

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

“Expresión heteróloga de una alfa-neurotoxina de la serpiente *Micruroides euryxanthus* en *Escherichia coli* y la construcción de un vector para su expresión en *Nicotiana tabacum*”

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

NICOLAS ELIZALDE MORALES

ASESOR: DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ (CEIB-UAEM)

CO-ASESOR: M EN C. ALEJANDRO OLVERA RODRÍGUEZ (IBT-UNAM)

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO 2019

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas en el Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos bajo la tutoría del Dr. Ramón Suárez Rodríguez y en el Laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del M en C. Alejandro Olvera Rodríguez.

Agradecemos la beca de maestría otorgada #622423 por del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, al Centro de Investigación en Biotecnología y los estímulos otorgados por los proyectos P-10061 Equine Ebola Antibody Production y DPAGA IN207218.

Índice

Índice	1
Abreviaturas.....	6
Índice de tablas	7
Índice de figuras	7
Agradecimientos.....	9
Dedicatorias	11
Resumen	12
1. Introducción.....	13
1.1 Serpientes venenosas	13
1.2 Serpientes de coral	14
1.2.1 <i>Micruroides euryxanthus</i>	14
1.3 Toxinas de tres dedos.....	15
1.3.1 Péptido señal	16
1.4 α -neurotoxinas	16
1.4.1 Cuadro clínico de envenenamiento por mordeduras de coralillos	18
1.4.2 Tratamiento clínico	18
1.5 Antivenenos mexicanos contra serpientes de coral	18
1.6 Expresión heteróloga de α -neurotoxinas	19
1.7 Sistemas de expresión heterólogos	19
1.7.1 Células de ovario de hámster chino (CHO)	19
1.7.2 <i>Picchia pastoris</i>	20
1.7.3 <i>Nicotiana tabacum</i>	20
1.7.4 <i>Escherichia coli</i>	20
2. Antecedentes.....	21
2.1 Casos clínicos de mordeduras por <i>Micruroides euryxanthus</i>	21
2.2 Análisis preliminar del veneno de <i>Micruroides euryxanthus</i>	21
2.3 Expresión heteróloga de α -neurotoxinas de serpientes de coral mexicanas	22
2.3.1 MlatA1 de <i>Micrurus laticollaris</i>	22

2.3.2 <i>Micrurus diastema</i>	22
2.3.3 <i>Nicotiana tabacum</i> y su uso potencial en la expresión de toxinas de origen animal	23
3. Justificación	24
4. Hipótesis	24
5. Objetivos.....	24
5.1 Objetivo general.....	24
5.2 Objetivos particulares	24
6. Metodología.....	25
6.1 Estrategia experimental.....	25
6.2 Extracción de RNA de glándulas de veneno de <i>M. euryxanthus</i> mediante el reactivo Trizol®.....	25
6.3 Obtención del cDNA mediante transcripción reversa	26
6.4 Amplificación de toxinas de tres dedos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	27
6.5 Electroforesis de DNA en agarosa.....	27
6.6 Purificación de productos de PCR	28
6.7 Clonación de productos de PCR en el vector comercial pCR 2.1 TOPO.....	28
6.7.1 Transformación del producto de clonación en células quimiocompetentes de <i>E.</i> <i>coli</i> XL1Blue	29
6.8 Selección de transformantes con la construcción del vector pCR TOPO 2.1-MTx1829	
6.8.1 Purificación de plásmidos	29
6.8.2 Digestión de plásmidos con enzimas de restricción.....	30
6.8.3 Secuenciación de plásmidos.....	30
6.8.4 Análisis de secuencias y alineamientos.....	30
6.9 Expresión de α -neurotoxinas en <i>Escherichia coli</i>	30
6.9.1 Diseño de oligonucleótidos	30
6.9.2 Amplificación del inserto mTx18 de la α -neurotoxina de <i>M. euryxanthus</i> mediante reacción en cadena de la polimerasa.....	31
6.9.3 Electroforésis de DNA en agarosa y purificación de productos de PCR.....	31
6.9.4 Subclonación del inserto MTx18 en el vector pCR 2.1 TOPO	31

6.9.5 Transformación del producto de subclonación en células quimiocompetentes de <i>E. coli</i> XL1Blue	32
6.9.5.1 Selección de transformantes	32
6.9.5.2 Purificación, análisis de restricción y secuenciación de plásmidos.....	32
6.9.6 Purificación tipo Miniprep del plásmido pCR 2.1 TOPO-MTx18.....	32
6.9.6.1 Digestión del plásmido pCR 2.1 TOPO-MTx18 con las enzimas de restricción <i>BamHI</i> y <i>HindIII</i>	33
6.9.6.2 Purificación del producto de digestión (inserto MTx18)	33
6.9.7 Ligación del inserto MTx18 en el vector de expresión pQE30.....	33
6.9.7.1 Transformación del producto de ligación en células quimiocompetentes de <i>E. coli</i> XL1Blue	34
6.9.8 Análisis de expresión total de la proteína recombinante en la cepa de <i>E. coli</i> XL1BLUE	34
6.9.8.1 Extracción de proteína total.....	34
6.9.8.2 Electroforesis de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) para el análisis de proteínas	35
6.9.8.3 Detección de la α -neurotoxina MTx18 mediante ensayo de Western Blot... 35	
6.9.9 Expresión de la α -neurotoxina MTx18 en la cepa de <i>E. coli</i> SHuffle.....	35
6.9.9.1 Transformación de la construcción pQE30-MTx18 en células quimiocompetentes de <i>E. coli</i> SHuffle	35
6.9.9.2 Análisis de expresión de la α -neurotoxina MTx18 en la cepa de <i>E. coli</i> SHuffle mediante gel de SDS-PAGE	36
6.9.9.3 Expresión de la α -neurotoxina MTx18 en la cepa SHuffle.....	36
6.9.9.4 Purificación de la α -neurotoxina recombinante MTx18 a partir de la fracción soluble mediante cromatografía de afinidad a níquel.....	36
6.9.10 Determinación de la letalidad de la α -neurotoxina recombinante en ratones de la cepa CD1	37
6.9.11 Producción de anticuerpos policlonales anti MTx18 en conejos	37
6.9.11.1 Inmunización de conejos Nueva Zelanda blancos.....	37
6.9.11.2 Determinación de títulos anti MTx18 mediante ELISA.....	38
6.9.11.3 Reconocimiento de los sueros de conejo hiperinmunizados contra la toxina recombinante MTx18 mediante Western Blot.....	38
6.10 Construcción del vector para la expresión en plantas de tabaco.....	39
6.10.1 Diseño de oligonucleótidos	39

6.10.2 Amplificación del inserto MTx18 de la α -neurotoxina de <i>M. euryxanthus</i> mediante reacción en cadena de la polimerasa.....	39
6.10.3 Electroforésis de DNA en agarosa	39
6.10.4 Purificación de productos de PCR	40
6.10.5 Clonación de productos de PCR en el vector comercial pCR 8 TOPO GW.....	40
6.10.5.1 Transformación del producto de clonación en células quimiocompetentes de <i>E. coli</i> Top 10	40
6.10.5.2 Selección de transformantes con la construcción PCR 8 TOPO GW-MTx 18	41
6.10.5.3 Purificación de plásmidos.....	41
6.10.5.4 Digestión de plásmidos pCR 8 TOPO GW-MTx18 con la enzima de restricción <i>EcoRI</i> y secuenciación.....	42
6.10.6 Recombinación mediante el sistema Gateway del gen MTx18 de la α -neurotoxina de <i>M. euryxanthus</i> en el vector de expresión de plantas pK2GW7	42
6.10.6.1 Amplificación del inserto MTx18 mediante reacción en cadena de la polimerasa y purificación	42
6.10.6.3 Recombinación del gen MTx18 en el vector de expresión de plantas pK2GW7.....	43
6.10.6.4 Transformación del producto de recombinación en células electrocompetentes de <i>E.coli</i> BD 3.1.....	44
6.10.7 Selección de transformantes y purificación de plásmidos	44
6.10.7.1 Digestión de plásmidos pK2GW7-MTx18 con la enzima de restricción <i>EcoRI</i> y secuenciación de plásmidos.....	44
7. Resultados.....	45
7.1 Extracción de RNA y obtención de cDNA.....	45
7.3 Amplificación de transcritos de α -neurotoxinas mediante reacción en cadena de la polimerasa.....	45
7.4 Selección de construcciones pCR 2.1 TOPO-3FTXs mediante ensayo de restricción del vector de clonación	46
7.5 Secuenciación de plásmidos	47
7.5 Expresión de α -neurotoxinas en <i>E. coli</i>	49
7.5.1 Amplificación y purificación del inserto MTx18 mediante PCR	49
7.5.2 Análisis de plásmidos pCR 2.1 TOPO-MTx18 mediante la digestión con enzimas de restricción <i>BamHI</i> y <i>HindIII</i>	49

7.5.2.1 Secuenciación de plásmidos	50
7.5.3 Análisis de plásmidos pQE30-MTx18 mediante la digestión con enzimas de restricción <i>BamHI</i> y <i>HindIII</i>	51
7.5.3.1 Secuenciación de la toxina MTx18 a partir del plásmido de expresión pQE30	51
7.5.4 Análisis de expresión total en la cepa de <i>E. coli</i> XL1Blue	52
7.5.5 Expresión de α -neurotoxina MTx18 en la cepa de <i>E. coli</i> SHuffle	52
7.5.6 Purificación de la toxina recombinante MTx18 mediante cromatografía de afinidad a níquel	54
7.5.7 Determinación de la letalidad de la toxina recombinante MTx18 en ratones CD1	54
7.5.8 Cuantificación de títulos de anticuerpos de conejo anti MTx18 mediante ELISA y dosis efectiva media	55
7.10 Construcción del vector para la expresión de la toxina MTx18 de <i>M. euryxanthus</i> en plantas de tabaco	56
7.10.1 Amplificación y purificación del gen MTx18 de la α -neurotoxina de <i>M. euryxanthus</i> mediante PCR	56
7.10.2 Análisis de construcciones pCR8 GW TOPO-MTx18 mediante el corte con la enzima de restricción <i>EcoRI</i>	56
7.10.3 Recombinación del gen MTx18 en el vector de expresión pK2GW7.....	57
7.10.3.1 Amplificación del gen de la α -neurotoxina MTx18 mediante PCR	57
7.10.3.2 Análisis de construcciones pK2GW7-MTx18 mediante el ensayo con la enzima de restricción <i>EcoRI</i>	58
8. Discusión	59
9. Conclusiones.....	63
10. Perspectivas	63
11. Bibliografía.....	64
12. Anexos	68

Abreviaturas

A₂₈₀: Absorbancia a 280 nm

nm: Nanómetros

mg: Miligramos

µg: Microgramos

ml: Mililitros

µl: Microlitros

MPM: Marcador de peso molecular

g: Gramos

mM: Milimolar

M: Molar

U: Unidades

PLA₂: Fosfolipasa de tipo A₂

RNA: Ácido ribonucleico

DNA: Ácido desoxirribonucleico

nAChR: Receptor nicotínico de acetilcolina

K_d: Constante de disociación

Kg: Kilogramo

mRNA: RNA mensajero

Kb: Kilobases

kDa: Kilodaltones

pb: Pares de bases

DL₅₀: Dosis letal media

DE₅₀: Dosis efectiva media

°C: Grados centígrados

cDNA: Cadena complementaria de DNA

MgCl₂: Cloruro de magnesio

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

TAE: Tris-Acetato-EDTA

UV: Luz ultravioleta

rpm: Revoluciones por minuto

ng: Nanogramos

IPTG: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

V: Volts

mAmp: Miliamperes

OD₆₀₀: Densidad óptica a 600 nm

UA: Unidades de absorbancia

IgG: Inmunoglobulinas G

3FTXs: Toxinas de tres dedos

UTR: Regiones no codificantes

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de α -neurotoxinas de venenos de elápidos	17
Tabla 2. Ejemplos de toxinas animales expresadas en plantas.....	23
Tabla 3. Condiciones de obtención de cDNA	26
Tabla 4. Condiciones de PCR para amplificar transcritos de toxinas de tres dedos.....	27
Tabla 5. Condiciones de amplificación del inserto MTx18 mediante PCR	31
Tabla 6. Esquema de inmunización de conejos	37
Tabla 7. Condiciones de amplificación del inserto MTx18 mediante PCR	39
Tabla 8. Condiciones de amplificación del inserto MTx18.....	43
Tabla 9. Porcentajes de identidad entre α -neurotoxinas de serpientes de coral de América.....	48

Índice de figuras

Figura 1. Morfología del aparato venenoso de serpientes	13
Figura 2. <i>Micruroides euryxanthus</i>	14
Figura 3. Estructura tridimensional de una 3FTx de la serpiente <i>Laticauda semifasciata</i> ...	15
Figura 4. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de toxinas de tres dedos.....	16
Figura 5. Mecanismo de acción de α -neurotoxinas	17
Figura 6. Mapa del vector de clonación pCR TOPO 2.1®.....	28
Figura 7. Mapa del vector de expresión pQE30	34
Figura 8. Mapa del vector de clonación pCR 8 TOPO GW	41
Figura 9. Mapa del vector de expresión para plantas de tabaco	43
Figura 10. Purificación de RNA	45
Figura 11. Amplificación de toxinas de tres dedos mediante PCR y purificación.....	46
Figura 12. Digestión de construcciones pCR 2.1 TOPO-3FTXs con <i>EcoRI</i>	46
Figura 13. Alineamiento de secuencias de 3FTXs de <i>M. euryxanthus</i>	47
Figura 14. Alineamiento de secuencias de α -neurotoxinas y MTx18 de <i>M. euryxanthus</i>	48

Figura 15. Amplificación y purificación del producto de PCR (Inserto MTx18)	49
Figura 16. Digestión de construcciones pCR 2.1 TOPO-MTx18 con <i>BamHI</i> y <i>HindIII</i>	50
Figura 17. Secuencia completa del gen que codifica la α -neurotoxina MTx18 de <i>M. euryxanthus</i>	50
Figura 18. Digestión de construcciones pQE30-MTx18 con <i>BamHI</i> y <i>HindIII</i>	51
Figura 19. Secuencia completa del gen que codifica la α -neurotoxina MTx18 de <i>M. euryxanthus</i> a partir del vector de expresión pQE30.....	51
Figura 20. Expresión total de la toxina recombinante MTx18 (rMTx18) en la cepa XL1Blue	52
Figura 21. Detección de la toxina rMTx18 mediante ensayo de western blot en la cepa XL1Blue..	52
Figura 22. Expresión total de la toxina rMTx18 en la cepa SHuffle.....	53
Figura 23. Detección de la rMTx18 mediante ensayo de western blot en la cepa SHuffle..	53
Figura 24. Prueba de expresión para la localización de la producción de la toxina rMTx18 en la cepa SHuffle.....	53
Figura 25. Purificación de la toxina recombinante rMTx18 mediante cromatografía de afinidad a níquel.	53
Figura 26. Cálculo de la dosis letal media de la toxina rMTx18 en ratones CD1	57
Figura 27. Cuantificación de títulos de anticuerpos de conejo anti-rMTx18	57
Figura 28. Purificación del inserto MTx18 de la α -neurotoxina de <i>M. euryxanthus</i>	57
Figura 29. Ensayo de restricción de la construcción pCR8 GW TOPO-MTx18 con la enzima <i>EcoRI</i>	57
Figura 30. Purificación del inserto MTx18 de la α -neurotoxina de <i>M. euryxanthus</i> para su recombinación en el vector pK2GW7	57
Figura 31. Digestión de la construcción pK2GW7-MTx18 mediante la enzima <i>EcoRI</i>	58
Figura 32. Secuencia completa de la α -neurotoxina MTx18 de <i>M. euryxanthus</i> a partir del vector PK2GW7-MTx18	58

Agradecimientos

Con mucho cariño y respeto al Dr. Ramón Suárez Rodríguez, por brindarme su apoyo y confianza en el laboratorio, por las pláticas, consejos, anécdotas y la convivencia en el LFMP donde me sentí muy bien recibido.

Mi más querido agradecimiento al M en C. Alejandro Olvera Rodríguez, quien me acogió en su pequeño grupo de trabajo (*La pichonera*), donde aprendí y crecí tanto académicamente como personalmente, gracias por tus enseñanzas, consejos y pláticas, también por tu apoyo y cariño.

Agradezco de manera especial al Dr. Alejandro Alagón Cano por la confianza y apoyo de abrirme las puertas de su laboratorio durante estos últimos años, así como su entusiasmo y alegría en las charlas de pasillo, siempre aprendí algo nuevo, desde plantas, cultura general y claro, de ciencia.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Lidia González Morales, M en C. Alejandro Olvera Rodríguez, Dr. José Augusto Ramírez Trujillo, Dr. José de Jesús Arellano García y Dr. Ramón Suárez Rodríguez.

A los miembros del laboratorio Alagón-Corzo, Dr. Alejandro Alagón, Angélica Linares, Ricardo Mondragón, Fernando Losoya, Mitzi Amaro, Alejandro Olvera, Oscar Pérez, Felipe Olvera, Dr. Gerardo Corzo, Hilda Vázquez, Manuela Ávila, Marco Ibarra, Andrea Colis, Roberto Ponce, Jesús Borrego, Damaris, Irving Archundía, Irene Castillo, Edgar Neri, Melisa Benard, Germán Aguilar, Diana Alvarado, Luis A. García, Lilu, Herlinda Clement, Félix Santana, Iván Arenas, Alondra Callejas, Samuel Cardoso, Raúl Sánchez, Guillermo de la Rosa, Marcos Salazar, David Villaseñor, Belem García, Oscar Aguayo, Julia Quiróz y a todos aquellos que de una u otra forma estuvieron poco tiempo pero dejaron su huella, Osiris Maldonado, Francisco Chablé y Ana Artero.

A los miembros del laboratorio del Dr. Ramón Suárez, Dr. Augusto Trujillo, Nancy Hernández, Fernando Aranda, Guadalupe Castillo, Laura Dector, Jessica Pacheco y Julio Salinas.

Por el apoyo técnico al Biól. Felipe Olvera Rodríguez, la M en C. Nancy Hernández Bueno y Ricardo Mondragón Cortés.

Por el apoyo administrativo a Angélica Linares Labastida, Biól Fernanda Cristina Barrera Garduño y en el laboratorio a Manuela Ávila.

Al centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma de Estado de Morelos.

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

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

A la unidad del bioterio del Instituto de Biotecnología.

A la unidad de cómputo del Instituto de Biotecnología.

Dedicatorias

A mis padres Aquileo Elizalde García y Aurelia Morales Ramón, por darme todo su cariño, amor, paciencia y sobre todo confianza en estos últimos años, sin su ayuda no habría sido lo mismo, esta meta personal también es suya, los amo.

A mi hermana Deisy, gracias por tu apoyo y cariño, por esos detalles de cuidar de mis papás y mis sobrinos, te quiero mucho.

A mis sobrinos, Ezequiel y Tavín, aun siendo pequeñitos también son parte de este logro, por todas esas risas, los juegos y las videollamadas. Son ese pedacito de vida que adoro tanto.

Al resto de mi familia, mis abuelas, tíos, primos y conocidos.

A mi gran amigo Alejandro Olvera Rodríguez (Pichón) y familia, gracias por esas risas, los regalos, el cariño y el aprecio, por lo convivido fuera y dentro del laboratorio.

A mis amigos de la pichonera, Mitzi, Fer, Ana, Roberto y Oscar, con quienes pasé excelentes tardes y buenas aventuras dentro y fuera del laboratorio, los quiero.

A mis amigos de la Universidad, Arístides, Rebeca, Ihalí, Gabriel y Denisse con quienes a pesar de la distancia siempre me entretenía y recordábamos viejos tiempos.

A mis amigos de generación de la maestría, personalmente a Jesús Hernández, Ulises Dantán, César Arreguín, Saúl Becerro, Ana Lilia, Erika y Lupita; a mis amigos de equipo de futbol y volibol, Alan, Gus, Poly, Chuy, Manuel Huerta, Fede, Julio, Chambers, entre otros y al buen Adrián por los viajes a casa.

A mis pokeamigos, con quienes compartía ese lado divertido y entretenido después de un experimento fallido y días largos; especialmente a David Aguilar, Claudia Cruz, Isaid Sánchez, Diego Pardo, Fer Ramírez, Isis Villanueva, Josué Ibarra, Merari, Luis, Toño, Samuel, Gab, Balam, César Vázquez, Charllie, Pepe, Pato, Felipe, Momo, Jorge, Juan, Alfredo, Jesús y Alex Rogers.

Resumen

El 20% de las serpientes distribuidas a nivel mundial son venenosas y están clasificadas en 5 familias principales de las cuales solo la familia elapidae y viperidae son consideradas de importancia médica. La familia elapidae está representada por mambas, cobras, bungarus y serpientes de coral o coralillos. Las serpientes de coral en América se clasifican en tres géneros distintos, *Micrurus*, *Leptomicrurus* y *Micruroides*. La especie *Micruroides euryxanthus* se distribuye en México en los estados de Sinaloa, Sonora, Chihuahua y Coahuila, sin embargo, pese a no ser considerada una especie potencialmente peligrosa es importante conocer los componentes tóxicos que abundan en su veneno y con base en ello analizar la relación evolutiva de esta especie con las serpientes del género *Micrurus*. En el presente trabajo se obtuvieron 18 secuencias totales de toxinas de tres dedos (3FTXs) a partir del RNA de las glándulas de veneno de *M. euryxanthus*, posteriormente se clasificaron en 6 grupos distintos de secuencias con base en su función y características. Las toxinas de tipo I o α -neurotoxinas (MTx6, MTx7 y MTx18) se compararon a nivel de secuencia con diferentes α -neurotoxinas reportadas en el veneno de distintos elápidos del mundo, así como toxinas expresadas heterológamente. A partir de los análisis *in silico* se seleccionó la toxina MTx18 la cual se clonó en el vector pQE30 para su expresión en el modelo de *E. coli*. La α -neurotoxina recombinante (rMTx 18) se expresó en la cepa SHuffle en forma soluble y activa con un rendimiento final de 2.6 mg/litro de medio de cultivo y una dosis letal media de 8.3 μ g/ratón. Los sueros de conejos hiperinmunizados con la toxina recombinante neutralizaron la actividad de la toxina con una dosis efectiva media de 224.3 μ l de suero de conejo/ratón. Se logró clonar el gen de la toxina MTx18 de *M. euryxanthus* en el vector de transformación de plantas pK2GW7 para su posterior expresión en tabaco.

1. Introducción

1.1 Serpientes venenosas

El suborden Serpentes alberga poco más de 3500 especies de serpientes distribuidas a nivel mundial, habitan zonas tropicales y subtropicales en todos los continentes excepto las regiones árticas (Vitt y Caldwell, 2014). Las serpientes venenosas representan el 20% y se clasifican en cinco grandes familias siendo viperidae y elapidae las familias de mayor importancia médica de acuerdo a la organización mundial de la salud. El aparato venenoso de estos ofidios se caracteriza por estar compuesto de un par de glándulas exocrinas que se encargan de producir el veneno y dientes maxilares modificados llamados colmillos por los que el veneno es liberado (Véase figura 1) (Mackessy, 2012).

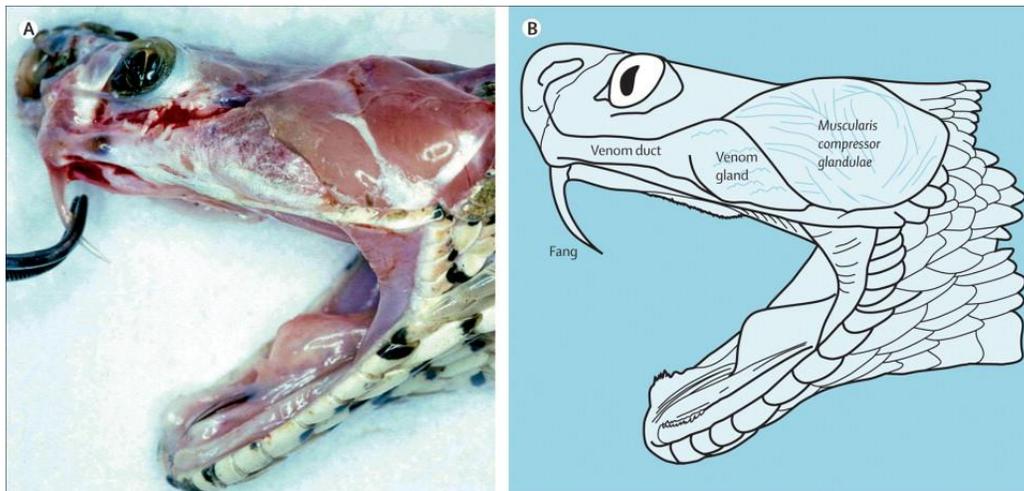


Figura 1. Morfología del aparato venenoso de serpientes. A) Vista *in vivo* del aparato venenoso. B) Esquema general con nombres del aparato venenoso de serpientes.

El veneno es una mezcla compleja de péptidos, proteínas y nucleósidos, desde el punto de vista biológico éste representa un arma de defensa contra la depredación, además facilita la caza y digestión de las presas (Gold *et al*, 2002). Los componentes del veneno conocidos como toxinas varían en peso molecular y poseen actividades farmacológicas distintas, por ejemplo, las serpientes de cascabel que pertenecen a la familia viperidae tienen venenos capaces de inducir coagulopatías, necrosis de tejidos así como neurotoxicidad debido a la presencia de algunos componentes como la crotovina en el veneno de la cascabel sudamericana *Crotalus durisus terrificus* mientras que el veneno de los elápidos tales como cobras, mambas y serpientes de coral o coralillos causan principalmente neurotoxicidad (Fox y Serrano, 2008; Calvete *et al*, 2010).

1.2 Serpientes de coral

Las serpientes de coral o coralillos, miembros de la familia elapidae en América están clasificados en tres géneros representativos de serpientes venenosas: *Micrurus*, *Leptomicrurus* y *Micruroides* siendo *Micrurus* el género con mayor abundancia con poco más 70 especies distribuidas desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina mientras que para *Micruroides* solo se ha reportado una especie y tres subespecies (Correa-Neto *et al*, 2011). Anualmente en América ocurren cerca de 200,000 casos de mordeduras de serpientes venenosas de los cuales 3,000 terminan en decesos y que en su mayoría son causados por crotálicos versus el 1% causado por serpientes de coral. Los coralillos cuentan con venenos muy letales y principalmente neurotóxicos, esto debido a la presencia de dos de los componentes más abundantes en el veneno como lo son fosfolipasas A₂ (PLA₂) neurotóxicas (β -neurotoxinas) y α -neurotoxinas que pertenecen a la superfamilia de las toxinas de tres dedos (3FTXs) (Chippaux, 2017).

1.2.1 *Micruroides euryxanthus*

La serpiente de coral de Sonora o *Micruroides euryxanthus* se distribuye en el sureste de Estados Unidos desde Arizona hasta Nuevo México y en el noreste de México en los estados de Sonora, Chihuahua, Sinaloa y Coahuila (Yang *et al*, 2017). Estas serpientes se caracterizan por poseer un patrón de colores rojo-amarillo-negro similar al de las serpientes de coralillo (*Micrurus*) a lo largo de su cuerpo, son de talla pequeña y miden aproximadamente 40-56 cm (Figura 2). Habita zonas desérticas, especialmente troncos, madrigueras y espacios rocosos, se alimenta de serpientes pequeñas y lagartijas. El potencial de su veneno se desconoce, sin embargo, dada la relación con las serpientes de la familia elapidae es probable que el veneno esté enriquecido con neurotoxinas (Ramírez-Bautista y Arizmendi, 2004).



Figura 2. *Micruroides euryxanthus*. Ejemplar en cautiverio de coralillo de Sonora, fotografía tomada por Edgar Neri Castro.

1.3 Toxinas de tres dedos

Son polipéptidos no enzimáticos formados por 60-74 residuos de aminoácidos y tienen cuatro o cinco puentes disulfuro de los cuales cuatro están conservados en todos los miembros de esta familia. Se caracterizan por tener un núcleo hidrofóbico establecido por cuatro puentes disulfuro y del cual emergen tres loops que semejan tres dedos de una mano, de ahí el nombre de la familia, como se observa en la figura 3.

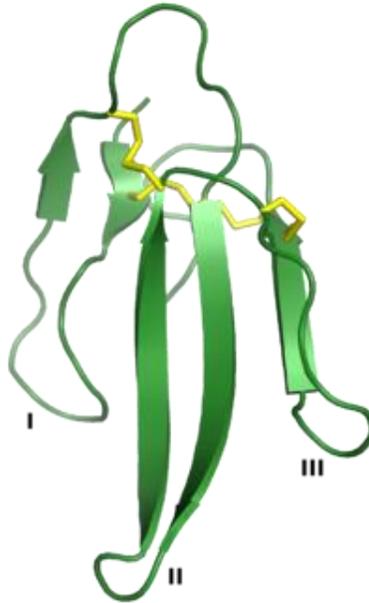


Figura 3. Estructura tridimensional de una 3FTx de la serpiente *Laticauda semifasciata*. La erabutoxina al igual que las 3FTxs en general posee tres loops bien definidos enumerados con números romanos en la figura mientras que los puentes disulfuro se encuentran en el núcleo de la proteína en barras amarillas.

Las 3FTxs poseen efectos tóxicos muy potentes y su estudio ha contribuido al análisis de los mecanismos de acción fisiológicos, bioquímicos y moleculares de los envenenamientos por serpientes de coral. Existe una gran variedad de actividades biológicas reportadas para esta familia, tal es el caso de las α -neurotoxinas que actúan como antagonistas del receptor nicotínico de acetilcolina muscular (nAChR), κ -bungarotoxinas con afinidad hacia receptores nicotínicos neuronales, toxinas muscarínicas con selectividad hacia receptores muscarínicos, fasciculinas que inhiben la acetilcolinesterasa, calciseptinas que bloquean canales de calcio de tipo L, cardiotoxinas que ejercen su actividad formando poros en membranas celulares, dendroaspinas las cuales antagonizan procesos de adhesión celular e interactúan con canales de potasio, entre otros (Kini y Doley, 2010; Kessler *et al*, 2017).

1.3.1 Péptido señal

La superfamilia de las 3FTxs entre otras de sus características tienen un péptido señal altamente conservado el cual comprende 21 aminoácidos (Figura 1), los transcritos de este tipo de toxinas está integrado por 3 exones, el péptido señal en tal caso está codificado en el exón 1 del RNA mensajero mientras que el resto de la proteína esta codificado en los exones 2 y 3. En la figura 1, se muestra un alineamiento de toxinas de tres dedos provenientes de distintos elápidos del mundo, el péptido señal se encuentra señalado en el corchete azul (Kessler *et al*, 2017).

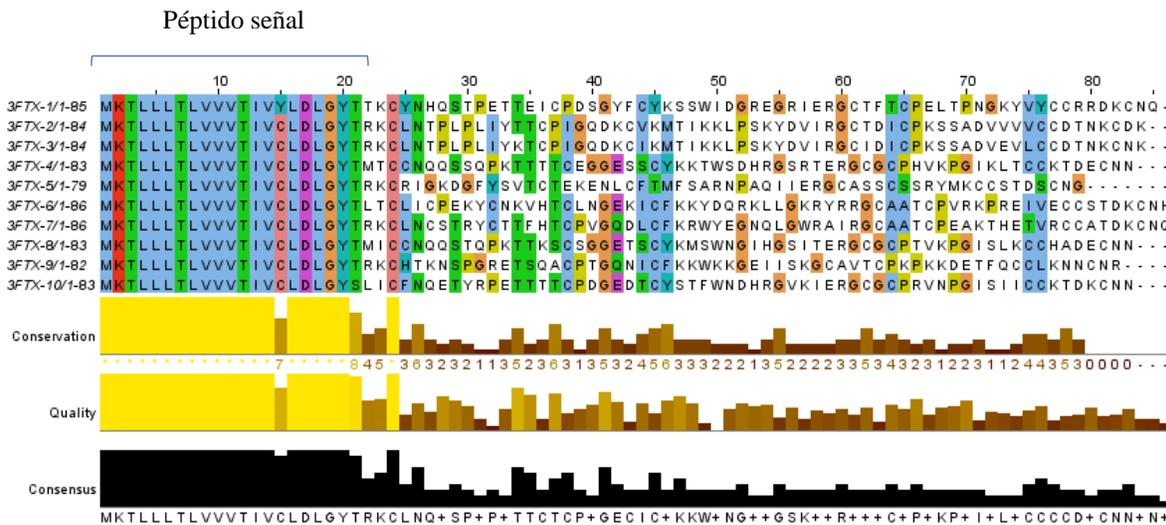


Figura 4. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de toxinas de tres dedos. El péptido señal se encuentra representado por 21 aminoácidos (corchete azul). Alineamiento hecho con el programa Jalview 2.10.5.

1.4 α -neurotoxinas

Se denomina así a un grupo de toxinas descubiertas hace poco más de 50 años, son el componente principal de los venenos de mambas, serpientes de coral, kraits y serpientes marinas. Se aislaron por primera vez a partir del veneno de la serpiente de Taiwan *Bungarus multicinctus*, son antagonistas del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) situado en la unión neuromuscular bloqueando la transmisión de impulsos nerviosos causando parálisis flácida (Figura 5).

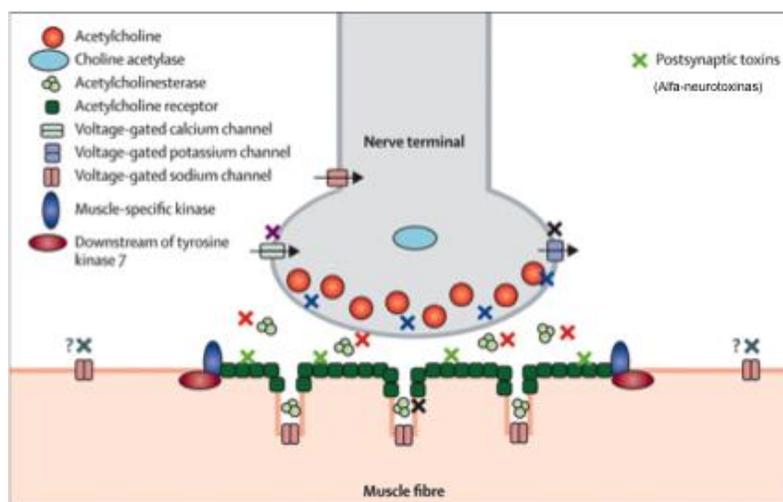


Figura 5. Mecanismo de acción de α -neurotoxinas. Las α -neurotoxinas se unen con gran afinidad al receptor de acetilcolina (cubos verdes intensos), mientras que las toxinas se representan con cruces verdes tenues e impiden que la acetilcolina pueda llegar al receptor en la fibra muscular y llevar a cabo la contracción de los músculos (Tomado de Thinglink, 2018).

Se clasifican en α -neurotoxinas de cadena corta (60-62 residuos de aminoácidos) con cuatro puentes disulfuro, α -neurotoxinas de cadena larga (66-74 residuos de aminoácidos) con cinco puentes disulfuro, el puente disulfuro extra situado en el loop II, α -neurotoxinas atípicas (69 residuos de aminoácidos) con cuatro puentes disulfuro y α -neurotoxinas no convencionales (62-68 residuos de aminoácidos) y cinco puentes disulfuro, el puente disulfuro extra a diferencia de la de cadena larga se sitúa en el loop I (Kini y Doley, 2010., Barber *et al* 2013.) A continuación, se muestra en la tabla 1 el resumen de algunas de las características en la clasificación de α -neurotoxinas.

Tabla 1. Clasificación de α -neurotoxinas de venenos de elápidos

Tipos	Blancos moleculares	Fuentes	Ejemplos
α -neurotoxinas de cadena corta	Alta afinidad por nAChR muscular o <i>Torpedo</i> ($K_d = 10^{-9} - 10^{-11}$ M)	Serpientes de la familia Elapidae e Hydrophidae	α -erabutoxina (<i>Laticauda semifasciata</i>) α -toxina (<i>Naja nigricolis</i>)
α -neurotoxinas de cadena larga	Alta afinidad por nAChR muscular o <i>Torpedo</i> ($K_d = 10^{-9} - 10^{-11}$ M) y nAChR neuronal ($K_d = 10^{-8} - 10^{-9}$ M)	Serpientes de la familia Elapidae	α -bungarotoxina (<i>Bungarus multicinctus</i>)
α -neurotoxinas atípicas	Alta afinidad por nAChR de <i>Torpedo</i> ($K_d = 10^{-11}$ M)	Serpientes de la familia Hydrophidae	Toxina Lc-a, Lc-b (<i>Laticauda colubrina</i>)
α -neurotoxinas no convencionales	Baja afinidad por nAChR muscular o <i>Torpedo</i> ($K_d = 10$ nM)	Exclusivo de especies de la familia Elapidae	Candoxina (<i>Bungarus candidus</i>) WTX (<i>Naja kaouthia</i>) Wntx-5 (<i>Naja sputatrix</i>)

En los blancos moleculares, se muestra la interacción con receptores nicotínicos de acetilcolina y ejemplos. Como información adicional se muestra la constante de disociación de las toxinas (K_d). *Torpedo*: Receptor nicotínico de acetilcolina específico de pez (raya).

1.4.1 Cuadro clínico de envenenamiento por mordeduras de coralillos

Las α -neurotoxinas del veneno de elápidos son altamente tóxicas, la dosis letal media de estas oscila entre 0.04 – 0.3 mg/kg de peso (Kini y Doley, 2010). El envenenamiento puede manifestarse rápidamente en un par de horas o retrasarse hasta 18 horas después de la mordedura de la serpiente. Algunos de los principales síntomas son reacciones cutáneas locales y dolor en el sitio de la mordedura, a menudo que el veneno se empieza a distribuir en el cuerpo se presenta parálisis de las extremidades y músculos respiratorios, espasmos, salivación excesiva, caída de párpados y cianosis (espasmos de músculos maxilares). Las muertes por mordeduras de serpientes de coral se deben al fallo respiratorio provocado por la parálisis de músculos respiratorios causados por α -neurotoxinas (Chang, 1979).

1.4.2 Tratamiento clínico

Las personas mordidas por elápidos son hospitalizadas durante 48 horas como mínimo para brindar el mejor soporte médico en caso de presentarse parálisis y neumonía en el cuerpo del paciente. Sin embargo, debido a complicaciones respiratorias algunos pacientes han llegado a requerir respiración artificial debido a la parálisis de músculos respiratorios. Pese a ello, el tratamiento definitivo contra las mordeduras de serpientes de coral es la administración de antiveneno el cual previene la manifestación de los síntomas, así como daño tisular o de órganos. Los antivenenos son producidos por la inmunización de animales de talla grande como caballos, ovejas, cerdos y llamas con el veneno de serpientes, posteriormente el suero se extrae y se procesa para concentrar las inmunoglobulinas (IgG) dando como resultado el producto terminado rico en anticuerpos. El antiveneno es administrado vía intravenosa, la dosis de antiveneno necesaria debe ser calculada relativamente de acuerdo a la cantidad de veneno inoculado en el cuerpo del paciente por lo que la cantidad de viales recomendada como dosis inicial va de uno a dos con dosis repetidas en casos de envenenamiento severo (Chippaux, 2017).

1.5 Antivenenos mexicanos contra serpientes de coral

Coralmyn[®] es un antiveneno policlonal de fragmentos (Fab)₂ de origen equino contra la mordedura de serpientes de coral en México y es fabricado por los Laboratorios Bioclón usando el veneno de *Micrurus nigrocinctus* como inmunógeno. El antiveneno Coralmy[®]n probado en ensayos de laboratorio es capaz de neutralizar el efecto del veneno de diferentes serpientes de coral norteamericanas en ratones, sin embargo, la cantidad de anticuerpos dirigidos contra α -neurotoxinas es baja debido a que están poco representadas en los venenos y además su bajo peso molecular impide que sean totalmente reconocidas por el sistema inmune del animal.

Una de las estrategias en el mejoramiento de antivenenos contra serpientes de coral implica la adición de α -neurotoxinas purificadas como suplemento a los esquemas de inmunización tradicionales en caballos y estos sean detectados por el sistema inmune del animal para la obtención de antivenenos más eficaces, es decir, mayor potencia relativa para tratar envenenamientos de manera más efectiva (Carbajal-Saucedo, 2004; Clement *et al*, 2016).

1.6 Expresión heteróloga de α -neurotoxinas

El descubrimiento de las α -neurotoxinas entre otros aspectos ha contribuido a la caracterización de algunos grupos de receptores, los mejores estudiados son los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), los subtipos neuronal y muscular cada uno compuesto por 5 subunidades fueron aislados gracias al uso de α -neurotoxinas como herramienta para su purificación. Sin embargo, uno de los grandes retos en el estudio de estos receptores es la disponibilidad de dichas toxinas puesto que son poco abundantes en el veneno de elápidos. Debido a ello una de las alternativas es la obtención de tales toxinas de forma recombinante, es decir, generar toxinas en un sistema de expresión (microbiano o eucarionte) distinto al de la fuente natural (Andersen y Krummen, 2002). Uno de los principales ejemplos es la α -bungarotoxina la cual se expresó en *E. coli* y *P. pastoris* mediante el uso de proteínas de fusión para generar toxinas activas y con ello elucidar los mecanismos de acción de α -neurotoxinas (actualmente ya conocidos), posteriormente se expresaron neurotoxinas de caracoles cónicos, serpientes marinas, cobras, entre otros (Rosenthal *et al*, 1994; Spiezia *et al*, 2012).

1.7 Sistemas de expresión heterólogos

Algunos aspectos a considerar durante la selección del sistema de expresión heterólogo son la calidad de la proteína, funcionalidad, tiempo de producción, rendimiento y costos. Las proteínas actualmente son producidas en bacterias, levaduras, células de mamífero, plantas e insectos, cada uno con sus ventajas y limitaciones de uso (Gecchele *et al*, 2015). A continuación, se describen algunos de los principales sistemas de expresión, ventajas y desventajas para la producción de proteínas recombinantes.

1.7.1 Células de ovario de hámster chino (CHO)

El activador de plasminógeno tisular humano fue la primera proteína recombinante terapéutica expresada en células de mamífero. Las células de mamífero son el principal sistema de expresión de proteínas terapéuticas, cerca del 70% de estas proteínas son producidas en células de ovario de hámster chino. Las ventajas más sobresalientes de su uso son que cuentan con una maquinaria capaz de llevar a cabo eficientemente modificaciones postraduccionales entre las que destacan las glicosilaciones principalmente ya que muchas proteínas de valor comercial están naturalmente glicosiladas, es un sistema

muy confiable pues se llegan a obtener rendimientos de hasta 10g/L de células (Kim, 2012). Algunas de las desventajas de las células CHO son el uso de medios de cultivo costosos, líneas celulares, equipos y sobre todo la susceptibilidad a la contaminación de los cultivos celulares por microorganismos puesto que no se emplea el uso de antibióticos como normalmente ocurre en bacterias, hongos etc. (Dingermann, 2008).

1.7.2 *Picchia pastoris*

Picchia pastoris se ha convertido en uno de los sistemas de expresión de proteínas heterólogas más exitosos en años recientes, algunos de los factores que han contribuido su uso es la presencia de un promotor derivado de la alcohol oxidasa I (AOXI) el cual controla fuertemente la expresión de los genes, es capaz de realizar modificaciones postraduccionales como procesamiento proteolítico, plegamiento, formación de puentes disulfuro y glicosilación de proteínas (Ahmad *et al*, 2014). Las técnicas necesarias para su manipulación genéticas son relativamente fáciles puesto que el sistema es muy similar a los descritos para *Saccharomyces cerevisiae*. A pesar de los usos potenciales de este sistema de expresión existen algunas desventajas que limitan su uso, tal es el caso del requerimiento de chaperonas moleculares para el ensamblaje de proteínas y que *P. pastoris* es incapaz de producir lo cual limita el correcto plegamiento de la proteína (Demain y Vaishnav, 2009).

1.7.3 *Nicotiana tabacum*

Durante los últimos 20 años las plantas han sido implementadas como alternativa en la producción de proteínas terapéuticas recombinantes de alto valor comercial como anticuerpos, vacunas y biofarmacéuticos (Colgan *et al*, 2010). Comparado con otros sistemas de expresión convencionales como células de mamífero, los sistemas de producción en plantas son menos costosos, de fácil escalamiento, están libres de patógenos humanos y las proteínas tienen el potencial de ser administrados directamente por vía oral. *Nicotiana tabacum* (tabaco), es uno de los sistemas vegetales más utilizados en la producción de proteínas recombinantes debido a su fácil manipulación mediante ingeniería genética y a los altos rendimientos de biomasa (Aproximadamente 100,000 kg/hectárea) (Conley *et al*, 2011). Sin embargo, algunas de las potenciales desventajas de su empleo son la contaminación con herbicidas y metabolitos tóxicos propios de la planta lo cual promueve una baja expresión y pobre calidad de la producción de la proteína (Demain y Vaishnav, 2009).

1.7.4 *Escherichia coli*

La producción de proteínas recombinantes en sistemas microbianos ha revolucionado la bioquímica. Los días donde se requerían kilogramos de tejido vegetal o animal para la purificación de pequeñas cantidades de proteínas de interés comercial han cambiado. La

capacidad de los microorganismos para producir y purificar proteínas recombinantes en grandes cantidades ha permitido no solo comercializarlas, también ha favorecido la caracterización de procesos bioquímicos y moleculares (Rosano y Ceccarelli, 2014). *E. coli* es el sistema de expresión microbiano más ampliamente usado debido a su fácil manipulación, crecimiento rápido y bajos costos de producción., aunado a lo anterior en años recientes se han implementado cepas, vectores y “tags” (etiquetas) para la purificación de proteínas de manera más eficiente y contender con las limitantes del sistema como lo son la formación de cuerpos de inclusión que a su vez requiere del uso de detergentes aniónicos para solubilizar la proteína generando costos extras y pasos de purificación adicionales, inestabilidad del mRNA y la falta de una maquinaria necesaria para realizar modificaciones postraduccionales en las proteínas que a diferencia de los modelos eucariotas que si son capaces de modificar a las proteínas (Jia y Jeon, 2016; (Demain y Vaishnav, 2009).

2. Antecedentes

2.1 Casos clínicos de mordeduras por *Micruroides euryxanthus*

A la fecha existen pocos reportes sobre mordeduras de serpientes del género *Micruroides*, son escasos los datos sobre la actividad del veneno y el cuadro clínico que causa su mordedura, sin embargo, entre los años 1955-1965 se documentaron cuatro casos de personas mordidas por *Micruroides euryxanthus*. En la descripción realizada por Findaly E. Russell, tres pacientes presentaron en su mayoría, debilidad, náusea, vómito, dolor en el sitio de la mordedura y dolor abdominal, síntomas muy parecidos a los que provoca la mordedura de *Micrurus fulvius* por lo que se les administró inmediatamente el suero anti elapídico contras las mordeduras de serpientes del género *Micrurus*, posterior a 4 horas de observación las personas fueron dadas de alta mientras que el paciente que no presentó síntomas solo presencié una mordedura seca, es decir, que la serpiente no le inoculó veneno (Russell, 1967).

2.2 Análisis preliminar del veneno de *Micruroides euryxanthus*

Las mordeduras de serpientes de coral se caracterizan por causar cuadros de envenenamiento muy severos, esto debido a que poseen venenos muy potentes que están enriquecidos con diversos grupos de toxinas como fosfolipasas o neurotoxinas que cuentan con una elevada toxicidad. En 2017 Yang y colaboradores realizaron ensayos de neurotoxicidad del veneno de *M. euryxanthus* junto con el de algunas especies del género *Micrurus* utilizando una preparación neuromuscular de pollo para determinar el valor de T₉₀ de cada veneno (tiempo en que una cantidad dada de veneno detiene la contracción muscular). El veneno de *M. euryxanthus* es menos neurotóxico que el de las especies *M. tener*, *M. spixii* y *M. pyrrhocryptus* mientras su valor de T₉₀ es mayor (más neurotóxico) que el de *M. fulvius* ya que el veneno de esta especie se sabe que está compuesto en su

mayoría por fosfolipasas, por su parte los ensayos de neutralización con el antiveneno Coralmy[®], solo el veneno de *M. fulvius* fue neutralizado mientras que la actividad en ratones del veneno del resto de las especies siguió latente ya que el antiveneno comercial carece de anticuerpos neutralizantes anti neurotoxinas las cuales son abundantes en los venenos de las coralillos incluyendo *M. euryxanthus* (Yang *et al*, 2017; Benard, 2011).

2.3 Expresión heteróloga de α -neurotoxinas de serpientes de coral mexicanas

2.3.1 MlatA1 de *Micrurus laticollaris*

En 2013, en el grupo del Dr. Alejandro Alagón Cano se aisló una α -neurotoxina de cadena corta a partir del veneno de *Micrurus laticollaris* denominada MlatA1, el gen de la toxina se clonó mediante el uso de un oligonucleótido específico del péptido señal de las toxinas de tres dedos y posteriormente se expresó en el vector de expresión pQE30 el cual añade un tag de 6 histidinas al grupo amino de la proteína para su purificación y expresión en bacterias. La MlatA1 recombinante (rMlatA1), se expresó de forma soluble y se purificó mediante cromatografía de afinidad a níquel, después se administró en ratones de la cepa CD1 vía intravenosa para probar su actividad, sin embargo, no fue tóxica por lo que algunas de las perspectivas actuales son probar distintas cepas de expresión, tiempo de inducción y temperatura para generar proteínas bien plegadas y activas (Carbajal, 2013).

2.3.2 *Micrurus diastema*

El antiveneno comercial Coralmy[®] de origen equino ha demostrado tener una parcial o baja potencia neutralizante contra el veneno de diversos coralillos mexicanos, esto debido a que los venenos son mezclas complejas de toxinas, algunas de tamaño grande o pequeño, muy abundantes o poco, con alta o poca inmunogenicidad, es decir, la capacidad para que el sistema inmune de caballos reconozca dichas toxinas y por ende generar anticuerpos neutralizantes (Calderón, 2011). Uno de los grupos inmunodominantes son fosfolipasas de tipo A₂, títulos de anticuerpos de caballo indican que se favorece más la respuesta inmune de este grupo de toxinas versus las α -neurotoxinas que dado su tamaño (aproximadamente 6-9 kDa) y bajo porcentaje en los venenos de coralillos son poco reconocidas por el sistema inmune repercutiendo en la baja cantidad de anticuerpos neutralizantes, de ahí la importancia de reforzar los esquemas de inmunización tradicionales con α -neurotoxinas purificadas y así mejorar la respuesta inmune contra éstas y obtener anticuerpos neutralizantes para mejorar la calidad de los futuros antivenenos contra las mordeduras de coralillos mexicanos. (Benard, 2011; Calderón, 2011). Sin embargo, algunas de las limitantes de la obtención de toxinas puras son la disponibilidad de veneno, bajos rendimientos y los procesos de purificación por lo que como alternativa se propuso expresar toxinas recombinantes usando diferentes sistemas heterólogos para producir toxinas en cantidades suficientes y activas. En 2014 se logró secuenciar algunas toxinas de

tres dedos (3FTXs) a partir del RNA de las glándulas de veneno de diferentes serpientes de coral mexicanas utilizando el oligonucleótido antxsPS dirigido contra el péptido señal de las 3FTXs previamente diseñado por Carbajal-Saucedo, una de las secuencias reportadas denominada D.H de la especie *Micrurus diastema* fue idéntica a una toxina presente en el veneno completo de esta especie por lo que fue la toxina idónea a expresar en *E. coli* utilizando el vector de expresión pQE30, la toxina recombinante (rD.H) se produjo de forma soluble (3.4 mg/l), se purificó mediante cromatografía de afinidad a níquel y tuvo actividad en ratones, posteriormente se inmunizaron conejos Nueva Zelanda blancos para producir sueros anti rD.H los que a su vez fueron capaces de neutralizar el efecto de la toxina en ratones (Guerrero-Garzón *et al*, 2018).

2.3.3 *Nicotiana tabacum* y su uso potencial en la expresión de toxinas de origen animal

Los componentes del veneno de arañas se caracterizan por tener actividades biológicas diversas, sin embargo, las propiedades más relevantes en dichas toxinas son antimicrobianos e insecticidas debido al potencial biotecnológico en agricultura y salud. Péptidos insecticidas se han empleado como control biológico en plantas puesto que el uso de pesticidas genera contaminación en suelos y favorece la multirresistencia, debido a ello distintos grupos de investigación han implementado el diseño de plantas transgénicas resistentes a insectos mediante la expresión heteróloga de toxinas insecticidas (Bates *et al*, 2005). A la fecha existen pocos reportes del uso de plantas en la expresión heteróloga de toxinas (Tabla 2).

Tabla 2. Ejemplos de toxinas animales expresadas en plantas

Proteína	Modelo	Proteína soluble (%)	µg/g de tejido
Inhibidor de proteinasa	Tomate	1	NR*
Ω-ACTX (araña)	Tabaco	0.1-0.25	NR*

NR: No reportado

En el Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas del CEIB, se utilizó el modelo de tabaco para la expresión heteróloga de un péptido insecticida de la araña *Macrothele gigas* con la finalidad de evaluar su capacidad contra insectos plaga. Se obtuvieron 3 líneas transgénicas mismas que se utilizaron para realizar ensayos de toxicidad en larvas de *Spodoptera frugiperda* mediante la ingesta de plantas. Las larvas de *S. frugierda* presentaron síntomas de intoxicación posterior a la alimentación con hojas de tabaco lo cual indicaba la posible actividad de la toxina comparado con los síntomas causados por la toxina nativa, este trabajo demostró la factibilidad de usar el modelo de tabaco para la expresión de toxinas ricas en puentes disulfuro de uso biotecnológico (Hernández-Campuzano, 2009).

3. Justificación

Actualmente se desconoce la actividad farmacológica del veneno de *Micruroides euryxanthus*, y los componentes tóxicos involucrados en el cuadro de envenenamiento causado por su mordedura. Sin embargo, dada la relación evolutiva de esta especie con las serpientes de coral se espera que el veneno de *M. euryxanthus* posiblemente esté enriquecido con neurotoxinas tal como se ha reportado en los venenos de serpientes del género *Micrurus*. Por ello mediante la búsqueda de transcritos tipo α -neurotoxinas a partir de las glándulas de veneno, así como la expresión de una toxina en el modelo de *E. coli* y la construcción de un vector para su expresión en plantas de tabaco se reportará por primera vez información acerca del veneno de una de las especies de coralillos nunca antes conocida.

4. Hipótesis

Las α -neurotoxinas recombinantes expresadas en *E. coli* se obtendrán en forma soluble y activa mientras que la construcción del vector para su expresión en plantas nos dirá si es el mejor modelo de expresión para α -neurotoxinas.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

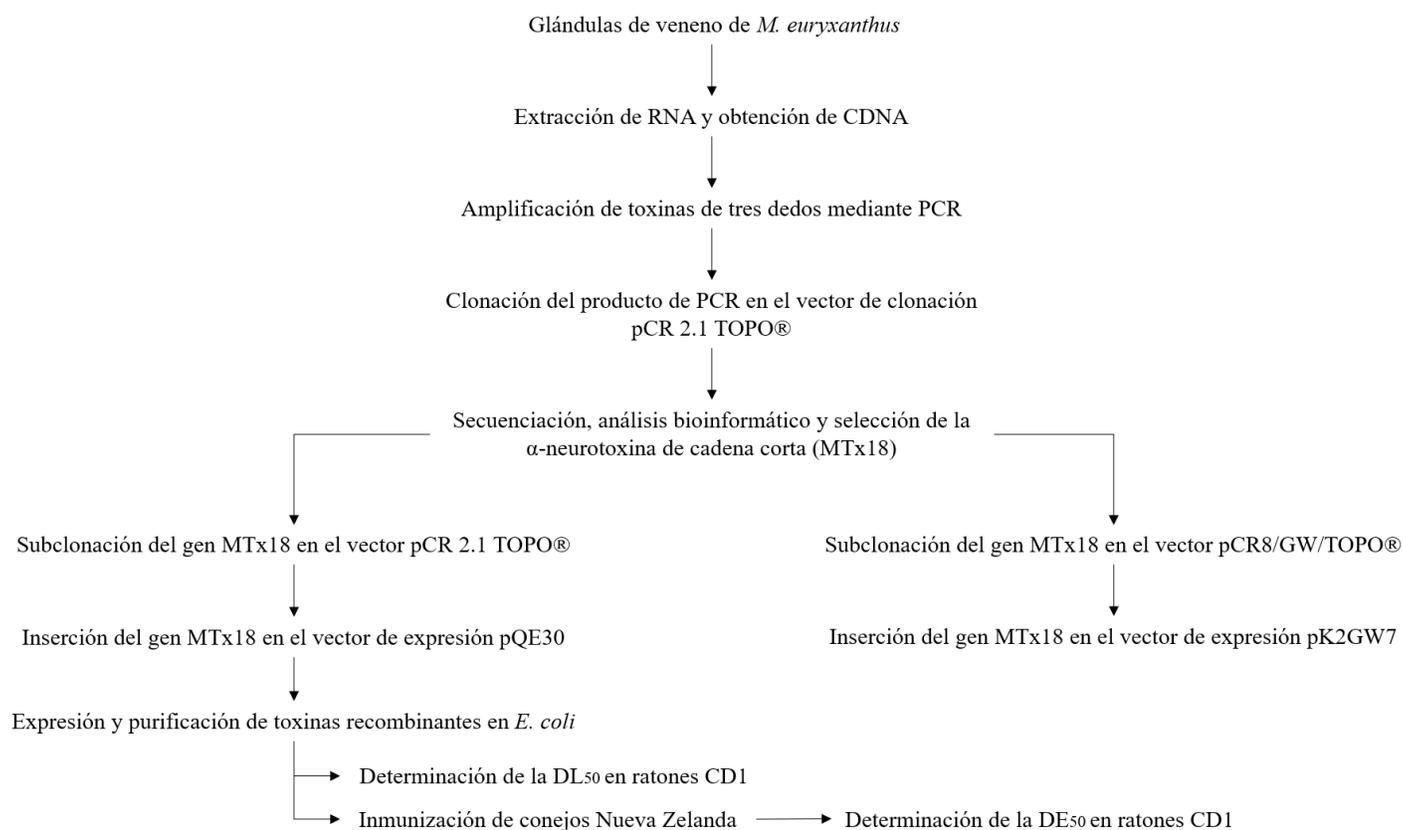
- Expresar α -neurotoxinas recombinantes de *M. euryxanthus* en *E. coli* y realizar la construcción del vector para su expresión en plantas de tabaco.

5.2 Objetivos particulares

- Obtener secuencias correspondientes a α -neurotoxinas de *M. euryxanthus*.
- Insertar el gen de la α -neurotoxina MTx18 en los vectores de expresión pQE30 y pK2GW7 para *E. coli* y *N. tabacum* respectivamente.
- Expresar y purificar las toxinas recombinantes producidas en *E. coli*.
- Evaluar la actividad de las toxinas recombinantes y determinar la dosis letal media (DL₅₀) en ratones CD1.
- Inmunizar conejos Nueva Zelanda con la toxina recombinante para la producción de sueros anti MTx18.
- Determinar la dosis efectiva media (DE₅₀) de los sueros de conejos hiperinmunizados con la toxina recombinante.

6. Metodología

6.1 Estrategia experimental



Estrategia experimental desarrollado en el presente trabajo.

6.2 Extracción de RNA de glándulas de veneno de *M. euryxanthus* mediante el reactivo Trizol®

Se extrajeron cuidadosamente las glándulas de veneno de *Micruroides euryxanthus* de un ejemplar colectado en Sonora, México. Posteriormente se colocó 100 mg de tejido en un tubo eppendorf de 2 ml más 1 ml del reactivo trizol, la muestra se mantuvo en hielo durante 10 minutos y después se centrifugó a 14,000 g durante 5 minutos a 4°C. Se añadió 200 μ l de cloroformo al tubo con muestra y se centrifugó a 14,000 g durante 5 minutos a 4°C, la fase orgánica se desechó y se añadió 200 μ l de isopropanol a la fase acuosa, la mezcla se incubó en hielo durante 10 minutos y se centrifugó como en el paso anterior.

La pastilla de RNA se lavó con 500 µl de etanol al 75% y después se incubó a 37°C para eliminar restos de solvente. Finalmente el RNA se recuperó en 100 µl de agua DEPC (Dietilpirocarbonato), se analizó en gel de agarosa para verificar su integridad y se almacenó a -70°C.

6.3 Obtención del cDNA mediante transcripción reversa

El cDNA se obtuvo mediante transcripción reversa utilizando como templado el RNA extraído de las glándulas de veneno de *M. euryxanthus*, la reacción se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor del kit 1st strand cDNA synthesis for RT-PCR de la casa comercial Roche®. La transcripción reversa se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp® PCR System 9700, a continuación se describen los reactivos usados y las condiciones de amplificación.

Reactivos

10X Buffer de reacción	2 µl
Buffer MgCl 25 mM.....	4 µl
Desoxinucleótidos 2.5 mM.....	2 µl
Oligonucleótido AP (20 picomolas)...	2 µl
Inhibidor de RNAsa.....	1 µl
Reversa transcriptasa.....	0.8 µl
RNA <i>Micruroides</i> (300 ng).....	8.2 µl

Tabla 3. Condiciones de obtención de cDNA

Temperatura	Tiempo	Ciclos
25°C	10 minutos	1
42°C	60 minutos	
99°C	5 minutos	
4°C	5 minutos	

Nota: El volumen de reacción de la obtención de cDNA mediante transcripción reversa fue de 50 µl totales.

6.4 Amplificación de toxinas de tres dedos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realizó una PCR para amplificar toxinas de tres dedos (3FTxs) mediante el oligonucleótido que flanquea el péptido señal conservado de las 3FTxs denominado “antxsPS” 5'-ATG-AAA-ACT-CTG-CTG-CTG-AC-3' diseñado por Carbajal-Saucedo y un oligonucleótido de timinas con una secuencia adaptadora (AUAP) 5'-GAC-TCG-AGT-CGA-CAT-CGA-TT-3' para poder capturar los transcritos a partir del cDNA de *M. euryxanthus*. En un tubo de PCR de 0.2 ml se mezclaron los componentes que se enlistan a continuación y la reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp® PCR System 9700 bajo las condiciones que se muestran en la tabla 4.

Reactivos

10X Buffer PCR + Mg ⁺²	5 µl
Desoxinucleótidos 2.5 mM.....	4 µl
Oligonucleótido forward: antxPS (20 picomolas).....	1 µl
Oligonucleótido reverse: AUAP (20 picomolas).....	1 µl
Agua desionizada.....	37.5 µl
cDNA de <i>Micruroides</i>	1 µl
Taq polimerasa.....	0.5 µl

Tabla 4. Condiciones de PCR para amplificar transcritos de toxinas de tres dedos

Pasos	Temperatura	Tiempo	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	3 minutos	1
Desnaturalización	94°C	1 minuto	
Hibridación	62°C	1 minuto	30
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	10 minutos	1

6.5 Electroforesis de DNA en agarosa

En un tubo eppendorf de 0.5 ml se mezcló 180 µl de producto de PCR + 20 µl de loading buffer 10X y se cargó en un gel preparativo de agarosa al 1% para separar los ácidos nucleicos. La corrida se realizó en una cámara de electroforesis horizontal para DNA de la marca BioRad en buffer de corrida TAE IX + Bromuro de etidio a 100 V, la visualización de los ácidos nucleicos se realizó mediante un transiluminador de luz UV.

6.6 Purificación de productos de PCR

El producto de PCR se purificó mediante el kit High pure PCR products de la casa comercial Roche®, en un tubo eppendorf de 2 ml previamente pesado, se colocó la banda de DNA extraída del gel de agarosa y se pesó nuevamente. Al tubo con agarosa se añadió 300 µl de binding buffer/100 mg de agarosa y se colocó en baño María a 65°C para disolver el DNA, después se agregó 150 µl de isopropanol/100 mg de agarosa al tubo y se mezcló levemente. Se tomó 700 µl de la mezcla y se transfirió a un tubo colector con filtro para concentrar el DNA centrifugando 1 minuto a 12,000 rpm hasta terminar con todo el volumen de la mezcla. La columna se lavó dos veces con 500 µl de wash buffer centrifugando el tubo 1 minuto a 12,000 rpm, como paso extra el tubo se centrifugó nuevamente durante 2 minutos a velocidad máxima para eliminar restos de solvente. Por último, se añadió 50 µl de agua tetradestilada al filtro y se centrifugó 1 minuto a 12,000 rpm para eluir el DNA, se verificó en un gel de agarosa y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.7 Clonación de productos de PCR en el vector comercial pCR 2.1 TOPO

De acuerdo al manual del fabricante del vector, la clonación de productos PCR se realizó mezclando en un tubo eppendorf de 1.5 ml 2 µl de producto de PCR (50 ng/µl de DNA), 1 µl de solución salina, 1 µl de vector y 1 µl de agua desionizada. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 30-60 minutos y se almacenó a 4°C hasta su uso.

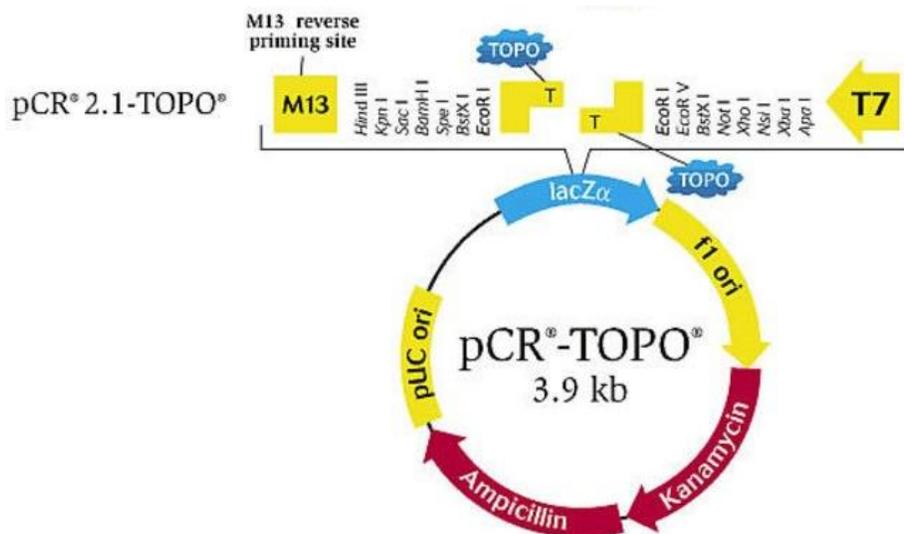


Figura 6. Mapa del vector de clonación pCR TOPO 2.1®. En la figura se muestra a detalle las características del sitio múltiple de clonación con sus respectivas timinas sobresalientes para lograr la inserción de producto de clonación, secuencias de los oligonucleótidos M13 y los genes de resistencia a antibióticos.

6.7.1 Transformación del producto de clonación en células quimiocompetentes de *E. coli* XL1Blue

Previamente se prepararon células quimiocompetentes de *E. coli* XL1Blue, se tomó una alícuota y se colocó en hielo, después se añadió 100 µl de células al tubo con el producto de clonación y se incubó en hielo durante 1 hora. Posteriormente se dio un choque térmico en baño María a las células a 42°C durante 30 segundos y se incubó nuevamente en hielo durante 3 minutos. Al tubo con células se añadió 250 µl de medio rico SOC y se incubó a 37°C durante 1 hora. La suspensión celular se plateó en cajas de petri con medio LB sólido + ampicilina 80 µg/ml + X-Gal (50 µg/ml) + IPTG 0.1 mM y se incubaron durante toda la noche a 37°C.

6.8 Selección de transformantes con la construcción del vector pCR TOPO 2.1-MTx18

El sistema de selección de plásmidos que describe el proveedor del vector está basado en que aquellas colonias con apariencia blanca contienen el plásmido TOPO con el inserto clonado correctamente, mientras que las colonias azules corresponden a bacterias cuyo plásmido está vacío. A partir de ello se seleccionaron distintas clonas positivas y se crecieron en tubos con 3 ml de medio LB líquido más ampicilina como marcador de selección a 37°C en una incubadora con agitación durante toda la noche.

6.8.1 Purificación de plásmidos

Los plásmidos se purificaron mediante miniprep comercial utilizando el kit High pure plasmid isolation de Roche®. Se tomó 2 ml de los caldos bacterianos y se centrifugaron en tubos eppendorf de 2 ml a 12,000 rpm durante 1 minuto. El sobrenadante se eliminó y la pastilla celular se resuspendió en 250 µl de solución de resuspensión, después se añadió 250 µl de solución de lisis a cada tubo y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. La suspensión celular se trató con 350 µl de solución amortiguadora, se mezcló levemente y se incubó en hielo durante 5 minutos, los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo colector con filtro para concentrar el DNA y se centrifugó nuevamente 1 minuto a 12,000 rpm. El filtro se lavó dos veces con 500 µl de solución de lavado centrifugando 1 minuto a 12,000 rpm. Por último, se añadió 50 µl de agua desionizada al filtro y se centrifugó como en el paso anterior para eluir el DNA, los plásmidos se analizaron en un gel de DNA y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

6.8.2 Digestión de plásmidos con enzimas de restricción

Debido a que el sitio múltiple de clonación del vector está delimitado por las enzimas de restricción *EcoRI* se empleó este método de selección ya que al cortar el vector se generaría un producto esperado de acuerdo al tamaño inserto clonado. Para ello, en tubos eppendorf de 0.5 ml se añadió 7 μ l de DNA (300-500 ng de plásmido), 1 μ l de buffer *EcoRI* 10X, 0.5 μ l de enzima *EcoRI* (10 U/ μ l) y se llevó a 10 μ l totales con agua desionizada para cada una de las muestras, la reacción se incubó a 37°C durante 1 hora en una incubadora clínica. Los productos de digestión se analizaron en un gel de DNA de agarosa al 1% y el patrón de corte se verificó mediante un transiluminador de luz UV.

6.8.3 Secuenciación de plásmidos

Los plásmidos con el patrón correcto de restricción se enviaron a secuenciar a la unidad de síntesis y secuenciación de DNA del IBT-UNAM. Las muestras se prepararon en tubos para PCR de 0.2 ml y se añadió 10 μ l de plásmido (500-600 ng de DNA), 5 μ l de agua desionizada más 1 μ l del oligonucleótido M13 Forward o Reverse según convenga que flanquea el sitio múltiple de clonación del vector pCR 2.1 TOPO, de ahí la importancia para la obtención de las secuencias de los insertos clonados en el vector.

6.8.4 Análisis de secuencias y alineamientos

Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante los programas 4peaks®, Gene Construction Kit® así como Clustal JalView para el alineamiento de secuencias, de igual manera se empleó la herramienta Blast de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para obtener datos y secuencias de toxinas de tres dedos.

6.9 Expresión de α -neurotoxinas en *Escherichia coli*

6.9.1 Diseño de oligonucleótidos

Partiendo de la secuencia de la α -neurotoxina MTx18 de *M. euryxanthus* se diseñaron los oligonucleótidos específicos MTx18FW 5'-GGA-TCC-ATG-ATA-TGT-TAC-AAC-CAA-CAG-3' y MTx18RV 5'-AAG-CTT-TCA-AGC-GTT-GCA-TTT-GCC-TGT-TG-3' para amplificar la toxina mediante PCR y añadir los sitios de corte de las enzimas de restricción necesarios para ligar el gen en el vector de expresión.

6.9.2 Amplificación del inserto MTx18 de la α -neurotoxina de *M. euryxanthus* mediante reacción en cadena de la polimerasa

La mezcla para amplificar el gen mTx18 se realizó en tubos para PCR de 0.2 ml, se añadió 5 μ l de buffer PCR 10X + Mg²⁺, 4 μ l de dNTPs (2.5 mM), 1 μ l de oligonucleótido forward (20 picomolas/ μ l), 1 μ l de oligonucleótido reverso (20 picomolas/ μ l), 37.5 μ l de agua desionizada, 0.5 μ l de *Taq* DNA polimerasa en un volumen final de 50 μ l. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp® PCR System 9700 bajo las siguientes condiciones que se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de amplificación del inserto MTx18 mediante PCR

Pasos	Temperatura	Tiempo	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	3 minutos	1
Desnaturalización	94°C	1 minuto	
Hibridación	62°C	1 minuto	30
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	10 minutos	1

El inserto se amplificó mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos por los cuales se añadieron los sitios de restricción *Bam*HI y *Hind*III.

6.9.3 Electroforesis de DNA en agarosa y purificación de productos de PCR

Se mezcló 180 μ l de producto de PCR + 20 μ l de loading buffer 10X y se cargó en un gel preparativo de agarosa al 1% para separar los ácidos nucleicos. La corrida se realizó en una cámara de electroforesis horizontal en buffer de corrida TAE IX + Bromuro de etidio a 100 V. La visualización de la banda de interés correspondiente a 191 pares de bases (pb) se verificó mediante un transiluminador de luz UV. El producto de PCR correspondiente al gen de la toxina MTx18 se extrajo del gel de DNA y se purificó siguiendo las especificaciones y el proceso previamente descrito. Al final de la purificación se analizó una muestra de DNA para corroborar la pureza del inserto.

6.9.4 Subclonación del inserto MTx18 en el vector pCR 2.1 TOPO

En un tubo eppendorf de 1.5 ml se mezcló 2 μ l de inserto (50 ng de DNA/ μ l), 1 μ l de solución salina, 1 μ l de vector y 1 μ l de agua desionizada. La reacción de clonación se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y al finalizar se almacenó en hielo hasta su uso.

6.9.5 Transformación del producto de subclonación en células quimiocompetentes de *E. coli* XL1Blue

Se añadió 100 µl de células quimiocompetentes de XL1Blue al tubo con el producto de clonación y se incubó en hielo durante 1 hora, posteriormente se dio un choque térmico a las células en baño María a 42°C durante 30 segundos y se incubó nuevamente en hielo 3 minutos. Después se agregó 250 µl de medio rico SOC al tubo con células y se incubó a 37°C durante 1 hora. Las células se platearon en cajas de petri con medio sólido LB + ampicilina (80 µg/ml) + X-Gal (50 µg/ml) + IPTG 0.1 mM, y se incubó a 37°C durante toda la noche.

6.9.5.1 Selección de transformantes

La selección de transformantes se realizó mediante el sistema de blancas y azules del vector de clonación TOPO, se crecieron en 3 ml de medio líquido LB + ampicilina (80 µg/ml) distintas clonas blancas a 37°C en el supuesto que contengan el vector con el inserto MTx18 correctamente clonado.

6.9.5.2 Purificación, análisis de restricción y secuenciación de plásmidos

Los plásmidos se purificaron utilizando el protocolo previamente descrito según las instrucciones del proveedor. Al finalizar, se analizó una muestra en gel de DNA de agarosa al 1% para verificar la integridad de los plásmidos, posteriormente se almacenaron a -20°C hasta su uso. Los plásmidos se digirieron con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III que flanquean el gen de la toxina MTx18 para verificar su correcta inserción en el vector. En tubos eppendorf de 0.5 ml se mezcló 6 µl de plásmido (100 ng de DNA), 1 µl buffer B 10X, 1 µl de enzima, 1 µl de enzima *Bam*HI, 1 µl de enzima *Hind*III y 1 µl de agua desionizada. La reacción se incubó a 37°C durante 1 hora y los productos de digestión se analizaron en un gel de agarosa al 1% para separar ácidos nucleicos y corroborar la liberación del inserto mTx18 de la neurotoxina de *M. euryxanthus*. Los plásmidos con el patrón correcto de restricción se enviaron a secuenciar a la unidad de síntesis y secuenciación de DNA del IBT-UNAM usando los oligonucleótidos M13 forward y reverso específicos del vector PCR 2.1 TOPO.

6.9.6 Purificación tipo Miniprep del plásmido pCR 2.1 TOPO-MTx18

La purificación de plásmido se realizó mediante Midiprep comercial utilizando el kit High pure Midiprep plasmid de Biorad®. Se creció la clona del plásmido con el inserto mTx18 en un matríz con 50 ml de medio LB líquido y ampicilina (80 µg/ml) a 37°C durante toda la noche. El caldo bacteriano se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 5 ml de solución amortiguadora. La suspensión bacteriana se trató con 5 ml de solución de lisis y se mezcló levemente, después

se agregó 5 ml de solución de neutralización y la suspensión se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se transfirió a un tubo corex de 50 ml, se añadió 1 ml de resina a la suspensión y se mezcló vigorosamente con una pipeta. El tubo con muestra se centrifugó a 8000 rpm durante 2 minutos a 4°C, el sobrenadante se eliminó y la pastilla (resina) se resuspendió en 10 ml de solución de lavado, posteriormente se centrifugó como en el paso anterior y la pastilla se resuspendió en 500 µl de solución de lavado. El sobrenadante se transfirió a un tubo con filtro para concentrar el DNA y se centrifugó en una mini centrífuga Eppendorf® a temperatura ambiente durante 1 minuto a 12000 rpm, el filtro se lavó con 500 µl de solución de lavado, se centrifugó como en el paso anterior y al finalizar se centrifugó nuevamente para eliminar restos de solventes. El DNA se eluyó añadiendo 500 µl de agua desionizada al filtro y se centrifugó 1 minuto a 12000 rpm, se analizó una muestra de DNA plasmídico en gel de DNA de agarosa al 1% y la muestra se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.9.6.1 Digestión del plásmido pCR 2.1 TOPO-MTx18 con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII*

La extracción del inserto MTx18 del plásmido de clonación para su posterior ligación en el vector de expresión se realizó mediante el corte con enzimas de restricción, en un tubo eppendorf de 1.5 ml se mezcló 70 µl de plásmido (500-700 ng de DNA), 10 µl de buffer B 10X, 3 µl de enzima *BamHI*, 3 µl de enzima *HindIII* y se llevó a 100 µl con agua desionizada. La reacción se incubó 1 hora a 37°C y los productos de digestión se analizaron en un gel de DNA de agarosa al 1%.

6.9.6.2 Purificación del producto de digestión (inserto MTx18)

El producto de digestión se purificó conforme a la metodología descrita en apartados pasados, al final del proceso se analizó una muestra en gel de DNA de agarosa al 1% para verificar la integridad y pureza del DNA, posteriormente se almacenó a 4°C hasta su uso.

6.9.7 Ligación del inserto MTx18 en el vector de expresión pQE30

La ligación se realizó utilizando una relación molar 1:8 (inserto:vector), en un tubo eppendorf de 1.5 ml se mezcló 3 µl de inserto (60 ng), 6 µl de plásmido linearizado (90 ng) con las enzimas *BamHI* y *HindIII*, 1 µl de enzima ligasa (40 U/µl), 2 µl de buffer ligasa 10X y 8 µl de agua desionizada. La reacción se incubó a 16°C durante 16 horas y al finalizar la muestra se almacenó en hielo hasta su uso.

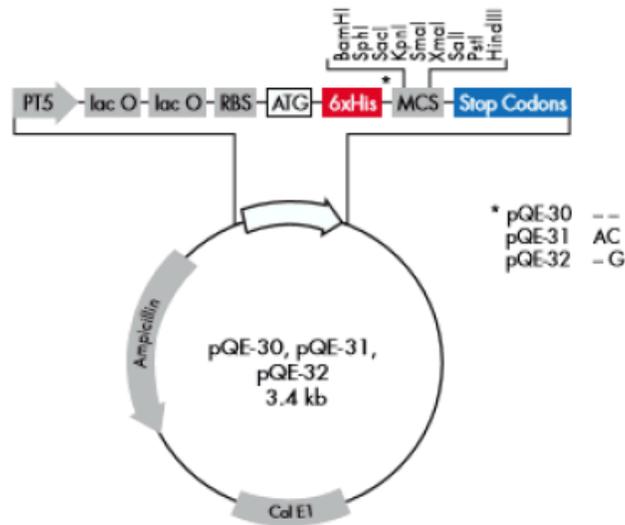


Figura 7. Mapa del vector de expresión pQE30. Se muestra en la imagen la etiqueta de histidinas, sitio múltiple de clonación con sus respectivos sitios de corte de enzimas de restricción disponibles y el gen de resistencia a ampicilina del plásmido para su selección.

6.9.7.1 Transformación del producto de ligación en células quimiocompetentes de *E. coli* XL1Blue

Al tubo con producto de ligación se añadió 100 µl de células quimiocompetentes de XL1Blue y se mantuvo en hielo durante 1 hora, posteriormente se dio un choque térmico a las células en baño María a 42°C durante 30 segundos y se colocó nuevamente en hielo durante 3 minutos. Después se añadió 250 µl de medio rico SOC a las células y se incubó a 37°C durante 1 hora, al finalizar la recuperación se platearon las células en cajas con medio sólido LB con ampicilina (80 µg/ml) y se incubó a 37°C durante toda la noche.

6.9.8 Análisis de expresión total de la proteína recombinante en la cepa de *E. coli* XL1BLUE

6.9.8.1 Extracción de proteína total

A partir de las bacterias transformadas con la construcción del vector de expresión, se crecieron diferentes clonas en tubos con 3 ml de medio LB líquido más ampicilina (80 µg/ml) e IPTG para inducir la expresión de la proteína a 37°C durante toda la noche. Los caldos bacterianos se centrifugaron en tubos eppendorf de 2 ml a 12000 rpm durante 1 minuto, el sobrenadante se eliminó y la pastilla celular se resuspendió en 100 µl de buffer de fosfatos (PBS IX), las muestras se almacenaron a 4°C hasta su uso.

6.9.8.2 Electroforesis de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) para el análisis de proteínas

Las muestras de proteína total extraídas de bacterias se prepararon individualmente en tubos eppendorf de 0.5 ml, se mezcló 40 µl de extracto de bacterias más 10 µl de buffer de carga desnaturizante y se colocó en baño María durante 5 minutos, posteriormente las muestras se cargaron 10 µl de muestra en un gel de SDS-PAGE al 15% utilizando una pipeta Gilson y utilizando como referencia un marcador de peso molecular Proteína Stain de la marca BioRad® (Ver anexos. Soluciones de electroforesis). La corrida se realizó en buffer TANK 1X a 80V para el gel concentrador y 120V para el gel separador, al finalizar la corrida el gel se tiñó con azul de coomasie G-250 y se destiñó con solución desteñidora (50% ácido acético + 50% isopropanol) realizando breves cambios de solución hasta obtener una resolución óptima.

6.9.8.3 Detección de la α -neurotoxina MTx18 mediante ensayo de Western Blot

A partir de un gel de SDS-PAGE con muestras de proteínas totales analizadas mediante electroforesis se realizó un western blot para detectar la expresión de la proteína recombinante. El gel (sin teñir) se colocó en un sándwich de papel filtro tipo Watman, esponjas y membrana de nitrocelulosa humedecidos en buffer de transferencia (fórmula), la transferencia se realizó en una cámara para western blot a 400 mAmp durante 1 hora. Posteriormente la membrana se bloqueó en buffer TBST 1X + 0.05 de leche en polvo comercial durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación, después la membrana se lavó 3 veces con buffer TBST 1X y se incubó con el anticuerpo de detección anti-Histidinas acoplado a fosfatasa alcalina en buffer TBST 1X durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. La membrana se reveló con una solución de BCIP/NBT de la casa comercial Invitrogen y el revelado se detuvo al momento de visualizar una señal adecuada con agua destilada.

6.9.9 Expresión de la α -neurotoxina MTx18 en la cepa de *E. coli* SHuffle

6.9.9.1 Transformación de la construcción pQE30-MTx18 en células quimiocompetentes de *E. coli* SHuffle

En un tubo eppendorf de 1.5 ml se mezcló 2 µl de plásmido purificado + 100 µl de células quimiocompetentes de *E. coli* SHuffle y se incubó 1 hora en hielo, después se dio un choque térmico en baño María a 42°C durante 30 segundos y se incubó en hielo durante 3 minutos. Al tubo con células se agregó 250 µl de medio rico SOC y se incubó 1 hora a 37°C, después se plateó 50 µl de células transformadas en una caja petri con medio LB sólido con ampicilina (80 µg/ml) y se incubó a 37°C durante toda la noche.

6.9.9.2 Análisis de expresión de la α -neurotoxina MTx18 en la cepa de *E. coli* SHuffle mediante gel de SDS-PAGE

Del producto de la transformación se tomaron diferentes clonas y se crecieron en medio LB líquido + ampicilina (80 $\mu\text{g/ml}$) y con y sin IPTG a 37°C, los caldos bacterianos se procesaron como se describió anteriormente para la extracción de la proteína total, en tubos eppendorf de 1.5 ml se mezcló 40 μl de proteína total + 10 μl de buffer desnaturante (SDS + azul de bromofenol) y se cargó en un gel de SDS-PAGE al 15%, la corrida se realizó en una cámara de electroforesis BioRad® con buffer de corrida TANK 1X a 80V para el gel concentrador y 120V para el gel separador. Al finalizar el gel se tiñó con el colorante azul de coomasie G-250 y se destiñó con solución desteñidora (50% ácido acético + 50% isopropanol).

6.9.9.3 Expresión de la α -neurotoxina MTx18 en la cepa SHuffle

Se seleccionó una de las clonas sobreproductoras analizadas mediante SDS-PAGE y se creció el pre-inóculo en medio LB líquido con ampicilina (80 $\mu\text{g/ml}$) a 37°C durante toda la noche. Posteriormente se inocularon matraces con medio LB líquido con ampicilina (80 $\mu\text{g/ml}$) con 10 ml del cultivo bacteriano y se incubó a 37°C con agitación hasta que los cultivos alcanzaron una densidad óptica (OD_{600}) de 0.6, después los matraces se indujeron con 1 mM IPTG y se incubaron a 20°C durante 24 horas. Los cultivos bacterianos se centrifugaron a 8000 rpm durante 20 minutos a 4°C, el sobrenadante se desechó y las pastillas celulares se resuspendieron en 4 ml de solución de extracción (BugBuster + 4 μl de benzonasa Novagen + 10 μl de lisozima Roche) por cada 500 ml de medio de cultivo, la suspensión celular se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos y se centrifugó a 12000 rpm a 4°C durante 20 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se almacenó a 4°C hasta su uso.

6.9.9.4 Purificación de la α -neurotoxina recombinante MTx18 a partir de la fracción soluble mediante cromatografía de afinidad a níquel

Se recirculó a flujo lento el sobrenadante extraído de bacterias en una columna con una resina de agarosa acoplada a níquel previamente empacada y equilibrada con PBS 1X, posteriormente la columna se lavó con PBS 1X hasta eliminar restos celulares y proteínas inespecíficas. Se realizó un segundo lavado con una solución de PBS 1X + 25 mM de imidazol colectando 1 ml de la elución en tubos eppendorf de 1.5 ml, se tomaron las lecturas en un espectrofotómetro y el lavado de la columna se detuvo hasta obtener lecturas de los lavados menor a 0.1 UA a 280 nm. La elución de la proteína se realizó agregando lentamente (goteo), una solución de PBS 1X + 250 mM de imidazol colectando la proteína en tubos eppendorf de 1.5 ml, al finalizar la proteína se colectó realizando un pool de los eluatos y se analizó en un gel de SDS-PAGE al 15% siguiendo las instrucciones

previamente descritas. La proteína se dializó utilizando una membrana de diálisis de tamaño de corte de 3.5 kDa SpectraPour frente a PBS como solución de intercambio a 4°C realizando de 4 a 5 cambios de solución, la proteína se cuantificó y se almacenó en alícuotas a -20°C hasta su uso.

6.9.10 Determinación de la letalidad de la α -neurotoxina recombinante en ratones de la cepa CD1

Utilizando la proteína pura MTx18, se administraron diferentes dosis de toxina recombinante tomando como intervalo entre 2 a 10 μ g en grupos de 3 ratones de la cepa CD1 de 18 a 20 gramos, la mortalidad de los individuos se determinó hasta las 24 horas. Posteriormente los datos obtenidos se analizaron con el paquete estadístico PrismaGraph y se graficaron los resultados.

6.9.11 Producción de anticuerpos policlonales anti MTx18 en conejos

6.9.11.1 Inmunización de conejos Nueva Zelanda blancos

Se dispuso de 2 conejos de la cepa Nueva Zelanda blancos de un peso de alrededor de 4 kg los cuales se inmunizaron con dosis crecientes de toxina recombinante pura en combinación con los adyuvantes completo de Freud, incompleto de Freud e hidróxido de aluminio de manera alternada, previamente se tomó una muestra de sangre como control basal o pre inmune para la medición de títulos de anticuerpos así como muestras de sangre posterior a la inmunizaciones para la determinación de la evolución de los títulos de anticuerpos frente a la toxina MTx18 mediante ELISA.

Tabla 6. Esquema de inmunización de conejos

Número	Fecha	Dosis (μ g/conejo)	Tipo de adyuvante
1	6-Septiembre-18	50	CF
2	14-Septiembre-18	100	IF
3	21-Septiembre-18	150	Alum
4	28-Septiembre-18	200	IF
5	5-October-18	250	Alum
6	11-October-18	250	IF
7	19-October-18	250	Alum
8	26-October-18	300	IF
9	1-Noviembre-18	400	Alum
10	9-Noviembre-18	500	IF
11	16-Noviembre-18	600	Alum
12	23-Noviembre-18	700	IF
13	30-Noviembre-18	800	Alum
14	6-Diciembre-18	800	IF

Nota: Abreviaturas en la tabla, CF: Adyuvante completo de Freud, IF: Adyuvante incompleto de Freud, Alum: Hidróxido de aluminio.

6.9.11.2 Determinación de títulos anti MTx18 mediante ELISA

Se sensibilizó una placa de 96 pozos con 100 μ l de la toxina recombinante mTx18 en solución de sensibilizado a una concentración de 5 μ g/ml y se incubó a 37°C durante una hora, después la placa se lavó manualmente 3 veces con solución de lavado. Posteriormente se incubaron los anticuerpos policlonales de conejo anti MTx18 en solución vehículo, se colocó 200 μ l de suero en el pozo 1 y 50 μ l de solución vehículo en los pozos 2 a 12 y se realizaron diluciones seriadas 1:3 tomando 50 μ l del pozo inicial hacia el pozo número 12 realizando pipeteos de 3 a 4 veces para mezclar correctamente (descartar 50 μ l en el último pozo) y se incubó 1 hora a 37°C, la placa se lavó como en el paso anterior. Después se agregó el segundo anticuerpo anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) a una dilución de 1:6000, se cubrió toda la placa con 200 μ l/pozo de la solución de trabajo y se incubó a 37°C durante 1 hora, la placa se lavó nuevamente como en los pasos previos y se reveló con una solución de revelado (ABTS 50 mg/ml + buffer ABTS) en 10 ml y se agregó 100 μ l a todos los pozos de la placa, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se leyó en un lector de placas de ELISA Tecan a 405 nm. Los resultados se graficaron mediante el programa estadístico PrismaGraph para determinar los valores de los títulos de anticuerpos (Soluciones de ELISA, ver anexos).

6.9.11.3 Reconocimiento de los sueros de conejo hiperinmunizados contra la toxina recombinante MTx18 mediante Western Blot

Se corrió en un gel de SDS-PAGE al 15% muestras de toxina recombinante en condiciones reductoras siguiendo la estrategia metodológica de este apartado, posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a manera de sándwich complementado con esponjas y papel filtro Watman en una cámara para Western Blot a 400 mA durante 1 hora. Al finalizar la transferencia, la membrana se bloqueó con una solución de TBST 1X + 0.05% de leche en polvo comercial a temperatura ambiente y con agitación durante 1 hora, al terminar la membrana se lavó 3 veces con TBST 1X y después la membrana se incubó con el primer anticuerpo (anticuerpos policlonales de conejo anti mTx18) a una dilución de 1:5000 en TBST 1X a temperatura ambiente con agitación por 1 hora. La membrana se lavó nuevamente con TBST 1X y se incubó con el segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina) en TBST 1X durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación y se reveló con una solución de trabajo de BCIP/NBT de Invitrogen, por último, la reacción se detuvo con agua hasta obtener una señal adecuada de detección de la proteína.

6.10 Construcción del vector para la expresión en plantas de tabaco

6.10.1 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñó el oligonucleótido específico NTMTx18FW 5'-ATG-AGA-GGA-TCG-CAT-CAC-CAT-CAC-CAT-CAC-GGA-TCC-ATG-ATA-TG-3' para amplificar la α -neurotoxina de *M. euryxanthus* y añadir la etiqueta de histidinas útil en la purificación de la proteína en conjunto con el oligonucleótido MTx18RV 5'-AAG-CTT-TCA-AGC-GTT-GCA-TTT-GCC-TGT-TG-3' previamente utilizado en la expresión en *E. coli*.

6.10.2 Amplificación del inserto MTx18 de la α -neurotoxina de *M. euryxanthus* mediante reacción en cadena de la polimerasa

El inserto de la α -neurotoxina MTx18 se amplificó mediante PCR, en un tubo de 0.2 ml para PCR se mezcló 5 μ l de buffer PCR 10X Mg⁺, 4 μ l de dNTPs (2.5 Mm), 1 μ l de oligonucleótido forward (20 picomolas/ μ l), 1 μ l de oligonucleótido reverse (20 picomolas/ μ l), 37.5 μ l de agua desionizada, 1 μ l de templado (50-100 ng de DNA) y 0.5 μ l de Taq DNA polimerasa (1 U/ μ l). La reacción de PCR se realizó con base a las condiciones de temperatura y ciclos que se muestran en la siguiente tabla 7.

Tabla 7. Condiciones de amplificación del inserto MTx18 mediante PCR

Pasos	Temperatura	Tiempo	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	3 minutos	1
Desnaturalización	94°C	1 minuto	
Hibridación	62°C	1 minuto	30
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	10 minutos	1

6.10.3 Electroforesis de DNA en agarosa

Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa preparativo al 1.5%, en un tubo eppendorf de 1.5 ml se mezcló 180 μ l de producto de PCR (correspondiente a 4 reacciones de PCR) + 20 μ l de buffer de carga 10X, la corrida se realizó en una cámara de electroforesis horizontal BioRad a 100V. Los ácidos nucleicos se visualizaron mediante un transiluminador de luz UV y la banda con el peso esperado se colocó en un tubo estéril, el DNA se almacenó a 4°C hasta su uso.

6.10.4 Purificación de productos de PCR

El producto de PCR se purificó mediante el kit High pure PCR products de la casa comercial Roche®, al tubo con agarosa se añadió 300 µl de binding buffer/100 mg de agarosa y se colocó en baño María a 65°C para disolver el DNA, después se agregó 150 µl de isopropanol/100 mg de agarosa al tubo y se mezcló levemente. Se tomó 700 µl de la mezcla y se transfirió a un tubo colector con filtro para concentrar el DNA centrifugando 1 minuto a 12,000 rpm hasta terminar con todo el volumen de la mezcla. La columna se lavó dos veces con 500 µl de wash buffer centrifugando el tubo 1 minuto a 12,000 rpm, como paso extra el tubo se centrifugó nuevamente durante 2 minutos a velocidad máxima para eliminar restos de solvente. Por último, se añadió 50 µl de agua tetradestilada al filtro y se centrifugó 1 minuto a 12,000 rpm para eluir el DNA, se verificó en un gel de agarosa y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.10.5 Clonación de productos de PCR en el vector comercial pCR 8 TOPO GW

En un tubo eppendorf de 1.5 ml se mezcló 4 µl de producto de PCR (50-100 ng de DNA), 1 µl de solución salina, 1 µl de vector (50 ng de DNA) y se incubó a 22°C durante toda la noche. Al finalizar el producto de clonación se almacenó a 4°C hasta su uso.

6.10.5.1 Transformación del producto de clonación en células quimiocompetentes de *E. coli* Top 10

Se añadió en frío 100 µl de células quimiocompetentes al tubo con el producto de clonación y se incubó en hielo durante 1 hora, después se dio un choque térmico a las células en baño María a 42°C durante 30 segundos y se incubó nuevamente en hielo por 3 minutos. Posteriormente se añadió 250 µl de medio rico SOC a las células y se incubó 1 hora a 37°C durante 1 hora, al finalizar las células se platearon en cajas petri con medio sólido LB + Espectinomicina (100 µg/ml) + X-Gal (50 mg/ml) + IPTG 0.1 mM y se incubó a 37°C durante toda la noche.

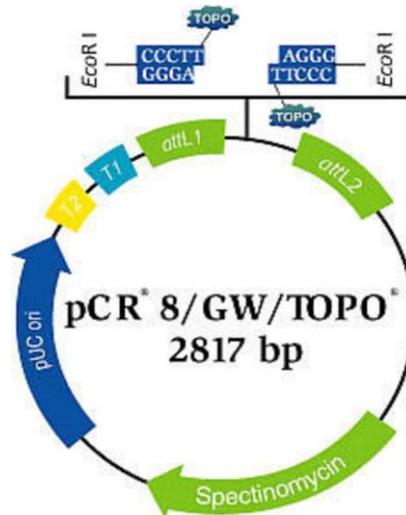


Figura 8. Mapa del vector de clonación pCR 8 TOPO GW. En la figura en verde se encuentran representados los sitios *attL* de recombinación y el gen de resistencia para la selección del plásmido mientras que en la parte superior de la imagen se muestra a detalle el sitio múltiple de clonación flanqueado por la enzima *EcoRI*.

6.10.5.2 Selección de transformantes con la construcción PCR 8 TOPO GW-MTx 18

Las clonas bacterianas con el plásmido insertado se seleccionaron mediante el sistema de blancas y azules, toda vez que las clonas con aspecto blanco son aquellas que contienen el inserto correctamente clonado en el plásmido mientras que las clonas con aspecto azul son bacterias sin construcción. Posteriormente se crecieron en medio LB líquido con espectinomicina (100 µg/ml) diferentes clonas a 37°C toda la noche.

6.10.5.3 Purificación de plásmidos

Los caldos bacterianos previamente cultivados se centrifugaron en tubos para microfuga de 2 ml a 12,000 rpm durante 1 minuto. El sobrenadante se eliminó y la pastilla celular se resuspendió en 250 µl de solución de resuspensión, después se añadió 250 µl de solución de lisis a cada tubo y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. La suspensión celular se trató con 350 µl de solución amortiguadora, se mezcló levemente y se incubó en hielo durante 5 minutos, los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo colector con filtro para concentrar el DNA y se centrifugó nuevamente 1 minuto a 12,000 rpm. El filtro se lavó dos veces con 500 µl de solución de lavado centrifugando 1 minuto a 12,000 rpm. Por último, se añadió 50 µl de agua desionizada al filtro y se centrifugó como en el paso anterior para eluir el DNA, los plásmidos se analizaron en un gel de DNA y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

6.10.5.4 Digestión de plásmidos pCR 8 TOPO GW-MTx18 con la enzima de restricción *EcoRI* y secuenciación

Los plásmidos se digirieron con la enzima de restricción *EcoRI* ya que este flanquea el sitio de clonación en el plásmido para corroborar la inserción del gen de la α -neurotoxina MTx18, la digestión se realizó en un tubo eppendorf de 0.5 ml y se mezcló 10 μ l de plásmido (50-100 ng de DNA), 2 μ l Buffer *EcoRI* 10X, 1 μ l de enzima *EcoRI* (1 U/ μ l) y se llevó a un volumen final de 20 μ l con agua desionizada. La reacción se incubó a 37°C durante 2 horas y los productos de digestión se analizaron en gel de agarosa al 2%, la clona (s) con el patrón correcto de restricción se sometieron a una segunda digestión empleando las enzimas *EcoRV* y *HindIII* para verificar la direccionalidad del inserto, al finalizar los plásmidos se almacenaron a -20°C hasta su uso. Los plásmidos putativos se secuenciaron en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM mediante el uso de oligonucleótidos M13 específicos del vector de clonación pCR 8 TOPO GW con el fin de seleccionar la construcción con el inserto perfectamente insertado y en la orientación correcta. Los datos se analizaron mediante los programas 4Peaks y Gene construction kit para la confirmación de secuencias.

6.10.6 Recombinación mediante el sistema Gateway del gen MTx18 de la α -neurotoxina de *M. euryxanthus* en el vector de expresión de plantas pK2GW7

6.10.6.1 Amplificación del inserto MTx18 mediante reacción en cadena de la polimerasa y purificación

El sistema Gateway de clonación por recombinación consiste en realizar la inserción de un gen integrado en un plásmido donador a un plásmido aceptor o en su defecto recombinar el producto de PCR amplificado de forma directa con el vector de expresión, esta última estrategia fue la que se empleó para insertar la secuencia de la toxina MTx18 en el plásmido pK2GW7. La reacción de PCR se realizó en un tubo para PCR de 0.2 ml, se mezcló 5 μ l de buffer Taq SO₂Mg² 10X, 3 μ l de MgCl₂, 4 μ l de dNTPs (2.5 mM), 1 μ l de Oligonucleótido forward M13 (10 picomolas), 1 μ l de Oligonucleótido reverse M13 (10 picomolas), 31 μ l de agua desionizada, 3 μ l de templado (50-100 ng de DNA) y 1 μ l de enzima Taq DNA polimerasa (1 U/ μ l). La PCR se llevó a cabo en un termociclador MiniPCR de acuerdo a las condiciones de temperatura y tiempo que se detallan en la tabla 8 que se muestra a continuación. Posteriormente el producto de PCR se purificó utilizando la estrategia del proveedor del kit como se describió previamente y se analizó en un gel de DNA de agarosa al 2% para verificar la integridad de la muestra, se cuantificó y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Tabla 8. Condiciones de amplificación del inserto MTx18

Pasos	Temperatura	Tiempo	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	3 minutos	1
Desnaturalización	94°C	1 minuto	
Hibridación	57°C	1 minuto	30
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	10 minutos	1

Volumen de reacción de PCR: 50 µl totales.

6.10.6.3 Recombinación del gen MTx18 en el vector de expresión de plantas pK2GW7

En un tubo eppendorf de 1.5 ml se añadió 6 µl de producto de PCR (100-200 ng de DNA), 1 µl de vector pK2GW7 (50-100 ng de DNA), 1 µl de LR Clonasa®, 2 µl de buffer TE 1X y la reacción se incubó a 22°C durante toda la noche, al finalizar la incubación se agregó 2 µl de proteinasa K a la reacción para inactivar la actividad enzimática de la LR Clonasa y el producto de recombinación se almacenó a 4°C hasta su uso.

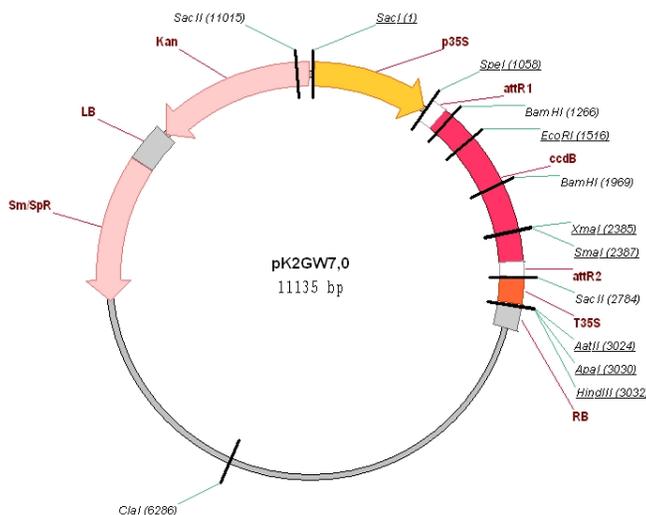


Figura 9. Mapa del vector de expresión para plantas de tabaco. En la imagen en tono rosa se observan los genes de resistencia del plásmido para su selección tanto en bacterias (Sm/Sp^R) como en plantas (Kan), así como el promotor p35S del virus del mosaico de la coliflor (amarillo), el sitio de recombinación flanqueado por las secuencias de recombinación attR, enzimas de restricción disponibles en el vector y los bordes izquierdo (LB) y derecho (RB) que delimitan la región del DNA transferido (T-DNA).

6.10.6.4 Transformación del producto de recombinación en células electrocompetentes de *E.coli* BD 3.1

Se agregó 50 µl de células quimiocompetentes de *E.coli* BD 3.1 al tubo con el producto de recombinación y se mantuvo en hielo durante 1 hora, después se transfirió a una celda para electroporar y se dio un pulso en un electroporador Eppendorf a 1000V durante 3 µs. Después se agregó 250 µl de medio rico SOC y las células se incubaron a 37°C durante 1 hora, al finalizar se plateó 100 y 200 µl de células en cajas de petri con medio LB sólido con espectinomicina (100 µg/ml), las cajas se incubaron nuevamente a 37°C durante toda la noche.

6.10.7 Selección de transformantes y purificación de plásmidos

La selección de transformantes se realizó con base a la supervivencia de bacterias puesto que el plásmido pK2GW7 contiene el gen *ccdB* sensible en algunas cepas causando su muerte por citotoxicidad, la estrategia consistió en utilizar la cepa DB 3.1 (resistente a *ccdB*) ya que aquellas bacterias con plásmidos que integraron correctamente el inserto crecerían de manera normal por sustitución del gen *ccdB* mientras que aquellas bacterias con el plásmido sin recombinar y cuyo gen *ccdB* sigue completo mueren por efecto tóxico. Las transformantes obtenidas se crecieron en 3 ml de medio LB líquido con espectinomicina (100 µg/ml) a 37°C durante toda la noche. Posteriormente los plásmidos se purificaron y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

6.10.7.1 Digestión de plásmidos pK2GW7-MTx18 con la enzima de restricción *EcoRI* y secuenciación de plásmidos

Para confirmar la inserción del gen el vector de expresión se realizó un corte con la enzima de restricción *EcoRI*, en un tubo eppendorf de 1.5 ml se añadió 10 µl de plásmido (50-100 ng de DNA), 1 µl de enzima *EcoRI*, 1 µl de buffer *EcoRI* y 3 µl de agua desionizada. La reacción se incubó durante 2 horas a 37°C y los productos de digestión se analizaron en un gel de DNA de agarosa al 2%. Los plásmidos con el patrón correcto de restricción se enviaron a secuenciar a la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM utilizando los oligonucleótidos específicos del gen MTx18 de la α -neurotoxina de *M. euryxanthus*. Los datos obtenidos se analizaron mediante los programas 4Peaks y Gene construction kit para la depuración de las secuencias.

7. Resultados

7.1 Extracción de RNA y obtención de cDNA

El RNA total purificado se analizó en un gel de DNA de agarosa (Figura 10), para verificar la integridad de los RNA ribosomales que se observan en el gel dentro de los pesos moleculares de 1 y 1.5 Kb respectivamente y con lo cual confirmamos que los RNA's mensajeros se conservan íntegros y sin degradación, lo cual es lo ideal para ser empleados como molde en la obtención de la cadena complementaria de DNA (cDNA).

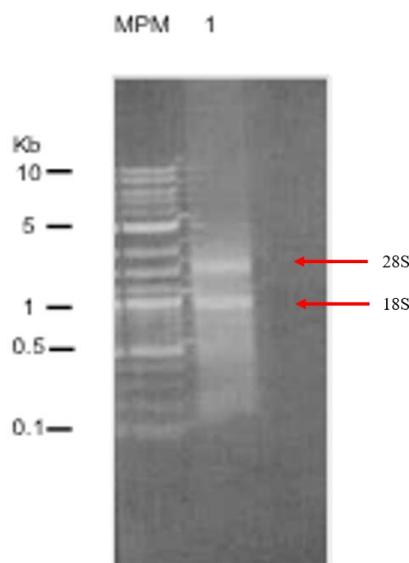


Figura 10. Purificación de RNA. Gel de DNA de agarosa al 1%. MPM: Marcador de peso molecular, carril 1: RNA total purificado a partir de las glándulas de veneno de *M. euryxanthus*. Las flechas en rojo indican las bandas correspondientes a los RNA ribosomales 28S y 18S.

7.3 Amplificación de transcritos de α -neurotoxinas mediante reacción en cadena de la polimerasa

El cDNA obtenido mediante transcripción reversa se utilizó como molde para amplificar los transcritos de toxinas de tres dedos (3FTXs) mediante PCR utilizando los oligonucleótidos antxsPS del péptido señal de las 3FTXs y el AUAP que tiene la misma secuencia que el oligonucleótido AP utilizado para la obtención de cDNA pero sin cola timinas. El producto esperado como se observa en la figura 11A del gel de DNA corresponde a una longitud de 500 pares de bases donde se incluye la secuencia del péptido señal y regiones no codificantes 5' y 3' que han sido reportadas en la literatura para los transcritos de este grupo de toxinas, mientras que en la figura 11B se observa el producto de PCR purificado.

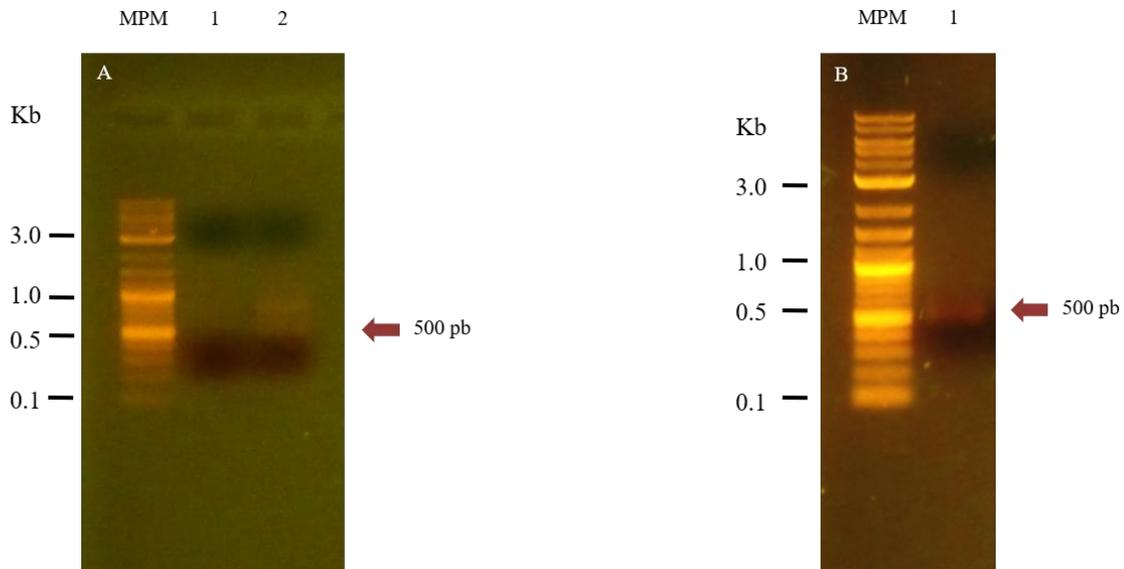


Figura 11. Amplificación de toxinas de tres dedos mediante PCR y purificación. 11A. MPM: Marcador de peso molecular, carril 1: Control negativo, carril 2: Amplicón de toxinas de tres dedos (indicado con flecha roja). 11B. MPM: Marcador de peso molecular, carril 1: Producto de PCR purificado (flecha roja).

7.4 Selección de construcciones pCR 2.1 TOPO-3FTXs mediante ensayo de restricción del vector de clonación

Las construcciones obtenidas producto de la transformación con el plásmido de clonación se analizaron mediante el corte con la enzima de restricción *EcoRI* que flanquea en sitio de inserción. En la figura 12 se muestra un gel para DNA de agarosa al 1% con las clonas que dieron positivo al patrón de restricción esperado de los plásmidos. Se analizaron 50 clonas distintas de las cuales 18 liberaron el inserto de 500 pb que corresponde al tamaño esperado de las 3FTXs.

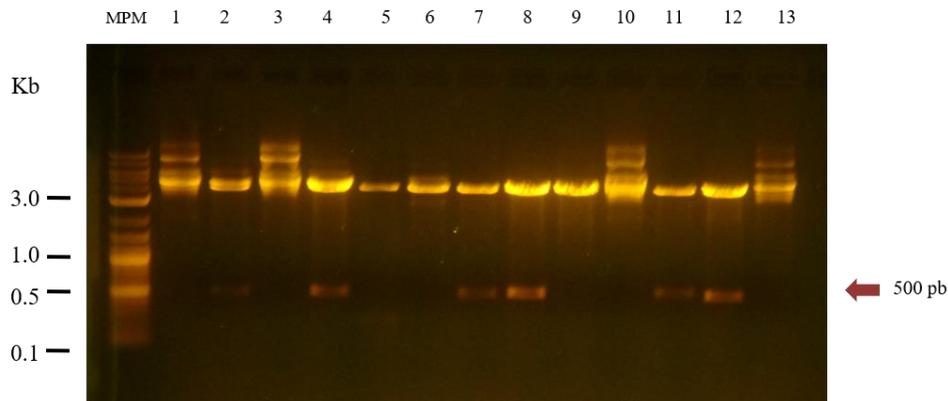


Figura 12. Digestión de construcciones PCR 2.1 TOPO-3FTXs con *EcoRI*. Gel de DNA de agarosa al 1%, MPM: Marcador de peso molecular, carriles 1-13: Plásmidos digeridos con *EcoRI*.

7.5 Secuenciación de plásmidos

Los plásmidos que presentaron el patrón correcto de restricción se mandaron a secuenciar y se depuraron para después realizar un alineamiento múltiple con las 18 secuencias obtenidas que se presenta en la figura 13. Posteriormente cada una de las secuencias fueron analizadas mediante la herramienta de BLAST en la base de datos del NCBI y se obtuvo una clasificación donde resultaron 6 grupos de secuencias distintas.

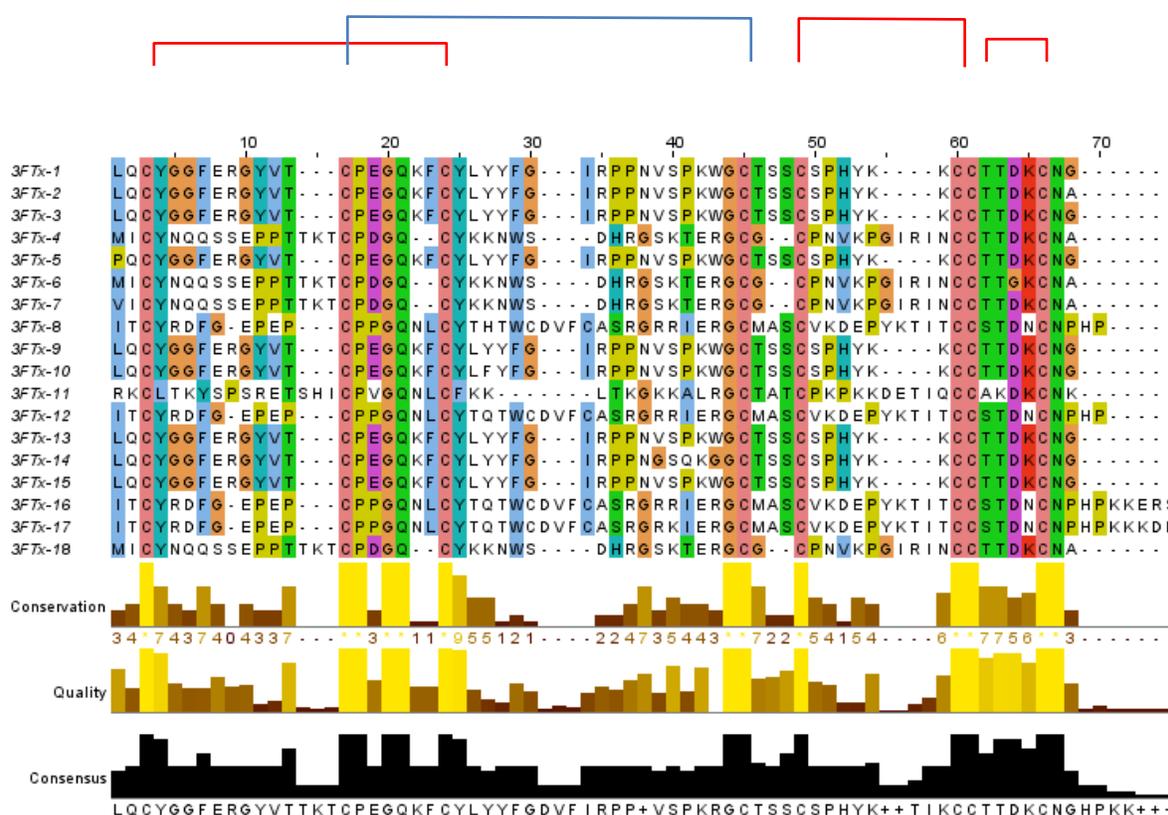


Figura 13. Alineamiento de secuencias de 3FTXs de *M. euryxanthus*. En la imagen se observa en la parte superior indicada con líneas el establecimiento de los puentes disulfuro de este grupo de toxinas mientras que en la parte inferior se muestran en barras el grande de conservación y consenso de las secuencias alineadas.

De los 6 grupos definidos, las secuencias de toxinas tipo I o α -neurotoxinas fueron analizadas nuevamente en la base de datos del NCBI para identificar el porcentaje de similitud con otras toxinas reportadas a nivel de secuencia de proteína o transcritos que permitieron seleccionar la secuencia de la toxina MTx18 (“M” de *Micruroides* y “Tx” de toxina) dado que como se observa en la tabla 10 y figura 14 tiene un porcentaje de identidad con toxinas aisladas a partir del veneno de serpientes del género *Micrurus*, de las cuales dos de ellas (MlatA1 y D.H) de *Micrurus laticollaris* y *Micrurus diastema* respectivamente se expresaron heterológamente en *E. coli* y *P. pastoris* con actividad tóxica.

Tabla 9. Porcentajes de identidad entre α -neurotoxinas de serpientes de coral de América

Toxinas	MTx 18	Frontoxin	MlatA1	Mpyrrhocryptus	D.H
MTx 18	100%	79%	78%	77%	77%
Frontoxin	79%	100%	61%	49%	66%
MlatA1	78%	61%	100%	43%	70%
Mpyrrhocryptus	77%	49%	43%	100%	56%
D.H	77%	66%	70%	56%	100%

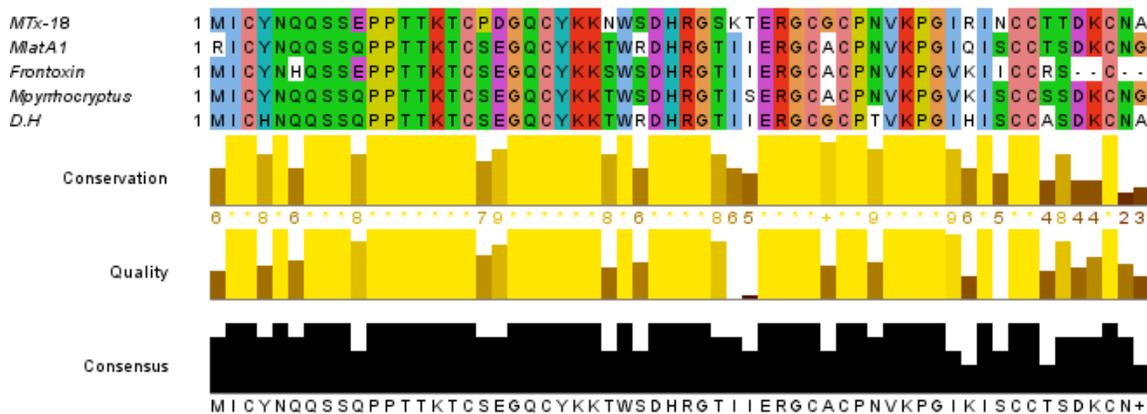


Figura 14. Alineamiento de secuencias de α -neurotoxinas y MTx18 de *M. euryxanthus*. Las especies con mayor similitud con la MTx18 fueron *Micrurus frontalis* (Frontoxina), *Micrurus laticollaris* (MlatA1), *Micrurus pyrrhocryptus* y *Micrurus diastema* (D.H) con 79, 78 y 77% respectivamente.

7.5 Expresión de α -neurotoxinas en *E. coli*

7.5.1 Amplificación y purificación del inserto MTx18 mediante PCR

Con el uso de los oligonucleótidos específicos se amplificó el inserto MTx18 cuya longitud es de 191 pb y el cual posteriormente se purificó como se observa en el gel de DNA de la figura 15.

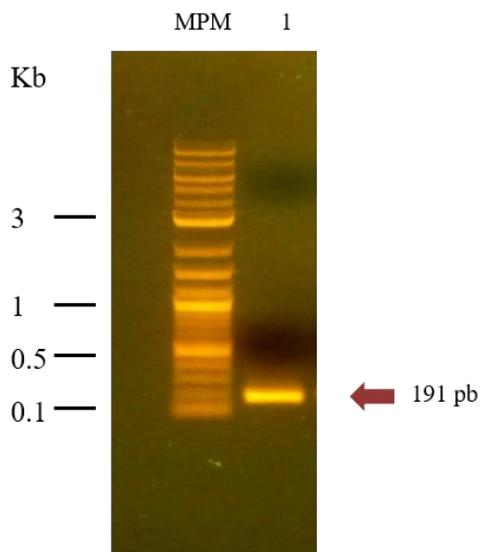


Figura 15. Amplificación y purificación del producto de PCR (Inserto MTx18).
Gel de DNA de agarosa al 1%, MPM: Marcador de peso molecular, carril 1: Producto de PCR purificado.

7.5.2 Análisis de plásmidos pCR 2.1 TOPO-MTx18 mediante la digestión con enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII*

Los plásmidos se purificaron y se digirieron con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII* añadidas en los extremos 5' y 3' respectivamente mediante los oligonucleótidos específicos de la toxina. En la figura 16 se observa la liberación del inserto del tamaño esperado (191 pb) que corresponde al gen MTx18 de la α -neurotoxina de *M. euryxanthus*.

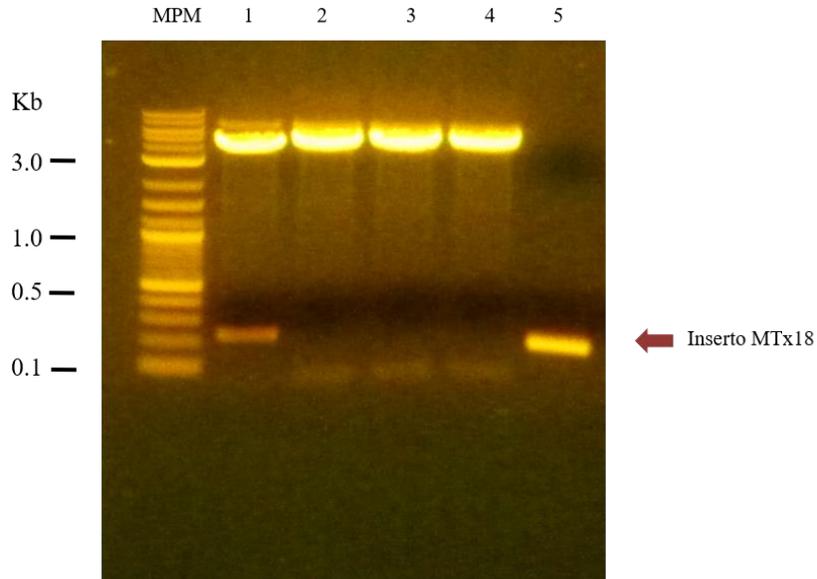


Figura 16. Digestión de construcciones pCR 2.1 TOPO-MTx18 con *Bam*HI y *Hind*III. Gel de DNA de agarosa al 1%, MPM: Marcador de peso molecular, carriles 1-4 plásmidos digeridos con *Bam*HI y *Hind*III, carril 5: Control positivo.

7.5.2.1 Secuenciación de plásmidos

Los plásmidos con el patrón correcto de restricción se enviaron a secuenciar para corroborar la secuencia de la toxina de *M. euryxanthus*. En la figura 17 se muestra la secuencia de la MTx18 depurada, con las secuencias correctas de las enzimas de restricción y sin cambios en el marco de lectura para su inserción en el vector de expresión pQE30.

```

BamHI
GGATCCATGATATGTTACACCCACACAGTCATCGGACCTCCACCCACTAAACTTGTCCCGATGGGCAGTGCTATAAAAAAATGGAGTGATCACCGTGGATCTAAACTG
▶ G S M I C Y N Q Q S S E P T T K T C P D G Q C Y K K N W S D H R G S K T
                                     HindIII
AARGGGGATGTGGTTGTCTAACGTGAAGCCCGGTATTGGAATTAAGTGTGCACACACAGACAATGCACCGCTGAGAGCTT
▶ E R G C G C P N V K P G I R I N C C T T D K C N A • K L

```

Figura 17. Secuencia completa del gen que codifica la α -neurotoxina MTx18 de *M. euryxanthus*. En la imagen en color azul se observa la secuencia de la proteína madura (MTx18) y en negritas el codón de inicio de la transcripción (Metionina), en rosa los sitios de restricción de las enzimas *Bam*HI y *Hind*III y en verde el codón de paro de la transcripción.

7.5.3 Análisis de plásmidos pQE30-MTx18 mediante la digestión con enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII*

Como se mencionó en la metodología, después de realizar la ligación se seleccionaron distintas clonas bacterianas para realizar el análisis con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII* y discernir entre plásmidos vacíos y aquellos que contienen clonado el gen MTx18, en la figura 14 se muestran algunas de las construcciones analizadas.

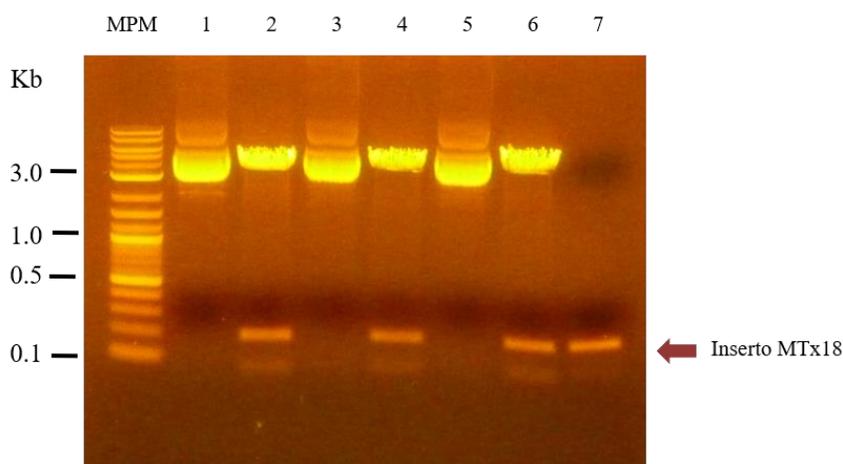


Figura 18. Digestión de construcciones pQE30-MTx18 con *BamHI* y *HindIII*. Gel de DNA de agarosa al 1%, MPM: Marcador de peso molecular, carriles 1, 3 y 5: Plásmidos sin digerir, carriles 2, 4 y 6: Plásmidos digeridos con *BamHI* y *HindIII*, carril 7: Control positivo.

7.5.3.1 Secuenciación de la toxina MTx18 a partir del plásmido de expresión pQE30

Los plásmidos con el patrón correcto de restricción se enviaron a secuenciar para corroborar la secuencia de la toxina, sitios de restricción y el marco de lectura que coloca en fase a la proteína con la etiqueta de histidinas que es añadida por el vector y que además ayudó a purificar la toxina (Figura 19).

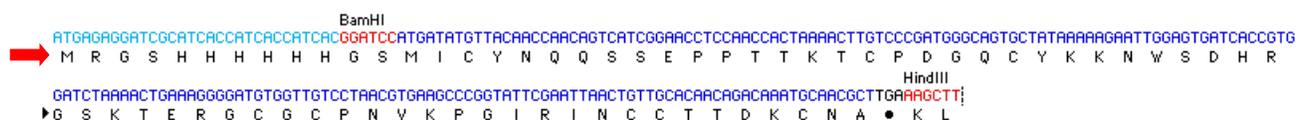


Figura 19. Secuencia completa del gen que codifica la α -neurotoxina MTx18 de *M. euryxanthus* a partir del vector de expresión pQE30. En la imagen en color azul celeste podemos encontrar 4 aminoácidos empezando con metionina que es el codón de inicio de la transcripción (Flecha roja) que añade el vector de expresión pQE30 seguido del tag de 6 histidinas útil para purificar la proteína, en rojo los sitios de restricción que flaquean la toxina, en azul marino la secuencia de la toxina madura y finalmente en negro el codón de paro de la transcripción.

7.5.4 Análisis de expresión total en la cepa de *E. coli* XL1Blue

La construcción pQE30-MTx18 se transformó en células de *E. coli* XL1Blue debido a que esta cepa produce proteína soluble y en cuerpos de inclusión haciendo más fácil la detección de la proteína. La toxina recombinante con un peso molecular de 7.9 kDa se observó en geles de SDS-PAGE y western blot (Figura 20 y 21, indicado con flechas rojas) y presentó un corrimiento anómalo en geles de proteínas (migra alrededor del marcador de 10 kDa) debido a la proporción de aminoácidos hidrofóbicos que se encuentran en este grupo de toxinas y que le confieren una carga extra a la proteína. Para el análisis en gel de SDS-PAGE las bacterias se indujeron con 1 mM de IPTG a 37°C durante toda la noche mientras que para el ensayo de western blot para detectar la proteína se utilizó un anticuerpo anti-histidinas y se empleó como control positivo la α -neurotoxina recombinante (rD.H) de *Micrurus diastema*.

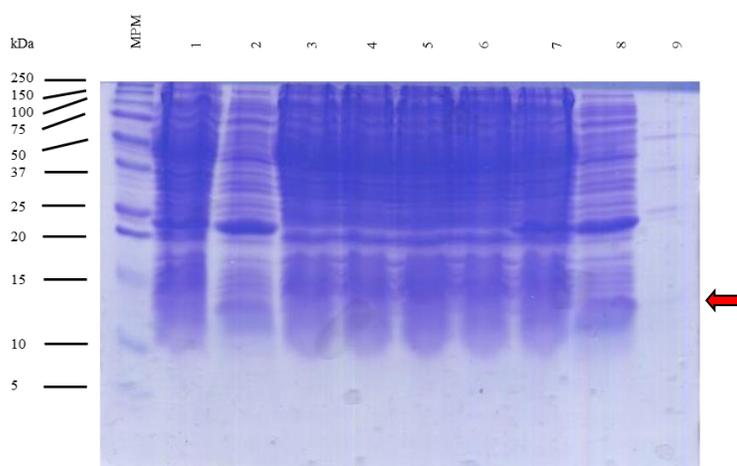


Figura 20. Expresión total de la toxina recombinante MTx18 (rMTx18) en la cepa XL1Blue. Gel de SDS-PAGE al 15%, MPM: Marcador de peso molecular, carriles 1-2: Clona 1 no inducida e inducida con 1 mM IPTG, carriles 3-4: Clona 2 no inducida e inducida con 1 mM IPTG, carriles 5-6: Clona 3 no inducida e inducida con 1 mM IPTG, carriles 7-8: Clona 4 no inducida e inducida con 1 mM IPTG, carril 9: Control positivo (rD.H).



Figura 21. Detección de la toxina rMTx18 mediante ensayo de western blot en la cepa XL1Blue. Membrana de nitrocelulosa incubado con anticuerpo anti-histidinas acoplado a fosfatasa alcalina. MPM: Marcador de peso molecular, carriles 1-2: Clona 1 no inducida e inducida con 1 mM IPTG, carriles 3-4: Clona 2 no inducida e inducida con 1 mM IPTG, carriles 5-6: Clona 3 no inducida e inducida con 1 mM IPTG, carriles 7-8: Clona 4 no inducida e inducida con 1 mM IPTG, carril 9: Control positivo (rD.H)

7.5.5 Expresión de α -neurotoxina MTx18 en la cepa de *E. coli* SHuffle

Después de confirmar la expresión de la toxina recombinante, se transformó un abanico de cepas comerciales para la producción de proteína soluble con la construcción del vector de expresión. Las células se crecieron a 37°C y se indujeron con 1mM IPTG durante toda la noche, la cepa con mejor expresión fue SHuffle como se muestra en la figura 22 del gel de SDS-PAGE, posteriormente se realizó un western blot (Figura 23) de algunas clonas para validar la producción de la toxina recombinante indicado con flechas rojas y usando como control positivo la α -neurotoxina recombinante (rD.H).

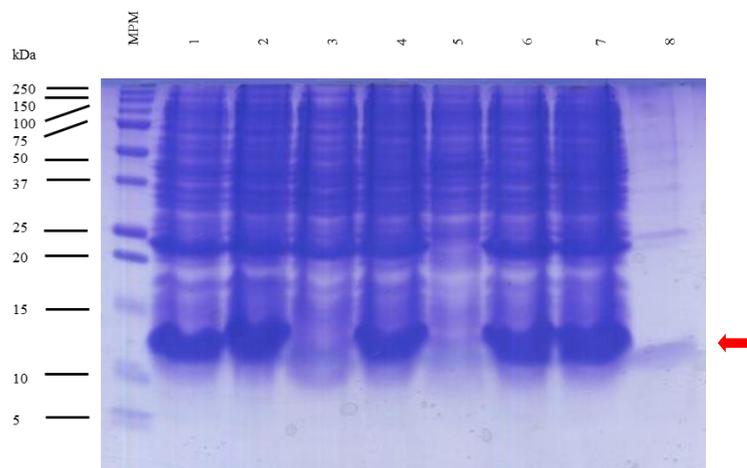


Figura 22. Expresión total de la toxina rMTx18 en la cepa SHuffle. Gel de SDS-PAGE al 15%, MPM: Marcador de peso molecular, carriles 1-7: Clonas distintas de la cepa SHuffle, carril 8: Control positivo (rD.H).

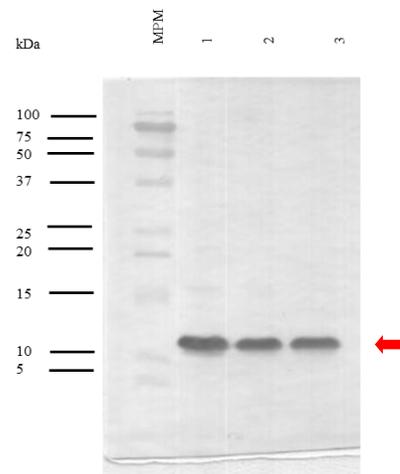


Figura 23. Detección de la rMTx18 mediante ensayo de western blot en la cepa SHuffle. Membrana de nitrocelulosa incubado con anticuerpo anti-histidinas acoplado a fosfatasa alcalina. MPM: Marcador de peso molecular, Carriles 1-2: Clonas distintas de la cepa SHuffle, carril 3: Control positivo (rD.H).

Posteriormente se inoculó un matraz de 50 ml de medio LB con la clona sobreexpresante de la toxina y se incubó a 16°C durante 20 horas inducido con 0.1 mM y 1 mM IPTG para realizar las pruebas de localización de producción de la proteína ya sea en forma soluble o cuerpos de inclusión, la expresión se analizó en geles de SDS-PAGE (Figura 24) y se observó que la proteína se produce de forma soluble (flecha roja) lo cual realizó más fácil entre otras cosas su extracción y purificación.

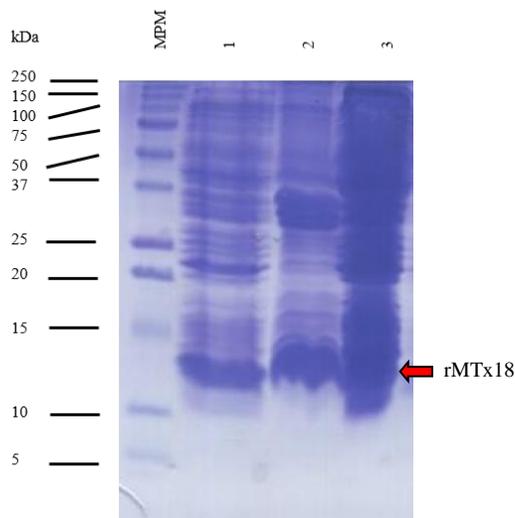


Figura 24. Prueba de expresión para la localización de la producción de la toxina rMTx18 en la cepa SHuffle. Gel de SDS-PAGE al 15%, MPM: Marcador de peso molecular, carriles 1-3: Clona 1 inducida con 1 mM IPTG (proteína total, cuerpos de inclusión y fracción soluble).

7.5.6 Purificación de la toxina recombinante MTx18 mediante cromatografía de afinidad a níquel

La toxina se produjo en matraces de 1 litro de medio LB con la clona sobreexpresante a una temperatura de 16°C durante 24 horas con una concentración de 1 mM IPTG. La proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad a níquel y después se analizó en un gel de SDS-PAGE para verificar la pureza e integridad como se muestra en la figura 25, el rendimiento de la toxina recombinante fue de 2.6 mg/litro de medio de cultivo.

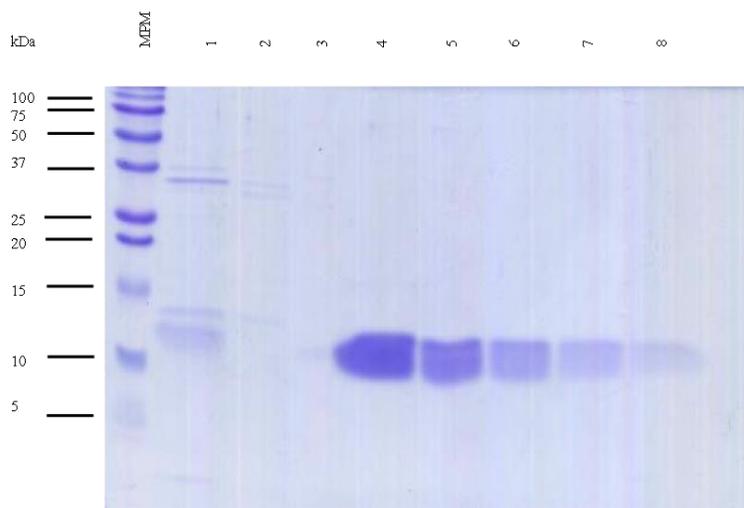


Figura 25. Purificación de la toxina recombinante rMTx18 mediante cromatografía de afinidad a níquel. Gel de SDS-PAGE al 15%, MPM: Marcador de peso molecular, carril 1: Lavado PBS, carril 2: Lavado 25 mM imidazol, carril 3: Elución 1, carriles 4-8: Toxina rMTx18 purificada.

7.5.7 Determinación de la letalidad de la toxina recombinante MTx18 en ratones CD1

Se logró producir la toxina recombinante MTx18 con actividad neurotóxica, posteriormente se probaron diferentes concentraciones de toxina purificada en grupos de 3 ratones de la cepa CD1 de 18-20 gramos, la mortalidad se determinó a las 24 horas y se graficaron los resultados que se muestran en la figura 22. La dosis letal media calculada fue de 8.3 µg de toxina/raton.

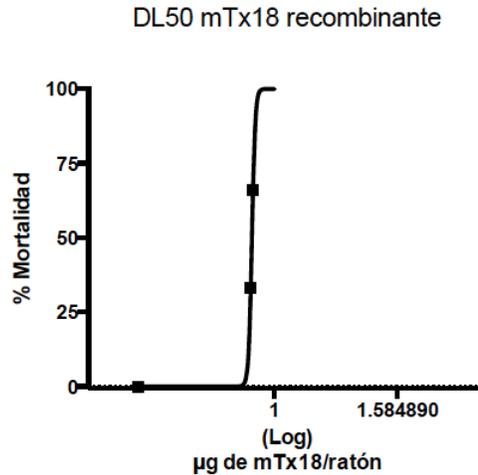


Figura 26. Cálculo de la dosis letal media de la toxina rMTx18 en ratones CDI. Porcentaje de mortalidad versus el logaritmo de la toxina recombinante expresado en microgramos/ratón.

7.5.8 Cuantificación de títulos de anticuerpos de conejo anti MTx18 mediante ELISA y dosis efectiva media

Los títulos de anticuerpos de conejo anti-MTx18 determinados por ELISA fueron de 72335 y 37783 para los conejos 22 y 23 respectivamente (Figura 27), sin embargo en los ensayos de dosis efectiva media (DE_{50}) solo el suero del conejo 22 neutralizó la actividad de la toxina con una DE_{50} calculada de 224.3 µl de suero de conejo/ratón mientras que el suero del conejo 23 neutralizó parcialmente la toxicidad usando el volumen máximo de suero permisible.

Titulos anti-rMTx 18 de *Micruroides*

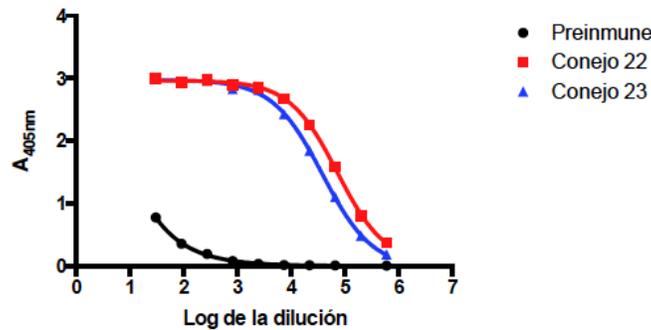


Figura 27. Cuantificación de títulos de anticuerpos de conejo anti-rMTx18. Se graficó la absorbancia a 405 nm versus el logaritmo de la dilución de los sueros de conejo. En la imagen en la línea negra se observa el control (suero preimmune), en azul el suero del conejo 23 y en rojo el suero del conejo 22 con el cual se determinó la DE_{50} en ratones.

7.10 Construcción del vector para la expresión de la toxina MTx18 de *M. euryxanthus* en plantas de tabaco

7.10.1 Amplificación y purificación del gen MTx18 de la α -neurotoxina de *M. euryxanthus* mediante PCR

A partir de la construcción pQE30-MTx18 y los oligonucleótidos específicos se amplificó el gen de la α -neurotoxina MTx18 mediante PCR, el inserto tiene una longitud de 225 pb que corresponde a la secuencia de la proteína madura y la etiqueta de histidinas para facilitar su purificación en plantas de tabaco.

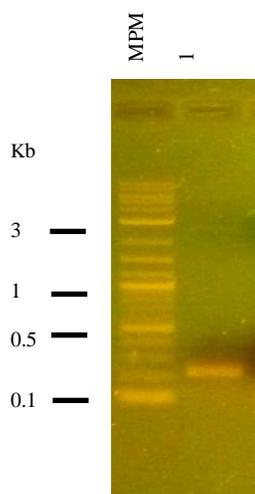


Figura 28. Purificación del inserto MTx18 de la α -neurotoxina de *M. euryxanthus*. Gel de DNA de agarosa al 1%, MPM: Marcador de peso molecular, carril 1: Inserto MTx18 purificado.

7.10.2 Análisis de construcciones pCR8 GW TOPO-MTx18 mediante el corte con la enzima de restricción *EcoRI*

Para realizar la clonación del producto de PCR amplificado se utilizó el vector de clonación pCR 8 GW TOPO, posteriormente se analizaron diferentes construcciones mediante ensayo de corte con la enzima de restricción *EcoRI* debido a que este flanquea el sitio de clonación en el vector. En la figura 29 se muestra un gel de DNA con una de las construcciones con el patrón de restricción esperado, después se envió a secuenciar utilizando los oligonucleótidos M13 del vector de clonación con los cuales se corroboró que la secuencia de la toxina MTx18 se encontraba completa y sin cambios en el marco de lectura.

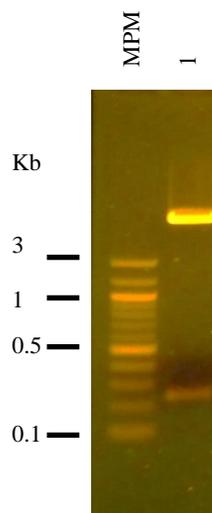


Figura 29. Ensayo de restricción de la construcción pCR8 GW TOPO-MTx18 con la enzima *EcoRI*. Gel de DNA de agarosa al 1.5%, MPM: Marcador de peso molecular, carril 1: Plásmido digerido con la enzima *EcoRI*.

7.10.3 Recombinación del gen MTx18 en el vector de expresión pK2GW7

7.10.3.1 Amplificación del gen de la α -neurotoxina MTx18 mediante PCR

El producto de PCR amplificado a partir del vector de clonación PCR 8 GW TOPO-MTx18 con una longitud de 529 pb se purificó y se analizó en un gel de DNA como se muestra en la figura 30. El amplicón corresponde al gen completo de la toxina, etiqueta de histidinas y los sitios de recombinación *AttI* necesarios para su inserción en el vector de expresión.

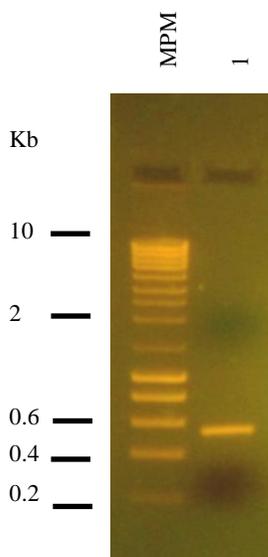


Figura 30. Purificación del inserto MTx18 de la α -neurotoxina de *M. euryxanthus* para su recombinación en el vector pK2GW7. Gel de DNA de agarosa al 1.5%, MPM: Marcador de peso molecular, carril 1: Inserto MTx18 purificado.

7.10.3.2 Análisis de construcciones pK2GW7-MTx18 mediante el ensayo con la enzima de restricción *EcoRI*

Los plásmidos previamente purificados se digirieron con la enzima *EcoRI* para corroborar la inserción del gen MTx18 en el vector de expresión pK2GW7, en el gel de DNA de la figura 31 se observa el inserto liberado correspondiente a la toxina MTx18. Posteriormente el plásmido se envió a secuenciar y dados los resultados se pudo validar la inserción del gen de la toxina en el vector de expresión con el marco de lectura correcto (Figura 32).

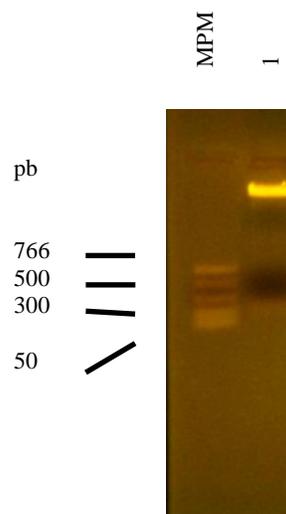


Figura 31. Digestión de la construcción pK2GW7-MTx18 mediante la enzima *EcoRI*. Gel de DNA de agarosa al 1.5%, MPM: Marcador de peso molecular, carril 1: Plásmido digerido con la enzima *EcoRI*.

```

ATGAGAGGATCGCATCACCCATCACCATCACGGATCCATGATATGTTACACCCACAGTCATCGGARACCTCCACCCACTAAACTTGTCCCGATGGGCAGTGCTATAAAAAG
▶ M R G S H H H H H H G S M I C Y N Q Q S S E P P T T K T C P D G Q C Y K K
AATTGGAGTGATCACCGTGGATCTAAACTGAAAGGGGATGTGGTTGTCTACGTGAAGCCCGGTATTCGAATTAAGTGTGCACACAGACAAATGCACCGCTTGAAGCTT
▶ N W S D H R G S K T E R G C G C P N V K P G I R I N C C T T D K C N A • K L
  
```

Figura 32. Secuencia completa de la α -neurotoxina MTx18 de *M. euryxanthus* a partir del vector PK2GW7-MTx18. En la imagen en verde se indica el codón de inicio de la transcripción (Metionina), amarillo la etiqueta de histidinas, azul celeste la secuencia de la toxina madura MTx18, en rojo los sitios de restricción *BamHI* y *HindIII* y por último en negro el codón de paro de la transcripción.

8. Discusión

Es bien sabido que entre las distintas familias de serpientes venenosas, la familia elapidae es una de las más estudiadas debido a las distintas especies de importancia médica que se encuentran dentro de este grupo por lo que en lo que se refiere al estudio de sus venenos se puede decir que solo se ha conocido la parte somera del problema ya que existen distintos componentes en el veneno de elápidos que a la fecha se desconoce su papel en el envenenamiento o interacciones entre moléculas que potencían la toxicidad y finalmente aquellas familias de toxinas de las cuales aún falta por conocer. Un ejemplo de ello son las toxinas de tres dedos, una superfamilia de toxinas que a su vez está integrada por familias de toxinas entre las cuales podemos encontrar citotoxinas, cardiotoxinas, α -neurotoxinas entre otras (Kini y Doyle, 2009). Este grupo de toxinas son de gran importancia puesto que se encuentran en el veneno de todos los elápidos y la toxicidad de tales venenos está relacionada a la presencia de ellas o en su defecto por fosfolipasas, otro grupo abundante en el veneno, pero en particular aquellas con actividad neurotóxica, conocidas como β -neurotoxinas. Sin embargo, éstas solo se han documentado en venenos de coralillos de Norteamérica, particularmente la especie *Micrurus fulvius* que posee potentes fosfolipasas que abarcan cerca del 33% del veneno siendo los componentes más letales en ratones (Vergara *et al* 2014).

Por otra parte, las α -neurotoxinas, un grupo de mayor envergadura y con mayor presencia en los venenos tanto de las serpientes del viejo y nuevo mundo de la familia elápidae, son potentes toxinas con una dosis letal media de aproximadamente 0.04 – 0.3 mg/kg de peso y que tienen preferencia por el receptor nicotínico de acetilcolina muscular situado en la placa del músculo nervioso. Provocan parálisis, edema, dolor, vómito, sialorrea y problemas respiratorios que debido a la gravedad puede llevar a la muerte (Kini y Doyle, 2009). Si bien actualmente se tiene mapeado el número de especies de elápidos de importancia médica y los avances en la caracterización de sus venenos para el futuro desarrollo de antivenenos de amplio espectro, existen otros ejemplares que debido a su rareza, poco conocimiento biológico pero aún más el potencial del veneno los hacen excelentes modelos de investigación desde el punto de vista toxinológico y evolutivo pues todo indica que son serpientes que resguardan más de lo que se conoce a cerca de los venenos y el uso potencial de algunos de sus componentes en el área médica, biotecnológica, etc. En América los géneros más representativos de elápidos en orden de relevancia son *Micrurus*, *Leptomicrurus* y *Micruroides*, las especies de serpientes de éste último género se distribuyen desde el sur de los Estados Unidos hasta en norte de México en los estados de Sonora, Sinaloa y Chihuahua principalmente, la especie *Micruroides euryxanthus* también conocida como coralillo de Sonora no representa un problema de salud debido a los pocos reportes sobre personas mordidas por esta serpiente, sin embargo se sabe que el veneno puede causar un envenenamiento considerable con la presencia de síntomas neurotóxicos que hasta el momento no habían sido identificados (Russell, 1967.)

Con el objetivo de identificar los componentes relacionados a la toxicidad del veneno de *Micruroides euryxanthus* y su relación con el resto de los elápidos, en este trabajo se secuenciaron transcritos de toxinas de tres dedos a partir del RNA de las glándulas de veneno para después realizar un filtro y seleccionar aquellas secuencias parecidas al grupo de las α -neurotoxinas, se empleó el oligonucleótido específico del grupo de las 3FTXs como previamente se había utilizado en los trabajos realizados por Guerrero-Garzón y Calbajal-Saucedo en 2014 y 2013 respectivamente, en contraste a los autores que contaban con la caracterización del veneno disponible y material abundante (veneno) en nuestro caso tuvimos que realizar análisis exhaustivos *in silico* con las secuencias obtenidas. Reportamos 18 secuencias clasificadas en 6 grupos distintos poniendo énfasis en 3 secuencias putativas con actividad α -neurotoxina denominadas MTx (*Micruroides* toxinas) seguidas de un número que se les asignó como fueron identificadas, MTx6, MTx7 y MTx18 que se igualó al número de secuencias reportadas (D.H, B.D y B.E por Guerrero-Garzón con base a sus análisis bioinformáticos y filogénicos. La secuencia mTx18 seleccionada como candidata a expresarse heterológamente en bacterias y plantas tiene una identidad de cerca del 77% con toxinas aisladas del veneno de coralillos americanos entre las cuales resalta la secuencia D.H de *Micrurus diastema* reportada por Guerrero-Garzón y la MlatA1 de *Micrurus laticollaris* por Carbajal-Saucedo (véase el alineamiento en la figura 28), está compuesta de 60 residuos de aminoácidos de las cuales destacan 8 cisteínas que a su vez forman 4 puentes disulfuro. La secuencia de la toxina MTx18 se subclonó y ligó en el vector pQE30 donde la proteína además se le añadió una etiqueta de histidinas para su purificación también se incluyeron algunos aminoácidos extras por parte del vector, en total 12 aminoácidos se incluyeron para dar un peso teórico de 7998.3 daltones (7.9 kDa) muy parecido al peso molecular reportado por las toxinas recombinantes rD.H de bacterias y rMlatA1 expresado en levaduras. La proteína se expresó de forma soluble en bacterias representando una ventaja para su extracción tomando en cuenta que si esta se llegase a expresar en la fracción insoluble en cuerpos de inclusión debía ser tratada con detergentes agresivos capaces de desnaturalizar la proteína y por ende la pérdida de la estructura correcta que está ligada a la toxicidad o en su defecto la necesidad de plegamiento *in vitro* que conlleva pasos extra de purificación, procesos caros y bajos rendimientos (Clement *et al* 2016). Otra de las ventajas de expresión de proteínas solubles es la capacidad de ciertas cepas bacterianas modificadas para propiciar la formación de puentes disulfuro en el citoplasma gracias a la presencia de chaperonas moleculares que asisten al plegamiento correcto de proteínas u oxidasas y reductasas que cumplen el mismo papel (Sorensen y Mortensen, 2005). Se probó la MTx18 en ratones la cual tuvo actividad tóxica, posteriormente se calculó la DL₅₀ que fue 8.3 μ g de toxina/ratón, que en comparación a las DL₅₀ de la rD.H y MlatA1 (3 μ g/ratón y 5 μ g/ratón) se necesita una ligera cantidad de proteína extra para producir un envenenamiento sin embargo aun así la mTx18 tiene una potencia letal interesante pese a que Russel en 1967 observó pacientes con ligeros síntomas a causa de la mordedura por *M. euryxanthus*, en todo caso esto podría deberse a que en el veneno se encuentran otros componentes que puede potenciar la toxicidad o disminuirla y en este experimento se trata de una toxina purificada que entra en contacto directo con los receptores en el ratón (Guerrero-Garzón, 2014., Barrón-Castillo, 2014).

Del mismo modo en que se trabajaron algunos trabajos aquí citados, se inmunizaron conejos con la toxina recombinante para producir anticuerpos y con ellos probar si estos sueros son capaces de neutralizar la toxicidad en ratones, después de semanas de inmunización se obtuvieron títulos de 72335 y 37783 para los conejos 22 y 23, que como se notó aun siendo el mismo modelo existen diferencias considerables a nivel de individuos y en este caso la respuesta inmune fue mejor en el conejo 22 mientras que para el conejo 23 se obtuvo el 50% de anticuerpos anti MTx18. Los sueros de conejos hiperinmunizados se probaron contra la toxina donde sólo el suero del conejo 22 fue capaz de neutralizar la toxicidad con 224.3 μ l/ratón mientras que los sueros del conejo 23 aun administrando el volumen máximo no neutralizó la toxicidad de la MTx18 recombinante. Al comparar nuestros resultados con los obtenidos tanto por Barrón-Castillo y Guerrero-Garzón las toxinas se neutralizaron con un volumen de suero de conejo de 227.7 μ l y 327.5 μ l respectivamente lo cual demuestra que pese a los datos de nuestro grupo de trabajo donde se argumentaba que el modelo de conejo no es un buen medio para generar anticuerpos neutralizantes, con nuestros resultados y anexas es posible llegar a pensar que la maduración de la respuesta inmune y la consecuente producción de anticuerpos neutralizantes se obtiene gracias a la administración de dosis altas de toxina potenciando la producción de mejores anticuerpos (Comunicación personal: Alejandro Olvera Rodríguez)

En lo que respecta a la posible expresión de la MTx18 en plantas de tabaco se sabe que es uno de los trabajos pioneros que se realizaran en este sistema de expresión que es el más utilizado en la producción de vacunas, anticuerpos y moléculas de alto valor comercial en el mercado. Hernández-Campuzano y colaboradores en 2009, expresaron una toxina de la araña *Macrotheles gigas* llamada Magi6 la cual tiene propiedad insecticida en plantas de tabaco para conferirle resistencia a insectos y con ello validar la actividad que presentaba dicho péptido. Ensayos con larvas de *Spodoptera frugiperda* mostraron que al alimentarse de hojas de plantas transgénicas se presentó un porcentaje de mortalidad considerable sin embargo no fueron lo suficientemente concretos, pese a ello se observó que las larvas tenían una preferencia por alimentarse de hojas de plantas de tabaco silvestres en lugar de hojas con la toxina. A diferencia de nuestros objetivos, el propósito de expresar a futuro una toxina de serpiente en plantas de tabaco tiene principal importancia en explorar otros sistemas de expresión capaces de generar toxinas activas y en grandes cantidades o visualizar el panorama de la expresión de este tipo de toxinas y otras con algún potencial biotecnológico como insecticida, antimicrobiano etc. Basados en la secuencia de la toxina insertada en el vector pQE30, se diseñó una estrategia para poder clonar el mismo gen de la MTx18 con la etiqueta de histidinas para su purificación y para lograr dicho cometido se empleó el sistema de recombinación Gateway que consiste en insertar un gen en un plásmido de clonación que a su vez se encarga de flanquear la secuencia por unos sitios de recombinación denominados *AttL* que son reconocidos por una enzima tipo ligasa que transfiere el gen a un plásmido destino, en este caso el vector de expresión pK2GW7 que de igual manera posee sitios de recombinación específicos denominados *AttR*. La metodología empleada para este propósito a diferencia de los procedimientos convencionales logró ser más ventajoso ya que se realizó una clonación directa llevada a cabo por sitios específicos de recombinación mientras que en el caso de bacterias se requirió de la liberación del

inserto de un vector de clonación, la preparación del plásmido destino digerido con las enzimas que flanquean el inserto y por último la ligación que dependiendo del fragmento de DNA puede resultar fácil o no. Una vez lograda la construcción se transformaron plantas de tabaco y aquí hay un abanico de discusión pues después de varios intentos por lograr obtener transformantes de plantas de tabaco ha sido difícil obtener líneas transgénicas por lo que con los avances del proyecto y los resultados de la expresión en bacterias se llegó a la conclusión de cubrir los objetivos restantes en un futuro proyecto.

Una de las limitantes como se mencionó al inicio de este proyecto fue trabajar de manera acertada en la selección de la toxina candidata para expresar heterológicamente en bacterias y plantas, en contraste al trabajo de Guerrero-Garzón en su estrategia implementó la separación del veneno de *Micrurus diastema* mediante HPLC, determinó cuales son las fracciones que causaron síntomas neurotóxicos en ratones y se enviaron a secuenciar para determinar la composición de aminoácidos e identificarlas posteriormente a manera de comparación con las secuencias obtenidas de las glándulas de veneno de donde seleccionó la toxina D.H, mientras que para *Micruroides euryxanthus* no se contaba con veneno y representó un cuello de botella, sin embargo al final del proyecto se pudo extraer el veneno de un ejemplar y se probó la letalidad en ratones pero debido a la escases de muestra no se pudo determinar la DL₅₀, posteriormente se realizó una separación de los componentes del veneno y se secuenció, gracias a esto se pudo identificar una toxina del veneno de *M. euryxanthus* que en cuanto al peso molecular coincide con el peso teórico de la toxina reportada en la glándulas de la misma especie por lo que en términos prácticos la mTx18 es uno de los componentes tóxicos que se encuentra como tal en el veneno y que gracias a ello actualmente se tiene un modelo de expresión de dichas toxinas con las cuales a futuro se puedan realizar algunos estudios sobre la caracterización proteómica del veneno y relaciones evolutivas que comparten con las demás toxinas de las serpientes de coral del género *Micrurus*.

9. Conclusiones

A partir de las glándulas de veneno de *Micruroides euryxanthus* se obtuvieron 18 secuencias totales de toxinas de tres dedos de las cuales tres secuencias correspondieron al tipo I o α -neurotoxina. La α -neurotoxina MTx18 se expresó en forma soluble y activa en la cepa de *E. coli* SHuffle utilizando el vector de expresión pQE30 y el suero obtenido a partir de un conejo hiperinmunizado neutralizó el efecto de la toxina en ratones.

10. Perspectivas

- Fraccionar el veneno para confirmar la presencia de la MTx18 en el veneno completo de *M. euryxanthus*.
- Realizar ensayos de neutralización cruzada con el suero de conejo anti MTx18 con otras α -neurotoxinas nativas y recombinantes.
- Generar plantas transgénicas de tabaco con el vector pK2GW7-MTx18 generado en el presente trabajo que expresen la α -neurotoxina MTx18 y comparar la actividad con la expresada en *E. coli*.

11. Bibliografía

- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., Schwab, H. 2014. Protein expresión in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:5301-5317.
- Andersen, D. C., Krummen, L. 2002. Recombinant protein expresión for therapeutic applications. *Current opinión in biotechnology* 13:117-123.
- Barber, C. M., Isbister, G. K., Hodgson, W. C. (2013). Alpha neurotoxins. *Toxicon* 66:47–58.
- Barrón-Castillo, U. (2014). Expresión de la α -neurotoxina MlatA1 de *Micrurus laticollaris* en *Pichia pastoris* y su evaluación de uso como inmunógeno. Tesis de maestría. Cuernavaca, Morelos, México. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Benard-Valle, M. 2011. Caracterización bioquímica de la serpiente de coral *Micrurus tener*. Tesis de maestría. Cuernavaca, Morelos, México. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Calderon, A. 2011. Caracterización de la respuesta inmune humoral en caballos contra el veneno de *Micrurus tener*. Tesis de maestría. Cuernavaca, Morelos, México. Instituto de biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Calvete, J. J., Sanz, L., Cid, P., de la Torre, P., Flores-Díaz, M., Dos Santos, M. C., Borges, A., Brems, A., Angulo, Y., Lomonte, B., Alape-Girón, A., Gutiérrez, J. M. 2010. Snake venomomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and South American *Crotalus durisus* complex points to neurotoxicity as an adaptive pedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. *Journal of proteome research* 9: 528-544.
- Carbajal-Saucedo, A. Comparación inmunoquímica del veneno de serpientes de coral (Elpidae: Micrurus, Micruroides) mexicanas. Tesis de maestría. 2004. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Carbajal-Saucedo, A., López-Vera, E., Bénard-Valle, M., N. Smith, E., Zamudio, F., R. de Roodt, A., Olvera-Rodríguez, A. 2013. Isolation, characterization, cloning and expression of an alpha-neurotoxin from the venom of the Mexican coral snake *Micrurus laticollaris* (Squamata: Elapidae). *Toxicon* 66:64-74.
- Chang, C.C. 1979. The action of snake venoms on nerve and muscles. In: Lee, C.Y. (Ed.), *Snake Venoms, Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer-Verlag, Berlin. 309-376.
- Chen, R. 2012. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnology Advances* 30:1102–1107.
- Chippaux, J. P. 2017. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease. *Journal of venomous animals and toxins including tropical disease* 23-38.

- Colgan, R., Atkinson, C. J., Paul, M., Hassan, S., Drake, P. M. W., Sexton, A. L., Santa-Cruz, S., James, D., Hamp, K., Gutteridge, C., Ma, J, K. C. 2010. Optimisation of contained *Nicotiana tabacum* cultivation for the production of recombinant protein pharmaceuticals. *Transgenic Resources* 19:241-256.
- Conley, A. J., Zhu, H., Le, L. C., Jevnikar, A. M., Lee, B. H., Brandle, J. E., Menassa, R. 2011. Recombinant protein production in a variety of *Nicotiana* hosts: a comparative analysis. *Plant Biotechnology Journal* 9:434-444.
- Correa-Neto, C., Junqueira de Azevedo, I de L.M., Silva, D.A., Ho, P.L., Leiao de Araujo, M., Alves, M.L., Sanz, L., Foguel, D., Zingali, R.B., Calvete, J.J. (2011). Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*. *Journal of proteomics* 74:1795-1809.
- Clement, H., Flores, V., De la Rosa, G., Zamudio, F., Alagón, A., Corzo, G. 2016. Heterologous expression, protein folding and antibody recognition of a neurotoxin from the Mexican coral snake *Micrurus laticorallus*. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases* 22:25.
- Demain, A. L., Vaishnav, P. (2009). Production of Recombinant Proteins by Microbes and Higher Organisms. *Biotechnology Advances* 27:297-306.
- Dingermann, T. (2008). Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges. *Biotechnology Journal* 3:90–97.
- Dufton, M.J., Hider R.C. (1983). Conformational properties of the neurotoxins and cytotoxins isolated from Elapid snake venoms. *Critical Reviews in Biochemistry* 14:113-171.
- Fernández, J., Vargas-Vargas, N., Pla, D., Sasa, M., Rey-Suárez, P., Sanz, L., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., Lomonte, B. (2015). Snake venomomics of *Micrurus alleni* and *Micrurus mosquitensis* from the caribbean region of Costa Rica reveals two divergent compositional patterns in new world elapids. *Toxicon* 107:217-233.
- Fox, J.W., Serrano, S. (2008). Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. *Proteomics* 8:909-920.
- Gecchele, E., Merlin, M., Brozzetti, A., Falorni, A., Pezzotti, M., Avesani, L. 2015. A comparative analysis of recombinant protein expression in different biofactories: Bacteria, insect cells and plant systems. *Journal of visualized experiments* 97.
- Gold, B.S., Richard, Dart, R.C., Barish, R.A. (2002). Bites of venomous snakes. *New England Journal of Medicine* 347:47-56.
- Guerrero-Garzón, J. F., Benard-Valle, M., Restano-Cassulini, R., Zamudio, F., Corzo, G., Alagón, A., Olvera-Rodríguez, A. 2018. Cloning and sequencing of three-finger toxins from the venom glands of four *Micrurus* species from Mexico and heterologous expression of an Alpha-neurotoxin from *Micrurus diastema*. *Biochimie* 147: 114-121.

- Hernández-Campuzano, B., Suárez, R., Lina, L., Hernández, V., Villegas, E., Corzo, G., & Iturriaga, G. (2009). Expression of a spider venom peptide in transgenic tobacco confers insect resistance. *Toxicon* 53:122–128.
- Jia, B., Jeon, C. O. 2016. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open Biology* 6:1-17.
- Kessler, P., Marchot, P., Silva, M., Servent, D. 2017. The three-finger toxin fold: a multifunctional structural scaffold able to modulate cholinergic functions. *Journal of neurochemistry* 142:7-18.
- Khow, O., Suntrarachun, S. (2012). Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2:159–162.
- Kim, Y. J., Kim, G. Y., Lee, M. G. 2012. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:917-930.
- Kini, R. M., Doley, R. (2010). Structure, function and evolution of three-finger toxins: Mini proteins with multiple targets. *Toxicon*, 56:855–867.
- Koh, D. C. I., Armugam, A., Jeyaseelan, K. (2006). Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63:3030–3041.
- Mackessy, S.P. (2009). *Handbook of venoms and toxins of reptiles*. CRC Press 65-91.
- Overton, T. W. (2014). Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discovery Today*, 19:590–601.
- Peng, L. S., Zhong, X. F., Huang, Y. S., Zhang, Y., Zheng, S. L., Wei, J. W., Wu, W. Y., Xu, A. L. (2003). Molecular cloning, expression and characterization of three short chain α -neurotoxins from the venom of sea snake-Hydrophiinae *Hydrophis cyanocinctus* Daudin. *Toxicon*, 42:753–761.
- Pérez-Torres, O. J. (2017). Clonación, expresión y caracterización de una alfa-neurotoxina presente en la serpiente de coral *Micrurus browni*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, México.
- Ramírez-Bautista, A., Arizmendi, M. C. 2004. *Micruroides euryxanthus*: Sistemática e historia natural de algunos anfibios y reptiles de México. Facultad de estudios superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. SNIB-CONABIO, México D.F.
- Rey-Suárez, P., Núñez, V., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. (2011). Proteomic and biological characterization of the venom of the redtail coral snake *Micrurus mipartitus* (Elapidae), from Colombia and Costa Rica. *Journal of proteomics* 75:655-667.
- Rosano, G. L., Ceccarelli, E. A. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology* 5:1-17.

- Rosenthal, J. A., Hsu, S. H., Schneider, D., Gentile, L. N., Messier, N. J., Vaslet, C. A., Hawrot, E. (1994). Functional expression and site-directed mutagenesis of a synthetic gene for α -bungarotoxin. *The journal of biological chemistry* 269:11178-11185.
- Russell, F. E. (1967). Bites by the sonoran coral snake *Micruroides euryxanthus*. *Toxicon* 5:39-42.
- Smith, L.A. (1990). Cloning characterization, and expression of animal toxins genes for vaccine development. *Medical Research*, 86, 1-40.
- Spiezia, M. C., Chiarabelli, C., Polticelli, F. 2012. Recombinant expression and insecticidal properties of a *Conus ventricosus* conotoxin-GST fusion protein. *Toxicon* 60:744-751.
- Vitt, L., Caldwell, J. (2014). *Herpetology: An introductory biology of amphibians and reptiles*. Elsevier Inc 597-610.
- Yang, D.C., Dobson, J., Cochran, C., Dashevsky, D., Arbuckle, K., Benard, M., Boyer, L., Alagón, A., Hendrikx, I., Hodgson, W.C., Fry, B.G. (2017). The bold and the beautiful: a neurotoxicity comparison of new world coral snakes in the *Micruroides* and *Micrurus* genera and relative neutralization by antivenom. *Neurotox Res* 32:487-495.

12. Anexos

Soluciones de electroforésis

Solución de acrilamida (30% acrilamida + 0.8% bis-acrilamida)

49.5 g de acrilamida

1.32 g bis-acrilamida

*Disolver en un volumen final de 165 ml de agua desionizada.

Buffer inferior (1.5 M Tris + 0.4 % SDS)

18.17 g de Tris

2 ml de SDS 20%

*Disolver en 50 ml de agua desionizada, ajusta el pH a 8.8 con HCl concentrado y enrasar a 100 ml.

Buffer superior (0.5 M Tris + 0.4% SDS)

6.06 g de Tris

2 ml de SDS 20%

*Disolver en 50 ml de agua desionizada, ajustar el pH a 6.8 con HCl concentrado y aforar a 100 ml con agua desionizada.

Buffer de corrida (0.25 M Tris + 1.9 M Glicina + 1% SDS): Solución 10X

15.2 g de Tris

72.1 g de glicina

25 ml de SDS 20%

*Disolver en 300 ml de agua desionizada y enrasar a 500 ml con agua desionizada.

Persulfato de amonio (PSA 10%)

0.1 g de $\text{N}_2\text{H}_8\text{S}_2\text{O}_8$

*Disolver en 1 ml de agua desionizada.

Solución de tinción: Azul brillante de Coomasie

(25% isopropanol + 10% ácido acético + 0.2% azul brillante de Coomasie R-250)

1 g de azul brillante de Coomasie R-250

125 ml de C₃H₈O

50 ml de C₂H₄O₂

*Disolver los reactivos y enrasar a 500 ml con agua desionizada.

Solución de destinción (10% isopropanol + 10% de ácido acético)

50 ml de C₃H₈O

50 ml de C₂H₄O₂

*Mezclar los solventes y enrasar a 500 ml con agua desionizada.

Gel separador al 12.5%

Buffer inferior: 1.5 ml

Solución de acrilamida: 2.5 ml

Agua desionizada: 2.0 ml

TEMED: 5 µl

PSA 10%: 20 µl

Gel concentrador al 4%

Buffer superior: 0.63 ml

Solución de acrilamida: 0.33 ml

Agua desionizada: 1.54 ml

TEMED: 2.5 µl

PSA 10%: 12.5 µl

Soluciones ELISA

Buffer de carbonatos

4.2 g de NaHCO_3

*Disolver en 450 ml de agua destilada, ajustar el pH a 9.5 con NaOH 5N y aforar a 500 ml.

Solución de bloqueo

25 ml de HCl

1 ml de Tween 20

2.5 g de gelatina

*Mezclar los reactivos y homogenizar la solución, aforar a 500 ml con agua destilada.

Solución de lavado

30 ml de NaCl 5 M

50 ml de Tris-HCl 1 M pH 8

0.5 ml de Tween 20

*Mezclar las soluciones, aforar a un litro con agua destilada.

Solución de reacción

25 ml de Tris-HCl 1 M pH 8

50 ml de NaCl 5 M

1 ml de Tween 20

100 mg de gelatina

*Disolver los reactivos lentamente y aforar a 500 ml con agua destilada.

