



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**“Análisis de la expresión de la neurotoxina Magi 4 utilizando
diferentes medios de cultivo”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

Ing. José de Jesús Hernández Pérez

DIRECTORA:

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal

CO-DIRECTOR:

Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete

Laboratorio de Estructura Función e Ingeniería de Proteínas

CUERNAVACA, MORELOS DICIEMBRE, 2018

La presente Tesis fue realizada bajo la dirección de la Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CeIB-UAEM) y bajo la co-dirección del Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete, quién es parte del departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBt- UNAM).

Se agradece al grupo de investigación en el Laboratorio de Estructura-Función e Ingeniería de Proteínas del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, campus Cuernavaca Morelos.

Agradezco a la maestría en Biotecnología del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos programa acreditado por el Padrón del Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de maestría "784725" que me proporcionó en el periodo correspondiente, y a la Dirección General de Asuntos del personal académico (DGAPA) por el apoyo del proyecto IN203118, el cual integra estos resultados.

Índice general

I.	
INDICE DE FIGURAS	iv
II. Índice de tablas	vi
III. Resumen.....	vii
I. Introducción	1
1.1 Delta Atracotoxinas.....	1
II. Antecedentes	2
2.1 Canales iónicos dependientes de voltaje (Na _v).....	2
2.2 Expresión heteróloga.....	5
2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	5
2.2.2 Promotores empleados en <i>E. coli</i>	7
2.3 pQE-30	8
2.4 Cuerpos de inclusión	9
2.5 Medios de cultivo	10
2.5.1 Medio LB	10
2.5.2 Osmolitos	11
2.6 Purificación	12
2.6.1 Purificación por cromatografía de alta resolución.....	12
2.6.2 Cromatografía de afinidad a metal inmovilizado	13
2.7 Biorreactores	13
2.7.1 Reactor tipo tanque agitado.....	14
2.7.2 Sistema de aireación.....	15
2.7.3 Dispositivos de adición, extracción y control	16
2.8 Análisis bilógicos	16
IV. Justificación	17
V. Hipótesis.....	18
VI. Objetivos generales.....	18
6.1 Objetivos particulares.....	18
VII. Materiales y métodos	18
7.1 Cepas bacterianas	19
7.2 Vectores plasmídicos.....	19
7.3 Medios empleados para la expresión de la neurotoxina Magi 4	20

7.3.1 Medio Luria- Bertani (LB) (Sambrock et al., 2001)	20
7.3.2 Medio Luria- Bertani suplementado con glucosa.....	20
7.3.3 Medio Luria- Bertani suplementado con sales y extracto de levadura.....	20
7.3.4 Medio LB suplementado con osmolitos.....	21
7.3.5 Medio LB suplementado con Arginina	22
7.3.6 Medio LB suplementado con Trehalosa.....	22
7.4 Preparación de células competentes.....	22
7.5 Producción y purificación del plásmido pQE-30 con el inserto de la neurotoxina Magi 4.....	23
7.6 Protocolo de transformación bacteriana.....	23
7.7 Protocolo de fermentaciones	24
7.7.1 Fermentación en matraz	24
7.7.2 Protocolo de fermentaciones en reactor tanque agitado	24
7.8 Medición del Crecimiento Celular	25
7.9 Determinación peso seco.....	26
7.10 Procesamiento de biomasa	26
7.10.1 Rompimiento celular	27
7.10.2 Solubilizar cuerpos de inclusión.....	27
7.11 Purificación Ni-NTA.....	27
7.12 Electroforesis.....	27
7.13 Western Blot.....	28
7.14 Precipitación de proteínas	29
7.15 Purificación HPLC	29
7.16 Plegamiento <i>in vitro</i> de la neurotoxina Magi 4	29
7.17 Análisis biológicos de las neurotoxinas	30
7.18 Cálculo de la dosis letal media (DL50) en ratones CD-1 y grillos <i>Achatea domesticus</i> utilizando el método de regresión no lineal.....	30
VIII. Resultados.....	30
8.1 Transformación con células quimiocompetentes	30
8.2 Selección de las cepas de <i>E. coli</i> SHuffle, Origami, M15, BL21.....	32
8.2.1 Análisis de cepas de expresión.....	34
8.3 Fermentaciones en matraz con LB + 1% de glucosa.....	36
8.4 Fermentaciones en matraz con medio LB suplementado con extracto de levadura y sales. ...	37
8.5 Fermentaciones medio LB+ Osmolitos.....	39

8.5.1 Medio LB + Arginina.....	39
8.5.2 Medio LB + Trehalosa	40
8.5.3 Medio LB + Sorbitol	42
8.5.4 Medio LB + Sorbitol en matraz.....	43
8.6 Fermentaciones en Biorreactor BIOFLO 110.	45
8.7 Purificación	47
8.7.1 procesamiento de la biomasa.....	47
8.7.2 Cromatografía de afinidad.....	47
8.8 Plegamiento <i>in vitro</i> de la neurotoxina Magi 4	48
8.9 Cálculo de la dosis letal media (DL ₅₀) en ratones y grillos utilizando el método de regresión no lineal.....	49
8.10 Rendimientos.....	50
IX. Conclusiones.....	50
X. Perspectivas	52
XI. Referencias.....	53

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Araña tela de embudo japonesa <i>Macrothele gigas</i>.....	2
Figura 2. Subunidad α de canal de sodio.....	4
Figura 3. Mapa del vector pQE30.....	9
Figura 4 Esquema de un biorreactor tipo tanque agitado.....	14
Figura 5. Tipos de propelas empleados en los impulsores. a) propela tipo Rushton. b) propela abierta c) propela marina.	15
Figura 6. Placas deflectoras en un reactor tanque agitado. a) Sin placas deflectoras b) Con placas deflectoras.....	15
Figura 7. Ubicación ordinaria de los componentes de un reactor.	16
Figura 8. Anatomía del grillo.	17
Figura 9. Diagrama de flujo que indica la estrategia a seguir para la producción y análisis de la neurotoxina Magi 4 de forma heteróloga en <i>E. coli</i>.....	19
Figura 10. Expresión de la neurotoxina Magi 4 en diferentes cepas de <i>E. coli</i> SHuffle, Origami, M15, BL21.....	32
Figura 11. Cienética de crecimiento de las diferentes cepas de <i>E. coli</i> SHuffle, Origami, M15, BL21.....	33
Figura 12. Comparación del crecimiento en las distintas cepas de <i>E. coli</i> SHuffle, Origami, M15, BL21.....	34
Figura 13. Gel de SDS-PAGE al 16% <i>E. coli</i> Origami LB matraz.....	35
Figura 14. Gel de SDS-PAGE al 16% <i>E. coli</i> SHuffle LB matraz.	35
Figura 15. Western blot de la neurotoxina Magi 4 purificada.....	36
Figura 16. Comparación de crecimiento medio LB y medio LB + glucosa.....	37

Figura 17. Gel de SDS-PAGE al 16% Proteínas obtenidas de la expresión de la neurotoxina Magi 4 en medio LB y medio LB+ glucosa:	37
Figura 18. Gráfica de crecimiento medio LB suplementado con extracto de levadura y sales, SHuffle. (Los resultados representan valores promedio y desviación estándar de tres repeticiones).....	38
Figura 19. Gel de SDS-PAGE al 16% medio LB suplementado con extracto de levadura y sales, SHuffle.	38
Figura 20. Gráfica de crecimiento medio LB + Arginina Origami	40
Figura 21. Gel de SDS-PAGE al 16% medio LB + Arginina Origami.	40
Figura 22. Gráfica de crecimiento medio LB + Arginina SHuffle.	40
Figura 23. Gel de SDS-PAGE al 16% medio LB + Arginina SHuffle.	40
Figura 24. Gráfica de crecimiento medio LB + Trehalosa Origami.	41
Figura 25. Gel de SDS-PAGE al 16% medio LB + Trehalosa Origami.	41
Figura 26. Gel SDS-PAGE al 16% medio LB + Arginina SHuffle.	41
Figura 27. Gráfica de crecimiento medio LB + Sorbitol Origami.	43
Figura 28. Gel de SDS-PAGE al 16% medio LB + Arginina Origami	43
Figura 29. Gráfica de crecimiento medio LB + Sorbitol SHuffle	43
Figura 30. Gel de SDS-PAGE al 16% medio LB + Sorbitol SHuffle	43
Figura 31. Gráfica de crecimiento de SHuffle empleando medio LB+ sorbitol.	44
Figura 32. Gráfica de crecimiento de Origami empleando medio LB+ sorbitol.	44
Figura 33. Gel de SDS-PAGE al 16% medio LB+ sorbitol cepa <i>E. coli</i> Origami:	45
Figura 34. Gel de SDS-PAGE al 16% medio LB+ sorbitol cepa <i>E. coli</i> SHuffle	45
Figura 35. Gráfica de crecimiento Reactor medio LB suplementado cepa <i>E. coli</i> SHuffle	46
Figura 36. Gráfica de crecimiento Reactor medio LB cepa <i>E. coli</i> SHuffle	46
Figura 37. Gel de SDS-PAGE al 16% Fermentación reactor medio LB cepa <i>E. coli</i> SHuffle:	46
Figura 38. Gel de SDS-PAGE al 16% Fermentación reactor medio LB suplementado cepa <i>E. coli</i> SHuffle:	46
Figura 39. Perfil cromatográfico empleando una columna C18 HPLC fase reversa obtenido a partir de las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad Ni-NTA.	48
Figura 40. Plegamiento in vitro de la neurotoxina Magi 4 recombinante.	49

II. Índice de tablas

Tabla 1. Descripción comparativa de secuencias de la neurotoxina Magi 4 y con las ACTXs.	4
Tabla 2. Cepas de <i>E. coli</i> frecuentemente empleadas en la producción de proteínas heterólogas y sus características principales.	6
Tabla 3. Promotores de expresión empleados en <i>E. coli</i> para la producción de proteína heteróloga.	7
Tabla 4. Ventajas y desventajas de la localización de las proteínas recombinantes producida en <i>E. coli</i> en los procesos de purificación (Adaptado de Choi et al., 2006)...	8
Tabla 5. Composición por litro medio Luria Bertani.	20
Tabla 6. Composición por litro medio Luria Bertani suplementado con glucosa.	20
Tabla 7 Composición por litro, medio Luria Bertani suplementado con sales y extracto de levadura.	21
Tabla 8. Composición por litro Medio Luria Bertani suplementado con sorbitol. ¡Error! Marcador no definido.	
Tabla 9. Composición por litro medio LB suplementado con Arginina.	22
Tabla 10. Composición por litro medio LB suplementado con Trehalosa.	22
Tabla 11. Composición por litro del tampón PBST.	28
Tabla 12. Cepas de <i>E. coli</i> transformadas.	31
Tabla 13. Elución columna de NI-NTA.	47
Tabla 14. DL₅₀ en ratones y grillos.	50
Tabla 15. Rendimientos.	50

III. Resumen

Los venenos de arañas contienen un rico coctel de neurotoxinas y otros componentes biológicamente activos. Las atracotoxinas *ACTX* incluyendo a la neurotoxina Magi 4, son las únicas neurotoxinas que son letales para mamíferos e insectos. tienen un mecanismo de acción basado en la inactivación de los canales de Na^+ dependientes de voltaje (Na_v), estos Na_v se encargan de regular el paso de los iones sodio a través de la membrana, abriéndose y cerrándose estimulados por un potencial de acción generando y propagando así señales eléctricas en células excitables. Así el estudio de estas toxinas nos ayudaría a comprender un poco más, la estructura y los mecanismos de acción de estas toxinas sobre los Na_v . Sin embargo, una de las limitantes en el estudio de estas toxinas se centra en la poca disponibilidad y bajos rendimientos obtenidos, a partir de la extracción directa del veneno de dichas arañas, buscando una alternativa a esto y con base en el uso de la tecnología del ADN recombinante en *E. coli*, se han logrado expresar toxinas de arañas con que van desde los 0.7 a 20 mg/L, cabe destacar que las toxinas no siempre son activas. Algunos trabajos proponen resolver esto mediante el uso de diferentes cepas de *E. coli*, sistemas de producción o modificaciones en el medio de cultivo, que favorezcan la producción de toxinas solubles. Con el objetivo de generar toxinas recombinantes activas que pudieran sustituir los métodos tradicionales de obtención de estas. Es por esta razón que el presente trabajo pretende expresar de forma heteróloga la neurotoxina Magi 4 en diferentes cepas de *E. coli* partiendo de una construcción en el vector pQE-30 y la secuencia de la neurotoxina Magi 4 previamente diseñada, funcional y estable, para después realizar fermentaciones con diferentes medios de cultivo y sistemas buscando obtener las neurotoxinas de forma soluble y activa. Finalmente, las neurotoxinas obtenidas a partir de estas fermentaciones serán probadas en modelos de ratones y grillos para verificar si las neurotoxinas recombinantes poseen el mismo efecto farmacológico que las nativas.

I. Introducción

Las arañas (Araneae) son el orden más numeroso de la clase Arachnida más de 47000 especies han sido descritas actualmente (World Spider Catalog versión 19.0 2018), a nivel mundial solo cuatro géneros son considerados de importancia médica, los cuales son: genero *Latrodectus*, *Loxosceles*, *Phoneutria* y *Atrax*. Las arañas del genero *Atrax* es un género de arañas venenosas que se encuentran en Australia. Pertenecen a la familia Atracidae, comúnmente conocidas como arañas australianas de tela de embudo. El género fue erigido por el reverendo Octavius Pickard-Cambridge en 1877. La familia Atracidae está formada de tres generos *Atrax*, *Hadronyche*, *Illawarra*, comprising 35 de estas especies poseen venenos extremadamente tóxicos, los cuales poseen una afinidad muy fuerte por sus sitios blanco, Na_v de mamíferos e insectos produciendo afecciones en el sistema nervioso central y periférico (Escoubas *et al.*, 2006).

1.1 Delta Atracotoxinas

Las *ACTX* se descubrieron primeramente en el veneno de las arañas pertenecientes al género *Atrax* y son las únicas neurotoxinas que son letales para mamíferos e insectos. Las *ACTX* son de naturaleza peptídica y se caracterizan por estar conformadas por alrededor de 42 residuos, de los cuales ocho son cisteínas, que a su vez forman cuatro enlaces disulfuro intramoleculares. Estos se sitúan en los residuos de cisteína tanto en el N-terminal como en el C- terminal, un residuo de triple cisteína (14-16) y una alta proporción de aminoácidos básicos (Nicholson *et al.*, 2002). Las *ACTX* tienen un mecanismo de acción basado en la inactivación de los canales de Na^+ dependientes de voltaje (Na_v). Los Na_v se encuentran en la membrana de la célula están formados por una sola cadena polipeptídica que consta de cuatro dominios homólogos (DI-DIV), cada uno de los cuales contiene seis segmentos α -hélice transmembranales (S1-S6) (George, 1990). Los canales Na_v se encargan de regular el paso de los iones sodio a través de la membrana, abriéndose y cerrándose estimulados por un potencial de acción generando y propagando así señales eléctricas en células excitables (Cooper, 2010). Por lo menos se conocen 10 genes diferentes que codifican para distintas isoformas de Na_v , los cuales se han expresado funcionalmente en mamíferos (Goldin *et al.*,

2001). Los subtipos de los Na_v se caracterizan por su sensibilidad a la tetrodotoxina (TTX), pudiendo ser sensibles o insensibles a concentraciones nanomolares. En contraste, en los insectos se cree que expresan un solo gen llamado *para*, donde el ARN es sometido a un amplio splicing alternativo, en *Drosophila melanogaster* se han identificado 2 genes de canales de sodio *para* y *DSCI*, pero el gen *para* es el único que ha demostrado que codifica un canal de sodio funcional. Éste gen está muy conservado entre distintas especies de insectos, sin embargo, posee una homología muy baja con los genes de Na_v de mamíferos (Yamaji *et al.*, 2009).

Una vez que las *ACTX* se unen a sus receptores específicos en la superficie extracelular (los canales Na_v) éstas disminuyen la inactivación prolongando el flujo de Na^+ , aumentando el potencial de acción y despolarizando la membrana, causando así el cuadro de efectos neurotóxicos (Nicholson *et al.*, 2002).



Figura 1. Araña tela de embudo japonesa *Macrothele gigas*.

II. Antecedentes

2.1 Canales iónicos dependientes de voltaje (Na_v)

Las células cuentan con dos tipos principales de proteínas que permiten el paso a través de la membrana: proteínas que permiten transportar moléculas orgánicas específicas a través de ellas y proteínas de membrana que forman un estrecho poro hidrofóbico que fluctúa entre estados abiertos y cerrados por donde se desplazan iones de forma selectiva llamados canales iónicos (Catterall *et al.*, 1992). Los Na_v son complejos multiproteicos constituidos por una subunidad α ~ 260 kDa que forma el poro por donde transitan los iones en respuesta a despolarizaciones del potencial de membrana y una o dos subunidades auxiliares β (~40 kDa), cuya función clásica consiste en modular el tráfico y las propiedades biofísicas de la

subunidad principal (Catterall *et al.*, 2000). La subunidad α es una proteína formada por cuatro dominios homólogos y cada dominio consiste de seis segmentos transmembranales (S1 a S6) unidos por asas intra y extracelulares (Figura 2). Hasta el momento funcionalmente se han caracterizado nueve subunidades α ($\text{Na}_v1.1$ - $\text{Na}_v1.9$), cada una codificada por un gen distinto (SCN1A-SCN5A, SCN8A, SCN11A), clasificadas por su homología (Catterall *et al.*, 2003) y sensibilidad a la tetrodotoxina (TTX). Las subunidades $\text{Na}_v1.1$ - $\text{Na}_v1.4$, $\text{Na}_v1.6$ y $\text{Na}_v1.7$ son consideradas sensibles a la TTX, ya que la IC_{50} de la toxina requerida para bloquear su actividad se encuentra en el rango nanomolar; mientras que las subunidades $\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.8$ y $\text{Na}_v1.9$ son resistentes a la TTX, ya que se requieren concentraciones micromolares para bloquearlas (Catterall *et al.*, 2005). Estos canales de Na_v tienen estructura y funciones similares, pero llevan a cabo su potencial de acción en diferentes células como lo son células nerviosas, musculares y neuroendocrinas sin embargo en células no excitables aun no es muy claro su papel. La neurotoxina Magi 4 fue aislada del veneno de la araña tela de embudo japonesa, *Macrothele gigas*. Ilustrada en la Figura 1. Esta neurotoxina Magi 4 consta de 43 aa y comparte una homología DEL 60 % con las ACTX de las arañas tela de embudo australianas (Tabla 1). La particularidad de la neurotoxina Magi 4 es que tiene una alta afinidad con el sitio receptor 3 en los Na_v de insectos, como lo hacen las ACTX, por lo contrario, la neurotoxina Magi 4 no compite por este en los Na_v de mamíferos, a pesar de ser letal a estos, por lo que se especula que se une a un sitio todavía no descrito pero adyacente al sitio 3. Además, también se ha demostrado que la neurotoxina Magi 4 disminuye selectivamente la inactivación de los canales Na_v 1.1, 1.3 y 1.6 en mamíferos y muestra una alta afinidad por el canal Na_v para en insectos (Yamaji *et al.*, 2009).

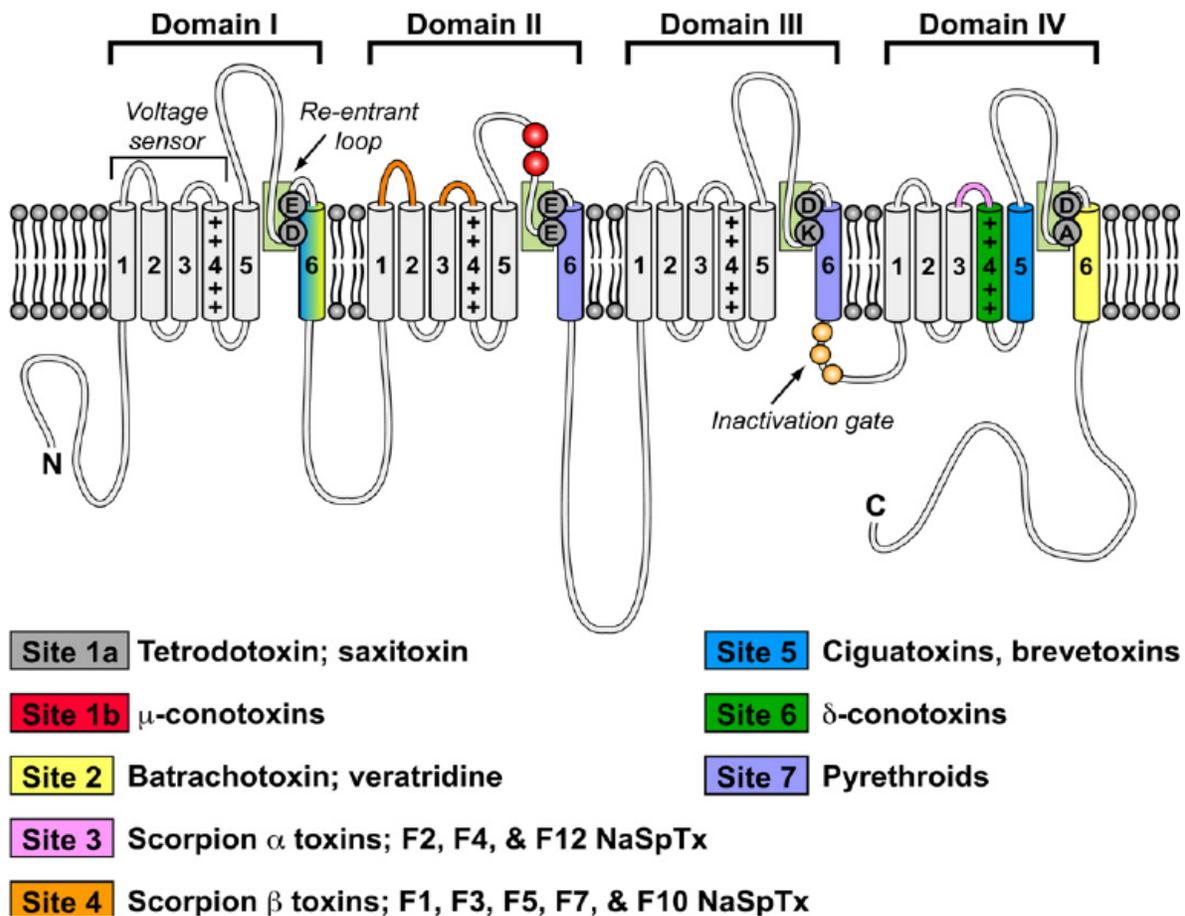


Figura 2. Subunidad α de canal de sodio.

Tabla 1. Descripción comparativa de secuencias de la neurotoxina Magi 4 y con las ACTXs.

	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Identidad %	Homología %
<i>M. gigas</i>	Magi 4	CGSKRAWCKEKDCCCGYNCVYAWYNQQSSCERKWKYLFTGEC	100	100
<i>H. versuta</i>	ACTX-Hv1a	CAKKRNWCGKTED-CCCPMKCVYAWYNEQGSQSTISALWKK-C	49	56
<i>A. robustus</i>	ACTX-Ar1	CAKKRNWCGKNED-CCCPMKCIYAWYNQQGSCQTTITGLFKK-C	51	56
<i>H. versuta</i>	ACTX-Hv1b	CSRSDGWCGKTED-CCCPMKCIKAWYKQNGNCQNTISAIWKN-C	29	41

Muchos péptidos pueden ser sintetizados químicamente, o expresados mediante la tecnología del ADN recombinante. Aun así, generalmente el tamaño del péptido determina la forma más adecuada de producción (Vlieghe *et al.*, 2010); esto es, péptidos cortos <45 aa pueden ser químicamente sintetizados en un solo evento dependiendo de la estructura secundaria que presenten, si es de estructura tipo alfa-hélice será más fácil de sintetizar que si tuviera una

estructura tipo beta-plegada. Esto debido a la disponibilidad del N-terminal creciente del polipéptido. Péptidos o proteínas mayores en longitud de residuos se recomienda la expresión heteróloga (Yamaji *et al.*, 2009)

2.2 Expresión heteróloga

La expresión heteróloga involucra la identificación del gen correspondiente y su inserción en el huésped para la síntesis de la proteína codificada (Terpe, 2006). La elección del sistema de expresión y el vector es un paso crítico en éste proceso, la elección se realiza en base al propósito de estudio, es decir, la producción de grandes cantidades de proteína o la investigación de las propiedades funcionales de la proteína clonada. A pesar de la creciente literatura describiendo expresiones proteicas satisfactorias no se puede establecer un conjunto de métodos que garanticen una producción ideal para cada proteína y que sea biológicamente activa (Ausubel *et al.*, 2003).

2.2.1 *Escherichia coli*

La popularidad de la bacteria Gram negativa *E. coli* como organismo preferencial para la expresión de proteínas es debido a su genoma muy bien caracterizado y la posibilidad de contar con una gran variedad de cepas mutantes y vectores de clonación para distintos propósitos además de la habilidad de alcanzar altas densidades ópticas en medios de cultivo baratos. La expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* se desarrolla principalmente en tres sitios, citoplasma, periplasma o la vía de secreción en el medio de cultivo, y dependiendo del sitio de expresión de la proteína, conlleva los posteriores pasos de obtención y purificación de las proteínas (Khow y Suntrarachum, 2012., Freigssner *et al.*, 2009). A pesar de ello una de las desventajas que presenta *E. coli* con respecto a otros sistemas de expresión radica en que muchas proteínas requieren modificaciones postraduccionales, mecanismos químicos por los cuales las proteínas y en particular sus aminoácidos son modificados covalentemente (Prabakaran *et al.*, 2012). Las glicosilaciones son modificaciones post-traduccionales que consisten en la adición de residuos de azúcares a proteínas, y son reconocidas por su papel en la actividad e inmunogenicidad de éstas (Dingermann, 2008, Overton *et al.*, 2014). Pese a los altos rendimientos que genera *E. coli* en la producción de

proteínas heterólogas, estas no siempre son obtenidas en su forma soluble y activa, está sobreexpresión viene acompañada generalmente con la formación de cuerpos de inclusión, agregados proteicos a menudo inactivos y poco solubles (Demain *et al.*, 2009). Dada ésta problemática se han desarrollado una amplia gama de cepas mutantes que pretenden afrontar éstas deficiencias, empleando ingeniería genética en cepas de *E. coli*, actualmente existen cepas comerciales capaces de promover la formación de enlaces disulfuro, gracias a la modificación de chaperonas moleculares, reductasas y oxidorreductasas, enzimas encargadas de facilitar el ambiente intracelular adecuado para promover la formación de tales interacciones covalentes, entre las cepas más utilizadas se encuentran *E. coli* BL21, apta para la producción de biomasa a gran escala, C43 (DE3) favorece la expresión de proteína soluble, Origami, la cual tiene mutados los genes tiorredoxin reductasa y glutatión reductasa con el propósito de formar puentes disulfuro en el citoplasma bacteriano (Sorensen *et al.*, 2005). En la (Tabla 2) se muestran algunas características de éstas cepas.

Tabla 2. Cepas de *E. coli* frecuentemente empleadas en la producción de proteínas heterólogas y sus características principales.

Cepa	Derivación	Características
AD494	K-12	Mutante <i>trxB</i> , facilita la formación de puentes disulfuro.
BL21	B834	Inactivada en las proteasas <i>Ion</i> y <i>ompT</i>
BL21 <i>trxB</i>	BL21	Mutante <i>trxB</i> , facilita la formación de puentes disulfuro. Inactivada en las proteasas <i>Ion</i> y <i>ompT</i>
BL21 CodonPlus-RIL	BL21	Aumenta la expresión de genes con codones poco frecuentes en <i>E. coli</i> . Inactivada en las proteasas <i>Ion</i> y <i>ompT</i>
BL21 CodonPlus-RP	BL21	Aumenta la expresión de genes con codones poco frecuentes en <i>E. coli</i> . Inactivada en las proteasas <i>Ion</i> y <i>ompT</i>
BLR	BL21	Mutante en <i>recA</i> , estabiliza la expresión de tándems. Inactivada en las proteasas <i>Ion</i> y <i>ompT</i>
B834	Cepa B	Auxótrofa en metionina.
C41	BL21	Mutante para expresión de proteínas de membrana.
C43	BL21	Doble mutante para expresión de proteínas de membrana.
HMS174	K-12	Mutante en <i>recA</i> , resistente a Rif
JM 83	K-12	Diseñada para secreción periplásmica.

Origami	K-12	Mutante en <i>trxB/gor</i> , facilita la formación de puentes disulfuro en el citoplasma.
Origami B	BL21	Mutante en <i>trxB/gor</i> , facilita la formación de puentes disulfuro en el cito plasma. Inactivada en las proteasas <i>Ion</i> y <i>ompT</i>
Rossetta	BL21	Aumenta la expresión de genes con codones poco frecuentes en <i>E. coli</i> . Inactivada en las proteasas <i>Ion</i> y <i>ompT</i>
SHuffle	K12	Mutante que expresa una isomerasa DsbC. Que facilita la formación de puentes disulfuro

2.2.2 Promotores empleados en *E. coli*

El gen codificante de la proteína heteróloga que se quiere expresar debe de ser clonada bajo el control de un promotor bien caracterizado (Terpe, 2006). Si bien muchos promotores de *E. coli* se han descrito, solo unos pocos son comúnmente utilizados (Tabla 3), un promotor útil debe de ser fuerte, con un bajo nivel de expresión basal (que sea fuertemente regulado), de fácil transferencia a otra cepa de *E. coli* y tener una inducción simple de bajo costo.

Tabla 3. Promotores de expresión empleados en *E. coli* para la producción de proteína heteróloga.

Sistema de expresión basado en	Inducción/ inductor	Niveles de expresión	Principales características
Promotor lac	Adición de IPTG 0.05-0.2 Mm	Bajo-Medio	Apropiada para productos génicos a niveles intracelulares muy bajos.
Promotor tcr y tac	Adición de IPTG 0.05-0.2 Mm	Alto	Expresión basal alta.
RNA polimerasa de T7	Adición de IPTG 0.05-0.2 Mm	Muy alto	Utiliza la RNA polimerasa de T7.

La purificación de las proteínas recombinantes producidas por *E. coli* puede seguir varias vertientes (Cisneros *et al.*, 2005), dependiendo de la localización de la proteína recombinante, la cual también proporciona ciertas ventajas según cada caso, se muestra en la (Tabla 4). Si la proteína recombinante fue acumulada en el citoplasma, el primer paso es la ruptura celular, ésta se puede llevar a cabo empleado medios mecánicos o químicos.

Tabla 4. Ventajas y desventajas de la localización de las proteínas recombinantes producida en *E. coli* en los procesos de purificación (Adaptado de Choi *et al.*, 2006).

Lugar de acumulación	Ventajas	Limitaciones
Citoplasma	Frecuentemente forma cuerpos de inclusión, se puede remover la mayoría de los contaminantes.	Requiere replegamiento posterior.
Periplasma	Se pueden formar puentes disulfuro, se pueden emplear señales de secreción naturales.	La translocación es empírica y muchas veces ineficiente.
Secreción extracelular	Facilidad de cosecha del producto con buena pureza en el sobrenadante. Razonablemente eficiente para péptidos.	La maquinaria de secreción no está completamente estudiada y es ineficiente para proteínas grandes.

2.3 pQE-30

La información genética de la proteína a producir usualmente se inserta en un vector (plásmido) de expresión, por ejemplo, pQE30 (Figura 3) este vector sirve para la expresión, purificación detección y ensayo de proteínas recombinantes fusionadas a 6 residuos de histidinas consecutivos. Los vectores pQE son vectores de alto nivel de expresión y bajo número de copias. Basado en el sistema de transcripción promotor T5-traduccion, los plásmidos pQE pertenecen a la familia de los plásmidos pDS. Posee el promotor del fago T5 que es reconocido por la RNA polimerasa de *E. coli* y dos operadores lac que aumenta la represión por la unión de lac lo que asegura una eficiente represión. Además, cuenta con el sitio sintético de unión a ribosoma (RBSII), para una alta tasa de traducción, la etiqueta de seis histidinas se encuentra en el extremo 5' de la región de clonado y permite que la proteína fusionada a la etiqueta pueda ser purificada mediante una cromatografía de afinidad con la resina Ni-NTA (Ácido níquel-nitrilotriacético). Cuenta con un sitio múltiple de clonado y codones de stop traducionales en todos los marcos abiertos de lectura para la preparación de construcciones de expresión apropiadas. Dos terminadores transcripcionales fuertes t0 (del fago λ) y T1 del rrnB del operón de *E. coli*.

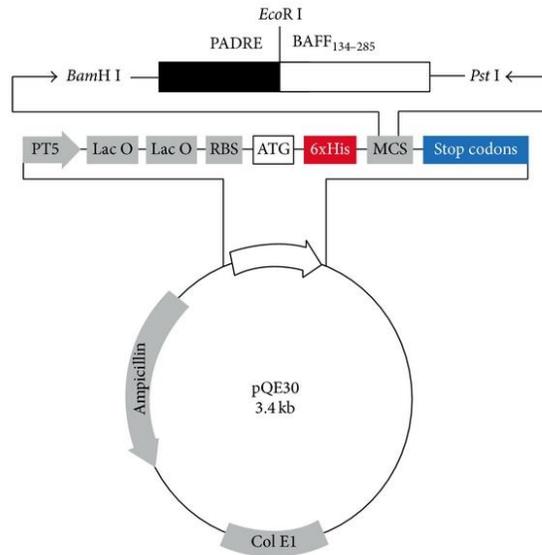


Figura 3. Mapa del vector pQE30.

Etiqueta de histidinas en el extremo N terminal. PT5: promotor T5, Lac O: operador lac. RBS: sitio de unión a ribosoma, ATG: codón de inicio, 6xHis: secuencia de etiqueta con seis histidinas, MCS: sitio múltiple de clonado con sitios de restricción indicados, Stop Codons : codones de paro en los tres marcos abiertos de lectura, Col E1: origen de replicación, Ampicilina: gen de resistencia a ampicilina, lac^q: gen represor de lac^q.

El gen de β -lactamasa (*bla*) le confiere resistencia a ampicilina 100 μ g/mL esto permite emplear una presión de selección para asegurar que crecen únicamente las células que contienen dicho plásmido, ya que, debido a efectos de segregación, el plásmido podría perderse y las células libres de plásmido crecerían más rápido (al carecer de la carga metabólica impuesta por el mismo plásmido), desplazando a las células portadoras del gene de interés con la consecuente pérdida de productividad. Sin embargo, la expresión del gene de resistencia al antibiótico es probablemente el origen principal de carga metabólica (Rozkov *et al.*, 2004).

2.4 Cuerpos de inclusión

Los cuerpos de inclusión (CI) son agregados celulares insolubles formados durante la sobreexpresión de proteínas heterólogas en *E. coli* ocurre principalmente debido a la agregación de proteínas parcialmente plegadas (intermediarios de plegamiento) en los espacios periplasmáticos y citoplasmáticos de *E. coli*. Para poder disponer de la proteína contenida en los CI se requiere romper las interacciones que los mantienen unidos con agentes caotrópicos, reductores o detergentes que permiten la disociación de las interacciones

y solubilizan la proteína (Choi *et al.*, 2004). Expresar proteínas que se dirijan hacia CI no supone necesariamente una desventaja, a pesar de no estar bien plegada o en su forma activa presenta ventajas destacables tales como: vectores menos complejos, si la proteína fuera tóxica para la bacteria, ésta se encuentra inactiva y deja de ser tóxica, existe un alto nivel de expresión, menor degradación que en forma soluble, resistencia a ataques proteolíticos y un fácil aislamiento de las proteínas de interés. Algunas de las principales desventajas que presentan los CI son el elevado costo para escalar el proceso de obtención y la purificación de las proteínas contenidas en los mismos, al solubilizar las proteínas éstas se desnaturalizan y deben replegarse, aunado a esto si la proteína forma puentes disulfuro ésta debe reducirse hasta su forma lineal y posteriormente oxidarse, por ésta razón se desarrollan diferentes metodologías y modificaciones en las cepas para obtener la proteína de forma soluble y activa. (Jonasson *et al.*, 2002).

2.5 Medios de cultivo

Un punto crítico en la producción de proteínas recombinantes, es la adecuada elección del medio de cultivo, ya que este juega un papel muy importante en los rendimientos obtenidos y en algunos casos a la expresión de estas en su forma soluble y activa.

2.5.1 Medio LB

Este medio es el más empleado en biología molecular para cultivos celulares, el cual permite un rápido crecimiento de células de *E. coli*, dicho medio contiene una fuente rica en aminoácidos (triptona), además contiene ácidos nucleicos y lípidos contenidos en el extracto de levadura. Una de las limitantes del LB es que solo permite crecimientos celulares que alcanzan una DO_{600} , de 2 a 3 unidades por esta razón existen múltiples modificaciones a este medio dependiendo del microorganismo que se utilice, sin embargo, en términos generales una vez que el cultivo alcanza una DO_{600} , de 0.3 el crecimiento se vuelve exponencial y la fuente de carbono se vuelve limitante obligando a la bacteria a utilizar los aminoácidos catabolizables del medio como fuente de energía. Una vez alcanzadas estas densidades la mayor parte de la energía es dirigida hacia la producción de metabolitos secundarios, y en menor proporción a la producción de biomasa lo que puede resultar favorable para una producción a escala laboratorio (Sezonov *et al.*, 2007). Sin embargo, la composición elemental aproximada en *Escherichia coli* corresponde a los siguientes porcentajes (% del

peso seco): Carbono 50%, Oxígeno 20%, Nitrógeno 14%, Hidrógeno 8%, Fósforo 3%, Azufre 1%, Potasio 1%, Sodio 1%, Calcio 0.5%, Magnesio 0.5%, Cloro 0.5%, Hierro 0.2%, Todos los demás 0.3% (Stanier, Dourofoff, Adelberg, Microbiología, 1977). Como se puede observar el porcentaje de estos elementos representa aproximadamente 80% del peso total del *E. coli*, la fuente de carbono se obtiene fundamentalmente de materiales orgánicos: glucosa, fructosa, glicerol etc. éste proporciona el esqueleto carbonado básico para la síntesis de las unidades estructurales que dan origen a las macromoléculas y estructuras de la célula, por lo general en el proceso catabólico de éstos compuestos, produce la energía necesaria para los procesos biosintéticos y el funcionamiento celular. El segundo elemento de gran importancia es el nitrógeno este representa del 8 al 15% en peso seco de *E. coli*, es un componente esencial de la proteína, ácidos nucleicos membrana celular y demás estructuras celulares. Éste debe ser incorporado en el medio en forma de compuestos orgánicos como extracto de levadura, soya que contienen nitrógeno en estado reducido o bien suministrar el nitrógeno de forma inorgánica en algunas sales de amonio. En lo que concierne a los elementos en menor proporción como el fosforo forma parte de los ácidos nucleicos, fosfolípidos y proteínas este suele requerirse en forma de fosfatos orgánicos e inorgánicos. El azufre generalmente en la célula se encuentra en su forma reducida como grupo sulfhidrilo y se adiciona al medio en forma de azufre para posteriormente ser reducido. Finalmente, las sales minerales son la fuente de iones como Na^+ , K, Cl y los micronutrientes como Mg y Mn.

2.5.2 Osmolitos

Condiciones ambientales severas, como temperaturas extremas alta presión osmótica o altas concentraciones de urea tienden causar estrés hídrico en las células (Yancey *et al.*, 1982). Muchos organismos han evolucionado para responder a estas condiciones regulando el nivel de pequeños compuestos orgánicos, llamados osmolitos. Se ha encontrado que estos osmolitos pueden influir y estabilizar el plegamiento nativo de proteínas (Viña., 2012). Existen 12 moléculas de osmolitos, sugiriendo un mecanismo subyacente universal aun no bien descrito. Teorías contrastantes se han propuesto implicando la interacción del solvente con los osmolitos como agente estabilizador. Los osmolitos han demostrado ser útiles en la

inhibición de la agregación de proteínas durante el replegamiento de proteínas mal plegadas *in vitro*. La incorporación de osmolitos tales como aminoácidos, azúcares y bajas concentraciones de agentes caotrópicos en el tampón de renaturalización da como resultado un alto rendimiento de replegamiento de proteínas recombinantes. La arginina ha sido una de las más empleadas en la solubilización de proteínas disminuyendo la formación de cuerpos de inclusión (Tsumoto *et al.*, 2010). De igual forma (Prasad *et al.*, 2011) demostró que al añadir concentraciones molares elevadas de osmolitos como la Arginina, sorbitol y trealosa en el medio de cultivo, una parte de la producción de proteína heteróloga unida a GFP se expresaba de forma soluble en mayor cantidad, es decir parte de la proteína producida anteriormente en cuerpos de inclusión ahora se dirigía hacia citoplasma, teniendo un efecto positivo en la producción de proteína soluble.

2.6 Purificación

Una vez establecidas las condiciones de expresión, el paso de purificación se basa en el aprovechamiento de las propiedades físico químicas de los componentes celulares teniendo en cuenta el grado de pureza que se desea alcanzar (Walls *et al.*, 2011).

2.6.1 Purificación por cromatografía de alta resolución

La cromatografía en columna es una técnica que se emplea en el fraccionamiento de mezclas proteicas haciéndolas pasar por una matriz sólida porosa que se encuentra inmersa en un solvente, posteriormente se hace pasar un gradiente de solvente a través de la columna y en consecuencia las proteínas van retrasándose de manera distinta según sus interacciones con la matriz, por lo que son recuperadas de forma separada a medida que éstas son eluidas de la columna, según el tipo de interacción de la proteína con la matriz éstas se pueden dividir en hidrofobicidad (interacciones), intercambio iónico (carga), tamaño (exclusión molecular) unión específica a grupos químicos (afinidad). Sin embargo, en la práctica, la selección del método de purificación está determinada por las condiciones a las que sea estable el metabolito de interés (McCluskey *et al.*, 2007; Tejeda *et al.*, 2011).

2.6.2 Cromatografía de afinidad a metal inmovilizado

Esta cromatografía emplea compuestos quelantes de unión covalente a soportes sólidos insolubles, para atrapar iones metálicos y utilizarlos como ligandos de afinidad a proteínas, valiéndose de los residuos de los aminoácidos expuestos en la superficie de la proteína. Esta tecnología fue introducida por Porath y colaboradores en 1975 y consiste de una matriz porosa, generalmente de agarosa con grupos quelantes como ácido iminodiacético (IDA) ácido nitrilotriacético (NTA) y carboximetil aspartato (Cm Asp) comercialmente el metal quelado más común es el níquel, aunque también existen resinas con cobalto, zinc o cobre (Block *et al.*, 2009). A pesar de que el metal es inmovilizado en la resina éste aún puede formar enlaces covalentes con una base, como nitrógeno aromático en el grupo imidazol de un residuo de histidina, siendo éste el aminoácido mejor retenido, ésta es la razón por la cual se emplean frecuentemente etiquetas de His. Posteriormente las proteínas se eluyen incrementando las concentraciones de imidazol en la fase móvil o bajando el pH, debido a que las moléculas de imidazol compiten con las His por los sitios de unión y al disminuir el pH se cambia la ionización de los residuos disminuyendo la capacidad para donar un electrón e interactuar con el metal (Gaber *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004). La neurotoxina Magi 4 se puede purificar mediante las diferencias de carga, hidrofobicidad y tamaño con respecto a los contaminantes que la acompañan.

2.7 Biorreactores

Un fermentador, también conocido como reactor o biorreactor, es un recipiente donde se lleva cabo un proceso de fermentación. Su función principal es mantener el medio y el microorganismo en condiciones adecuadas para lograr la mayor producción de metabolitos de interés, los biorreactores deben proporcionar las condiciones propicias del entorno, tienen que ser capaces de mantener condiciones adecuadas de homogeneidad, una medición y control de las variables. Los biorreactores tipo tanque agitado son los más ampliamente utilizados y sus escalas pueden ir desde unos cuantos mililitros hasta los cientos de metros cúbicos, la agitación es un parámetro importante ya que ésta mantiene las células en suspensión y además interviene para proporcionar una mejor transferencia de oxígeno (Bolívar, 2007). Es deseable que el fermentador cumpla con una serie de requisitos entre los que se encuentran: Consumo bajo de energía, capacidad para mantener uniforme el medio de

cultivo, buena transferencia de calor, un control automático de pH, buena transferencia de oxígeno y facilitar la toma de muestra en tiempo real (Galindo *et al.*, 2007)

2.7.1 Reactor tipo tanque agitado

El reactor que se encuentra en el grupo de trabajo está compuesto, por un tanque de vidrio de 5 L con un motor ubicado en la parte superior de éste para la agitación del caldo de cultivo. Las partes principales de éste biorreactor son: Sistema de agitación (motor e impulsor), deflectores, dispositivos de adición y control (toma de muestra soluciones ácido base), sistema de aireación, sistema de transferencia de calor, termopar, sensores de temperatura oxígeno disuelto y pH. Cabe destacar que cada uno de los parámetros mencionados se pueden controlar de forma automática mediante la unidad de mando Bio Flow 110. El cual se muestra en la (figura 4).



Figura 4 Esquema de un biorreactor tipo tanque agitado

Las principales funciones que cumple el sistema de tanque agitado es:

Aumentar la transferencia de oxígeno al medio de cultivo, éste se da cuando el difusor suministra oxígeno al medio por la parte inferior del reactor y choca con las propelas rompiendo las burbujas, formando burbujas de menor tamaño y finalmente haciéndolas entrar en un flujo turbulento como se observa en la imagen. Dando lugar a un fenómeno que se denomina edad de la burbuja. De ésta forma la transferencia de masa se ve favorecida además de realizar correcta distribución de los nutrientes en el medio de cultivo (Hernández *et al.*,

2003). Los impulsores son dispositivos utilizados para dar movimiento al medio de cultivo. Su número se define con base en el tamaño del reactor, y su disposición dentro del fermentador depende de la configuración geométrica del recipiente. Existen diferentes tipos de impulsores que se diferencian básicamente por el tamaño de las paletas en la (figura 5) se muestran los más comunes.

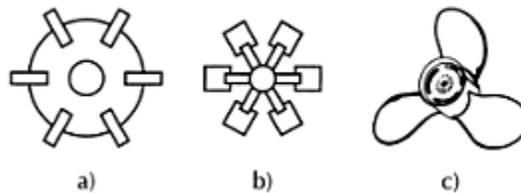


Figura 5. Tipos de paletas empleados en los impulsores. a) paleta tipo Rushton. b) paleta abierta c) paleta marina.

Las placas deflectoras o baffles (Figura 6) o también denominados corta corrientes. Son placas colocadas a lo largo del reactor, muy cerca de sus paredes, y se utilizan para evitar la formación de un vórtice, y así, mejorar el mezclado del caldo de cultivo. Generalmente se utilizan 3 deflectores, esto depende directamente del tamaño y la configuración geométrica del biorreactor en la siguiente imagen se ilustra el fenómeno antes descrito.

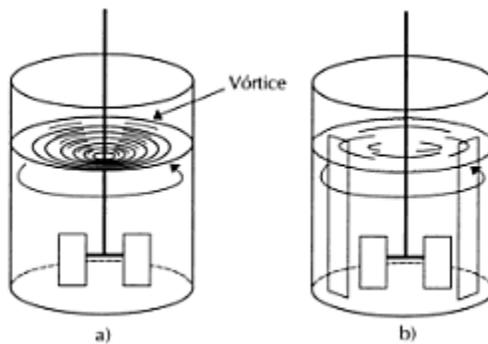


Figura 6. Placas deflectoras en un reactor tanque agitado. a) Sin placas deflectoras b) Con placas deflectoras.

2.7.2 Sistema de aireación

La mayoría de organismos requieren de oxígeno (en mayor o menor cantidad) para el desarrollo del microorganismo. El oxígeno es muy poco soluble en agua, por lo que se debe suministrar continuamente. El aire es incorporado por una bomba y posteriormente se pasa a

través de filtros con un diámetro de poro de 0.22 micras, para impedir el paso de cualquier microorganismo, permitiendo mantener la inocuidad del reactor, éste es inyectado por la parte inferior, próximo a las propelas de forma que éstas se encarguen de la correcta distribución en todo el fermentador. (Galindo *et al.*, 2012)

2.7.3 Dispositivos de adición, extracción y control

Estos son puertos o aberturas en el reactor, que permiten la adición de antiespumante, ácido o base según lo requiera el medio de cultivo, así como también el drenaje del mismo y toma de muestras del medio de cultivo.

Los dispositivos de control son los sensores de pH, OD, T, nivel de espuma todos estos son colocados en la parte superior del reactor mediante las aberturas que proporciona el reactor como se muestra en la (figura 7), estos deben permanecer sellados para evitar contaminaciones.

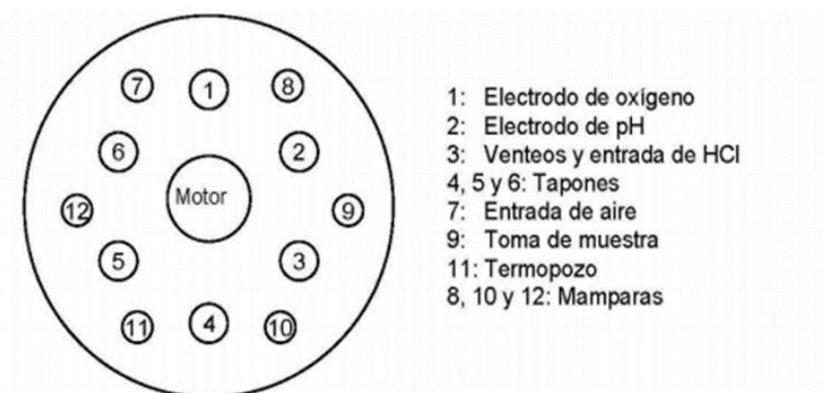


Figura 7. Ubicación ordinaria de los componentes de un reactor.

2.8 Análisis bilógicos

Administración de neurotoxina vía intracraneal en ratones, la administración vía intracraneal es un método empleado cuando es difícil difundir el fármaco por otras vías, este método sobrepasa la barrera hematoencefalica y otros mecanismos que limitan la distribución de los fármacos, permitiendo que altas concentraciones de fármaco entren al compartimiento

central. Los mecanismos de esta barrera son altamente selectivos permitiendo el paso discreto de moléculas hidrófobas O_2 CO_2 , hormonas, péptidos, y productos metabólicos como glucosa. Para la administración via intracraneal, es necesario anestésiar al ratón con un anestésico por inhalación (Cloroformo), para que durante la intervención este permanezca inconsciente a los puntos dolorosos y, por tanto, no responda a ellos (Rang. 2004).

En el caso de los grillos se inyecta la toxina mediante la inyección de la neurotoxina en el pronotum del grillo como se muestra en la (figura 8) ya que este es el medio más rápido para llegar a la hemolinfa.

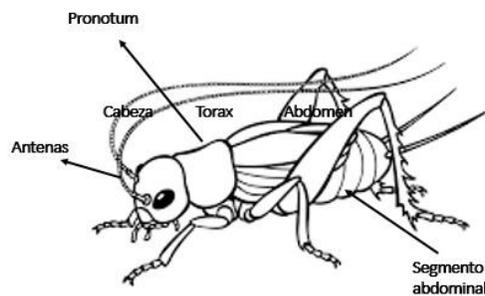


Figura 8. Anatomía del grillo.

IV. Justificación

La neurotoxina Magi 4, posee una gran afinidad por los receptores Nav , de mamíferos e insectos, siendo una herramienta con aplicación en la investigación de la estructura de dichos canales. La obtención de la neurotoxina Magi 4, se ve limitada debido a la escasez de estos arácnidos. Por lo que es de nuestro interés expresar heterológamente la neurotoxina Magi 4 empleando diferentes cepas de *E. coli* en matraces y reactor tanque agitado, para tener una forma viable de producción, y conocer si las variaciones en el medio de cultivo generan moléculas biológicamente activas sin necesidad de plegar *in vitro*.

V. Hipótesis

El medio de cultivo jugará un papel importante, para expresar de manera soluble y con buenos rendimientos la neurotoxina Magi 4, por lo que la variación de estos favorecerá a la obtención de la toxina en su forma activa.

VI. Objetivos generales

A partir del conocimiento actual acerca de la neurotoxina Magi 4, por su interés y potencial biotecnológico, en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos.

- Expresar de forma heteróloga la neurotoxina Magi 4 utilizando diferentes cepas de *E. coli*, medios de cultivo, y sistemas de producción para obtener la toxina recombinante biológicamente activa

6.1 Objetivos particulares

- Producir heterológamente la neurotoxina Magi 4 en *E. coli* Origami SHuffle BL21, y M15 en matraces con diferentes medios de cultivo.
- Producir heterológamente la neurotoxina Magi 4 en la cepa de *E. coli* con mayor producción en reactor tipo tanque agitado utilizando el mejor medio de cultivo obtenido a partir de las fermentaciones en matraces.
- Comprobar la actividad biológica y comparar los rendimientos.

VII. Materiales y métodos

El siguiente trabajo se llevó a cabo siguiendo la estrategia experimental que se muestra en la (figura 9)

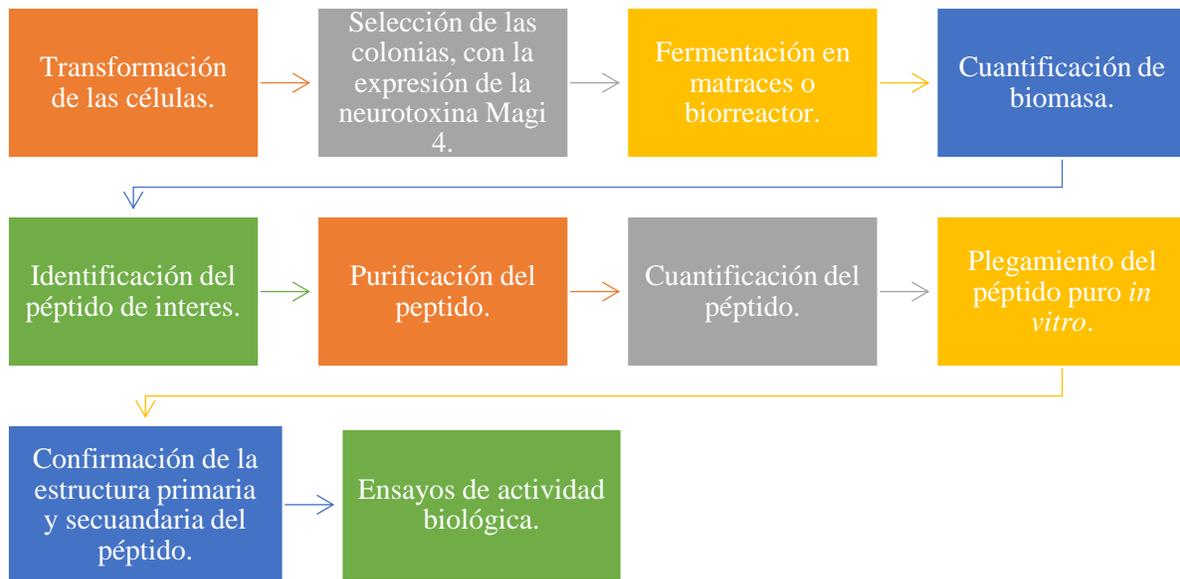


Figura 9. Diagrama de flujo que indica la estrategia a seguir para la producción y análisis de la neurotoxina Magi 4 de forma heteróloga en *E. coli*.

7.1 Cepas bacterianas

En este trabajo se emplearon células quimio competentes de *E. coli*; Origami, SHuffle, BL21, M15 y Rosseta. Provenientes de la colección de cepas del departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBt- UNAM).

7.2 Vectores plasmídicos

Para este trabajo se empleó un vector tipo pQE30 con el respectivo inserto de la neurotoxina Magi 4 (3,576 pb), en las diferentes cepas de *E. coli*. La expresión es dirigida por el promotor del fago T5, y dos terminadores transcripcionales fuertes t0 (del fago λ) y T1 del *rrnB* del operón de *E. coli*. El plásmido lleva incorporado una etiqueta de 6 histidinas, así como como el gen de β -lactamasa (*bla*) que le confiere resistencia a ampicilina, permitiendo la identificación de clonas recombinantes.

7.3 Medios empleados para la expresión de la neurotoxina Magi 4

7.3.1 Medio Luria- Bertani (LB) (Sambrock et al., 2001)

Se utilizó como medio de cultivo base en las fermentaciones con las diferentes cepas de *E. coli* Origami, SHuffle, BL21, M15 y Rosseta.

Tabla 5. Composición por litro medio Luria Bertani.

Componentes	(g)
Bactotripton	10
Extracto de levadura	5
NaCl	5
Agar (para medios solidos)	12

El medio líquido y sólido se esterilizaron a 121° C durante 20 minutos.

7.3.2 Medio Luria- Bertani suplementado con glucosa

Tabla 6. Composición por litro medio Luria Bertani suplementado con glucosa.

Componentes	(g)
Bactotripton	10
Extracto de levadura	5
NaCl	5
Glucosa	5

7.3.3 Medio Luria- Bertani suplementado con sales y extracto de levadura.
(Guillermo de la Rosa 2017).

Tabla 7 Composición por litro, medio Luria Bertani suplementado con sales y extracto de levadura.

Componentes	(g)
Bactotripton	20
Extracto de levadura	30
NaCl	21
NH ₄ H ₂ PO ₄	3.5
KH ₂ PO ₄	3.5
K ₂ HPO ₄	5
Mg SO ₄ ·7H ₂ O	7

Para el medio Luria- Bertani suplementado con sales y extracto de levadura, se esterilizan los compuestos pertenecientes al medio LB, a 121°C por 20 minutos. Posteriormente se disuelven las sales en medio LB y son esterilizadas por filtración (filtro de .22 µm) y se añaden al medio LB.

7.3.4 Medio LB suplementado con osmolitos (Prasad *et al.*, 2011)

Tabla 8. Composición por litro Medio Luria Bertani suplementado con sorbitol.

Componentes	(g)
Bactotripton	10
Extracto de levadura	5
NaCl	5
Sorbitol .4M	73
Sorbitol .5M	91
Sorbitol .6M	109

7.3.5 Medio LB suplementado con Arginina

Tabla 9. Composición por litro medio LB suplementado con Arginina.

Componentes	(g)
Bactotripton	10
Extracto de levadura	5
NaCl	5
Arginina .1M	17
Arginina .2M	35
Arginina .25M	44

7.3.6 Medio LB suplementado con Trehalosa

Tabla 10. Composición por litro medio LB suplementado con Trehalosa.

Componentes	(g)
Bactotripton	10
Extracto de levadura	5
NaCl	5
Trehalosa .5m	171

Para los medios Luria- Bertani suplementados con osmolitos, se esterilizan los compuestos pertenecientes al medio LB, a 121°C por 20 minutos. Posteriormente se disuelven los osmolitos en medio LB y son esterilizadas por filtración (filtro de .22 µm) y se añaden al medio LB.

7.4 Preparación de células competentes

Se crecieron células de *E. coli* como preinóculo, en un tubo con 3 mL de medio LB, se añaden 3 µL de tetraciclina a una concentración de 10 mg/mL, se incuban a 35° C durante toda la noche. Posteriormente se tomaron 1.6 mL del preinóculo y se inoculo un matraz de 250 mL con 50 mL de medio LB y 50 µL de tetraciclina (1:1000), se incubo a 37° C, 250 rpm, hasta que alcanzar una DO₆₀₀ de 0.6 a 0.8, posteriormente se centrifugo el medio a 10,000 rpm por 10 minutos, 4 °C. Se decantó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en una solución 0.1 M de cloruro de calcio, empleando un décimo del volumen del cultivo original, éste se

incubo en hielo durante 2 horas, transcurrido el tiempo se centrifugo a 10,000 rpm por 10 minutos y se decantó el sobrenadante. Nuevamente el pellet se resuspendió en una solución 0.1 M de cloruro de calcio, empleando un décimo del volumen original y se le agregaron 88 μL de Dimetilsulfóxido por cada mL de células en cloruro de calcio. Posteriormente se realizaron alícuotas de 100 μL por vial e inmediatamente se congelaron empleando hielo seco, etanol y se almacenaron a -70°C .

7.5 Producción y purificación del plásmido pQE-30 con el inserto de la neurotoxina Magi 4

La producción del inserto correspondiente al gen de la neurotoxina Magi 4, se realizó purificando el plásmido seleccionado mediante el kit Midi Prep de la casa comercial Bio-Rad®. Para esto se inoculó un matraz de 100 mL que contenía 50 mL de medio LB. Se inoculo con la clona que poseía el plásmido con el inserto del gen de la neurotoxina Magi 4. Después se incubó a 37°C durante toda la noche. Una vez transcurrido este tiempo el cultivo se centrifugó a 5,000 rpms por 5 minutos a 4°C , se desechó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 5 ml de solución de lisis la cual contenía 3 μl de lisozima 1 μl , benzonasa 1:10, 3 mL de Bug Buster. Dejando la solución en agitación a temperatura ambiente durante 45 minutos. El tubo se centrifugó a 8,000 rpms durante 10 minutos a 4°C , el sobrenadante se transfirió a un tubo, se transfirió a una columna de afinidad, el tubo colector se centrifugó 1 minuto a 12,000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se realizó un segundo paso de lavado con 500 μl de solución de buffer de lavado centrifugando el tubo como en el paso anterior. Para eliminar restos de solvente del buffer de lavado, el tubo se centrifugó nuevamente durante 2 minutos a 12,000 rpms, finalmente el plásmido se eluyó con 500 μl de buffer de elución, para ello se reconectó la columna a un tubo eppendorf estéril, la muestra se centrifugó a 12,000 rpms durante 1 minuto, y el plásmido se almacenó 4°C hasta su uso.

7.6 Protocolo de transformación bacteriana.

Se descongelaron células calcio competentes viales de 100 μL , se agregaron de 10 a 15 ng del plásmido pQE30 que posee la secuencia de la neurotoxina Magi 4, se mantuvo en hielo por 15 min, se colocaron los tubos a 42°C por 25 s. Se colocaron los tubos en hielo por 5

min, posteriormente las muestras se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL, que contenían 900 μ L de medio SOC, se incubo por una hora a 37°C y 125 rpm. Una vez transcurrido éste tiempo se centrifugaron los tubos a 6,000 rpm durante 2 minutos. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 200 μ L de agua estéril. Posteriormente se vertió sobre una placa petri que contenía medio LB con ampicilina 100 μ g/mL, se dejaron incubado a 37 °C toda la noche. Transcurrido el tiempo de incubación se identificaron las placas que contenían colonias transformadas y se seleccionaron las 4 colonias que se encontraran más aisladas, éstas colonias se sembraron en placas de agar con LB y 100 μ g de ampicilina.

7.7 Protocolo de fermentaciones

7.7.1 Fermentación en matraz

A partir del resguardo en glicerol se tomó una pequeña alícuota con una punta estéril y se vertió en un tubo de vidrio que contenía 5 mL de medio LB con 100 μ g/mL de ampicilina. con el objetivo de preparar un preinóculo. Este se dejó crecer por 12 horas a 37°C y 250 rpm. Una vez que se obtuvo el preinóculo, este se utilizó para inocular matraces de 250 mL con 50 mL de medio LB, 100 μ g/mL de ampicilina, dejando el medio con una DO_{600} de 0.05, se incubo a 37°C, 250 rpm. Se monitoreo el crecimiento microbiano hasta que alcanzo una DO_{600} entre 0.6 y 0.8, una vez alcanzada ésta DO_{600} se indujo el cultivo con 0.1 mM de IPTG y se dejó el cultivo por 16 horas en las mismas condiciones.

7.7.2 Protocolo de fermentaciones en reactor tanque agitado

7.7.2.1 Biorreactor BIOFLO 110 BIOSTAT®B (Braun Biotech Internacional).

Este biorreactor tiene una capacidad de 5 L el cual debe operarse al 80% de su capacidad.

7.7.2.2 Preparación de inóculo

En dos matraces de 250 mL con 50 mL de medio LB estéril con 100 μ g/mL de ampicilina. Se agregaron 5 μ L de stock glicerol de las cepas transformantes (almacenadas a -70°C), posteriormente se incubó durante toda la noche a 37° C y 250 rpm de agitación.

7.7.2.3 Preparación del biorreactor

Se calibro el sensor de pH, con 3 soluciones tampón a pH 4, 7 y, 10 hasta obtener lecturas estables. Posteriormente se calibro el sensor de oxígeno disuelto. La calibración se puede hacer de varios modos empleando una solución saturada de sales, lo cual indicaría 0% de oxígeno o bien, haciendo fluir aire con un difusor en agua por 5 minutos, lo cual indicaría 100% de saturación. Posteriormente se colocaron los dispositivos de medición, adición y extracción en los sitios indicados, se adiciono el medio de cultivo, hasta completar 80% de su capacidad (4 L), una vez con el medio cargado éste se esterilizo, empleando una autoclave tipo Tomy a 121°C 25 minutos. Una vez finalizada la esterilización, se conectó el biorreactor a la unidad de control, se fijaron las condiciones de operación pH (7.0), temperatura 37°C, rpm 250 y flujo de oxígeno 1.5 vvm; se agregaron 200 µL de antiespumante (aceite de silicón al 30%) y ampicilina 100 µg/mL.

7.7.2.4 Inoculación

Una vez alcanzadas las condiciones de operación, 37°C, pH 7, 200 rpm de agitación, y 1.5 vvm; se determinó la cantidad de inóculo necesario para partir con la fermentación a una DO₆₀₀ de 0.05, y ésta se agregó al biorreactor.

7.7.2.5 Inducción

Se tomaron muestras cada hora hasta alcanzar la densidad óptica deseada; 0.6 a 0.8 DO₆₀₀, en éste punto se agregó IPTG para alcanzar una concentración de 0.1 mM en el medio.

7.7.2.5 Finalización

La fermentación finalizó 16 horas después de la inducción. Posteriormente se recuperó la biomasa mediante centrifugación.

7.8 Medición del Crecimiento Celular

El crecimiento celular fue monitoreado mediante mediciones constantes de una DO₆₀₀, cada muestra fue medida en cubetas de 1 mL, y fueron diluidas con medio LB. Los gramos de peso seco de bacterias se determinaron mediante una curva de calibración. Para elaborar la curva de calibración se llevó a cabo un cultivo de células de *E. coli* sin inducir. Una vez finalizado el cultivo, al día siguiente, se midió la densidad óptica alcanzada y se prepararon

variadas diluciones; con agua destilada, en tubos eppendorf. Se midió la densidad óptica a las muestras. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 13,000 rpm durante 3 minutos, los sobrenadantes fueron descartados y los tubos con el pellet fueron secados en el savant durante 8 horas hasta eliminar toda la humedad. Finalmente, los tubos con pellet fueron pesados y se restó el peso del tubo obteniendo, de éste modo, se obtuvo el peso seco de las células. La curva de calibración fue utilizada para determinar el rendimiento de los cultivos (concentración total de proteína).

7.9 Determinación peso seco

El crecimiento celular fue monitoreado mediante mediciones constantes de absorbancia a 600 nm. Cada muestra fue medida en cubetas de 1 mL y fueron diluidas con medio LB. Los gramos de peso seco de las bacterias se determinaron mediante una curva de calibración figura A1 (ver anexo). Para elaborar la curva de calibración se llevó a cabo un cultivo de células de *E. coli* SHuffle sin inducir. Una vez finalizado el cultivo, al día siguiente, se midió la densidad óptica alcanzada y se prepararon variadas diluciones; con agua destilada, en tubos eppendorf. Se midió la densidad óptica a las muestras diluidas a 600 nm. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 13,000 rpm durante 3 minutos. Los sobrenadantes fueron descartados, y los tubos con el pellet fueron secados en el savant durante 8 horas hasta eliminar toda la humedad. Finalmente, los tubos con pellet fueron pesados, y se restó el peso del tubo, obteniendo de éste modo el peso seco de las células. La curva de calibración fue utilizada para correlacionar los valores de absorbancia con la cantidad de biomasa seca contenida en un cultivo.

7.10 Procesamiento de biomasa

Una vez terminada la fermentación, el primer paso a seguir es la recuperación de las células por centrifugación, ésta operación se realizó en una centrifuga de columpio a 7,000 g por 15 minutos. Posteriormente se decanta el sobrenadante y, se pesa la biomasa obtenida.

7.10.1 Rompimiento celular

Una vez obtenida la biomasa el siguiente paso fue la ruptura celular, para esto se resuspendió la biomasa en 30 mL de tris HCl 50 mM posteriormente la muestra se pasó por un homogenizador de alta presión llamado prensa french la cual se ajusta a 35 kPa de presión pasando alícuotas de 5 mL cada una hasta finalizar el volumen de muestra.

7.10.2 Solubilizar cuerpos de inclusión

Una vez obtenidos los cuerpos de inclusión estos se resuspendieron en buffer Tris HCl 50 mM y se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 minutos, este paso se repitió 3 veces con el objetivo de lavar los cuerpos de inclusión. Posteriormente se resuspendió en 30 mL de cloruro de guanidonio 6M hasta disolver todos los gránulos y se dejó en agitación 12 horas a 4°C.

7.11 Purificación Ni-NTA

Se colocó una columna de plástico QUIAGEN de 10 mL en un soporte con una pinza de tres dedos, posteriormente se realizó un lavado a la columna con 5 volúmenes de agua destilada caliente, se adiciono 3 mL de la resina Ni-NTA a la columna y se lavó con 30 volúmenes de agua tetradestilada, seguido de 10 volúmenes de cloruro de guanidinio 6 M, se hicieron pasar los cuerpos de inclusión, previamente solubilizados por la resina a un flujo lento(2 veces), después se hicieron lavados con 10 volúmenes de cloruro de guanidino 6 M y 5 volúmenes de imidazol 30 mM , para eluir la proteína se empleó una solución 400 mM de imidazol 15 mL, cuando se añadió esta solución se colectaron las fracciones eluidas en tubos eppendorf.

7.12 Electroforesis

El análisis de la expresión de proteínas, en las diferentes cepas se realizó mediante electroforesis, en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Para esto se midió la DO₆₀₀ de las muestras y se tomó la de mayor valor, con el fin de homogenizar la concentración celular en las muestras, una vez homogéneas las muestras se centrifugaron a 6,000 rpm por 3 minutos, y se decantó el sobrenadante. Posteriormente se resuspendió el pellet en 100 µL de Tris HCl a 50 mM, se añadieron los reactivos Bug buster, benzonasa y lisozima a 10, 1, 3

μL, respectivamente, se agitaron por 30 minutos a temperatura ambiente, se centrifugo la suspensión a 13,000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se considera como la fracción soluble, y el pellet la fracción insoluble. La fracción insoluble se resuspendió en 100 μL de Tris HCl 0.5 mM, junto con 6 μL de buffer de carga, estas muestras se sometieron a 100°C por 5 minutos. Los pocillos del gel se cargaron con 20 μL de muestra, en los geles de acrilamida al 16%. La electroforesis se realizó a 60 V mientras el colorante migraba por la porción del gel concentrador, seguido de 150 V hasta que el colorante llego al límite inferior del gel separador. Posteriormente el gel tñó con azul de Coomassie.

7.13 Western Blot

Primero, se requiere la transferencia de las proteínas, separadas por SDS-PAGE, a un soporte solido tal como una membrana de nitrocelulosa. La membrana de nitrocelulosa se colocó sobre el gel de poliacrilamida. A continuación, ambos elementos fueron colocados entre papeles filtro, se humedecieron con buffer de transferencia y las proteínas fueron transferidas por electroforesis hacia el ánodo.

Los sitios de unión no específicos fueron bloqueados con TBS-T y leche en polvo al 10% durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron tres lavados con buffer TBS-T y se incubo con el anticuerpo primario (aniti His de conejo). Los anticuerpos de conejo fueron diluidos en TBS-T. Después se realizaron 3 lavados con TBST-T. Después se realizaron 3 lavados con PBST, se incubo la membrana con el segundo anticuerpo disuelto PBST anti inmunoglobulina G acoplado a peroxidasa (1:300) durante 3 horas. Finalmente se realizaron 3 lavados con PBST y se revelo con reactivo de detección ECL.

Tabla 11. Composición por litro del tampón PBST.

Componentes	(g)
Na Cl	8
KCl	0.2
Na ₂ HPO ₄	1.44
KH ₂ PO ₄	0.24
Tween 20	2 mL

7.14 Precipitación de proteínas

Para poder precipitar las proteínas que se encuentran solubilizadas en cloruro de guanidinio 6 M, se mezcló 100 μ L de muestra con 400 μ L de metanol frío y se agito con el vortex, se adicionaron 100 μ L de cloroformo frío y se agito con vortex, posteriormente se añadió 300 μ L de agua tetradesilada y se agito con el vortex, la muestra se centrifugo a 13,000 rpm por un minuto, con mucho cuidado se eliminó el sobrenadante con una pipeta, tratando de no perturbar la delgada tela blanca que se forma entre las 2 fases una vez realizado esto se añadió 400 μ L de etanol absoluto, se mezcló con vortex y se centrifugo a 13,000 rpm por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se dejó secar el pellet, finalmente el pellet se resuspendió empleando una solución al 50% de a ACN.

7.15 Purificación HPLC

Para esta purificación se prepararon soluciones de agua tetradesilada con 0.1% de TFA (solvente A) y acetonitrilo con 0.1 % de TFA (solvente B), se filtraron las soluciones. Posteriormente se tomaron las muestras colectadas a partir de la purificación por afinidad con Ni-NTA y se sometieron a un nuevo paso de purificación por HPLC de fase reversa. Con la finalidad de separar las distintas isoformas que contienen los cuerpos de inclusión, así como eliminar las sales presentes en la solución. La separación se realizó empleando una columna C₁₈ analítica con un gradiente de 0 a 60% de solvente A a B respectivamente, en 60 minutos con un flujo 1 mL/min, el registro del cromatograma se obtuvo a una longitud de onda de 230 nm.

7.16 Plegamiento *in vitro* de la neurotoxina Magi 4

Se preparó un buffer que contenía: 0.1 M de acetato de amonio pH 7.6, 2M de cloruro de guanidinio, 0.1 mM de glutatión oxidado, 1 mM de glutatión reducido y 10 mM de péptido a plegar. Posteriormente se disolvió la proteína en el buffer de plegamiento y se incubo a 4°C por 4 días, pasado este tiempo la solución se diluyo 1:2 con agua destilada a 4°C, se incubo durante 3 días a 4°C, finalmente, la reacción se acidifico a pH 2 empleando TFA y se realizó la purificación por HPLC.

7.17 Análisis biológicos de las neurotoxinas

La actividad biológica de la neurotoxina Magi 4 fue evaluada empleando el modelo de ratones CD-1 y grillos *Achatea domesticus* de acuerdo con las normas del comité de bienestar animal del Instituto de Biotecnología de la UNAM manteniendo el número de individuos al mínimo para validar los experimentos. Para los ensayos en ratones, se colocó un pedazo de algodón dentro de un frasco, al cual se le añadió un poco de cloroformo, posteriormente se introdujeron uno a uno los ratones durante algunos segundos (5-10) hasta que el ratón quedara en analgesia (Torres. 2001), una vez en esta fase, se colocan rápidamente sobre un paño y se realizan los ensayos de inyección vía intracraneal, a una concentración conocida del material por analizar, posteriormente se analiza la recuperación del ratón y los síntomas que presenta. Como blanco se emplea agua estéril, ya que la toxina se encuentra disuelta en esta. Para los ensayos en grillos se emplearon grillos de .2 a .5 gr de peso a las que se aplicaron directamente en pronotum del grillo o protórax. Posteriormente se evaluaron los efectos ocasionados.

7.18 Cálculo de la dosis letal media (DL50) en ratones CD-1 y grillos *Achatea domesticus* utilizando el método de regresión no lineal.

Se utilizaron grupos de 3 individuos, ya sea de ratones o de grillos con los cuales se obtuvo una dosis con el 0 % y con el 100 % de letalidad. Se incluyeron cuatro puntos intermedios entre las dosis determinadas $\{(D100 - D0)/4\}$. Con estas dosis intermedias se obtuvieron el 33 y 66 % de la letalidad. Los datos de letalidad se analizaron con el programa “GraphPadPrism”, del cual se obtuvo un gráfico de regresión no lineal, DL50, el error estándar y el intervalo de confianza.

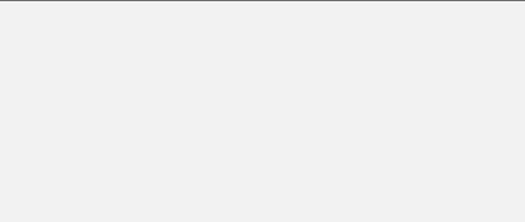
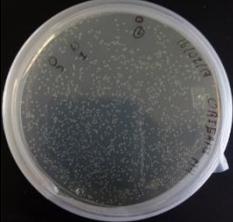
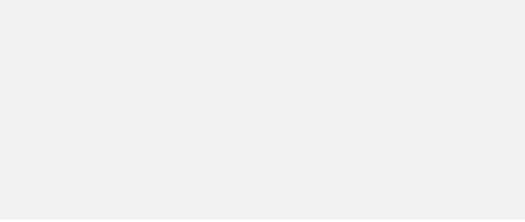
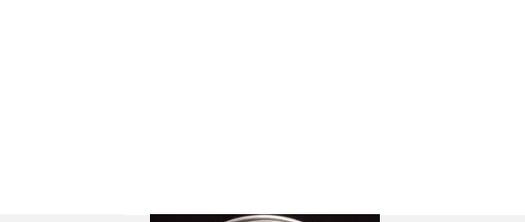
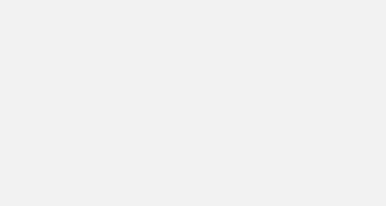
VIII. Resultados

8.1 Transformación con células quimiocompetentes

Con el fin de disponer de las cepas adecuadas para los estudios posteriores, se inició probando distintas cepas de *E. coli*, tomando en cuenta las ventajas propias de cada variante, para ello

fue necesario realizar transformaciones con células quimiocompetentes de *E. coli* empleando las variantes Origami, SHuffle, BL21, M15 y Rosseta. Para la transformación se empleó la construcción del plásmido pQE30 con el respectivo inserto de la neurotoxina Magi 4. Los resultados de la transformación se muestran en la (Tabla 12).

Tabla 12. Cepas de *E. coli* transformadas.

Cepa de <i>E. coli</i>	Positivo	Negativo
Shuffle		
Origami		
BL21		
M15		
Rosseta		

En la tabla 12 se observan los resultados de la transformación de las cepas de *E. coli* SHuffle, Origami, M15, BL21, estas con resultados positivos, sin embargo, la cepa *E. coli* Rosseta mostro resultados negativos por lo que fue descartada. Posteriormente de cada transformante

se seleccionaron 3 colonias y se llevaron a cabo fermentaciones con cada cepa, en matraces de 250 mL con 50 mL de medio LB, según lo descrito en la sección materiales y métodos.

8.2 Selección de las cepas de *E. coli* SHuffle, Origami, M15, BL21

Posteriormente se avaluó la producción de neurotoxina en cada una de las colonias, de las cuales se seleccionaron las que presentaron bandas más intensas en el perfil electroforético (figura 10).

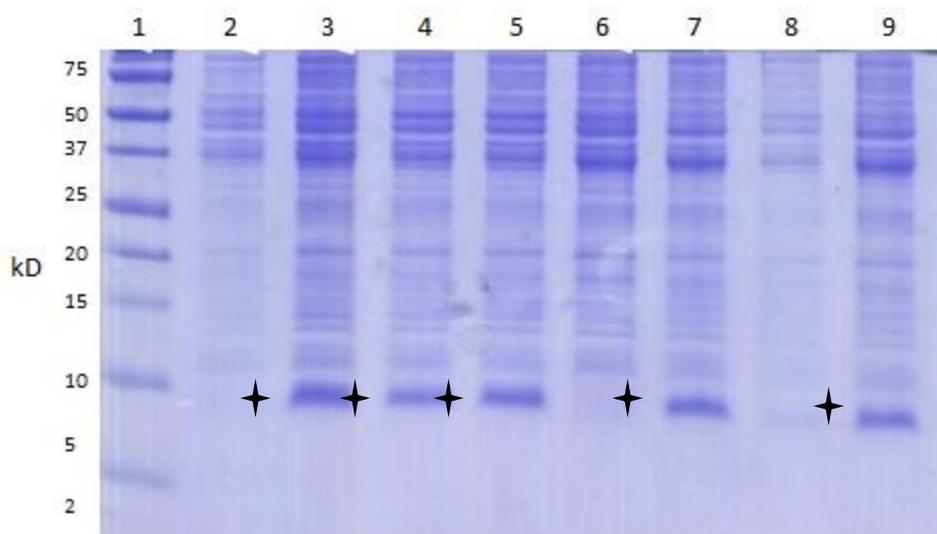


Figura 10. Expresión de la neurotoxina Magi 4 en diferentes cepas de *E. coli* SHuffle, Origami, M15, BL21.

Carril 1 peso molecular 2, fracción soluble Origami, 3 cuerpos de inclusión Origami, 4 fracción soluble SHuffle, 5 cuerpos de inclusión SHuffle, 6 fracción soluble M15, 7 cuerpos de inclusión M15, 8 fracción soluble BL21, 9 cuerpos de inclusión BL21. Señalados las bandas correspondientes al peso molecular aproximado 7 kDa.

Marcadas con una cruz las bandas que corresponden al peso molecular esperado aproximadamente 7 kDa. En el gel se puede observar la expresión con resultados positivos en los CI en las 4 cepas transformadas (carriles 3,5,7,9) se observó que, las cepas de *E. coli* Origami BL21 y M15 no expresaron la neurotoxina Magi 4 en la fracción soluble (carriles 2,6,8), y solamente la cepa de *E. coli* SHuffle expresó tanto en fracción soluble como en cuerpos de inclusión (CI) (carriles 3,4). Para esto se tomaron en cuenta dos parámetros: el perfil electroforético y la densidad óptica alcanzada al final de la fermentación. A pesar de

que todas las cepas transformadas mostraron presencia de la neurotoxina Magi 4, se seleccionaron dos cepas estas fueron: *E. coli* SHuffle debido a que presenta la neurotoxina en cuerpos de inclusión y fracción soluble, esto último podría sugerir que ésta es expresada con un plegamiento correcto o parecido al de la neurotoxina nativa, aunado a esto el crecimiento por parte de esta cepa alcanzo 2.1 DO₆₀₀ (figura 11) además, se escogió la cepa *E. coli* Origami debido a que expresa la neurotoxina Magi 4 en cuerpos de inclusión, además cuando se comparan los crecimientos por parte de las 4 cepas *E. coli* Origami se destaca por alcanzar hasta 2.5 DO₆₀₀. Por otro lado, a pesar de tener presencia de la neurotoxina Magi 4 se descartaron las cepas *E. coli* M15 y *E. coli* BL21 debido a que su crecimiento no es tan elevado como el de las otras dos cepas de *E. coli* Origami y SHuffle (figura 12)

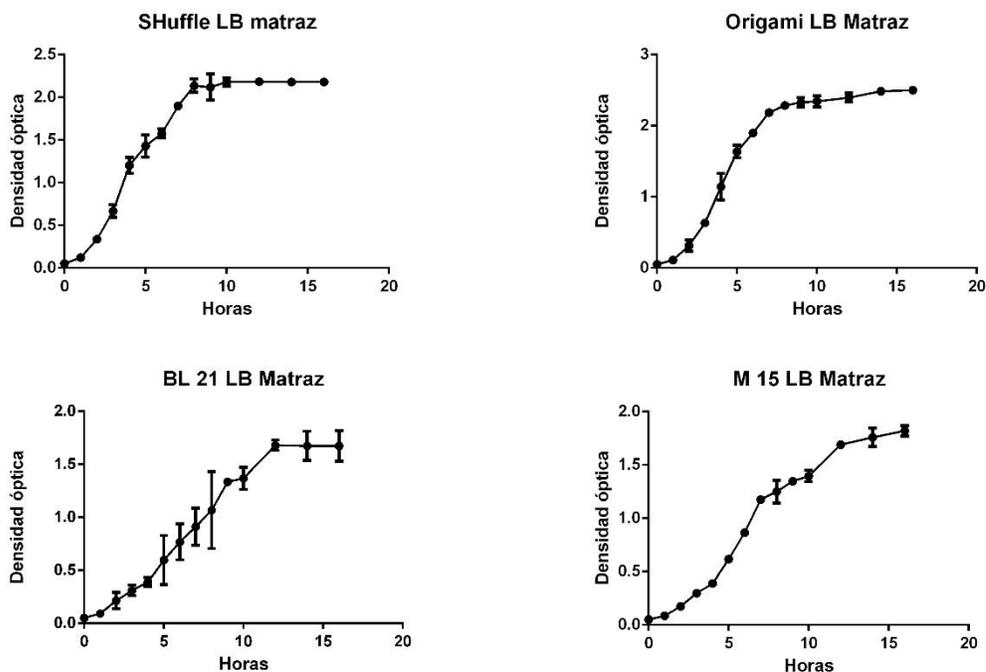


Figura 11. Cienética de crecimiento de las diferentes cepas de *E. coli* SHuffle, Origami, M15, BL21.

Comparación diferentes cepas de *E.coli*

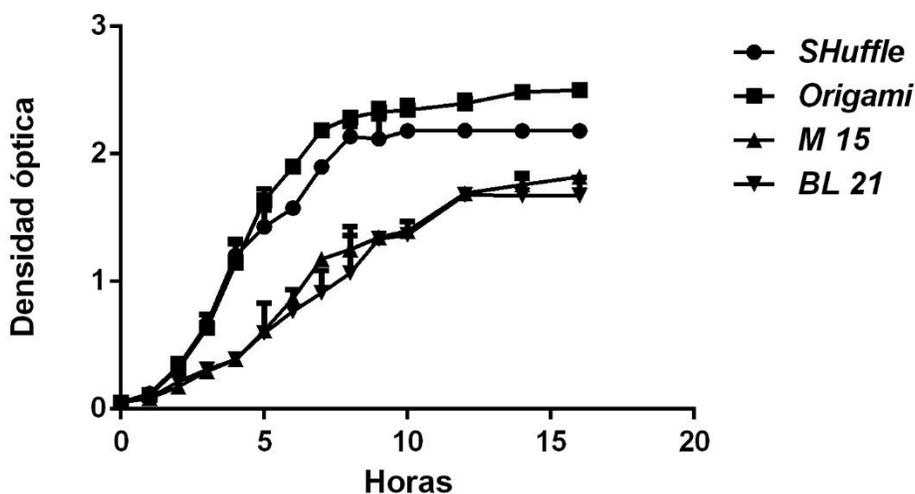


Figura 12. Comparación del crecimiento en las distintas cepas de *E. coli* SHuffle, Origami, M15, BL21

8.2.1 Análisis de cepas de expresión

Una vez observado que las cepas de *E. coli* Origami y SHuffle tuvieron mayor crecimiento y expresión de la neurotoxina Magi 4, se estableció que estas dos cepas fueron las más idóneas para fermentaciones futuras. Cuando la expresión de una proteína es llevada a cabo bajo las mismas condiciones ésta debe ser claramente visible en un gel de poliacrilamida de lo contrario podría haber un problema en el vector o en las condiciones de expresión, así que por ésta razón se seleccionaron 4 colonias de una misma cepa, se realizaron fermentaciones según lo descrito en la sección materiales y métodos. Una vez finalizadas las fermentaciones se corrieron gels de poliacrilamida al 16% para verificar el perfil electroforético. Los resultados se muestran en la (figura 14) donde se observa la expresión de la neurotoxina Magi 4 tanto en CI como en fracción soluble en la cepa de *E. coli* SHuffle. Por otro lado, la cepa de *E. coli* de Origami presentó una buena expresión de la neurotoxina Magi 4 en cuerpos de inclusión, sin embargo, no fue así para la fracción soluble, como se observa en la figura 13. Además, se puede observar que la colonia 3 (carriles 5,6) de *E. coli* Origami presentó una baja expresión de la neurotoxina Magi 4, esto puede ser debido, a algún error de traducción durante la expresión. Con éste experimento concluimos que, es importante seleccionar más

de una colonia, al finalizar la transformación y verificar su perfil de expresión. Las colonias de *E. coli* SHuffle expresaron homogéneamente a la proteína, las diferencias entre ellas no son muy perceptibles. Por tanto, la cepa de *E. coli* SHuffle destaca en la producción de la neurotoxina Magi 4.



Figura 13. Gel de SDS-PAGE al 16% *E. coli* Origami LB matraz.

Gel de SDS-PAGE al 16% Origami LB matraz: MPM: Marcador de peso molecular, FS: Fracción Soluble, CI: Cuerpos de Inclusión. carril 1: Origami 1 FS., carril 2: Origami 1 CI, carril 3: Origami 2 FS., carril 4: Origami 2 CI. carril 5: Origami 3 FS., carril 6: Origami 3 CI., carril 7: Origami 4 FS., carril 8: Origami 4 CI.

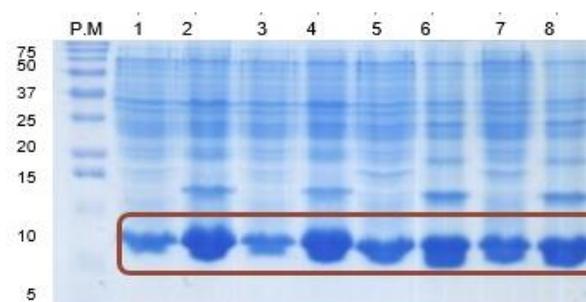


Figura 14. Gel de SDS-PAGE al 16% *E. coli* SHuffle LB matraz.

Gel de SDS-PAGE al 16% SHuffle LB matraz: MPM: Marcador de peso molecular, FS: Fracción Soluble, CI: Cuerpos de Inclusión. carril 1: SHuffle 1 FS, carril 2: SHuffle 1 CI, carril 3: SHuffle 2 FS, carril 4: SHuffle 2 CI. carril 5: SHuffle 3 FS, carril 6: SHuffle 3 CI, carril 7: SHuffle 4 FS, carril 8: SHuffle 4 CI.

Una vez visualizadas las bandas con el peso molecular esperado, se procedió a comprobar la presencia de la neurotoxina Magi 4 mediante la técnica Western blot según lo descrito en el apartado de materiales y métodos, se corrieron las muestras de las cepas *E. coli* Origami y SHuffle procedentes de las fermentaciones realizadas en matraz. En la figura (15) podemos apreciar la presencia de la neurotoxina Magi 4 en ambas cepas, en el carril 1 se muestra la cepa *E. coli* SHuffle, en el carril 2 la cepa *E. coli* Origami y en el carril 3 un control positivo.

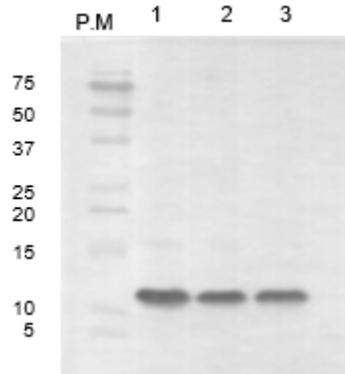


Figura 15. Western blot de la neurotoxina Magi 4 purificada.

Western blot Magi 4 purificada: carril 1 SHuffle, carril 2 SHuffle medio LB suplementado, carril 3 control Magi 4

8.3 Fermentaciones en matraz con LB + 1% de glucosa

A partir del cultivo preservado en glicerol, se corrieron fermentaciones añadiendo al medio LB + 1 % de glucosa. Con el fin de comprobar si existía un incremento en la producción de biomasa. Se realizó el siguiente experimento donde se emplearon cepas de *E. coli* SHuffle y Origami, este se realizó por triplicado en matraces de 250 mL con 50 mL medio LB siguiendo la metodología descrita en materiales y métodos, el crecimiento celular se monitoreo tomando muestras cada hora, y midiendo la DO_{600} durante 16 horas. En éstas curvas (figura 16) podemos observar un incremento en la producción de biomasa, aproximadamente 20% que corresponden a los tratamientos en los que se añadió glucosa, alcanzando valores de 2.6 DO_{600} para *E. coli* SHuffle y 2.9 DO_{600} para *E. coli* Origami, con respecto a la fermentación que empleó solamente medio LB.

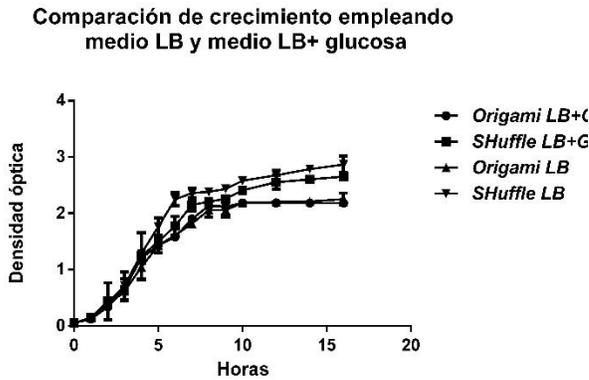


Figura 16. Comparación de crecimiento medio LB y medio LB + glucosa

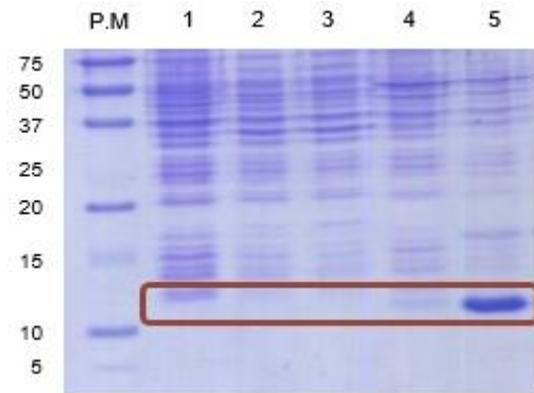


Figura 17. Gel de SDS-PAGE al 16% Proteínas obtenidas de la expresión de la neurotoxina Magi 4 en medio LB y medio LB+ glucosa:

MPM: Marcador de peso molecular, FS: Fracción Soluble, CI: Cuerpos de Inclusión. carril 1: Origami 1 FS., carril 2: Origami 1 CI, carril 3: SHuffle FS., carril 4: SHuffle CI. carril 5: Ctl+.

Terminado el tiempo de la fermentación se tomaron muestras de los cultivos, se analizó el perfil electroforético, mediante geles SDS de acrilamida al 16% obteniendo los siguientes resultados: cómo podemos observar en la (figura 17) a pesar del incremento favorable de más del 20 % en el crecimiento microbiano, cuando se analiza la expresión de la neurotoxina Magi 4 esta, disminuye drásticamente en ambas cepas de *E. coli* Origami y SHuffle, tanto en fracción soluble como en cuerpos de inclusión, en contraste con los experimentos realizados anteriormente con medio LB. Estos resultados nos llevaron a tomar la decisión de no implementar glucosa al medio de cultivo, y tratar de buscar una alternativa que favoreciera la expresión de la neurotoxina Magi 4.

8.4 Fermentaciones en matraz con medio LB suplementado con extracto de levadura y sales.

Con la finalidad de incrementar la expresión de la neurotoxina Magi 4 y no solo el crecimiento celular, se corrieron fermentaciones con las cepas de *E. coli* Origami y SHuffle empleando un medio suplementado con mayor fuente de carbono, nitrógeno, y elementos traza. En trabajos anteriores, se han obteniendo toxinas como las C_{ss}II y Mlat de forma

soluble y activa. Bajo estos resultados se corrieron fermentaciones empleando el medio suplementado, siguiendo la metodología descrita anteriormente. Con el objetivo de incrementar el crecimiento celular y la producción de la neurotoxina Magi 4 en su forma activa. Como se puede apreciar en la (figura 18) al realizar las fermentaciones con el medio suplementado se aprecia un incremento considerable en la producción de biomasa, hasta del 50 % en comparación con fermentaciones realizadas solamente con medio LB. Cabe destacar que las fermentaciones en ambos casos se mantuvieron hasta alcanzar la fase estacionaria 16h medio LB y 26h medio LB suplementado, de igual forma al realizar un perfil electroforético de las fermentaciones los resultados son favorables para la producción de la neurotoxina Magi 4 en ambas cepas, como era de esperarse la cepa de *E. coli* SHuffle presenta la toxina en cuerpos de inclusión y en fracción soluble, sin embargo, surge un nuevo resultado para la cepa Origami, ya que ahora puede apreciarse una banda clara en la fracción soluble lo que podría indicar que la toxina haya adquirido su conformación nativa. (Figura 19).

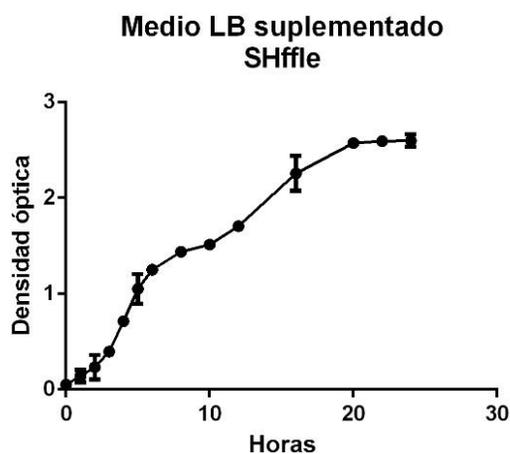


Figura 18. Gráfica de crecimiento medio LB suplementado con extracto de levadura y sales, SHuffle.

(Los resultados representan valores promedio y desviación estándar de tres repeticiones)

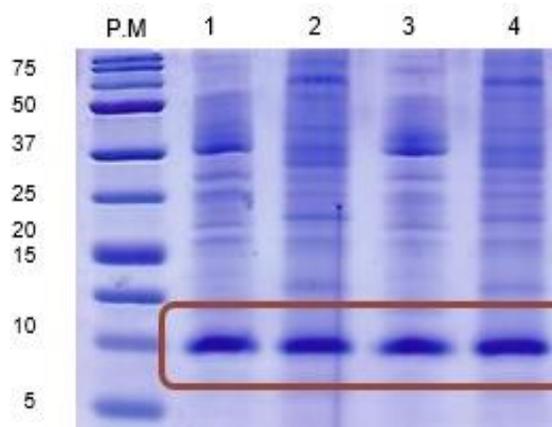


Figura 19. Gel de SDS-PAGE al 16% medio LB suplementado con extracto de levadura y sales, SHuffle.

MPM: Marcador de peso molecular, FS: Fracción Soluble, CI: Cuerpos de Inclusión. carril 1: SHuffle FS., carril 2: SHuffle CI, carril 3: SHuffle 2 FS., carril 4: SHuffle 2 CI.

8.5 Fermentaciones medio LB+ Osmolitos

Con el objetivo de generar toxinas solubles y activas se realizaron fermentaciones agregando osmolitos al medio LB, como se describe en el apartado de antecedentes. Para estas fermentaciones se añadió al medio LB distintas concentraciones de osmolitos por separado, Trehalose (0.5 M), Arginina (0.1, 0.2, 0.25 M), sorbitol (0.4,0.5,0.6 M), con el fin de observar el efecto en la solubilización de proteínas. Se emplearon las cepas de *E. coli*, SHuffle la cual, sin presencia de osmolitos, ya presenta proteína en fracción soluble y la cepa *E. coli* Origami la cual, solamente produce proteína en cuerpos de inclusión.

Debido a que las concentraciones de osmolitos son muy elevadas las fermentaciones se realizaron en tubos falcón de 50 mL con 20 mL de medio siguiendo la metodología descrita en materiales y métodos. El crecimiento celular se monitoreo tomando muestras cada hora, y midiendo la DO₆₀₀ durante 16 horas de cada cepa, arrojando los siguientes resultados.

8.5.1 Medio LB + Arginina

Para el medio LB + Arginina, se puede observar en ambas cepas (figuras 20 y 22) una disminución en el crecimiento celular alcanzando únicamente 0.4 DO₆₀₀, esto refleja un 75% menos crecimiento, en comparación con el medio LB 2.2 DO₆₀₀. Al realizar el perfil electroforético para la cepa *E. coli* Origami (figura 21). Se pueden observar bandas muy intensas, señaladas con una flecha, lo que refleja un incremento en la expresión de proteínas en fracción soluble, para las 3 concentraciones de arginina, sin embargo, estas no corresponden al peso molecular esperado, en la misma imagen en el recuadro se muestra control positivo de la neurotoxina Magi 4. Por otro lado, la cepa de SHuffle (figura 23). También presenta un incremento de la expresión de proteína soluble en las 3 concentraciones de arginina, pero de igual forma no corresponden al peso molecular esperado, a excepción de la concentración de 0.25 M de arginina, en esta se observa una banda correspondiente al peso molecular esperado, sin embargo, esta cepa por si misma ya presentaba en medio LB la neurotoxina Magi 4 en fracción soluble.

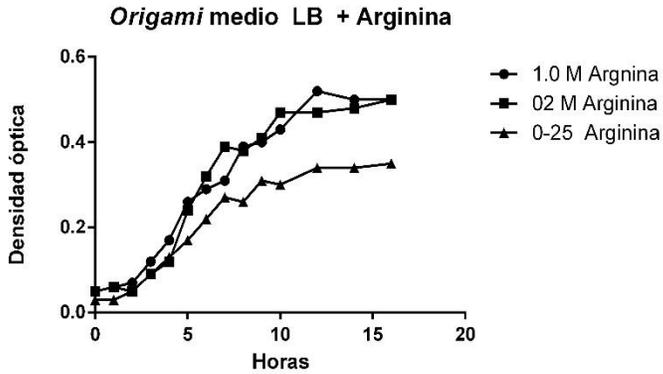


Figura 20. Gráfica de crecimiento medio LB + Arginina Origami

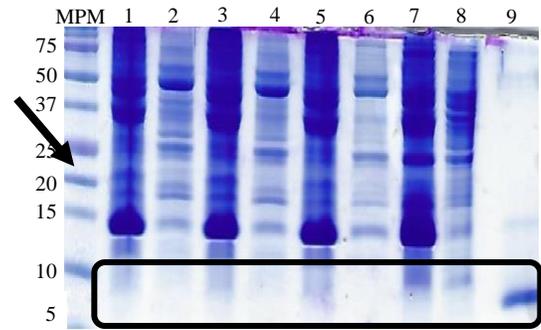


Figura 21. Gel de SDS-PAGE al 16% medio LB + Arginina Origami.

MPM: Marcador de peso molecular, FS: Fracción Soluble, CI: Cuerpos de Inclusión. carril 1: Origami FS 0.1M arginina, carril 2: Origami CI. 0.1M arginina, carril 3: Origami FS. 0.2M arginina, carril 4: Origami CI. 0.2M arginina, carril 5: Origami FS. 0.25 M arginina, carril 6: Origami CI. 0.25M arginina, carril 7: Origami FS. 0.25M arginina, carril 8: Origami CI. 0.25M arginine, carril 9: control +.

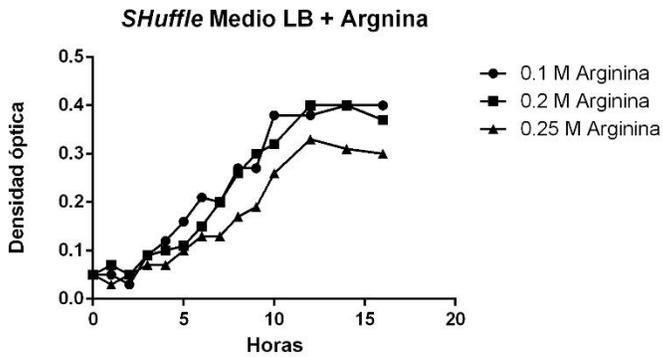


Figura 22. Gráfica de crecimiento medio LB + Arginina SHuffle.

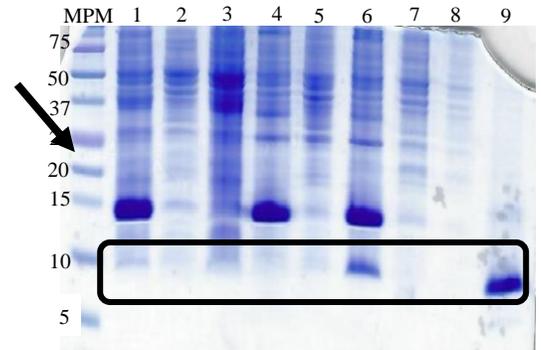


Figura 23. Gel de SDS-PAGE al 16% medio LB + Arginina SHuffle.

MPM: Marcador de peso molecular, FS: Fracción Soluble, CI: Cuerpos de Inclusión. carril 1: SHuffle FS 0.1M arginina, carril 2: SHuffle CI. 0.1M arginina, carril 3: SHuffle FS. 0.2M arginina, carril 4: SHuffle CI. 0.2M arginine, carril 5: SHuffle FS. 0.25 M arginine, carril 6: SHuffle CI. 0.25M arginine, carril 7: SHuffle FS. 0.25M arginina, carril 8: SHuffle CI. 0.25M arginine, carril 9: control +.

8.5.2 Medio LB + Trehalosa

En estas fermentaciones se añadió al medio LB el osmolito Trehalose (0.5 M). Con el fin de observar el efecto en la solubilización de proteínas. aquí se emplearon las cepas SHuffle y

Origami de *E. coli*. Como se puede observar en la (figura 24). En el crecimiento celular alcanza valores de hasta 2.2, valores muy cercanos a los observados en las fermentaciones con medio LB, en ambas cepas. Cuando se realizó el perfil electroforético (figuras 25 y 26), se encontró que de igual forma se incrementaba la expresión de proteínas tanto en fracción soluble como en cuerpos de inclusión, sin embargo, las bandas señaladas con una flecha, no corresponden al peso molecular esperado para la neurotoxina Magi 4. En el recuadro se muestra un control positivo y se logra observar una expresión casi nula de la Magi 4. Por lo que este medio se descartó para futuras fermentaciones.

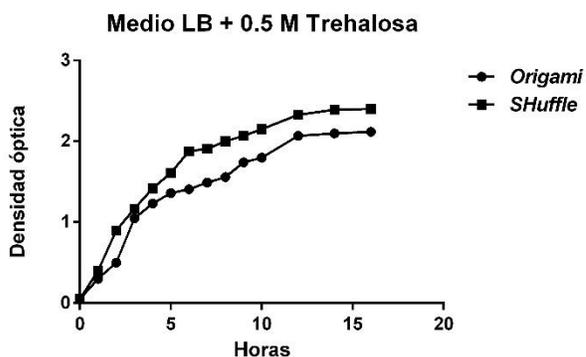


Figura 24. Gráfica de crecimiento medio LB + Trehalosa Origami.

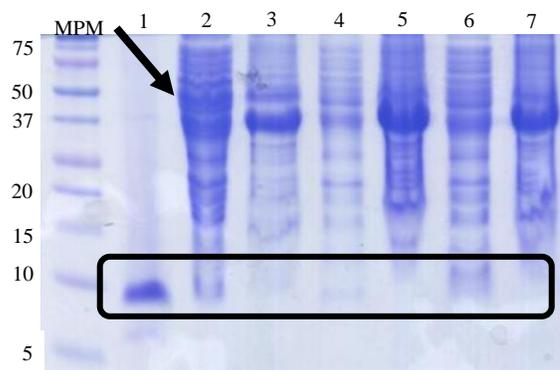


Figura 25. Gel de SDS-PAGE al 16% medio LB + Trehalosa Origami.

MPM: Marcador de peso molecular, FS: Fracción Soluble, CI: Cuerpos de Inclusión. carril 1: control +, carril 2: Origami FS 0.5 M trehalosa, carril 3: *Origami* CI 0.5 M trehalosa, carril 4: *Origami* CI 0.5 M trehalosa, carril 5: *Origami* FS. 0.5 M trehalosa, carril 6: Origami CI 0.5 M trehalosa.

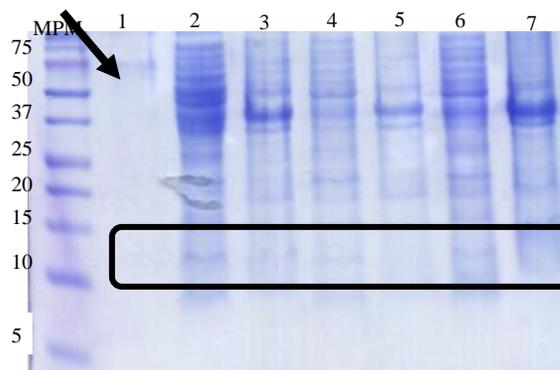


Figura 26. Gel SDS-PAGE al 16% medio LB + Arginina SHuffle.

MPM: Marcador de peso molecular, FS: Fracción Soluble, CI: Cuerpos de Inclusión. carril 1: descartado,

carril 2: SHuffle FS. 0.5 M trehalosa, carril 3: SHuffle CI 0.5 M trehalosa, carril 4: SHuffle CI 0.5 M trehalosa, carril 5: SHuffle FS. 0.5 M trehalosa, carril 6: SHuffle CI 0.5 M trehalosa.

8.5.3 Medio LB + Sorbitol

Para estas fermentaciones se añadió al medio LB el osmolito Sorbitol, en concentraciones (0.4, 0.5, 0.6 M). Con el fin de observar el efecto en la solubilización de proteínas. De igual forma se emplearon las cepas SHuffle y Origami de *E. coli* para las fermentaciones. El resultado del crecimiento celular se muestra en las (figuras 27 y 29). En las gráficas podemos apreciar un descenso de un 25% en la generación de biomasa alcanzando 1.4 y 1.6 DO₆₀₀ respectivamente, en comparación con las fermentaciones realizadas en medio LB 2.4 DO₆₀₀. Sin embargo, cuando se analiza el perfil electroforético en las (figuras 28 y 30), podemos observar en el recuadro bandas de expresión, tanto en cuerpos de inclusión como en fracción soluble para ambas cepas. Por lo que se escogió este medio para realizar fermentaciones de mayor volumen en matraces.

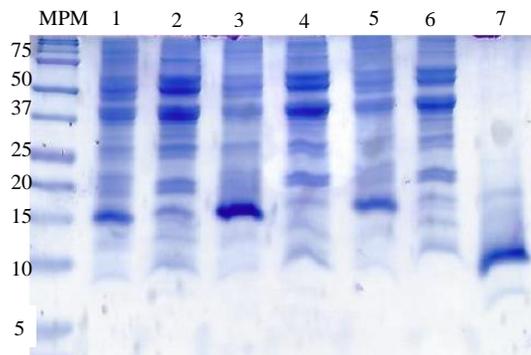
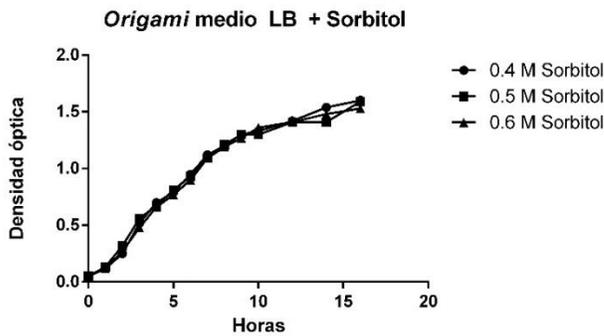


Figura 27. Gráfica de crecimiento medio LB + Sorbitol Origami.

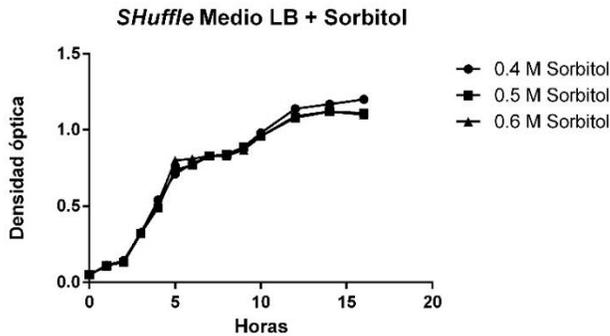


Figura 29. Gráfica de crecimiento medio LB + Sorbitol SHuffle.

Figura 28. Gel de SDS-PAGE al 16% medio LB + Arginina Origami

MPM: Marcador de peso molecular, FS: Fracción Soluble, CI: Cuerpos de Inclusión. carril 1: Origami FS 0.4M sorbitol, carril 2: Origami CI. 0.4M sorbitol, carril 3: Origami FS. 0.5M sorbitol, carril 4: Origami CI. 0.5M sorbitol, carril 5: Origami FS. 0.6M sorbitol, carril 6: Origami CI. 0.6M sorbitol, carril 7: Origami FS. 0.6M sorbitol, carril 8: Origami CI. 0.6M sorbitol, carril 9: control +.

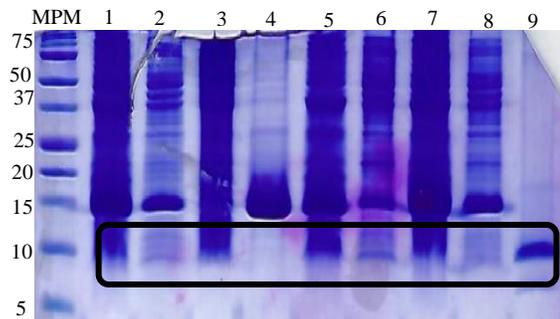


Figura 30. Gel de SDS-PAGE al 16% medio LB + Sorbitol SHuffle.

MPM: Marcador de peso molecular, FS: Fracción Soluble, CI: Cuerpos de Inclusión. carril 1: SHuffle FS 0.4M sorbitol., carril 2: SHuffle CI. 0.4M sorbitol, carril 3: SHuffle FS. 0.5M sorbitol, carril 4: SHuffle CI. 0.5M sorbitol, carril 5: SHuffle FS. 0.6M sorbitol, carril 6: SHuffle CI. 0.6M sorbitol, carril 7: SHuffle FS. 0.6M sorbitol, carril 8: SHuffle CI. 0.6M sorbitol, carril 9: control +.

8.5.4 Medio LB + Sorbitol en matraz

Se emplearon cepas SHuffle y Origami, de *E. coli*, el experimento se realizó en matraces de 250 mL con 50 mL medio LB con su respectiva concentración de Sorbitol (0.4, 0.5, 0.6 M.) Siguiendo la metodología descrita en materiales y métodos, el crecimiento celular se monitoreo tomando muestras cada hora, y midiendo la DO₆₀₀ durante 16 horas, figuras 31 y

32. En las (figuras 31 y 32) podemos observar un descenso del 20% en la generación de biomasa, alcanzando 1.4, 1.7 DO₆₀₀, respectivamente en comparación con las fermentaciones realizadas en medio LB 2.4 DO₆₀₀. Sin embargo, uno de los resultados más interesantes de este experimento se observa en las (figuras 33 y 34), donde surgió al analizar el perfil electroforético de ambas cepas encontrando que la cepa Origami de *E. coli* ahora expresaba proteínas en forma soluble, lo que podría sugerir un correcto plegamiento de la neurotoxina Magi 4. Por otro lado, la fermentación con la cepa SHuffle de *E. coli* arrojó resultados menores a los presentados en fermentaciones anteriores empleando medio LB.

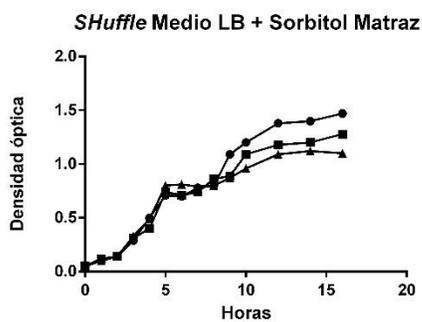


Figura 31. Gráfica de crecimiento de SHuffle empleando medio LB+ sorbitol.

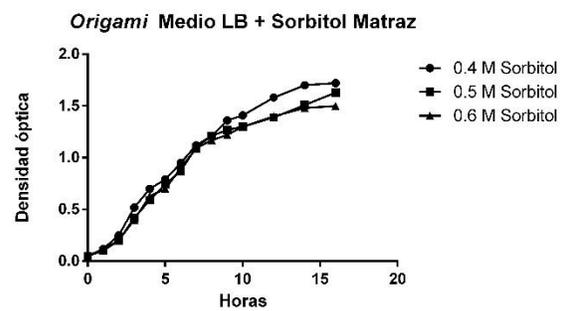


Figura 32. Gráfica de crecimiento de Origami empleando medio LB+ sorbitol.

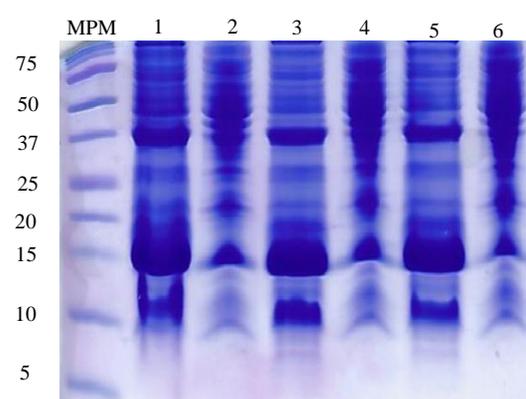
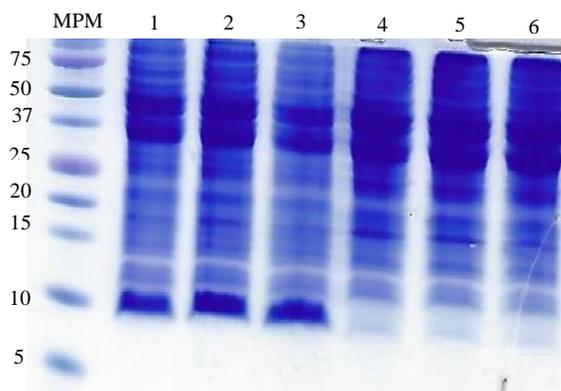


Figura 33. Gel de SDS-PAGE al 16% medio LB+ sorbitol cepa *E. coli* Origami:

MPM: Marcador de peso molecular, FS: Fracción Soluble, CI: Cuerpos de Inclusión. carril 1: Origami CI 0.6M sorbitol, carril 2: Origami FS. 0.6M sorbitol, carril 3: Origami CI. 0.5M sorbitol, carril 4: Origami FS. 0.5M sorbitol, carril 5: Origami CI. 0.4M sorbitol, carril 6: Origami FS. 0.4M sorbitol.

Figura 34. Gel de SDS-PAGE al 16% medio LB+ sorbitol cepa *E. coli* SHuffle

MPM: Marcador de peso molecular, FS: Fracción Soluble, CI: Cuerpos de Inclusión. carril 1: SHuffle CI 0.6M sorbitol, carril 2: SHuffle FS. 0.6M sorbitol, carril 3: SHuffle CI. 0.5M sorbitol, carril 4: SHuffle FS. 0.5M sorbitol, carril 5: SHuffle CI. 0.4M sorbitol., carril 6: SHuffle FS. 0.4M sorbitol.

8.6 Fermentaciones en Biorreactor BIOFLO 110.

Dados los resultados obtenidos en las fermentaciones anteriores, se seleccionó la cepa *E. coli* SHuffle, así como los medios que mostraron un mejor desempeño en la producción de la neurotoxina Magi 4, estos fueron: LB, LB suplementado con sales y levadura. Esto con la finalidad de aumentar el volumen del cultivo y observar el comportamiento y expresión de esta cepa cuando es cultivada en volúmenes mayores. Dadas las ventajas y características descritas anteriormente, que ofrece un sistema como el biorreactor, se realizaron fermentaciones con ambos medios empleando la cepa SHuffle. Para esto se empleó un biorreactor BIOFLO 110 de 5 litros. El crecimiento celular se monitoreo tomando muestras cada hora, y midiendo la DO_{600} durante 26 h, (figuras 35 y 36). En las gráficas podemos apreciar un incremento del 10% en la generación de biomasa alcanzando 2.4 y 3.1 DO_{600} , respectivamente, en comparación con las fermentaciones realizadas en medio LB de 2.2 y 2.8 DO_{600} , respectivamente. Puesto que, las condiciones de aireación, control de pH, agitación, temperatura son controladas y más eficientes que en un simple matraz, estas deberían generar una mejor expresión de la neurotoxina Magi 4, no obstante, se encontraron los siguientes resultados al realizar el perfil electroforético de las fermentaciones; esto es, para la fermentación en la que se empleó solamente medio LB (figura 37) se observan bandas un poco más tenues para fracción soluble y cuerpos de inclusión, en contraste con las

observadas en las fermentaciones realizadas anteriormente en matraz (figura 14). Por otra parte, al realizar el perfil electroforético de la fermentación con el medio LB suplementado (figura 38) se puede observar una expresión favorable tanto en cuerpos de inclusión como en fracción soluble muy parecidas a las observadas en la fermentación realizadas en matraz.

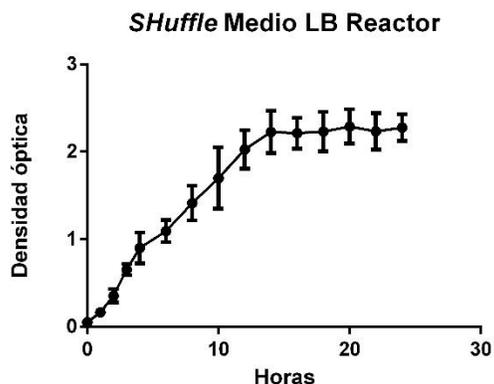


Figura 35. Gráfica de crecimiento Reactor medio LB suplementado cepa *E. coli* SHuffle

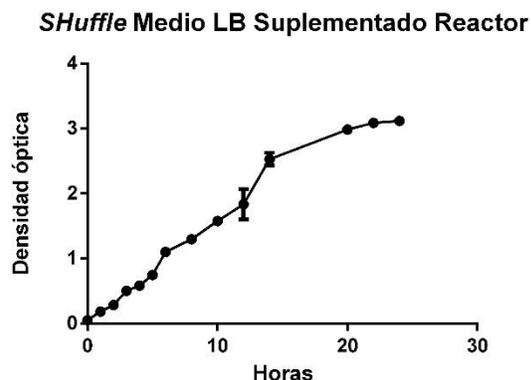


Figura 36. Gráfica de crecimiento Reactor medio LB suplementado cepa *E. coli* SHuffle

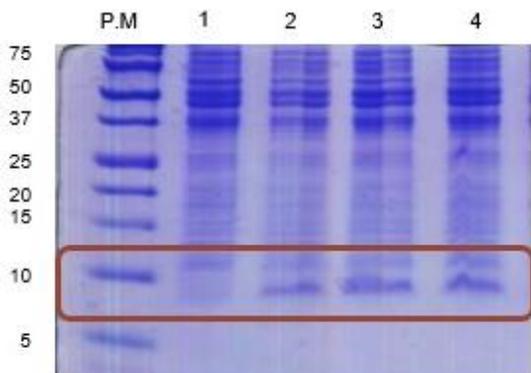


Figura 37. Gel de SDS-PAGE al 16% Fermentación reactor medio LB cepa *E. coli* SHuffle:

MPM: Marcador de peso molecular, FS: Fracción Soluble, CI: Cuerpos de Inclusión. carril 1: SHuffle FS, carril 2: SHuffle CI, carril 3: SHuffle 2 FS, carril 4: SHuffle 2 CI.

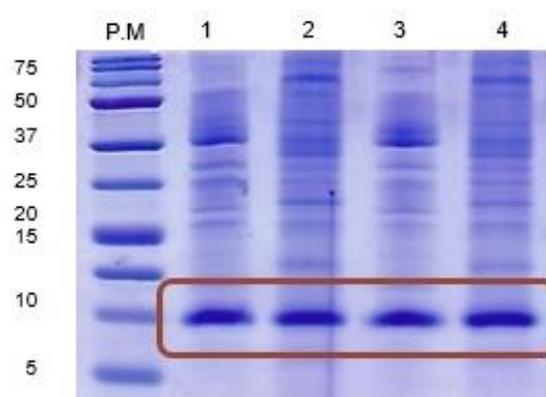


Figura 38. Gel de SDS-PAGE al 16% Fermentación reactor medio LB suplementado cepa *E. coli* SHuffle:

MPM: Marcador de peso molecular, FS: Fracción Soluble, CI: Cuerpos de Inclusión. carril 1: SHuffle FS, carril 2: SHuffle CI, carril 3: SHuffle 2 FS, carril 4: SHuffle 2 CI.

8.7 Purificación

8.7.1 procesamiento de la biomasa

Una vez terminadas las fermentaciones se procedió a cosechar la biomasa mediante centrifugación, y se procedió a lisar las células mediante el sistema de prensa hidroneumática según lo descrito en el apartado de materiales y métodos. La fracción soluble se separó, al igual que los cuerpos de inclusión mediante centrifugación, seguidamente, los cuerpos de inclusión se solubilizaron en GndCl 6M, según lo descrito en la sección de materiales y métodos. Posteriormente la neurotoxina Magi 4 se purificó utilizando cromatografía de afinidad (columna Ni-NTA). Obteniendo los rendimientos que se muestran en la (Tabla 13).

Tabla 13. Elución columna de NI-NTA.

Fracción	Concentración de proteína (mg/mL)
1	0.38
2	4.56
3	6.18
4	2.17
5	2.42
6	1.53
7	1.18

8.7.2 Cromatografía de afinidad

las fracciones eluidas por columna Ni-NTA se redujeron con DTT, y fueron purificadas por cromatografía de fase reversa, la (figura 39) muestra el perfil cromatográfico de dicha purificación, donde la fracción correspondiente al tiempo de retención 37 min, marcado con un asterisco presentó la masa molecular esperada.

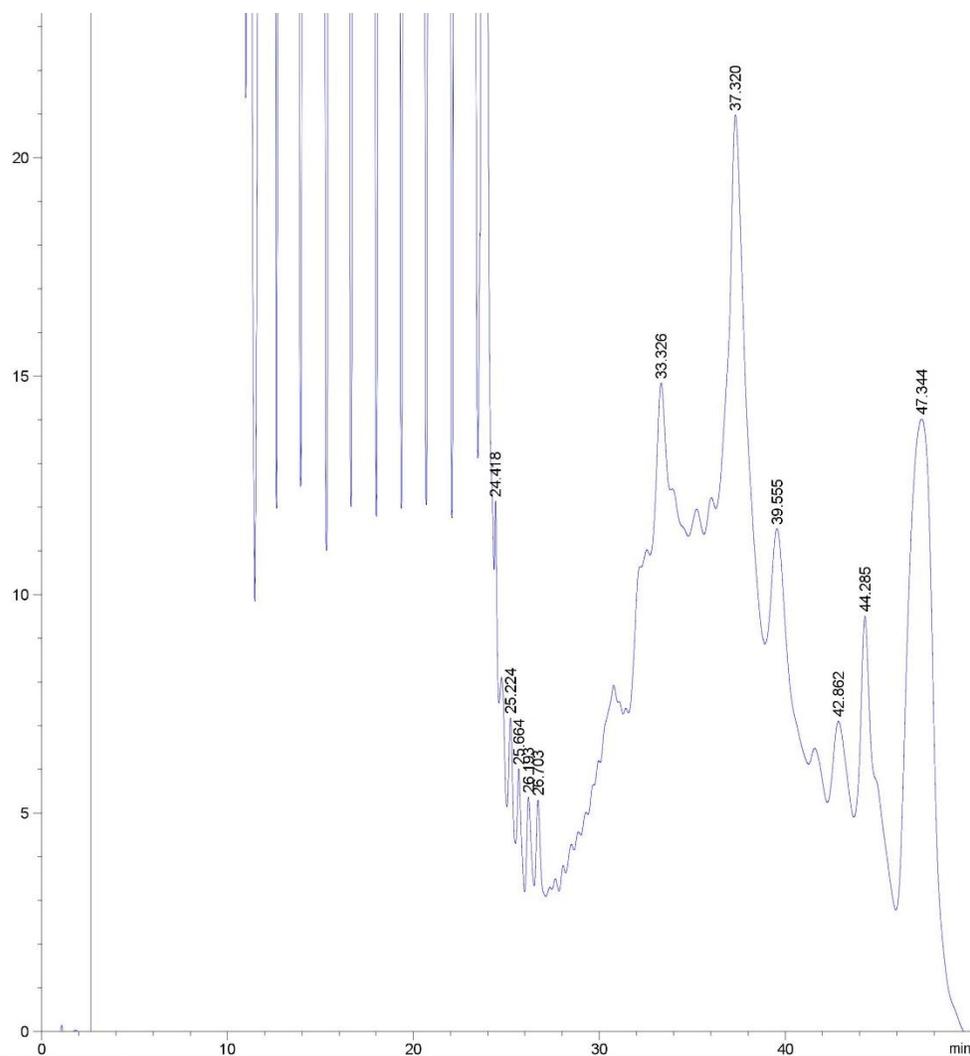


Figura 39. Perfil cromatográfico empleando una columna C18 HPLC fase reversa obtenido a partir de las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad Ni-NTA.

8.8 Plegamiento *in vitro* de la neurotoxina Magi 4

Una vez colectadas las fracciones, de varias corridas de HPLC bajo las mismas condiciones, correspondientes al tiempo de retención 37 min, se procedió a realizar un plegamiento *in vitro* según lo descrito en el apartado de materiales y métodos. La mejor condición para el plegamiento fue el aumento del tiempo de incubación (de 4 a 7 días) y el aumento de la concentración de los pares oxido-reductores (de 0.1 mM: 1 mM a 1 mM: 10 mM, GSSG:GSH). Al finalizar, se realizó un HPLC fase reversa, en la (figura 40) se muestra el cromatograma, la fracción mayoritaria al tiempo de retención de 48.5 min, presentó la masa

molecular esperada (al igual que otras fracciones minoritarias), y solo esta resultó tóxica a ratones.

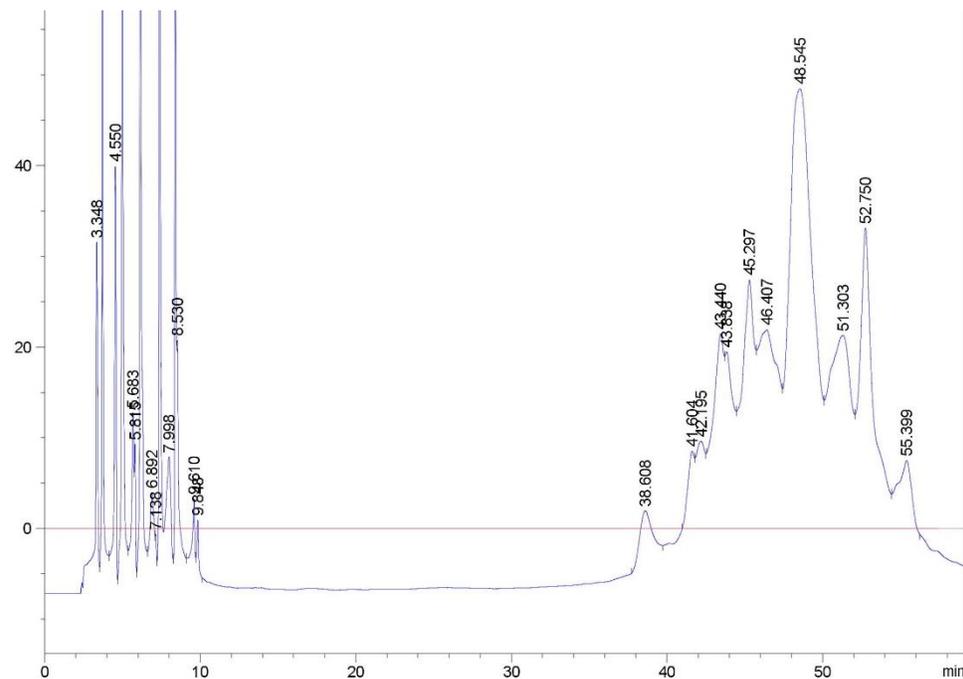


Figura 40. Plegamiento *in vitro* de la neurotoxina Magi 4 recombinante.

La fracción con asterisco representa la fracción mayoritaria con tiempo de retención de 48.5 minutos.

8.9 Cálculo de la dosis letal media (DL₅₀) en ratones y grillos utilizando el método de regresión no lineal.

Como fue mencionado la fracción toxica se encontró en el tiempo de retención de 48.5 min. Con esta fracción se calculó la DL₅₀ utilizando un método de “up and down”, y mediante un análisis no lineal. Para esto se utilizaron grupos de 3 animales, ya sea de ratones o de grillos. Las dosis empleadas fueron desde el 0 % al 100 % de letalidad, incluyendo cuatro puntos intermedios entre las dosis determinadas $\{(D_{100} - D_0) / 4\}$. Con estas dosis intermedias se obtuvo el 33 y 66 % de la letalidad, los cuales se analizaron con el programa “GraphPadPrism”. La DL₅₀ en ratones CD-1 fue de 546 ng/20 g ratón y la DL₅₀ en grillos fue de 8.9 µg /g de grillo.

Tabla 14. DL₅₀ en ratones y grillos.

Neurotoxina	DL ₅₀ ratones 20g		DL ₅₀ grillos	
Magi 4 nativa	15.4 ng	3.1 pmol	6.2 ug/g	1.2 nmol
Magi 4 sintetica	35 ng	0.7 pmol	0.9 ug/g	0.2 nmol
Magi 4 recombinante	860 ng	122 pmol	8.2 ug/g	8.6 nmol

8.10 Rendimientos

En la tabla 15 se muestran los rendimientos obtenidos a partir de las distintas fermentaciones realizadas en matraces y en reactor obteniendo los mejores resultados con el medio LB suplementado.

Tabla 15. Rendimientos.

Fermentación	Biomasa (g/L)	Proteína después de Ni-NTA (mg/L)	Proteína reducida (mg/L)	Rendimiento %	Proteína oxidada (mg/L)	Rendimiento final %
Matraz	5.6	4.2	3.3	78	0.4	9
Reactor medio LB	4.8	4.8	3.2	68	0.6	12
Reactor medio suplementado con extracto de levadura y sales	8.0	6.0	4.3	71	0.9	15

IX. Conclusiones

PRIMER OBJETIVO

- Expresar de forma heteróloga la neurotoxina Magi 4 utilizando diferentes cepas de *E. coli*, medios de cultivo, y sistemas de producción para obtener la toxina recombinante biológicamente activa

1. Se logró expresar a la neurotoxina Magi 4 en las cepas de *E. coli* Origami, SHuffle, BL21, M15 de forma exitosa, evaluado mediante perfil de proteínas mediante geles SDS-PAGE.
2. La neurotoxina Magi 4 se concentra mayoritariamente en cuerpos de inclusión a excepción de la cepa SHuffle la cual expresa la neurotoxina Magi 4 de forma soluble y en cuerpos de inclusión.

SEGUNDO OBJETIVO

- Producir heterológicamente la neurotoxina Magi 4 en *E. coli* Origami SHuffle BL21, y M15 en matraces con diferentes medios de cultivo.
3. El medio óptimo para la producción de la neurotoxina Magi 4, fue el medio LB, seguido del medio LB suplementado con extracto de levadura y sales.

TERCER OBJETIVO

- Producir heterológicamente la neurotoxina Magi 4 en la cepa de *E. coli* con mayor producción, en reactor tipo tanque agitado utilizando el mejor medio de cultivo obtenido a partir de las fermentaciones en matraces.

Se logró expresar heterológicamente la neurotoxina Magi 4 empleando un biorreactor siendo la cepa de *E. coli* SHuffle la idónea para esta fermentación.

CUARTO OBJETIVO

- Comprobar la actividad biológica y comparar los rendimientos.

El aumento del tiempo de plegamiento, así como, el incremento 10X de GSH/GSSG favoreció el plegamiento de la neurotoxina Magi 4.

La reacción de plegamiento resultó en diferentes isoformas, y solo una de estas, la fracción correspondiente al tiempo de retención 48.5 cromatografía fase reversa, fue la que presentó actividad tanto en ratones como en insectos.

Se probó esta fracción y se encontró una LD₅₀ para ratones fue de 860 ng/20 gr y para grillos fue de 8.2 ug/g.

X. Perspectivas

- Realizar fermentaciones empleando el método de feed batch en el reactor tanque agitado.
- Realizar estudios electrofisiológicos (Patch/Clamp) con la finalidad de observar diferencias puntuales entre a toxina nativa y la producida de forma heteróloga.
- Comparación en estructuras de la Magi 4 nativa vs rMagi 4 realizando ensayos de dicroísmo circular.

XI. Referencias

- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E. 2003. *Current Protocolin Molecular Biology*, Jhon Wiley & Sons Inc; Ringbou edition.
- Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., ... & Schäfer, F. (2009). Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. In *Methods in enzymology*(Vol. 463, pp. 439-473). Academic Press.
- Catterall, W. A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 26(1), 13-25.
- Catterall, W. A., Goldin, A. L., & Waxman, S. G. (2003). International Union of Pharmacology. XXXIX. Compendium of voltage-gated ion channels: sodium channels. *Pharmacological reviews*, 55(4), 575-578.
- Catterall, W. A., Perez-Reyes, E., Snutch, T. P., & Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological reviews*, 57(4), 411-425.
- Choi, J. H., & Lee, S. Y. (2004). Secretary and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 64(5), 625-635.
- Choi, J. H., Keum, K. C., & Lee, S. Y. (2006). Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science*, 61(3), 876-885.
- Cisneros-Ruiz, M., & Rito-Palomares, M. (2005). Estrategias de bioingeniería para la recuperación primaria de productos biológicos. *Revista mexicana de ingeniería Química*, 4(1).
- Cooper, G.M. and R.E. Hausman, R.E (2010) *La CÉLULA*. 5 Edición: p. 544-545.
- Demain, A. L., Vaishnav, P. (2009). Production of Recombinant Proteins by Microbes and Higher Organisms. *Comprehensive Biotechnology*, Second Edition, 3 (3), 333–345.
- Dingermann, T. (2008). Recombinant therapeutic proteins : Production platforms and challenges, (3), 90–97.

- Escoubas, P., Sollod, B., & King, G. F. (2006). Venom landscapes: mining the complexity of spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach. *Toxicon*, 47(6), 650-663.
- Freigassner, M., Pichler, H., & Glieder, A. (2009). Tuning microbial hosts for membrane protein production. *Microbial cell factories*, 8(1), 69.
- Gaberc-Porekar, V., & Menart, V. (2001). Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 49(1-3), 335-360.
- Galindo, E., Peña, C., & Serrano-Carreón, L. (2007). Domesticar microorganismos en un biorreactor: los retos del bioingeniero”.
- George, A. L. (2005). Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *The Journal of clinical investigation*, 115(8), 1990-1999.
- Goldin, A. L. (2001). Resurgence of sodium channel research. *Annual review of physiology*, 63(1), 871-894.
- Gräslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B. M., Bray, J., Gileadi, O., ... & Ming, J. (2008). Protein production and purification. *Nature methods*, 5(2), 135.
- Hernández, A., Alfaro, I., & Arrieta, R. (2003). *Microbiologia Industrial*.
- Jonasson, P., Liljeqvist, S., Nygren, P. A., & Ståhl, S. (2002). Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and applied biochemistry*, 35(2), 91-105.
- Kelly, W. J., & Muske, K. R. (2004). Optimal operation of high-pressure homogenization for intracellular product recovery. *Bioprocess and biosystems engineering*, 27(1), 25-37.
- Khow, O., Suntrarachun, S. (2012). Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2 (2), 159–162.
- Li, M., Su, Z. G., & Janson, J. C. (2004). In vitro protein refolding by chromatographic procedures. *Protein expression and purification*, 33(1), 1-10.
- McCluskey, A. J., Poon, G. M., & Gariépy, J. (2007). A rapid and universal tandem-purification strategy for recombinant proteins. *Protein Science*, 16(12), 2726-2732.
- Merrifield, R. B. (1963). Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, 85(14), 2149-2154.

Nicholson, G. M., & Graudins, A. (2002). Spiders of medical importance in the Asia–Pacific: Atracotoxin, latrotoxin and related spider neurotoxins. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 29(9), 785-794.

Overton, T. W. (2014). Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discovery Today*, 19 (5), 590–601.

Prabakaran, S., Lippens, G., Steen, H., & Gunawardena, J. (2012). Post-translational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 4(6), 565-583.

Prasad, S., Khadatare, P. B., & Roy, I. (2011). Effect of chemical chaperones in improving the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 77(13), 4603-4609.

QIAexpressionist, A. (2002). A handbook for high-level expression and purification of 6xhis-tagged proteins. Qiagen. p1-125..

Rang (2004). *Farmacología* (5ª ed.). España: Editorial Elsevier, pp. 503-508

Roush, D. J., & Lu, Y. (2008). Advances in primary recovery: centrifugation and membrane technology. *Biotechnology progress*, 24(3), 488-495.

Rozkov, A., Avignone-Rossa, C. A., Ertl, P. F., Jones, P., O'Kennedy, R. D., Smith, J. J., ... & Bushell, M. E. (2004). Characterization of the metabolic burden on *Escherichia coli* DH1 cells imposed by the presence of a plasmid containing a gene therapy sequence. *Biotechnology and bioengineering*, 88(7), 909-915.

Sambrook, J. & Russel, D. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Schein, C. H., & Noteborn, M. H. (1988). Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Nature biotechnology*, 6(3), 291.

Sørensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology*, 115(2), 113-128.

Tejeda-Mansir, A., Montesinos-Cisneros, R. M., & Guzmán, R. (2011). *Bioseparaciones*. Pearson Education

Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(2), 211.

Torres, L. (2001). *Tratado de anestesia y reanimación* (1ª ed.). España: Arán Ediciones, pp. 3002

Tsumoto, K., Abe, R., Ejima, D., & Arakawa, T. (2010). Non-denaturing solubilization of inclusion bodies. *Current pharmaceutical biotechnology*, 11(3), 309-312.

Viña, J. (2002). Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution.

Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J., & Khrestchatisky, M. (2010). Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug discovery today*, 15(1-2), 40-56.

Walls, D., McGrath, R., & Loughran, S. T. (2011). A digest of protein purification. In *Protein Chromatography* (pp. 3-23). Humana Press.

Yamaji, N., Little, M. J., Nishio, H., Billen, B., Villegas, E., Nishiuchi, Y., ... & Corzo, G. (2009). Synthesis, solution structure, and phylum selectivity of a spider δ -toxin that slows inactivation of specific voltage-gated sodium channel subtypes. *Journal of Biological Chemistry*, 284(36), 24568-24582.

Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D., & Somero, G. N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 217(4566), 1214-1222.

Zapata, F. G. B. (2004). *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*. El Colegio Nacional. Catterall W. A. (1992) *Physiol. Rev.* 72, S15-48.



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 11 - Diciembre - 2018

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor principal)
Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete (Co Tutor)
Dr. Iván Arenas Sosa
Dr. Luis Caspeta Guadarrama
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Tesis: "Análisis de la expresión de la neurotoxina Magi 4 utilizando diferentes medios de cultivo"

Alumno que la presenta a revisión: **JOSE DE JESUS HERNANDEZ PEREZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. LUIS CASPETA GUADARRAMA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 11 Dic. 2018

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor principal)
Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete (Co Tutor)
Dr. Iván Arenas Sosa
Dr. Luis Caspeta Guadarrama
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Tesis: "Análisis de la expresión de la neurotoxina Magi 4 utilizando diferentes medios de cultivo"

Alumno que la presenta a revisión: **JOSE DE JESUS HERNANDEZ PEREZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. IVAN ARENAS SOSA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 17 Dic 2018

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor principal)
Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete (Co Tutor)
Dr. Iván Arenas Sosa
Dr. Luis Caspeta Guadarrama
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Tesis: "Análisis de la expresión de la neurotoxina Magi 4 utilizando diferentes medios de cultivo"

Alumno que la presenta a revisión: **JOSE DE JESUS HERNANDEZ PEREZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE


DR. JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 11 Diciembre de 2018

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor principal)
Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete (Co Tutor)
Dr. Iván Arenas Sosa
Dr. Luis Caspeta Guadarrama
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Tesis: "Análisis de la expresión de la neurotoxina Magi 4 utilizando diferentes medios de cultivo"

Alumno que la presenta a revisión: **JOSE DE JESUS HERNANDEZ PEREZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 11 Diciembre de 2018

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor principal)
Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete (Co Tutor)
Dr. Iván Arenas Sosa
Dr. Luis Caspeta Guadarrama
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Tesis: "Análisis de la expresión de la neurotoxina Magi 4 utilizando diferentes medios de cultivo"

Alumno que la presenta a revisión: **JOSE DE JESUS HERNANDEZ PEREZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

Gerardo Corzo

DR. GERARDO ALFONSO CORZO BURGUETE