



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

OBTENCIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE DE LA α -LATROTOXINA
DE *Latrodectus mactans*, A PARTIR DE CUERPOS DE INCLUSIÓN EN
EL MODELO DE *Escherichia coli*.

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MITZI GUADALUPE AMARO RUIZ

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. ALEJANDRO OLVERA RODRÍGUEZ

CUERNAVACA, MORELOS

NOVIEMBRE, 2022

Comité Revisor

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte

Biól. Hugo Suárez Contreras

M. en C. Alejandro Olvera Rodríguez

Dr. Cuauhtémoc Juan Humberto Lanz Mendoza

Dr. Baltazar Becerril Luján

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Alejandro Alagón Cano por el apoyo y la confianza de permitirme formar parte de su gran grupo de trabajo, por hacernos la estancia más ligera y agradable con los chistes en el pasillo y, sobre todo, por todas las enseñanzas y conocimientos.

A mi tutor y gran amigo el M. en C. Alejandro Olvera Rodríguez (Pichón) gracias por permitirme ser parte de la “pichonera”, por guiarme en todo momento durante la tesis, enseñarme con papelito y lápiz cuando se me dificultaban las cosas, regañarme por ser tan distraída haha, porque fuiste muy comprensivo cuando sabías los problemas que a veces me consumía, por hablar conmigo cuando necesitaba apoyo, por compartirme todos tus conocimientos que aprendiste de manera difícil, todo el cariño, las pláticas, los chistes, las canciones que cantamos y por convertirte en mi maestro y amigo.

A la Dra. Ma. Del Carmen Villafuerte por brindarme su tiempo, opiniones y comentarios en los seminarios, así como tener siempre una cálida sonrisa cuando me sentía más nerviosa.

Al Biól. Hugo Suárez por sus acertados comentarios y preguntas para que tuviera muchos más conocimientos sobre mi proyecto, gracias por el tiempo invertido en la revisión a detalle de mi trabajo que me permitieron mejorar el escrito.

Al Dr. Baltazar Becerril Luján por todas las aportaciones desde el escrito hasta cada palabra que decía en los seminarios para mejorar mi formación académica.

Al Dr. Humberto Lanz por sus comentarios, apoyo y buena actitud durante las evaluaciones de este proyecto.

A mis amigos de la Pichonera con quienes me volví una Mitzi más sociable y por todas las risas y diversión en los tiempos libres: Fernando Losoya, Nicolás Elizalde y Oscar Torres. Ana Artero “amiga cofa” que, aunque estuvo poco tiempo, se convirtió en una gran amiga y Roberto Ponce que se nos unió tiempo después a la pichonera.

A mis amigas de la facultad Diana Reséndiz, a Elizabeth Urióstegui y Jocelyn (Ponche) por las pláticas centradas, tristes y los momentos de risas infinitas haha.

A los miembros del laboratorio Alagón-Corzo. Dr. Alejandro Alagón, Dr. Gerardo Corzo, M. en C. Alejandro Olvera, Hilda Vázquez, Biól. Felipe Olvera, Edgar Neri, Melissa Benard, Herlinda Clement, Manuela Ávila, Angélica Linares, Ricardo Mondragón, Marco Ibarra, Jesús Borrego, Damaris, Irving Archundia, Irene Castillo, Germán Aguilar, Oscar Aguayo, Diana Alvarado, Luis Román, Félix Santana, Iván Arenas, Alondra Callejas, Samuel Cardoso, Manuel Yáñez, Raúl Sánchez, Guillermo de la Rosa, Marcos Salazar, David Villaseñor, Belem García, Oscar Aguayo, Julia Quiroz, Andrea Colis.

Al Dr. Gerardo Corzo Burguette por su actitud tan amable y contagiarnos su “ánimo” durante el trabajo de laboratorio, así como integrarnos siempre desde las comidas inesperadas hasta las posadas.

A Leticia Olvera por su amable apoyo durante el proyecto.

Por el apoyo técnico al Biól. Felipe Olvera Rodríguez y Ricardo Mondragón Cortés.

A la Dra. Hilda Vázquez López por brindarme su apoyo académico.

A la M.V.Z María Elena Elizabeth Mata por su amable atención durante el uso de los animales del bioterio del IBt, UNAM.

Por el apoyo administrativo a Angélica Linares Labastida y la ayuda en el laboratorio a la Sra. Manuela Ávila, por ser unas personas muy cálidas, gracias por todas las pláticas desde las graciosas hasta escucharme cuando necesitaba de apoyo.

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la unidad de síntesis y secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología.

A la unidad de cómputo del Instituto de Biotecnología.

DEDICATORIAS

A mi padre Pedro Amaro, porque desde muy pequeña, siempre me enseñó a preguntarme el porqué de las cosas, cuando tenía alguna duda, siempre me contestaba: investigalo tú sola, si no lo encuentras, yo te ayudo. Por inculcarme el amor por “el saber” comprándome todos esos CD de Encarta cuando aún el internet era un poco más restringido, por haberme guiado en todo momento, por ayudarme a ser una mejor persona, por ser mi mejor amigo en tiempo de crisis y, sobre todo, agradezco infinitamente que me haya tocado el mejor padre de todas las eras.

A mi madre Guadalupe Ruiz, por sus infinitos cuidados cuando era pequeña, todas las historias y juegos, por desvelarse todas las noches cuando tenía miedo o enfermaba y prepararme todo lo que quería en la madrugada aun teniendo que ir a trabajar por las mañanas, porque gracias a ti tengo toda mi ropa y joyas porque yo odio ir de compras haha, por todas las pláticas que tuvimos aprendí a ser una persona más completa enseñándome lo bueno y lo malo de la vida. Gracias por todas las experiencias bonitas que vivimos juntas, cuando me siento sola, recuerdo esos días tan bonitos, jamás los olvidaré.

A mi hermana Giovanna “Larvita Locust” por ser mi pequeña bebé preciosa que llegó a mi vida a mejorarla inconmensurablemente, por enseñarme que la felicidad puede existir en una pequeña “larva” haha, por todos los juegos, en especial el de Gears of War en modo locura haha, por las risas, las pláticas, podría escribir millones de cosas pero solo diré que estoy eternamente agradecida porque tú llegaste a nuestras vidas y todo brilló, todo es felicidad a tu lado, y no podría explicar lo importante que eres para mi chaparra. Gracias a los tres, los amo.

A mis compañeritos de vida:

Kirby, mi chititín lindo, gracias por acompañarme desde los 8 años hasta la universidad, por estar conmigo en la computadora y en la mesa durante horas solo para acompañarme y por “todo” una palabra corta para tan espectacular amigo perruno, te amo y te recordaré todos los días de mi vida.

Bebé: mi gatito hermoso, estás jugando conmigo mientras escribo esto, eres el mejor amigo que alguien pudiera desear, como siempre te digo “eres el amor de mi vida”, espero tener la bendición de tenerte más años conmigo, porque tú pequeño, eres una pieza crucial para mi felicidad.

Piuglu: mi bella avecita espojandita, sin esperarte me llenaste de alegría, todos los días al despertar, tu efusividad alegra mis mañanas, me encantan desde tus juegos a picotazos, tus bailes y sonidos especiales que solo haces para mí y tu manera de reconfortarme durmiendo en mi pecho. Mis tres pequeños, los mejores compañeros de todos los tiempos.

A mi mami Carmelita por enseñarme lo que es sentirse como una nieta completamente amada, no existen palabras para explicar el amor tan grande que tenías, me hubiera encantado compartirte esto, pero me ayudaste desde donde estás, te extrañaré siempre y te llevo en mi corazón.

A mi abuelito Francisco porque fuiste un abuelito muy amoroso y te encantaba mi canto, en los momentos tristes cantaba y recordaba tus ojitos cerrados disfrutando de mi voz y tus grandes aplausos.

A mi tía Rosy y mi abuelita Margarita que siempre tiene bellas palabras que darme y una bonita bienvenida cuando voy a casa.

A Fernando Losoya, mi novio guapísimo, con quien he compartido infinitos momentos, gracias por el gran apoyo brindado, por todo el amor y la compañía, por consentir a “mis niños”, por ser un buen amigo y compañero tanto en la vida como en los juegos hahah y sobre todo por intentar siempre ser una mejor versión para mí y para ti.

A Samuel Cardoso, ahora entiendo por qué en las películas hablan de los mejores amigos llamados Sam, y tú eres el más Sam de todos, gracias por ser como eres, por existir *“todos necesitamos a ese alguien quien te entiende como a nadie, justo cuando más lo necesitas, todos necesitamos un alma en quién confiar”* te quiero mucho.

A Alejandro Olvera (Pichón), gracias porque fuiste muy comprensivo cuando sabías los problemas que a veces me consumía, por hablar conmigo cuando necesitaba apoyo, por compartirme todos tus conocimientos que aprendiste de manera difícil, todo el cariño, las pláticas, los chistes, las canciones que cantamos y por convertirte en mi maestro y amigo.

Todos ustedes fueron una gran fuerza para mí, gracias por todo.



Instituto de Biotecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

El presente trabajo de tesis nivel licenciatura, fue realizado en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano, doctor Emérito por la Universidad Nacional Autónoma de México, adscrito al departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos en el Instituto de Biotecnología, UNAM ubicado en Cuernavaca, Morelos, bajo la tutoría del M. en C. Alejandro Olvera Rodríguez. Agradecemos el apoyo económico otorgado para efectuar este proyecto al Fondo Institucional de Fomento Regional para el Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación (**FORDECYT**)-3303045.

RESUMEN	11
I. Introducción	12
<i>I.2 Generalidades de las arañas</i>	12
<i>I.3 Anatomía general de las arañas</i>	13
<i>I.3 Biología de las arañas del género Latrodectus</i>	14
I.3.1 Taxonomía.....	14
I.3.2 Distribución del género <i>Latrodectus</i>	15
I.3.3 Morfología.....	16
I.3.4 Hábitos y hábitat del género <i>Latrodectus</i>	17
I.3.5 Epidemiología	18
<i>I.4 Latrodectismo</i>	18
I.4.1 Manifestaciones clínicas.....	19
<i>I.5 Veneno de Latrodectus mactans</i>	20
I.5.1 Mecanismo de acción	20
<i>I.6 Estructura α-Latrotoxina</i>	22
I.6.1 Dominio amino terminal	25
I.6.2 Dominio de anquirinas	25
I.6.3 Dominio carboxilo terminal.....	25
<i>I.7 Antivenenos</i>	26
I.7.1 Antiveneno específico Aracmyn F(ab') ₂	27
II Antecedentes	27
III Justificación.....	29
IV Hipótesis	29
V Objetivos.....	29
<i>V.1 Objetivos particulares</i>	29
VI Estrategia Experimental.....	30
VII Materiales y Metodología.....	31
<i>7.1 Diseño de oligonucleótidos específicos</i>	31
<i>7.1.1 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para los fragmentos amino terminal y parte de anquirinas de la α- Latrotoxina</i>	32

7.1.2 Electroforesis de ADN en gel de Agarosa	33
7.1.3 Purificación de fragmentos de ADN obtenidos por PCR	33
7.2 Clonación en el vector TOPO 2.1	33
7.3 Transformación en células E. coli y selección de colonias positivas	34
7.3.1 Purificación de plásmido y análisis con enzimas de restricción	35
7.3.2 Análisis de secuencias	36
7.3.3 Purificación de plásmido que contienen los genes que codifican para el dominio amino terminal y el fragmento del dominio de anquirinas de L. mactans	36
7.4 Ligación en el vector pQE30	37
7.4.1 Expresión del dominio amino terminal y el fragmento del dominio de anquirinas en diferentes cepas de E.coli, purificación y secuenciación.	38
7.4.2 Electroforesis del dominio amino terminal y el fragmento del dominio anquirinas. ...	39
7.4.2 Análisis por Western Blot	39
7.5 Condiciones de cultivo.	40
7.6 Obtención de las proteínas en Cuerpos de Inclusión	40
7.7 Solubilización de Cuerpos de Inclusión	41
7.8 Purificación por afinidad en columna de Níquel (Ni-NTA)	41
7.9 Electroforesis de proteínas recombinantes	42
7.10 Toxicidad de la proteína recombinante en la cepa CD1	42
7.11 Producción de anticuerpos policlonales de las proteínas recombinantes en conejos ...	42
7.12 Reconocimiento de los anticuerpos producidos en conejos mediante ELISA	44
7.13 Ensayos de neutralización de los sueros producidos en conejos	45
VIII Resultados.....	46
8.1 Amplificación y clonación en el vector TOPO 2.1 del dominio amino terminal y fragmento del dominio de anquirinas	46
8.2 Purificación de plásmido y análisis con las enzimas de restricción	48
8.3 Clonación en el vector de expresión pQE30 y transformación en cepas bacterianas Origami y Shuffle	50
8.4 Pruebas de expresión de las proteínas recombinantes rLTxNT y rLTxAnk en las cepas Origami y Shuffle	52
8.6 Expresión de rLTxNT/pQE30 y rLTxAnk/pQE30 en la cepa Arctic	57

<i>8.7 Potencia letal de las proteínas rLTxNT y rLTxAnk</i>	61
<i>8.8 Generación de anticuerpos policlonales en conejo</i>	61
<i>8.9 Ensayos de neutralización de los sueros producidos</i>	62
IX. Discusión	63
X. Conclusiones	67
XI. Perspectivas	68
XII. Referencias	68
XIII. Anexo	73

RESUMEN

Las arañas del género *Latrodectus*, conocidas como viudas, están ampliamente distribuidas alrededor de todo el mundo excepto en las zonas polares, generalmente las hembras adultas son las causantes del cuadro de envenenamiento al humano llamado latrodectismo.

El veneno de las arañas *Latrodectus* contienen diversas proteínas de alto peso molecular, entre las más importantes se encuentra la α -latrotoxina (específica para vertebrados), α - latroinsectotoxina y α -latrocrustatoxina. La α -latrotoxina se une a receptores específicos en las membranas presinápticas estimulando una liberación masiva de neurotransmisores, provocando una parálisis muscular. Esta proteína madura consta de dos dominios: amino terminal y el dominio de anquirinas.

El tratamiento más efectivo contra el envenenamiento es el antiveneno Aracmyn, el cual está compuesto por fragmentos $F(ab')_2$ de inmunoglobulinas de caballos inmunizados con el veneno de miles de arañas del género *L. mactans*. Este proceso es caro, poco eficiente y riesgoso, así que se han buscado alternativas para expresar la α -latrotoxina de *L. mactans* de manera recombinante y utilizarla como inmunógeno para producir suero neutralizante.

En este trabajo, se expresó la proteína α -latrotoxina de manera recombinante en modelo de *E. coli* y se fragmentó el dominio amino terminal, así como la región de anquirinas con el objetivo de producir proteína de manera soluble y generar anticuerpos específicos anti α -latrotoxina. Las proteínas obtenidas se aislaron de los cuerpos de inclusión utilizando el detergente N-laurilsarcosine al 2% y purificando mediante una cromatografía de afinidad en una columna NiNTA. Al utilizarlas como inmunógenos en conejos, se generaron sueros capaces de neutralizar el veneno de *L. mactans* así como su sintomatología.

I. Introducción

I.2 Generalidades de las arañas

Las arañas comprenden un grupo diverso y ampliamente distribuido de artrópodos; han conquistado todos los ecosistemas terrestres excepto las zonas polares. Existen 47 800 especies aproximadamente según world spider catalog (2018). Se encuentran dentro del phylum Arthropoda (del griego *arthron*: unión y *podos*: pie) que es el grupo más extenso del reino animal, se le llama así por presentar patas articuladas y exoesqueleto rígido.

Este phylum se divide en dos subphyla: *Mandibulata* y *Chelicerata* este último recibe ese nombre por poseer quelíceros, los arácnidos son parte de ellos. El orden *Araneae* contiene el mayor número de especímenes dentro de los arácnidos. Se subdivide en tres infraórdenes: *Mesothelae* (arañas segmentadas), *Mygalomorphae* (tarántulas) y *Araneomorphae* (arañas verdaderas). Son un grupo bastante antiguo, sus registros fósiles datan de 300 millones de años atrás dentro del período Carbonífero.

Muchas arañas desarrollaron sistemas especializados como trampas de seda o cazando a sus víctimas, un ejemplo de ellas son las arañas no tejedoras o errantes. Se alimentan de insectos, diversos artrópodos o pequeños mamíferos.

Todas las arañas, salvo la familia *Uloboridae* (arañas de patas plumosas), producen veneno; son pocas las especies que tienen verdadera importancia médica, ya que poseen venenos lo suficientemente tóxicos como para provocar envenenamiento y en ocasiones la muerte al ser humano (Hoffmann, 2004). También existen aquellas que tienen efectos necrotóxicos, como las arañas del género *Loxosceles* (Cabrerizo *et al.*, 2009).

I.3 Anatomía general de las arañas

La morfología de las arañas está comprendida en dos partes: la parte anterior llamada cefalotórax o prosoma, que se divide en parte cefálica donde se encuentran las glándulas de veneno especializadas. Las glándulas venenosas son una estructura compuesta por una parte muscular, una capa secretora y un conducto secretor que desemboca al gancho inoculador (Castro *et al.*, 2009), además de un número variable de pares de ojos, cuatro pares de patas y un par de pedipalpos, que en los machos funcionan como órganos copuladores.

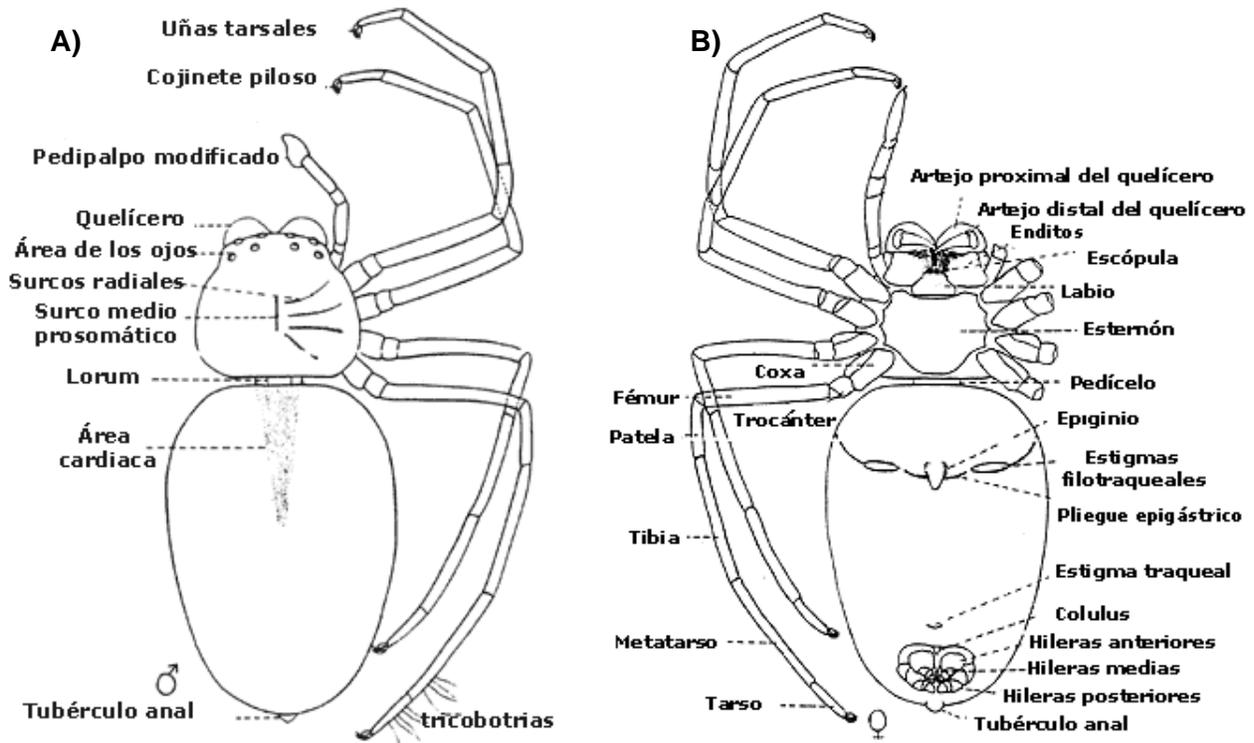


Figura 1. Morfología de las arañas. A) Vista ventral de una araña. B) Vista dorsal de una araña. Modificado de Hoffman (2004).

En la mayoría de las especies las glándulas venenosas se encuentran una parte en el cefalotórax y otra parte en los quelíceros, no obstante, existen arácnidos como los pseudoescorpiones, que contienen las glándulas de veneno en los pedipalpos.

El veneno es utilizado para paralizar y realizar una digestión externa de sus presas, a su vez, como defensa contra los depredadores. Se secreta mediante la contracción de una capa de musculatura en las glándulas venenosas, pasando por un par de ductos a través de los quelíceros y saliendo por el extremo de cada uno del par de colmillos (Rash & Hodgson, 2001), en la parte torácica podemos encontrar los surcos torácico, cervical y radial. La parte posterior denominada opistosoma o abdomen donde se encuentran los órganos como corazón, ovarios, pulmones y realizan funciones como la digestión, circulación, respiración excreción y reproducción. También se encuentran los espineretes, que son los apéndices por donde se secreta la seda.

Algunas arañas como la “viuda negra” teje sus telas extensas e irregulares cerca del suelo, debajo de detritos, entre pilas de leña o delante de madrigueras. Estas arañas cuelgan de la tela cabeza abajo y cuando la presa queda enredada, la atacan rápidamente. Si accidentalmente son presionadas contra la piel humana, la araña reacciona naturalmente mordiendo para su defensa (Castro *et al.*, 2009)

I.3 Biología de las arañas del género *Latrodectus*

I.3.1 Taxonomía

Las arañas del género *Latrodectus* se encuentran dentro del reducido grupo de arañas capaces de producir daño al ser humano, las que han presentado mayor importancia médica por el número de casos clínicos son: *L. mactans*, *L. hasselti* y *L. tredecimguttatus*. (Saracco & de Roodt, 2010). Las arañas del género *Latrodectus* pertenecen a la familia *Theridiidae*.

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda,

Clase: Arachnida,

Orden: Araneae

Suborden: Araneomorphae

Superfamilia: Araneoidea

Familia: Theridiidae

Género: *Latrodectus*

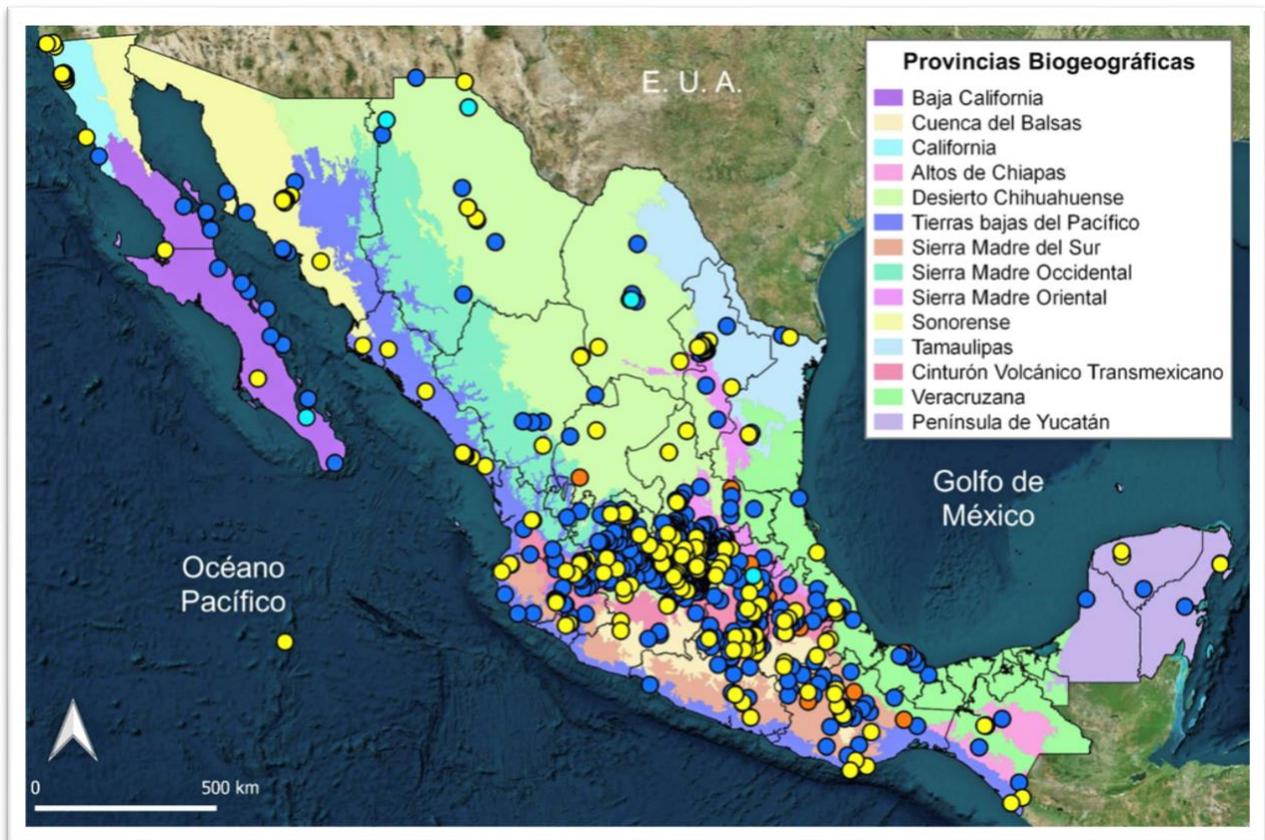
Especie: *Latrodectus mactans*



Fig. 2. Viuda negra (*Latrodectus mactans*) hembra.

I.3.2 Distribución del género *Latrodectus*

Existen alrededor de 45 especies de *Latrodectus* descritas en el mundo (Saracco & de Roodt, 2010). La especie *Latrodectus mactans* (Fig.2) la podemos encontrar en Estados Unidos, Chile, Guatemala, México, Uruguay y Argentina. En Australia y Nueva Zelanda (*Latrodectus hasseltii*); en Italia, España y Rusia (*Latrodectus tredecimguttatus*); en Sur África (*Latrodectus indistinctus*); y en Madagascar (*Latrodectus menavodi*) (Rafael R. L. Sampayo, 1943). En México se encuentran 3 especies, *Latrodectus mactans*, *L. geometricus* y *L. hesperus* (Cabrera *et al.*, 2017) (Fig. 3).



I.3.3 Morfología

La viuda negra hembra, mide aproximadamente de 8 a 15 mm. a diferencia de los machos que miden la mitad de las hembras (Saracco & de Roodt, 2010). Generalmente una viuda negra hembra es color negro y brillante, su tonalidad lo van adquiriendo a medida que se desarrolla su crecimiento; la característica morfológica más relevante es una marca roja en de su abdomen en forma de reloj de arena de color rojo en la parte ventral, cuenta con un abdomen globuloso. Poseen patas largas y delgadas, 3 uñas tarsales y 8 ojos.

Los machos son generalmente del mismo color que las hembras y en la parte del abdomen, tienen la marca del reloj de arena rojizo, aunque la coloración, puede variar

dependiendo de la especie. También contienen veneno, aunque, debido a que sus quelíceros son bastante pequeños, son incapaces de atravesar la piel humana y provocar un envenenamiento.

La reproducción de la viuda negra ocurre durante la primavera y a inicio del verano. Es conocido que las hembras devoran a sus machos tras la cópula, la hembra es capaz de almacenar el esperma. En el opistosoma de las arañas hembra, hay un par de ovarios. La luz de cada ovario conduce a un oviducto, y los dos oviductos se unen para formar el útero, que abre al exterior en el surco epigástrico. A los lados del gonoporo femenino, suele haber un par de aberturas copuladoras que llevan, a través de los conductos de conexión, a un par de receptáculos seminales. Un segundo par de tubos, denominados conductos de fecundación conectan los receptáculos seminales con el útero. Justo delante del surco epigástrico, poseen una placa denominada epiginio, que cubre el poro genital que lleva a las aberturas copuladoras y a los receptáculos seminales. Una vez que el esperma esté almacenado en la hembra y las condiciones nutricionales son apropiadas, coloca en su telaraña un saco blanquecino (ooteca) que contiene de 25 a 900 huevos que tarda de 14 a 30 días en madurar y que mantendrá las crías a salvo hasta el momento de la eclosión. Pocas arañas logran sobrevivir debido al canibalismo entre las crías. Las arañas nacen en estado de ninfas y mudan de piel varias veces al año aumentando su tamaño hasta alcanzar la madurez sexual, llegan a vivir hasta 2 años (Álvarez del Toro, 1992).

I.3.4 Hábitos y hábitat del género *Latrodectus*

De costumbres furtivas y baja agresividad, generalmente reaccionan solo si se la molesta o cuando es comprimida accidentalmente sobre una región del cuerpo.

Son predominantemente rurales, aunque se han encontrado en áreas urbanas, resultante de su transporte pasivo junto a productos agrícolas. Viven en lugares oscuros cerca del piso, al aire libre, entre hierbas, zonas de cultivo, depósitos de granos, en el rastrojo, laderas de montañas, donde hay basura, pilas de madera, piedras, o en las

paredes. El incremento de la temperatura ambiente, las altas tasas de reproducción de la *Latrodectus*, la intensificación de las labores agrícolas y el aumento de paseos campestres, donde las personas se tienden en el pasto, hacen que aumenten las posibilidades de contacto hombre/araña. Las viudas negras tejen una telaraña muy resistente y pegajosa. Ya que son cazadoras en espera, al caer una presa en su tela, la inmovilizan con la seda para morderla e inyectarle su veneno.

I.3.5 Epidemiología

El comportamiento epidemiológico que se ha observado en pacientes con mordedura de araña es de mayor incidencia durante el verano y el otoño. El número de casos de envenenamiento no se conoce con exactitud, aunque existe una cifra aproximada. En México se ha reportado que, del total de casos de intoxicaciones por animales ponzoñosos, el 11% es debido a mordeduras de arañas, registrándose cada año entre 3.000 a 5.000 personas lesionadas por mordeduras de *Latrodectus mactans* y *Loxosceles*, predominando de manera muy amplia la mordedura por viuda negra (Haro *et al.*, 2016).

I.4 Latrodectismo

Se le llama latrodectismo a la intoxicación generada por el veneno de las arañas *Latrodectus*, que son conocidas como “viuda negra” o “araña capulina”. El componente activo proteico más importante del veneno de esta araña es la alfa-latrotóxina, que afecta específicamente a mamíferos. Influye en los canales de sodio de neuronas motoras permaneciendo abiertos, provocando una excesiva liberación de neurotransmisores (acetilcolina y norepinefrina), estimulando excesivamente la placa neuromotora.

I.4.1 Manifestaciones clínicas

Clínicamente, se pueden identificar signos y síntomas que involucran al sistema nervioso simpático y parasimpático, con amplia interacción de neurotransmisores, pudiendo expresarse en diversos aparatos y sistema del organismo, tales como: placa neuromuscular, ojos, glándulas salivales, corazón, pulmones, aparato digestivo, vejiga, órganos sexuales y la piel.

La consecuencia ante la mordida de la viuda negra ocasiona diferentes síntomas en el humano, aproximadamente de 15 minutos a media hora después de la mordedura, donde se presenta un cuadro de envenenamiento leve en el que se puede observar huellas de la lesión (por la mordida de los quelíceros) se presenta dolor en el sitio afectado además de hinchazón con un halo de palidez y eritema circundante, seguida con la disminución de la temperatura corporal, prurito, diaforesis y piloerección local. Conforme avanzan las horas, se presenta un cuadro moderado en el que se suman síntomas como: cefalea con intensidad variable, náuseas, vómito, parestesias generalizadas, mialgias, artralgias, temblores generalizados, sensación de cansancio, sudoración intensa y generalizada, inquietud y sialorrea.

En algunos casos, si el envenenamiento persiste sin iniciar tratamiento posterior a la mordedura, se puede presentar un cuadro de envenenamiento grave en el que se puede presentar priapismo, dolor abdominal y torácicos intensos que van aumentando, los espasmos musculares y el temblor se acentúan, aparece nistagmo, taquicardia, hipertensión arterial, crisis convulsivas, arritmias, edema pulmonar, colapso vascular y choque.

Para establecer un tratamiento, es necesario observar correctamente el grado de envenenamiento para iniciar las medidas terapéuticas oportunas.

Se basa en medidas de soporte entre las que se incluye el uso de analgésicos y la rehidratación con suero intravenoso (Saracco & de Roodt, 2010).

Si se presenta un cuadro de envenenamiento de moderado a grave, se requiere antiveneno específico ya que persistirán los síntomas y agravarse aún más

presentándose edema pulmonar, cerebral o problemas cardiovasculares lo que puede llevar a la muerte. La efectividad del tratamiento va directamente relacionada al tiempo de evolución del evento. La remisión del cuadro clínico inicia 15 minutos posteriores a la aplicación del antiveneno y se presenta la recuperación completa entre los 90 y 120 minutos. La aplicación del antídoto debe ser intravenosa.

I.5 Veneno de *Latrodectus mactans*

Los venenos de los arácnidos y de las serpientes son mezclas heterogéneas de sustancias biológicas activas e inactivas. Los componentes principales son proteínas, aminoácidos libres, poliaminas, polipéptidos, enzimas, nucleótidos y sales inorgánicas. El veneno de *Latrodectus mactans* se produce por secreción holocrina: las células secretorias que se encuentran en el lumen de la glándula venenosa se desintegran y vierten el contenido en el lumen. Como resultado, las toxinas aparecen en el lumen junto con varios organelos, proteasas y pequeñas moléculas (Rash & Hodgson, 2001). La composición del veneno de *Latrodectus mactans* incluye diferentes toxinas en las que se encuentran la latrodectina alfa, la latrotoxina alfa (α -LTX) de 130 kDa dirigida a vertebrados, la latrocrustatotoxina (α -LCTX) de 150 kDa dirigida a crustáceos (Krasnoperov *et al.*, 1991), la latroinsectotoxina (α -LIT) de 120 kDa con actividad equivalente sobre insectos (Magazanik *et al.*, 1992). La latrotoxina es una potente neurotoxina que a concentraciones picomolar causa una masiva secreción de neurotransmisores en mamíferos resultando en el bloqueo de la transmisión nerviosa y llevando a cabo una parálisis muscular.

I.5.1 Mecanismo de acción

Se ha propuesto varios mecanismos para el funcionamiento de la α -latrotoxina, tanto dependientes como independientes de calcio extracelular, que llevan a la liberación de iones intracelulares como el calcio y el sodio terminando en la activación de estas. La α -latrotoxina actúa sobre la membrana citoplasmática, en la que provoca la aparición de

poros, que llevan a la salida de cationes divalentes y monovalentes como calcio, magnesio, potasio y sodio de la célula.

Los mecanismos dependientes de calcio ocurren en células endocrinas, así como en células nerviosas, este mecanismo consiste en la unión del dominio amino terminal de la α -latrotoxina en la membrana y en presencia de cationes divalentes como calcio o magnesio forma multímeros (dímeros o tetrámeros) que generan canales catiónicos no selectivos y la entrada de calcio desencadena la fusión vesicular y la exocitosis.

La activación de canales iónicos genera al inicio una liberación masiva de acetilcolina y luego de catecolaminas de las terminaciones nerviosas del sistema nervioso autónomo. Como resultado de estos eventos ocurre la despolarización de la unión neuromuscular con hiperreactividad autonómica y agotamiento de la acetilcolina.

En ausencia de calcio extracelular, la toxina sigue siendo capaz de estimular las vesículas, aunque el proceso es más lento. Se han descubierto tres receptores, estructural y funcionalmente distintos, que, aunque no son indispensables en la formación de canales catiónicos, facilitan la unión y polimerización de la α -latrotoxina: las neurexinas, proteínas con un solo dominio transmembrana (Graudins *et al.*, 2012) cuya unión a la α -LTX es calcio dependiente y el primer receptor descubierto para la α -latrotoxina; los independientes de calcio (CIRL) también llamada latrofilina, un miembro de la familia CL de receptores acoplados a proteína G. Se cree que estos receptores sirven como sitios para dirigir α -LTX a la ubicación apropiada en la superficie celular, como la zona activa de los terminales nerviosos en la unión neuromuscular. Una vez unido, se produce una oligomerización de α -LTX que permite la formación de tetrámeros, seguido de inserción de membrana y formación de canales catiónicos no selectivos. Esta formación de poros produce la exocitosis vesicular y la fuga de neurotransmisores, se activan los canales de calcio y la tirosina fosfatasa de proteínas (PTP δ), este es el último de los receptores descubiertos y al igual que la latrofilina, puede unirse aún en ausencia de calcio, aún no existe mucha información.

El efecto específico de la α -latrotoxina para la liberación de neurotransmisores indica que los receptores pueden ser responsables de la acción tóxica en las membranas neuronales (Meza-Aguilar & Boucard, 2014). La α -latrotoxina interactúa selectivamente

con la doble capa de lípidos de la membrana celular de las terminaciones presinápticas haciéndola más permeable, abriendo canales catiónicos con la participación de las moléculas de calcio como se observa en la figura 4; las toxinas pasan al interior de la célula por endocitosis, liberando gran cantidad de neurotransmisores como norepinefrina y acetilcolina; con efectos notables en la unión neuromuscular (Magazanik *et al.*, 1992; Ori & Ikeda, 1998)

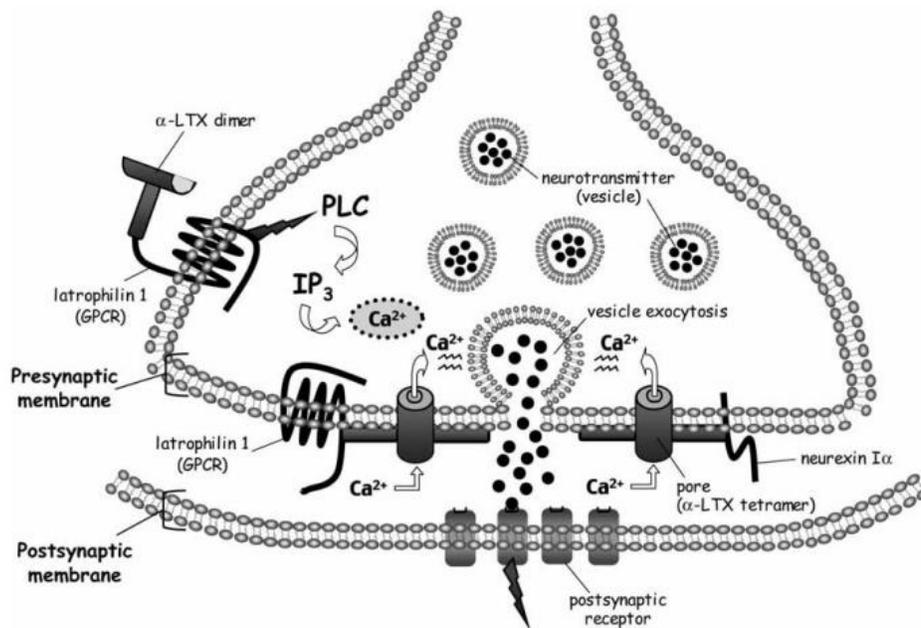


Fig. 4. Mecanismo de acción de la α -latrotóxina. Representación esquemática de los efectos de α -latrotóxina (α -LTX) en la membrana presináptica de las sinapsis autónomas o somáticas. α -LTX se une específicamente a receptores de células neuronales específicos, la latrofilina o neurexina. En presencia de cationes divalentes y al unirse a latrofilina o neurexina I α , α -LTX tetrameriza e inserta en la membrana presináptica para formar poros permeables al calcio. (Luch, 2010).

I.6 Estructura α -Latrotóxina

La α -latrotóxina (α -LTX) es la proteína que afecta a los vertebrados y está compuesta por una sola cadena polipeptídica no glicosilada y sin actividad enzimática, de 130 kDa aproximadamente (Ashton *et al.*, 2000) que se ha aislado del veneno de la araña del género *Latrodectus*. Es una proteína hidrófila, que actúa selectivamente en la membrana

presináptica de vertebrados, en donde estimula la secreción masiva de neurotransmisores. Al agotarse los neurotransmisores, se produce un bloqueo de la transmisión nerviosa lo que lleva a la parálisis muscular, cuando el diafragma es afectado, sobreviene la muerte por asfixia en algunos casos.

La α -latrotoxina se sintetiza como una protoxina mayor a 157 kDa donde se cree que los dominios I y IV son eliminados por escisión proteolítica durante la maduración del veneno por dos sitios de reconocimiento de la furina (endopeptidasa), uno en el sitio N-terminal y otro en el C-terminal. El proceso de maduración se da probablemente en el lumen glandular donde hay niveles elevados de proteasas, dejando una toxina activa madura de 130 kDa compuesta de los dominios II y III.

En condiciones no reductoras la α -latrotoxina existe como un homodímero, con cada monómero compuesto por cuatro dominios: un péptido señal (dominio I) que abarca los primeros 20 aminoácidos y es eliminado en la toxina madura, un dominio N-terminal (dominio II) conservado con dos segmentos hidrofóbicos que abarca del aminoácido 21 hasta el residuo 470 y contiene 3 residuos invariantes de cisteína, (dominio III) compuesto con 20 o 22 repeticiones imperfectas de anquirinas, comprende de los aminoácidos 471 hasta el residuo 1180; y un fragmento (935-1030) que parece ser el sitio de unión al receptor presináptico y un dominio propéptido C-terminal (dominio IV) que va desde el aminoácido 1181 al 1381, el cual se elimina durante la maduración de la toxina (Dulubova *et al.*, 1996).

La α -LTX se encuentra en forma monomérica, aunque se sabe que actúa cuando se inserta en la membrana presináptica de la célula neuronal formando dímeros y tetrámeros para insertarse en la membrana (Saibil, 2000), de tal modo que permite el paso de cationes como calcio y potasio, despolarizando la membrana y provocando una exocitosis masiva de neurotransmisores.

En estudios de criomicroscopía se ha observado que la toxina tiene tres dominios (Fig. 5) diferentes denominados “ala” (que corresponde al dominio, residuos 21–320 aproximadamente), “cuerpo” (corresponde a la primera parte del dominio intermedio, aproximadamente del 321 al 1015), y “cabeza” (que corresponde a la segunda el fragmento del dominio de anquirinas (residuos 1015-1179).

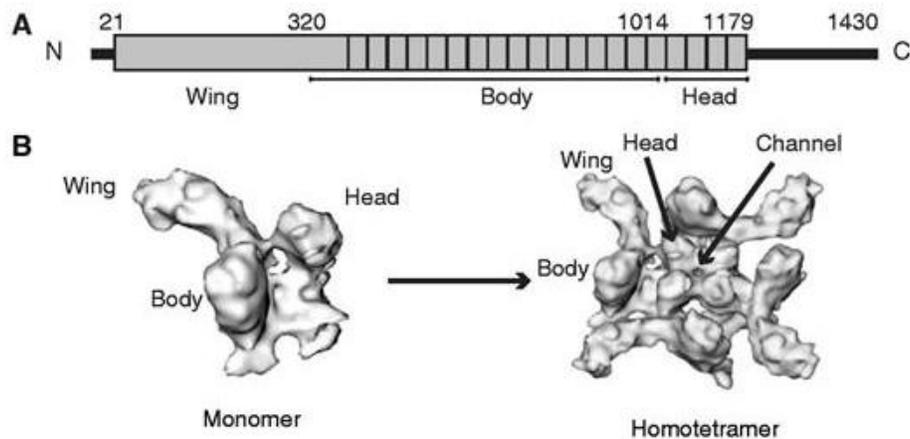


Fig. 5. Estructura de la α -latrotoxina. (A) Esquema de la estructura primaria de α -latrotoxina que indica los dominios funcionales, con números que indican la posición de los aminoácidos, recuadros mostrando la posición de 22 repeticiones tipo anquirina, y líneas negras que indican extremos amino (N) - y carboxilo (C) -terminal que se escinden postraduccionalmente para producir la proteína madura (B) (Izquierda) Estructura tridimensional de α -latrotoxina y homotetrámero (a la derecha) que indica la posición de los dominios proteicos determinado a partir de microscopía cryo-EM (modificado de Ushkaryov et al., 2004) (Garb & Hayashi, 2013).

Los monómeros se ensamblan en dímeros asimétricos en los que las alas quedan perpendiculares; los dímeros se unen para formar tetrámeros cuya longitud estimada es alrededor de 19 Å. El tetrámero es hidrofóbico y los monómeros que lo forman rodean un canal que atraviesa la membrana, por lo que los cationes divalentes y neurotransmisores que pueden difundir libremente, como catecolaminas, glutamato, péptidos, acetilcolina, norepinefrina y GABA (Fig. 6).

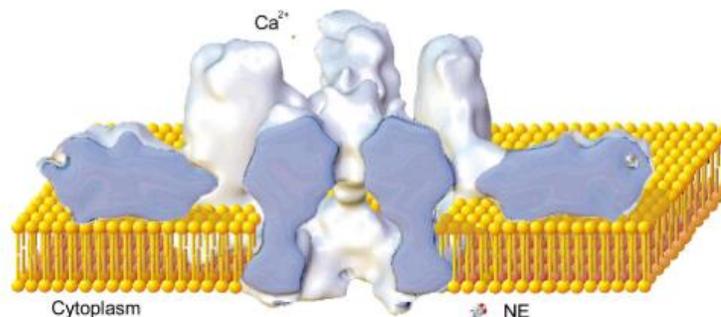


Fig. 6. Modelo del tetrámero de la α -latrotoxina en la bicapa lipídica. El poro está completamente insertado en la membrana y los brazos extendidos se encuentran sobre la superficie extracelular. Un ion de calcio y el neurotransmisor norepinefrina (NE) son mostrados a escala (Saibil, 2000).

I.6.1 Dominio amino terminal

Un segmento del dominio amino terminal está completamente expuesto en la membrana, donde puede ser susceptible a la degradación por proteasas, mientras que los otros dominios están inmersos en la membrana (Ushkaryov, 2002). Contiene aproximadamente 431 residuos y dos secuencias hidrofóbicas de 20-26 aminoácidos.

La α -Latrotoxina tiene tres cisteínas en la región N-terminal que están conservadas en todas las latrotoxinas (Dulubova *et al.*, 1996). La sustitución de alguna de las tres cisteínas conservadas de este dominio elimina la toxicidad de la proteína, lo cual sugiere la importancia de los puentes disulfuro en el dominio amino terminal (Ichtchenko *et al.*, 1998).

I.6.2 Dominio de anquirinas

El análisis de la secuencia de aminoácidos reveló la presencia de 22 repeticiones imperfectas en las posiciones 439-1180 que pueden facilitar las interacciones toxina-membrana. Estas repeticiones son altamente homólogas entre las diferentes latrotoxinas, aunque el número de repeticiones puede variar. Las repeticiones de anquirina son un motivo de secuencia que se encuentra en proteínas, con diversas funciones que incluyen la iniciación de la transcripción, la regulación del ciclo celular, la integridad del citoesqueleto, el transporte de iones y la señalización de células. (Graudins *et al.*, 2012).

I.6.3 Dominio carboxilo terminal

Este dominio no es de gran relevancia para la toxicidad del veneno, es el sitio menos conservado ya que durante la maduración de la proteína es procesado.

I.7 Antivenenos

Desde sus inicios, los antivenenos eran sueros crudos que contenían una gran cantidad de sustancias antigénicas, que son responsables de un gran número de reacciones secundarias que en ocasiones llegaban a causar la muerte del paciente por choque alérgico. Estos sueros eran llamados de primera generación (Zabala *et al.*, 2004).

Los sueros de segunda generación fueron obtenidos por la purificación de las inmunoglobulinas, estos originaban menos reacciones adversas y se conservaban altas concentraciones de Inmunoglobulinas G (IgG).

Actualmente existen los antivenenos de tercera generación o faboterápicos. Estos utilizan solamente las fracciones F(ab')₂ que reconocen los determinantes antigénicos, por lo que poseen una alta especificidad neutralizante y no provocan reacciones secundarias.

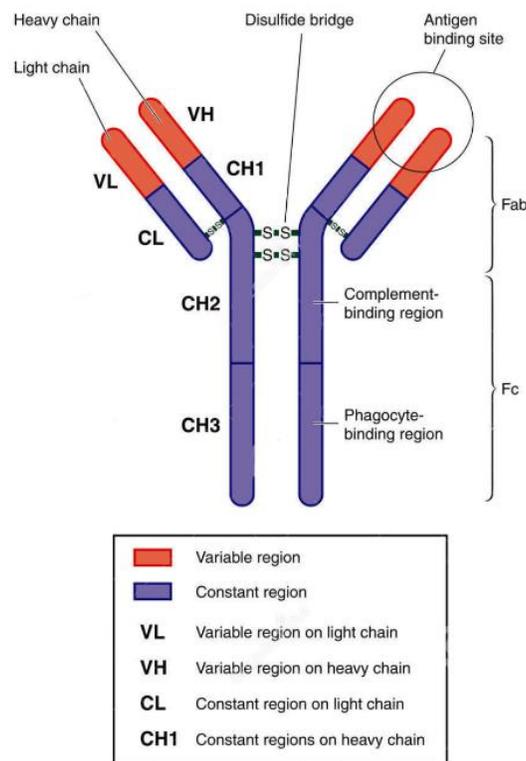


Fig. 7. Modelo de una inmunoglobulina IgG donde se muestran las regiones Fab. Modificado de Dreamstime.

I.7.1 Antiveneno específico Aracmyn F(ab')₂

El tratamiento más efectivo para la mordedura de viuda negra es el antiveneno Aracmyn. Fue creado en México desde el año 1999 en el Instituto Bioclon en colaboración con el Instituto de Biotecnología de la UNAM, el cual se compone de fragmentos F(ab')₂ de inmunoglobulinas policlonales de caballos inmunizados con el veneno de *Latrodectus mactans*. Este antiveneno impide que el sitio activo del veneno interactúe con su receptor y, por lo tanto, evita que se desencadenen los mecanismos fisiopatológicos de la intoxicación, por lo que se requieren anticuerpos que tengan mayor afinidad por el veneno completo.

II Antecedentes

La mayor parte de los estudios sobre el veneno de *Latrodectus* fueron realizados por el grupo de E. Grishin en Moscú, en el Instituto de Química Bioorgánica (Academia Rusa de Ciencias), estudiando tanto el veneno como las toxinas que lo componen, particularmente diversas latrotoxinas y fueron quienes realizaron los primeros estudios estructurales de la proteína utilizando la especie *L. tredecimguttatus*. Así mismo lograron clonar y secuenciar el gen que corresponde a la α -latrotoxina (Kiyatkin *et al.*, 1993).

Este grupo logró expresar α -LTX recombinante activa mediante el sistema de células insecto-baculovirus, y demostró que la proteína recombinante posee propiedades biológicas semejantes a la toxina nativa, como la liberación de neurotransmisores, letalidad en ratones y la unión específica a neurexina y latrofilina. Tras varios años lograron expresar la proteína madura (el dominio amino terminal y el dominio de anquirinas).

En el laboratorio del Dr. Roberto Stock, del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Prud'Homme en el 2001 clonó y secuenció el gen de la proteína madura α -latrotoxina de *Latrodectus mactans* y demostró que la secuencia reportada para *L. tredecimguttatus* y

Latrodectus mactans tienen una homología a nivel de nucleótidos del 95.3% para el fragmento amino terminal completo (1374 pb) y a nivel de aminoácidos una identidad del 93.2%.

En el laboratorio del Dr. Stock, lograron expresar diversos fragmentos de la proteína en *E. coli*, todos se obtuvieron de manera insoluble encontrándose cuerpos de inclusión (Prud'Homme, 2004). En estudio *in vivo*, estas proteínas fueron efectivas como inmunógenos, sin embargo, la cantidad de proteína soluble era muy limitada y la mayor parte se encontraba como cuerpos de inclusión. De los estudios de protección, el dominio amino terminal de la proteína recombinante fue capaz de generar anticuerpos neutralizantes contra el extracto de glándulas venenosas de *Latrodectus mactans*.

Por otro lado, Graudins y colaboradores en el 2012 de la escuela Medical & Molecular Biosciences, en la Universidad de Tecnología, Sydney, Australia, utilizaron el anticuerpo monoclonal 4C4.1 y realizaron pruebas de neutralización en diferentes venenos de arañas *Latrodectus*. Hicieron pruebas electrofisiológicas, estimulando el músculo del cuello en pollos y se observó que el anticuerpo 4C4.1 bloquea la liberación de neurotransmisores al evitar la tetramerización de la α -LTX de *L. tredecimguttatus* al inhibir la tensión y contractura del músculo. El epítipo que reconoce el anticuerpo monoclonal 4C4.1 está situado en una región de bisagra entre los aminoácidos (1007-1013).

En estudios de Western Blot, demostraron que el anticuerpo monoclonal no reconoce la α -LTX de otras especies del mismo género *Latrodectus* (*L. hasselti*, *L. mactans*, *L. hesperus*, *L. lugubris*). Esto indica que el epítipo no está presente, o muestra diferencias en las moléculas de α -LTX encontradas en otros venenos de *Latrodectus*.

En el dominio de tipo anquirinas se encuentra la región que se une al epítipo 4C4.1 que neutraliza el efecto de *L. tredecimguttatus*, por lo que podría ser importante también la unión contra el veneno de *L. mactans*.

III Justificación

Se cuenta con la secuencia que codifica para la proteína madura alfa latrotoxina (α -LTX) de *Latrodectus mactans* (viuda negra), se expresó, pero la mayor parte se obtuvo como cuerpos de inclusión. Se propone generar proteína recombinante de manera soluble para usarlo como inmunógeno y producir anticuerpos policlonales capaces de neutralizar el veneno.

Por otra parte, el anticuerpo monoclonal 4C4.1 obtenido de *L. tredecimgutatus*, se probó en diferentes venenos de arañas del género *Latrodectus* y únicamente neutraliza el veneno de la especie contra el que fue hecho. Debido a diferencias en las moléculas, no logra unirse al veneno de diferentes *Latrodectus*, siendo así, se obtendrá el fragmento donde se encuentra el anticuerpo monoclonal 4C4.1 situado en la región de tipo anquirinas en *L. mactans* para generar anticuerpos policlonales y probarlo contra el veneno completo para neutralizarlo.

IV Hipótesis

Se generará proteína recombinante soluble a partir de cuerpos de inclusión, que servirá como inmunógeno para generar anticuerpos neutralizantes contra la α -LTX de *L. mactans*.

V Objetivos

Objetivo General

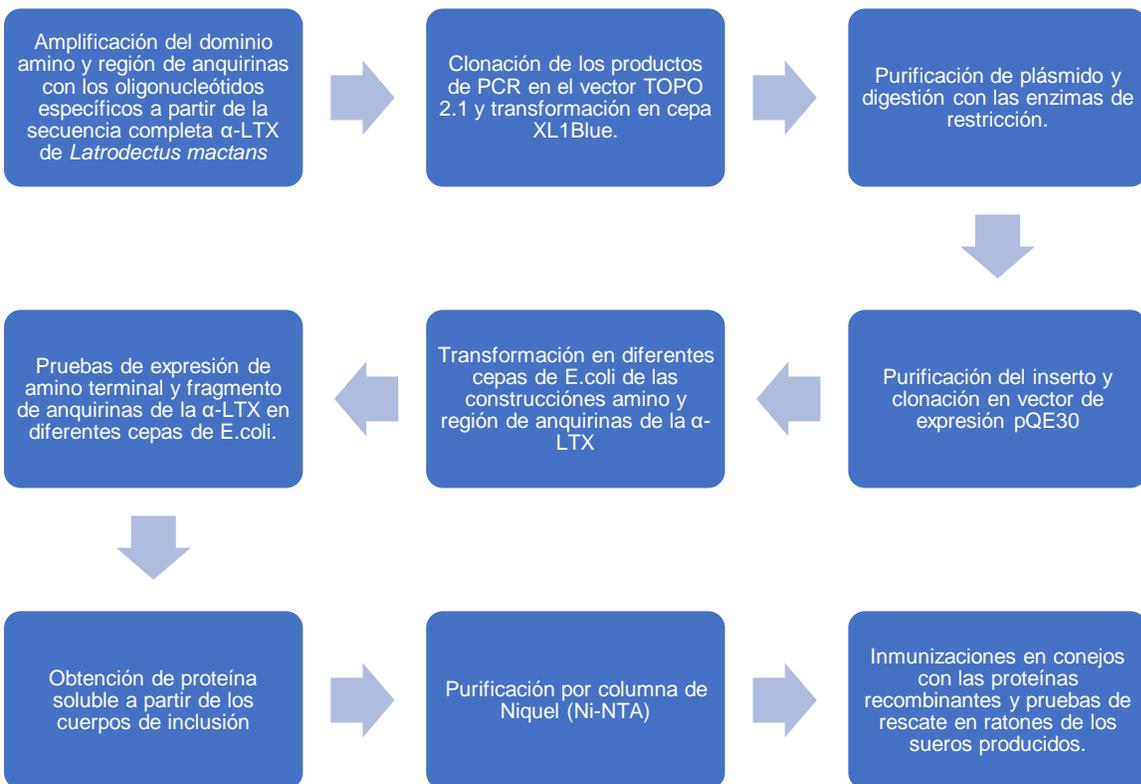
Expresar la región amino de la α -latrotoxina y un fragmento del dominio de anquirinas de manera soluble para utilizarla como antígeno en la producción de anticuerpos específicos anti α -LTX.

V.I Objetivos particulares

- Clonar el fragmento que corresponden a la parte amino terminal y parte de la región de anquirinas de la α -LTX de *Latrodectus mactans*.

- Realizar dos construcciones en pQE30 con el gen que codifica para el dominio amino terminal y otra para la región de anquirinas y expresarlo en diferentes cepas de *E. coli*.
- Determinar condiciones de expresión para ver mejoras en el rendimiento de proteína y obtenerlas solubles a partir de cuerpos de inclusión.
- Generar anticuerpos policlonales utilizando las proteínas recombinantes obtenidas amino terminal y parte de anquirinas contra la α -latrotoxina en conejos Nueva Zelanda hiperinmunizados.
- Evaluar neutralización en ratones con los sueros producidos en conejos hiperinmunizados contra el veneno de *L. mactans*.

VI Estrategia Experimental



VII Materiales y Metodología

7.1 Diseño de oligonucleótidos específicos

A partir de la secuencia reportada para *L. mactans* por Prud'Homme (2014), se diseñaron oligonucleótidos específicos para clonar el gen que codifique para la región amino terminal que comprende de los aminoácidos 1 al 437 (1311 pb) de la proteína madura y para la región que abarca el dominio tipo anquirinas que comprende del aminoácido 940 al 1049 (327 pb) reportado por Graudins (2012).

Para el extremo 5' del fragmento amino terminal se utilizó la secuencia que codifica para el sitio de restricción BamHI y un oligo reverso con la secuencia codificante para la enzima de restricción Sall, además de un codón de paro en el extremo 3'. Para el extremo 5' del fragmento de anquirinas 4C4.1 con la secuencia codificante para la enzima de restricción BamHI y un oligo reverso con la secuencia codificante para la enzima de restricción HindIII, además de un codón de paro para el extremo 3' como se muestra en la Tabla 1.

Posteriormente se enviaron a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Oligonucleótidos específicos para el dominio Amino Terminal (rLTxNT) y el fragmento de anquirinas (rLTxAnk)		Sitio de restricción	Codón de paro	Tm
rLTxNT Fw	5' GGA TCC GAA GGA GAA GAA TTA ACT TTA G 3'	BamHI		58°C
rLTxNT Rv	5' GTC GAC TTA ATC TCT ATC GAT GTC AAT GAA ATT TG 3'	Sall	TTA	
rLTxAnk Fw	5' GGA TCC GAT AAT AAT AGA AGG GAT GAA TG 3'	BamHI		60°C
rLTxAnk Rv	5' AAG CTT TTA ACC ATT ATC ACA ATC ATG ATT AAC 3'	HindIII	TTA	

Tabla 1. Diseño de oligonucleótidos iniciadores y reversos para rLTxNT y rLTxAnk. En rojo se muestra el sitio de restricción y en verde la secuencia que codifica para el codón de paro.

7.1.1 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para los fragmentos amino terminal y parte de anquirinas de la α - Latrotoxina

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos (Tamay de Dios *et al.*,2013). Se compone de tres etapas: desnaturalización; en esta etapa las cadenas de ADN son separadas a una temperatura de 94°C durante 1 minuto (el tiempo depende de la secuencia del templado), hibridación; los oligonucleótidos iniciadores se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria, esta temperatura depende del diseño de los oligonucleótidos que oscila entre 50 y 65 °C, extensión; en esta etapa la taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-oligonucleótidos iniciadores y empieza su función agregando dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN, la temperatura óptima para la reacción es de 72°C.

Se realizó un PCR para amplificar los fragmentos de la α -latrotoxina y se utilizó como templado la α -latrotoxina (rLTx 9) que se tenía dentro del plásmido pQE30 construido por el laboratorio del Dr. Roberto Stock que contiene el gen que codifica para la α -LTX madura. Para una reacción de 50 μ L se colocaron 5 μ L de Buffer para PCR 10X, 4 μ L de dNTP's (2.5mM), 1 μ L de oligonucleótido iniciador (20 pmol/ μ L) 1 μ L de oligonucleótido reverso (20 pmol/ μ L), 37.5 μ L de agua tetradestilada 1 μ L de la muestra rLTx 9 y 0.5 μ L de Taq polimerasa, este mismo volumen se utilizó para ambos fragmentos. El proceso se repitió 25-30 ciclos constantes en el termociclador.

Dominio Amino Terminal		Fragmento de Anquirinas	
Temperatura °C	Tiempo (minutos)	Temperatura °C	Tiempo (minutos)
94	3	94	3
94	1	94	1
58	1	62	1
72	1	72	1
72	10	72	10
4	∞	4	∞

Tabla 2. Condiciones para la realización de PCR

7.1.2 Electroforesis de ADN en gel de Agarosa

Los productos de PCR se analizaron en gel de Agarosa 1% con amortiguador TAE 1X (40mM de Tris-HCl, 20 mM ácido acético glacial, 1 mM EDTA pH 8.0 Y 1µg/mL de bromuro de etidio) en la cámara de electroforesis Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad). Las muestras se prepararon utilizando 9 µL de producto de PCR de cada fragmento (terminal y dominio de anquirinas) más 1 µL de buffer de carga para ácidos nucleicos (0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilencianol, 0.25% ficoll 40). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100V.

7.1.3 Purificación de fragmentos de ADN obtenidos por PCR

La purificación de los fragmentos se hizo mediante un kit comercial High Pure PCR Product Purification de Roche™. De acuerdo con el peso esperado de cada fragmento: el dominio amino terminal (1.3 k.b) y el fragmento del dominio de anquirinas (0.3 kb). Los insertos fueron analizados nuevamente en un gel de agarosa 1% para observar el grado de pureza.

7.2 Clonación en el vector TOPO 2.1

Este vector contiene en ambos extremos de una timidina sobresaliente unida con uniones covalentes a la enzima topoisomerasa I, que, además de mantener el vector linearizado, ayuda al producto de PCR que se pueda ligar fácilmente. El amplicón (producto de PCR) contiene una adenina sobresaliente en el extremo 3' cuando se utiliza la Taq polimerasa en el proceso de la PCR (Fig. 7).

Una vez purificados los fragmentos el dominio amino terminal y el fragmento del dominio de anquirinas, se llevó a cabo una reacción de clonación donde se agregó 2 µL de cada inserto purificado, 2 µL de agua, 1 µL de solución salina y 1 µL del vector de clonación pCR2.1-TOPO de Invitrogen®, la mezcla se incubó 30 minutos a temperatura ambiente quedando lista para su transformación.

PCR de colonia + 9 μL de reacción para PCR (Buffer 10X, dNTP's, oligonucleótidos iniciadores, oligonucleótidos reversos, Taq polimerasa y agua tetradestilada para aforar a 10 μL) en las mismas condiciones anteriores para el dominio amino terminal y el fragmento del dominio de anquirinas.

Los productos se cargaron en un gel de agarosa 1% y se eligieron aquellas que daban el peso esperado para el dominio amino terminal y el fragmento del dominio de anquirinas.

Los 9 μL restantes de las mezclas, se utilizaron como inóculo y se incubaron en 3 mL de medio LB con ampicilina 1 mM a 37°C con agitación constante durante 12 horas.

7.3.1 Purificación de plásmido y análisis con enzimas de restricción

Se purificaron los plásmidos siguiendo las especificaciones del fabricante. Este procedimiento se basa en una lisis alcalina para liberar el plásmido; el ADN cromosómico queda atrapado en la pared celular quedando en la parte precipitada que es descartada. El ADN plasmídico permanece en el sobrenadante y posteriormente pasa al tubo de centrifugado para purificarlo mediante una resina de carga positiva.

Para analizar si los fragmentos el dominio amino terminal y el fragmento del dominio de anquirinas han sido incorporado al plásmido, se realizó un análisis de restricción. Para el dominio amino terminal, se tomaron 8 μL de plásmido, 1 μL de buffer B (buffer sugerido para una digestión óptima) 0.5 μL de enzima BamHI y 0.5 μL de enzima Sall y se incubó a 37°C durante 1 hora. Se utilizaron las mismas condiciones para el fragmento del dominio de anquirinas, pero con las enzimas BamHI y HindIII. Se observaron los resultados en un gel de agarosa 1%.

7.3.2 Análisis de secuencias

Los productos purificados se enviaron a la Unidad de Síntesis y Secuenciación (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM para analizar las secuencias nucleotídicas. Se utilizaron los oligonucleótidos comerciales m13 pUC -40 FORWARD (5´ GTT TTC CCA GTC ACG TTG TA 3´) y m13 pUC REVERSE (5´ TTG TGA GCG GAT AAC AAT TTC 3´). Los resultados se analizaron en el programa Gene Construction kit™, para observar la secuencia correcta y la visualización de los sitios de restricción añadidos.

7.3.3 Purificación de plásmido que contienen los genes que codifican para el dominio amino terminal y el fragmento del dominio de anquirinas de *L. mactans*

Se hizo la purificación de los plásmidos a mayor escala, utilizando el kit comercial Plasmid Midiprep (BioRad®) siguiendo las especificaciones del proveedor. Posteriormente se realizó un análisis de restricción. Ya que las enzimas de restricción utilizadas tienen una digestión del 100% con diferente buffer, se agregaron por separado. Para el dominio amino terminal se utilizaron las enzimas de restricción BamHI y Sall. Para BamHI se utilizó el buffer B y para Sall se utilizó el buffer H, para el fragmento del dominio de anquirinas se utilizaron las enzimas de restricción BamHI y HindIII, las dos cortan al 100% con el buffer B. Para el dominio amino terminal se agregaron 80 µL de plásmido, 3 µL de enzima BamHI, 10 µL de Buffer B y 7 µL de agua tetradestilada, se incubó durante 1 hora y se purificó el producto con el kit High Pure PCR Product Purification, posteriormente se realizó el mismo procedimiento ahora con la enzima Sall y el buffer H. El producto digerido se cargó en un gel de Agarosa 1%, las bandas de 1.3 kb fueron cortadas y purificadas. Para el fragmento del dominio de anquirinas se utilizó 80 µL de plásmido, 3 µL de enzima BamHI, 3 µL de enzima HindIII, 10 µL de Buffer B y 4 µL de agua tetradestilada, se incubó durante una hora, las bandas liberadas de aproximadamente 0.3 kb fueron purificadas.

7.4 Ligación en el vector pQE30

El vector de expresión empleado fue pQE30 de QIAGEN se caracteriza por proporcionar un sistema completo para la expresión, purificación, detección y ensayo de proteínas además de ser etiquetadas con 6xHis en el extremo amino-terminal, dos secuencias del operador lac que aumentan el represor vinculante y asegurar la represión, contienen un elemento promotor fago T5 reconocido por la ARN polimerasa de la *E.coli*, sitio de unión ribosómica, un sitio múltiple de clonación, codones de paro e inicio para la traducción, un gen represor lacI, y un gen de resistencia a ampicilina.

Se realizó el mismo procedimiento de digestión para el vector de expresión pQE30. Para el dominio amino terminal con BamHI/Sall y para el fragmento del dominio de anquirinas BamHI/HindIII y se desfosforilaron con fosfatasa alcalina para evitar que se ligen entre ellos.

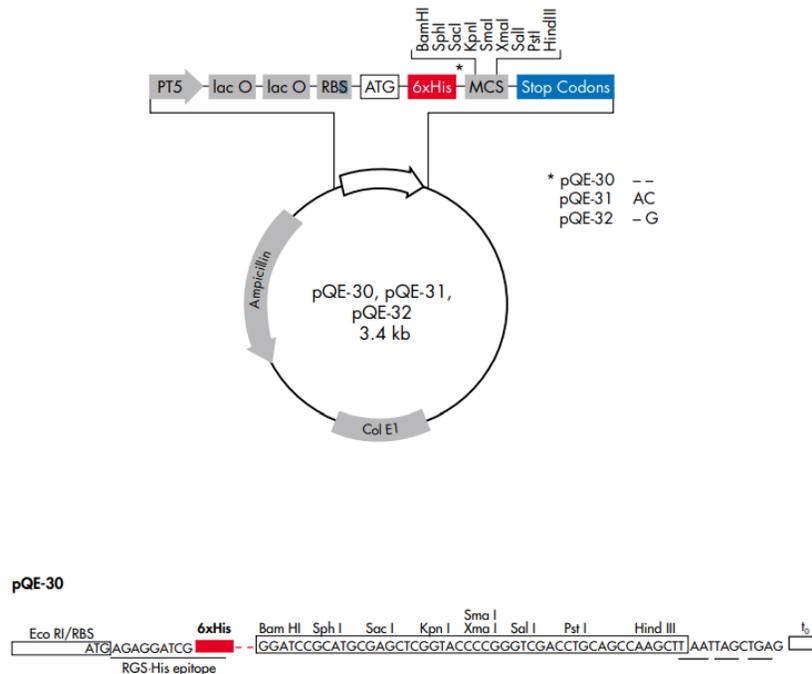


Fig. 9. Mapa del vector pQE30. PT5=Promotor T5. Lac O= operador lac. RBS= sitio sintético de unión a ribosomas. ATG= Condón de inicio. 6xHis= Etiqueta de histidinas. MCS= Sitio múltiple de clonación con sitios de restricción. Stop codons= Codones de paro. Col E1= Origen de replicación. Ampicilin= Gen de resistencia a ampicilina.

Para la ligación se utilizó el vector desfosforilado y los insertos amino terminal y parte del dominio anquirinas con una relación molar 1:12 (plásmido: inserto). Se agregaron 4 μ L del vector pQE30 previamente cortado para cada inserto, 13 μ L de cada inserto el dominio amino terminal y el fragmento del dominio de anquirinas, 2 μ L de buffer para T4 ligasa 10X y 1 μ L de la enzima ligasa T4 que cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre un grupo 5'-fosforilo y un grupo 3'-hidroxilo. Se requiere ATP para la reacción de ligación, la mezcla se incubó a 16°C durante 20 horas.

Una vez clonados los insertos en el vector se transformaron en la cepa XL1Blue, se hizo un PCR de colonia para observar las construcciones y así purificar los plásmidos y transformarlos en las cepas: Origami y Shuffle las cuales son recomendadas para la obtención de proteína soluble. Para verificar que el inserto estuviera en el plásmido se hizo un PCR de colonia como ya se describió anteriormente, se utilizaron los oligonucleótidos específicos para cada fragmento (Dominio amino terminal= BamHI y Sall, iniciador y reverso. Para el fragmento de anquirinas se utilizó BamHI y HindIII, iniciador y reverso), como templado la latrotoxina, Taq polimerasa y agua tetradestilada. Las colonias positivas se seleccionaron y posteriormente se pusieron a crecer en tubos de 3 mL para su expresión.

7.4.1 Expresión del dominio amino terminal y el fragmento del dominio de anquirinas en diferentes cepas de *E.coli*, purificación y secuenciación.

Se tomaron colonias independientes al azar de Origami y Shuffle para cada una de las construcciones y se crecieron en tubos de 3 mL con Ampicilina (1mM) con agitación constante a 37°C 10 horas. Posteriormente se agregó 1 mM de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) a 37°C toda la noche con agitación constante.

Se tomó 1 mL de las bacterias y se centrifugaron a 13,400 rpm durante 1 minuto, desechando el sobrenadante y al pellet se les agregó 100 μ L de agua tetradestilada, se tomaron 20 μ L de cada una de las mezclas y agregamos 20 μ L de buffer de carga (2X) para correr en un gel SDS-PAGE al 12.5% para el dominio amino terminal y 15% para el fragmento del dominio de anquirinas y observar expresión de la proteína recombinante.

7.4.2 Electroforesis del dominio amino terminal y el fragmento del dominio anquirinas.

Se corrió en un gel SDS-PAGE, basado en la separación de las proteínas respecto a su tamaño y a la adquisición de cargas negativas, bajo la influencia de un campo eléctrico descrito por Laemmli.

Se utilizó una cámara vertical para electroforesis BIO-RAD® modelo Mini PROTEAN® III Cell. Las muestras fueron preparadas en condiciones reductoras con buffer para proteínas y se colocan durante 5 minutos en agua hirviendo para su desnaturalización. Se corre con un voltaje inicial de 80 V, hasta que los marcadores de peso molecular queden separados, inmediatamente se sube el voltaje a 120 aproximadamente 90 minutos. Una vez concluida la electroforesis, se procede a teñir los geles con la solución de tinción (25% Isopropanol + 10% de + Ácido Acético + 0.2% Azul brillante de Coomasie G-250) durante 15 minutos, y se destiñeron con solución de destinción (10% metanol y 10% ácido acético).

Las clonas positivas se mandaron a mandó a secuenciar en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM para analizar las secuencias nucleotídicas. Se utilizaron los oligonucleótidos FORWARD (5´ GAG CGG ATA ACA ATT ATA A3´) y REVERSE (5´ GGT CAT TAC TGG ATC TAT 3´) para pQE. Los resultados se analizaron en el programa Gene Construction kit™, para verificar la secuencia correcta.

7.4.2 Análisis por Western Blot

Esta técnica se utiliza para identificar proteínas o partes de estas mediante el uso de anticuerpo específicos que reconocen la proteína de interés o algún marcador que se le agrega en el caso de las proteínas recombinantes.

La electroforesis de los geles de poliacrilamida se realizará al 12.5% y 15% bajo condiciones reductoras y se desarrollarán de acuerdo al apartado 7.4.2. Se utilizarán 3 µg de cada una de las 3 muestras y buffer de corrida 2X.

Después de correr el gel SDS-PAGE al 12.5% y 15%, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (0.45 µm HATF, Milipore®), en una cámara semi-húmeda HEP-1 owl®, con amortiguador de transferencia (39 mM glicina, 48 mM Tris-base, 0.037% SDS y 20% metanol) a corriente constante de 400 mA/1 hora. Terminada la transferencia se bloquearon las membranas con una solución de leche (Svelty, Nestlé®) al 5% en amortiguador TBST (5 mL Tris HCl pH 7.5 1M, 15 mL NaCl 5 M, 250 µL Tween 20) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación constante. Se hicieron tres lavados de 10 min cada uno con buffer TBST 1X. Se incubó a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-histidinas acoplado a fosfatasa alcalina de Roche™ en una proporción (1:5000) por una hora, terminada la incubación se repite el lavado de la membrana con TBST 1X y para finalizar se añadió en agitación constante la solución de revelado BCIP/NBT 10X de Invitrogen.

7.5 Condiciones de cultivo.

Se realizó un pre-cultivo de 50 mL en medio LB + ampicilina 1M de las cepas seleccionadas y se incubó toda la noche a 37°C con agitación constante. Posteriormente se inoculó 10 mL de cada cultivo a un matraz con 500 mL de medio LB + ampicilina 1M, y se dejó creciendo a 37°C con agitación constante hasta tener una O.D. de 0.6 a 600 nm a los que se indujo con IPTG 0.1 mM y se incubó a 16°C durante 20 horas con agitación constante (200 rpm).

7.6 Obtención de las proteínas en Cuerpos de Inclusión

Para obtener los cuerpos de inclusión, los cultivos se centrifugaron a 13,000 rpm por 25 minutos a 4°C, el sobrenadante se desechó y los pellets se resuspendieron con 4 mL Bug Buster (buffer de lisis) + 4 µL de Benzonasa + 15 µL de lizosima a 3KU/ µL, se dejó incubando en agitación suave por 20 minutos y se centrifugaron 25 minutos a 13,000

rpm, se desechó el sobrenadante y se recuperaron los pellets que contienen los cuerpos de inclusión.

7.7 Solubilización de Cuerpos de Inclusión

Posteriormente se agregaron 4 mL de Bug Buster + 5 μ L de lisozima, se dejó agitación suave durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se hicieron 3 lavados con 30 mL de Bug Buster diluido 1:10 y entre cada lavado se centrifugó a 6,000 rpm por 15 minutos a 4°C rpm. A los pellets se les agregó Lauroylsarcosine (40mM de Tris/HCl con 2% de N-Lauroylsarcosine pH 8.0) en un total de 50 mL. y se incubaron a 16°C durante 24 horas en agitación suave. Posteriormente se centrifugaron a 13,000 rpm por 15 minutos a 4°C y el sobrenadante de cada tubo se dializó contra PBS 1X en una proporción 1:2 cambiándolo cada 8 horas durante 48 horas. Terminando la incubación se centrifugó a 11,000 rpm por 15 minutos a 4°C y se recuperaron las proteínas.

7.8 Purificación por afinidad en columna de Níquel (Ni-NTA)

La etiqueta de histidinas que proporciona el vector pQE30, facilita la purificación por afinidad a níquel, ya que las histidinas poseen una cadena lateral de imidazol que tiene afinidad a los metales como el níquel. Cuando las proteínas recombinantes están en el proceso de elución, es necesario agregar imidazol a cierta concentración, ya que compite con la etiqueta de histidinas, liberando la proteína de interés. Este método lo utilizaremos para purificar las proteínas recombinantes.

Se utilizaron 2 columnas, una para cada proteína (el dominio amino terminal y el fragmento del dominio de anquirinas) y se agregó 2 mL de resina de níquel nitriloacético (Qiagen) que tienen capacidad para 10 mL de 8 cm x 1.5 cm y se equilibraron con 40 mL de PBS 1X.

El sobrenadante obtenido fue transferido a las columnas donde se recirculó a flujo muy lento. El primer lavado se realizó con 40 mL de PBS 1X y el segundo con 40 mL de PBS

1X + 25 mM de Imidazol, esto para eliminar el pegado inespecífico de diferentes proteínas que no son de interés.

Para eluir las proteínas recombinantes se utilizó 10 mL de PBS 1X + 250 mM de Imidazol, se colectaron muestras de 1 mL en tubos eppendorf de 1.5 mL.

7.9 Electroforesis de proteínas recombinantes

Las muestras se corrieron en un gel SDS-PAGE al 12.5% y 15%, se juntaron en un pool aquellas que presentaban las bandas más nítidas, y se dializaron contra PBS 1X en una proporción 1:10 a 3°C con agitación constante, los cambios fueron cada 6 horas durante 24 horas. Se midió concentración mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 280 nm, asumiendo que 1 unidad de absorbancia equivale a 1 mg/mL de proteína recombinante.

7.10 Toxicidad de la proteína recombinante en la cepa CD1

Para evaluar la toxicidad de las proteínas recombinantes proveniente del veneno de la araña *Latrodectus mactans*, se inyectaron 2 grupos de 3 ratones por vía intravenosa (vena caudal) de la cepa CD1 con pesos entre 18-21 gramos y como control negativo se inyectó un ratón de cada grupo con PBS 1X.

7.11 Producción de anticuerpos policlonales de las proteínas recombinantes en conejos

Se obtuvieron anticuerpos policlonales en conejos Nueva Zelanda a partir de la inoculación vía subcutánea de los antígenos recombinantes durante 12 semanas siguiendo el esquema de inmunización (Tabla 3). Los conejos se inyectaron semanalmente en dosis crecientes partiendo con 30 µg hasta 3.8 mg. del dominio amino terminal, el fragmento de anquirinas y la alfa latrotoxina recombinante completa (rLtx L1.9.5) obtenido por Alejandro Olvera.

Las inmunizaciones se preparan en forma de emulsión de PBS 1X + los inmunógenos + dos tipos de adyuvantes intercalándolos entre cada inmunización. Los adyuvantes son estimulantes no específicos de la respuesta inmune. En las inmunizaciones se empleó el Adyuvante Incompleto de Freund (IFA) que es solo aceite mineral, e Hidróxido de Aluminio (ALUM) para aumentar su inmunogenicidad y eficacia.

Antes de comenzar con las inmunizaciones, se tomó muestra de sangre a los 3 conejos la cual se denomina como suero pre-inmune.

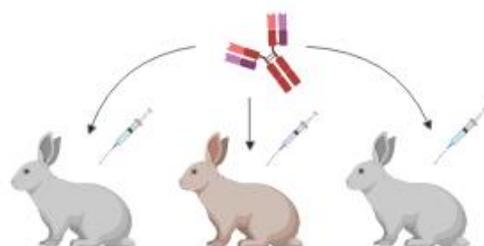


Fig. 10 Imagen representativa. Conejos a inmunizar

Día	No. De inmunización	Dosis por conejo (µg)	Adyuvante
0	1	30	IFA
7	2	60	ALUM
14	3	120	IFA
21	4	240	ALUM
35	5	480	IFA
42	6	960	ALUM
56	7	1920	IFA
63	8	3840	ALUM
70	9	3840	IFA
77	10	3840	ALUM
84	11	3840	IFA
91	12	3840	ALUM

Tabla 3. Esquema de inmunización con las proteínas recombinantes (dominio amino terminal y fragmento de aquirinas y la alfa latrotoxina completa) para los conejos 64, 65 y 66.

7.12 Reconocimiento de los anticuerpos producidos en conejos mediante ELISA

El Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) nos permite identificar los títulos que obtendremos de los anticuerpos y a determinar el nivel de producción generados en respuesta de las inmunizaciones. La técnica empleada para este análisis será ELISA indirecto que consiste en el uso de un anticuerpo secundario conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) unido a la proteína de interés o antígeno. Una vez que sucede esta reacción antígeno-anticuerpo se genera una reacción colorimétrica al agregar ABTS como sustrato. Posteriormente las placas se leen con un lector de placas de ELISA TECAN a 405 nm.

Sensibilización: Se inmovilizará la α -latrotoxina en las columnas 1 al 11 de placas de microtitulación de 96 pozos (Thermofisher Scientific®) adicionando 100 μ L/pozo de buffer de carbonatos (NaCO_3 100mM, pH 9.5) a una concentración de 5 μ g/mL por 2 horas a 37°C. Se hacen lavados 3 veces con 200 μ L de solución de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH 8/NaCl 150 mM/Tween 20 0.05%).

Bloqueo: Se agregarán 200 μ l de solución de bloqueo (Tris-HCl 50 Mm pH 8, gelatina 5mg/mL/Tween 20 0.02%) a todos los pozos de las placas y se incuban 2 hrs. a 37°C. Se hacen lavados 3 veces con solución de lavado.

Primer anticuerpo: A partir de una dilución 1:30 del suero de los conejos en diluyente (Tris-HCl 50mM pH 8/ NaCl 0.5 M/gelatina 1 mg/mL/ Tween 20 0.05%), se realizarán diluciones seriadas 1:3, hasta 10 diluciones directamente en la placa de microtitulación a un volumen final de 100 μ L. Se incuban durante 1 hr. a 37°C. Terminando la incubación, las placas se lavan nuevamente 3 veces.

Segundo anticuerpo: Se agregarán 100 μ L por pozo de una dilución 1:2000 utilizando el anticuerpo comercial anti-rabbit IgG (L+H) HRP incubando por 1 hr. a 37°C. Posteriormente se lavan 3 veces.

Revelado: Se dispersan 100 μ L/pozo de solución de revelado (1 ml ABTS 1X Roche/75 μ L ABTS 50 mg/mL/H₂O), se incuba por 10 minutos y se detiene la reacción añadiendo 30 μ L/pozo de SDS al 20%.

Una vez que la reacción de revelado llega a los 10 minutos, se leen las placas a 405 nm en el lector de placas TECAN y se procesan los datos obtenidos con el programa GraphPad Prism Versión 6.01.

7.13 Ensayos de neutralización de los sueros producidos en conejos

Antes de realizar los ensayos de neutralización se midió la potencia del veneno de *L. mactans* recién extraído, en un grupo de 5 ratones de la cepa CD1 (18 -20 gr Bioterio IBT/UNAM).

La DL₅₀ (dosis letal media) fue de 3 μ g / ratón (DL₅₀ se define como la dosis necesaria, para causar la muerte del 50 % de la población). La potencia neutralizante de los sueros, rLTxNT, rLTxAnk y rLTx en conejo se probaron contra 3 DL₅₀ del veneno de *L. mactans*). Los experimentos se realizaron incubando el suero y el veneno durante 30 min a 37 °C. Después del tiempo de incubación se inyectó vía intravenosa a un grupo de 5 ratones de la cepa CD1. También se realizaron ensayos de rescate, inyectando el suero 3 - 5 minutos después de la inoculación en cuanto se inició la sintomatología del envenenamiento.

VIII Resultados

8.1 Amplificación y clonación en el vector TOPO 2.1 del dominio amino terminal y fragmento del dominio de anquirinas

A partir de la secuencia de la α -latrotoxina (LTX 9) de la araña *Latrodectus mactans* en el vector de expresión pQE30 que contiene el gen que codifica para la α -LTX madura, se realizó la PCR para el dominio amino terminal (rLTxNT) y el dominio de anquirinas (rLTxAnk) utilizando los oligonucleótidos específicos (Tabla 1). El peso esperado para rLTxNT es de 1.3 kb y para rLTxAnk es de 0.3 kb. El producto amplificado se cargó en un gel de Agarosa 1%, la banda resultante se purificó (Fig.10).

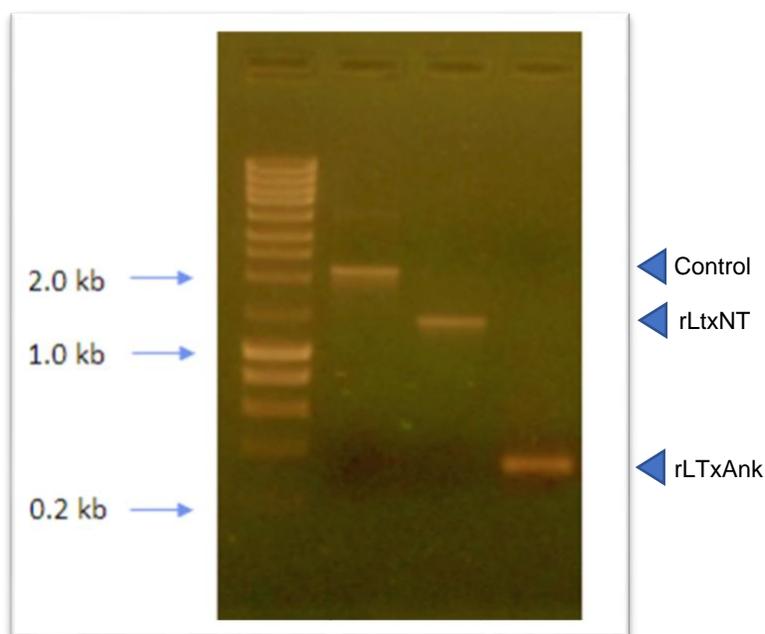


Fig. 10. Amplificación de los genes rLTxNT y rLTxAnk completos mediante PCR en gel de Agarosa 1%. Pb= Pares de bases. MPM= Marcador de peso molecular. rLTxNT= Dominio Amino Terminal. rLTxAnk= Fragmento del dominio de Anquirinas.

Los productos amplificados se clonaron en el vector pCRTPOPO 2.1 y se transformaron en las células *E. coli* XL1Blue quimio competentes. Se seleccionaron las clonas al azar y se realizó una PCR de colonia para analizarlas: rLTxNT (Fig.11) y rLTxAnk (Fig.12).

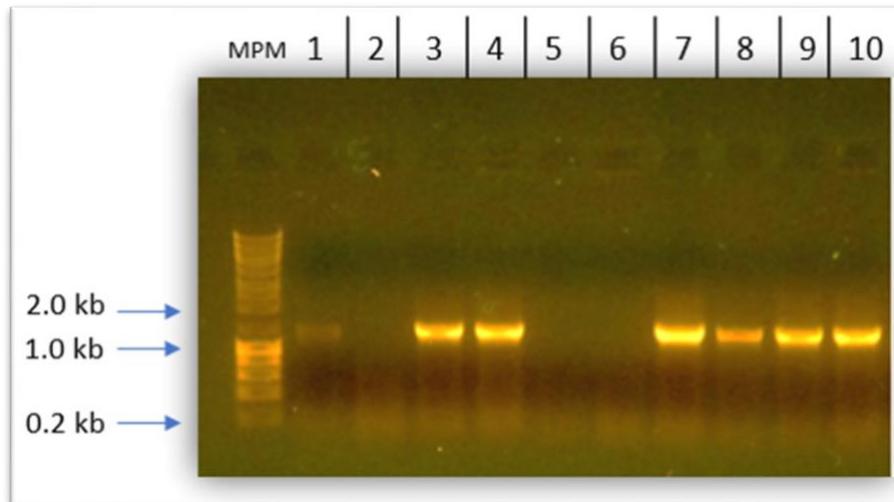


Fig. 11. Análisis del PCR de colonia de rLTxNT con un peso de 1.3 kb. Gel de Agarosa 1% MPM= Marcador de peso molecular. Los carriles del 1 al 10 contienen las clonas seleccionadas. Las clonas 1, 3, 4, 7, 8, 9 y 10 se seleccionaron como positivas con un peso aproximado de 1.3 kb.

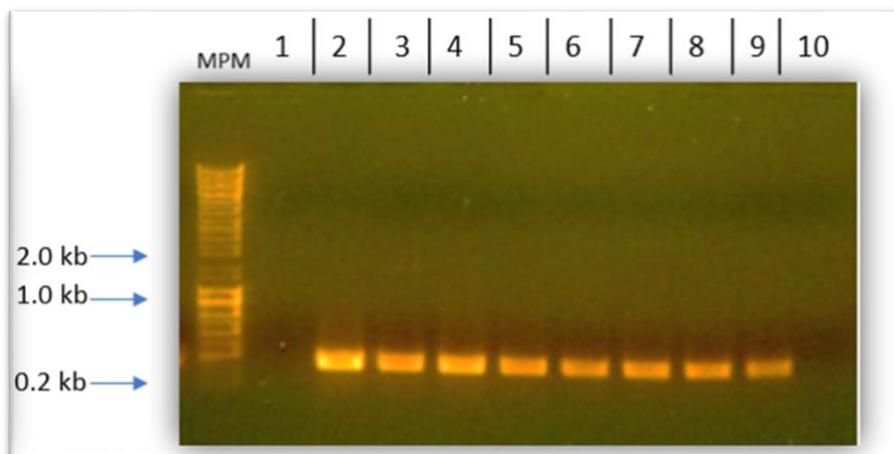


Fig. 12. PCR de colonia de rLTxAnk en gel de Agarosa con un peso de 0.3 kb. Colonias positivas. MPM= Marcador de peso molecular. Los carriles del 1 al 10 contienen las clonas seleccionadas. Las clonas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 se seleccionaron como clonas positivas con un peso aproximado de 0.3 kb.

De las 10 colonias seleccionadas 7 resultaron positivas para rLTxNT, y 8 clonas para rLTxAnk.

8.2 Purificación de plásmido y análisis con las enzimas de restricción

Se seleccionaron 6 clonas de rLTxNT y rLTxAnk. Posteriormente se purificaron los plásmidos y se realizó el ensayo con las enzimas de restricción correspondientes para cada gen. Se seleccionaron las clonas que liberaron los insertos del peso esperado, para rLTxNT 1.3 kb (Fig. 13) y para rLTxAnk 0.3 kb. (Fig.14).

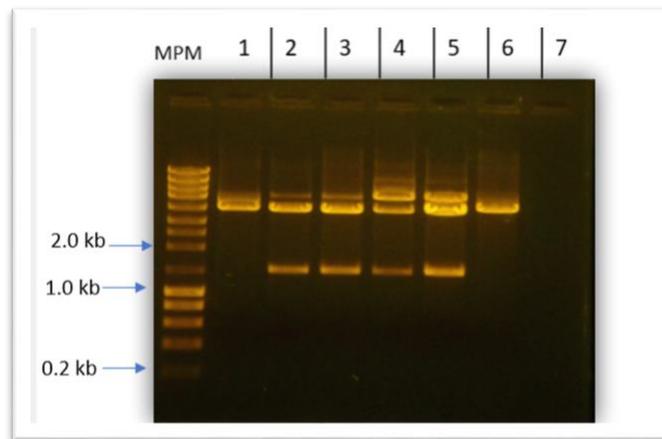


Fig. 13. Digestión con las enzimas de restricción para rLTxNT (BamHI y Sall). Carriles del 2 al 5 se muestran los plásmidos digeridos. Tamaño esperado 1.3 kb (bandas inferiores). También se puede observar las bandas superiores que corresponden al vector TOPO 2.1 linearizado (3.9 kb). Carril 1 y 6 resultaron negativos.

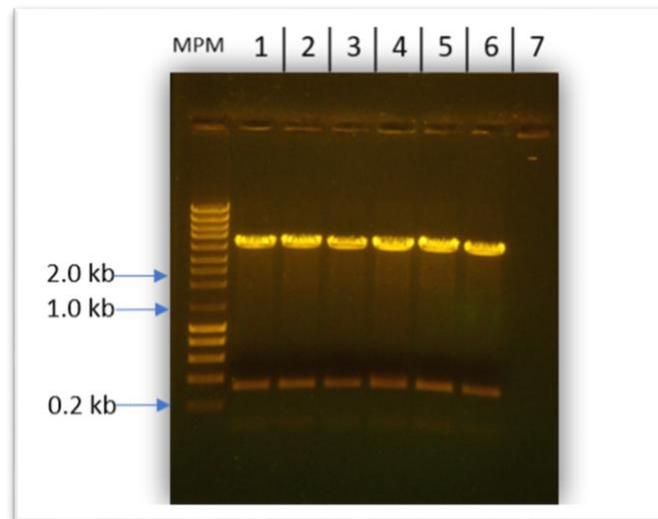


Fig. 14. Análisis con las enzimas de restricción de BamHI y HindIII para rLTxAnk. Gel de Agarosa 1% MPM. Carriles del 1 al 6 se muestran los plásmidos digeridos. Tamaño esperado 0.3 kb (bandas inferiores). De igual manera se observan las bandas superiores que corresponden al vector TOPO 2.1 (3.9 kb).

Para rLTxNT se seleccionaron las 4 clonas positivas y para rLTxAnk se seleccionaron las clonas 1,2,4 y 6 para mandarse a la unidad de secuenciación y corroborar la secuencia correcta. Se obtuvo la secuencia completa de la clona número 3 para rLTxNT (Fig.16) y para rLTxAnk la clona 4 (Fig.15).

```

BamHI
GGATCCGATAAATAGAGGGGATGATGCCCTAAGAGAGATGTGCATCTCTCATTTCGAGTTTGCAGTGCAGTTCATTTGATAAATAGAAATAGTAAACTTTGTTGGTACTTGAARATT
  D N N R R D E C P K E E C A I S H F A V C D A V Q F D K I E I V K Y F V G T L E N
TTAGCATTTGGTCCCTTGCATCAGGCAGCAGGTACGGTACCTTCACATAGTGAATATTTGGTCGAGAGAGATATCTCAGTGTGACGGAGCAGAACTGATACTCCATTGTTACGCTCTG
F S I C G P L H Q A A R Y G H L H I V K Y L V E E E Y L S V D G S K T D T P L C Y A S E
                                     HindIII
AATGGACATTTAGCGGTTGTTACACATCTAGTAAATGGGGCAAGTATATCATGATTGTGATATGGTTAAGCTT;
  N R H I A V V Q H I V S N R A K V N H D C D N R
  
```

Fig. 15. A) Secuencia del gen rLTxAnk en TOPO 2.1 flanqueado con los sitios de restricción agregados BamHI y HindIII.

```

BamHI
GGATCCGAGGAGAGGATTAACCTTTAGATGAAAAGCAGAAATATGCTCAGATTAGAACTCCACCAAAATATGTAGATATAGCTTCCATATTAT
  G S E G E E L T L D E K A E I C S E L E L Q Q K Y V D I A S N I I
TGCGCATCTTCTCTCTTCCATGGTTGGTAAATTTGATAGGACCATAGCTGCACGCCGATGACCGTTACCCATGTTGCTTCTGGGAGGTTAGATA
  G D L S S L P M V G K I V G T I A A A A M T V T H V A S G R L D
TCGAGCAGCGTGTGGTGGTGCAGTGACTTACCTTTTCGATCAGATTAGGAGTTCTGGAAAAGAGGTTCAACGAGTAGACCCGAGTTGGAAAGT
  I E Q T L L G C S D L P F D Q I K E V L E K R F N E V D R K L E S
CACAGTGCAGCTAGAGGAATCACTAACTGGTAGAGAGATATATCCGCGGTAGAAAACACGGAGCAGATGATAGAGGTTTGTAGAGT
  H S A A L E E I T K L V E R S I S A V E K T R K Q M N K R F D E V
CATGAAGTCTATTCAGGACGCAAAAGTTTCCCCATTGTTTCGAAAATAAATACCTTTGCAGATATTTTGATACTGAAAGGAAAGATCCGTGGTT
  M K S I Q D A K V S P I V S K I N N F A R Y F D T E K E R I R G
TAAGTTAATGATTATATTCTTAAGCTTGAGAGACCAATGGCATACTACTTTCATTTCAAGAGTGCAGAACTCCAAAGGATGATAGTTACAGCT
  L K L N D Y I L K L E E P N G I L L H F K E S R T P K D D S L Q A
CCTTTATTCAGTATTATTCAGAGGATATGCAGTACCAATCAATTTGATGACGATTAAGCTTTTAAAGTTCTCTATGCATTGCTGTATGGTACCCA
  P L F S I I Q E G Y A V P K S I D D E L A F K V L Y A L L Y G T Q
GACATATGCTCAGGTTATGTTTTTCTCCTAGAACATACTTTTCTCGCTAACCATTTACGAGAAAGGAGATTTAGAAAAGTATGATGATACT
  T Y V S V M F F L L E Q Y S F L A N H Y Y E K G D L E K Y D E Y
TTAATACTTAAATATGATTTTTAGATTTCAATCATCACTTGTGGGTACCGCACATCTAATAACGAGGGCTTATTGACAGAGTCTTCAAGTT
  F N N L N N V F L D F K S S L V G T G T S N N E G L I D R V L Q V
TTAATGACTGTTAAGATAGCGAGTTCTTAGGATTTGAAAACCGGTGTAGATGAATGCTGACGAGAAATAAATTTATTTAATAAATTAAGGA
  L M T V K N S E F L G I G K N G V D E M L N E K I N L F N K I K E
AGAAATCGAAGCAGCAGAGATGACAAATAGTGAGACACCAGAAATTTTGCAGAAATTTTCAATTTGACAAAGATATACAACTCCCATCGGAGATT
  E I E S K Q R M T I S E T P E N F A Q I S F D K D I T T P I G D
GGAGAGTGGTCCGGAGTACGTTACGCTGTACATATGCAGTGAACCTTATTTCTAAATCGGTCAATGGTCTGATCCCTTGAGTGTAGAGAG
  W R D G R E V R Y A V Q Y A S E T L F S K I G H W S D P L S V R E
AAGCATGCCCTACTCTCAGATGCCAGTTGACCAACCCGAGAAACGTACTGTTTTTCAGAAATTTGACACAGCAGCAACCCCACTGGTTGGCGA
  K A C P T L R M P V D Q T R R N V L V F R K F D N S K P Q L V G E
                                     Sall
AATCACACCATACCTATCAATTTTCATTGACATCGATAGAGATTAGTCCGAC;
  I T P Y L S N F I D I D R D • V D
  
```

Fig. 16. Secuencia del gen rLTxNT en TOPO 2.1 flanqueado con los sitios de restricción agregados BamHI y Sall.

8.3 Clonación en el vector de expresión pQE30 y transformación en cepas bacterianas Origami y Shuffle

Se hicieron las ligaciones de los insertos purificados de rLTxNT y rLTxAnk en el vector de expresión pQE30 previamente linearizado, con las mismas enzimas de restricción elegidas para cada uno de los insertos. Se transformaron en la cepa XL1Blue y se obtuvo la construcción rLTxAnk/pQE30, desafortunadamente la región amino terminal no la pudimos obtener. Se hicieron ligaciones posteriores de rLTxNT, variando la temperatura de incubación a 4 hrs. y a 30 minutos. Se transformaron en XL1Blue y en las cepas Origami y Shuffle directamente y no se obtuvo ninguna colonia.

Se volvió a ligar el inserto rLTxNT en el vector pQE30 en las mismas condiciones del apartado 7.4. En esta ocasión se transformó por electroporación en la cepa MC1061 de *Escherichia coli* obteniendo la construcción rLTxNT/pQE30. Se seleccionaron 22 clonas al azar y se realizó una PCR de colonia de 30 ciclos con una Tm de 58°C en un volumen un total de 10 µL (Fig. 17).

Ya que tenemos las bandas esperadas de la PCR de colonia en ambas construcciones, se purificó plásmido (Fig. 18).

Posteriormente se transformaron las construcciones rLTxNT/pQE30 y rLTxAnk/pQE30 en las cepas Origami y Shuffle quimio competentes mediante choque térmico. Para rLTxAnk/pQE30 se seleccionaron las clonas al azar de cada placa y se hizo un PCR de colonia para verificarlas (Fig. 19), se hizo lo mismo con rLTxNT/pQE30.

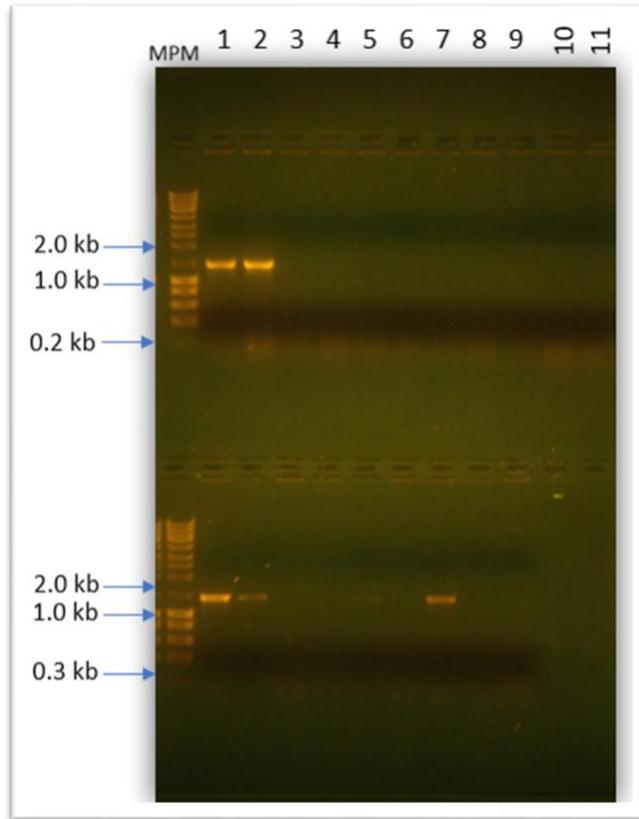


Fig. 17. PCR de colonia de rLTxNT producto de la transformación por electroporación, con un peso de 1.3 kb. Gel de Agarosa 1%. MPM= Marcador de peso molecular. Los carriles del 1 al 11 de la imagen superior e inferior, corresponden a la cepa MC1061, 6 clonas positivas totales (Carril 1 y 2 del gel superior y 1,2,5 y 7 del gel inferior).

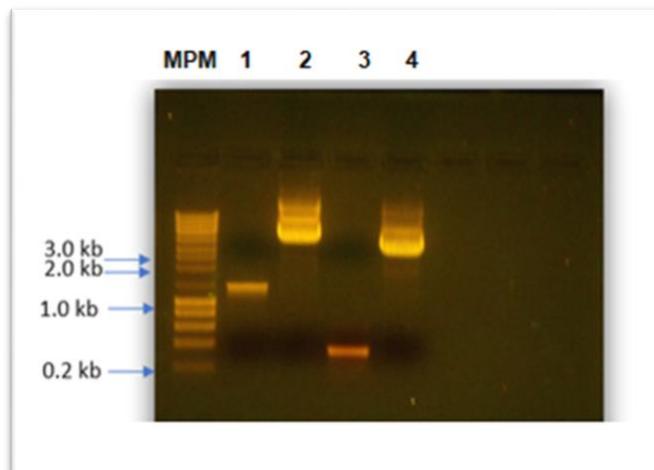


Fig. 18. Construcciones rLTxAnk y rLTxNT en el vector pQE30. Gel de Agarosa 1%. Inserto rLTxNT con un peso de 1.3 kb. MPM= Marcador de peso molecular. (Carril 1) Inserto rLTxNT con un peso 1.3 kb. (Carril 2) Construcción rLTxNT/pQE30 con un peso de 4.7 kb (Carril 3) Inserto rLTxAnk con un peso de 0.3 kb (Carril 4) Construcción rLTxAnk/pQE30 con un peso de 0.3 kb.

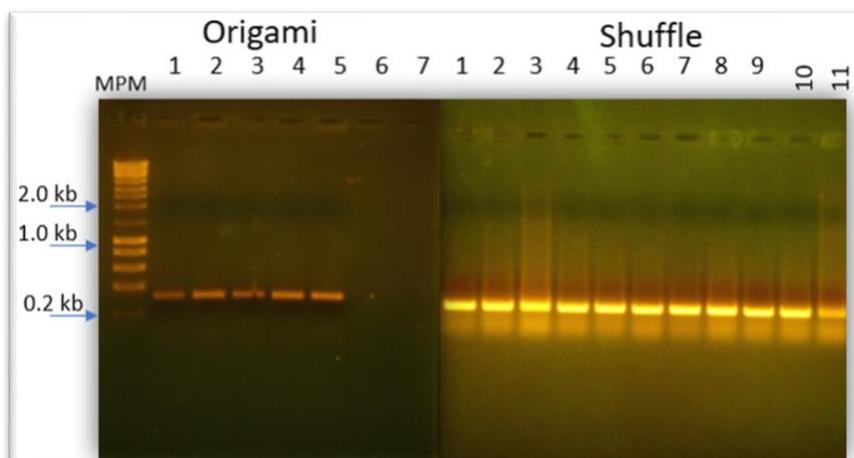


Fig. 19. Análisis del PCR de colonia de rLTxAnk en gel de Agarosa 1% con un peso de 0.3 kb. MPM= Marcador de peso molecular. Los carriles del 1 al 5 de la imagen izquierda, corresponden a la cepa Origami, las 5 clonas salieron positivas. Los carriles del 1 al 5 de la imagen derecha, corresponden a la cepa Shuffle, ambos contienen todas las clonas positivas.

8.4 Pruebas de expresión de las proteínas recombinantes rLTxNT y rLTxAnk en las cepas Origami y Shuffle

Se crecieron clonas positivas para rLTxNT/pQE30 y rLTxAnk/pQE30 en Origami y Shuffle en tubos de 3 mL de medio LB y Ampicilina (1mM) a 37° C con agitación constante durante 8 horas. Posteriormente se agregó 1 mM de inductor (IPTG) a 37°C toda la noche con agitación constante.

Se tomaron 1 mL de las bacterias y se centrifugaron a 13,400 rpm, desechando el sobrenadante y al pellet se les agregó 100 µL de agua tetradestilada. Las muestras se prepararon bajo condiciones reductoras, se utilizó Sample Buffer 2X (10% glicerol, 2.5% SDS, 50 mM Tris HCl, pH 6.8, 5% β-mercaptoetanol, 0.02% de azul de bromofenol) y se colocaron en agua hirviendo durante cinco minutos. Posteriormente se cargó en un gel SDS-PAGE al 12.5% las muestras para rLTxNT y al 15% para rLTxAnk.

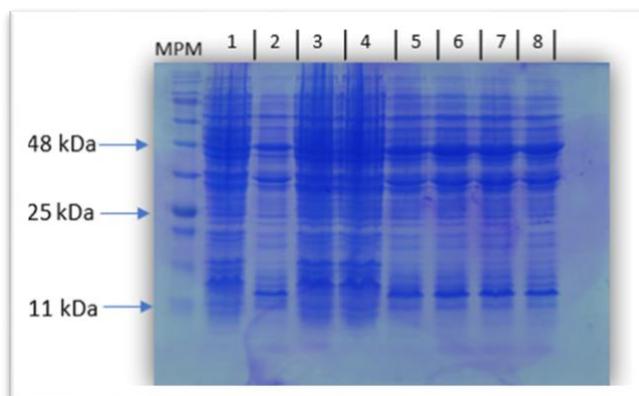


Fig. 20. Gel SDS-PAGE al 12.5 % para observar expresión de proteína recombinante rLTxNT en la cepa Shuffle. MPM= marcador de peso molecular. Carril 1 al 8 se muestra la expresión de la proteína inducida con 1 Mm de IPTG a 16°C. Carril 2,5,6,7 y 8 clona positivas con un peso esperado de 48 kDa.

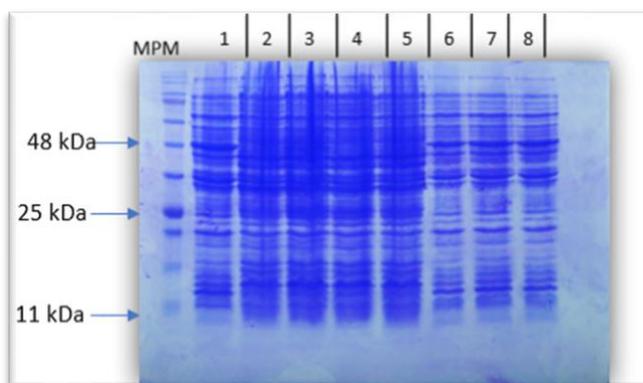


Fig. 21. Gel SDS-PAGE al 12.5 % para observar expresión de proteína recombinante rLTxNT en la cepa Origami. MPM= marcador de peso molecular. Carril 1 al 8 se muestra la expresión de la proteína inducida con 1 Mm de IPTG a 16°C. Carril 1,6,7 y 8 clona positivas con un peso esperado de 48 kDa.

En las figuras 20 y 21 se muestra la expresión de las clonas rLTxNT/pQE30 en las cepas Shuffle y Origami. El peso molecular de la proteína recombinante es aproximadamente de 48 kDa, se puede apreciar que las clonas 2, 5, 6, 7 y 8 que corresponde a la cepa Shuffle muestran la mayor expresión, debido a esto se hizo un Western blot anti-histidinas para verificar la presencia de la proteína rLTxNT, se enviaron a secuenciar las clonas positivas a la Unidad de Síntesis y secuenciación (USSDNA) de la UNAM para verificar si la construcción del gen era correcta y mantenía la etiqueta de las 6 histidinas añadidas por el vector (Fig. 24).

Para rLTxAnk la expresión se realizó en las mismas condiciones. Se puede observar que en la cepa Shuffle se aprecia mejor la expresión (Fig.22) que en Origami (Fig.23), por lo que se realizó un Western blot anti-histidinas de rLTxAnk en la cepa Shuffle y Origami para verificar reconocimiento de la proteína. Posteriormente se mandaron a secuenciación y se verificó en el programa Gene Construction (Fig. 24).

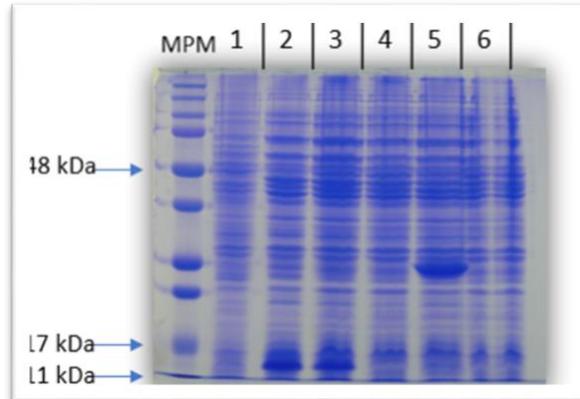


Fig. 22. Observación de la expresión de la proteína rLTxAnk en la cepa Shuffle. Gel SDS-PAGE al 15%. MPM= marcador de peso molecular. Carril 5 control negativo. Carril 1,2,3,4 y 6 se muestra la expresión de la proteína inducida con 1 Mm de IPTG a 16°C. Carril 2, 3 y 4 muestran clones positivos con un peso esperado de 11 kDa.

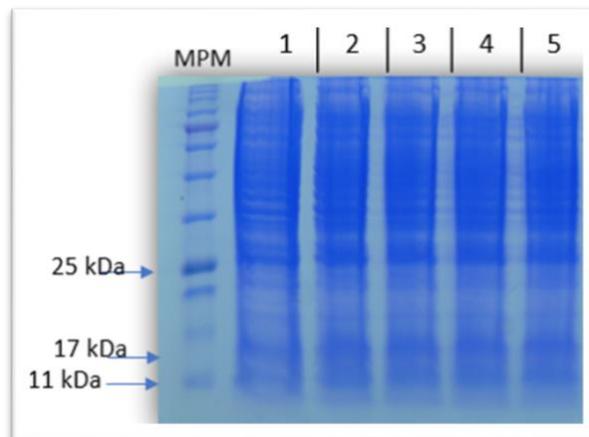


Fig. 23. Observación de la expresión de la proteína rLTxAnk en la cepa Origami. Gel SDS-PAGE al 15%. MPM= marcador de peso molecular. Carril 1, 2,3,4 y 5 se muestra la expresión de la proteína inducida con 1 Mm de IPTG a 16°C. Los carriles 2,3,4 y 5 muestran clones positivos con un peso esperado de 11 kDa.

A)

```

1      11      21
M R G S H H H H H H G S E G E E L T L D E
22      32      42
K A E I C S E L E L Q Q K Y V D I A S N I
43      52      63
I G D L S S L P M V G K I V G T I A A A A
64      74      84
M T V T H V A S G R L D I E Q T L L G C S
85      95      105
D L P F D Q I K E V L E K R F N E V D R K
106     116     126
L E S H S A A L E E I T K L V E R S I S A
127     137     147
V E K T R K Q M N K R F D E V M K S I Q D
148     158     168
A K V S P I V S K I N N F A R Y F D T E K
169     179     189
E R I R G L K L N D Y I L K L E E P N G I
190     200     210
L L H F K E S R T P K D D S L Q A P L F S
211     221     231
I I Q E G Y A V P K S I D D E L A F K V L
232     242     252
Y A L L Y G T Q T Y V S V M F F L L E Q Y
253     263     273
S F L A N H Y Y E K G D L E K Y D E Y F N
274     284     294
N L N N V F L D F K S S L V G T G T S N N
295     305     315
E G L I D R V L Q V L M T V K N S E F L G
316     326     336
I G K N G V D E M L N E K I N L F N K I K
337     347     357
E E I E S K Q R M T I S E T P E N F A Q I
358     368     378
S F D K D I T T P I G D W R D G R E V R Y
379     389     399
A V Q Y A S E T L F S K I G H W S D P L S
400     410     420
V R E K A C P T L R M P V D Q T R R N V L
421     431     441
V F R K F D N S K P Q L V G E I T P Y L S
442     452
N F I D I D R D • V D

```

B)

```

1      11      21
M R G S H H H H H H G S D N N R R D E C P
22      32      42
K E E C A I S H F A V C D A V Q F D K I E
43      53      63
I V K Y F V G T L E N F S I C G P L H Q A
64      74      84
A R Y G H L H I V K Y L V E E E Y L S V D
85      95      105
G S K T D T P L C Y A S E N G H L A V V Q
106     116     124
H L V S N G A K V N H D C D N G • K L

```

Fig. 24. Secuencia del gen rLTxAnk en el vector pQE30 con la etiqueta de histidinas, flanqueado con los sitios de restricción BamHI y HindIII.

8.5 Pruebas de expresión rLTxNT/pQE30 y rLTxAnk/pQE30 en la cepa Shuffle

Se tomó la clona 6 rLTxNT/pQE30 en Shuffle y la clona 2 rLTxAnk/pQE30 en Shuffle para observar si las proteínas se expresan de manera soluble o en agregados proteicos llamados cuerpos de inclusión (C.I). El proceso ya está descrito en la metodología.

Se observa a las proteínas rLTxAnk (Fig.25) y rLTxNT (Fig.26) en cuerpos de inclusión, por lo que se solubilizaron con un detergente llamado N-Lauroylsarcosine al 2%. Posteriormente se purificó por columna de afinidad a níquel Ni-NTA.

La proteína rLTxAnk fue purificada y dializada (pasos descritos en la metodología), se midió absorbancia por espectrofotómetro a 280nm y obtuvimos rendimientos de 7.36 µg/mL. Se realizó el mismo procedimiento para la rLTxNT. Se cuantificó por absorbancia 280 nm en espectrofotómetro y obtuvimos rendimientos de 11 µg/mL.

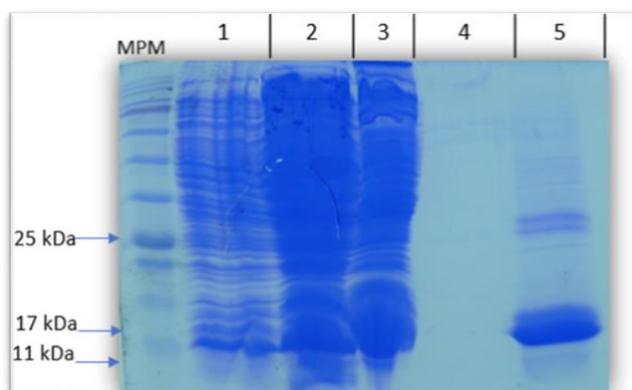


Fig. 25. Identificación de la proteína recombinante rLTxAnk en la cepa Shuffle. Gel SDS-PAGE al 15 % teñido con azul de Coomassie. MPM= marcador de peso molecular. Carril 1: Proteína Total; Carril 2: Cuerpos de Inclusión; Carril 3: Soluble; Carril 4: Purificado de proteína soluble por Ni-NTA; Carril 5: Purificado de cuerpos de inclusión. Con N-Lauroylsarcosine 2%.

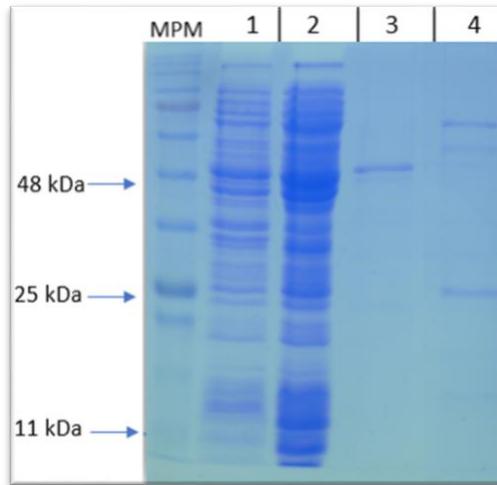


Fig. 26. Identificación de la proteína recombinante rLTxNT en la cepa Shuffle. Gel SDS-PAGE al 12.5 % teñido con azul de Coomassie. MPM= marcador de peso molecular. Carril 1: Proteína Total; Carril 2: Cuerpos de Inclusión; Carril 3: Purificado y dializado de rLTxNT con N- Lauroylsarcosine 2% y Carril 4: Purificado de proteína soluble por Ni-NTA.

8.6 Expresión de rLTxNT/pQE30 y rLTxAnk/pQE30 en la cepa Arctic

Se decidió probar otra cepa de *E.coli* para mejorar los rendimientos de ambas proteínas. Se transformaron las construcciones rLTxNT/pQE30 y rLTxAnk/pQE30 en la cepa Arctic de *E. coli*, se seleccionaron las colonias al azar y se realizó la expresión total.

De las colonias positivas se escogió una clona de cada construcción y se expresaron, posteriormente se localizaron las proteínas en cuerpos de inclusión. Se crecieron dos matraces de 1 litro de cada construcción y se pusieron a crecer a 30°C hasta una O.D de 0.6, se colocó a cada matraz 1mM de IPTG y se indujeron a 10°C durante 22 horas a 200 rpm. Se centrifugaron a 8000 rpm durante 20 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y al pellet se le agregaron 25 mililitros de Tris-HCL 1M pH 8. Se hizo la ruptura celular mediante prensa francesa y se pasó dos veces. Las muestras se centrifugaron por 30 minutos a 9,000 rpm, se desechó el sobrenadante y al pellet se le hicieron 3 lavados con PBS 1X; durante el primer y segundo lavado, las muestras se centrifugaron a 6500 rpm por 15 minutos a 4°C, y el último lavado fue a 7,000 rpm durante 15 minutos a 4°C.

Se recuperaron los cuerpos de inclusión y se solubilizaron con N-Laurylsarcosine al 2% con Tris-HCL 40mM pH 8.0 a 20°C por 24 hrs. con agitación suave, una vez que pasaron las 24 horas se centrifugaron a 9,000 rpm por 20 minutos a 4°C.

El sobrenadante se resuspendió con el mismo volumen de la muestra con PBS 1X y se hicieron cambios cada 8 horas durante 3 días. Una vez que pasaron los 3 días, se centrifugaron las muestras a 6,300 rpm por 15 min. a 4°C.

Se colocaron 2 columnas de 20 ml para cada muestra con 3 ml. de Ni-NTA/50% metanol y se equilibró con 40 ml de PBS 1X, las muestras rLTxNT y rLTxAnk se transfirieron a las columnas y se recircularon a flujo muy lento. Se lavó con 40 ml de PBS 1X, posteriormente se realizó un segundo lavado con 40 ml de PBS 1X + 25 mM de Imidazol para eliminar el pegado inespecífico de proteínas. Para la elución se utilizó PBS 1X + 250 Mm de Imidazol a un volumen determinado dependiendo de la cantidad de proteína que se esté eluyendo. Se seleccionaron las muestras que tienen mayor cantidad y se juntaron en un solo tubo, uno para rLTxNT y otro para rLTxAnk.

Las proteínas se almacenaron a 4°C en PBS 1X + 0.02% de Azida de Sodio. Se pasaron por electroforesis en gel SDS-PAGE, para rLTxNT al 12.5% y para rLTxAnk al 15%.

Se midió absorbancia 280nm por espectrofotómetro de ambas proteínas y se obtuvieron rendimientos para la fracción amino terminal (rLTxNT) 3.33 µg/mL y para rLTxAnk se obtuvieron 9.54 µg/mL.

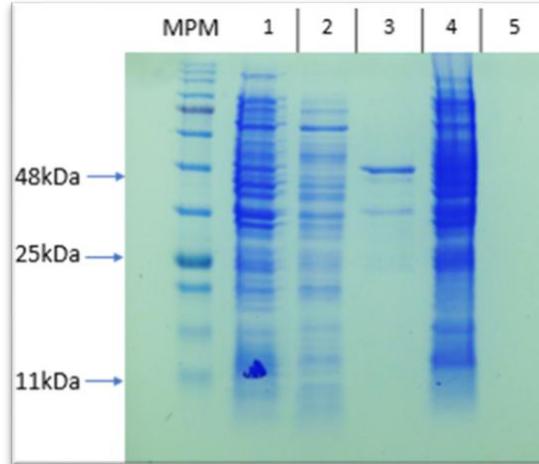


Fig. 27. Identificación de la proteína recombinante rLTxNT en la cepa Arctic. Gel SDS-PAGE al 12.5 % teñido con azul de Coomassie. MPM= marcador de peso molecular. Carril 1: Proteína Total; Carril 2: Proteína Soluble; Carril 3: Purificado y dializado de rLTxNT solubilizado con N- Lauroylsarcosine 2% y Carril 4: Control Negativo cepa Arctic.

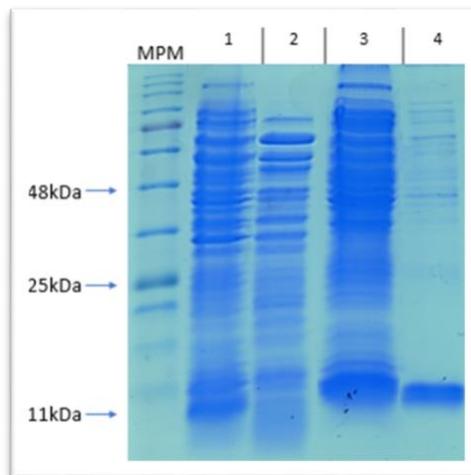


Fig. 28. Identificación de la proteína recombinante rLTxAnk en la cepa Arctic. Gel SDS-PAGE al 15 % teñido con azul de Coomassie. MPM= marcador de peso molecular. Carril 1: Proteína Total; Carril 2: Proteína Soluble; Carril 3: Cuerpos de Inlusión y Carril 4: Proteína purificada y dializada de rLTxAnk solubilizado con N- Lauroylsarcosine 2%.

Con los resultados anteriores, se seleccionaron las cepas donde se obtuvieron los mayores rendimientos y se escaló el procedimiento para obtener mayor cantidad de proteína. Los rendimientos obtenidos por litro de cultivo ya purificados fueron 11 mg para rLTxNT en la cepa Shuffle y 8 mg para rLTxAnk en la cepa Arctic. Se realizó un gel SDS-PAGE al 12.5% (Fig. 29).

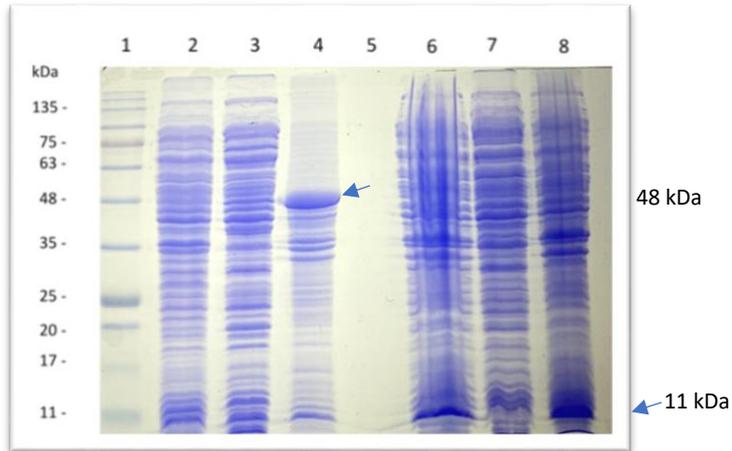


Fig 29. Expresión de las proteínas recombinantes Gel SDS-PAGE al 12.5% carril 1: Marcadores de peso molecular, 2: Lisado bacteriano completo (total) en la cepa Shuffle de rLTxNT, 3: Proteína soluble rLTxNT, 4: Proteína del pellet donde se encuentran los C.I de rLTxNT y se observa la banda de 48 kDa. Carriles 6, 7 y 8: rLTxAnk en la cepa Arctic, se continua con el mismo orden que el anterior y se observa una banda de aproximadamente 11 kDa.

Se observó el reconocimiento de las proteínas recombinantes rLTxNT y rLTxAnk en Western Blot contra un anticuerpo monoclonal anti-histidinas (Fig.30).

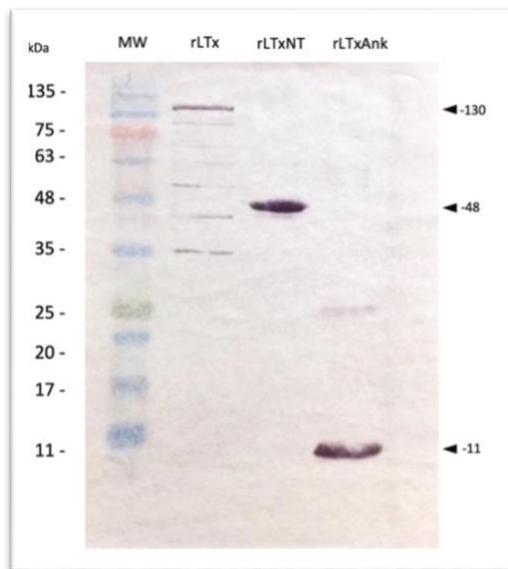


Fig. 30. Western-blot de las proteínas recombinantes, donde se observa el reconocimiento de rLTxNT y rLTxAnk contra un anticuerpo monoclonal anti-Histidinas, rLTx es la alfa latrotoxina completa recombinante que también fungió como control positivo.

8.7 Potencia letal de las proteínas rLTxNT y rLTxAnk

Una vez que se obtuvieron las proteínas rLTxNT y rLTxAnk purificadas y cuantificadas se inyectaron 2 grupos de 3 ratones por vía intravenosa con el fin de observar si tienen toxicidad.

Del primer grupo, se inyectó un ratón con 43.6 μg , al segundo con 87.2 μg de la proteína rLTxNT y el tercer ratón fue inoculado con 1 mL de PBS 1X como control negativo. Del segundo grupo se inoculó un ratón con 73.6 μg , al segundo con 147.2 μg de rLTxAnk y al tercer ratón 1 mL de PBS 1X como control negativo. Las proteínas recombinantes resultaron no ser letales como se esperaba debido al mal plegamiento del dominio amino terminal obtenido de C.I y la región de anquirinas que por sí sola no es tóxica (Fig.31).

rLTxAnk Purificada y Dializada de C.I en Shuffle	rLTxNT Purificada y Dializada de C.I en Shuffle
1 ratón con 73.6 μg 1 ratón con 147.2 μg NO LETAL	1 ratón con 43.6 μg 1 ratón con 87.2 μg NO LETAL

Fig. 31. Potencia letal de las proteínas recombinantes. Se observa que ambas no presentan letalidad.

8.8 Generación de anticuerpos policlonales en conejo

Se seleccionaron las proteínas recombinantes que presentaban mejores rendimientos. Para rLTxNT se obtuvieron 4.36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y para rLTxAnk ya que se obtuvieron 9.54 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Ya que en las pruebas de toxicidad en ratones no hubo letalidad, se pudo incrementar la dosis para la inmunización en los conejos Nueva Zelanda.

Se inmunizaron durante 12 semanas en dosis crecientes hasta la octava semana, a partir de ahí se mantuvo hasta la doceava semana. La primera sangría se tomó 5 semanas después de la primera inmunización. Con la técnica ELISA, se pudo observar que había reconocimiento de las 3 proteínas recombinantes contra el veneno completo de la araña *L. mactans*.

8.9 Ensayos de neutralización de los sueros producidos

Los ensayos de neutralización se llevaron a cabo por dos métodos: incubación y de rescate. Para estos ensayos se utilizó el suero de los conejos previamente inmunizados con las proteínas recombinantes.

Para el primer ensayo, el suero de cada conejo se incubó con 3DL₅₀ del veneno de *L. mactans* a 37 °C durante 30 min.

Posteriormente se inyectaron ratones con la mezcla incubada que contenía 15 µl suero contra la rLTx y 3DL₅₀ del veneno, esto se llevó a un volumen total de 200 µl en solución PBS 1X, en este ensayo se obtuvo el 100% de sobrevivencia, para la rLTxNT se administraron 25 µl de suero y de igual manera la sobrevivencia fue del 100%, a diferencia de la rLTxAnk donde se tuvo que aumentar hasta 450 µl de suero y solo se salvó 1 de los 3 ratones.

Para los ensayos de rescate se ocuparon grupos de tres ratones, a los que se les inyectó 3DL₅₀ de veneno vía I.V, una vez que se observaban los síntomas de envenenamiento (alrededor de 3 min. post-inyección), se inoculó el suero de los conejos hiperinmunizados con las tres proteínas recombinantes. Para rLTx y rLTxNT se inyectaron 100 y 250 µl de suero y la neutralización fue satisfactoria ya que lograron el 100% de sobrevivencia. Para rLTxAnk se utilizó un volumen máximo de 450 µl y se observó un retardo del doble a cinco veces más de tiempo en la muerte de los ratones, cuando eran comparados con el grupo control sin suero. Los títulos obtenidos mediante el ELISA fueron los siguientes: anti-rLTxNT (12,309), en verde el suero anti-rLTxAnk (5,265) y en morado el suero anti-

rLTx (16,036) se graficaron, la EC₅₀ fue de 9.8 mL (8.1 a 11.8 µl) para rLTx y 27.5 µl (24.3 a 29.9 µl) para el suero rLTxNT (Fig.32).

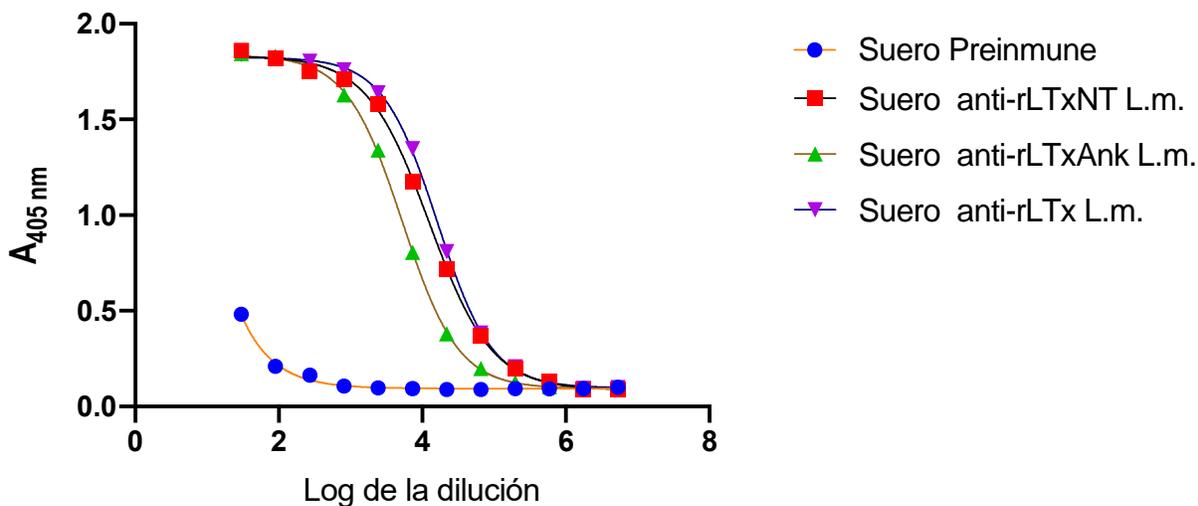


Fig. 32. Títulos de los anticuerpos anti-alfa latrotoxina obtenidos al final de las inmunizaciones (12 semanas), en color azul se muestra el suero preinmune, en rojo el suero anti-rLTxNT (12,309), en verde el suero anti-rLTxAnk (5,265) y en morado el suero anti-rLTx (16,036).

IX. Discusión

Expresión de las proteínas recombinantes

El presente trabajo tuvo como objetivo obtener proteína recombinante soluble a partir de cuerpos de inclusión. Se han presentado desafíos al expresar la alfa latrotoxina ya que esta proteína es de alto peso molecular ya que consta del dominio amino terminal y anquirinas en la proteína madura con actividad tóxica y al obtenerla completa de manera recombinante presenta dificultades en la expresión y purificación ya que parece contener secuencias capaces de formar estructuras que dificultan su manipulación.

Durante el trabajo de Monica Prud'Homme (2004), se expresó el dominio amino terminal completo de la α LTX tanto de *L. mactans* como de *L. tredecimguttatus* sin embargo, estas

proteínas nunca pudieron obtenerse de manera soluble a pesar de utilizar diferentes cepas de *E.coli*, y en diversas condiciones así como diferentes vectores de expresión. Se tuvieron dificultades al momento de la ligación al vector y fue imposible expresar el dominio de anquirinas en el sistema de *E.coli*. El dominio de anquirinas tiene 20-22 secuencias repetidas de aproximadamente 33 aminoácidos y es posible que la secuencia de nucleótidos forme algún tipo de estructura secundaria que posiblemente impida la reproducibilidad en los PCRs, incluso Monica Prud'homme reporta que fue imposible la amplificación en la combinación de primers.

De igual manera, Alejandro Olvera intentó obtener la alfa latrotoxina completa de manera soluble en bacteria, sin embargo, esto no fue posible, aun utilizando cepas bacterianas recomendadas por el proveedor para la producción de proteínas solubles (Origami DE3[®] Novagen; Shuffle[®], NEB. ArticExpress DE3[®] Agilent). Esto pudo deberse a que influyó el largo de la proteína y su región hidrofóbica que se encuentra más enriquecida en el dominio tipo anquirinas (Graudins, A. *et al.*, 2012).

Tomando en cuenta estos reportes, en este trabajo se decidió producir por separado la región amino terminal de la alfa latrotoxina que corresponde a los aminoácidos 1 al 437 (48 kDa) que es considerado muy importante para la actividad de la alfa latrotoxina, trabajos realizados con mutantes demostraron que las cisteínas de esa región son fundamentales para la toxicidad (Volynski *et al*, 1999). Por otra parte, se reportó un anticuerpo monoclonal (AcM 4C4.1), dirigido contra la región de anquirinas (1007-1013 aa.), de la α -LTx de *L. tredecimguttatus* (Pescatori, M. y Grasso, A. 2000). Este AcM en pruebas de electrofisiológicas en cervix de pollo, mostró una inhibición de la tensión, contracciones y contractura muscular de manera dependiente de la dosis de anticuerpo. Esta neutralización fue específica contra *L. tredecimguttatus* y no se observó neutralización con el veneno otras especies de *Latrodectus*, así como tampoco el reconocimiento por ensayos de western-blot (Graudins, A. *et al.*, 2012).

Para el dominio de anquirinas se tomaron en cuenta los aminoácidos 940 al 1049 (327 pb). De esta manera comprendería la región utilizada para el anticuerpo monoclonal de

L. tredecimguttatus y si consideramos que las secuencias de las dos especies tienen una identidad del 93% era posible obtener anticuerpos neutralizantes.

Se logró expresar de manera recombinante en el modelo de *E. coli* los dos fragmentos de la alfa latrotoxina.

Obtención de las proteínas rLTxNT y rLTxAnk solubles a partir de cuerpos C.I

A pesar de haber utilizado las cepas recomendadas y las condiciones específicas para generar proteínas solubles de estos dos fragmentos rLTxNT y rLTxAnk resultaron igual que la proteína completa (rLTx) que expresó A. Olvera, como cuerpos de inclusión (C.I) en *E.coli*. Por esta razón se decidió usar un protocolo que permite la obtención de proteínas solubles y funcionales a pesar de que las proteínas se encuentren en C.I. Anteriormente se afirmaba con base en la literatura que los cuerpos de inclusión eran proteínas mal plegadas y afuncionales, sin embargo, algunos trabajos han demostrado que utilizando cepas bacterianas recomendadas para la expresión de proteína soluble, así como el uso de temperaturas bajas de incubación e inductor, podemos producir proteínas solubles y funcionales a partir de C.I., utilizando detergentes aniónicos o agentes caotrópicos para la disolución de dichos cuerpos (Spela P. *et al.*, 2008). De esta manera se logró obtener proteína soluble de las dos proteínas de interés.

Purificación de rLTxNT y rLTxAnk

El vector utilizado (pQE30) agrega una etiqueta de 6 histidinas (H₆) en la región amino terminal, por lo que fueron purificadas por afinidad en una resina de níquel (NiTA). Una de las observaciones por A. Olvera al producir la rLTx fue que a pesar de que se obtuvo un buen rendimiento en el lisado total, en el proceso de purificación se perdía aproximadamente 80-90% de la proteína. Esto fue diferente para las proteínas en este trabajo ya que se obtuvieron buenos rendimientos a pesar de purificarlos de igual manera. No hay una pérdida significativa al momento de la purificación de rLTxNT y rLTxAnk, además, en el análisis de pureza para dichas proteínas se calculó alrededor del 80%.

Títulos mediante ELISA de los anticuerpos policlonales obtenidos en conejo

Las dos proteínas recombinantes obtenidas rLTxNT y rLTxAnk además de la rLTx expresada por A. Olvera, fueron utilizadas como antígenos y se inyectaron en conejos Nueva Zelanda de forma independiente. Los títulos de los anticuerpos se obtuvieron mediante el método de ELISA (Guerrero *et al.*, 2018); como antígeno se utilizó el veneno de *L.mactans*, con la finalidad de determinar si los sueros obtenidos reconocían a la proteína nativa, se observó que los títulos obtenidos no son muy altos, esto fue debido a que se retó contra el veneno y los sueros van dirigidos contra la alfa latrotoxina o parte de ella y esta solo forma un porcentaje de todos los componentes, aproximadamente un 10%. Por otra parte, se realizaron ensayos de ELISA con las proteínas purificadas como antígeno y se obtuvieron títulos mayores, debido a que la pureza de las proteínas no es del 100% es probable que los sueros también estén reconociendo proteínas de la bacteria.

DL₅₀ y ensayos de neutralización

Las DL₅₀ determinadas en ratones presentan variaciones según la especie y la técnica utilizada en la extracción del veneno. Un ejemplo es la DL₅₀ determinada utilizando homogenizado total de glándula que es 1.3 mg/kg para *L.mactans*, mientras que por estimulación eléctrica, la DL₅₀ se calculó en 0.26 mg/kg (Daly *et al.*, 2001). Utilizando métodos proteómicos, estiman que el total de latrotoxinas representa entre 7.3 y el 10.9 % de la cantidad total de proteína del veneno, por lo que las diferencias en la estimación de la dosis letal pueden estar relacionadas a la variabilidad en la proporción de las alfas latrotoxinas con respecto al total de proteína (Duan *et al.*, 2006). Un reporte previo de la dosis letal, hecho por la Biol. Monica Prud'home, estudiante de maestría del grupo del Dr. Roberto Stock en el IBT/UNAM, en el que reportó en su tesis una DL₅₀ de 8 µg / ratón de 20 gr. Es por ello que primeramente se calculó la dosis letal media del veneno de *L. mactans* obtenido por estimulación eléctrica para los ensayos en esta tesis. Se realizó en grupo de tres ratones de la cepa CD1, y dio una DL₅₀ de 3 µg por ratón, esta diferencia se debe a que utilizamos veneno fresco, con menos tiempo de congelación. En los ensayos, se observó la neutralización completa para rLTxNT y rLTx, por el contrario, la

pre-incubación con 450 µl de suero anti LTxAnk solo logró la supervivencia de 1 de los 3 ratones inyectados, esto sugiere una menor cantidad de anticuerpos neutralizantes en el suero o menor afinidad en ellos. De igual manera en los experimentos de rescate, para rLTxNT y rLTx lograron una supervivencia del 100% de los ratones, a diferencia de rLTxAnk donde no sobrevivieron, pero si retrasó la muerte de 2 a 5 veces a comparación con el ratón control sin suero.

X. Conclusiones

Actualmente, el antiveneno de la araña viuda negra mexicana se elabora a partir de la obtención del veneno de cientos o miles de arañas y los costos de mantenimiento de los ejemplares es alto, por lo que es necesario generar alternativas éticamente sólidas y eficientes. Dada la complejidad de la expresión recombinante de la alfa-latrotoxina en forma soluble y activa, se propone el uso de dos de sus fragmentos purificados a partir de cuerpos de inclusión.

Las proteínas obtenidas, fueron utilizadas independientemente como antígenos en conejos, de los que se obtuvo suero neutralizante de la proteína rLTxNT hacia el veneno de *L. mactans*. Esto sugiere que tiene el potencial para utilizarse como antígeno en la inmunización de caballos, ya que es el animal utilizado comúnmente en la fabricación de antivenenos comerciales. Esto nos acercaría al objetivo de generar un antiveneno contra el latroductismo, sin la necesidad de utilizar el veneno producido por las arañas. Aunque se requieren más estudios para evaluar la neutralización cruzada, estos resultados preliminares son prometedores.

XI. Perspectivas

- Realizar inmunizaciones con rLTxNT y rLTX en caballos para generar anticuerpos policlonales en mayor escala.
- Obtener por técnica de hibridomas anticuerpos monoclonales anti rLTxNT en ratones y evaluar capacidad neutralizante hacia el veneno de *L. mactans*.

XII. Referencias

- Alvarez de Toro, M., (1992), Arañas de Chiapas. Universidad Autónoma de Chiapas, México, 203-231.
- Ashton, A. C., Rahman, M. A., Volynski, K. E., Manser, C., Orlova, E. V., Matsushita, H., Davletov, Bazbek, van Heel, M., Grishin E. V., Y.A. Ushkaryov. (2000). Tetramerisation of α -latrotoxin by divalent cations is responsible for toxininduced non-vesicular release and contributes to the Ca^{2+} dependent vesicular exocytosis from synaptosomes- *Biochimie* 82:453-468.
- Cabrera-Espinosa, L. A., & Valdez-Mondragón, A. (2021). Distribución y modelaje de nicho ecológico, comentarios biogeográficos y taxonómicos del género de arañas *Latrodectus* (Araneae: Theridiidae) de México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 92(0), 923665.
- Cabrerizo, S., Docampo, P. C., Cari, C., Ortiz de Rozas, M., Diaz, M., Roodt, A. De, & Curci, O. (2009). Loxoscelismo: epidemiología y clínica de una patología endémica en el país. *Arch. Argent. Pediatr*, 107(2), 152–159.
- Castro, S., Espejo, H., Vásquez, G., & Espinoza, S. (2009). Síndrome neurotóxico

secundario a mordedura de araña: a propósito de un caso. *Revista Médica Vozandes*, 20(1), 52–55.

Daly, F. F., Hill, R. E., Bogdan, G. M., & Dart, R. C. (2001). Neutralization of *Latrodectus mactans* and *L. hesperus* venom by redback spider (*L. hasseltii*) antivenom. *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology*, 39(2), 119–123.

Duan, Z. G., Yan, X. J., He, X. Z., Zhou, H., Chen, P., Cao, R., Xiong, J. X., Hu, W. J., Wang, X. C., & Liang, S. P. (2006). Extraction and protein component analysis of venom from the dissected venom glands of *Latrodectus tredecimguttatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 145(3–4), 350–357.

Dulubova, IE, et al. (1996), Cloning and Structure of α -Latroinsectotoxin, a Novel Insect-specific Member of the Latrotoxin Family, *The Journal of Biological Chemistry* 271, 7535-7543.

Garb, J. E., & Hayashi, C. Y. (2013). Molecular evolution of α -latrotoxin, the exceptionally potent vertebrate neurotoxin in black widow spider venom. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 999–1014.

Graudins, A., Little, M. J., Pineda, S. S., Hains, P. G., King, G. F., Broady, K. W., & Nicholson, G. M. (2012). Cloning and activity of a novel α -latrotoxin from red-back spider venom. *Biochemical Pharmacology*, 83(1), 170–183.

Guerrero-Garzón, J. F., Bénard-Valle, M., Restano-Cassulini, R., Zamudio, F., Corzo, G., Alagón, A., & Olvera-Rodríguez, A. (2018). Cloning and sequencing of three-finger

toxins from the venom glands of four *Micrurus* species from Mexico and heterologous expression of an alpha-neurotoxin from *Micrurus*

Hoffman, A. (2004). El maravilloso mundo de los arácnidos.

Ichtchenko, K., et al, (1998), α -Latrotoxin action probed with recombinant toxin receptor recruit α -latrotoxin but do not traduce an exocytotic signal. *The EMBO Journal* 17, 6188-6199.

Kiyatkin, N., Dulubova, I, Grishin, E., (1993), Cloning and structural analysis of α -latroinsectotoxin cDNA, Abundance of ankyrin-like repeats, *Eur. J. Biochem.* 213,121-127.

Krasnoperov, V.G., O.G. Shamotienko & E.V. Grishin. 1991. Interaction of alpha-(125) latrocrustotoxin with nerve cell membranes from the river crab *astacus astacus*. *Bioorg. Khim.* 17(5):716-718.

Luch, A. (2010). Mechanistic insights on spider neurotoxins. *Exs*, 100, 293–315.

Luis C. Haro, Oscar F. Ballvé, Carlos E Santibañez, Alejandro V. Mondragón, Sergio M. García, Marco A. Peregrina, Mónica M. Hernández, Verónica A. Guevara, Patricia E. Galindo, Norberto S. Cruz, Web-Redtox, Mariana C. Ramírez, Eduardo G. Willis, Rodolfo M. Martín, Ramón V. Gascón, (2016). Reunión de expertos en intoxicaciones por animales venenosos.

Magazanik, L. G., Fedorova, I. M., Kovalevskaya, G. I., Pashkov, V. N., Bulgakov, O. V.,

- & Grishin, E. V. (1992). Selective presynaptic insectotoxin (α -latroinsectotoxin) isolated from black widow spider venom. *Neuroscience*, 46(1), 181–188.
- Meza-Aguilar, D. G., & Boucard, A. A. (2014). Latrophilins updated. *Biomolecular Concepts*, 5(6), 457–478.
- Ori, M., & Ikeda, H. (1998). Spider venoms and spider toxins. *Journal of Toxicology - Toxin Reviews*, 17(3), 405–426.
- Prud'Homme, M.A. (2004) "Producción y evaluación de antígenos recombinantes de la α -latrotoxina de *Latrodectus mactans*". (Tesis de Maestría). Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rafael R. L. Sampayo. (1943). Pharmacological action of the venom of *Latrodectus mactans* and other *latrodectus* spiders. *The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics* 309-310.
- Rash, L. D., & Hodgson, W. C. (2001). Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon*, 40(3), 225–254.
- Rodríguez González, M. (2008). "Expresión de alfa-latrotoxina recombinante activa de *Latrodectus mactans* utilizando el sistema de células de insecto-baculovirus". (Tesis de Maestría). Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Saibil, H. R. (2000). The black widow versatile venom *Nature America Inc.* 7(1), 3–4.

Saracco, S., & de Roodt, A. (2010). Latrodectismo. *Revista Medica Universitaria*, 6, 1–13.

Špela., Grdadolnik, J., Gaberc-Porekar, V. *et al.* Engineering inclusion bodies for non-denaturing extraction of functional proteins. *Microb Cell Fact* 7, 34 (2008).

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2(5), 70–78.

Ushkaryov, Y. (2002). α -Latrotoxin: from structure to some functions. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 40(1), 1–5.

Volynski, K. E., Nosyreva, E. D., Ushkaryov, Y. A., & Grishin, E. V. (1999). Functional expression of α -latrotoxin in baculovirus system. *FEBS Letters*, 442(1), 25–28.

Zavala, J. T., Sánchez, J. G. D., Sánchez, V., Alarcón, L. C., & Dora Ruiz Sánchez, L. C. R. (2004). Picaduras por alacranes y arañas ponzoñosas de México.

XIII. Anexo

Artículo publicado

“Neutralization of black widow spider (*Latrodectus mactans*) venom with rabbit polyclonal serum hyperimmunized with recombinant alpha-latrotoxin fragments”

Biochimie 201 (2022) 55–62



Neutralization of black widow spider (*Latrodectus mactans*) venom with rabbit polyclonal serum hyperimmunized with recombinant alpha-latrotoxin fragments



Alejandro Olvera Rodríguez¹, Mitzi G. Amaro Ruiz¹, Melisa Bénard-Valle, Edgar Neri-Castro, Felipe Olvera Rodríguez, Alejandro Alagón*

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, 62210, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:
Received 1 April 2022
Received in revised form 24 May 2022
Accepted 27 June 2022
Available online 30 June 2022

Keywords:
Alpha-latrotoxin
Polyclonal serum
Neutralization
Spider venom
Recombinant toxin

ABSTRACT

Alpha-latrotoxin (αLTx) is the component responsible for causing the pathophysiology in patients bitten by spiders from the genus *Latrodectus*, commonly known as black widow spiders. The current antivenom used to treat these envenomations in Mexico is produced using the venom of thousands of spiders, obtained through electrical stimulation. This work aimed to produce this protein as well as two of its fragments in a bacterial model, to evaluate their use as immunogens to produce neutralizing hyperimmune sera, in rabbits.

αLTx is a 130 kDa protein which has not yet been obtained in a soluble active form using bacterial models. In the present work, αLTx and two of its fragments, ankyrin domain and amino terminal domain (LTxAnk and LTxNT) were produced in bacteria and solubilized from inclusion bodies using *N*-lauroyl sarcosine. These three proteins were used for hyperimmunization in order to evaluate their potential as immunogens for the production of neutralizing hyperimmune sera against the complete venom of *Latrodectus mactans*.

The hyperimmune sera obtained using the complete αLTx as well as the LTxNT, was capable of preventing death of mice envenomated with 3 LD₅₀s of venom, both in preincubation and rescue experiments. Conversely, the serum obtained using the LTxAnk fragment, generated only partial protection and a delay in the time of death, even with a maximum dose of 450 μL. We therefore conclude that the produced proteins show great potential for their use as immunogens and should be further tested in large animals, such as horses.

© 2022 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Black widow spiders (*Latrodectus* sp.) are a genus belonging to the family Theridiidae (Arthropoda, Arachnida, Araneae) [1] which is distributed worldwide and comprises 31 species [2,3] Three of these species are present in Mexico and can be found throughout the whole country: *Latrodectus mactans* [4], *L. geometricus* [5] and *L. hesperus* [6].

Latrodectism is the term used to refer to the clinical syndrome caused by widow spider venom and, in vertebrates, is caused by a

single protein component termed alpha-latrotoxin (αLTx) [7,8]. This syndrome is characterized primarily by extremely painful muscle spasms and hypertension but is rarely lethal [9–11]. The degree of intoxication can generally be classified as: grade 1, consisting of local pain at the site of the injury, sialorrhea, and diaphoresis; grade 2, including the mentioned symptoms as well as marked dyspnea, headache, muscle stiffness, and priapism; and grade 3, including all of the above as well as miosis or mydriasis, heart rhythm disorders, bronchospasm, and respiratory arrest [12]. Severe cases are usually observed in the elderly, children, and patients with cardiovascular diseases [13]. The exact number of cases of Latrodectism in Mexico is unknown but there is an estimate of 3,000 envenomations caused by spiders of the genera *Loxosceles* and *Latrodectus*, where the latter is thought to be predominant [14]

αLTx is a non-glycosylated polypeptide with a molecular mass of

* Corresponding author.
E-mail address: alejandro.alagon@ibt.unam.mx (A. Alagón).

¹ These authors contributed equally to the work.

Cuernavaca, Morelos a 24 de agosto de 2021

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **MITZI GUADALUPE AMARO RUIZ**, con el título del trabajo: **OBTENCIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE DE LA α -LATROTOXINA DE *Latrodectus mactans*, A PARTIR DE CUERPOS DE INCLUSIÓN EN EL MODELO DE *Escherichia coli*.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación de **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DRA. CARMEN GUTIÉRREZ VILLAFUERTE

SECRETARIO: BIÓL. HUGO SUÁREZ CONTRERAS

VOCAL: M. EN C. ALEJANDRO OLVERA RODRÍGUEZ

SUPLENTE: DR. CUAUHTÉMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA

SUPLENTE: DR. BALTAZAR BECERRIL LUJÁN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

CUAUHTEMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA | Fecha:2021-08-24 11:00:50 | Firmante

faMCN9Zop0GYAxBe/466gEiYB54ys9ps8Lle5HKDzlxPRhM9vfeujAXX1rJjG9xxWzRXq/Ee9HcCgwqs8vmbnks0YvdlBhq1aG9NntBJzX8hQG95wAZVBeEVgrgGqeu8hc6XlqhJ
oYeOhN3to7N4aoc6mBmqbUa4dHFdTQ7xcLh21GVjo2eIF7SZb+nlwFRGHMrO12croO2NaOmln1p+0m6QxgZMhiJVg2L6ofn8fSl1t1XPb45fBGGVg/INN+iqeu+9BXAmKX8qgLK
vHEbAM+0IR00E8dtbnYmGxyDJDiudDdHQ7LlslSCfKh1MYMrkFGfHUs5sM/PH634qobg==

BALTAZAR BECERRIL LUJAN | Fecha:2021-08-24 11:13:33 | Firmante

nsHQAGhLyiwnMqe99rS/Lbrdhn01vxbJ8MFhVgVHS4I9p8Tvt88vt7uGr1ceMtKjppai/polvKUR6gmG/jw0OyBLBNvLIGfUyZGXqByNC/qbCmCg3/pv11NDOrT7CBZk/frpD/3GvYZt+
MNx715RiROF0blsoMU5tG11dkcRvG3zBA9DMIHE4d/H0AGa5/G6CO0lzJvEr4rXd6wRJsxjNT2VXQ9lisMKlApQ2rArFpZ4ZuT7Sct+tOf7Jed1JbBlaajb+hwi5n1qblrHzlxq0wY6Qx
oAr80iP61yyycFU1Uk1uFiwuGHF68695FEwYN7Lab8+hXmf5ecCANmNWnw==

HUGO SUAREZ CONTRERAS | Fecha:2021-08-24 21:00:21 | Firmante

06t1IHirJ0D8sjoUyNo8tqDb0QUsSYA5gHjGegVq6jEHH7faGGZiAiEMvgUS5NoNzfXfP0DNEXuvec1fzdCh64IYVn8j9oQzYbh/e1plXDAbjza6MBYgM9Y9BIF9OloZnQN7oxweqe
MyezrHiHzmaXe7Bvx53ymzrFthZowVdQhGxvJ76hJgUOBuB+S18C6Hr/F+n0nOjUvu+6bj8lUDnTnQwKwpCVXhPM1CHTgfAGvXKvqPsm7gs0JTC55AlcC52Lbk6iXx6x/LueK3g
/M2z9fZWFPTxjKl/qzma1ErWgx3/PXyZAFYnfo0oVQl13O2OcczwDfGvuRq3Rg==

MARIA DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE | Fecha:2021-08-27 13:11:59 | Firmante

nlac5+jJe+ASlwY4sAgJ4hhQ9Gz01A8BmZONJ6BGS9Vn0JiiKN/eHlqgkMtdj2kcrF/gd2FOBe3Y6YQ4/U/MzeifTEOF3sHJ7avSN2m/QcL6RqsYOOZcQRiQJEH9ocEfaGt6n8xW+7
Gjj0gC/38yEzfxC42NfvKjmpG7dlGYMmmYixbWDaER6sQppa3TnDi1un132/ruBYO16vG9R+OBIMK0x7av7QUg+mT4N9KxwvRU8VGYGJsm5dGcZWOk8bCSNF0lmdLV9PS
wX4kla0ktZJoAZ+ts/teDpOES2PjwC0c+zPp/nMCFbU8kl2WrJskqRxsLScmPGyVdVFXwPw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



ZcuT0i

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/RqP3NA5RFcSdKKJt3qccoQxxVYLxsDFX>

