tabla 2. Secuencias identificadas en el proteoma del veneno de *M. fulvius* y comparadas con los datos del transcriptoma reportado por Margres et al., en 2013

No. spot	Secuencias halladas en el análisis por MS/MS	Ion precursor (m/z)	No. carga (z)	Transcriptoma ( <i>M. fulvius</i> ; SRA062772)	Familia	Covertura (%)
1302	LFDDTK NVWIGLNDPR IWEWTDR EYCVHLLASQGYLK WNDTPCESLFAFICR TWPDAEMFCR	369.69 592.31 503.24 841.43 639.29 664.78	+2 +2 +2 +2 +3 +2	gi 537444939	Lectina tipo C 1b	45.6
1303	NVWIGLNDPR	592.32	+2	gi 537444939	Lectina tipo C 1b	7.3
1401	EYCVHLLASEGYLK NVWIGLNDPR	561.27 592.30	+3 +2	gi 537444939	Lectina tipo C 1b	19.7
2201	LFDDTKTWPDAEMFCR IWEWTDR SSTNYTSWNEGEPNNSWNK EYCVHLLASQGYLK WNDTPCESLFAFICR NVWIGLNDPR	683.30 503.24 1107.96 841.41 958.43 592.31	+3 +2 +2 +2 +2 +2	gi 537444939	Lectina tipo C 1b	59.5
2301	APYNDKKNYNIDLK SWWDFADYGCYCGSGGSGTPVDDLK TAALCFAK	784.40 1458.10 441.23	+2 +2 +2	gi 537444805	Fosfolipasa A <sub>2</sub> 2a	38.5
2305	NMIECTTKR CKDFVCNCDR TAALCFAK APYNDKKNYNIDLK WTLYSYDCSNGQLTCK	576.76 458.50 441.22 575.30 998.42	+2 +3 +2 +3 +2	gi 537444863	Fosfolipasa A <sub>2</sub> 11	46.7
3303	NMIECTTKR WTLYSYDCSNGQLTCK CKDFVCNCDR TAALCFAK APYNDKKNYNIDLK CCQVHDDCYGAEK	584.77 998.42 458.51 441.23 523.25 885.83	+2 +2 +3 +2 +3 +2	gi 537444863	Fosfolipasa A <sub>2</sub> 11	57.4
4302	CCQVHDDCYDTAEK APYNDKKNYNIDLK TAALCFAK	600.89 523.27 441.23	+3 +3 +2	gi 537444803	Fosfolipasa A <sub>2</sub> 2b	28.7
4303	WTLYSYDCSNGQLTCK CKDFVCNCDR APYNDKKNYNIDLK TAALCFAK VHGCWPK	1005.46 458.52 523.27 441.23 442.22	+2 +3 +3 +2 +2	gi 537444748	Fosfolipasa A <sub>2</sub> 5b	44.3
5301	NMIECTTKR WTLYSYDCSNGQLTCK CKDFVCNCDR TAALCFAK APYNDKKNYNIDLK CCQVHDDCYDTAEK DFVCNCDR	584.77 998.43 458.51 441.22 575.28 600.88 543.19	+2 +2 +3 +2 +3 +3 +2	gi 537444803	Fosfolipasa A <sub>2</sub> 2b	58.2
5303	CCQVHDNCYDEASK NMIQCTTK	893.35 498.23	+2 +2	gi 537444735	Fosfolipasa A <sub>2</sub> 7b	18.0
5304	WTLYSYDCSKGQLTCK	670.65	+3	gi 537444774	Fosfolipasa A <sub>2</sub> 31	13.11
6502	WTLYSYDCSNGQLTCK CKDFVCNCDR TAALCFAK	998.45 687.27 441.23	+2 +2 +2	gi 537444748	Fosfolipasa A <sub>2</sub> 5b	27.8

6504	TAALCFAK APYNDKKNYNIDLK	441.24 523.27	+2 +3	gi 537444731	Fosfolipasa A <sub>2</sub> 9	17.2
6701	APYNDKKNYNIDLK TAALCFAK	523.25 441.22	+3 +2	gi 537444819	Fosfolipasa A <sub>2</sub> 24	17.2
6805	LWNYFHSTLLPK TFLPIFVNSVN AATYFWPGSEVK SMEAIFLAHGPDFK YGPVSGQVIK VMEVLQWLDLPR VRDVELLTGLDFYSVLK NPFYNPSPAK DFYTFDSEAIK AEYLETWDTLMPNINK RLHFANNVR YISAYSQDILMPLWNSYTISK EQSSPLLCDFGPVPSPDLGCK DVELLTGLDFYSVLK	506.94 625.84 678.34 789.89 524.29 757.91 984.05 567.78 717.84 977.48 376.21 1255.13 1195.57 856.46	+3 +2 +2 +2 +2 +2 +2 +2 +2 +2 +3 +2 +2 +2	gi 537444868	Fosfodiesterasa 1	23.2
7501	APYNDKKNYNIDLK DFVCNCDR TYSYDCSEGK	523.26 543.20 605.23	+3 +2 +2	gi 537444777	Fosfolipasa A <sub>2</sub> 30	25.4
7502	CKDFVCNCDR TAALCFAK APYNDKKNYNIDLK TYSYDCSEGK DFVCNCDR	687.27 441.23 523.26 605.24 543.21	+2 +2 +3 +2 +2	gi 537444821	Fosfolipasa A <sub>2</sub> 23	33.6
8203	HWLSFTNYGCYCGYGGSGTPVDELDR CKDFVCNCDR TAALCFAK IDPSHCQ TYSYDCSEGK CFPSVR	1004.42 458.51 441.22 428.67 605.22 383.18	+3 +3 +2 +2 +2 +2	gi 537444757	Fosfolipasa A <sub>2</sub> 4e	54.9
9603	TSVAVVQDYGK NDNAQLLTR SNVAVTLDFGK AAKDDCDLPELCTGR NQCIALMGSGVK DPDYGMVEPGTK DDCDLPELCTGR VYEMVNLLNK YIEFYVVVDNR	583.80 522.77 632.34 574.26 647.32 662.79 725.80 619.82 708.86	+2 +2 +2 +3 +2 +2 +2 +2 +2	gi 537444726	Metaloproteasa 1 (SVMP)	17.5
9605	DPDYGMVEPGTK DMCFTLNQR	662.78 600.74	+2 +2	gi 537444726	Metaloproteasa 1 (SVMP)	3.5
9606	AAKDDCDLPELCTGR TSVAVVQDYGK SNVAVTLDFGK	574.26 583.81 632.35	+3 +2 +2	gi 537444726	Metaloproteasa 1 (SVMP)	6.4

### 6.1.5 Fraccionamiento del veneno por HPLC de fase reversa y caracterización de las fracciones aisladas.

En la separación del veneno completo por RP-HPLC se obtuvieron 22 fracciones, las cuales, fueron nombradas arbitrariamente con letras del alfabeto (Figura 8). De cada fracción se determinó la masa molecular, abundancia en el veneno y algunas actividades biológicas (Tabla 3).

Típicamente, en el perfil cromatográfico de venenos del género *Micrurus* fraccionados en condiciones similares a las que se usaron en este trabajo, se ha observado que las proteínas de bajo peso molecular (6-7.5 kDa) eluyen a bajas concentraciones de acetonitrilo (5-30%), y las de mediano peso molecular (13-17 kDa) aparecen después del minuto 30, por lo cual, el perfil de *M. fulvius* (Figura 8) es consistente con lo reportado en la literatura (da Silva et al., 1991; Rosso et al., 1996).

En las primeras fracciones (A, B y U) la masa molecular no se logró determinar debido a que probablemente no son componentes peptídicos, como está reportado en el análisis cromatográfico de otras *Micrurus* (da Silva et al., 1991; Rosso et al., 1996). Las siguientes fracciones se clasificaron en dos grupos proteicos: El primero, comprende componentes que eluyen del 28 al 35% de acetonitrilo con masa molecular de 6-7.5 kDa, la cual es similar a la reportada para distintas toxinas de tres dedos (3FTx) encontradas en venenos del género *Micrurus* (Olamendi-Portugal et al., 2008; Rosso et al., 1996; Serafim et al., 2002; Dal Belo et al., 2005; Rosso et al., 1996; Dokmetjian et al., 2009; Vital Brazil 1990). El segundo grupo, comprende los componentes con masa molecular de 13 a 16 KDa, con mayor hidrofobicidad dado que eluyen del 35 al 45% de acetonitrilo y las más abundantes en el veneno. Los componentes del segundo grupo son semejantes a las  $\beta$ -NTxs con actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> reportadas en diversas especies del género *Micrurus* (Serafim et al., 2002; Dal Belo et al., 2005; Vital Brazil, 1990).

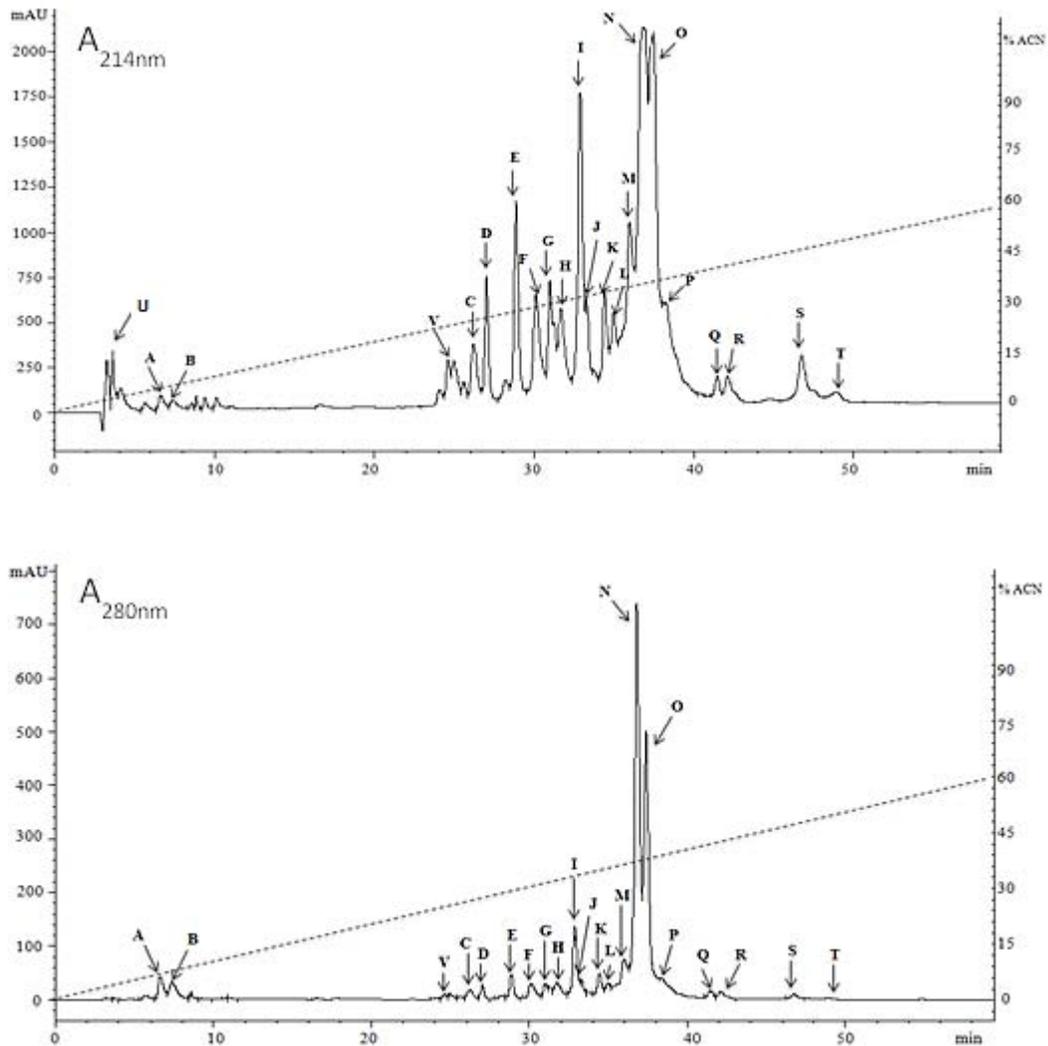


Figura 8. Perfil cromatográfico del fraccionamiento de veneno de *M. fulvius* (1 mg) por RP-HPLC con una columna C-18, detección de las fracciones a 214nm (superior) y 280 nm (inferior).

#### 6.1.6 Letalidad de las fracciones aisladas

La prueba de letalidad se realizó con aquellas fracciones de las cuales se obtuvo material suficiente, inyectando 20 µg en tres ratones por vía IV (Tabla 3). Las fracciones K, N y O fueron 100% letales en esta prueba. Las fracciones V, C, E, F, I, M y P no resultaron letales con 20 µg/ratón por vía IV, e incluso, los ratones no presentaron sintomatología alguna que indicara que son medianamente tóxicas en este modelo de estudio.

La  $DL_{50}$  de las fracciones aisladas se determinó únicamente para las que resultaron letales con 20  $\mu\text{g}/\text{ratón}$  (Tabla 3). Las fracciones más letales y abundantes en el veneno fueron N y O, con  $DL_{50}$ s de 1.07 y 0.91  $\mu\text{g}/\text{g}$ , respectivamente. La sintomatología que desarrollaron los ratones inyectados con las fracciones N y O, fue igual a la que se observa con el veneno completo; los síntomas fueron, disminución de la actividad y aislamiento, parálisis progresiva de las extremidades anteriores seguida de dificultad para respirar y finalmente la muerte. En la mayoría de los casos se observó orina de color rojo-marrón que podría atribuirse a la miotoxicidad, como lo sugieren de Root et al., (2012). En general, la sintomatología observada en ratones es consistente con los síntomas documentados en casos clínicos (Kitchens y Van Mierop, 1987), por lo que el modelo de ratón es útil en el estudio del envenenamiento por *M. fulvius* a nivel experimental.

#### 6.1.7 Actividad $PLA_2$ y alfa neurotóxica

Las fracciones más letales (N, O y K) fueron también las que mostraron mayor actividad  $PLA_2$ . En la literatura está reportado que la actividad  $PLA_2$  es necesaria para que las  $\beta$ -NTxs ejerzan la neurotoxicidad, aunque la actividad enzimática no es directamente proporcional a la neurotoxicidad. Por ejemplo, la taipoxina es una  $\beta$ -neurotoxina encontrada en el veneno de la serpiente *Oxyuranus s. scutellatus*, tiene baja actividad  $PLA_2$  y al mismo tiempo es altamente neurotóxica ( $DL_{50}$  2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , en ratón) (Fohlman et al., 1976; Punjerkar y Krizaj, 2007).

Tabla 3. Caracterización de los componentes del veneno de *M. fulvius* que se obtuvieron en el fraccionamiento por RP-HPLC

Muestra	TR (min)	%	Masa (Da)	<sup>a</sup> Actividad PLA <sub>2</sub> (U/mg ± SD)	Inhibición del nAChR (%)	Letalidad con 20 µg/ratón	DL <sub>50</sub> (µg/g) (IC 95%)
Veneno		100		492 (± 137)	ND	ND	0.3 (0.29 to 0.31 )
A	11.12	1.3	No detectada	ND	ND	ND	ND
B	12.50	1.7	No detectada	ND	ND	ND	ND
U	13.30	0.4	No detectada	ND	ND	ND	ND
V	28.12	2.5	6454.01; 6592.1; 6775.3	ND	0	0/3	ND
C	29.76	2.1	7145.4	ND	30	0/3	ND
D	30.37	2.9	6903.9; 6961.9; 7145.4	ND	60	ND	ND
E	32.22	5.2	6945.9; 6887.8	ND	100	0/3	ND
F	33.90	4.6	6493.8	ND	50	0/3	ND
G	34.35	4.0	6517.9	ND	50	ND	ND
H	34.60	3.6	6354.8; 6493.8; 7103.3; 7590.6	ND	20	ND	ND
I	35.92	8.8	13466	51 (± 5)	ND	0/3	ND
J	36.37	2.2	ND	ND	ND	ND	ND
K	37.50	3.2	13195.9; 13525.8; 13792	461 (± 57)	ND	3/3	1.07 (1.07 -1.08)
L	38.32	2.7	13212.9	180 (± 24)	ND	1/3	ND
M	38.90	8.7	13183.9	207 (± 54)	ND	0/3	ND
N	39.69	18.1	13436.9	758 (± 56)	ND	3/3	0.54 (0.52 -0.57)
O	40.22	15.3	13370.8; 7534.8	514 (± 132)	ND	3/3	0.91 (0.75 – 1.11)
P	41.14	7.0	6827.3; 7534.8	158 (± 34)	10	0/3	ND
Q	44.27	0.4	ND	69 (± 13)	ND	ND	ND
R	44.96	1.5	16000.5	41 (± 5)	ND	ND	ND
S	49.07	2.9	No detectada	ND	ND	ND	ND
T	51.50	1.0	No detectada	ND	ND	ND	ND

<sup>a</sup> La actividad fosfolipasa se midió por triplicado

TR = Tiempo de retención

ND = No determinada

CI = Intervalo de confianza  $\alpha = 0.05$

### 6.1.8 Electrofisiología de las fracciones con peso molecular de 6-7.5 kDa

La actividad alfa neurotóxica con  $1\mu\text{M}$  de cada fracción se midió en células humanas TE-671, las cuales expresan de manera endógena el receptor nicotínico para acetilcolina (nAChR) de tipo muscular. El efecto de las fracciones C, D, FG, H y P, fue parcial y reversible; la fracción V no mostró inhibición del receptor (Figura 9). La fracción E, fue la única capaz de abatir el 100% de la respuesta, aunque también de manera reversible (Tabla 3).

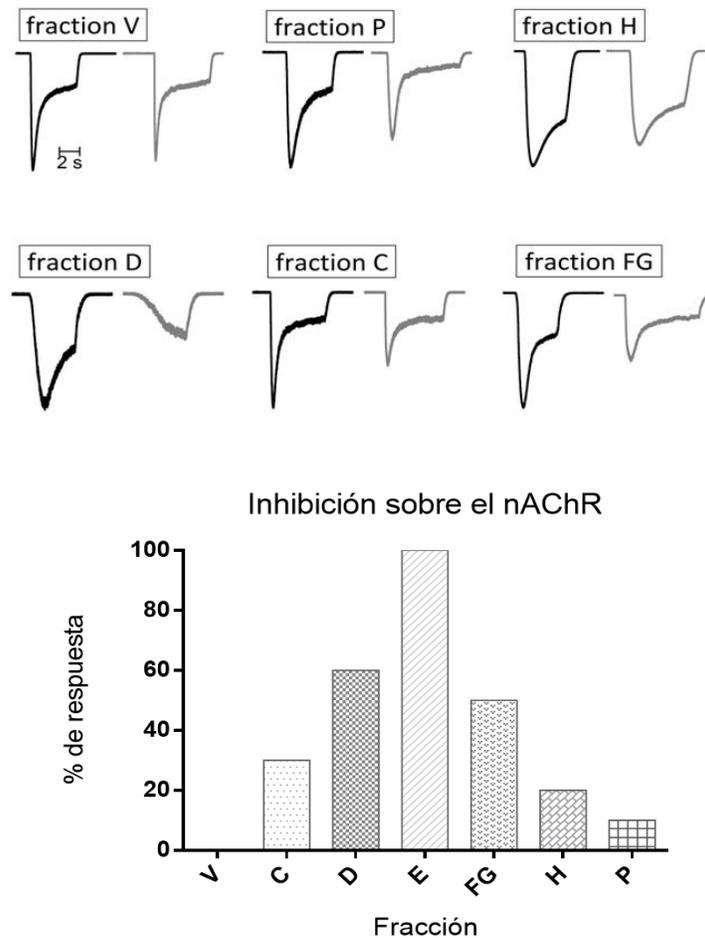


Figura 9. Inhibición del nAChR en células TE-671. (superior) El trazo en color negro representa el voltaje registrado en respuesta al estímulo de ACh y el gris representa la respuesta al estímulo de ACh después de añadir  $1\mu\text{M}$  de la fracción de interés. (inferior) Gráfica donde se representa la inhibición de cada fracción en porcentaje.

En la fracción E se encontraron dos masas moleculares, una de 6945.9 y otra de 6887.8; por ello, se utilizó cromatografía de intercambio catiónico para separar los componentes. En el perfil cromatográfico (Figura 10), se observaron dos picos bien definidos con tiempo de retención de 32 y 38 minutos, éstos se colectaron manualmente y se determinó la actividad alfa-neurotóxica de cada uno.

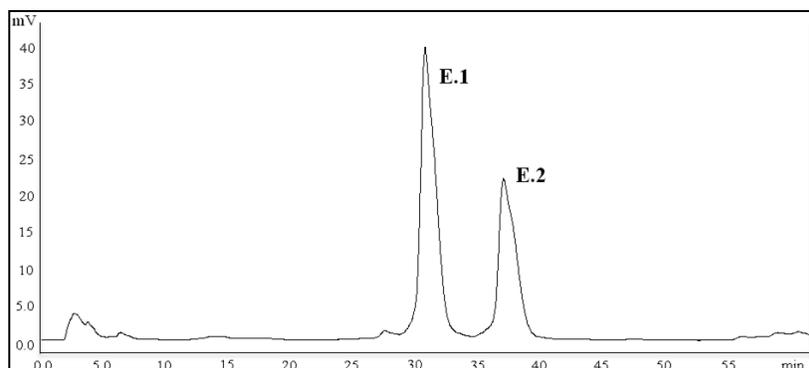


Figura 10. Cromatograma de la fracción “E” separada por HPLC-catiónico

Cada componente de la fracción E se evaluó por electrofisiología y se halló que ambos eran activos. A partir de la curva dosis-respuesta y se determinó que la  $IC_{50}$  fue de  $13 \pm 1$  y  $9.5 \pm 0.3$  nM para E.1 y E.2, respectivamente (Figura 11).

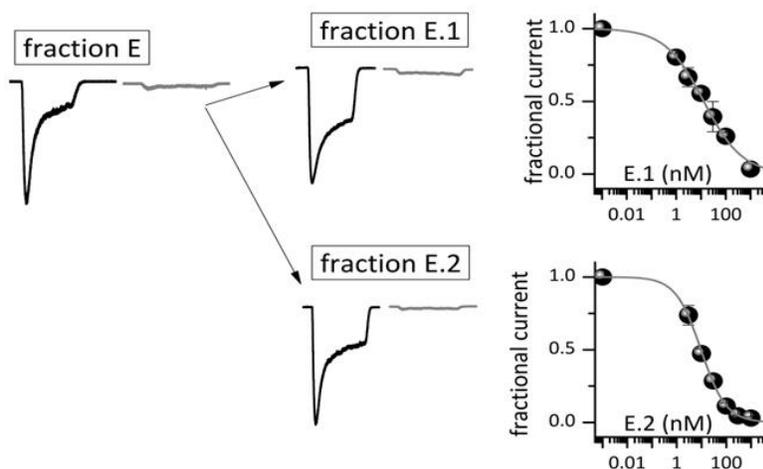


Figura 11. Determinación de la  $IC_{50}$  para cada componente de la fracción E. El trazo en color negro es la respuesta inicia al estímulo de ACh; el trazo en gris es la respuesta después de incubar la toxina.

Los resultados de la prueba de  $\alpha$ -neurotoxicidad *in vitro* para los componentes de bajo peso molecular son congruentes con la toxicidad medida en ratones, donde se encontró que las fracciones de 6-7.5 kDa no fueron letales inyectando 20  $\mu$ g por vía IV; por lo cual, podemos decir que en mamíferos no actúan como verdaderas  $\alpha$ -NTxs.

Recientemente, en el estudio del veneno de *M. tener* reportado por Bénard et al., (2014) se hallaron 3FTxs letales en reptiles y que no fueron tóxicas en el modelo de ratón, por lo que es probable que también los componentes de bajo peso molecular de *M. fulvius* sean letales en presas naturales, como lagartijas y serpientes pequeñas.

Por otra parte, parece haber una tendencia evolutiva de coralillos Norteamericanos hacia el enriquecimiento del veneno con  $\beta$ -NTxs, como se observa en la Figura 12, la cual compila datos proteómicos de distintas especies del género *Micrurus*. Por ello, sería importante estudiar la evolución de venenos del género *Micrurus* y la toxicidad en presas naturales para determinar la función de las 3FTxs en el veneno de corales Norteamericanos.

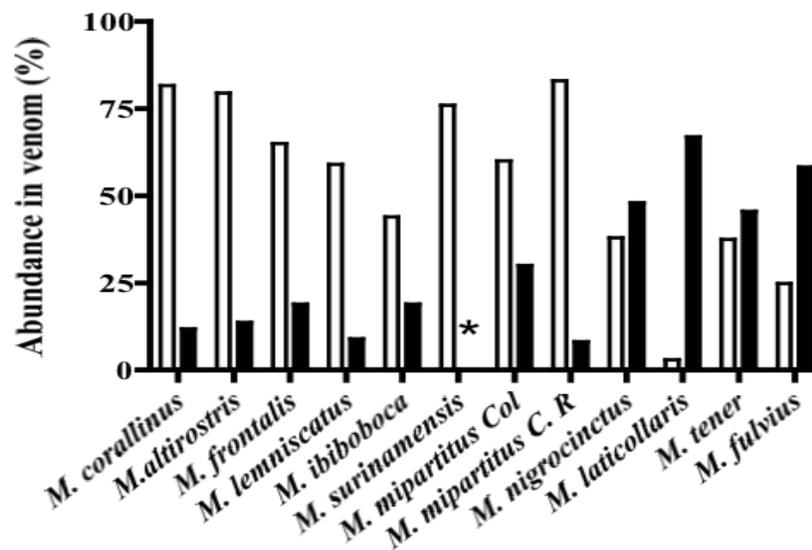


Figura 12. Proporción de componentes de diferentes venenos de *Micrurus*, 13-14 kDa (negro) and 6-8 kDa (blanco). Correa-Netto et al., 2011 (*M. altirostris*, *M. corallinus*); Fernandez et al., 2011 (*M. nigrocinctus*); Ciscotto et al., 2011 (*M. frontalis*, *M. ibiboca*, *M. lemniscatus*); Olamendi-Portugal et al., 2008 (*M. surinamensis*); Bénard-Valle et al., 2014 (*M. tener tener*); Rey-Suárez et al., 2011 (*M. mipartitus* (Colombia), *M. mipartitus* (Costa Rica)); Carbajal 2013 et al., 2013 (*M. laticollaris*); en este trabajo (*M. fulvius*). \*El porcentaje de las proteínas que pesan de 13-14 kDa no es especificado por los autores.

### 6.1.9 Secuenciación amino terminal

Las secuencias parciales encontradas mostraron alta identidad con secuencias reportadas en base de datos del transcriptoma (Tabla 4). Con base en el alineamiento y en la clasificación de las 3FTxs, hecha por Fry et al., (2003), los componentes E.1 y E.2 pertenecen a un grupo de toxinas huérfanas, este nuevo grupo se encontró recientemente, por lo cual, la información acerca de su función es escasa o nula.

Tabla 4. Secuencia amino terminal de la fracción E.1, E.2, N y O obtenidas por degradación de Edman

Fracción	Secuencia	Masa (Da)	Identidad (%)	Familia de proteínas
E.1	LKCKSSRTETMTCPEGEDKCEKYAVGLMHGYFFFIY TCTSKCHEGAYNVCCSTDLN	6945.9	96	3FTx
E.2	LKCYSSRTETMTCPXGEXKCEKYAVGXMGXGFFFX	6887.8	85	3FTx
N	NLIHKNMICTTKRSWWHFADYGCYCGSGSXTVP	13436.9	64	PLA <sub>2</sub>
O	NLIHFKNMIECTTKRSWWHFADYGCYCGSG	13370.8	100	PLA <sub>2</sub>

## 6.2 Farmacocinética y biodistribución de la principal $\beta$ -NTx de *M. fulvius*

### 6.2.1 Bioconjugación de la $\beta$ -NTx o albúmina con el quelante DTPA

La bioconjugación de la principal  $\beta$ -NTx de *M. fulvius* y de la albúmina sérica bovina (BSA) con el agente bifuncional DTPA se realizó a pH básico de 8.3, para favorecer la desprotonación del grupo amino de las lisinas el cual, mediante un ataque nucleofílico forma un enlace amido con uno de los carboxilos activados en el DTPA.

Los resultados del rendimiento por absorción atómica muestran que hay en promedio 2.5 átomos de  $\text{Cu}^{2+}$  por cada molécula de  $\beta$ -NTx-DTPA, por lo cual asumimos que hay al menos 2.5 quelantes (DTPA) unidos a cada  $\beta$ -NTx. En cuanto a la BSA-DTPA, se encontraron cinco átomos  $\text{Cu}^{2+}$  por cada BSA-DTPA. El hecho de que haya un mayor número de quelantes unidos a la BSA se debe a que es una molécula más grande que la  $\beta$ -NTx y que contiene mayor número de lisinas disponibles para reaccionar con el DTPA.

La electroforesis de dos dimensiones nos sirvió como prueba cualitativa de la bioconjugación, dado que se ha reportado que el punto isoeléctrico de proteínas unidas a quelantes bifuncionales con varios grupos carboxilo, se recorre hacia pH ácido (Gangopadhyay et al., 1994; Lee et al., 2003). Los geles de dos dimensiones que realizamos antes y después de la bioconjugación muestran que existen tres isoformas de la toxina nativa, las cuales se ubican hacia pH básico (aproximadamente 8-10); mientras que la neurotoxina modificada se enfoca completamente en pH ácido (pH 3), además se observan algunos complejos con mayor peso molecular que podrían ser varias moléculas de  $\beta$ -NTx unidas a una o más moléculas de DTPA (Figura 13).

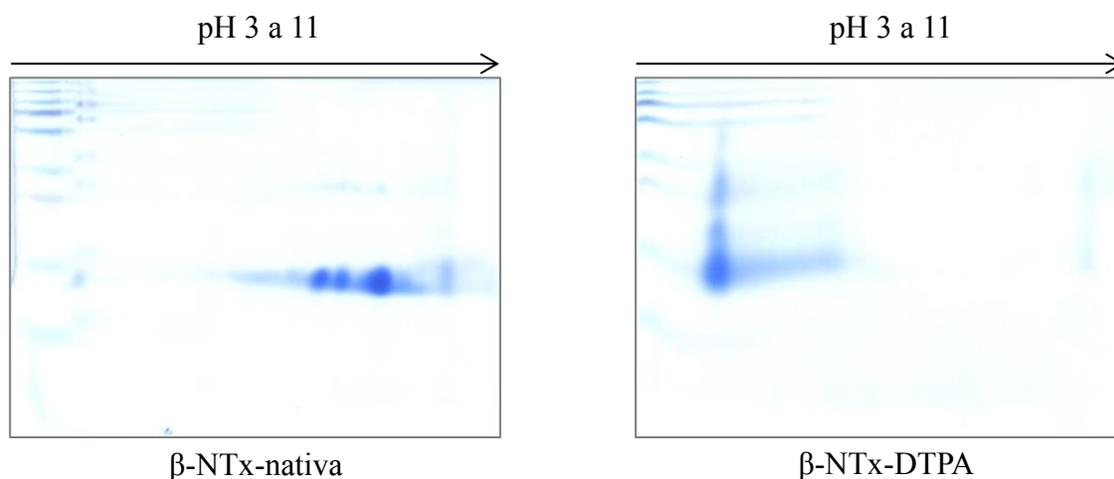


Figura 13. Electroforesis de dos dimensiones de la  $\beta$ -NTx nativa (izquierda) y la bioconjugada con DTPA (derecha) en un gel de bis-acrilamida al 17%.

### 6.2.2 Actividad biológica de la $\beta$ -NTx-DTPA

En este experimento se determinó el efecto que tuvo la bioconjugación sobre la actividad enzimática. La actividad se midió el mismo día bajo las mismas condiciones. La enzima nativa mostró 675 U/mg mientras que en la bioconjugada la actividad fue de 278 U/mg; el resultado indica que tras el proceso de bioconjugación la actividad enzimática disminuyó 2.4 veces. Este resultado podría deberse a que son activas solo aquellas  $\beta$ -NTxs donde el sitio catalítico está libre para actuar, mientras que aquellas que formaron complejos

entrecruzados podrían haber perdido la actividad enzimática, debido al impedimento estérico o a que se encuentra bloqueado el sitio catalítico.

Algunos trabajos de péptidos bioconjugados con DTPA, mencionan que al modificar la proporción péptido:DTPA o añadir un “linker” puede ayudar a conservar la actividad biológica (Fichna y Janecka, 2003; Shi et al., 2011), por lo cual, debería considerarse para futuros estudios de la neurotoxina de *M. fulvius* o de otras toxinas bioconjugadas.

La letalidad de la  $\beta$ -NTx-DTPA disminuyó tres veces con respecto a la nativa, ésta disminución coincide con la pérdida de la actividad enzimática, donde la enzima conservó solo un tercio de su actividad inicial. Con base en la literatura, se sabe que aunque la actividad PLA<sub>2</sub> es necesaria para la neurotoxicidad ésta no es directamente proporcional al efecto neurotóxico (Chang et al., 1977); es decir, que puede haber toxinas con baja actividad PLA<sub>2</sub> pero altamente letales. Sin embargo, en el caso de *M. fulvius* la disminución de la actividad PLA<sub>2</sub> se reflejó directamente en el efecto neurotóxico y letal en ratones.

### 6.2.3 Eficiencia del radiomarcaje y pureza radioquímica

Bajo las condiciones de tiempo (1 h) y temperatura (37 °C) de incubación que se establecieron en el radiomarcaje con <sup>67</sup>GaCl<sub>3</sub> se logró obtener 60-78% de eficiencia. Después de la purificación, la pureza radioquímica de las proteínas marcadas fue  $\geq 92\%$ . Estos resultados son consistentes con lo reportado en la literatura (Hnatowich et al., 1983; Haisma et al., 1984) y son aceptables para realizar los experimentos de cinética y biodistribución.

### 6.2.4 Evaluación de la estabilidad en suero

La estabilidad de las proteínas radiomarcadas e incubadas en suero a 37 °C se mantuvo por encima del 85% durante 48 horas. Para determinar la unión inespecífica del radioisótopo a proteínas se incubó el <sup>67</sup>Ga libre con albúmina nativa, dando como resultado 1% de unión. Con base en nuestros resultados, podemos decir que la estabilidad del complejo proteína-quelante-radionúclido fue la adecuada para los experimentos de cinética y biodistribución *in vivo*. Nuestros resultados son congruentes con lo reportado por Lewis et al., (1994);

quienes encontraron que la estabilidad de un complejo anticuerpo-DTPA-<sup>111</sup>In se mantiene alrededor del 85% durante 50 h después del radiomarcaje.

### 6.3 Tiempo de residencia de la <sup>67</sup>Ga-DTPA-β-NTx en el sitio de inoculación por imagen molecular

Los resultados muestran que 48 h después de la inyección queda el 10 (± 4%) y 9 (± 3%) de la β-NTx y BSA, respectivamente, en el sitio de inoculación. La mayor absorción ocurre durante las 3 h post-inyección, dado que en este tiempo se absorbe el 70% de la dosis inicial. Después, entre las 3 y 26 h, se absorbe otro 10% de la dosis y 48 h más tarde todavía queda el 10% en el sitio de inoculación. La dosis que permanece en el sitio de inyección y que sigue absorbiéndose lentamente podría contribuir a mantener los niveles tóxicos en sangre. En el caso de una mordida real, considerando los 5 mg de veneno que inyecta en promedio un coralillo, el 20% de veneno que quedaría en el sitio de inyección después de 3 h, sería suficiente para mantener el efecto neurotóxico en el humano.

Con base en estos resultados, se confirma que el sitio de inyección funciona como reservorio de liberación prolongada conocido en el área de venenos como “depósito de veneno” (Boyer et al., 2000). Este fenómeno ya se ha observado con otros venenos de serpiente (Reid y Theakston, 1983); fue sugerido a partir del análisis de casos clínicos de envenenamiento en los que se administró el antiveneno y horas después de haber dado de alta a los pacientes, éstos regresaban al hospital con síntomas de envenenamiento. El análisis de estos casos llevo a los expertos en el tema, a concluir que la recurrencia del envenenamiento está causada por el veneno que sigue activo en el sitio de inoculación y que continúa entrando al torrente sanguíneo (Seifert y Boyer, 2001; Boyer et al., 2001; Warrell, 2010).

La confirmación de que existe un “depósito” de la neurotoxina podría tener impacto en la manera de tratar el envenenamiento por *M. fulvius*, debido a que si el antiveneno se administrara en forma de infusión, en lugar de bolo intravenoso, éste se mantendría en niveles sanguíneos adecuados para neutralizar a la toxina que está entrando lentamente al torrente sanguíneo; ya sea desde el sitio de inyección o desde tejido profundo.

#### 6.4 Biodistribución por imagen

La biodistribución de la  $^{67}\text{Ga}$ -DTPA- $\beta$ -NTx inyectada por vía subcutánea muestra que 3 h después de la inyección, se presenta la mayor captación de actividad en el ganglio poplíteo, ganglio lumbar y riñones (Figura 15 (imagen representativa n = 4)); esto es consistente con la concentración máxima encontrada en las cinéticas plasmáticas. La acumulación en tales sitios es debida a la biodistribución de la  $\beta$ -NTx, dado que en el grupo control, al cual se le administró el Galio-67 libre, se observa la marca distribuida principalmente en sangre y una ligera captación en pulmones (Figura 14). Las imágenes confirman claramente la participación del sistema linfático en la absorción del veneno. Después de 24 horas, la acumulación de la marca radioactiva en el ganglio poplíteo y en los riñones es escasa, esto se debe a que en 24 h la mayor parte de la dosis inyectada ya se eliminó.

La acumulación de la marca en los riñones está relacionada con el metabolismo de la  $\beta$ -NTx, este resultado es consistente con lo reportado para proteínas en general, ya que está bien documentado que las proteínas menores a 50 kDa se metabolizan por vía renal (Tang y Meibohm, 2006). Otra posibilidad es que exista afinidad de la neurotoxina o sus metabolitos por alguna estructura en los riñones, esto podría estar relacionado también con la nefrotoxicidad que reportan de Root et al., (2012) cuando inyectan el veneno de *M. fulvius* por vía intramuscular en ratas.

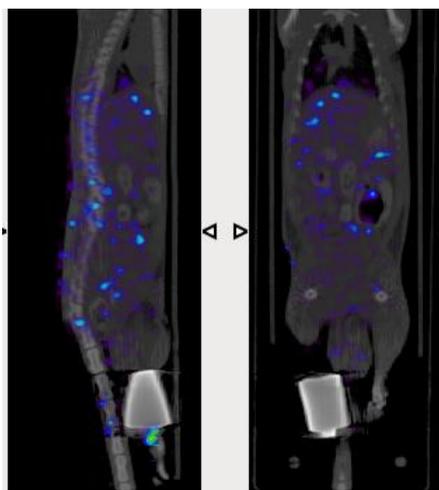


Figura 14. Biodistribución del  $^{67}\text{Ga}$  libre a las 3 h post-inyección; en ella se puede observar la marca distribuida en sangre y ligera captación en las mucosas.

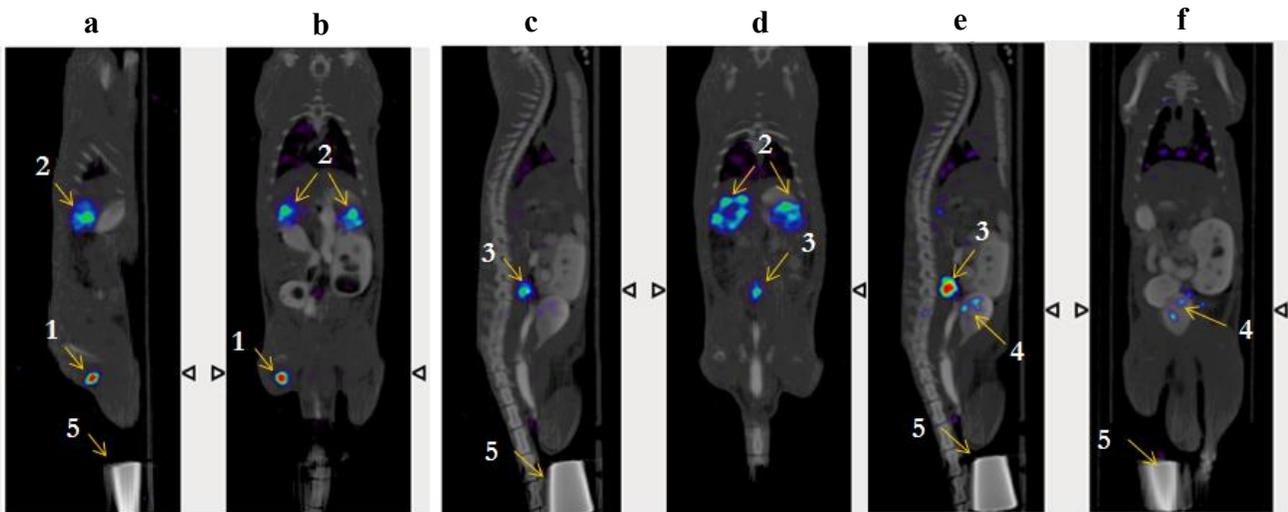


Figura 15. Imagen SPECT/CT fusionada de la biodistribución de  $^{67}\text{Ga-DTPA-}\beta\text{-NTx}$  3 h post-inyección. En el panel a y b, se presenta un corte sagital y coronal, respectivamente, donde se observa la captación en el ganglio poplíteo (marcado con el número 1) y los riñones (marcados con el número 2). En el panel c, el corte sagital donde se observa la acumulación en el ganglio lumbar (marcado con el número 3). En el panel d, el corte sagital que muestra la acumulación en ganglio lumbar y los riñones. En el panel e, se aprecia la diferencia entre la captación del ganglio lumbar y la vejiga (marcada con el número 4); el panel f, muestra solo la acumulación en vejiga. El número 5 indica el escudo de plomo que se colocó en el sitio de la inyección.

### 6.5 Biodistribución en órganos

El análisis de la biodistribución permite identificar los órganos o tejidos diana, la permeabilidad y el tiempo de residencia en un blanco específico. La biodistribución está determinada por diversos factores asociados a la molécula en estudio, tales como la vía de administración, el tamaño molecular, las propiedades fisicoquímicas y la afinidad por órganos o tejidos. También influyen factores asociados a la fisiología, tales como la tasa de irrigación sanguínea en cada órgano, el metabolismo, sobreexpresión de receptores, entre otros. En el caso de la  $\beta\text{-NTx}$ , debido a que la inyección fue por vía SC y parte de la absorción es por la vía linfática, la acumulación por imagen molecular se observó en los ganglios poplíteo y lumbar (Figura 15). El órgano que mostró la mayor captación fueron los riñones; esto podría deberse al metabolismo y eliminación de la toxina. Los datos de la imagen molecular son consistentes con la acumulación en órganos a las 24 h (Tabla 5 y Figura 16).

El riñón es el principal órgano de eliminación para proteínas menores a 60 kDa, el metabolismo renal esta mediado por tres procesos metabólicos: 1) los péptidos grandes y complejos se filtran en los glomérulos, de ahí se reabsorben en vesículas endocíticas donde son hidrolizadas a fragmentos peptídicos pequeños y aminoácidos. 2) los péptidos pequeños y lineales se filtran por glomérulo y se metabolizan por exopeptidasas, después los aminoácidos resultantes son reabsorbidos a circulación sistémica. 3) las proteínas que no se filtran por glomérulo se extraen de los peritúbulos a capilares postglomerulares, donde se metabolizan vía intracelular (Tang y Meibohm, 2006).

Con base a la estructura de la neurotoxina el mecanismo de eliminación podría ser el número dos, porque aunque el tamaño molecular no es muy grande (13, 436 Da) la estructura es compleja porque contiene siete puentes di-sulfuro que le confieren alta estabilidad (Arce-Bejarano et al., 2014).

Tabla 5. Biodistribución 24 h post-inyección

Muestra	<sup>67</sup> Ga-DTPA-β-NTx	<sup>67</sup> Ga-DTPA-BSA	<sup>67</sup> Ga
	% dosis	% dosis	% dosis
Riñones	3.15 (± 0.77)	1.96 (± 0.69)	1.82 (± 0.19)
Corazón	0.13 (± 0.03)	0.08 (± 0.02)	0.04 (± 0.01)
Pulmones	0.47 (± 0.20)	0.14 (± 0.06)	0.04 (± 0.01)
Hígado	1.42 (± 0.75)	0.64 (± 0.02)	0.17 (± 0.03)
Diafragma	0.10 (± 0.04)	0.04 (± 0.01)	0.03 (± 0.01)
Estómago	0.21 (± 0.10)	0.16 (± 0.07)	0.04 (± 0.01)
Bazo	0.76 (± 0.30)	0.60 (± 0.11)	0.32 (± 0.19)
Orina	32.1 (± 3.0)	33.7 (± 12.0)	61.3 (± 4.5)
Heces	2.23 (± 0.66)	3.1 (± 1.6)	5.47 (± 2.0)

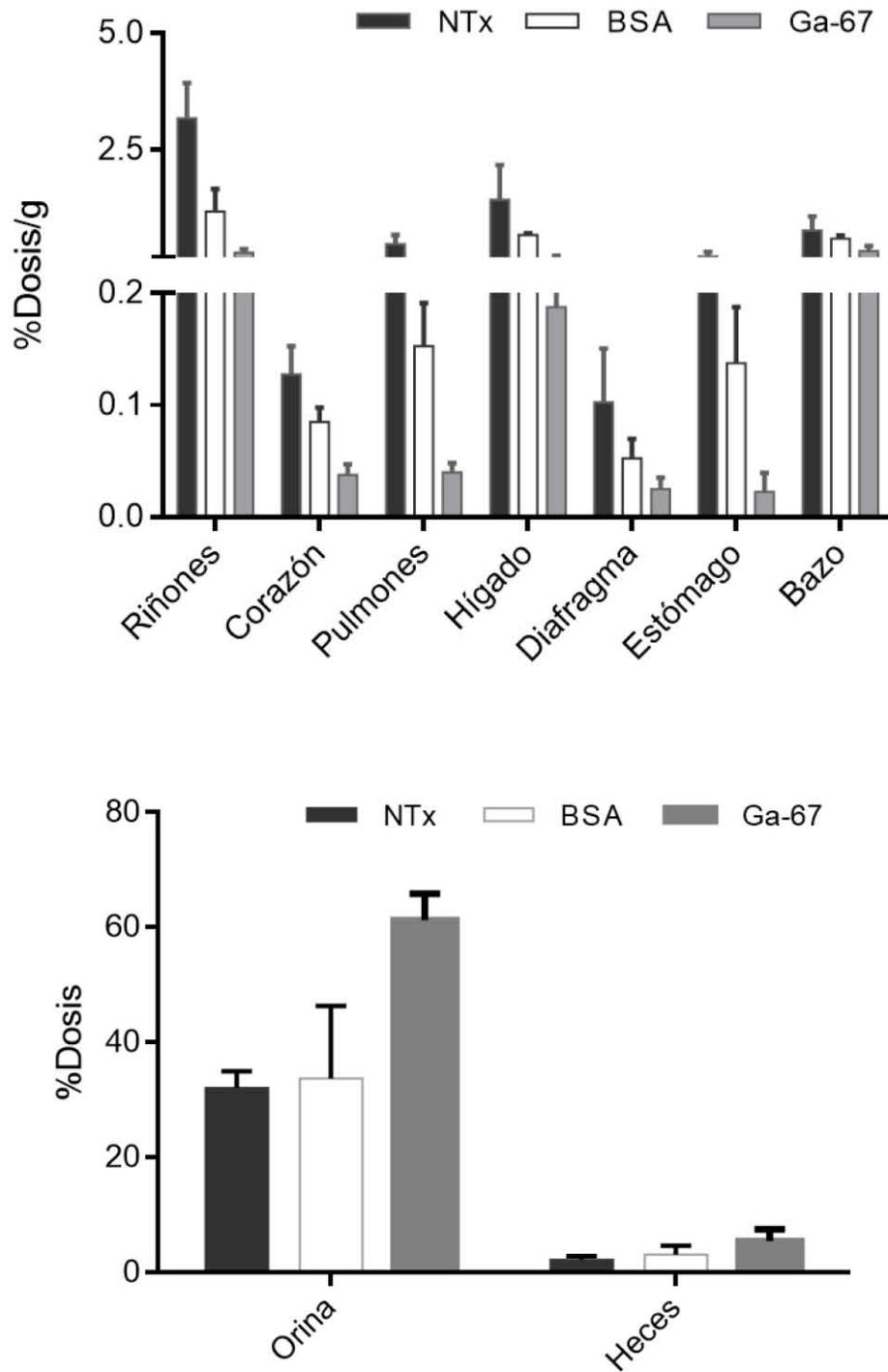


Figura 16. En la parte superior se muestra el gráfico de la biodistribución en órganos y abajo la dosis cuantificada en heces y orina, 24 h después de la inyección. Los datos son el promedio de  $n = 4 \pm DE$ .

## 6.6 Radiofarmacocinética

El análisis de la distribución y eliminación de la NTx radiomarcada e inyectada por vía IV se realizó a partir de la cinética en sangre (Grupo 1). En la Figura 17 se muestra la gráfica del comportamiento cinético durante 24 horas.

Figura 17. Gráfica de la cinética plasmática de la NTx radiomarcada, administrada vía IV. Los datos fueron corregidos por la dosis, peso y decaimiento del  $^{67}\text{Ga}$ ; representan el promedio  $\pm$  DE (n = 4) y la línea es el ajuste a decaimiento bi-exponencial.

La cinética se ajustó a decaimiento bi-exponencial con  $R^2$  de 0.939 ( $\pm$  0.014). La gráfica muestra que la NTx se distribuye rápidamente en el organismo con una fase  $\alpha$  de 4.33 ( $\pm$  0.65) min y se elimina de manera lenta con una fase  $\beta$  de 91 ( $\pm$  46) min. Esto indica que la  $\beta$ -NTx se distribuye con rapidez en órganos altamente perfundidos, como el hígado, riñones y corazón, y después en fluidos extracelulares.

El volumen de distribución aparente (Vd) resultó de 53 ( $\pm$  9) mL, cercano al 20% del peso corporal de la rata, esto significa que la  $\beta$ -NTx se distribuye en el líquido intersticial. Este resultado es congruente con el ajuste bi-exponencial de la farmacocinética y es el comportamiento que se ha reportado para la mayoría de las proteínas exógenas

administradas por vía IV (Tang y Meibohm, 2006). El volumen de distribución en estado estacionario ( $V_{SS}$ ) es cuando se alcanza el equilibrio entre lo que está en circulación sanguínea y lo que se está eliminando; en este caso, resultó de 106% ( $\pm 28$ ). El resultado sugiere que hay afinidad por algún tejido específico; ésta neurotoxina actúa en las terminales presinápticas de la unión neuromuscular por lo cual, su distribución será en todas las terminales nerviosas periféricas. La velocidad de depuración (CL) encontrada fue de 0.6 ( $\pm 0.1$ ) mL/min. En general, para proteínas, la velocidad de depuración y el mecanismo dependen del tamaño molecular, carga global, hidrosolubilidad, grupos funcionales, estructura terciaria y cuaternaria y propensión a agregación; además de la función renal del organismo en el cual se analiza la cinética (Tang y Meibohm, 2006; Goodman y Gilman, 1996).

La cinética de la  $\beta$ -NTx radiomarcada se analizó también en la administración SC (Grupo 2), debido a que por esta vía ocurre la inoculación del veneno en un envenenamiento real. En la figura 18 se muestra la gráfica de la cinética que se obtuvo.

Figura 18. Gráfica de la cinética plasmática de la NTx radiomarcada, administrada vía SC. Los datos fueron corregidos por la dosis, peso y decaimiento del  $^{67}\text{Ga}$ ; representan el promedio  $\pm$  DE (n = 4).

Al administrar la  $\beta$ -NTx radiomarcada por vía SC se modifica considerablemente la cinética comparada con la administración IV. Aquí se observa una absorción rápida en la primera hora, después se mantiene en estado estacionario (concentración constante) por tres horas y empieza la fase de eliminación. El  $t_{1/2}$  aumentó cinco veces con respecto al intravenoso, esto se explica por la absorción constante desde el sitio de inyección y la eliminación lenta. El tiempo medio de residencia (MRT), el tiempo promedio que permanece la toxina en el organismo, aumentó casi dos veces con respecto al IV. El volumen de distribución en estado estacionario resultó de 150% del peso corporal, esto indica que existe afinidad por algún tejido; en este caso, por ser administración SC es la dosis que se encuentra en el sitio de inyección y que va entrando paulatinamente a circulación sanguínea. El CL no se modificó con respecto a la administración IV, este resultado era esperado ya que no depende de la vía de administración. La biodisponibilidad (F) que se alcanzó después de 48 h de cinética, fue de 93% ( $\pm 7$ ) mostrando una absorción casi completa.

En la Figura 19 se presenta la comparación de la cinética de los grupos 1 y 2.

Figura 19. Comparativo del comportamiento farmacocinético de la  $^{67}\text{Ga-DTPA-}\beta\text{-NTx}$  después de la administración IV y SC.

En la Tabla 6 se muestran los parámetros farmacocinéticos calculados para los grupos experimentales 1 y 2. Los parámetros se obtuvieron a partir del análisis no compartamental.

Tabla 6. Parámetros farmacocinéticos de la  $^{67}\text{Ga-DTPA-}\beta\text{-NTx}$  administrada por vía IV y SC

	Grupo 1 Promedio ( $\pm$ DE)	Grupo 2 Promedio ( $\pm$ DE)
tz (min)	2,880	1,440
t 1/2 (min)	91 ( $\pm$ 46)	449 ( $\pm$ 42)
Cz (cpm/mL)	7,300 ( $\pm$ 3873)	4,798 ( $\pm$ 628)
Vd (mL)	53 ( $\pm$ 9)	-
Vd (%)	19 ( $\pm$ 3)	-
$\lambda_z$	-	0.0016 ( $\pm$ 0.000056)
Cp <sub>max</sub> (cpm/mL)	271,829 ( $\pm$ 57,506)	124,518 ( $\pm$ 16,451)
t max (min)	-	83 ( $\pm$ 17)
AUC <sub>0-t</sub> (cpm/mL * min)	23,742,075 ( $\pm$ 2,575,063)	93,498,190 ( $\pm$ 8,340,021)
AUMC <sub>0-t</sub> (cpm/mL * min <sup>2</sup> )	11,530,926,608 ( $\pm$ 1,722,513,964)	65,910,025,832 ( $\pm$ 1,244,830,250)
CL (mL/min)	0.6 ( $\pm$ 0.1)	0.631 ( $\pm$ 0.04)
MRT (min)	488 ( $\pm$ 81)	701 ( $\pm$ 42.1)
Vss (mL)	290 ( $\pm$ 68)	442 ( $\pm$ 20)
Vss (%)	106% ( $\pm$ 28)	150% ( $\pm$ 9)
MAT (min)	-	213 ( $\pm$ 42)
F (%)	-	93% ( $\pm$ 7)

Con la finalidad de analizar la cinética del radionúclido  $^{67}\text{Ga}$  cuando se encuentra libre, ésta se midió de manera independiente por vía IV y SC (Grupos 3 y 4).

En la Figura 20 se muestra el comportamiento cinético del  $^{67}\text{Ga}$  inyectado por vía intravenosa medido durante 24 h.

Figura 20. Gráfica de la cinética plasmática del  $^{67}\text{Ga}$  administrado vía IV. Los datos fueron corregidos por la dosis, peso y decaimiento del  $^{67}\text{Ga}$ , representan el promedio  $\pm$  DE  $n = 4$  y la línea es el ajuste a decaimiento mono-exponencial.

La cinética del radionúclido libre presentó un comportamiento distinto al de la NTx radiomarcada. La cinética se ajustó a decaimiento mono-exponencial con  $R^2$  de  $0.994 (\pm 0.0033)$ . El  $t_{1/2}$  calculado fue de  $8 (\pm 0.86)$  min, el cual es 11 veces menor al encontrado para la NTx. Este resultado confirmó que los datos obtenidos en cinética de la NTx realmente están determinados por la toxina y no por la marca radiactiva que podría liberarse. El  $V_d$  fue del 21% mostrando que el  $^{67}\text{Ga}$  libre se distribuye en circulación sanguínea y en líquido intersticial. En la literatura se ha reportado que cuando éste radionúclido está libre, se distribuye principalmente en todas las mucosas del organismo; esto explica que el  $V_{SS}$  calculado sea del 212% ( $\pm 32$ ).

La cinética del  $^{67}\text{Ga}$  inyectado por vía SC y medido por 24 h, se muestra en la Figura 21. En este caso, el  $t_{1/2}$  fue de  $53 (\pm 6)$  min, el cual es más de ocho veces mayor con respecto al valor encontrado para la NTx radiomarcada e inyectada por vía SC. Igual que en el caso de la vía IV, este resultado confirma los datos cinéticos de la NTx por vía SC. El  $V_{SS}$  fue igual al que se obtuvo por vía IV, este resultado era esperado, dado que la distribución del radionúclido libre no cambia en función de la vía de administración debido a su tamaño molecular. La biodisponibilidad del  $^{67}\text{Ga}$  a las 24 h fue cercana al 100%, este resultado se debe a que por el tamaño molecular, la absorción del es prácticamente completa. El tiempo máximo de absorción fue casi de la mitad comparado con el de la NTx, lo cual indica que su absorción es por capilares sanguíneos.

Figura 21. Gráfica de la cinética plasmática del  $^{67}\text{Ga}$  administrado vía SC. Los datos fueron corregidos por la dosis, peso y decaimiento del  $^{67}\text{Ga}$ , representan el promedio  $\pm$  DE n = 4.

En la Figura 22, se muestra el comparativo entre la cinética por vía IV con la cinética por vía SC del  $^{67}\text{Ga}$  libre.

Figura 22. Comparativo del comportamiento farmacocinético del  $^{67}\text{Ga}$  después de la administración IV y SC.

En la Tabla 7 se muestran los parámetros farmacocinéticos calculados para los grupos experimentales 3 y 4. Los parámetros se obtuvieron a partir del análisis no compartamental.

Tabla 7. Parámetros farmacocinéticos del  $^{67}\text{Ga}$ -libre administrada por vía IV y SC

	Grupo 3 Promedio ( $\pm$ DE)	Grupo 4 Promedio ( $\pm$ DE)
tz (min)	1440	1440.00
t 1/2 (min)	8 ( $\pm$ 0.9)	53 ( $\pm$ 6)
Cz (cpm/mL)	7,872 ( $\pm$ )	5,662 ( $\pm$ 1912)
Vd (mL)	59 ( $\pm$ 3.3)	-
Vd (%)	21% ( $\pm$ 2)	-
$\lambda_z$	-	0.013 ( $\pm$ 0.0017)
Cp <sub>max</sub> (cpm/mL)	252,973 ( $\pm$ 20,965)	42,051 ( $\pm$ 9,346)
t max (min)	-	49 ( $\pm$ 9)
AUC <sub>0-t</sub> (cpm/mL * min)	14,412,939 ( $\pm$ 9,143,878)	15,707,755 ( $\pm$ 2,301,217)
AUMC <sub>0-t</sub> (cpm/ml * min <sup>2</sup> )	8,182,493,666 ( $\pm$ 699,174,244)	8,420,023,170 ( $\pm$ 1,496,644,666)
CL (mL/min)	1 ( $\pm$ 0.12)	1 ( $\pm$ 0.2)
MRT (min)	567 ( $\pm$ 29)	534 ( $\pm$ 39)
V <sub>ss</sub> (mL)	587 ( $\pm$ 88)	590 ( $\pm$ 123)
V <sub>ss</sub> (%)	211 % ( $\pm$ 32)	220% ( $\pm$ 47)
MAT (min)	-	33 ( $\pm$ 19)
F (%)	-	96% ( $\pm$ 21)

## 7. Resumen de resultados

- i. Las  $\beta$ -NTxs representan el 58.3% del veneno de *M. fulvius*, dos de ellas son las más abundantes en el veneno y las más letales para ratones.
- ii. Los resultados de la caracterización proteómica del veneno de *M. fulvius* son consistentes con los datos del transcriptoma previamente reportados. Las pequeñas discrepancias que se encontraron podrían deberse al enfoque metodológico que se siguió.
- iii. El veneno de *M. fulvius* contiene componentes de bajo peso molecular que no son letales en ratones y que tienen efecto sobre el nAChR, aunque son rápidamente reversibles.
- iv. Los resultados de este trabajo rompen con el paradigma de que la toxicidad en los venenos de coralillos está dada principalmente por  $\alpha$ -NTxs y estimula a la realización de futuros estudios sobre la evolución y especialización de venenos del género *Micrurus*.
- v. Se demostró la participación del sistema linfático en la absorción de la principal neurotoxina de *M. fulvius* por medio de imagen molecular.
- vi. La acumulación de radiactividad en los riñones sugiere que el metabolismo y eliminación de la neurotoxina ocurre principalmente por vía renal.
- vii. El sitio de inyección funciona como depósito desde donde se libera la  $\beta$ -NTx durante 48 h.
- viii. La neurotoxina radiomarcada mostró tener largo tiempo de vida media y de residencia, mientras que la depuración fue lenta.

## 8. Conclusión

La caracterización del veneno *M. fulvius* mostró que ésta es la única serpiente de coral, reportada hasta ahora, cuya toxicidad está determinada principalmente por  $\beta$ -neurotoxinas. Por medio de imagen molecular, se demostró que el sitio de inoculación funciona como un depósito desde donde se absorbe la principal  $\beta$ -neurotoxina del veneno con la participación del sistema linfático y se elimina por vía renal.

## 9. Perspectivas

- i. Estudiar la función biológica de los componentes de bajo peso molecular del veneno de *M. fulvius* en blancos distintos al receptor de ACh y/o en receptores de reptiles.
- ii. Analizar la composición del veneno de *M. fulvius* desde el punto de vista evolutivo.
- iii. Estudiar el efecto miotóxico y nefrotóxico de las PLA<sub>2</sub> de *M. fulvius*.
- iv. Analizar la biodistribución de la neurotoxina radiomarcada, por imagen molecular, cuando se administra el antiveneno.
- v. Analizar la cinética de la  $\beta$ -NTx (marcada con <sup>67</sup>Ga) y del antiveneno (marcado con <sup>111</sup>In) de manera simultánea por imagen molecular.

## 10. Referencias

1. Aird S. D. and Da Silva N. J. 1991. Comparative Enzymatic Composition of Brazilian Coral Snake (*Micrurus*) Venoms. *Comp. Biochem. Physiol.* 99B: 287-294.
2. Arce-Bejarano, R., Lomonte, B., & Gutiérrez, J. M. 2014. Intravascular hemolysis induced by the venom of the Eastern coral snake, *Micrurus fulvius*, in a mouse model: Identification of directly hemolytic phospholipases A<sub>2</sub>. *Toxicon*, 90, 26-35.
3. Arroyo O., Rosso J. P., Vargas O., Gutierrez J. M., Cerdas L. 1987. Skeletal Muscle Necrosis Induced by a Phospholipase A<sub>2</sub> Isolated from the Venom of the Coral Snake *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. *Comp. Biochem. Physiol.*; 87B: 949-952.
4. Aukland K, Reed R. 1993. Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume. *Physiol Rev*; 73(1):1-78.
5. Barnes J, Trueta J. 1941. Absorption of bacteria, toxins and snake venoms from the tissues: importance of the lymphatic circulation. *The Lancet*; 237(6142): 623-626.
6. Bénard-Valle, M., Carbajal-Saucedo, A., de Roodt, A., López-Vera, E., and Alagón, A. 2014. Biochemical characterization of the venom of the coral snake *Micrurus tener* and comparative biological activities in the mouse and a reptile model. *Toxicon*; (77) 6-15.
7. Bosman F, Stamenkovic I. 2003. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol*; 200(4):423-428.
8. Boyer, L., Seifert, S., and Cain, J. 2001. Recurrence phenomena after immunoglobulin therapy for snake envenomations: Part 2. Guidelines for clinical management with crotaline Fab antivenom. *Annals of emergency medicine*; 37(2), 196-201.
9. Campbell J, Lamar W. 2004. The venomous reptiles of the western hemisphere. Volume 1. New York: Cornell University Press.
10. Carbajal-Saucedo A, López-Vera E, Bénard-Valle M, Smith E, Zamudio F, de Roodt A, Olvera-Rodríguez A. 2013. Isolation, characterization, cloning and expression of an alpha-neurotoxin from the venom of the Mexican coral snake *Micrurus laticollaris* (squamata: elapidae). *Toxicon* 66: 64-74.
11. Cecchini A. L., Marcussi S., Silveira L.B., Borja-oliveira C. R., Rodrigues-Simioni L., Amara S., Stábeli R. G., Giglio J. R., Arantes E. C., Soares A. M. 2005. Biological and enzymatic activities of *Micrurus* sp. (Coral) snake venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A.* 140: 125-134.
12. Chang, C. C., Su, M. J., Lee, J. D., and Eaker, D. 1977. Effects of Sr<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> on the phospholipase A and the presynaptic neuromuscular blocking actions of  $\beta$ -bungarotoxin, crototoxin and taipoxin. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*; 299(2), 155-161.
13. Charman S. A., Segrave A. M., Edwards G. A., Porter C. J. H. 2000. Systemic Availability and Lymphatic Transport of Human Growth Hormone Administered by Subcutaneous Injection. *Journal of pharmaceutical science*; 89: 168-177
14. Chippaux J.P y Goyffon M. 1997. Venoms antivenoms and immunotherapy. *Toxicon*; 36:823-846.

15. Ciscotto PH, Rates B, Silva DA, Richardson M, Silva LP, Andrade Donato MF, Cotta GA, Selena MW, Rodrigues R, Sanchez E, De Lima ME, Pimenta, A. 2011. Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species. *Journal of proteomics*; 74(9), 1810-1825.
16. Clement H, Olvera A, Rodríguez M, Zamudio F, Palomares LA, Possani LD, Odell GV, Alagón A, Sánchez-López R. 2012. Identification, cDNA cloning and heterologous expression of a hyaluronidase from the tarantula *Brachypelma vagans* venom. *Toxicon*; 60:1223-1127.
17. Corrêa-Netto C, Junqueira-de-Azevedo I DL, Silva DA, Ho PL, Leitão-de-Araújo M, Alves MLM, Sanz L, Foguel D, Zingali RB, and Calvete JJ. 2011. Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*. *J Proteomics*; 74:1795-1809.
18. Corrêa-Netto C, Junqueira-de-Azevedo I DL, Silva DA, Ho PL, Leitão-de-Araújo M, Alves MLM, Sanz L, Foguel D, Zingali RB, and Calvete JJ. 2011. Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*. *J Proteomics*; 74:1795-1809.
19. da Silva Jr N, Griffin PR, Aird SD. Comparative chromatography of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. 1991. *Comp Biochem Phys Part B*; 100:117-126.
20. Dal Belo C. A., Leite G. B., Toyama M. H., Marangoni S., Pinto A., Dias M., Sauthan A., Rowan E. G., Hyslop S., Rodrigues-Simioni L. 2005. Pharmacological and Structural Characterization of a Novel Phospholipase A<sub>2</sub> from *Micrurus dumerilli carinicauda* venom. *Toxicon*; 46: 736-750.
21. de Roodt AR, Paniagua-Solis J F, Dolab JA, Estévez-Ramírez J, Ramos-Cerrillo B, Litwin S, Dokmetjian JC, Alagón A. 2004. Effectiveness of two common antivenoms for North, Central, and South American *Micrurus* envenomations. *Clin Toxicol*; 42:171-178.
22. de Roodt, A. R., Lago, N. R., and Stock, R. P. 2012. Myotoxicity and nephrotoxicity by *Micrurus* venoms in experimental envenomation. *Toxicon*; 59(2), 356-364.
23. Dokmetjian J. C., del Canto S., Vinzón S., de Jimenez M. B. 2009. Biochemical characterization of the *Micrurus pyrrhocryptus* venom. *Toxicon*. 53: 375-382.
24. Doley R, Zhou X and Kini RM. Snake venom Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes. In: Mackessy SP, editor. Handbook of Venom And Toxins of Reptiles. CRC Press. Taylor and Francis Group; 2010.
25. Fernandez J, Alape-Girónn , Angulo Y, Sanz L, Gutiérrez JM, Calvete JJ, Lomonte. 2011. Venomic and antivenomic analyses of the Central American coral snake, *Micrurus nigrocinctus* (Elapidae). *J Proteome Res*; 10:1816-1827.
26. Ferro-Flores G. y Arteaga de Murphy C. 2007. Estado actual y futuro de la gammagrafía SPECT/CT con radiofármacos de <sup>99m</sup>Tc. *Revista de investigación clínica*; 59: 373-381.
27. Fichna, J., and Janecka, A. 2003. Synthesis of target-specific radiolabeled peptides for diagnostic imaging. *Bioconjugate chemistry*; 14(1), 3-17.

28. Fidler, H. K., Glasgow, R. D., & Carmichael, E. B. 1940. Pathological changes produced by the subcutaneous injection of rattlesnake (*Crotalus*) venom into *Macaca mulatta* monkeys. *The American journal of pathology*; 16(3), 355.
29. Fischman A., Babich J., Strauss W. 1993. A ticket to ride: peptide radiopharmaceuticals. *The Journal of Nuclear Medicine*; 34: 2253-2265.
30. Fohlman, J., Eaker, D., Karlsson, E., and Thesleff, S. 1976. Taipoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian snake taipan (*Oxyuranus s. scutellatus*). *European Journal of Biochemistry*; 68(2), 457-469.
31. Fry, B. G., Wüster, W., Kini, R. M., Brusic, V., Khan, A., Venkataraman, D., and Rooney, A. P. 2003. Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins. *Journal of Molecular Evolution*; 57(1), 110-129.
32. Gangopadhyay, A., Saravis, C. A., and Kassis, A. I. 1994. Semipreparative isoelectrophoresis of DTPA-conjugated antibody leads to isolation of antibody isoforms with different immunoreactivities. *Journal of nuclear biology and medicine (Turin, Italy: 1991)*; 38(1), 61-67.
33. Girish K, Shashidharamurthy R, Nagaraju S, Gowda T, Kemparaju K. 2004. Isolation and characterization of hyaluronidase a “spreading factor” from Indian cobra (*Naja naja*) venom. *Biochimie*; 86(3):193-202.
34. Girish KS, Kemparaju K. 2007. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci*; 80:1921-1943.
35. Goodman y Gilman (Editores) 1996. Las bases de la farmacología. Novena edición. Ed. McGraw-Hill-Interamericana. México.
36. Groch M. y Erwin W.D. 2000. SPECT in the year 2000: Basic principles. *Journal of Nuclear Medicine Technology*; 28: 233-246.
37. Guyton A. C and Hall J. E. 2001. Tratado de Fisiología Médica. McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V. Decima ed. 197-211.
38. Haisma, H., Goedemans, W., De Jong, M., Hilkens, J., Hilgers, J., Dullens, H., and Den Otter, W. 1984. Specific localization of In-111-labeled monoclonal antibody versus 67-Ga-labeled immunoglobulin in mice bearing human breast carcinoma xenografts. *Cancer Immunology and Immunotherapy*; 17(1), 62-65.
39. Hammoudi-Triki D., Lefort J., Rougeot C., Robbe-Vincent A. Bon C., Laraba-Djebari F., Choumet V. 2007. Toxicokinetic and toxicodynamic analyses of *Androctonus Australis* hector venom in rats: Optimization of antivenom therapy. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 218: 205-214.
40. Hnatowich, D. J., Childs, R. L., Lanteigne, D., and Najafi, A. 1983. The preparation of DTPA-coupled antibodies radiolabeled with metallic radionuclides: an improved method. *Journal of immunological methods*; 65(1), 147-157.
41. Hughes D. 2003. Nuclear medicine and infection detection: the relative effectiveness of imaging with <sup>111</sup>In-oxine-, <sup>99m</sup>Tc-HMPAO-, and <sup>99m</sup>Tc-stannous fluoride colloid-labeled leukocyte and with <sup>67</sup>Ga-citrate. *Journal of Nuclear Medicine Technology*; 31: 196-201.

42. Ismail M. y Abd-Elsalam M.A. 1998. Pharmacokinetics of <sup>125</sup>I-labeled IgG, (Fab')<sub>2</sub> and Fab fractions of scorpion and snake antivenins: merits and potential for therapeutic use. *Toxicon*; 36: 1523-1528.
43. Kemeny, D. M., Dalton, N., Lawrence, A. J., Pearce, F. L., and Vernon, C. A. 1984. The purification and characterisation of hyaluronidase from the venom of the honey bee, *Apis mellifera*. *European journal of biochemistry*; 139(2), 217-223.
44. Kitchens C. S. y Van Mierop L. H. S. 1987. Envenomation by the Eastern Coral Snake (*Micrurus fulvius fulvius*) *JAMA*; 258: 1615-1618.
45. Krejcarek, G. E., and Tucker, K. L. 1977. Covalent attachment of chelating groups to macromolecules. *Biochemical and biophysical research communications*; 77 (2), 581-585.
46. Krifi M.N., Savin S., Debray M., Bon C., Ayeb M., Choumet V. 2004. Pharmacokinetic Studies of scorpion venom before and after antivenom immunotherapy. *Toxicon*; 45: 187-198.
47. Labbe J.P. 2003. SPECT/CT emerges from the shadow of PET/CT. *Biofotonics International*. Laurin Publishing Company.
48. Leão, L. I., Ho, P. L., and LM Junqueira-de-Azevedo, I. 2009. Transcriptomic basis for an antiserum against *Micrurus corallinus* (coral snake) venom. *BMC genomics*; 10(1), 112.
49. Lee, H. J., and Pardridge, W. M. 2003. Monoclonal antibody radiopharmaceuticals: cationization, pegylation, radiometal chelation, pharmacokinetics, and tumor imaging. *Bioconjugate chemistry*; 14(3), 546-553.
50. Lewis, M. R., Raubitschek, A., and Shively, J. E. 1994. A facile, water-soluble method for modification of proteins with DOTA. Use of elevated temperature and optimized pH to achieve high specific activity and high chelate stability in radiolabeled immunoconjugates. *Bioconjugate chemistry*; 5(6), 565-576.
51. Liu S. 2004. The role of coordination chemistry in the development of target specific radiopharmaceuticals. Critical review. *Chemical society review*; 33: 445-461.
52. Liu S. 2008. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of Metallic radionuclides. *Advanced Drug Delivery Reviews*; 60: 1347-1370.
53. Liu S. y Scott E. 1999. <sup>99m</sup>Tc-labeled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals. *Chemical reviews*; 99: 2235-2268.
54. Margres MJ, Aronow K, Loyacano J, Rokyta DR. 2013. The venom-gland transcriptome of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) reveals high venom complexity in the intragenomic evolution of venoms. *BMC genomics*; 14:1-18.
55. Montecucco C., Gutierrez J. M., Lomonte B. 2008. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanism of action. *Cell. Mol. Life Sci*; 65: 2897-2912.
56. Nirthanan S. and Gwee M. C. E. 2004. Three-Finger  $\alpha$ -Neurotoxins and the Nicotinic Acetylcholine Receptor, Forty Years On. *J. Pharmacol Sci*; 94: 1-17

57. Norris R. L., Pfalzgraf R. R., Laing G. 2009. Death following coral snake bite in the United States - First documented case (with ELISA confirmation of envenomation) in over 40 years. *Toxicon*; 53: 693-697.
58. Novais C.M., Pujatti P., Castro M.A., Soares M., De lima M.E., Simal C., Gouvea dos Santos R. 2006. <sup>99m</sup>Tc radiolabeling of crotoxin as a tool for biodistribution studies. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry* 3: 591-595.
59. Nunan E.A., Cardoso V.N., Moraes-Santos T. 2002. Technetium-99m labeling of tityustoxin and venom from the scorpion *Tityus serrulatus*. *Applied radiation and isotopes* 57: 849-852.
60. Olamendi-Portugal T., Batista C. V. F., Restano-Cassulini R., Pando V., Villa-Hernandez O., Zavleta-Martinez-Vargas A., Salas-Arruz M. C., Rodriguez de la Vega R. C., Becerril B., Possani L. D. 2008. Proteomic Analysis of the Venom from the Fish Eating Coral Snake *Micrurus surinamensis*: Novel Toxins, Their Function and Phylogeny. *Proteomics*; 8: 1919-1932.
61. Paniagua, D., Jiménez, L., Romero, C., Vergara, I., Calderón, A., Benard, M., M.J. Bernas, H. Rilo, A. de Roodt, G. D'Suze, M.H. Witte, L. Boyer, Alagón, A. 2012. Lymphatic route of transport and pharmacokinetics of *Micrurus fulvius* (coral snake) venom in sheep. *Lymphology*; 45(4), 144-153.
62. Paniagua, D., Vergara I., Boyer L., Alagón A. 2014. Role of the lymphatic system on snake venom absorption: Review of mechanism and clinical implications. Handbook of toxinology; volume: Snake venom. Springer.
63. Porter J. H., Charman S. 2000. Lymphatic Transport of Proteins After Subcutaneous Administration. *Journal of Pharmaceutical Science*; 89:297-310.
64. Pungercar J. and Krizaj I. 2007. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A<sub>2</sub> *Toxicon*; 50: 871-892
65. Ramsey G. F. y Klickstein G. D. 1962. Coral snake bite. *JAMA*. 182: 949-151.
66. Ramsey H. W., Taylor W. J., Boruchow I. B., And Snyder G. K. 1972. 1Mechanism Of Shock Produced By An Elapid Snake (*Micrurus F. Fulvius*) Venom In Dogs. *American Journal Of Physiology*; 222: 782-786.
67. Reid, H. A., and Theakston, R. D. G. (1983). The management of snake bite. *Bulletin of the World Health Organization*, 61(6), 885.
68. Rey-Suárez, P, Núñez V, Gutiérrez JM, Lomonte B. 2011. Proteomic and biological characterization of the venom of the redbellied coral snake, *Micrurus mipartitus* (Elapidae), from Colombia and Costa Rica. *J Proteomics*; 75:655-667.
69. Rigoni M, Paoli M, Milanesi E, Caccin P, Rasola A, Bernardi P, Montecucco C. 2008. Snake phospholipase A2 neurotoxins enter neurons, bind specifically to mitochondria, and open their transition pores. *J Biol Chem*; 283:34013-34020.
70. Rossetto O, Montecucco C. 2008. Presynaptic neurotoxins with enzymatic activities. In: Freiburg KS, editor. Handbook of experimental pharmacology, vol 184: *Pharmacology of neurotransmitter release*. Berlin: Springer-Verlag; p.129-170.

71. Rosso J. P., Vargas-Rosso O., Gutiérrez J. M., Rochat H., Bougis P. E. 1996. Characterization of  $\alpha$ -Neurotoxin and Phospholipase A<sub>2</sub> Activities from *Micrurus* venoms. *Eur. J. Biochem.* 238: 231-239.
72. Roze J. A. 1996. Coral Snakes of the Americas: Biology, Identification, and Venoms. Ed. Krieger Publishing Company.
73. Seifert, S. and Boyer, L. 2001. Recurrence phenomena after immunoglobulin therapy for snake envenomations: Part 1. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of immunoglobulin antivenoms and related antibodies. *Annals of emergency medicine*; 37(2), 189-195.
74. Serafim F. G., Reali M., Druz-Hofling M. A., Fontana M: D. 2002. Action of *Mirurus dumerilii carinicauda* coral snake venom on the mamalian neuromuscular junction. *Toxicon*; 40:167-174.
75. Sevcik C., D'Suze G., Díaz P., Salazar V., Hidalgo C., Azpúrua H., Bracho N. 2004. Modelling Tityus scorpion venom and antivenom pharmacokinetics. Evidence of active immunoglobulin G's F(ab')<sub>2</sub> extrusion mechanism from blood to tissues. *Toxicon*; 44: 731-741.
76. Shargel L., YU A., 1999. Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics. Cuarta edición. Ed. Mc Graw-Hill. New York, USA. Capítulo 2.
77. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry*; 68(5), 850-858.
78. Shi, J., Kim, Y. S., Chakraborty, S., Zhou, Y., Wang, F., and Liu, S. 2011. Impact of bifunctional chelators on biological properties of <sup>111</sup>In-labeled cyclic peptide RGD dimers. *Amino Acids*; 41(5), 1059-1070.
79. Supersaxo A., Hein W. R., Steffen H. 1990. Effect of Molecular Weight on the Lymphatic Absorption of Water-Soluble Compounds Following Subcutaneous Administration. *Journal of Pharmaceutical Research* 7:167-169.
80. Swartz M. A. 2001. The Physiology of the Lymphatic System. *Advanced Drug Delivery Reviews*; 50: 3-20.
81. Tan N. and Ponnudurai G. 1992. The Biological Properties of Venoms of Some American Coral Snakes (Genus *Micrurus*). *Comp. Biochem. Physiol*; 10B: 471-474.
82. Tanaka GD, Maria de Fátima DF, Portaro FC, Sant'Anna OA, Tambourgi DV. 2010. Diversity of *Micrurus* snake species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization. *PLoS Neglected Trop D*; 4:e622.
83. Tang, L., and Meibohm, B. (2006). Pharmacokinetics of peptides and proteins. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Biotech Drugs: Principles and Case Studies in Drug Development*.
84. Tolksdorf S, Cassidy JW, McCready MH, McCullagh DR. 1949. *In vitro* studies with hyaluronidase. *Ann N Y Acad Sci*; 52:1024-1027.
85. Vázquez H., Chávez-Haro A., García-Ubbelohde W., Mancilla-Nava R., Paniagua-Solís J., Alagón A., Sevcik C. 2005. Pharmacokinetics of a F(ab')<sub>2</sub> scorpion antivenom in healthy human volunteers. *Toxicon*; 46: 797-805.

86. Vázquez H., Olvera F., Paniagua-Solís J., Alagón A., Sevcik C. 2010. Pharmacokinetics in rabbits and anti-sphingomyelinase D neutralizing power of Fab, F(ab')<sub>2</sub>, IgG and IgG(T) fragments from hyper immune equine plasma. *International Immunopharmacology*; 10: 447-454.
87. Vital Brazil O. 1990. Pharmacology of coral snake vnooms. *Mem. Inst. Buantan*; 52: 31-33.
88. Walter, F. G., Bilden, E. F., Gibly, R. L. 1999. Envenomations. *Critical care clinics*; 15(2), 353-386.
89. Warrell, D. A. 2010. Snake bite. *The Lancet*; 375(9708), 77-88.
90. Weis, R., y McIsaac, R. J. 1971. Cardiovascular and muscular effects of venom from coral snake, *Micrurus fulvius*. *Toxicon*; 9(3), 219-228.
91. Wood A, Schauben J, Thundiyil J, Kunisaki T, Sollee D, Lewis-Younger C, Bernstein J, Weisman R. 2013. Review of Eastern coral snake (*Micrurus fulvius fulvius*) exposures managed by the Florida Poison Information Center Network: 1998-2010. *Clin Toxicol*; 51:783-788.
92. [www.oms.org](http://www.oms.org) Fecha de consulta: 17-Junio-2010
93. [www.snakedatabase.org](http://www.snakedatabase.org) Fecha de consulta: 19-08-2013
94. Yonamine C.M., Costa H., Silva J., Moramoto E., Rogero J., Troncone., Camillo A.P. 2005. Biodistribution studies of bee venom and spider toxin using radiotracers. *Journal venom of animal toxins incl. trop.* 11: 39-50.

# ANEXO I

Datos y gráficas de las farmacocinéticas individuales.

Figura I. Gráficas farmacocinéticas de la NTx radiomarcada y administrada por vía IV en ratas. Cada gráfica enumerada corresponde a la cinética de un individuo.

Tabla I. Parámetros farmacocinéticos por individuo en la cinética por vía IV de la NTx radiomarcada

	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Promedio	DE	CV (%)
Peso (g)	276	278	265	280	275	6.7	2%
D (cpm)	14,166,308	14,711,166	13,893,879	13,076,592	13,961,986	681,072	5%
tz (min)	1,440	1,440	1,440	1,440	1,440	0	0%
t <sub>1/2</sub>		106	40	127	91	45	50%
Cz (cpm/mL)	1,600	8,200	10,000	9,400	7,300	3,873	53%
Vd (mL)	57	47	43	65	53	9	18%
Vd (%)	20%	16%	16%	23%	19%	3%	17%
Cp <sub>max</sub> (cpm/mL)	25,0017	316,235	320,607	200,458	271,829	57,506	21%
AUC <sub>0-t</sub> (cpm/mL * min)	23,347,600	26,952,300	20,680,800	23,987,600	23,742,075	2,575,063	11%
AUMC <sub>0-t</sub> (cpm/mL * min <sup>2</sup> )	8,996,460,400	12,775,045,500	11,955,516,733	12,396,683,800	11,530,926,608	1,722,513,964	15%
CL (mL/min)	0.61	0.55	0.67	0.55	0.59	0.1	10%
MRT (min)	385	474	578	517	489	81	17%
V <sub>ss</sub> (mL)	234	259	388	282	291	68	23%
V <sub>ss</sub> (%)	84%	93%	146%	100%	106%	27%	26%
MAT (min)	-	-	-	-			

Figura II. Gráficas farmacocinéticas de la NTx radiomarcada y administrada por vía SC en ratas. Cada gráfica corresponde a la cinética de un individuo.

Tabla II. Parámetros farmacocinéticos por individuo en la cinética por vía SC de la NTx radiomarcada

	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Promedio	DE	CV (%)
Peso (g)	300	292	294	291	294	4.0	1%
D (cpm)	56,120,374	64,020,815	56,937,661	57,754,948	58,708,450	3,603,896	6%
tz (min)	2,880	2,880	2,880	2,880	2,880	0	0%
t ½	449	475	389	483	449	42	9%
Cz (cpm/mL)	4,611	5,706	4,617	4,257	4,798	628	13%
$\lambda_z$	0.001543	0.001460	0.001781	0.001436	0.0015	0.00015	10%
Vd (mL)	-	-	-	-	-	-	-
Vd (%)	-	-	-	-	-	-	-
Cp <sub>max</sub> (cpm/mL)	90	60	90	90	83	17.3	21%
AUC <sub>0-t</sub> (cpm/mL * min)	90,538,264	110,757,679	88,088,574	84,608,245	93,498,190	11,760,756	13%
AUMC <sub>0-t</sub> (cpm/mL * min <sup>2</sup> )	60,570,333,964	84,403,805,150	61,312,062,080	57,353,902,136	65,910,025,833	12,448,302,509	19%
CL (mL/min)	0.62	0.58	0.65	0.68	0.63	0.0	7%
MRT (min)	669	762	696	677	701	42	6%
V <sub>ss</sub> (mL)	414	440	449	462	442	20	5%
V <sub>ss</sub> (%)	138%	150%	153%	159%	2	9%	6%
MAT (min)	180	274	207	189	213	42	20%
F (%)	95%	102%	91%	86%	93%	7%	7%

Figura III. Gráficas farmacocinéticas del  $^{67}\text{Ga}$  administrado por vía IV en ratas. Cada gráfica corresponde a la cinética de un individuo.

Tabla III. Parámetros farmacocinéticos por individuo en la cinética por vía IV del  $^{67}\text{Ga}$ .

	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Promedio	DE	CV (%)
Peso (g)	270	284	276	279	277	6	2%
D (cpm)	15,256,024	16,890,598	13,349,021	13,893,879	14,847,381	1,580,714	11%
tz (min)	1,440	1,440	1,440	1,440	1,440	0	0%
t $\frac{1}{2}$ (min)	7	7	8	9	8	1	
Cz (cpm/mL)	8,169	7,921	7,080	8,318	7,872	553	7%
Vd (mL)	65	60	51	58	59	3.4	6%
Vd (%)	24%	21%	19%	21%	21%	2%	8%
Cp <sub>max</sub> (cpm/mL)	234,739	279,566	259,841	237,749	252,974	20,965	8%
AUC <sub>0-t</sub> (cpm/mL * min)	14,249,522	14,256,512	13,476,049	15,669,673	14,412,939	914,388	6%
AUMC <sub>0-t</sub> (cpm/mL * min <sup>2</sup> )	8,603,457,805	8,159,441,754	7,205,840,760	8,761,234,346	8,182,493,666	699,174,244	9%
CL (mL/min)	1.1	1.2	1.0	0.9	1	0.1	12%
MRT (min)	603	572	534	559	567	29	5%
Vss (mL)	646	678	529	496	588	88	15%
Vss (%)	239%	239%	192%	178%	212%	32%	15%
MAT (min)	-	-	-	-			

Figura IV. Gráficas farmacocinéticas del  $^{67}\text{Ga}$  administrado por vía SC en ratas. Cada gráfica corresponde a la cinética de un individuo.

Tabla IV. Parámetros farmacocinéticos por individuo en la cinética por vía SC del <sup>67</sup>Ga.

	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Promedio	DE	CV (%)
Peso (g)	278	259	273	260	268	10	4%
D (cpm)	15,528,453	18,525,172	19,342,459	14,711,166	17,026,813	2,252,006	13%
tz (min)	1,440	1,440	1,440	1,440	1,440	0	0%
t 1/2	49	60	57	47	53	6	12%
Cz (cpm/mL)	2,971	6,436	7,426	5,817	5,663	1,913	34%
$\lambda_z$	0.01423	0.01154	0.01211	0.01477	0.0131	0.0015	12%
Cp <sub>max</sub> (cpm/mL)	35,033	33,496	46,808	52,868	42,051	9,347	22%
t max (min)	45	60	30	60	49	8.7	18%
AUC <sub>0-t</sub> (cpm/mL * min)	12,850,122	15,036,865	16,749,044	18,194,992	15,707,756	2,301,217	15%
AUMC <sub>0-t</sub> (cpm/mL * min <sup>2</sup> )	6,253,708,629	8,587,085,701	9,403,792,324	9,435,506,030	8,420,023,171	1,496,644,666	18%
CL (mL/min)	1.2	1.2	1.2	0.8	1	0.2	18%
MRT (min)	486	571	561	518	534	39	7%
Vss (mL)	588	703	648	419	590	123	21%
Vss (%)	211%	271%	237%	161%	220%	46%	21%
MAT (min)	-80.8	3.6	-6.0	-48.9			

Figura V. Gráfica donde se observa el porcentaje remanente en el tiempo, de la dosis de  $\beta$ -NTx (círculo) o BSA (cuadrado) radiomarcadas e inyectadas por vía SC.

## Análisis farmacocinético no compartamental

El perfil cinético de la concentración de la  $\beta$ -NTx radiomarcada en sangre (Cs) en función del tiempo (t), se ajustó a un decaimiento bi-exponencial con la ecuación 1 (eq. 1). Para calcular la concentración máxima en sangre ( $C_{S_{max}}$ ) cuando la  $\beta$ -NTx radiomarcada se administra vía IV. También se calculó el valor de Cs cuando  $t = 0$ .

$$Cs(t) = a * e^{-\alpha t} + b * e^{-\beta t} \quad (\text{eq. 1})$$

Para evaluar la distribución inicial de la  $\beta$ -NTx radiomarcada en el organismo cuando se administra vía IV, se calculó el volumen de distribución ( $V_D$ ) con la eq. 2:

$$V_D = \frac{D_{i.v.}}{C_{0x}} \quad (\text{eq. 2})$$

Los parámetros farmacocinéticos restantes se estimaron con modelo no compartamental.

La vida media terminal para las cinéticas SC ( $t_{1/2}$ ) se estimó con la constante de velocidad terminal ( $\lambda_z$ ) de la fase de eliminación.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda_z} \quad (\text{eq. 3})$$

El área bajo la curva (AUC) refleja la cantidad total de la  $\beta$ -NTx radiomarcada que alcanza circulación sistémica. Este parámetro, al igual que el área bajo la curva de primer

momento (AUMC) se estimaron integrando las cinéticas con el método del trapecio, como se muestra en las ecuaciones 4 y 5.

$$AUC_{0-t} = \int_0^t Cs \, dt = \sum_{i=0}^{i=t} \frac{1}{2} \cdot (Cs_i - Cs_{i+1}) \cdot (t_{i+1} - t_i) \quad (\text{eq. 4})$$

$$AUC_{0-t} = \int_0^t Cs \, dt = \sum_{i=0}^{i=t} \frac{1}{2} \cdot (t_{i+1} - t_i) \cdot (C_i + Cs_{i+1}) \quad (\text{eq. 5})$$

Para extrapolación a infinito ( $\infty$ ), se utilizó la siguiente fórmula:

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + AUC_{t-\infty} \quad (\text{eq. 6})$$

Donde  $AUC_{t-\infty}$  puede evaluarse usando el último valor de Cs calculado al tiempo t y la constante de velocidad terminal ( $\lambda_z$ ).

$$AUC_{t-\infty} = \frac{Cs(t)}{\lambda_z} \quad (\text{eq. 7})$$

El mismo principio se aplicó para la extrapolación de AUMC:

$$AUMC_{0-\infty} = AUMC_{0-t} + AUMC_{t-\infty} \quad (\text{eq. 8})$$

$$A \quad U_{\infty} = \left( \frac{M \cdot C(t)}{\lambda} \right) \left( \frac{C(t)}{\lambda} \right) \quad (\text{eq. 9})$$

La depuración (CL) se refiere a la eliminación irreversible de la  $\beta$ -NTx radiomarcada de circulación sistémica, e indica el volumen de suero que queda depurado por minuto. Se calculó de la siguiente manera:

$$CL = \frac{D}{A_{iv}} \cdot U \cdot C \quad (\text{eq. 10})$$

La biodisponibilidad (F), es la fracción de la dosis administrada vía SC que alcanza la circulación sistémica y se calculó con la ecuación 11.

$$F = \frac{AUC_{s.c.} \cdot D_{i.v.}}{AUC_{i.v.} \cdot D_{s.c.}} \quad (\text{eq. 11})$$

El tiempo medio de residencia (MRT) se refiere al tiempo promedio en que el veneno permanece en el organismo y está definido por la siguiente ecuación:

$$MRT = \frac{AUC}{C} \quad (\text{eq. 12})$$

El tiempo medio de absorción (MAT) se refiere al tiempo promedio que la  $\beta$ -NTx radiomarcada tarda en llegar a circulación sistémica desde el sitio de inoculación, cuando se administra vía SC.

(eq. 13)

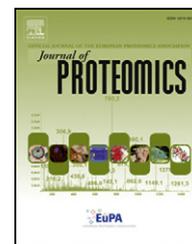
El volumen de distribución en estado estacionario ( $V_{ss}$ ) se refiere al volumen de distribución aparente cuando la curva de concentración plasmática de la  $\beta$ -NTx radiomarcada vs el tiempo alcanza el equilibrio.

$$V_{ss} = CL \cdot MRT \quad (\text{eq. 14})$$

El tiempo máximo ( $t_{max}$ ), que se refiere al tiempo al que se alcanza la concentración máxima ( $C_{s_{max}}$ ), y la concentración en plasma al final de la cinética ( $C_z$ ), se tomaron directamente de los datos experimentales.

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

[www.elsevier.com/locate/jprot](http://www.elsevier.com/locate/jprot)

## Eastern coral snake *Micrurus fulvius* venom toxicity in mice is mainly determined by neurotoxic phospholipases A<sub>2</sub>☆



Irene Vergara, Martha Pedraza-Escalona, Dayanira Paniagua, Rita Restano-Cassulini, Fernando Zamudio, Cesar V.F. Batista, Lourival D. Possani, Alejandro Alagón\*

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad # 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, México

### ARTICLE INFO

Available online 5 March 2014

#### Keywords:

Proteome

*Micrurus fulvius*

Coral snake

Neurotoxicity

Mass spectrometry

### ABSTRACT

Here we show for the first time that the venom from an elapid (*Micrurus fulvius*) contains three finger toxin (3FTxs) peptides with low toxicity but high content of lethal phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). The intravenous venom LD<sub>50</sub> in mice was 0.3 μg/g. Fractionation on a C<sub>18</sub> column yielded 22 fractions; in terms of abundance, 58.3% of them were components of 13–14 kDa and 24.9% were molecules of 6–7 kDa. Two fractions with PLA<sub>2</sub> activity represented 33.4% of the whole venom and were the most lethal fractions. Fractions with low molecular mass (<7000 Da) partially and reversibly blocked the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), with the exception of one that blocked it completely. The fraction that blocked 100% contained two protein species whose dose–response was determined; the IC<sub>50</sub>s were 13 ± 1 and 9.5 ± 0.3 nM. Despite the apparent effect on nAChR none of the low molecular mass fractions were lethal in mice, at concentrations of 1 μg/g. From 2D-PAGE and LC-MS/MS, we identified fourteen species of PLA<sub>2</sub>, four protein species of C-type lectin, three zinc metalloproteinases, one phosphodiesterase and one 3FTx. The N-terminal amino acid sequence of fractions with biological interest was obtained.

#### Biological significance

In contrast with coral snake venoms from South America, *M. fulvius* has minor amounts of low molecular mass components, but high content of PLA<sub>2</sub>, which is responsible for the venom lethality of this species. The results reported here contribute to better understanding of envenomation development and to improve antivenom design and production. These findings break from the paradigm that neurotoxicity caused by *Micrurus* venoms is mainly attributable to 3FTx neurotoxins and encourage future studies on *Micrurus* evolution and venom specialization. This article is part of a Special Issue entitled Non-model organisms.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

☆ This article is part of a Special Issue entitled Non-model organisms.

\* Corresponding author. Tel.: +52 777 329 16 02.

E-mail address: [alagon@ibt.unam.mx](mailto:alagon@ibt.unam.mx) (A. Alagón).

## 1. Introduction

Elapids in America essentially comprise coral snakes, which are grouped in three genera: *Micrurus*, *Micruroides*, and *Leptomicrurus*. The *Micrurus* genus contains around sixty species distributed from the Southern United States to South America [1]. *Micrurus* bites are rare in humans but have medical significance due to the high toxicity of their venom, since it is estimated that 5 mg of venom can be lethal to humans [2]. Symptoms observed after coral snake bite include local pain, sialorrhea, paresthesia, ptosis, weakness, blurred vision, paralysis, fasciculation and diplopia. In severe cases, envenomation may progress to respiratory arrest [3–5]. Neurotoxic effects from *Micrurus* venoms are attributed to post-synaptic neurotoxin ( $\alpha$ -neurotoxin) and pre-synaptic neurotoxins with phospholipase A<sub>2</sub> activity (PLA<sub>2</sub>) [6–14]. The  $\alpha$ -neurotoxin acts on nicotinic acetylcholine receptors as an antagonist of the neurotransmitter [15]. The mechanism of action of neurotoxic PLA<sub>2</sub> is not well characterized, but proposed mechanisms suggest that PLA<sub>2</sub> binds to an active zone in the presynaptic plasma membrane, hydrolyzes the phospholipids of the external layer and alters the membrane conformation. This promotes exocytosis of neurotransmitter, followed by inhibition of vesicle recycling and the fusion of new ones [16]. After that, the toxin enters the neuron and binds specifically with mitochondria, promoting the formation of transition pores and leading to axonal degeneration [17,18].

Although less common, other possibly toxic components have been identified in several species of *Micrurus*, including L-amino oxidase, hyaluronidase, snake venom metalloproteinases, phosphodiesterase and alkaline phosphomonoesterase [19,20].

In the United States, numerous coral snake bites are attributable to *Micrurus fulvius* (Eastern coral snake) [21]. Paniagua et al. [22] reported a thorough study of venom pharmacokinetics; however, venom composition and toxic activities are only partially known. Recently, Marges et al. [23] reported the de novo assembly and analysis of the venom-gland transcriptome of *M. fulvius*, showing that the most abundant toxin transcripts are PLA<sub>2</sub>, short and long chain neurotoxins belonging to the 3FTx family, metalloproteinases and Kunitz-type inhibitors. Transcriptome analysis yielded relevant information about possible proteins in the venom, but on the other hand it is well documented that transcripts are not always expressed [24,11]. Thus, in addition it is necessary to conduct proteomics and toxicological studies of the active proteins. In order to enrich understanding of *M. fulvius* venom, this work shows its proteomic study, biochemical and biological activities. The results reported here provide a better understanding about the development of the envenomation and contribute to a more complete knowledge for improving better therapy, against bites of this American elapid.

## 2. Methods and materials

### 2.1. Venom

Lyophilized venom (pooled from 10 specimens) was purchased from the National Natural Toxins Research Center (NNTRC,

Texas A&M University-Kingsville, US). The venom was reconstituted in 150 mM NaCl and centrifuged for 5 min at 11,300 g. Soluble protein was quantified by absorbance at 280 nm, assuming that 1 unit of absorbance corresponds to 1 mg protein/ml. Solubilized venom was kept at –20 °C until used.

### 2.2. Laboratory animals

Male and female CD1 mice, weighing 18 to 20 g, were purchased from Harlan Mexico, S.A. de C.V. Animals received water and food ad libitum and were maintained under a 12-h light/dark cycle. The Institutional Committee for Animal Welfare approved the experimental protocol for animal management.

### 2.3. LD<sub>50</sub>

The lethal potency of crude venom or isolated fractions was determined by increasing doses of venom in NaCl 150 mM, in groups of five mice injected into the lateral tail vein. A control group received an identical injection of NaCl 150 mM. Mortality was recorded at 48 h post-injection. The LD<sub>50</sub> was calculated by a sigmoidal dose–response curve with non-linear regression, using the GradPad Prism 4.0 Software (San Diego, CA).

### 2.4. PLA<sub>2</sub> activity

PLA<sub>2</sub> enzymatic activity of crude venom or fractions of interest was measured with a titrimetric method described by Shiloah et al. [25]. Samples were evaluated by using 0.5 mL of a 10% egg yolk solution (NaCl 0.1 M, CaCl<sub>2</sub> 0.01 M, 0.1% Triton X-100, pH adjusted to 8) as the substrate. Liberation of acid was measured at pH 8.0 and room temperature by titration with a microelectrode on a laboratory pH meter with 0.05 N NaOH under a constant stream of nitrogen and stirring. One unit of activity was defined as the amount of enzyme that liberates 1  $\mu$ mol of free fatty acid/min under the above conditions.

### 2.5. Hyaluronidase activity

Enzymatic activity was measured by turbidimetry according to Tolksdorf et al. [26], with slight modifications. Increasing amounts of *M. fulvius* venom were incubated with 266  $\mu$ g/mL of hyaluronic acid (HA) in reaction buffer of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 M pH 5.8 and NaCl 0.15 M at a final volume of 150 mL. Following 20 min at room temperature (RT), samples were incubated in boiling bath for 5 min. After, cetylpyridinium 10% (500  $\mu$ L) was added and incubated for 10 min at RT. Immediately, sample absorbance was measured at 540 nm. One unit of hyaluronidase is defined as the amount of enzyme required to hydrolyze 1  $\mu$ g of HA per minute under the above-described conditions.

### 2.6. 2D gel electrophoresis

Soluble venom or fractions was precipitated by using methanol/chloroform procedure and dissolved with DeStreak Rehydration Solution (GE Life Sciences). Protein concentration for each sample was determined with 2D Quant Kit (GE Life Sciences). Isoelectric focusing (IEF) was carried out by using 13 cm Immobiline Dry Strips with a non-linear pH gradient from 3 to 11 (GE Life Sciences); strips were passively hydrated for 16 h

with thiourea rehydration solution and loaded with 43  $\mu\text{g}$  of fraction N, 30  $\mu\text{g}$  of fraction O, or 200  $\mu\text{g}$  of *M. fulvius* venom, 1% (v/v) DTT and 0.5% (v/v) IPG buffer pH 3–11 (GE Life Sciences). IEF was performed at 20 °C by Ettan IPGphor 3 unit (GE Life Sciences) by using a programmed voltage gradient with a current limit of 75  $\mu\text{A}$  per strip. Voltage was linearly increased from 1000 to 8000 V over 2.5 h for each sample entry, followed by a constant 8000 V; samples focused completely after 15,000 V/h. Prior to the second dimension, strips were incubated for 15 min in SDS equilibration buffer solution (6 M Urea, 75 mM Tris-HCl, pH 8.8, 29.3% glycerol, 2% SDS and 1% bromophenol blue stock solution), first with 1% DTT and then with 2.5% iodoacetamide. The equilibrated strips were inserted onto SDS-PAGE gels (12.5% SDS-PAGE gel for crude venom and 17% for isolated fractions) and sealed with agarose 1% prepared in SDS electrophoresis buffer including traces of bromophenol blue as a tracking dye for monitoring the performance of the electrophoretic separation. The electrophoresis was conducted at a constant current of 5 mA/gel for 12 h; then gels were fixed in 40% methanol, 10% acetic acid and stained with Colloidal Blue Silver Coomassie (24 h) with gentle agitation, followed by washing in deionized water to remove background staining. Each gel was scanned with a Typhoon 9400 Scanner Densitometer; and spot detection and numbering were performed by using the wizard tool in Bio-Rad PDQuest Advanced 8.0.1 software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

### 2.7. Protein identification by tandem mass spectrometry

Protein spots were excised from 2D-SDS PAGE, destained in 50% ethanol, 5% acetic acid, and dehydrated in 100% acetonitrile; each spot was reduced, alkylated and enzymatically digested in trypsin solution (Promega, Madison, WI). Afterwards, the concentrated peptide mixture was desalted by using C<sub>18</sub> Zips Tips (Millipore), and peptides were eluted in 1–5  $\mu\text{l}$  acetonitrile. Digested peptides were analyzed with a LTQ Orbitrap XL ETD Mass Spectrometer (Thermo Scientific). Peptide tolerance was set to 1.2 Da, and peptide charges of +2 and +3 were fragmented. MS/MS tolerance was set to 0.6 Da. All the data were searched against the National Center for Biotechnology Information (NCBI) non-redundant database using Mascot software (Matrix Science, Boston, MA). Our results are consistent with the most abundant RNA transcripts found in the venom gland of *M. fulvius*. The discrepancies found between the transcriptome of the venom gland of *M. fulvius* and its venom proteome can be attributed to several factors: transcripts with transient, temporal or null expression, differences related to the number of specimens used in the studies, and a possibly bias caused by our methodological approach since we focused mainly in the more abundant proteins present in the venom. The search accuracy limits were fixed in 0.8 Da for fragment mass and 20 ppm for precursor mass. The carbamidomethyl cysteine was set as fixed modification, whereas the oxidation methionine was set as variable modification.

### 2.8. Venom fractionation by RP-HPLC

Separation of soluble venom was carried out by high performance liquid chromatography (HPLC) on an Agilent 1100 chromatograph (Agilent, CA), using a C-18 semi-preparative reverse phase column (GraceVydac 250 x 10 mm. Particle size,

5  $\mu\text{m}$ ). The column was equilibrated with water plus 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). Fractions were eluted with a linear gradient of 0 to 60% acetonitrile in 0.1% TFA, over 60 min. Several independent applications were performed with 5 to 7 mg of soluble venom each time, dissolved in distilled water. Absorbance was monitored at 280 nm and each fraction was collected manually, dried in a vacuum centrifuge, dissolved in distilled water and the protein content quantified by absorbance at 280 nm. Individual fractions were named arbitrarily with alphabetic letters.

### 2.9. Molecular mass determination

The fractions obtained after HPLC were loaded into an LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo-Fischer) with electrospray ionization system (ESI). The mobile phase consisted of 50% acetonitrile, plus 0.1% acetic acid, injected at a flow rate of 500 nL/min. The spray voltage was 1.9 kV and the ion detection was made on positive mode. Spectrometric data were acquired manually by using Tune Plus software and software Xtract was used for data deconvolution. Molecular masses were determined as average masses considering the contribution of heavy isotopes.

### 2.10. Lethality test

Chromatographic fractions containing sufficient protein were assessed by injecting intravenously the equivalent of 20  $\mu\text{g}$  of protein per mouse; three mice were used per fraction. The LD<sub>50</sub> of those fractions capable of killing the tested group of animals was determined. The control group received an identical injection of NaCl 150 mM. Mortality was recorded at 48 h post-injection.

### 2.11. N-terminal amino acid sequencing

Chromatographic pure fractions of interest were reduced with DTT and alkylated with iodoacetamide as previously described [8], then were submitted to automatic amino acid sequencing determination by Edman degradation. Sequencing was performed in a PPSQ-31A Protein Sequencer from Shimadzu Scientific Instruments, Inc. (Columbia, Maryland, USA). Each fraction (approximately 250 pmol) was adsorbed on Glass Fiber Disk TFA treated, distributed by Shimadzu.

In order to obtain complete sequence of the fraction labeled E.1, it was digested with endoprotease-Glu-C (From Roche) and CNBr. Peptide fragments produced by the digestion were isolated by RP-HPLC, vacuum dried and sequenced by Edman degradation.

### 2.12. Electrophysiological assays

Post-synaptic neurotoxicity of components with similar molecular mass to 3FTx was assessed in the human Rhabdomyosarcoma TE671 cell line, which expresses muscle acetylcholine receptor (AChR) [27]. Cell culture and electrophysiological records were done as previously described [8]. In brief, the cells were cultured in DMEM containing 4.5 g/L of glucose and 10% of fetal calf serum (FCS), and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. All reagents were purchased from GIBCO®.

**Table 1 – RP-HPLC isolated fractions of *M. fulvius* and biological activities.**

Sample	RT (min)	<sup>a</sup> % (A <sub>214 nm</sub> )	Mass (Da)	<sup>b</sup> PLA <sub>2</sub> activity (U/mg ± SD)	<sup>c</sup> α-ntx activity (% response)	Lethality (20 µg/mouse)	LD <sub>50</sub> (µg/g) (CI 95%)
Venom		100		492 (±137)	ND	ND	0.3 (0.29–0.31)
A	11.12	1.3	Not detected	ND	ND	ND	ND
B	12.50	1.7	Not detected	ND	ND	ND	ND
U	13.30	0.4	Not detected	ND	ND	ND	ND
V	28.12	2.5	6454.01; 6592.1; 6775.3	ND	0	0/3	ND
C	29.76	2.1	7145.4	ND	30	0/3	ND
D	30.37	2.9	6903.9; 6961.9; 7145.4	ND	60	ND	ND
E	32.22	5.2	6945.9; 6887.8	ND	100	0/3	ND
F	33.90	4.6	6493.8	ND	50	0/3	ND
G	34.35	4.0	6517.9	ND	50	ND	ND
H	34.60	3.6	6354.8; 6493.8; 7103.3; 7590.6	ND	20	ND	ND
I	35.92	8.8	13466	51 (±5)	ND	0/3	ND
J	36.37	2.2	ND	ND	ND	ND	ND
K	37.50	3.2	13195.9; 13525.8; 13792	461 (±57)	ND	3/3	1.07 (1.07–1.08)
L	38.32	2.7	13212.9	180 (±24)	ND	1/3	ND
M	38.90	8.7	13183.9	207 (±54)	ND	0/3	ND
N	39.69	18.1	13436.9	758 (±56)	ND	3/3	0.54 (0.52–0.57)
O	40.22	15.3	13370.8; 7534.8	514 (±132)	ND	3/3	0.91 (0.75–1.11)
P	41.14	7.0	6827.3; 7534.8	158 (±34)	10	0/3	ND
Q	44.27	0.4	ND	69 (±13)	ND	ND	ND
R	44.96	1.5	16000.5	41 (±5)	ND	ND	ND
S	49.07	2.9	Not detected	ND	ND	ND	ND
T	51.50	1.0	Not detected	ND	ND	ND	ND

RT = Retention time.

ND = Not determined.

<sup>a</sup> The percentage that each individual fraction represents was calculated by dividing each peak area by the sum of areas of all peaks obtained.

<sup>b</sup> Phospholipase activity was measured by triplicate.

<sup>c</sup> α-ntx activity = blockage of response to ACh as described in Section 2 and in Fig. 5.

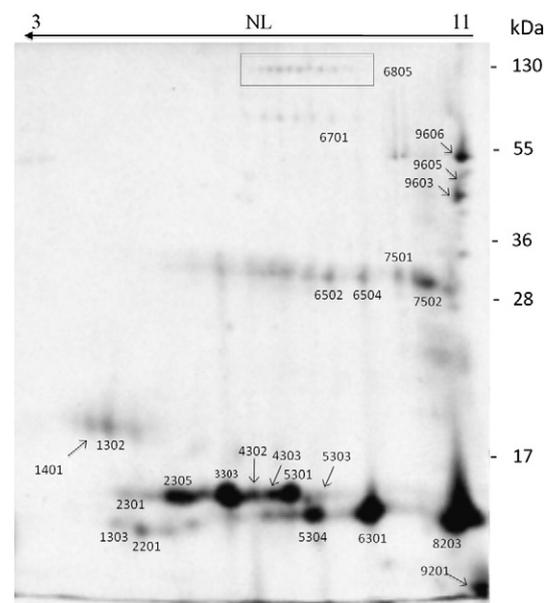
The standard extracellular solution contains: 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 5 mM D-glucose; pH 7.40 (adjusted with NaOH). The standard pipette solution at [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> = 10<sup>-9</sup> M (pCa 9) contains: 130 mM K<sup>+</sup>-aspartate, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES at pH 7.30 (adjusted with KOH). Acetylcholine was used at 10 µM and α-bungarotoxin 50 nM was used as a positive control. Fresh working solutions at final concentrations were prepared every 2 h.

MultiClamp 700B amplifier, Digidata 1440A and pClamp10 software were used during data acquisition (all from Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA). The software Clampfit 10 (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA) and Origin 7 (OriginLab, Northampton, MA, USA) were used during off-line analysis.

The effect of each fraction was evaluated at 1 µM by application of the fraction for about 40–60 s, immediately followed by the application of acetylcholine. For the dose-response curve, data obtained from different concentrations were normalized, plotted and fitted by using a sigmoid equation of the Logistic form.

### 2.13. Refractionation by cationic exchange-HPLC

From RP-HPLC one fraction of interest was submitted to an additional separation by using cation-exchange HPLC on equipment from Millipore-Waters (Model 600) using the column TSK gel SP-5PW. Elution was performed at a constant flow rate of 1 mL/min in 20 mM sodium acetate buffer pH 4.5 as solvent A, and linear ionic gradient of NaCl 0.5 M from 0 to 100% over



**Fig. 1 – Proteomic map of *M. fulvius* venom (200 µg). 2D-PAGE was performed under denaturing conditions using a wide pH range (3–11 Non-Linear — NL-IPG strip) in IEF and 12.5% SDS-PAGE in second dimension. Each spot detection and number assigned was performed using wizard tool in Bio-Rad PDQuest Advanced 8.0.1 software.**

**Table 2 – Spot identification from *Micrurus fulvius* venom, compared with the transcriptome reported by Margres et al., 2013 [23].**

Spot no.	MS/MS-derived sequence	Precursor ion(m/z)	Charge number (z)	Transcriptome ( <i>M. fulvius</i> ; SRA062772)	Protein family	Coverage (%)
1302	LFDDTK	369.69	+2	gi 537444939	C-type lectin 1b	45.6
	NVWIGLNDPR	592.31	+2			
	IWEWTDR	503.24	+2			
	EYCVHLLASQGYLK	841.43	+2			
	WNDTPCESLFAFICR	639.29	+3			
	TWPDAEMFCR	664.78	+2			
1303	NVWIGLNDPR	592.32	+2	gi 537444939	C-type lectin 1b	7.3
1401	EYCVHLLASEGYLK	561.27	+3	gi 537444939	C-type lectin 1b	19.7
2201	NVWIGLNDPR	592.30	+2		C-type lectin 1b	59.5
	LFDDTKTWPDAEMFCR	683.30	+3	gi 537444939		
	IWEWTDR	503.24	+2			
	SSTNYTSWNEGEPNNSWNK	1107.96	+2			
	EYCVHLLASQGYLK	841.41	+2			
	WNDTPCESLFAFICR	958.43	+2			
2301	NVWIGLNDPR	592.31	+2		Phospholipase A2 2a	38.5
	APYNDKKNYNIDLK	784.40	+2	gi 537444805		
	SWWDFADYGCYCGSGGSGTPVDDLDK	1458.10	+2			
	TAALCFAK	441.23	+2			
2305	NMIECTTKR	576.76	+2	gi 537444863	Phospholipase A2 11	46.7
	CKDFVCNCDR	458.50	+3			
	TAALCFAK	441.22	+2			
	APYNDKKNYNIDLK	575.30	+3			
	WTLYSYDCSNGQLTCK	998.42	+2			
3303	NMIECTTKR	584.77	+2	gi 537444863	Phospholipase A2 11	57.4
	WTLYSYDCSNGQLTCK	998.42	+2			
	CKDFVCNCDR	458.51	+3			
	TAALCFAK	441.23	+2			
	APYNDKKNYNIDLK	523.25	+3			
	CCQVHDDCYGEAEK	885.83	+2			
4302	CCQVHDDCYDTAEK	600.89	+3	gi 537444803	Phospholipase A2 2b	28.7
	APYNDKKNYNIDLK	523.27	+3			
	TAALCFAK	441.23	+2			
4303	WTLYSYDCSNGQLTCK	1005.46	+2	gi 537444748	Phospholipase A2 5b	44.3
	CKDFVCNCDR	458.52	+3			
	APYNDKKNYNIDLK	523.27	+3			
	TAALCFAK	441.23	+2			
	VHGCWPK	442.22	+2			
5301	NMIECTTKR	584.77	+2	gi 537444803	Phospholipase A2 2b	58.2
	WTLYSYDCSNGQLTCK	998.43	+2			
	CKDFVCNCDR	458.51	+3			
	TAALCFAK	441.22	+2			
	APYNDKKNYNIDLK	575.28	+3			
	CCQVHDDCYDTAEK	600.88	+3			
	DFVCNCDR	543.19	+2			
	CCQVHDNCYDEASK	893.35	+2	gi 537444735		
NMIQTTK	498.23	+2				
5304	WTLYSYDCSKGQLTCK	670.65	+3	gi 537444774	Phospholipase A2 31	13.11
6502	WTLYSYDCSNGQLTCK	998.45	+2	gi 537444748	Phospholipase A2 5b	27.8
	CKDFVCNCDR	687.27	+2			
	TAALCFAK	441.23	+2			
6504	TAALCFAK	441.24	+2	gi 537444731	Phospholipase A2 9	17.2
	APYNDKKNYNIDLK	523.27	+3			
6701	APYNDKKNYNIDLK	523.25	+3	gi 537444819	Phospholipase A2 24	17.2
	TAALCFAK	441.22	+2			
6805	LWNYFHSTLLPK	506.94	+3	gi 537444868	Phosphodiesterase 1	23.2
	TFLPIFVNSVN	625.84	+2			
	AATYFWPGSEVK	678.34	+2			
	SMEAIFLAHGPDFK	789.89	+2			
	YGPVSGQVIK	524.29	+2			
	VMEVLQWLDLPR	757.91	+2			
	VRDVELLTGLDFYSVLK	984.05	+2			
	NPFYNPSPAK	567.78	+2			

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Spot no.	MS/MS-derived sequence	Precursor ion(m/z)	Charge number (z)	Transcriptome ( <i>M. fulvius</i> ; SRA062772)	Protein family	Coverage (%)
	DFYTFDSEAIVK	717.84	+2			
	AEYLETWDTLMPNINK	977.48	+2			
	RLHFANNVR	376.21	+3			
	YISAYSQDILMPLWNSYTISK	1255.13	+2			
	EQSSPLLCDFGVPVSPDLSGCK	1195.57	+2			
	DVELLTGLDFYSVLK	856.46	+2			
7501	APYNDKKNYNIDLK	523.26	+3	gi 537444777	Phospholipase A2 30	25.4
	DFVCNCDR	543.20	+2			
	TYSYDCSEGK	605.23	+2			
7502	CKDFVCNCDR	687.27	+2	gi 537444821	Phospholipase A2 23	33.6
	TAALCFAK	441.23	+2			
	APYNDKKNYNIDLK	523.26	+3			
	TYSYDCSEGK	605.24	+2			
	DFVCNCDR	543.21	+2			
8203	HWLSFTNYGCYCGYGGSGTPVDELDR	1004.42	+3	gi 537444757	Phospholipase A2 4e	54.9
	CKDFVCNCDR	458.51	+3			
	TAALCFAK	441.22	+2			
	IDPSHCQ	428.67	+2			
	TYSYDCSEGK	605.22	+2			
	CFPSVR	383.18	+2			
9603	TSVAVVQDYGK	583.80	+2	gi 537444726	Snake venom metalloproteinase 1	17.5
	NDNAQLLTR	522.77	+2			
	SNVAVTLDFGK	632.34	+2			
	AAKDDCDLPELCTGR	574.26	+3			
	NQCIALMGSGVK	647.32	+2			
	DPDYGMVEPGTK	662.79	+2			
	DDCDLPELCTGR	725.80	+2			
	VYEMVNLLNK	619.82	+2			
	YIEFYVVVDNR	708.86	+2			
9605	DPDYGMVEPGTK	662.78	+2	gi 537444726	Snake venom metalloproteinase 1	3.5
	DMCFTLNQR	600.74	+2			
9606	AAKDDCDLPELCTGR	574.26	+3	gi 537444726	Snake venom metalloproteinase 1	6.4
	TSVAVVQDYGK	583.81	+2			
	SNVAVTLDFGK	632.35	+2			

50 min at room temperature. Absorbance was monitored at 280 nm and each fraction was collected manually, dried in a vacuum centrifuge, dissolved in distilled water; and the protein content was determined by absorbance at 280 nm.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Biological activities of soluble whole venom

LD<sub>50</sub> in mouse (Table 1) was consistent with previously reported data [28]. As can be observed, *M. fulvius* whole soluble venom is highly lethal, as with other *Micrurus* sp. [5,20]. Experimentally envenomated mice showed symptoms including retraction, trembling, and motor weakness, and some mice secreted dark urine 30 min post-injection. The neurotoxic symptoms in mice are similar and consistent with those reported in humans [29,21]; although dark urine has been observed exclusively in rodents [30]. It is worth mentioning that high levels of creatine kinase (CK) have been reported in humans with coral snake envenomation [29,31] suggesting myotoxicity.

As shown in Table 1, PLA<sub>2</sub> activity of whole soluble venom was 492 ± 137 U/mg. The presence of this activity has been reported previously in the venom of *M. fulvius*, showing higher

activity compared with other species [30,19]. The enzymatic activity found here shows high phospholipase activity, although slightly different from earlier described values, very likely due to the method used for quantification. This enzymatic activity has been correlated with presynaptic neurotoxicity [32] and assumed to be directly related to CK levels in blood [30]. Hyaluronidase activity was identified, confirming earlier reports [19,20]. The activity of this enzyme in the venom of *M. fulvius* (23.51 ± 3.97 U/mg) is certainly lower when compared to that of other venomous animals including scorpions, viper snakes, bees, wasps, spiders, caterpillars, fishes, and lizards [33,20,34–36]. The low hyaluronidase activity observed in this venom suggests that this enzyme probably is not playing an important role on dispersion and absorption of venom.

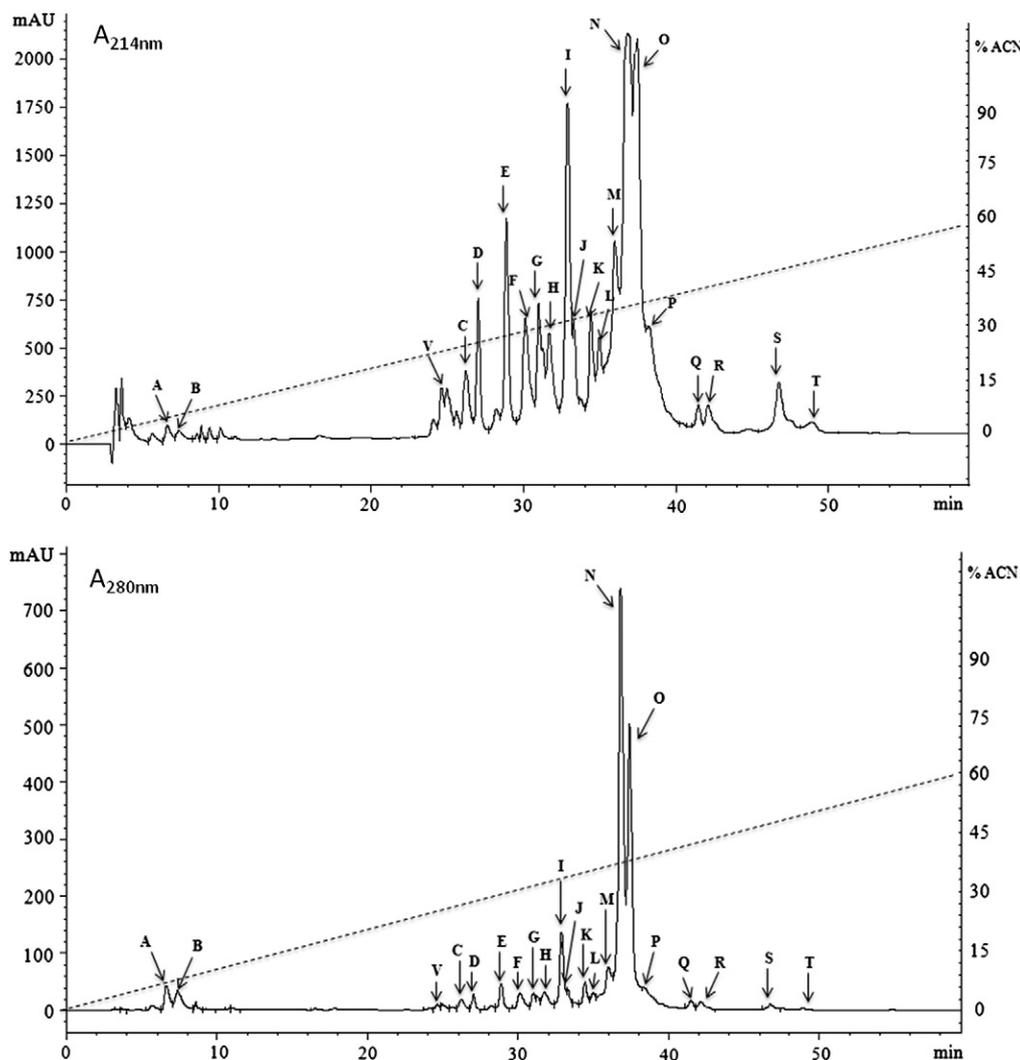
#### 3.2. Proteome map of *M. fulvius* venom

Two-dimensional electrophoretic analysis of *M. fulvius* venom, using isoelectric focusing within a wide pH range (3–11), revealed more than 40 well resolved spots (Fig. 1). For the proteome analysis we selected the most abundant spots (26 out of 40) from the 2D-SDS PAGE with molecular masses ranging from 7 to 130 kDa. Spots were excised from the gels, reduced, alkylated and enzymatically digested in trypsin

solution. All peptide sequences obtained by LC-MS/MS were compared with the *M. fulvius* venom transcriptome previously reported [23]. In the majority of cases (Table 2), a high coverage percentage was found because several peptides matched with the transcriptome data base. In two cases (spots 1303 and 5304), only a single peptide matched; the quality of their spectra was confirmed manually and the corresponding peptide sequences were corroborated. From this analysis, four different species of C-type lectin 1b, fourteen of phospholipases A<sub>2</sub>, one phosphodiesterase and three species of metalloproteinase 1 were identified. In accordance with these results, the most abundant toxins in *M. fulvius* venom are different species of phospholipase A<sub>2</sub>, with molecular masses between 13 and 17 kDa, identified predominantly at basic pHs, consistent with results obtained by RP-HPLC fractionation. Additionally, one spot (9201) was not found in the database of the transcriptome previously reported, but was identified by Mascot to resemble a 3FTx precursor (29 coverage percentage and 128 Mascot score) from *M. corallinus* (gi241995603). The two peptides found in this spot had low identity percentage against all 3FTxs reported in the

transcriptome. Margres et al. [23] found high abundance of Kunitz-type inhibitor transcripts. In the analysis conducted here, however, these inhibitors were not identified. The transcriptome also reported several low-abundance toxins transcripts of cysteine-rich with EGF-like domain, hyaluronidase, L-amino acid oxidase, natriuretic peptide, nerve growth factor, nucleotidase, phospholipase B (PLB) and vascular endothelial growth factor (VEGF) [23] that were not identified in the analyzed spots from 2D-SDS PAGE.

The apparent inconsistencies when comparing the proteome analysis of this communication and the transcriptome previously reported can be explained in several ways. First, the transcriptome results of Margres and collaborators were performed by using a single specimen, whereas this study was drawn from a pool of 10 individuals. Second, as earlier described by Correa-Netto et al. [11] working with *M. corallinus*, is the fact that transcripts with transient expression, temporary or null expression can occur, in addition to which the actual venom secreted by a snake might not contain other components normally found in the cells associated with salivary or



**Fig. 2 – Chromatographic profile of *M. fulvius* venom after fractionation on a C-18 column. Elution was achieved with a gradient from 0 to 60% acetonitrile in 0.1% TFA in 60 min. Peaks detection at A<sub>214</sub> nm (upper panel) and A<sub>280</sub> nm (lower panel). Each fraction was analyzed by LC/MS.**

venomous glands. Third, the low resolution of the 2D-SDS PAGE used in this study for low molecular mass peptides prevented us to identify some components. Fourth, and probably the most important, our proteome analysis was directed to the more conspicuous spots separated in the gel.

Concerning hyaluronidase, as already mentioned above, enzymatic activity was found, but the protein was not identified in the proteomic analysis, probably because it is expressed in low amounts and could be masked by dimers or trimers of PLA<sub>2</sub>.

### 3.3. Characterization of venom components

#### 3.3.1. RP-HPLC venom separation

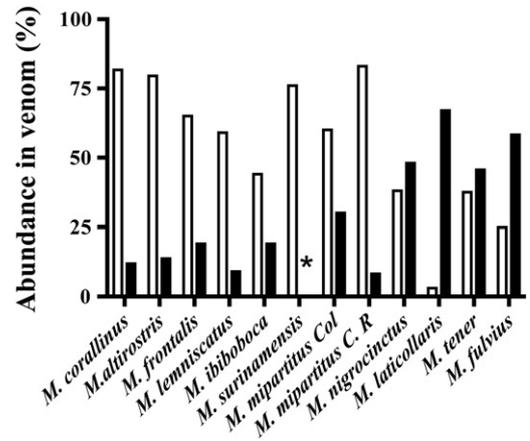
Separation of venom by RP-HPLC yielded 22 fractions (Fig. 2) and the molecular mass of each individual fraction was determined. Table 1 shows that individual fraction can contain two or three different molecular masses with equal hydrophobicity. Low molecular weight components eluted from 28 to 35% of acetonitrile, while components similar to PLA<sub>2</sub> came out at 36–40% of solvent (Fig. 2). Only one fraction (fraction P) with low molecular weight eluted at 40% of acetonitrile. Our elution profile is consistent with that reported for different *Micrurus* venoms, separated in similar conditions [38,6]. The percentage that each individual fraction represents was calculated by dividing each peak area by the sum of areas of all peaks obtained. In contrast with other coral snakes' venom, particularly with South American species, *M. fulvius* contains high amounts of PLA<sub>2</sub> (58.3%), and low amounts of components with typical molecular mass of the 3FTx peptides (24.9%) (Fig. 3). Moreover, the results described here agree well with proportionality of toxin transcripts found in the *M. fulvius* transcriptome [23]; and this explains the high phospholipase activity exhibited by this venom, in contrast with other *Micrurus* species.

#### 3.3.2. Lethality test

As mentioned earlier, only fractions obtained in sufficient amounts from the RP-HPLC separation were used for lethality tests. Results given in Table 1 showed three lethal fractions (K, N and O) with masses around 13 kDa; whereas low molecular mass components were apparently nontoxic to mice, with the amount (20 µg/mouse) assayed.

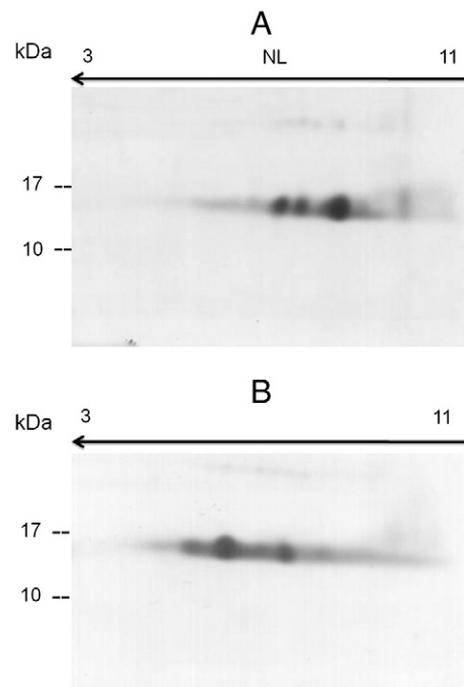
The proportional quantity of pre- and post-synaptic components usually found depends on the coral snake species. Further characterizations of new world elapid snake venoms have shown that the most abundant toxic components are typically post-synaptic neurotoxins as shown in Fig. 3 [8,11,39].

Recently, different reports have shown the presence of a significant quantity of PLA<sub>2</sub> in *Micrurus* venoms. Fernandez et al. 2011 [12], found PLA<sub>2</sub>s to be the predominant component (48%) in the *M. nigrocinctus* proteome. On the other hand, Bénard-Valle et al. in 2013 [14], found similar amounts of PLA<sub>2</sub>s (45.6%) in the North American coral snake *M. tener*. In our research group, preliminary results obtained with venom from *M. laticollaris* indicate that this snake has an important predominance of PLA<sub>2</sub>s, but also a potent 3FTx toxin (Mlat 1) [13]. For comparative purposes the proportional composition of venom components for several *Micrurus* species is shown in Fig. 3.



**Fig. 3 – Comparison of component abundance with molecular masses of 13–14 kDa (white) and of 6–8 kDa (black) in different *Micrurus* venoms. Data were compiled from published work by: Netto et al. [11] (*M. altirostris*, *M. corallinus*); Fernandez et al. [12] (*M. nigrocinctus*); Ciscotto et al. [10] (*M. frontalis*, *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus*); Olamendi-Portugal et al. [8] (*M. surinamensis*); Bénard-Valle et al. [14] (*M. tener tener*); Rey-Suárez et al. [39] (*M. mipartitus* from Colombia and *M. mipartitus* from Costa Rica); Carbajal et al. [13] (*M. laticollaris*); this work (*M. fulvius*). \*Percentage of proteins weighing 13–14 kDa, not specified by the authors.**

Our results show that most, if not all, of the toxicity towards mice of *M. fulvius* venom can be attributed to presynaptic neurotoxins, which are capable of axonal damage. This implies



**Fig. 4 – 2D-PAGE of the two main fractions isolated by RP-HPLC from *M. fulvius* venom. A) fraction N (43 µg) and B) fraction O (30 µg) were performed under denaturing conditions using a wide pH range (3–11 Non-Linear — NL-IPG strip) in IEF and 17% SDS-PAGE in second dimension.**

**Table 3 – Sequences obtained by Edman degradation compared with the transcriptome reported by Margres et al., 2013 [23].**

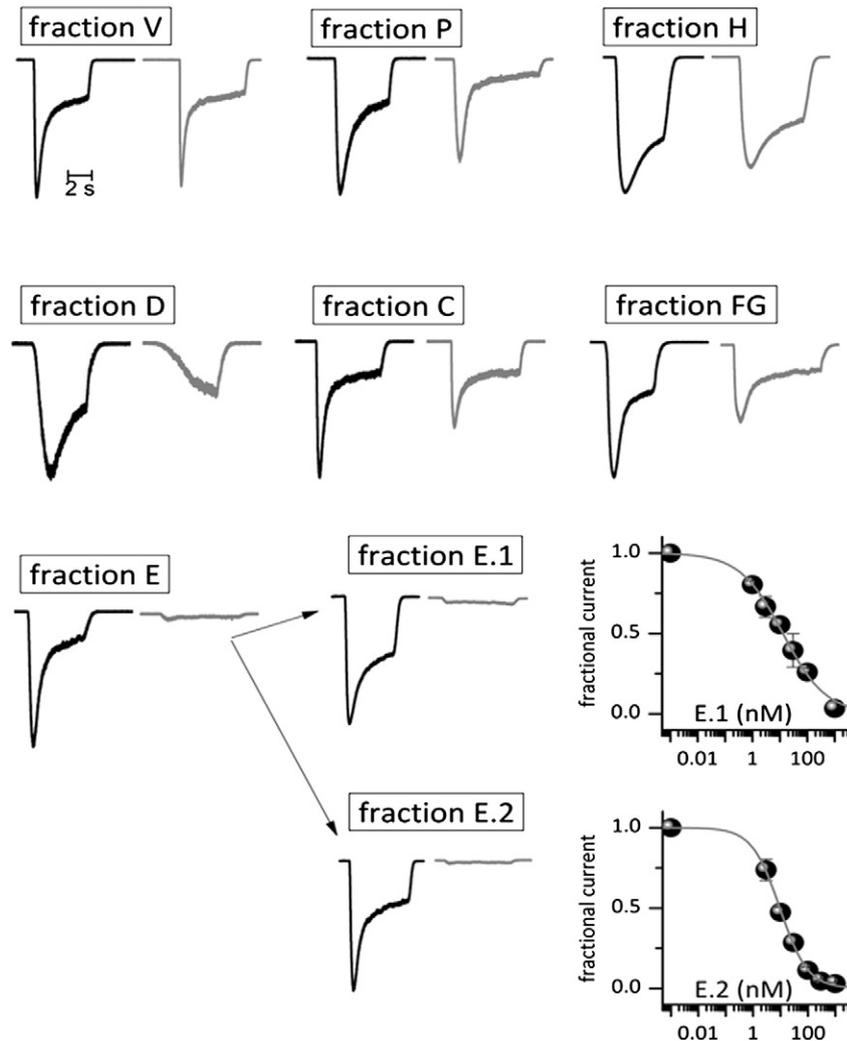
Fraction	Sequence	Mass (Da)	Identity (%)	Transcriptome ( <i>M. fulvius</i> ; SRA062772)	Protein family
E.1	LKCKSSRTETMTCPEGEDKCEKYAVGLMHGY FFFIYTCTSKCHEGAYNVCCSTDLCN	6945.9	96	gi GAEP01001967.1	3FTx
E.2	LKCYSSRTETMTCPXGEXKCEKYAVGXMXGXFFFX	6887.8	85	gi 537444968GAEP01001967.1	3FTx
N	NLIHKNMICTTKRSWWHFADYGCYCGSGGSXTPV	13436.9	64	gi 537444808GAEP01002030.1	PLA <sub>2</sub>
O	NLIHFKNMIECTTKRSWWHFADYGCYCGSG	13370.8	100	gi 537444813GAEP01002028.1	PLA <sub>2</sub>

3FTx: three finger toxin.  
PLA<sub>2</sub>: phospholipase A<sub>2</sub>.

that muscle paralysis caused by *M. fulvius* venom might not be reversed by antivenoms, in contrast with paralysis caused by other *Micrurus* venoms with predominant  $\alpha$ -neurotoxicity (e.g., *M. altirostris* [11], *M. mipartitus* [39]), and by other  $\alpha$ -neurotoxic elapid venoms [40]. These marked differences in *Micrurus* venom composition are related to prey preference by the different coral snake species [14,37,41].

### 3.3.3. Characterization of phospholipases A<sub>2</sub>

Based on PLA<sub>2</sub> protein molecular masses reported by several authors [42,43], the fractions whose molecular masses were around 13 kDa were tested for PLA<sub>2</sub> activity. All of those fractions had activity (Table 1). Notably, fractions N and O account for 33.7% of the whole venom. Both fractions contain the highest phospholipase activity and were the most lethal ones to mice.



**Fig. 5 – Effect of the low molecular mass components of *M. fulvius* venom on the muscle nicotinic Ach receptor. Representative currents in control (black traces) and after application of 6–8  $\mu$ g/ml of the fractions (gray traces). Bottom middle and right panels show the effect and the dose response curve of the two peaks (E.1 and E.2) resolved from fraction E. The IC<sub>50</sub> and slope values for peak E.1 were of 13  $\pm$  1 nM and 0.55  $\pm$  0.04 and for peak E.2, 9.5  $\pm$  0.3 nM and 0.85  $\pm$  0.03 nM.**

Fractions N and O were submitted to 2-D PAGE separation (Fig. 4), for more complete characterization.

Fraction N profile showed at least three basic protein species ( $pI = 7-9$ ), with predominant species around pH 8. Fraction O showed three protein species near to neutral pH ( $pI = 5-7$ ). Neurotoxic PLA<sub>2</sub>s are commonly found in snake venoms. Crotoxin, for example, one of the most studied neurotoxic phospholipase from *Crotalus durissus terrificus* venom, contains several protein species that differ from each other by a few amino acids [44,45].

N-terminal amino acid sequence from N and O fractions were performed. The sequences identified were analyzed by using TBLASTN software and compared to those reported in the *M. fulvius* transcriptome analysis (Table 3). Partial sequence of fraction O had 100% identity with one of the transcripts, whereas fraction N had 64% with another one.

### 3.4. Three finger toxin proteins (3FTx)

RP-HPLC fractions that share some characteristics, including retention time and molecular weight of alpha-neurotoxins found in different *Micrurus* [6,13,46], were evaluated by electrophysiology as described in methods. Partial and reversible responses were observed with fractions C, D, FG, and H at 1  $\mu$ M. Fraction V showed no response (Table 1 and Fig. 5). Due to the weak effect of these fractions, dose-response curves were not carried out. Fraction E was the only one able to abolish 100% of the response; however, its effect was immediately reversed after washing. For better characterization, fraction E was refractionated by cation-exchange chromatography. Two peaks resolved (E.1 and E.2, see Fig. 6). When tested at 1  $\mu$ M, the two peaks abolished the response to acetylcholine. The IC<sub>50</sub> values obtained for fraction E.1 and E.2 were  $13 \pm 1$  and  $9.5 \pm 0.3$  nM, respectively.

The 3FTx peptides identified in *M. fulvius* venom, which were apparently not toxic to mice, suggest that these toxins could be specialized for recognition of targets present exclusively on their prey, such as lizards and snakes. Recently, Bénard-Valle et al. [14] found 3FTxs specific to mammals and reptiles in the venom of the coral snake *M. tener*. On the other hand, similar to our present findings with 3FTx of *M. fulvius* venom, there are a number of 3FTxs in several elapid snake venoms with low neurotoxicity and weak and reversible binding to mammal

nAChR and, because their biological roles are poorly characterized, Fry et al. [42] classified them into orphan groups.

N-terminal amino acid sequence from E.2 and complete sequence of E.1 were obtained. The sequences found were analyzed by using TBLASTN software in order to compare with those reported from *M. fulvius* venom gland transcriptomic analysis. The results are shown in Table 3. Their sequences show high identity with the 3FTxs peptides (85 and 96%) reported before [23]. The complete sequence of fraction E.1 contains the expected eight cysteines conserved in 3FTx.

## 4. Conclusion

Earlier characterizations of different coral snake venoms have concluded that neurotoxicity of these species was essentially determined by alpha-neurotoxins. In this work we show conclusively that PLA<sub>2</sub>s are the main venom components responsible for *M. fulvius* neurotoxicity in mice. Two PLA<sub>2</sub> fractions alone constitute nearly 33.4% of soluble venom, and they are also the most lethal components in mice. Our results are consistent with the most abundant RNA transcripts found in the venom gland of *M. fulvius*. The discrepancies found between the transcriptome of the venom gland of *M. fulvius* and its venom proteome can be attributed to several factors: transcripts with transient, temporal or null expression, differences related to the number of specimens used in the studies, and a possibly bias caused by our methodological approach since we focused mainly in the more abundant proteins present in the venom.

The *M. fulvius* components with low molecular masses work like reversible  $\alpha$ -neurotoxins on human muscle AChR; however, none of these were lethal to mice at doses up to 20  $\mu$ g per animal by the intravenous route. Additional studies are necessary before fully understanding the role played by these proteins in the venom and their interaction with other toxins.

## Acknowledgments

Irene Vergara was supported by a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico. This work was partially supported by grant IN214211 from Programa de

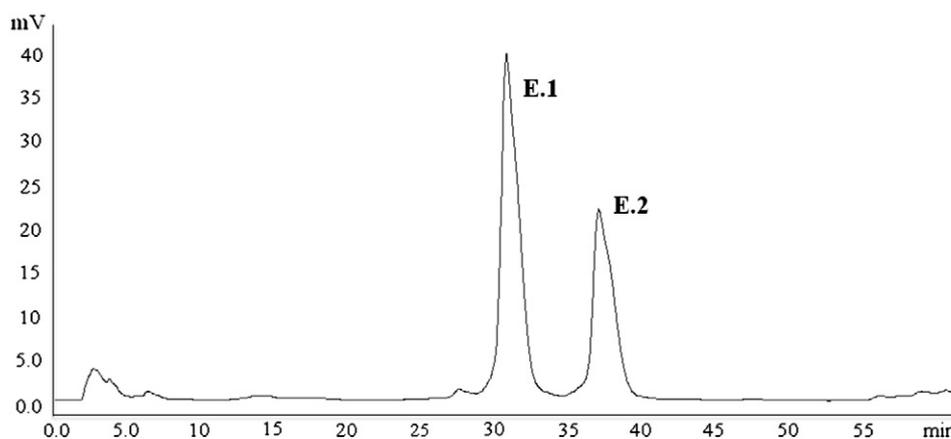


Fig. 6 – Resolution of fraction E by HPLC-cationic exchange, using a TSK gel SP-5PW column, into E.1 and E.2 fractions. Conditions as described in Section 2.

Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM (PAPIIT-UNAM) to Alejandro Alagón and grant from SEP-CONACyT 153496 to Lourival Possani. Technical assistance of Herlinda Clement, Felipe Olvera, Alejandro Olvera, Erika P. Meneses-Romero and Lorena Hernández-Orihuela is greatly appreciated by the authors. The critical reading and comments to the manuscript by Leslie V. Boyer (Tucson, AZ) are deeply appreciated.

## REFERENCES

- [1] Campbell J, Lamar W. *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*, vol. 1. New York: Cornell University Press; 2004.
- [2] Fix JD. Venom yield of the North American coral snake and its clinical significance. *South Med J* 1980;73:737–41.
- [3] Vital Brazil O. Mode of action and pathophysiology of experimental envenomation. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1987;29:119–26.
- [4] da Silva JN, Aird SD. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. *Comp Biochem Physiol C* 2001;128:425–56.
- [5] de Roodt AR, Paniagua-Solis JF, Dolab JA, Estévez-Ramírez J, Ramos-Cerrillo B, Litwin S, et al. Effectiveness of two common antivenoms for North, Central, and South American *Micrurus* envenomations. *Clin Toxicol* 2004;42:171–8.
- [6] Rosso JP, Vargas-Rosso O, Gutiérrez JM, Rochat H, Bougis PE. Characterization of  $\alpha$ -Neurotoxin and Phospholipase A2 activities from *Micrurus* Venoms. *Eur J Biochem* 1996;238:231–9.
- [7] Dal Belo CA, Leite GB, Toyama MH, Marangoni S, Corrado AP, Fontana MD, et al. Pharmacological and structural characterization of a novel phospholipase A2 from *Micrurus dumerilii carinicauda* venom. *Toxicon* 2005;46:736–50.
- [8] Olamendi-Portugal T, Batista CV, Restano-Cassulini R, Pando V, Villa-Hernandez O, Zavaleta-Martínez-Vargas A, et al. Proteomic analysis of the venom from the fish eating coral snake *Micrurus surinamensis*: novel toxins, their function and phylogeny. *Proteomics* 2008;8:1919–32.
- [9] Dokmetjian JC, del Canto S, Vinzón S, de Jiménez Bonino MB. Biochemical characterization of the *Micrurus pyrrhocryptus* venom. *Toxicon* 2009;53:375–82.
- [10] Ciscotto PH, Rates B, Silva DA, Richardson M, Silva LP, Andrade Donato MF, et al. Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species. *J Proteomics* 2011;74:1810–25.
- [11] Correa-Netto C, Junqueira-de-Azevedo IDL, Silva DA, Ho PL, Leitão-de-Araújo M, Alves MLM, et al. Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*. *J Proteomics* 2011;74:1795–809.
- [12] Fernandez J, Alape-Girón A, Angulo Y, Sanz L, Gutiérrez JM, Calvete JJ, et al. Venomic and antivenomic analyses of the Central American coral snake, *Micrurus nigrocinctus* (Elapidae). *J Proteome Res* 2011;10:1816–27.
- [13] Carbajal-Saucedo A, López-Vera E, Bénard-Valle M, Smith E, Zamudio F, de Roodt A, et al. Isolation, characterization, cloning and expression of an alpha-neurotoxin from the venom of the Mexican coral snake *Micrurus laticollaris* (squamata: elapidae). *Toxicon* 2013;66:64–74.
- [14] Bénard-Valle M, Carbajal-Saucedo A, de Roodt A, López-Vera E, Alagón A. Biochemical characterization of the venom of the coral snake *Micrurus tener* and comparative biological activities in the mouse and a reptile model. *Toxicon* 2013;77:6–15.
- [15] Nirthanan S, Gwee MC. Three-finger  $\alpha$ -neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. *J Pharm Sci* 2004;94:1–17.
- [16] Rossetto O, Montecucco C. Presynaptic neurotoxins with enzymatic activities. In: Freiburg KS, editor. *Pharmacology of neurotransmitter release*, Handbook of experimental pharmacology Berlin: Springer-Verlag; 2008. p. 129–70.
- [17] Rigoni M, Paoli M, Milanese E, Caccin P, Rasola A, Bernardi P, et al. Snake phospholipase A2 neurotoxins enter neurons, bind specifically to mitochondria, and open their transition pores. *J Biol Chem* 2008;283:34013–20.
- [18] Barrientos SA, Martínez NW, Yoo S, Jara JS, Zamorano S, Hetz C, et al. Axonal degeneration is mediated by the mitochondrial permeability transition pore. *J Neurosci* 2011;31:966–78.
- [19] Tan NH, Ponnudrai G. The biological properties of venoms of some American coral snakes (Genus *Micrurus*). *Comp Biochem Physiol B* 1992;101:471–4.
- [20] Tanaka GD, Maria de Fátima DF, Portaro FC, Sant'Anna OA, Tambourgi DV. Diversity of *Micrurus* snake species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4:e622.
- [21] Wood A, Schauben J, Thundiylil J, Kunisaki T, Sollee D, Lewis-Younger C, et al. Review of Eastern coral snake (*Micrurus fulvius fulvius*) exposures managed by the Florida Poison Information Center Network: 1998–2010. *Clin Toxicol (Phila)* 2013;51:783–8 [Early Online].
- [22] Paniagua D, Jiménez L, Romero C, Vergara I, Calderón A, Benard M, et al. Lymphatic route of transport and pharmacokinetics of *Micrurus fulvius* (coral snake) venom in sheep. *Lymphology* 2012;45:144–53.
- [23] Margres MJ, Aronow K, Loyacano J, Rokyta DR. The venom-gland transcriptome of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) reveals high venom complexity in the intragenomic evolution of venoms. *BMC Genomics* 2013;14:1–18.
- [24] Wang YM, Parmelee J, Guo YM, Tsai IH. Absence of phospholipase A2 in most *Crotalus horridus* due to translational blockage: comparison with *Crotalus horridus atricaudatus*. *Toxicon* 2010;56:93–100.
- [25] Shiloah J, Klibansky C, de Vries A, Berger A. Phospholipase B activity of a purified phospholipase A from *Vipera palestinae* venom. *J Lipid Res* 1973;14:268–78.
- [26] Tolksdorf S, Cassidy JW, McCreedy MH, McCullagh DR. In vitro studies with hyaluronidase. *Ann N Y Acad Sci* 1949;52:1024–7.
- [27] Stratton MR, Darling J, Pilkington GJ, Lantos PL, Reeves BR, Cooper CS. Characterization of the human cell line TE671. *Carcinogenesis* 1989;10:899–905.
- [28] Sánchez EE, Lopez-Johnston JC, Rodríguez-Acosta A, Pérez JC. Neutralization of two North American coral snake venoms with United States and Mexican antivenoms. *Toxicon* 2008;51:297–303.
- [29] Kitchen CS, Van Mierop LHS. Envenomation by the eastern coral snake (*Micrurus fulvius fulvius*). *JAMA* 1987;258:1615–8.
- [30] de Roodt AR, Lago NR, Stock RP. Myotoxicity and nephrotoxicity by *Micrurus* venoms in experimental envenomation. *Toxicon* 2012;59:356–64.
- [31] Manock SR, Suarez G, Graham D, Avila-Aguero ML, Warrell DA. Neurotoxic envenoming by South American coral snake (*Micrurus lemniscatus helleri*): case report from eastern Ecuador and review. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008;102:1127–32.
- [32] Ho CL, Tsai IH, Lee CY. The role of enzyme activity and charge properties on the presynaptic neurotoxicity and the contracture-inducing activity of snake venom phospholipases A<sub>2</sub>. *Toxicon* 1986;24:337–45.
- [33] Girish KS, Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci* 2007;80:1921–43.
- [34] King T, Sobotka A, Alagon A, Kochoumian L, Lichtenstein L. Protein allergens of white-faced hornet, yellow hornet, and yellow jacket venoms. *Biochemistry US* 1978;17:5165–74.
- [35] Alagón A, Guzmán HS, Martín BM, Ramírez AN, Carbone E, Possani LD. Isolation and characterization of two toxins from

- the Mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus* karsch. *Comp Biochem Physiol B* 1988;89:153–61.
- [36] Clement H, Olvera A, Rodríguez M, Zamudio F, Palomares LA, Possani LD, et al. Identification, cDNA cloning and heterologous expression of a hyaluronidase from the tarantula *Brachypelma vagans* venom. *Toxicon* 2012;60:1223–7.
- [37] Daltry JC, Wuester W, Thorpe RS. Diet and snake venom evolution. *Nature* 1996;379:537–40.
- [38] da Silva Júnior NJ, Griffin PR, Aird SD. Comparative chromatography of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comp Biochem Physiol B* 1991;100:117–26.
- [39] Rey-Suárez P, Núñez V, Gutiérrez JM, Lomonte B. Proteomic and biological characterization of the venom of the redbellied coral snake, *Micrurus mipartitus* (Elapidae), from Colombia and Costa Rica. *J Proteomics* 2011;75:655–67.
- [40] Prasampun S, Walsh J, Awad SS, Harris JB. Envenoming bites by kraits: the biological basis of treatment-resistant neuromuscular paralysis. *Brain* 2005;128:2987–96.
- [41] da Silva Júnior NJ, Aird SD. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2001;128:425–56.
- [42] Kini M, Iwanaga S. Structure-function relationships of phospholipases II: charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. *Toxicon* 1986;24:895–905.
- [43] Fraenkel-Conrat H. Snake venom neurotoxins related to phospholipase A<sub>2</sub>. *Toxin Rev* 1982;1:205–21.
- [44] Faure G, Guillaume JL, Camoin L, Saliou B, Bon C. Multiplicity of acid subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom results from posttranslational modifications. *Biochemistry* 1991;30:8074–83.
- [45] Moreno-Robles E, Alape-Girón A, Sánchez M, Gutiérrez-Gutiérrez JM. A new method for the detection of phospholipase A<sub>2</sub> variants: identification of isoenzymes in the venoms of newborn and adult *Bothrops asper* (terciopelo) snakes. *Toxicon* 1988;26:363–71.
- [46] Silveira DOJ, da Silva RDBP, Soares MB, Stephano MA, de Oliveira DW, Raw I, et al. Cloning and characterization of an alpha-neurotoxin-type protein specific for the coral snake *Micrurus corallinus*. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267:887–91.