



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LAS TOXINAS Bs1 Y Bs2 PROVENIENTES DE LA  
TARÁNTULA *Brachypelma smithi*, CON POTENCIAL ACTIVIDAD INSECTICIDA”**

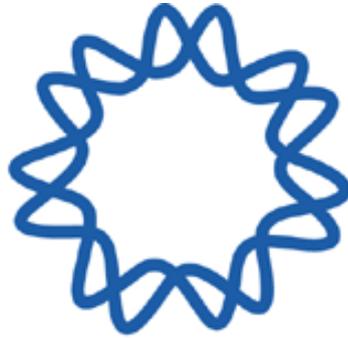
**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
B I Ó L O G O  
P R E S E N T A:**

**GALILEA JAIMES PESCADOR**

DIRECTORA DE LA TESIS:

**DRA. HERLINDA CATALINA CLEMENT CARRETERO**

CUERNAVACA, MORELOS FEBRERO, 2022



La presente Tesis fue realizada en el grupo del Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete, bajo la dirección de la Dra. Herlinda Catalina Clement Carretero pertenecientes al departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBt-UNAM) Campus Cuernavaca, Morelos.

Se agradece el apoyo de la Dirección General de Asuntos del personal académico PAPIIT - IT200321, y al CONACyT-FORDECYT - 303045.

## **COMITÉ DE SINODALES**

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte  
M. en B. Luis Enrique Cruz Trujillo  
Dra. Herlinda Catalina Clement Carretero  
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís  
Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete

Dedico esta tesis a mi familia que me han servido de inspiración para saber lo que quiero en mi vida.

A mi madre, por todo el amor y dedicación que nos has dado a tus hijos y que a pesar de las dificultades has sabido salir adelante y no sueltas nuestras manos. Hoy gracias a ti, he podido llegar hasta donde estoy.

A mi hermano, que a pesar de los malos ratos siempre sabe sacarme una sonrisa y me apoya incondicionalmente.

A mi padre, por su amor incondicional y por la vida.

Y principalmente a mí, por todo mi esfuerzo, dedicación y sobre todo no dejarme vencer por mi mente. Sigue así y grandes cosas vendrán. Nunca olvides que lo haces por ti y por todxs aquellxs que están, estuvieron y estarán.

*El límite es el cielo :)*

## **Agradecimientos**

Al Dr. Gerardo Corzo Burguete por la confianza y brindarme la oportunidad de pertenecer a su magnífico grupo de trabajo. Personalmente y con mucho respeto, me ha inspirado para seguir aprendiendo y avanzar.

A la Dra. Herlinda Clement Carretero por aceptarme como tu estudiante y persona, por toda la enseñanza que has dejado en mí y por siempre apoyarme para seguir avanzando y creciendo tanto académicamente como personalmente.

A la Dra. Ligia Luz Corrales García, por sus muchas enseñanzas académicas y técnicas.

A Ricardo Mondragón Cortes y Manuela Ávila por su ayuda técnica y auxiliar.

A mis compañeros de laboratorio del Dr. Gerardo Corzo a: Dra. Herlinda Clement, Dr. Iván Arenas, Dra. Ligia Luz Corrales, Dr. Marcos Salazar, Biol. Miguel Mejía, Biol. Samuel Cardoso, M. en C. Astrid Tuxpan, Marco, Odalis y Erika por su apoyo, consejos, cariño y vivencias juntos.

A la familia Garay Izurieta que, con mucho respeto, agradezco la confianza y el apoyo que le han brindado a mi familia.

A Patricia Ranfla, mi psicóloga, que sin su guía profesional todo esto no hubiera sido posible, gracias por todo tu apoyo y hacerme ver que la vida, a pesar de sus altibajos necesita ser vivida.

## INDICE GENERAL

<b>INDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>INDICE DE TABLAS .....</b>	<b>IX</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
<b>2.MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>3</b>
2.1 TARÁNTULAS .....	3
2.1.1 Generalidades de las tarántulas .....	3
2.1.2 Generalidades del género <i>Brachypelma</i> .....	3
2.1.3 <i>Brachypelma smithi</i> .....	5
2.2 LOS VENENOS.....	6
2.2.1 Descripción del veneno .....	6
2.2.2 Presencia de veneno en los cinco reinos .....	6
2.2.3 El veneno en el mundo de las arañas .....	6
2.2.4 El veneno de las tarántulas.....	7
2.2.5 Venenos insecticidas .....	7
2.3 CANALES IÓNICOS .....	8
2.3.1 Descripción de los canales iónicos.....	8
2.3.2 Canales iónicos de sodio dependientes de voltaje.....	8
2.3.3 Interacciones de toxinas con los Nav.....	9
2.3.4 Canal iónico de sodio dependiente de voltaje de insectos y gen para/tip-E .....	10
<b>3.ANTECEDENTES .....</b>	<b>11</b>
<b>4.JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>14</b>
<b>5.HIPÓTESIS.....</b>	<b>14</b>
<b>6.OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
6.1 OBJETIVO GENERAL .....	14
6.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	14
<b>7.DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>15</b>
<b>8.METODOLOGÍA.....</b>	<b>15</b>
8.1 SISTEMAS DE EXPRESIÓN .....	15
8.1.1 Vectores de expresión .....	15
8.1.2 Plásmido pQE30.....	16
8.1.3 <i>Escherichia coli</i> .....	16
8.2 TRANSFORMACIÓN DE CEPA SHUFFLE DE <i>E. COLI</i> .....	17
8.3 EXPRESIÓN DE PÉPTIDOS INSECTICIDAS.....	17
8.4 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS PÉPTIDOS INSECTICIDAS Bs1 Y Bs2 POR ELECTROFORESIS.....	18
8.5 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES .....	18
8.6 ANÁLISIS DE FRACCIONES POR ELECTROFORESIS .....	19
8.7 WESTERN BLOT .....	19
8.8 CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO (HPLC).....	20
8.8.1 RP-HPLC.....	20
8.9 PLEGAMIENTO <i>IN VITRO</i> .....	22
8.9.1 DTT.....	22

8.9.2 Glutación GSH/GSSG.....	22
8.10 ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	23
8.10.1 Ensayos de toxicidad en grillos ( <i>Achaeta domesticus</i> ) con muestras sin plegar .....	23
8.11 DIGESTIÓN DEL PÉPTIDO BS1 CON EL FACTOR XA.....	23
8.11.1 Factor Xa.....	23
<b>9.RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
9.1 PÉPTIDO Bs1 .....	24
9.1.1 Transformación bacteriana .....	24
9.1.2 Expresión del péptido Bs1.....	25
9.1.3 Purificación del péptido Bs1 por cromatografía de afinidad a níquel, análisis electroforético y Western Blot.....	26
9.1.4 Perfil cromatográfico (HPLC-RP) de la expresión del péptido Bs1, análisis de masa molecular de cada fracción sin plegar y prueba de actividad biológica de fracciones sin plegar en grillos .....	28
9.1.5 Perfil cromatográfico del re-plegamiento del péptido Bs1 utilizando un par-redox y prueba de actividad biológica del péptido Bs1. ....	33
9.1.6 Perfil cromatográfico de la digestión del péptido Bs1 con factor Xa.....	34
9.1.7 Prueba de actividad biológica del péptido Bs1 después de digestión con factor Xa.....	37
9.2 PÉPTIDO Bs2 .....	38
9.2.1 Transformación bacteriana .....	38
9.2.2 Expresión del péptido Bs2.....	38
9.2.3 Purificación del péptido Bs2 por cromatografía de afinidad a níquel, análisis electroforético y Western Blot.....	39
9.2.4 Perfil cromatográfico (HPLC-RP) de la expresión del péptido Bs2.....	41
9.2.5 Perfil cromatográfico (HPLC-RP) del plegamiento del pool de expresión Bs2 y prueba de actividad biológica del péptido Bs2 después de plegamiento .....	41
<b>10.DISCUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
<b>11.CONCLUSIÓN .....</b>	<b>48</b>
11.1 CONCLUSIONES BS1 .....	48
11.2 CONCLUSIONES BS2 .....	48
<b>12.PERSPECTIVAS .....</b>	<b>48</b>
<b>13.BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>52</b>
ANEXO 1: MEDIOS DE CULTIVO .....	52
ANEXO 2: SOLUCIONES .....	53
ANEXO 3: AMORTIGUADORES.....	54

## INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. ....	4
Fig. 2. ....	5
Fig. 3. ....	5
Fig. 4. ....	5
Fig. 5. ....	9
Fig. 6. ....	10
Fig. 7. ....	16
Fig. 8. ....	24
Fig. 9. ....	24
Fig. 10. ....	25
Fig. 11. ....	26
Fig. 12. ....	27
Fig. 13. ....	27
Fig. 14. ....	28
Fig. 15. ....	29
Fig. 16. ....	29
Fig. 17. ....	30
Fig. 18. ....	31
Fig. 19. ....	32
Fig. 20. ....	33
Fig. 21. ....	34
Fig. 22. ....	35
Fig. 23. ....	35
Fig. 24. ....	36
Fig. 25. ....	36
Fig. 26. ....	37
Fig. 27. ....	38
Fig. 28. ....	38
Fig. 29. ....	39
Fig. 30. ....	40
Fig. 31. ....	40
Fig. 32. ....	41
Fig. 33. ....	41
Fig. 34. ....	42
Fig. 35. ....	42
Fig. 36. ....	43
Fig. 37. ....	43
Fig. 38. ....	44

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	7
Tabla 3.....	21
Tabla 4.....	31
Tabla 5.....	32
Tabla 6.....	33
Tabla 7.....	44
Tabla 8.....	45

## Resumen

Las arañas son artrópodos que pertenecen a la clase Arachnida. Su veneno es una mezcla compleja de componentes con diferentes actividades biológicas entre los que se encuentran proteínas con actividad enzimática, péptidos, poliaminas, sales y ácidos entre otros. El veneno de las arañas está diseñado para causar daño a sus presas como parálisis, digestión y muerte, a través de la modulación de canales iónicos, receptores y enzimas. Las tarántulas, familia Theraphosidae, por su gran tamaño son temidas por la gente. Sin embargo, estas no representan graves problemas al ser humano debido a que su veneno es en general poco tóxico a mamíferos. Aun así, el veneno de las tarántulas, y de otras familias de arañas, se ha estudiado debido a que poseen diversas propiedades biológicas, ya sea como analgésicos, antibióticos o insecticidas. Las tarántulas presentan un sistema de captura de presas y alimentación el cual se basa principalmente en insectos. La glándula de veneno de la tarántula *Brachypelma smithi* contiene los péptidos Bs1 y Bs2, ambos con estructura primaria idéntica en el N-terminal, pero diferente en el C-terminal. El péptido Bs1 inhibe el canal iónico de sodio dependiente de voltaje Para/tipE, y se expresa en el veneno de esta araña. El péptido Bs2 fue encontrado en el transcriptoma de la glándula de veneno, pero no fue detectado en el veneno propio. Con en el conocimiento previo de estos péptidos, en el presente trabajo se pretende sintetizar mediante herramientas de biología molecular ambos péptidos, con el objetivo principal de conocer si la estructura primaria de Bs1 y Bs2 difieren en la actividad en grillos (*Achaeta domesticus*).

**Palabras clave:** insecticida, canal iónico, expresión heteróloga, Bs1, Bs2, purificación, plegamiento, pruebas biológicas.

## 1. Introducción

Se sabe que la agricultura y la expansión de esta ejercen un efecto importante en el clima, los ciclos del agua, el carbono, el nitrógeno, las emisiones de gases de efecto invernadero y la biodiversidad (18). En México, la agricultura es catalogada como una de las principales actividades primarias (40) con una participación del 3.1% en el PIB (41). De la misma manera, la agricultura propicia de recursos y de un hogar a diversos tipos de animales, entre ellos los artrópodos. Estos son organismos que comprenden distintos grupos, algunos de ellos por ejemplo los insectos, son muy importantes para la agricultura ya que enriquecen los suelos o polinizan algunas plantas para la obtención de frutos u otros productos de interés (19). Sin embargo, muchos de estos animales presentan problemas a la agricultura convirtiéndose en plagas. Las plagas son cualquier especie, raza o biotipo vegetal o animal o agente patógeno dañino para las plantas o productos vegetales (28) y se estima que estos contribuyen a la destrucción de aproximadamente el 14 por ciento de la producción global de cultivos anuales (11). En México se ha reportado una pérdida del 78% por causas climáticas, enfermedades, así como de las plagas (29). Algunas de las plagas que afectan más a México son el pulgón (*Aphididae*), la mosquita blanca (*Aleyrodidae*), picudo (*Curculionidae*), araña roja (*Tetranychus urticae*), gallina ciega (*Phyllophaga* sp.), mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) y minador de hojas (*Liriomyza* sp.) (31).

Para el control de las plagas se usan insecticidas sintéticos o químicos que contribuyen al daño ambiental y que pueden tener consecuencias en la salud (11). Estos insecticidas químicos no solo matan a la plaga, sino que también matan o pueden matar a organismos que no son su objetivo, como otros artrópodos, aves e incluso pequeños mamíferos (20). Otro tipo de problema que se presentan con el uso de insecticidas químicos es la resistencia que crean las plagas hacia estos químicos. Esta capacidad para desarrollar resistencia hacia ciertas toxinas les da a estos animales más oportunidades para poder sobrevivir en su entorno (30).

Actualmente se están investigando alternativas más eficientes y seguras a un insecticida químico. Como los bioinsecticidas, que son agentes naturales o productos metabólicos provenientes de microorganismos y agentes patógenos de insectos como virus, bacterias, nematodos y protozoos, así como insecticidas de origen vegetal y animal (32). Una de las fuentes para nuevos bioinsecticidas son los componentes de venenos de arañas, debido a que las arañas son depredadores naturales de insectos, su veneno va dirigido a receptores y canales iónicos del sistema nervioso de los insectos lo cual puede generar una parálisis e incluso la muerte del animal (33).

## 2. Marco teórico

### 2.1 Tarántulas

#### 2.1.1 Generalidades de las tarántulas

Como todas las arañas, las tarántulas son animales de ocho patas, además de las patas tienen un par de apéndices cortos parecidos a patas llamados pedipalpos, uno a cada lado de los quelíceros. Su cuerpo está dividido en dos partes: cefalotórax y abdomen y que cuentan con un exoesqueleto y quelíceros por donde pueden inyectar su veneno. Sin embargo, las tarántulas cuentan con características que solo ellas tienen como lo son: el gran tamaño, esta es la característica más destacada de este grupo ya que sus cuerpos son más grandes de las arañas comunes, los pelos urticantes alrededor de todo su cuerpo y que son capaces de lanzar si se sienten amenazadas, los pulmones en forma de libro son característicos en este grupo de arañas (1, 2). Las tarántulas pertenecen a la familia *Theraphosidae* y a la fecha existen 985 especies (en 147 géneros) que están ampliamente distribuidas alrededor del mundo (6).

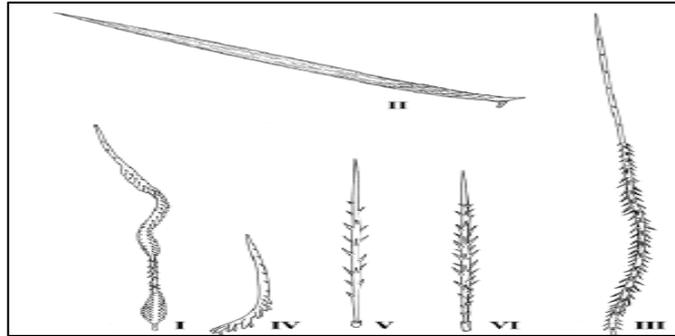
#### 2.1.2 Generalidades del género *Brachypelma*

El género *Brachypelma* presenta especies con una longitud corporal de entre 35-70 mm. Este género puede ser encontrado desde México hasta Costa Rica. Las especies de *Brachypelma* que habitan la zona del Pacífico de México tienen las patas marcadas con bandas de color rojo, a estas tarántulas se les conoce como *Brachypelma* de patas rojas. Las especies de *Brachypelma* que habitan en la zona del Atlántico de México y a través de Centroamérica tienen una coloración corporal oscura y con pelos rojos en el abdomen, a estas tarántulas se les conoce como *Brachypelma* de cadera o trasero rojo (2). Aunque existen especies como *Brachypelma fossorium* que no pertenecen a ninguno de estos dos grupos mencionados ya no cuentan con las características morfológicas necesarias para pertenecer y los análisis con el marcador COI se demostró que no pertenece al género *Brachypelma* o al nuevo género *Tlitocatl* y se propone reubicar a dicha especie en el género *Stichoplastoris* (**Figura1**)



Fig. 1. Distribución del género *Brachypelma* a lo largo de la República Mexicana basadas en especímenes de museo. Dicha distribución se indica como círculos: especies de patas rojas; cuadrados: especies de abdomen rojo; diamantes: *Brachypelma fossorium*, que no pertenece a ninguno de los dos grupos mencionados. Figura tomada y modificada de (35).

Es difícil poder diferenciar a las tarántulas en los primeros estadios de los géneros *Brachypelma* y *Aphonopelma*. Pero cuando las tarántulas del género *Brachypelma* pasan a la etapa adulta, las características morfológicas son más notables y se pueden distinguir porque: los machos son más robustos y tienen patas más gruesas y fuertes, también tienen ganchos tibiales en las patas y vistos desde arriba tanto hembras como machos se observan más redondos. Los machos y hembras de este género tienen pelos urticantes estridulatorios (parecidos a plumas) (2). Además de las características previamente descritas, un rasgo crucial para identificar y diferenciar al género *Brachypelma* del género *Aphonopelma* es que el cefalotórax tiene una forma circular vista desde arriba y su cabeza no se ve levantada cuando es mostrada desde un costado (**Figura 2**) (2).



**Fig. 2.** Pelos urticantes de las tarántulas. Las tarántulas pueden tener varios tipos de pelos urticantes. El género *Brachypelma* solo presentan las formas I y II.

### 2.1.3 *Brachypelma smithi*

La especie *Brachypelma smithi* es comúnmente conocida como tarántula mexicana de rodillas rojas, es endémica de México y habita la parte costera del estado de Guerrero, particularmente desde la cuenca del Río Balsas hasta Acapulco. Tanto hembras como machos presentan unos patrones de coloración en las patas en forma de anillos desde naranja pálido a rojos-naranjas, es por esto a lo que se debe su nombre común. Las hembras de esta especie son más grandes que los machos con una longitud promedio de 70 mm y los machos con 60 mm (**Figuras 3 y 4**) (2, 35).



**Fig. 3.** Ejemplar macho de *Brachypelma smithi*.



**Fig. 4.** Ejemplar hembra de *Brachypelma smithi*.

## **2.2 Los venenos**

### **2.2.1 Descripción del veneno**

Los venenos son una sustancia (mezcla de moléculas tóxicas) que al ser introducida dentro de un organismo vivo puede ocasionar alteraciones funcionales e incluso la muerte, esto se da dependiendo del grado de toxicidad que tenga el veneno (34).

### **2.2.2 Presencia de veneno en los cinco reinos**

Los venenos han evolucionado como armas biológicas ya que los organismos que los poseen pueden utilizarlos como defensa en contra de depredadores o para la caza y alimentación. La presencia del veneno está en los cinco reinos y dependiendo del organismo sus actividades biológicas pueden variar. El veneno con el que cuentan estos organismos puede presentar actividad neurotóxica, hemolítica, mitotóxica, citotóxica, actividad de inhibición de canales iónicos y estimulación de reacciones urticantes o de inflamación (3).

### **2.2.3 El veneno en el mundo de las arañas**

El veneno de las arañas es una mezcla compleja de componentes bioactivos de naturaleza proteica (enzimas y péptidos), poliaminas, sales y ácidos (4) que sirve principalmente para la captura de sus presas. El tamaño de las arañas es generalmente pequeño y su veneno en la mayoría de las ocasiones tiene efectos nulos hacia el ser humano debido a que este es utilizado para cuestiones de captura de presas y alimentación (3). Solo algunas especies de arañas son consideradas de alta importancia médica y en la salud pública como lo son los géneros *Latrodectus* y *Loxosceles* (45). En México generalmente se consideran de importancia médica estos dos géneros ya que causan el latrodectismo y el loxoscelismo, respectivamente. El latrodectismo es causado por la mordedura de la hembra del género *Latrodectus* al morder se inyecta un veneno que está compuesto por diversas fracciones (46), este veneno está compuesto de moléculas de alto peso molecular, su fracción principal es la  $\alpha$ -latrotoxina (130 kDa) que se une a receptores presinápticos para evocar la liberación de neurotransmisores ocasionando problemas neuromusculares (47). El loxoscelismo es caracterizado por la mordida de una araña del género *Loxosceles* que puede generar dolor local, dermonecrosis, etc. (48). No obstante, se ha descubierto en diversos estudios que veneno de las arañas puede tener diferentes actividades biológicas como analgésicos, insecticidas, importancia médica hacia los humanos, etc. (5, 46)

### 2.2.4 El veneno de las tarántulas

Dado que el tamaño de las tarántulas es generalmente más grande, comparado con el de otras familias de arañas, parece que su sistema de captura de presas se basa en las ventajas que brindan sus dimensiones corporales más que a la toxicidad de sus componentes del veneno. Los venenos de las tarántulas contienen péptidos insecticidas dirigidos hacia receptores de canales iónicos que pueden bloquearlos, modularlos, inhibirlos o ser intermediarios en la conducción de iones (7). Además, estudios han demostrado que muchas de las actividades biológicas de estos venenos pueden presentar homologías, ya sea en algunas especies de tarántulas del mismo género o de especies diferentes (9).

### 2.2.5 Venenos insecticidas

El veneno de las arañas y escorpiones han evolucionado alrededor de millones de años en una relación presa-depredador que tienen con los insectos. Como estos animales se alimentan mayoritariamente de insectos, su veneno debe ser altamente efectivo para poder paralizarlos o matarlos, por lo que estos venenos han evolucionado para volverse más específicos hacia canales y receptores de iones de los insectos (10, 3, 11, 12). A continuación, se muestran las **tablas 1 y 2**, en donde se describe la actividad de algunos péptidos insecticidas pertenecientes a arañas y escorpiones.

**Tabla 1. Especies de arañas con actividad insecticida**

N.S.	Nombre de la especie	Nombre de la toxina	Efecto biológico	Referencia
1	<i>Oxyopes takobius</i>	Spiderina-1a u otTX1a	Insecticida	Nadezhdin et al., 2017
2	<i>Agelenopsis aperta</i>	Omega-Aga-IVA	Inhibe canal de Ca <sup>++</sup>	Adams, 2004
3	<i>Hadronyche versuta</i>	Kappa-hezatoxin-Hv1c o Kappa-HXTX-Hv1c	Actúa en canales iónicos Na <sub>v</sub> y Ca <sub>v</sub>	Maggio and King, 2002
4	<i>Eucratoscelus constrictus</i>	κ-TRTX-Ec2a	Bloquea canales BK <sub>Ca</sub>	Windley et al., 2012
5	<i>Apomastus schlingeri</i>	Aps III	Bloquea Na <sub>v</sub>	Bende et al., 2013

**Tabla 2. Especies de escorpiones con actividad insecticida**

N.S.	Nombre de la especie	Nombre de la toxina	Efecto biológico	Referencia
1	<i>Leiurus quinquestria hebraeus</i>	LqhalphalT	Inactiva canal de Na <sup>+</sup>	Gordon et al., 1996

2	<i>Leiurus quinquestria hebraeus</i>	Lqh II	Inactiva canal de Na <sup>+</sup>	Sautière et al., 1998
3	<i>Buthotus judaicus</i>	Bj-xtrIT	Actúa en canal iónico de Na <sup>+</sup>	Oren et al., 1998
4	<i>Centruroides noxius</i>	Cn10	Actúa en canal iónico de Na <sup>+</sup>	Selisko et al., 1996
5	<i>Vaejovis mexicanus</i>	Péptido 24	Bloquea canal iónico de potasio Kv1.3	Gurrola, G. et al., 2012

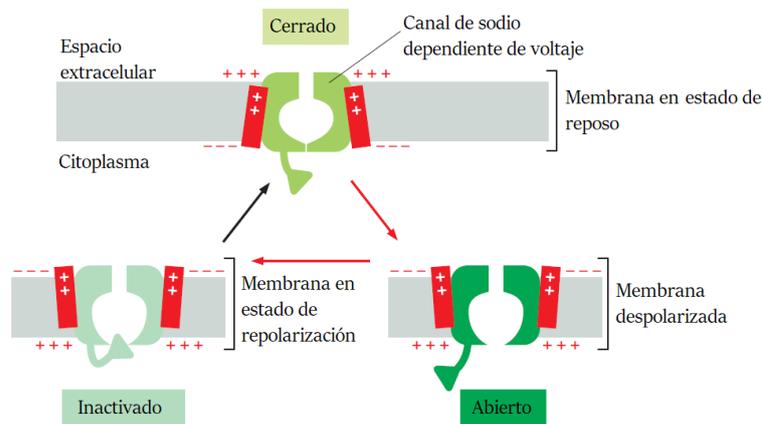
## 2.3 Canales iónicos

### 2.3.1 Descripción de los canales iónicos

Los canales iónicos son estructuras proteicas que forman parte de la membrana celular, cuentan con propiedades para conducir iones (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup>) a través de la membrana, como ser altamente selectivos ante los iones y un estado cerrado que solamente cambia a abierto en respuesta a señales. Esta apertura implica cambios conformacionales de la proteína y pueden estar regulados a estímulos mecánicos, por ligando (moléculas químicas específicas) o por voltaje (variaciones de voltaje que hay en la célula). Existen canales iónicos que no están regulados y se encuentran abiertos con la célula en reposo (36). Con frecuencia, los canales iónicos son el lugar donde actúan fármacos, toxinas o venenos (13).

### 2.3.2 Canales iónicos de sodio dependientes de voltaje

Todas las células cuentan con una concentración de iones de sodio dentro y fuera de su membrana (5-15:145 mM). La membrana celular es impermeable a estos iones ya que cuentan con una carga, lo cual les impide entrar; estructuras como los canales iónicos de sodio tienen la función de introducirlos a la membrana. Estos canales son altamente selectivos con los iones ya sea por la carga que tengan o por los enlaces que pueda formar para poder causar un cambio en la estructura del canal y así poder difundir en la membrana. Cuando la membrana se encuentra altamente polarizada (reposo), el canal tiene una conformación cerrada; cuando la membrana se despolariza el canal puede cambiar a una conformación abierta; cuando la membrana pasa al estado de repolarización el canal se inactiva (**Figura 5**) (36).



**Fig. 5.** Canal iónico de sodio dependiente de voltaje, demostración grafica de las conformaciones abierto, cerrado e inactivo. Figura tomada de (36).

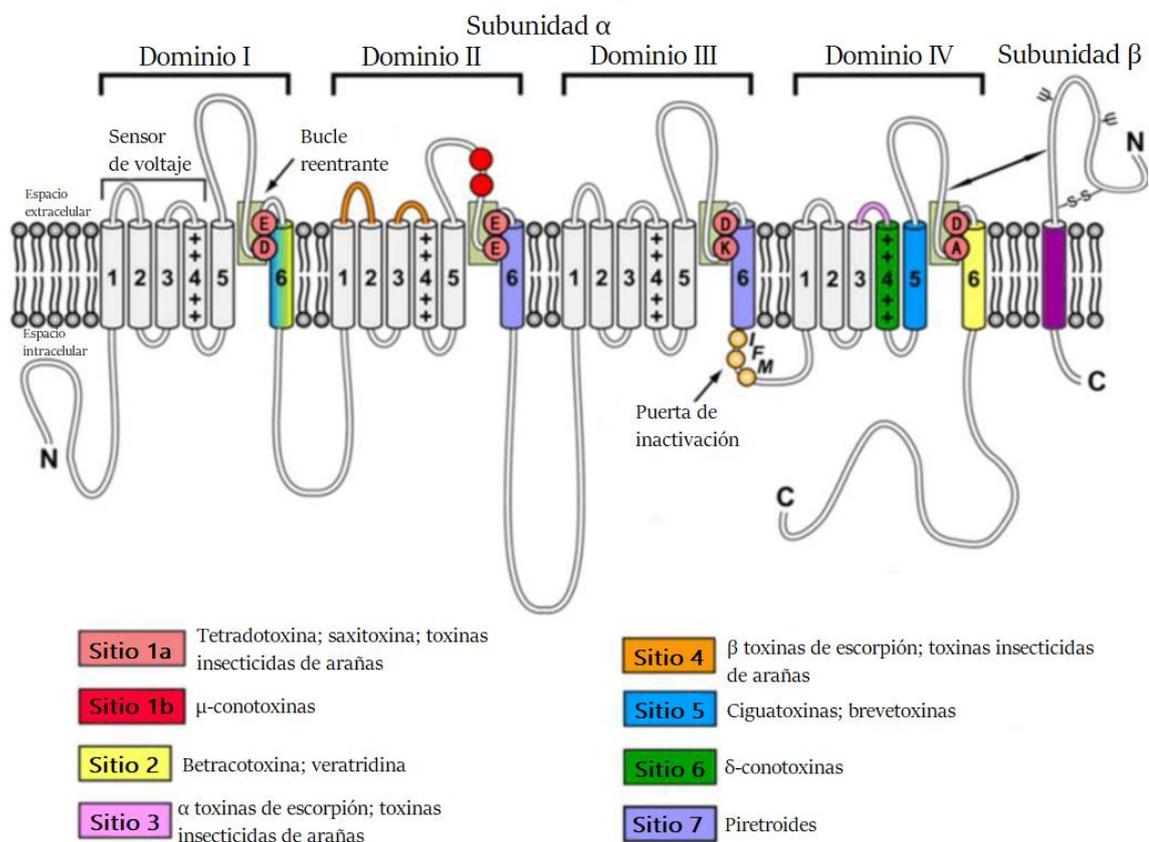
Los primeros canales iónicos dependientes de voltaje que fueron reportados son los de calamares (*Loligo sp.*) y en estudios posteriores se encontraron en organismos tan simples como las bacterias hasta organismos complejos como los humanos (14).

La familia de los canales iónicos dependientes de voltaje es esencial para la señalización y la comunicación de una célula con otra. Su estructura consiste en una subunidad alfa ( $\alpha$ ) que forma el poro para introducir a los iones sodio, compuesta de cuatro dominios: I, II, III, IV; y dos subunidades beta ( $\beta$ ). Tanto eucariotas como procariontes cuentan con  $\alpha$ -hélices en la parte transmembranal que se denominan como S1, S2, S3, S4, S5 y S6, estas se encuentran en los dominios del canal y tienen como función ser sensores que captan los cambios en el voltaje de la célula. Además, entre los segmentos S5 y S6 se encuentran bucles que van hacia el espacio extracelular. (14, 15). La hélice S4 es una pieza clave para la captación de las irregularidades del voltaje en la célula ya que cuenta con residuos de aminoácidos (de 4 a 8) con carga positiva (R o K) y estos son los responsables de captar los cambios en el voltaje (14).

### 2.3.3 Interacciones de toxinas con los $\text{Na}_v$

Las neurotoxinas pueden ser producidas por plantas, animales y algunos microorganismos (3, 16) y estas van dirigidas hacia los canales iónicos de sodio dependientes de voltaje por diversas estrategias. Se han definido siete sitios en los cuales una toxina puede unirse. Sitio 1: las toxinas se unen en la superficie del poro, bloqueando al canal; sitio 2: al unirse las toxinas hacen que la compuerta del poro se haga más selectiva y puede hacer cambiar la permeabilidad; sitio 3: las

toxinas inhiben la rápida inactivación del poro; sitio 4: al unirse las toxinas se facilita el estado de reposo del potencial de acción; sitio 5: al unirse las toxinas inhiben la activación del poro; sitio 6: es parecido al sitio 3 solo que el sitio de unión es diferente; sitio 7: inhiben la inactivación, cambian la activación dependiente de voltaje y ralentizan la cinética de activación y desactivación. Se sabe que los canales iónicos de sodio dependientes de voltaje son buenos para el desarrollo de nuevos bioinsecticidas ya que se ha demostrado que tienen una gran variedad de sitios de unión ( $Ca_v$  y  $K_v$  no tienen tantos) y también porque los canales de los insectos son diferentes a los de los mamíferos, esto resulta ser beneficioso ya que con esto no se correría peligro de la baja especificidad que tienen los insecticidas químicos. Solo tres de estos sitios (s1, s3 y s4) previamente mencionados interactúan con toxinas insecticidas provenientes de arañas (**Figura 6**) (11, 12, 14).



**Fig. 6.** Representación gráfica del canal iónico de sodio dependiente de voltaje y la interacción de diferentes toxinas con los sitios del canal. Figura tomada y modificada de (37).

### 2.3.4 Canal iónico de sodio dependiente de voltaje de insectos y gen *para/tip-E*

En las últimas décadas del siglo XX se hicieron diversos estudios sobre el canal iónico de sodio dependiente de voltaje de insectos en los que se descubrió que el locus *para* (parálisis) que se

encuentra en el cromosoma X de *Drosophila melanogaster*, es un gen estructural del Nav de insectos que tiene un 67% de aminoácidos homólogos al Nav que se encuentra en el cerebro de rata. Este mismo gen cuenta con una subunidad auxiliar reguladora que se codifica por el locus de mutación de la parálisis inducida por temperatura al cual nombraron *tip-E*. Se demostró también que cuando el gen *para* se coexpresa con *tip-E* esto incrementa la amplitud de corriente y el rango de inactivación sin afectar directamente la dependencia de voltaje y tiempo de los Nav (49,50,51). El canal iónico de sodio dependiente de voltaje de los insectos cuenta con similitudes en la homología de secuencia con el canal iónico de sodio dependiente de voltaje de los vertebrados, en la actividad eléctrica y base iónica y en la estructura ya que ambos se encuentran formados por las mismas sub unidades y dominios, por el contrario existe una distinción farmacológica en el Nav de insectos ya que el veneno de depredadores naturales de estos (como los arácnidos) actúan solamente en los Nav de insectos y no de vertebrados (aunque existen sus excepciones) (45, 52, 53).

### 3. Antecedentes

Corzo et al. (2008) reportó que un péptido del veneno de la araña *Brachypelma smithi* presenta características moleculares comunes entre las especies de arañas de diferentes géneros. El veneno crudo de esta tarántula se fraccionó, obteniendo un péptido de 41 residuos de aminoácidos y 3 puentes disulfuro, con un peso molecular de 4,917 Da. Este péptido reveló la presencia de actividad insecticida en grillos domésticos (*Achaeta sp.*), modificando el canal iónico de sodio dependiente de voltaje *para/tipE* con una LD<sub>50</sub> de 11 mg/g. Además, como dato adicional, se observó en este estudio que el péptido Bs1 presenta homología en la estructura primaria con los péptidos Magi1, Magi2 y HwTxVI provenientes de la araña hexatelida *Macrothele gigas* de Japón y de la araña terafosida *Ornithoctonus huwena*, respectivamente.

Este primer trabajo resulta crucial en la investigación actual para la elaboración de este proyecto de tesis ya que se está trabajando con el péptido Bs1 y Bs2 provenientes de la misma tarántula (*B. smithi*), Bs1 contenido en el venenos, y ambos Bs1 y Bs2 contenidos como transcritos en la glándula de veneno, obtenidos mediante una biblioteca de cDNA antes mencionada para su caracterización molecular.

En un segundo trabajo reportado por Gentz et al. (2009) se realizó la comparación de péptidos y su actividad insecticida en venenos de diferentes grupos de arañas terafosidas. En este estudio se seleccionaron cinco venenos de arañas, tres tienen origen australiano (*Coremiocnemis tropix*,

*Selenocosmia crassipes*, and *Selenotholus foelschei*) y dos son de origen mexicano (*Brachypelma albiceps* y *Brachypelma hamorii*). El objetivo de este estudio fue desarrollar un sistema de bioensayos que permitiera a los candidatos de venenos de arañas ser identificados más rápida y efectivamente como fuente de componentes insecticidas. Para lograr este objetivo utilizaron grillos domésticos (*Achaeta domesticus*) y tenebrios (*Tenebrio molitor*), la razón por la que utilizaron estos insectos para los ensayos es que tienen una relación taxonómica con los insectos plaga además de su importancia como insectos holometábolos y hemimetábolos, respectivamente. Se demostró que los tenebrios parecen ser un mejor sistema de ensayos para las observaciones primarias del potencial de veneno, especialmente cuando la cantidad del veneno llega a ser limitada. Los autores concluyen que las arañas de origen mexicano (en este estudio) resultan ser ligeramente más letales que las que tienen un origen australiano.

Este trabajo, ha sido importante para la elaboración de este proyecto de tesis ya que se muestra que las arañas terafosidas son letales contra este tipo de insectos, y es importante la relación taxonómica entre las arañas que se muestran, ya que *B. smithi* es una araña del orden Theraphosidae y del mismo género (*Brachypelma*) que las utilizadas en este trabajo, de igual manera como en este trabajo tienen una alta letalidad se esperaría que los péptidos Bs1 y Bs2 tuvieran una letalidad alta contra insectos.

En un tercer trabajo reportado por Windley et al. (2012) estudiaron péptidos de venenos de arañas como bioinsecticidas. Se menciona que los bioinsecticidas son una nueva generación de insecticidas que utilizan organismos (ya sean genéticamente modificados) o los productos del metabolismo de estos organismos. Los venenos de las arañas han demostrado ser una rica fuente de péptidos que pueden causar parálisis o la muerte a los insectos, estas respuestas pueden ser observadas ya que las toxinas insecticidas tienen como objetivo a los canales iónicos (sodio, potasio, calcio, calcio activado por potasio) pero solamente siendo estos activados por voltaje, la bicapa lipídica, las terminales nerviosas presinápticas y los receptores de NMDA.

Windley menciona la importancia fisiológica y las modificaciones hacia este canal que surgen cuando las toxinas provenientes del veneno de arañas interactúan con el canal. De igual manera, reportan que se han descrito toxinas de araña con actividad insecticida en cinco órdenes de insectos: Blattodea (cucarachas), Coleoptera (escarabajos), Diptera (moscas y mosquitos), Lepidoptera (mariposas y polillas) y Orthoptera (saltamontes, grillos y langostas), esta descripción de distintos órdenes es importante para la agricultura y el control de plagas. Además proponen que para que un péptido sea considerado insecticida, este debe contar con tres requisitos como: la potencia que tienen en el sitio blanco, la selectividad dirigida solamente a

insectos (de los cinco órdenes previamente descritos); la actividad que deben tener, debe ser dada por vía oral o por contacto, ya que las plagas se alimentan de los cultivos; y la estabilidad en condiciones de campo, puesto que los péptidos deberían de funcionar de la misma manera que cuando se expresaron en el laboratorio. Así mismo que perdure el bioinsecticida hasta que la plaga se vea controlada y que su degradación sea completa para no perjudicar a los campos y al medio ambiente como se ha venido haciendo con los insecticidas químicos.

Este trabajo, también describe brevemente información para la elaboración del proyecto de tesis, siendo que las toxinas insecticidas pueden actuar en los canales iónicos dependientes de voltaje, por lo que es de nuestro interés la descripción de los canales  $Na_v$  ya que los péptidos Bs1 y Bs2 se contempla actúen sobre este canal.

Clement et al. (2015) estudiaron la comparación entre la expresión recombinante y la síntesis química de un péptido insecticida de araña rico en cisteína, mencionan que la expresión heteróloga y la síntesis química del péptido puede afectar en la obtención del rendimiento y el buen plegamiento de las moléculas bioactivas. Evalúan esta problemática comparando los dos sistemas de expresión con la producción de un péptido llamado Ba1 proveniente del veneno de la araña *theraphosa Brachypelma albiceps*.

Para la evaluación de la expresión heteróloga del péptido Ba1 utilizan los plásmidos pQE40 y pET28a+, utilizaron las cepas provenientes de *E. coli* M15 y BL21, respectivamente, y para la síntesis química de Ba1 se utilizó la metodología Fmoc. El gen de Ba1 se clonó en el vector de expresión pQE40, resultando el péptido HisrDFHRBa1 y con el vector pET28a+ se obtuvo el péptido HisrBa1, ambos péptidos fueron inyectados en grillos domésticos (*A. domesticus*) a una concentración de 100  $\mu\text{g/L}$  y 900  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente. Por la síntesis química se obtuvo el péptido sBa1 y fue inyectado en grillos domésticos (*A. domesticus*) 12.1  $\mu\text{g/L}$ .

Este trabajo concluyó que la síntesis química es una técnica más económica ya que no es necesaria la utilización de muchos reactivos y lleva menos tiempo. Por otro lado, la expresión heteróloga es una técnica que implica utilizar más reactivos, tiempo y recursos económicos. Sin embargo, es la técnica actualmente más utilizada y mejor descrita cuando se trata de sintetizar péptidos ricos en cisteína mayores a 40 aminoácidos.

Este trabajo resulta importante para la elaboración de este proyecto de tesis, porque gracias a la comparación de las técnicas podemos elegir alguna que pueda ayudarnos a generar buenos resultados.

#### **4. Justificación**

Las plagas son un gran problema para los cultivos agrícolas de México, en 2014 se reportó una pérdida del 78% causada por plagas, para el control de las plagas se utilizan insecticidas químicos, sin embargo, estos químicos propician el daño ambiental y a la salud. En los últimos años se han propuesto alternativas para reemplazar el uso de estos químicos por agentes más eficientes y seguros como los bioinsecticidas.

En este proyecto se propone el uso de componentes de veneno de la tarántula *Brachypelma smithi* expresados heterológamente como bioinsecticida, puesto que las arañas son depredadores naturales de insectos y su veneno va dirigido específicamente hacia ellos. Dado que el uso continuo de tarántulas es inconveniente para esta investigación se propone la expresión heteróloga de los péptidos insecticidas Bs1 y Bs2 para su producción en masa y posterior evaluación.

#### **5. Hipótesis**

Los péptidos Bs1 y Bs2, expresados heterológamente, presentarán actividad insecticida en grillos.

#### **6. Objetivos**

##### **6.1 Objetivo general**

Caracterizar y expresar de forma heteróloga los péptidos recombinantes Bs1 y Bs2, y evaluar su actividad insecticida en grillos.

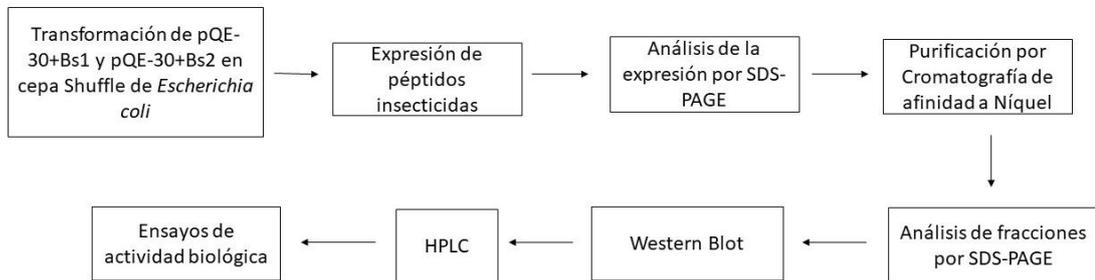
##### **6.2 Objetivos particulares**

Expresar de forma heteróloga en *E. coli* los péptidos Bs1 y Bs2.

Purificar y plegar adecuadamente los péptidos Bs1 y Bs2.

Demostrar la actividad insecticida después de la expresión de los péptidos Bs1 y Bs2 en grillos domésticos

## 7. Diseño experimental



## 8. Metodología

### 8.1 Sistemas de expresión

Los sistemas de expresión están conformados por los vectores de expresión y un organismo hospedero los cuales trabajan en conjunto para la obtención de productos recombinantes como proteínas.

#### 8.1.1 Vectores de expresión

Los vectores de expresión son pequeñas moléculas de ADN circular que se encuentra en el citosol bacteriano, cuando una bacteria se reproduce los plásmidos pueden ser transmitidos a las células hijas, el tamaño del inserto que puede clonar es de 15,000 pares de bases; los bacteriófagos son virus que infectan a bacterias, estos se replican de forma autónoma pero utilizando recursos de la bacteria infectada para lograr hacerlo, el tamaño del inserto que puede clonar es de 23,000 pares de bases; los cósmidos son vectores híbridos entre el ADN de los plásmidos y los extremos de la secuencia de los bacteriófagos, el tamaño del inserto que pueden clonar es de 45,000 pares de bases (21).

### 8.1.2 Plásmido pQE30

Como se ha mencionado con anterioridad los plásmidos son vectores de expresión. En este caso el plásmido pQE30 sirve para expresar proteínas recombinantes con 6 residuos de histidinas en su N-terminal para facilitar la purificación de la proteína (22, 27) (**Figura 7**).

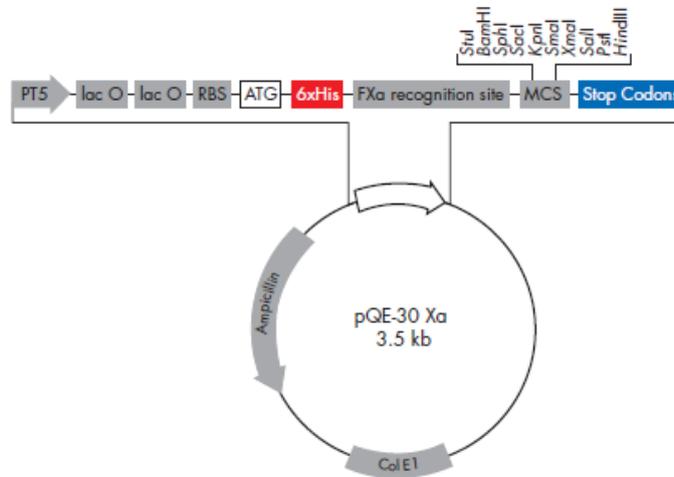


Fig. 7. Representación gráfica de del plásmido pQE-30.

### 8.1.3 Escherichia coli

*Escherichia coli* es una bacteria con forma de bacilo que habitualmente habita en los intestinos de animales de sangre caliente, como el humano (38) y aunque algunas cepas llegan a ser patógenas para el ser humano hay cepas que han sido modificadas para realizar trabajos en el campo de la biotecnología como la clonación. La caracterización genética y fisiológica de esta bacteria ha presentado ventajas a las investigaciones biotecnológicas ya que gracias a esto es relativamente barato trabajar con esta bacteria. Algunas ventajas que conlleva el uso de *E. coli* son una mayor velocidad específica de crecimiento (ya que es una bacteria mesófila), fácil manipulación genética, cuenta con una amplia gama de vectores de expresión estables, cuenta con una amplia gama de cepas disponibles. Algunas desventajas son que es potencialmente un patógeno, posee una membrana externa que dificulta la secreción de proteínas (Gram negativa) (26, 39).

## 8.2 Transformación de cepa Shuffle de *E. coli*

Los plásmidos de secuencia corroborada con cada uno de los genes de Bs1 y Bs2, se usaron para transformar la cepa quimiocompetente Shuffle de *E. coli*. Se transformó siguiendo el siguiente protocolo:

- Una alícuota de 100  $\mu$ L de células quimio competentes Shuffle y 100 ng de cada uno de los plásmidos.
- Incubar 30 minutos en hielo
- Dar un choque térmico a 42°C por 40 segundos.
- Incubar 5 minutos en hielo.
- Agregar 200  $\mu$ L de medio SOC.
- Incubar a 37° C por 1 hora.
- Se plaquearon 30  $\mu$ L de las células transformadas en medio solido agar-medio LB con Ampicilina.
- Incubar a 37°C toda la noche.

## 8.3 Expresión de péptidos insecticidas

Se eligió una colonia producto de la transformación de cada uno de los genes de trabajo y se inoculó en 25 mL de medio LB con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina, se incubó a 37°C toda la noche a 180 rpm. De este cultivo se tomaron los 25 mL y se adicionaron a 1 L de LB con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina, y se incubó por 3 horas a 37°C a 180 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.8 U (600 nm). En este punto se realizó la inducción de la expresión con isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) en las siguientes condiciones:

*E. coli* Shuffle/pQE30: Bs1: 0.5 mM IPTG a 16° C durante 24 h y 180 rpm

*E. coli* Shuffle/pQE30: Bs2: 0.5 mM IPTG a 16° C durante 24 h y 180 rpm

Después de la inducción de cada cultivo las células fueron cosechadas por centrifugación a 8,000 rpm durante 20 minutos a 4°C en un rotor JA-14 (Modelo J2-21 Centrifuga, Beckman).

El rompimiento celular se realizó por un proceso mecánico, con el equipo “One Shot Cell Disrupters” (Constant Systems<sup>LTD</sup>) que está diseñado para romper selectivamente la pared celular permitiendo que los componentes intracelulares sean liberados y colectados. La presión ejercida sobre las células fue de 30 kpsi. Las fracciones solubles e insolubles se separaron por

centrifugación a 12,000 rpm durante 20 min a 4°C en un rotor JA-20 (Modelo J2-21 Centrifuga, Beckman).

#### **8.4 Análisis de expresión de los péptidos insecticidas Bs1 y Bs2 por electroforesis**

Se hizo un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15% con el siguiente protocolo:

- Gel separador
  - Lower Buffer: 1.5 mL
  - Acrilamida: 3 mL
  - Agua ultrapura (mili-Q): 1.5 mL
  - Persulfato de amonio 10%: 20 µL
  - TEMED: 5 µL
- Gel concentrador
  - Upper Buffer: 0.63 mL
  - Acrilamida: 0.33 mL
  - Agua ultrapura (Milli-Q): 1.54 mL
  - Persulfato de amonio 10%: 12.5 µL
  - TEMED: 2.5 µL

Para analizar las muestras de las células Shuffle inducidas, sin inducir y las fracciones soluble y fracción insoluble (cuerpos de inclusión) obtenidas previamente, para observar en qué fracción se encuentran los péptidos insecticidas Bs1 y Bs2. La electroforesis se corrió con un voltaje constante de 100 V. Los geles se tiñeron con una solución de azul brillante de Coomassie G250 (BioRad) durante 2 h en agitación constante y a temperatura ambiente; posteriormente los geles se destiñeron con 10% ácido acético más 10% isopropanol durante 2 h a temperatura ambiente, y en agitación constante.

#### **8.5 Purificación de proteínas recombinantes**

La fracción insoluble (cuerpos de inclusión) obtenida con anterioridad se resuspendió en 5 mL de 6 M Cloruro de guanidinio (GdnHCl).

Para la purificación de las proteínas se utilizó una columna de 12 mL (Supelco) en donde se agregaron 4 mL de resina Ni-NTA. La técnica consta de uso de una columna vertical con una matriz porosa de agarosa con níquel que usa como compuesto quelante al ácido nitrilotriacético (NTA) que formara enlaces covalentes con los residuos de aminoácidos (6 His). Posteriormente

las proteínas son eluidas con un Buffer de pH bajo o por competencia con imidazol. La proteína expresada a partir de pQE30 cuenta con una etiqueta de 6xHis en su extremo N-terminal, lo cual hace a la resina Ni-NTA óptima para que la proteína se pegue en ella.

Se equilibró con 5 volúmenes de columna de 50 mM Tris-HCl pH 8 + 6 M GdnHCl, una vez equilibrada, los cuerpos de inclusión solubilizados se dejaron pasar por la columna y se recirculó dos veces para asegurar la unión de la proteína a la resina. La columna se sometió a tres lavados para remover el pegado inespecífico:

- El primer lavado se realizó con 10 mL de 50 mM Tris-HCl pH 8 + 6 M GdnCl, recuperando 5 fracciones de 1 mL cada una.
- El segundo lavado se realizó con 10 mL de 40 mM Imidazol en 50 mM Tris-HCl pH 8 + 6 M GdnCl, recuperando 5 fracciones de 1 mL cada una.
- El tercer lavado se realizó con 15 mL de 400 mM Imidazol en 50 mM Tris-HCl pH 8 + 6 M GdnCl, recuperando las 15 fracciones de 1 mL cada una.

### **8.6 Análisis de fracciones por electroforesis**

Las fracciones obtenidas fueron precipitadas por el método metanol-cloroformo para posteriormente ser resuspendidas y analizadas un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15% (siguiendo el protocolo previamente descrito). La electroforesis se corrió con un voltaje constante de 100 V. Los geles se tiñeron con una solución de azul brillante de Coomassie R250 (BioRad) durante 2 h en agitación constante y a temperatura ambiente; posteriormente los geles se destiñeron con 10% ácido acético más 10% isopropanol durante 2 h a temperatura ambiente, y en agitación constante.

### **8.7 Western blot**

La técnica consiste en separar proteínas de una muestra por su peso molecular por medio de electroforesis, para posteriormente ser transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana es incubada con suero o plasma que tiene anticuerpos que se unirán al antígeno presente en la membrana, los antígenos a su vez están unidos a la proteína de interés en el gel de poliacrilamida. El complejo antígeno-anticuerpo se hace visible con el uso posterior de un anticuerpo secundario y el sustrato que le corresponda. Las bandas que se observan en la membrana deben ser concordantes a los anticuerpos presentes en la muestra (21).

Inicialmente se corrió un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15% con la muestra a 100 V. Una vez finalizado, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa siguiendo el siguiente protocolo:

- Hidratar en Buffer de transferencia 1 membrana de nitrocelulosa, 6 papeles filtro, gel SDS-PAGE.
- En una cámara de transferencia (HEP-1 OWL) colocar 3 papeles filtro, la membrana de nitrocelulosa, el gel SDS-PAGE y 3 papeles filtro, comprimir un poco para la eliminación de burbujas.
- Conectar el equipo a corriente eléctrica y dejar transferir por 1h a 400 mA a corriente constante.
- Bloquear la membrana con 5% leche (semidescremada) + TBST 1x por 2 horas a temperatura ambiente y agitación constante.
- Lavar la membrana 3 veces con TBST 1x
- Agregar anticuerpo monoclonal anti-histidinas en una dilución 1:2000 por 1 hora a temperatura ambiente.
- Lavar la membrana 3 veces con TBST 1x
- Revelar la membrana con 1 mL de Buffer de revelado (Invitrogen) en agitación constante.
- Una vez reveladas las bandas, lavar con agua ultrapura (Mill-Q).

## **8.8 Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)**

La cromatografía líquida de alto rendimiento es una técnica que se utiliza para separar los componentes pertenecientes a proteínas. Como las cromatografías, cuenta con una fase estacionaria (columna) y una fase móvil. Cuando la muestra es inyectada, se hace pasar un gradiente de los solventes que eluyen a las proteínas, se dan interacciones químicas que de acuerdo con estas es como los contenidos de la muestra serán separados. Este tipo de interacciones pueden ser de intercambio iónico, de unión específica a grupos químicos, de tamaño o de interacciones hidrofóbicas. (22, 25).

### **8.8.1 RP-HPLC**

Igual que las técnicas cromatográficas se basa en la unión de un compuesto mezclado con la fase móvil a una fase estacionaria y por contrario a las otras técnicas este cuenta con una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar (generalmente agua y acetonitrilo o metanol) que funciona para separar analitos hidrofóbicos. Cuando los analitos entran en la columna, la fase móvil los transporta a través de esta y dependiendo de la afinidad que tengan los analitos con la fase estacionaria y la fase móvil es como se separarán, los analitos hidrofóbicos son los que serán retenidos con mayor fuerza por la fase estacionaria y los analitos hidrofílicos tendrán una fuerte afinidad con la fase móvil por lo que se eluirán con mayor facilidad.

Las interacciones hidrofóbicas, polares y iónicas son los tres mecanismos primarios que dictarán el comportamiento cromatográfico. Las interacciones hidrofóbicas son una interacción débil y transitoria entre la fase estacionaria no polar y los analitos, cuanto más hidrofóbico sea el analito, mayor será la retención de este en la fase estacionaria. Las interacciones polares son interacciones entre los grupos funcionales polares de los analitos con el ligando de la fase estacionaria, interactúan a través de puentes de hidrogeno y dipolo-dipolo. Las interacciones de intercambio iónico ocurren cuando hay un intercambio de iones y los analitos experimentan diferentes tasas de interacción.

Las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad se unieron y esta mezcla se purificó por HPLC-RP usando una columna analítica C18 (Vydac® #50491, 5 µm 300 Å 4.6 x 250 mm). En el proceso se usó solvente A (0.1% de ácido trifluoroacético-TFA- en agua) y como solvente B (0.1% TFA en acetonitrilo) en un gradiente de 20-50% de acetonitrilo en 60 minutos y a un flujo de 1 mL/min. Las fracciones fueron colectadas manualmente por monitoreo a una absorbancia de 230 y 280 nm. Las fracciones fueron secadas con Savant SpeedVac (Thermo Scientific).

Los fracciones colectados fueron repurificados por HPLC-RP usando una columna analítica C18 difenilo (Restek® cat. #9516575, 5 µm, 250\*4.6mm), utilizando solvente A (0.1% de ácido trifluoroacético-TFA- en agua) y como solvente B (0.1% TFA en acetonitrilo) en un gradiente de 0-60% de acetonitrilo en 60 minutos y a un flujo de 1 mL/min. Las fracciones fueron colectadas manualmente por monitoreo a una absorbancia de 230 y 280 nm. Las fracciones fueron secadas con Savant SpeedVac (Thermo Scientific).

**Tabla 3.** Comparación entre una columna analítica C18 común y una columna analítica C18 difenilo.

Características columnas C18		
	C18 Común	C18 Difenilo
Hidrofobicidad	baja	baja
Capacidad de aceptación de enlaces H	alta	alta
Aromaticidad	nula	alta
Selectividad catiónica pH 2.8	baja	baja
Selectividad catiónica pH 7.0	baja	alta

## **8.9 Plegamiento *in vitro***

Una proteína nativa es aquella que cuenta con propiedades que actúan en funciones biológicas específicas, cuando una proteína nativa pierde alguna de sus propiedades (estructura tridimensional alterada) se le llama que está desnaturizada. Para poder renaturalizar alguna de estas proteínas se pueden utilizar compuestos que interactuaran con sus residuos de aminoácidos, esto logra que la proteína se pliegue y recobre sus propiedades y por ende su actividad (43). Algunas moléculas que pueden ayudar con el proceso de renaturalización son: la urea, el mercaptoetanol, la enzima disulfuro isomerasa, chaperonas moleculares y el glutatión (GSH) (44).

### **8.9.1 DTT**

El reactivo DTT o Ditioneitol es un agente usado comúnmente para reducir los puentes disulfuro de las proteínas y así desnaturizarlas, también es usado para la preparación de muestras y desnaturizarlas antes de un análisis electroforético (54).

### **8.9.2 Glutatión GSH/GSSG**

El GSH es un tripéptido conformado por Glu-Gly-Cys, con bajo peso molecular y que cuenta con un grupo sulfhidrilo (-SH). Algunas de las funciones en las que participa dentro de la célula son: mantener balance redox de la célula, participar en procesos de detoxificación, controlar permeabilidad de la membrana y el transporte de aminoácidos. Cuando este compuesto es parte de las funciones del estado redox de la célula (GSH/GSSG), lo que hace es balancear especies oxidadas y reducidas dentro de la célula. De este balance dependen la activación de enzimas, síntesis de ADN y ARN, proliferación celular, plegamiento de proteínas, entre otras. Es por esto por lo que se usa el glutatión como reactivo para el plegamiento correcto de proteínas (44).

El plegamiento se llevó a cabo siguiendo este protocolo:

- Agregar en un tubo Eppendorf
  - 2M GndCl
  - 100 µg muestra a plegar
  - 10 µM GSH
  - 1 µM GSSG
- Agitar suavemente hasta observar una mezcla homogénea
- Dejar 24 h a a 4°C

## **8.10 Ensayos de actividad biológica**

### **8.10.1 Ensayos de toxicidad en grillos (*Achaeta domestica*) con muestras sin plegar**

Las fracciones obtenidas por HPLC-RP fueron resuspendidas en 30  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O y posteriormente cuantificadas en espectrofotómetro de masa NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) con A<sub>280</sub>.

Estas fracciones serán inyectadas en grillos de 0.1 g. Se les inyectara entre el quinto y sexto segmento (de abdomen a cabeza). La inyección se hará con una jeringa Hamilton (10  $\mu$ L).

## **8.11 Digestión del péptido Bs1 con el factor Xa**

### **8.11.1 Factor Xa**

El factor Xa (NEW ENGLAND BioLabs) es una enzima proteasa que tiene como función romper los enlaces peptídicos de las proteínas/péptidos. La construcción de las toxinas pQE-30:Bs1 y pQE-30:Bs2 presentan un sitio de reconocimiento (IEGR) por la proteasa del factor Xa, el corte se generará en la parte C-terminal del residuo de arginina. La digestión se hizo siguiendo este protocolo:

- Agregar 100  $\mu$ g de proteína
- Buffer factor Xa (ver anexo 1)
- 2  $\mu$ L de factor Xa proteasa (cuantas unidades son en 2  $\mu$ L)
- Volumen de reacción 100  $\mu$ L
- Incubar a 37°C por 2 horas
- Al terminar el tiempo de incubación, centrifugar 3 minutos a 14,000 rpm

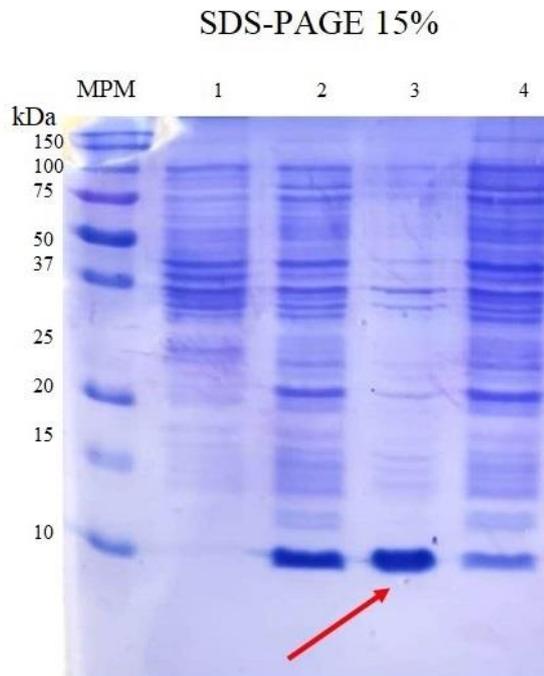
Las fracciones digeridas fueron purificadas utilizando HPLC-RP usando una columna C18 difenilo. En el proceso se usó solvente A (0.1% de ácido trifluoroacético-TFA- en agua) y como solvente B (0.1% TFA en acetonitrilo) en un gradiente de 0-60% de acetonitrilo en 60 minutos y a un flujo de 1 mL/min. Las fracciones fueron colectadas manualmente por monitoreo a una absorbancia de 230 y 280 nm. Las fracciones fueron secadas con Savant SpeedVac (Thermo Scientific).



### 9.1.2 Expresión del péptido Bs1

A partir de las células recién transformadas (*E. coli* Shuffle), se tomó una colonia y se inoculó en 50 mL de medio LB + ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron durante 16 horas a 37°C con agitación. Al final de esta incubación se tomaron 15 mL del cultivo y se adicionó a 1 L de LB + ampicilina (100 µg/mL) incubándolo a 37°C y 230 rpm durante 3 horas, hasta que el cultivo alcanzara una densidad óptica aproximada de 0.8 unidades y en este momento se adicionó el inductor IPTG en una concentración de 0.5 mM. El cultivo inducido se incubó a 16°C y 230 rpm durante 18 horas.

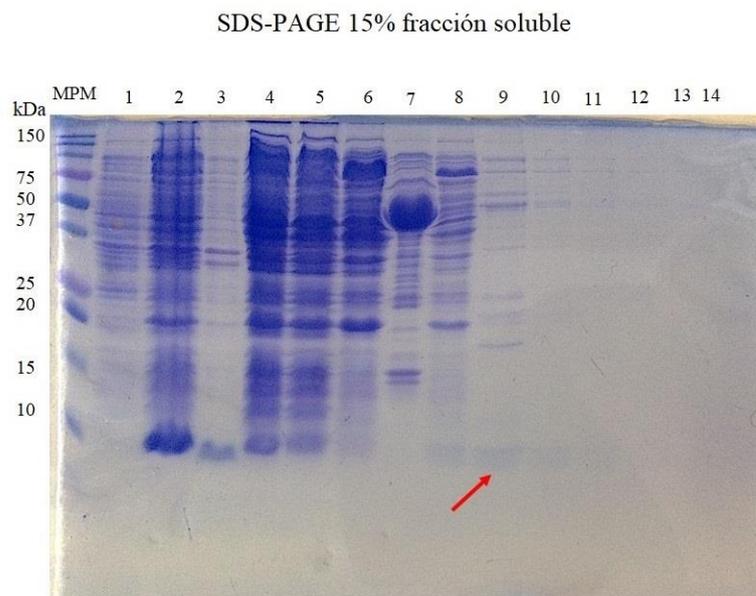
Para confirmar la expresión de las células se realizó un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15%. Los resultados muestran que en la expresión del péptido Bs1 se ve tanto en la fracción soluble como en la fracción insoluble, esto puede significar que el péptido Bs1 fue mal plegado por *E. coli* y es por esto por lo que se observan en los cuerpos de inclusión (42). (**figura 10**)



**Fig. 10.** Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15% de la expresión del péptido Bs1. MPM. Marcador de peso molecular (BIO RAD), kDa: kilo Daltones, carril 1: células sin inducir Bs1, carril 2: células inducidas Bs1, carril 3: cuerpos de inclusión Bs1, carril 4: fracción soluble Bs1.

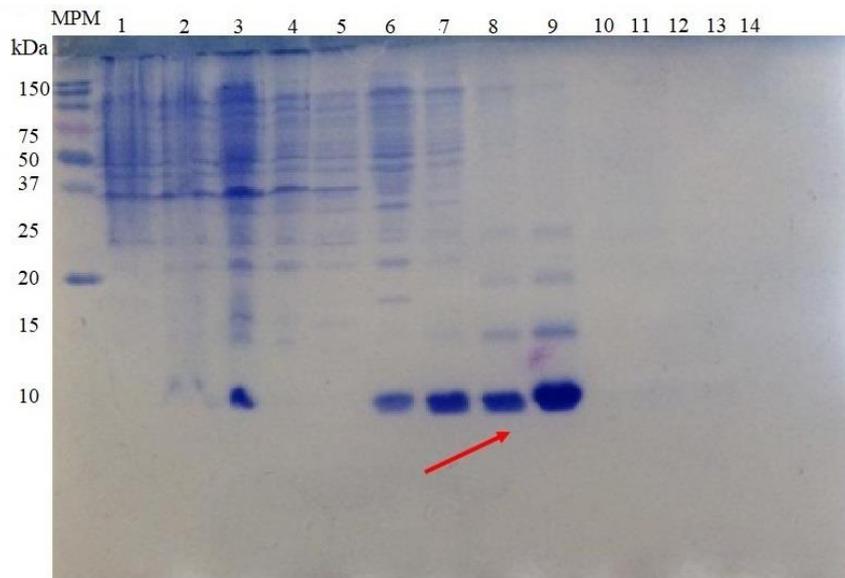
### 9.1.3 Purificación del péptido Bs1 por cromatografía de afinidad a níquel, análisis electroforético y Western Blot

La fracción soluble y los cuerpos de inclusión fueron purificados en una columna de afinidad a níquel utilizando una resina Ni-NTA (QUIAGEN) y se sometieron a dos lavados para eliminar el pegado inespecífico y a una elución, adicionando mayor concentración de imidazol (400 mM). Las fracciones fueron analizadas mediante un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15% en condiciones reductoras y desnaturalizantes para confirmar que en dichas fracciones el péptido Bs1 se encontraran. En la **figura 11** se muestra el gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15% de la fracción soluble en donde se observa que no se encuentra el péptido Bs1 dentro del peso molecular aparente de 10 kDa en las eluciones realizadas. En la **figura 12** se muestra el gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15% de los cuerpos de inclusión en donde se observa que el péptido Bs1 se encuentra en las fracciones eluidas, (carril 7 a 14) con un peso molecular aparente de 10 kDa. Para confirmar la presencia del péptido en los cuerpos de inclusión un Western Blot utilizando un anticuerpo anti-histidinas, el cual es mostrado en la **figura 13**, en donde se puede observar que los anticuerpos se unieron a las histidinas del péptido y se transfirieron las bandas del gel a la membrana en las posiciones de los cuerpos de inclusión y las eluciones.



**Fig. 11.** Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15% de la purificación por Ni-NTA de la fracción soluble Bs1. MPM: Marcador de peso molecular (BIO RAD), kDa: kilo Daltones, carril 1: células sin inducir Bs1, carril 2: células inducidas Bs1, carril 3: cuerpos de inclusión Bs1, carril 4: fracción soluble Bs1, carril 5: recirculante Bs1, carril 6: primer lavado, carril 7: segundo lavado, carril 8-14: eluciones.

### SDS PAGE 15% cuerpos de inclusión Bs1



**Fig. 12.** Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15% de la purificación por Ni-NTA los cuerpos de inclusión Bs1. MPM: marcador de peso molecular (BIO RAD), kDa: kilo Daltones, carril 1: células sin inducir Bs1, carril 2: células inducidas Bs1, carril 3: cuerpos de inclusión Bs1, carril 4: recirculante Bs1, carril 5: primer lavado, carril 6: segundo lavado, carril 7-14: eluciones.

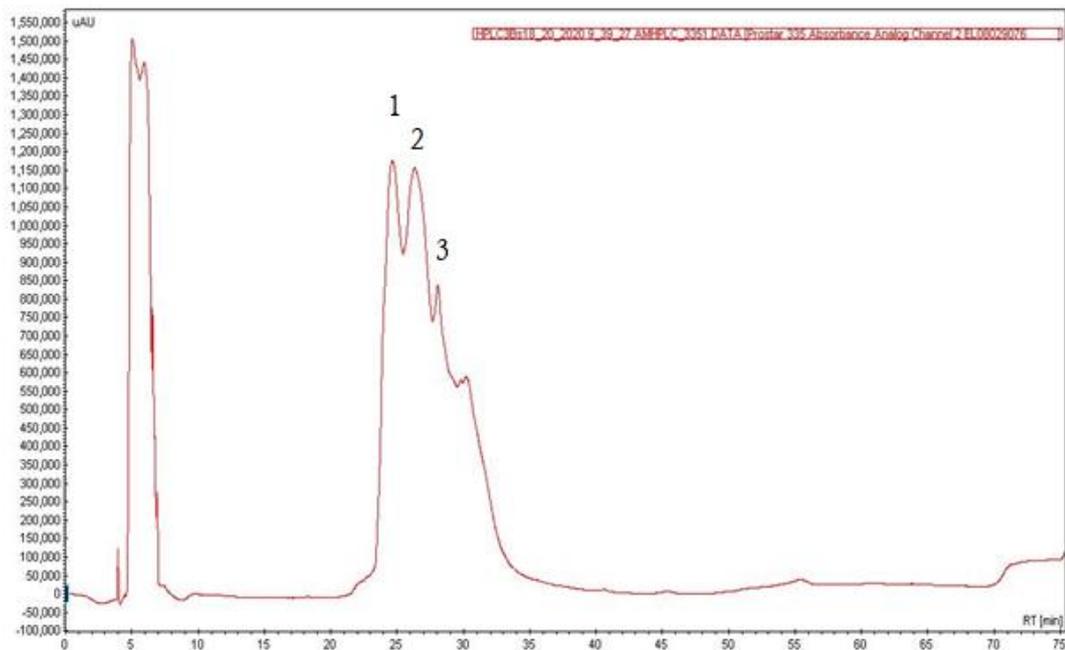
### Western Blot Bs1



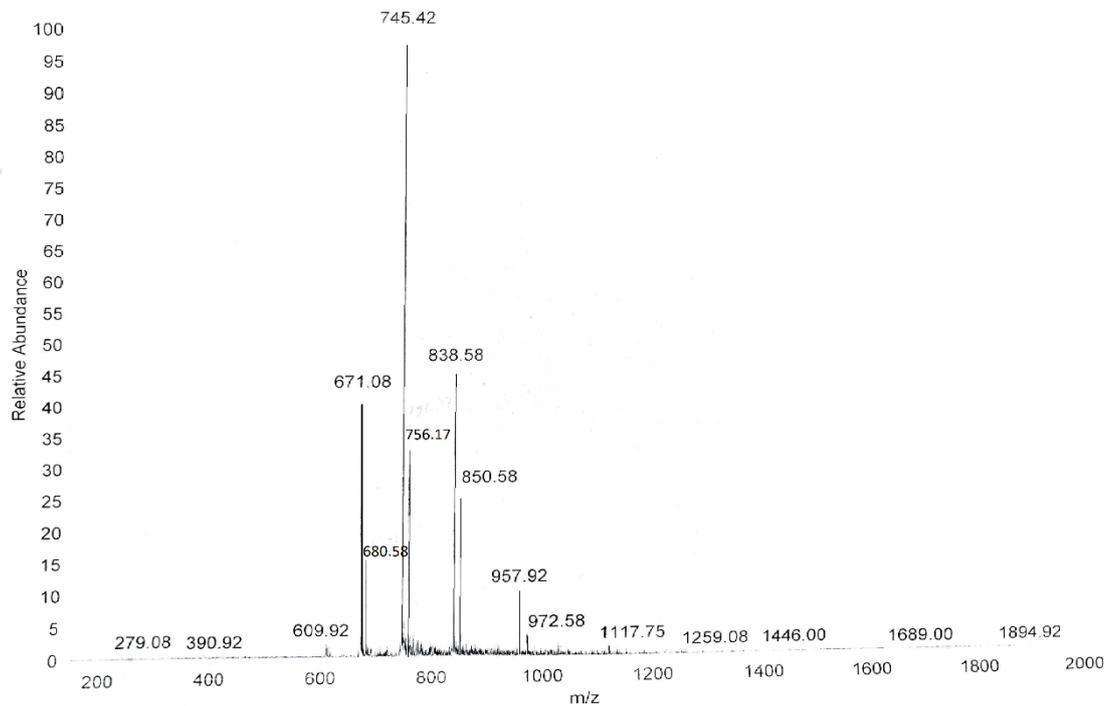
**Fig. 13.** Western Blot de la purificación por Ni-NTA de los cuerpos de inclusión Bs1. MPM: marcador de peso molecular (BIO RAD), kDa: kilo Daltones, carril 1: células sin inducir Bs1, carril 2: células inducidas Bs1, carril 3: cuerpos de inclusión Bs1, carril 4: fracción soluble Bs1, carril 5: recirculante Bs1, carril 6: primer lavado, carril 7: segundo lavado, carril 8-14: eluciones.

#### 9.1.4 Perfil cromatográfico (HPLC-RP) de la expresión del péptido Bs1, análisis de masa molecular de cada fracción sin plegar y prueba de actividad biológica de fracciones sin plegar en grillos

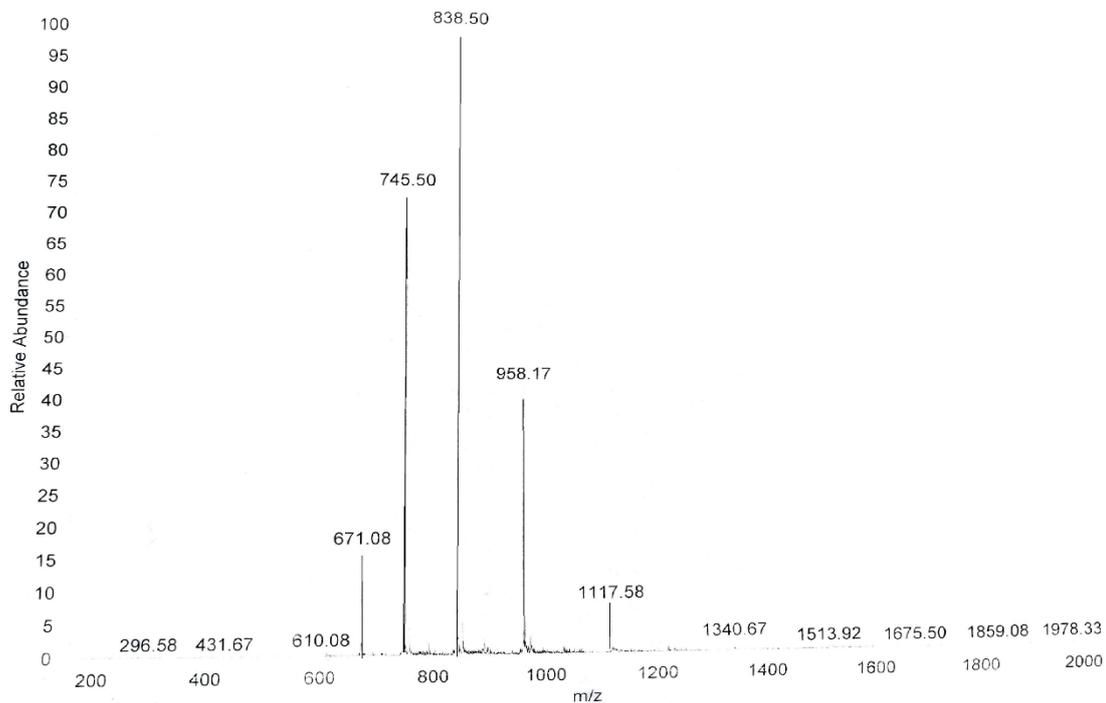
Las fracciones eluidas de la columna de afinidad a Ni, que mostraron el peso aparente de 10 kDa en el gel de SDS-PAGE 15% fueron unidas y purificadas por HPLC de fase reversa. En el perfil cromatográfico de la expresión del péptido Bs1 se obtuvieron tres fracciones (como se muestra en la **figura 14**) los cuales fueron colectados para obtener su masa molecular a través de espectrofotometría de masas (**figura 15, 16 y 17** de cada fracción respectivamente). La masa teórica oxidada es 6,700.5 Da. Para la fracción Bs1-1 se obtuvo una masa experimental de 6,700.4 Da y para la fracción Bs1-2 se obtuvo una masa experimental de 6,700.0 Da, lo cual corresponde con masa teórica esperada de 6,700.5 Da para cada uno de estos, sin embargo, para la fracción 3 la masa experimental fue de 6,731.5 Da lo cual no correspondió con la masa teórica por lo que se descartó su uso para este proyecto. Las fracciones Bs1-1 y Bs1-2 fueron secados en un concentrador Savant SpeedVac (Thermo Scientific) para su posterior uso.



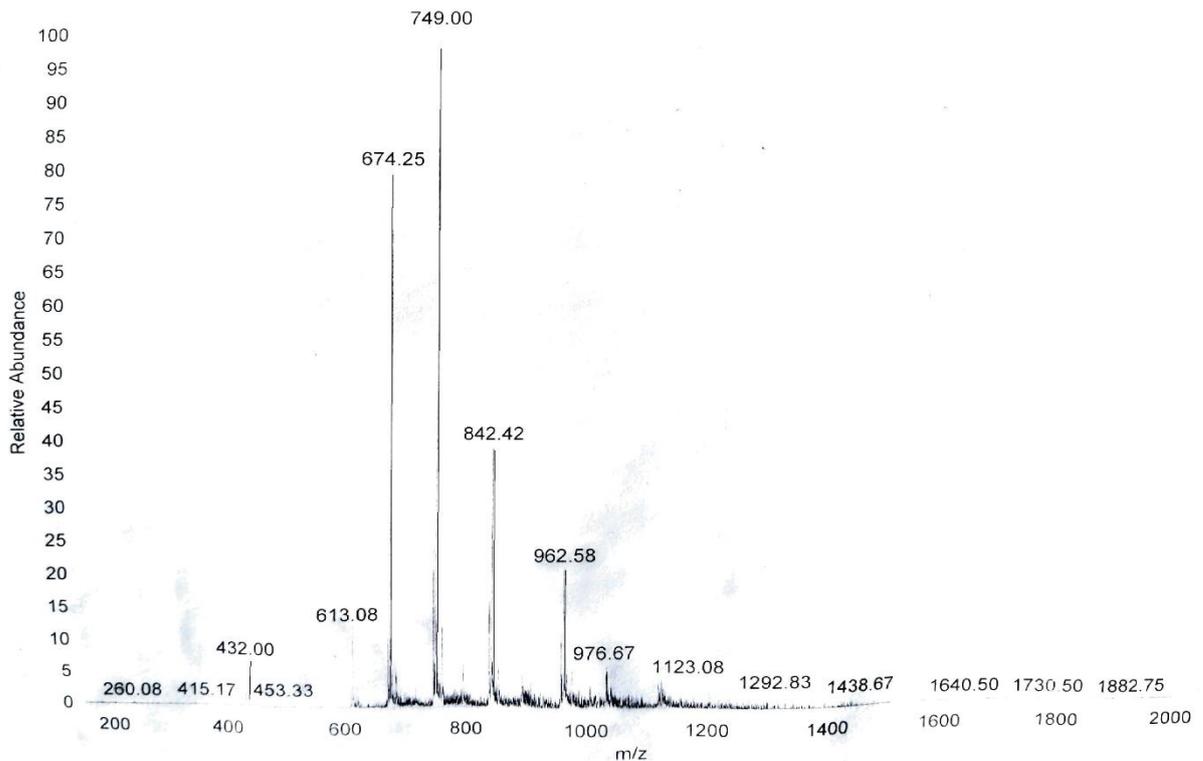
**Fig. 14.** Perfil cromatográfico del pool de fracciones Ni-NTA Bs1, utilizando HPLC-RP, columna C18 analítica y un gradiente 20-50%B en 60 minutos. 1: fracción uno, 2: fracción dos, 3: fracción tres.



**Fig. 15.** Masa molecular de la fracción 1 del péptido Bs1.



**Fig. 16.** Masa molecular de la fracción 2 del péptido Bs1.



**Fig. 17.** Masa molecular de la fracción 3 del péptido Bs1.

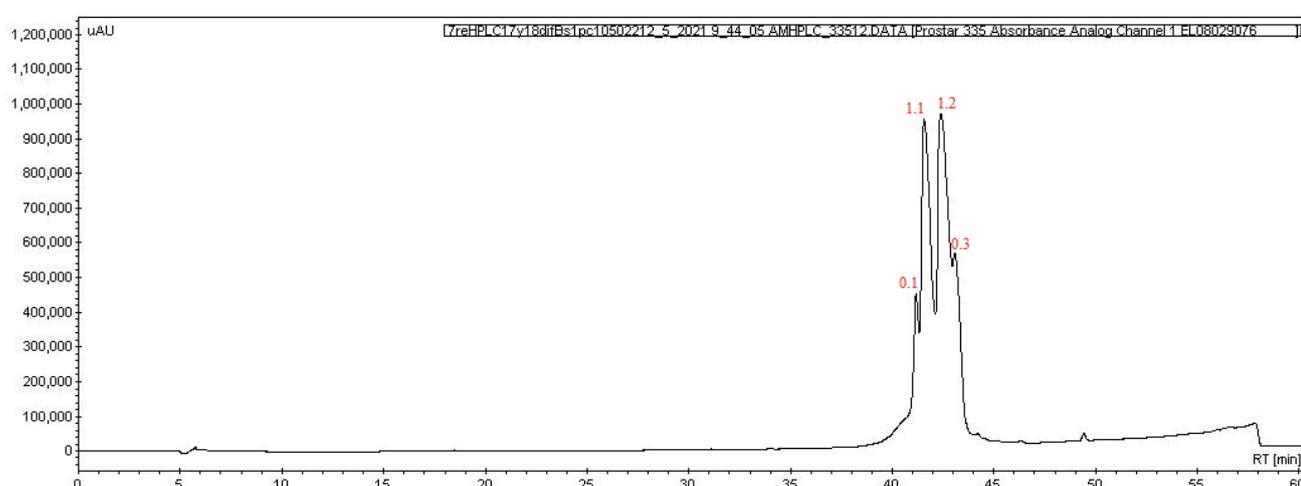
Las fracciones 1 y 2 (**fig. 14**) que fueron repurificadas con la columna C18 (Vydac) se les probó la actividad biológica en grillos (*A. domesticus*) a diferentes concentraciones como se muestra en la **tabla 4**. La fracción Bs1-1 fue ensayada a una concentración inicial de 100 µg por grillo, donde se observó parálisis a las 5h después de la inyección, y muerte a las 24h después de la inyección por lo que se decidió aumentar la concentración de la dosis y observar si el tiempo de alguno de los síntomas aparentes se veía reducido. La fracción Bs1-1 inyectada a una concentración final de 150 µg por grillo no redujo el tiempo de parálisis, en cambio el tiempo de muerte si se vio reducido a 6 h. Se continuo aumentando la dosis de la fracción Bs1-1, sin embargo, se obtuvieron resultados similares hasta la concentración de 400 µg por grillo donde se observó una parálisis a las 2h y 15 minutos, y muerte a los 30 minutos. La fracción Bs1-2 fue ensayada a una concentración inicial de 100 µg por grillo, sin embargo, a esta concentración no se observó ningún síntoma aparente dentro del rango de 24h por lo que se decidió aumentar la concentración de la dosis y observar si el tiempo de alguno de los síntomas aparentes se veía reducido. La fracción Bs1-2 a una concentración final de 400 µg por grillo no presentó parálisis, en cambio, el tiempo de muerte se observó a las 3h después de la inyección.

**Tabla 4.** Ensayo de actividad insecticida de las fracciones 1 y 2 del péptido Bs1 en grillos.

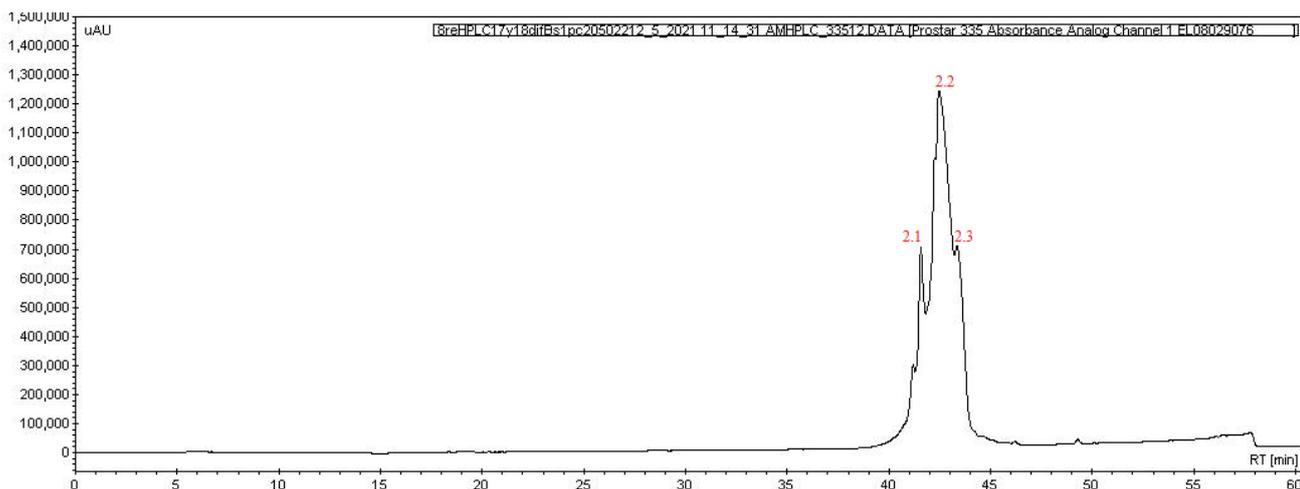
Toxina recombinante	Dosis (µg/grillo)	Síntomas aparentes dentro de 24h	
Bs1-fracción 1	100	Parálisis 5h	Muerte 24h
Bs1-fracción 1	150	Parálisis 5h	Muerte 6h
Bs1-fracción 1	400	Parálisis 2h y 15 min	Muerte 2h y 45 min
Bs1-fracción 2	100	NP	NP
Bs1-fracción 2	400	NP	Muerte 3h
Control	H <sub>2</sub> O	NA	NA

Las fracciones Bs1- 1 y Bs1-2 fueron repurificadas por HPLC-RP con una columna C18 difenilo (Restek), como se muestra en la **figura 18** y **19** de cada fracción respectivamente, donde se observa que la fracción Bs1-1 y Bs1-2 están conformados con diferentes fracciones. En el perfil cromatográfico de la fracción Bs1-1 (**figura 18**) se observa que este se encuentra conformado por cuatro fracciones Bs1-0.1, Bs1-1.1, Bs1-1.2 y Bs1-0.3 de las cuales las fracciones Bs1-1.1 y Bs1-1.2 se tomaron como las fracciones principales debido a que cuentan con una masa molecular experimental de 6,700.0 y 6,700.0 Da respectivamente, las cuales corresponden a la masa teórica de 6,700.5 Da. En el perfil cromatográfico de la fracción 2 (**figura 19**) se observa que este se encuentra conformado por tres fracciones Bs1-2.1, Bs1-2.2 y Bs1-2.3 de las cuales la fracción 2.2 se tomó como la fracción principal ya que cuenta con una masa experimental de 6,699.3 Da, la cual corresponde a la masa teórica de 6,700.5 Da.

Las fracciones principales de cada fracción se utilizaron para probar su actividad en grillos (**Tabla 5**).



**Fig. 18.** Perfil cromatográfico de la repurificación de la fracción 1 del péptido Bs1, utilizando HPLC-RP, columna C18 difenilo y un gradiente 0-60%B en 60 minutos.



**Fig. 19.** Perfil cromatográfico de la repurificación de la fracción 2 del péptido Bs1, utilizando HPLC-RP, columna C18 difenilo y un gradiente 0-60%B en 60 minutos.

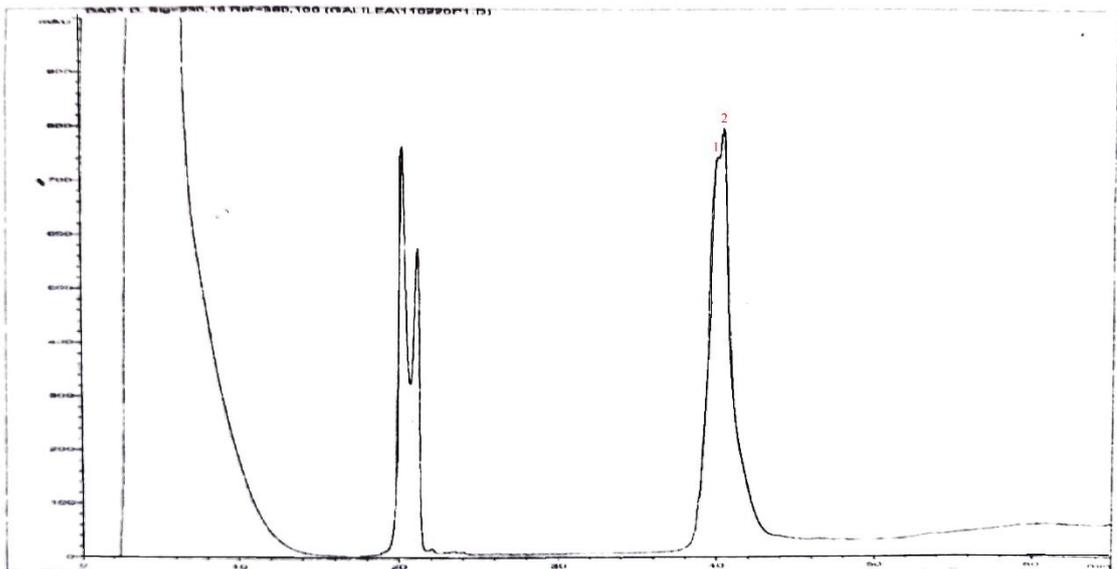
Todas las fracciones Bs1-1.1, Bs1-1.2 y Bs1-2.2 obtenidas de la repurificación con la columna C18 difenilo (Restek) de las fracciones Bs1-1 y Bs1-2 (**fig. 18 y 19**, respectivamente) se probaron a diferentes concentraciones, sin embargo, las únicas que resultaron con actividad fueron: la fracción Bs1-1.2 del fracción Bs1-1 la cual con una dosis de 400 µg por grillo se presentó muerte hasta las 11h después de la inyección, y la fracción Bs1-2.2 del fracción Bs1-2 la cual con una dosis de 300 µg por grillo presento la parálisis a las 5h y muerte a las 6h después de la inyección por lo que se decidió aumentar la dosis hasta 400 µg por grillo, los grillos presentaron parálisis a las 6h y 30 minutos, y muerte a las 8h después de la inyección como se muestra en la **tabla 5**. Cabe resaltar que para cada dosis se inyectaron 3 grillos y el tiempo de síntomas aparentes dentro de 24h varió por lo que se hizo un promedio de los datos y es por esto que la hora de muerte de la fracción Bs1-2.2 a una concentración de 400 µg por grillo es mayor a la de 300 µg por grillo.

**Tabla 5.** Ensayo de actividad insecticida de las fracciones 1.2 y 2.2 del péptido Bs1.

Toxina recombinante	Dosis (µg/grillo)	Síntomas aparentes dentro de 24h	
Bs1- fracción 1.2	400	NP	Muerte 11h
Bs1-fracción 2.2	300	Parálisis 5h	Muerte 6h
Bs1-fracción 2.2	400	Parálisis 5h	Muerte 8h
Control	H <sub>2</sub> O	NA	NA

### 9.1.5 Perfil cromatográfico del re-plegamiento del péptido Bs1 utilizando un par-redox y prueba de actividad biológica del péptido Bs1.

El re-plegamiento del pool de expresión del péptido Bs1 se realizó a las condiciones descritas anteriormente en la metodología. Posteriormente se realizó un HPLC-RP, como se muestra en la **fig. 20**, en donde se obtuvieron dos fracciones: Bs1-1-plega y Bs1-2-plega las cuales fueron utilizadas para la prueba de actividad biológica como se muestra en la **tabla 6**. Ambas fracciones fueron probadas a una concentración inicial de 100 µg por grillo, empero solamente la fracción Bs1-1-plega fue la que mostro actividad paralizando los grillos a las 7h y 55 min y matándolos a las 8h y 40 min después de la inyección, comparando estos resultados con la **tabla 4** podemos concluir que el re-plegamiento utilizando un par-redox GHH/GSSG no contribuye a mejorar la actividad biológica del péptido ya que el tiempo en el que presentaron los síntomas los grillos fue mayor a comparación de la actividad del péptido plegado directamente obtenido de los cuerpos de inclusión.



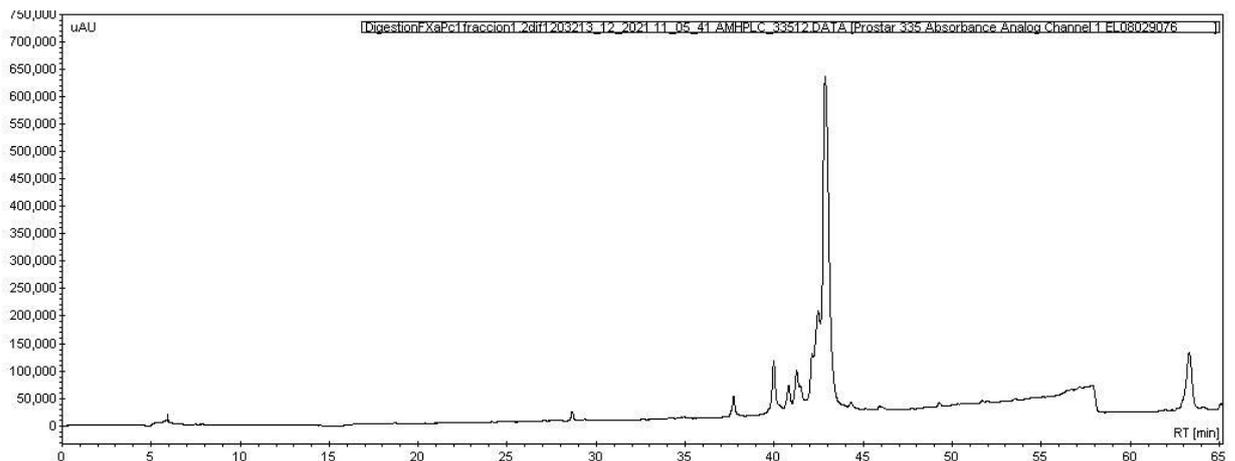
**Fig. 20.** Perfil cromatográfico del plegamiento del pool de expresión del péptido Bs1, utilizando HPLC-RP, columna C18 y un gradiente 0-60%B en 60 minutos

**Tabla 6.** Ensayo de actividad insecticida de las fracciones 1 y 2 del pool de expresión péptido Bs1 replegado utilizando un par-redox.

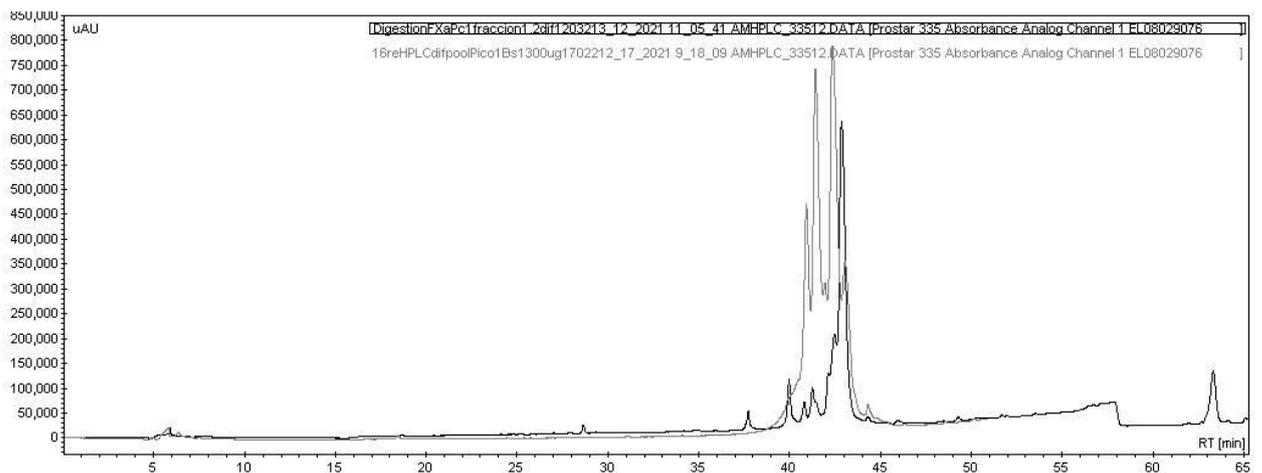
Toxina recombinante	Dosis (µg/grillo)	Síntomas aparentes dentro de 24h	
		Parálisis	Muerte
1	100	7h y 55 min	8h y 40 min
2	100	NP	NP
Control	H <sub>2</sub> O	NA	NA

### 9.1.6 Perfil cromatográfico de la digestión del péptido Bs1 con factor Xa

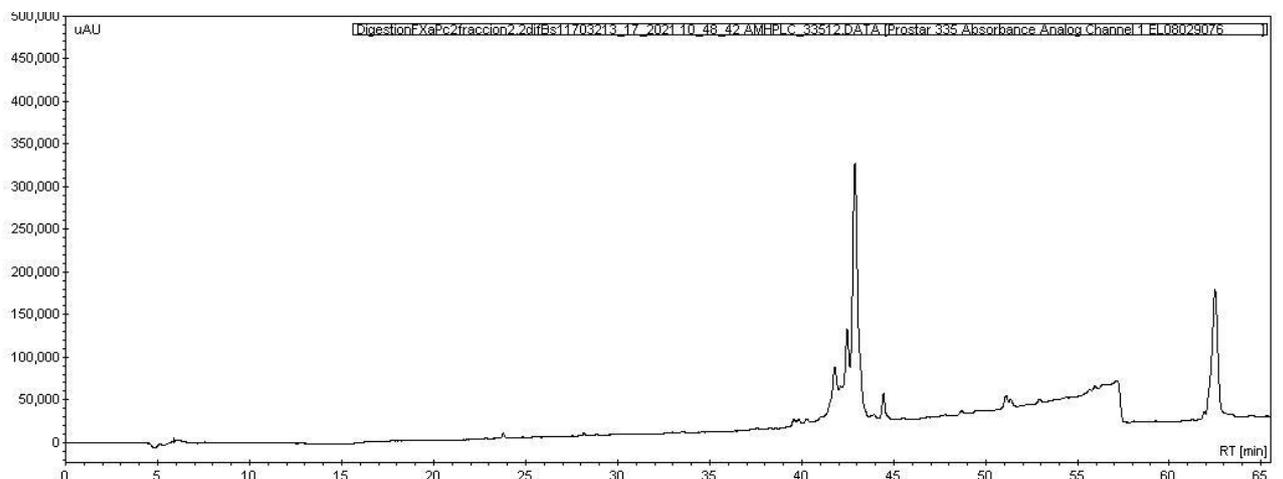
Se hicieron digestiones de las fracciones provenientes de las fracciones Bs1-1 y Bs1-2 del péptido Bs1 con el factor Xa y separando los productos utilizando HPLC-RP mediante una columna C18 difenilo y un gradiente de 0-60%B en 60 minutos. La fracción Bs1-1.2 fue digerida por 1h a 37°C, como se muestra en el perfil cromatográfico **figura 21**, se muestra en la **figura 22** una comparación entre la fracción Bs1-1.2 no digerida contra la fracción Bs1-1.2 digerida. Se hicieron dos digestiones de la fracción Bs1-2.2, la primera digestión fue por 1h a 37°C, en el perfil cromatográfico (**figura 23**) se observa que la enzima no digirió a la fracción por lo que se optó por hacer una digestión por 20h a 37°C, en el perfil cromatográfico (**figura 24**) se observa que la enzima digirió parte de la fracción, se muestra en la **figura 25** una comparación entre la fracción Bs1-2.2 no digerida contra la fracción 2.2 digerida por 1h y la fracción Bs1-2.2 digerida por 20h en donde se puede observar que la absorbancia de fracción digerida va disminuyendo en su absorbancia por lo que se consideró que probablemente si había sido digerida, sin embargo, empero al obtener la masa molecular de la fracción 2.2 digerida por 20h se puede contemplar (**figura 26**) que la masa experimental (6,699.7 Da) es muy cercana a la masa teórica (6,700.4 Da) por lo que se confirmó que en realidad la enzima no corto a la proteína de fusión del péptido maduro Bs1.



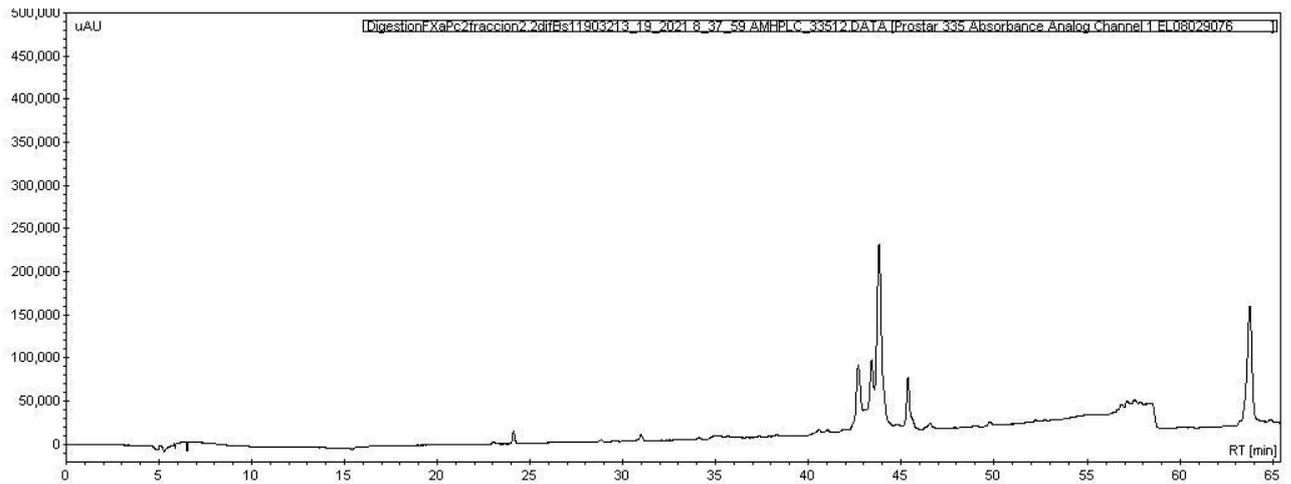
**Fig. 21.** Perfil cromatográfico de la fracción 1.2 digerida por 1h a 37°C del péptido Bs1 con el factor Xa utilizando HPLC-RP, columna C18 difenilo y un gradiente de 0-60%B en 60 minutos



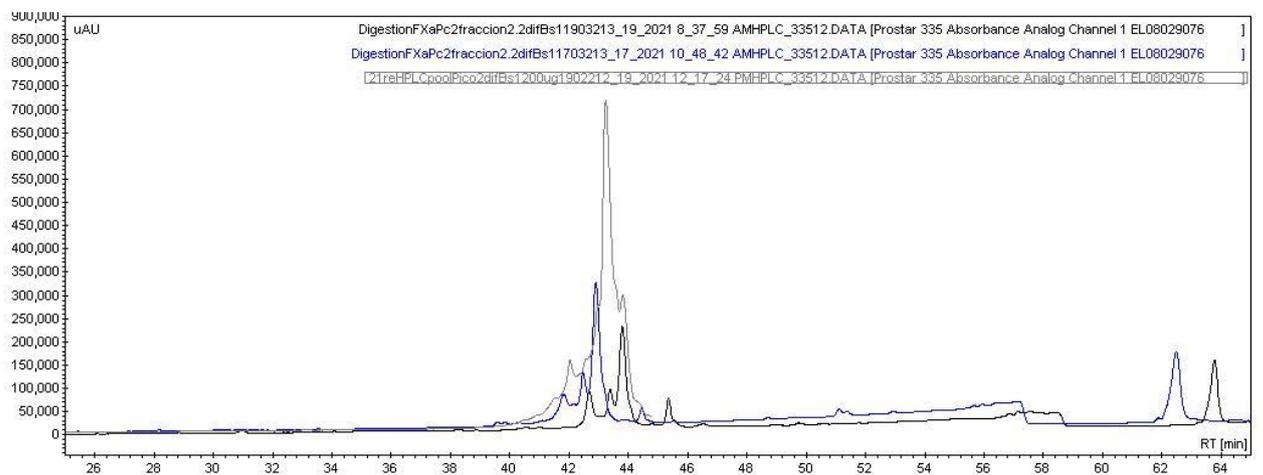
**Fig. 22.** Perfil cromatográfico de la fracción 1.2 no digerida contra la fracción 1.2 digerida por 1h a 37°C del péptido Bs1 con el factor Xa utilizando HPLC-RP, columna C18 difenilo y un gradiente de 0-60%B en 60 minutos. En negro: fracción 1.2 digerida, en gris: fracción 1.2 no digerida.



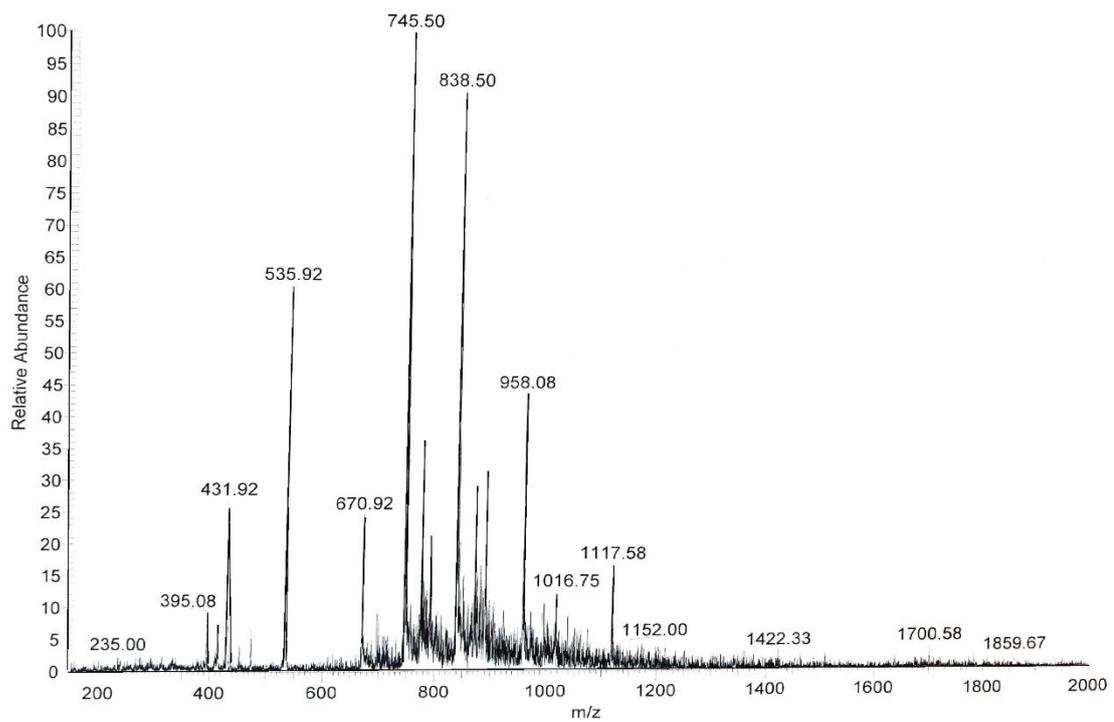
**Fig. 23.** Perfil cromatográfico de la fracción 2.2 digerida por 1h a 37°C del péptido Bs1 con el factor Xa utilizando HPLC-RP, columna C18 difenilo y un gradiente de 0-60%B en 60 minutos



**Fig. 24.** Perfil cromatográfico de la fracción 2.2 digerida por 20h a 37°C del péptido Bs1 con el factor Xa utilizando HPLC-RP, columna C18 difenilo y un gradiente de 0-60%B en 60 minutos.



**Fig. 25.** Perfil cromatográfico de la fracción 2.2 no digerida contra la fracción 2.2 digerida por 1h y la fracción 2.2 digerida por 20h del péptido Bs1 con el factor Xa utilizando HPLC-RP, columna C18 difenilo y un gradiente de 0-60%B en 60 minutos. En gris: fracción 2.2 no digerida, en azul: fracción 2.2 digerida por 1h, en negro: fracción 2.2 digerida por 20h.



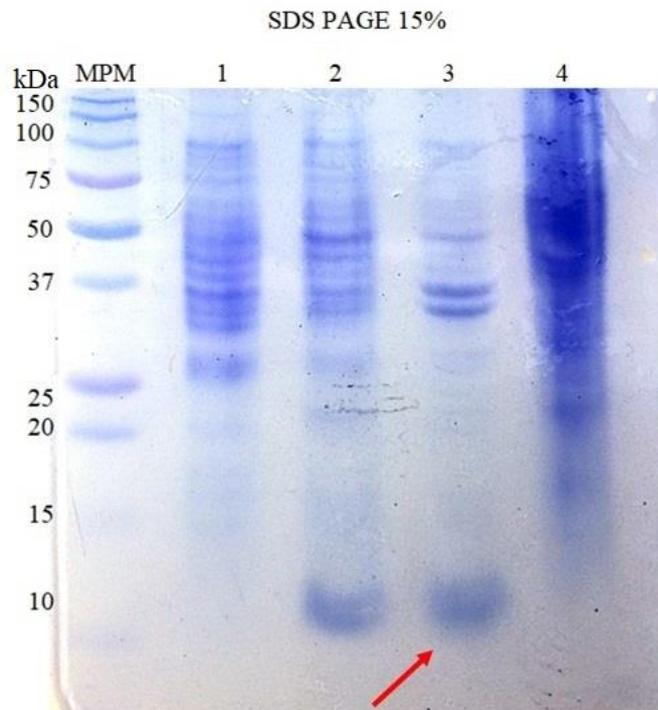
**Fig. 26.** Masa molecular de la digestión de 20 horas del factor Xa de la fracción 2.2 del péptido Bs1.

### 9.1.7 Prueba de actividad biológica del péptido Bs1 después de digestión con factor Xa

Debido a que no hubo digestión por parte de la enzima, se decidió no probar la actividad en los grillos ya que se especula que darían resultados redundantes a los obtenidos con el péptido sin digerir y/o habría una interrupción en la actividad por parte de la digestión.



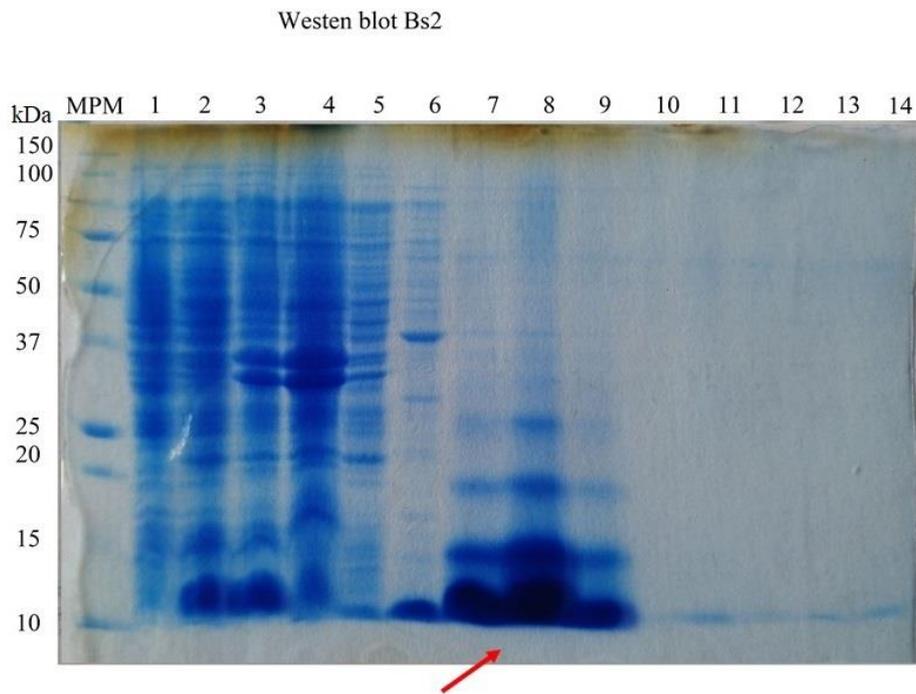
en cuerpos de inclusión (carril 3), con un peso molecular aparente de 10 kDa, que el péptido Bs2 aparezca en esta fracción puede significar que fue mal plegado por *E. coli* y es por esto por lo que se observan solo en los cuerpos de inclusión (42).



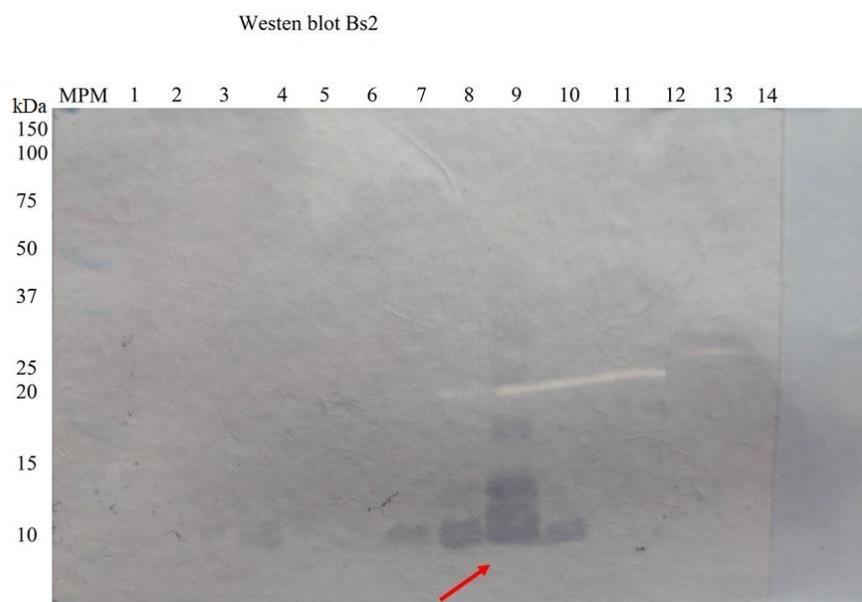
**Fig. 29.** Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15% de la expresión del péptido Bs2. MPM: Marcador de peso molecular (BIO RAD), kDa: kilo Daltones, carril 1: células sin inducir Bs2, carril 2: células inducidas Bs2, carril 3: cuerpos de inclusión Bs2, carril 4: fracción soluble Bs2.

### 9.2.3 Purificación del péptido Bs2 por cromatografía de afinidad a níquel, análisis electroforético y Western Blot

Los cuerpos de inclusión fueron purificados en una columna de afinidad a níquel con resina Ni-NTA y se sometieron a tres lavados para el pegado inespecífico. Las fracciones eluidas y obtenidas por Ni-NTA fueron analizadas mediante un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15% en condiciones desnaturalizantes para confirmar que en dichas eluciones el péptido Bs2 se encontrara. En la **figura 30** se muestra el gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15% de los cuerpos de inclusión en donde se observa que el péptido Bs2 se encuentra dentro de las eluciones realizadas (carril 7 a 14), a un peso molecular aparente de 10 kDa. Para confirmar por completo la presencia del péptido en los cuerpos de inclusión se realizó un Western Blot utilizando un anticuerpo anti-histidinas, el cual es mostrado en la **figura 31**.



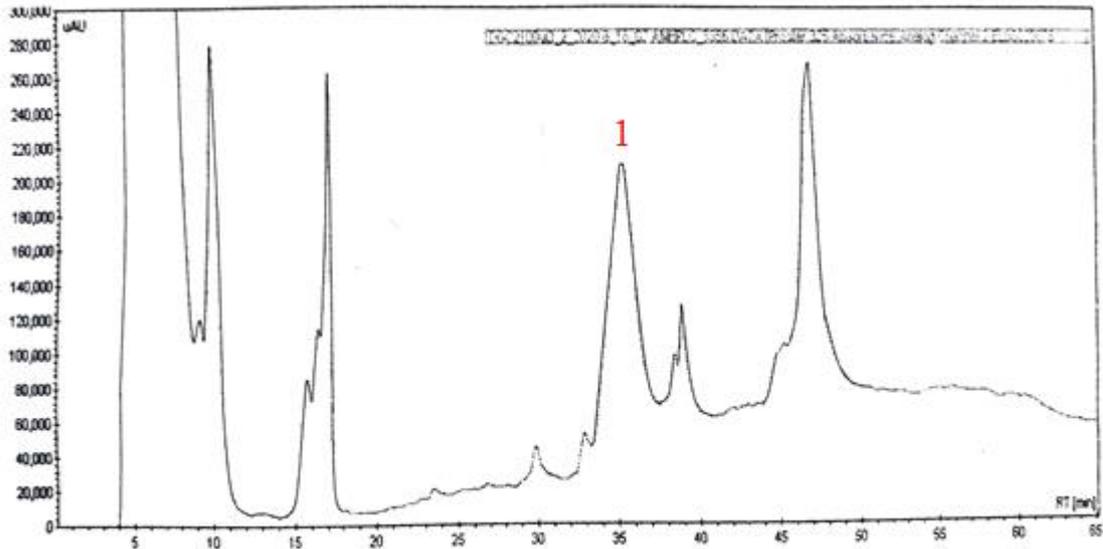
**Fig. 30.** Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15% de la purificación por Ni-NTA de los cuerpos de inclusión del péptido Bs2. MPM: Marcador de peso molecular (BIO RAD), kDa: kilo Daltones, carril 1: células sin inducir Bs2, carril 2: células inducidas Bs2, carril 3: cuerpos de inclusión Bs2, carril 4: recirculante Bs2, carril 5: primer lavado, carril 6: segundo lavado, carril 7-14: elusiones.



**Fig. 31.** Western Blot de la purificación por Ni-NTA de los cuerpos de inclusión Bs2. MPM: marcador de peso molecular (BIO RAD), kDa: kilo Daltones, carril 1: células sin inducir Bs2, carril 2: células inducidas Bs2, carril 3: cuerpos de inclusión Bs2, carril 4: recirculante Bs2, carril 5: primer lavado, carril 6: segundo lavado, carril 7-14: elusiones.

#### 9.2.4 Perfil cromatográfico (HPLC-RP) de la expresión del péptido Bs2

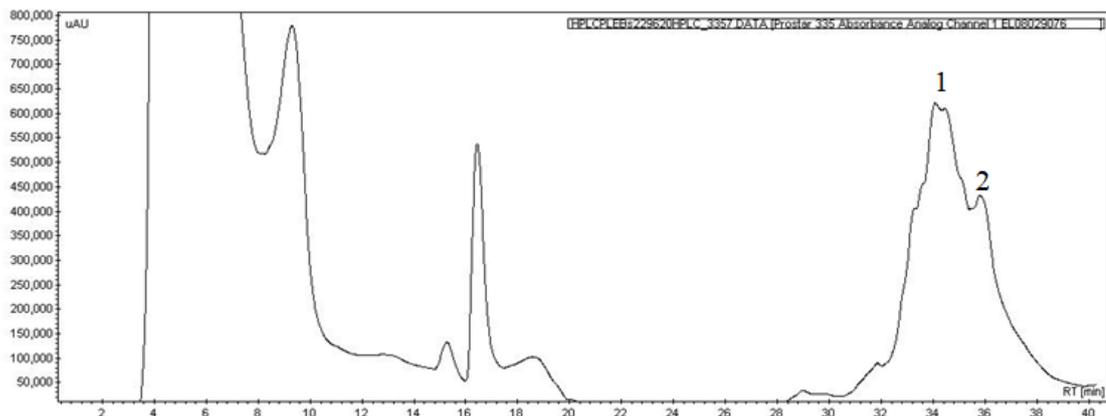
Las fracciones eluidas por columna Ni-NTA (**fig. 31**) fueron unidas y purificadas por HPLC de fase reversa usando una columna C18 (Vydac®). En el perfil cromatográfico de la expresión del péptido Bs2 se obtuvo una fracción principal (como se muestra en la **figura 32**), esta fracción tuvo una masa molecular experimental oxidada de 6,697.0 Da la cual concuerda con la masa molecular teórica de 6,698.5 Da.



**Fig. 32.** Perfil cromatográfico del pool de fracciones Ni-NTA del péptido Bs2, utilizando HPLC-RP, columna C18 analítica y un gradiente 0-60 en 60 minutos. 1: fracción uno.

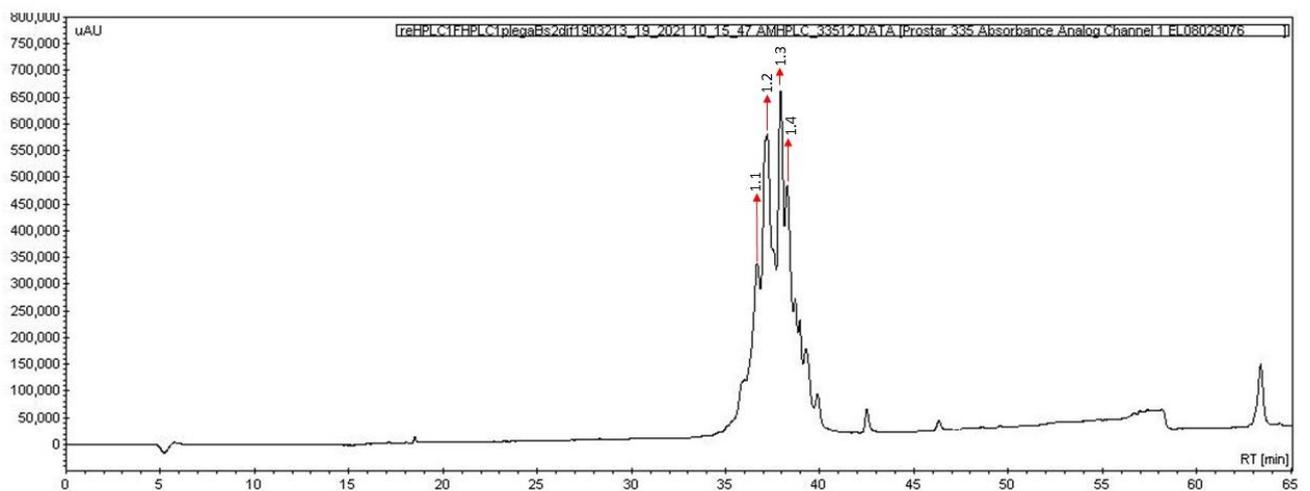
#### 9.2.5 Perfil cromatográfico (HPLC-RP) del plegamiento del pool de expresión Bs2 y prueba de actividad biológica del péptido Bs2 después de plegamiento

Posteriormente la fracción 1 fue plegada por 5 días a 4°C y purificada por HPLC-RP (como se muestra en la **figura 33**) usando una columna C18 (Vydac®).

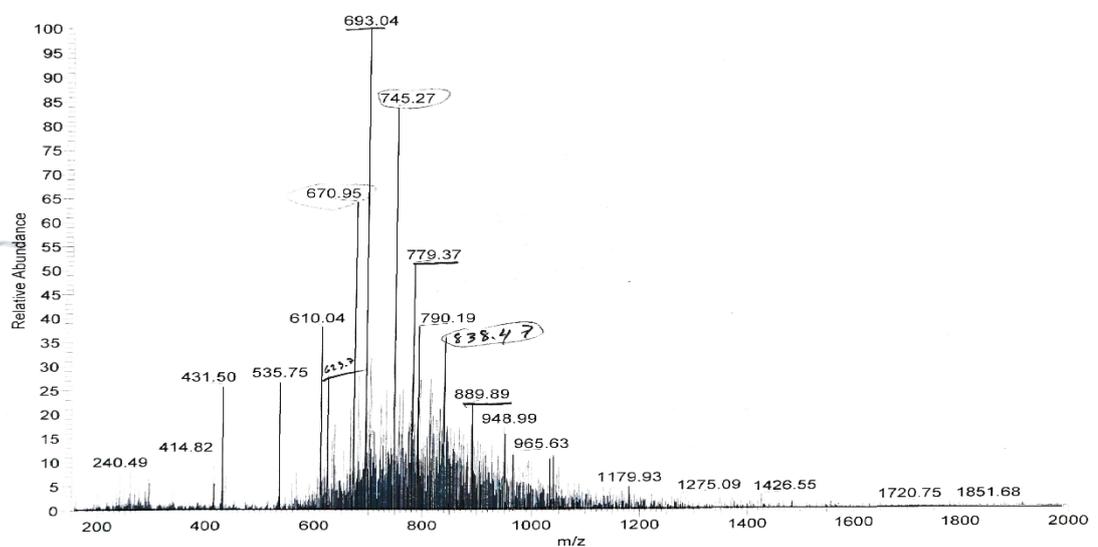


**Fig. 33.** Perfil cromatográfico del plegamiento de la fracción 1 del péptido Bs2, utilizando HPLC-RP, columna C18 analítica y un gradiente de 0-60%B en 60 minutos. 1: fracción uno, 2: fracción 2.

Se obtuvieron 2 fracciones principales y cada una de estas fue repurificada con una columna C18 difenilo (Restek®) debido a que se observó (en el péptido Bs1) que hay una mejor y más amplia separación de las fracciones. La fracción Bs2-1-plega está conformada por cuatro fracciones principales Bs2-1.1-plega, Bs2-1.2-plega, Bs2-1.3-plega y Bs2-1.4-plega, como se muestra en la **figura 34**, las cuatro fracciones fueron enviadas a masas. La fracción Bs2-1.2-plega obtuvo una masa experimental de 6,699.2 Da (**figura 35**), la fracción 1.3 obtuvo una masa experimental de 6,699.4 Da (**figura 36**) y la fracción 1.4 obtuvo una masa experimental de 6,698.5 Da (**figura 37**), las cuales son similares a la masa molecular teórica de 6,698.5. La fracción Bs2-1.1-plega cuenta con la masa molecular experimental de 7,309.9 debido a esto fue que se descarto su uso para este proyecto.



**Fig. 34.** Perfil cromatográfico de la repurificación de fracción 1 del péptido Bs2 plegado, utilizando HPLC-RP, columna C18 difenilo y un gradiente de 0-60%B en 60 minutos. 1.1: fracción 1, 1.2: fracción 2, 1.3: fracción 3 y 1.4: fracción 4.



**Fig. 35.** Masa molecular de la fracción 1.2 del plegamiento del péptido Bs2.

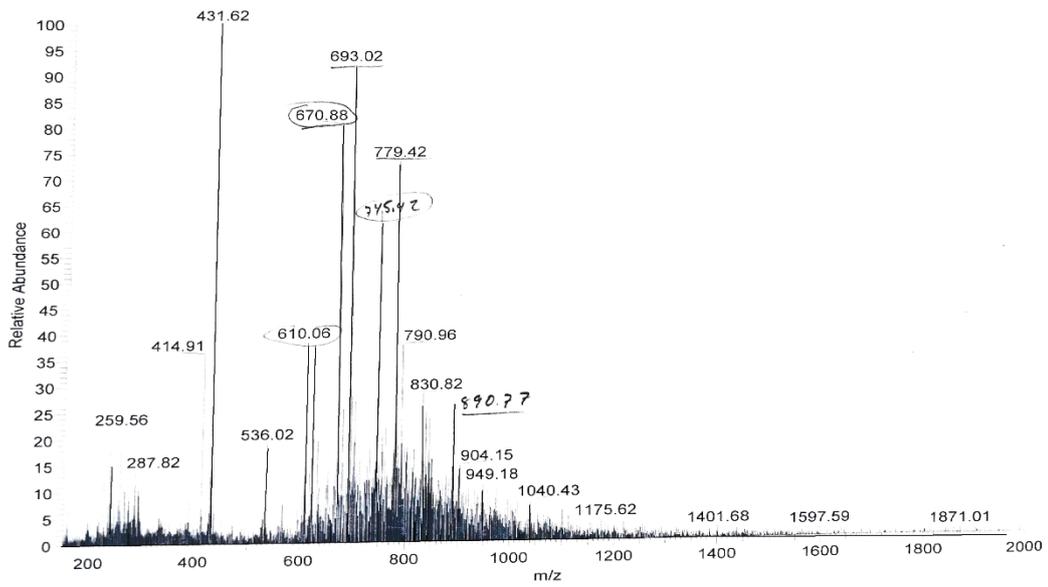


Fig. 36. Masa molecular de la fracción 1.3 del plegamiento del péptido Bs2.

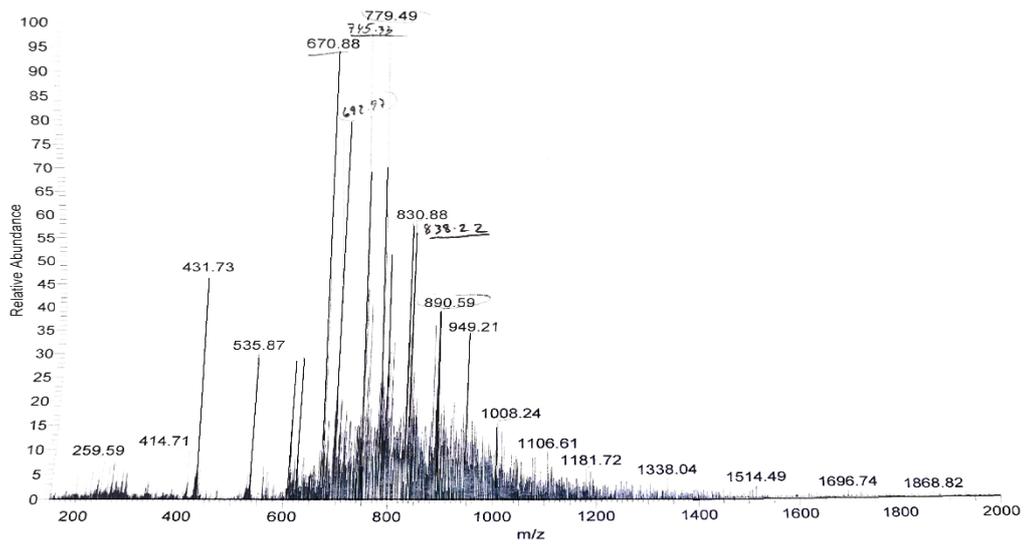


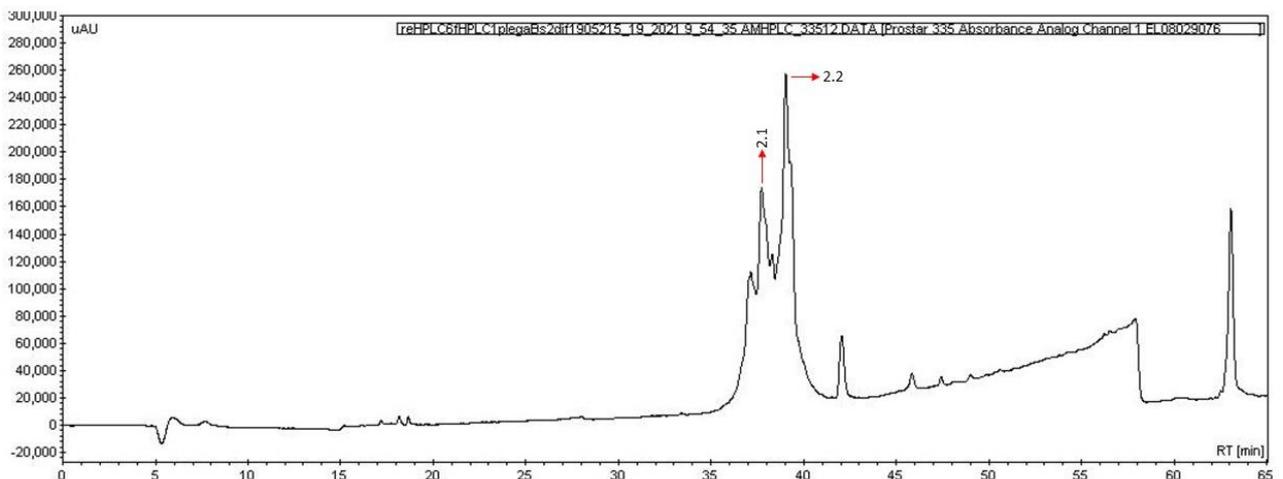
Fig. 37. Masa molecular de la fracción 1.4 del plegamiento del péptido Bs2.

Se ensayó la actividad de las fracciones Bs2-1.2-plega, Bs2-1.3-plega y Bs2-1.4-plega provenientes de la fracción Bs2-1-plega plegada (**fig. 34**) en grillos. Las fracciones Bs2-1.2-plega y Bs2-1.4-plega no presentaron ningún efecto en los grillos a una concentración de 200 y 250 µg por grillo, sin embargo, la fracción 1.3 a una concentración de 200 µg por grillo provocó que los grillos tuvieran una parálisis parcial de solo las patas traseras por 5h, sin embargo, los grillos se recuperaron y no murieron por lo que se decidió aumentar la dosis a 250 µg por grillo con la cual los grillos se paralizaron completamente a las 3h y murieron 6h después de la inyección. Estos resultados se presentan en la **tabla 8**.

**Tabla 7.** Ensayo de actividad insecticida de las fracciones Bs2-1.2-plega, Bs2-1.3-plega y Bs2-1.4-plega del péptido Bs2 re-plegado.

Toxina recombinante	Dosis (µg/grillo)	Síntomas aparentes dentro de 24h	
1.2	200	NP	
1.2	250	NP	NP
1.3	200	Parálisis patas traseras por 5h	Recuperado
1.3	250	Parálisis 3h	Muerte 6h
1.4	200	NP	NP
1.4	250	NP	NP
Control	H <sub>2</sub> O	NA	NA

La fracción 2 se encuentra conformada por dos fracciones principales Bs2-2.1-plega y Bs2-2.2-plega como se muestra en la **figura 38**.



**Fig. 38.** Perfil cromatográfico de la repurificación de fracción 2 del péptido Bs2 plegado, utilizando HPLC-RP, columna C18 difenilo y un gradiente de 0-60%B en 60 minutos. 2.1: fracción 1, 2.2: fracción 2.

Se ensayó la actividad de las fracciones Bs2-2.1-plega y Bs2-2.2-plega provenientes de la fracción Bs2-2-plega plegada (*fig. 34*) en grillos a una concentración de 100, 200 y 250 µg por grillo, sin embargo, las fracciones tuvieron un efecto nulo en estos.

**Tabla 8.** Ensayo de actividad insecticida de las fracciones Bs2-2.1-plega, Bs2-2.2-plega del péptido Bs2 re-plegado.

<b>Toxina recombinante</b>	<b>Dosis (µg/grillo)</b>	<b>Síntomas aparentes en 24h</b>
2.1	100	NP
2.1	200	NP
2.1	250	NP
2.2	100	NP
2.2	200	NP
2.2	250	NP

## 10. Discusión

La expresión heteróloga de proteínas recombinantes en bacterias, particularmente hablando de *Escherichia coli*, ha resultado tener ventajas significativas en los trabajos de investigación debido a que esta bacteria es la más estudiada y ha sido caracterizada genética y fisiológicamente, gracias a esto, se ha podido explotar su potencial y con los años ha llegado a ser el sistema más barato para la producción de proteínas recombinantes en comparación con otros sistemas como las levaduras. Las ventajas más importantes que conlleva el uso de esta bacteria para la expresión de proteínas recombinantes es la eficiencia transcripcional y traduccional, que, sumada al uso de cepas como lo es Shuffle, que promueven la formación de puentes disulfuro logran hacer que la proteína tenga un buen plegamiento y por ende conserve su actividad.

Los venenos crudos provenientes de arañas mayoritariamente poseen actividad insecticida ya que son principalmente depredadores de esta clase de animales, su veneno puede causar parálisis o letalidad en los insectos. Las tarántulas a pesar de su gran tamaño, en su mayoría cuentan con péptidos con actividad dirigida únicamente a insectos. Existen péptidos de tarántulas con actividad insecticida que ya han sido caracterizados y son altamente estudiados como: atracotoxinas ( $\delta$ ,  $\omega$ ), hainatoxinas, etc. Sin embargo, aún existen muchos péptidos provenientes de tarántulas que son poco estudiados, como lo es el caso de *Brachypelma smithi* que cuenta con dos péptidos: Bs1 y Bs2, esta es una tarántula endémica de las costas de Guerrero en México. México por su parte cuenta con una gran cantidad de especies de tarántulas endémicas del país, a las cuales se les podría sacar el provecho en el campo de la biotecnología estudiando sus venenos completos y los péptidos con actividad insecticida que los podrían conformar.

En este trabajo se expresaron heterológicamente los péptidos Bs1 y Bs2 en la cepa Shuffle de *E. coli* utilizando el plásmido pQE-30 con el objetivo de poder evaluar la actividad insecticida después de que los péptidos hayan sido expresados heterológicamente. Para ambos péptidos se obtuvo una expresión en cuerpos de inclusión lo cual se traduce a un mal plegamiento por parte del sistema bacteriano además de que la proteína no cuenta con modificaciones post traduccionales y por lo que se asume que no se formaron correctamente los puentes disulfuro, y por ende la proteína puede verse comprometida en su actividad insecticida, sin embargo, se optó por probar la actividad con esos péptidos una vez purificados por Ni-NTA (solo las eluciones) y por HPLC de fase reversa con una columna C18 (Vydac) común. Para el péptido Bs1 se obtuvieron dos fracciones principales, Bs1-1 y Bs1-2, las cuales con una concentración máxima de 400  $\mu\text{g}$  por grillo presentaron una actividad significativa en estos, paralizándolos y

matándolos. Clement y colaboradores sugirieron en 2015 que hace falta un uso exponencialmente mayor de toxina recombinante para matar un solo grillo (100-900  $\mu\text{g}$  por grillo) en comparación a la toxina nativa. Lo cual fue confirmado en los ensayos de actividad de los péptidos Bs1 y Bs2 ya que se necesitan aproximadamente entre 300 y 400  $\mu\text{g}$  de toxina recombinante para matar a un solo grillo en comparación con la nativa que solamente necesita de 11  $\mu\text{g}$  por grillo. Zlotkin en 1999 habló que en el canal iónico de sodio dependiente de voltaje de los insectos es similar al de mamíferos sin embargo, este cuenta con un locus llamado *para* que es un gen estructural que causa parálisis y es sensible a la temperatura, es por esto que podemos observar una parálisis total o solamente de patas traseras en los grillos cuando se les inocula las toxinas recombinantes Bs1 y Bs2.

Las fracciones del péptido Bs1 y Bs2 obtenidas en columna C18 (Vydac) común fueron posteriormente repurificadas en columna C18 difenilo (Restek), las cuales mostraron una mejor separación de las fracciones haciendo hincapié en que el uso de la columna C18 difenilo para obtener fracciones mejor purificadas es una buena opción, sin embargo, se ha observado que entre más separadas se encuentren las fracciones menor actividad es la que se tiene y especulamos que es necesaria la unión de las fracciones para que tengan o conserven la actividad insecticida. También se ha observado que por el tiempo de retención algunas fracciones pueden corresponder a las originales, para un ejemplo más claro, la fracción Bs1-1.1 puede pertenecer a la fracción Bs1-1 y la fracción Bs1-1.2 a la fracción Bs1-1.

Cuando se hace un alineamiento de las secuencias de los péptidos Bs1 y Bs2 se puede observar que ambos péptidos en su lado amino terminal tienen una conformación idéntica de residuos de aminoácidos, sin embargo, en el lado carboxilo terminal es en donde se encuentran tanto cambios no conservadores (WW por CS) como cambios conservadores (C por S y S por T), todos estos aminoácidos pueden formar la estructura de  $\beta$ -plegada y se podría decir que ambos péptidos pueden estar conformados por las mismas estructuras secundarias, empero, el cambio de posición de la última Cisteína que conforma a los péptidos (Bs1 posición 52, Bs2 posición 46) podría hacer que la estructura terciaria sea la que difiera y por ende una presente más actividad insecticida que la otra. En este caso, se observó que el péptido Bs1 es el que tiene más actividad insecticida que el péptido Bs2.

## 11. Conclusión

### 11.1 Conclusiones Bs1

- Se logró expresar el péptido Bs1 de forma heteróloga en la cepa SHuffle de *E. coli*.
- Se lograron purificar 2 fracciones principales con la masa molecular experimental esperada (6,700.5 Da) del péptido Bs1 en una columna C18.
- Se lograron purificar 3 fracciones principales con la masa molecular experimental (6,700.5 Da) del péptido Bs1 con columna C18 difenilo.
- Se logró re-plegar el péptido Bs1 y probar su actividad en grillos, sin embargo, solo una fracción tuvo actividad.
- Las fracciones obtenidas del péptido Bs1 sin un re-plegamiento mostraron tener más actividad que aquellas que obtenidas directamente de cuerpos de inclusión.

### 11.2 Conclusiones Bs2

- Se logró expresar el péptido Bs2 de forma heteróloga en la cepa SHuffle de *E. coli*.
- Se logró purificar 1 fracción principal del péptido Bs2 en columna C18.
- Se lograron purificar 5 fracciones principales con la masa molecular experimental esperada (6,705.4 Da) del péptido Bs2 en columna C18 difenilo.
- Se logró re-plegar el péptido Bs2 y mostrar su actividad, sin embargo, solo una fracción tuvo actividad.

## 12. Perspectivas

- Determinar las masas moleculares de las fracciones obtenidas de la fracción 1.2 de la digestión del factor Xa del péptido Bs1.
- Determinar las masas moleculares de las fracciones Bs2-2.1-plega y Bs2-2.2-plega.

### 13. Bibliografía

1. Al, D. (1987). Tarantulas a complete introduction. Estados Unidos. T.F.H. Publications, Inc.
2. Cooper, E.W.T., West, R. y Mendoza, J. (2019). *Identificación de Tarántulas Listadas en la CITES: especies Aphonopelma, Brachypelma y Sericopelma*, Comisión para la Cooperación Ambiental, Montreal, 80 pp.
3. Cifuentes, Juan Luis / Fabio German Cupul (2010). Venenos: armas químicas de la naturaleza. Primera edición. FCE, SEP, Conacyt. México. 191 pp.
4. Escoubas, P. et al. (2000). Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochimie*. Vol 89: 893-902.
5. Lampe, R. A. (1999) Analgesic peptides from venom of *Grammostola spatulata* and use thereof, US5877026A.
6. World Spider Catalog (2020). World Spider Catalog. Version 21.0. Natural History Museum Bern, online at <http://wsc.nmbe.ch>, accessed on {14/04/2020}. doi: 10.24436/2
7. Apadhay, R. et al. (2016). Spider venom toxins its biological effects and allergic-immune responses: a review. *World Journal of Pharmaceutical Research*. Vol 5. Issue 5.
8. Gentz, M.C et al. (2009). Comparison of the peptidome and insecticidal activity of a taxonomically diverse group of theraphosid spiders. *Toxicon* 53, 496-502.
9. Corzo, G. et al. (2008). An insecticidal peptide from the theraphosid *Brachypelma smithi* spider venom reveals common molecular features among spider species from different genera. *Peptides* 29, 1901-1908.
10. Smith, J. et al. (2013). The insecticidal potential of venom peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 3665-3693
11. Windley, M.J. et al. (2012). Spider venom peptides as bioinsecticides. *Toxins*. 4, 191-227.
12. Nicholson, G.M. (2007). Insect-selective toxins targeting voltage-gated sodium channels. *Toxicon*. 49, 490-512.
13. Kandell, E. (2009). Principios de neurociencia. En Kandell, E. Capitulo 6: Canales iónicos 105-124pp). LTC. México. 1441 pp.
14. Chahine, M. (ed.). (2018). Voltage gated sodium channels: structure, function and channelopathies. Switzerland: Springer. 448 pp.
15. Catterall, W. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 1, 13-25.
16. Madigan, M.T. et al. (2015). En *Unidad 3: Diversidad microbiana* (468 p.). Brock, Biología de los microorganismos. España: Pearson. 1200 pp.
17. Clement, H. et al. (2015). A comparison between the recombinant expression and chemical synthesis of a short cysteine-rich insecticidal spider peptide. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 21:19
18. Paruelo J. M., Guerscham, J. P., & Verón, S. R. (2005). Expansión agrícola y cambios en el uso de suelo. *Ciencia Hoy*, 87, 14-23.
19. Guzmán-Mendoza, R., Calzontzi-Marín, J., Salas-Araiza, M. D. & Martínez-Yáñez, R. (2016). La riqueza biológica de los insectos: análisis de su importancia multidimensional. *Acta Zoológica Mexicana*. 32(3): 370-379.
20. Devine J., G., Eza, D., Ogasuku, E. & Furlong J, M. (2008). Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 25 (1): 74-100.

21. Salazar, M.A., Sandoval, R.A. y Armendáriz, B.J. (2013). *Biología molecular, fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. México: McGraw-Hill. 324pp.
22. Walls, D. y Loughran, S.T (eds.) (2011). *Protein Chromatography, methods, and protocols*. Switzerland: Springer. 527pp.
23. Hatti-Kaul, R. et al. (eds.) (2003). *Isolation and purification of proteins*. New York: Marcel Dekker, Inc. 637 pp.
24. Block H, Maertens B, Spriestersbach A, Brinker N, Kubicek J, Fabis R, Labahn J, Schäfer F. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods Enzymol*. 2009; 463:439-73
25. Tejeda, M. et al. (2011). *Bioseparaciones*. Pearson: México. 704 pp.
26. García, J. et al. (2013). Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *VacciMonitor*. 22(2): 30-39.
27. QIAGEN. Pqe-30 (map):  
<https://www.qiagen.com/es/resources/resourcedetail?id=f057bb24-5b3e-441c-aca8-d34b0b039418&lang=en>.
28. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2016). *Glosario de términos fitosanitarios NIMF 5*. Roma. 41 p.
29. INEGI, Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA). (2014). *Conociendo al campo de México. Resultados. Levantamiento del 16 de octubre al 28 de noviembre de 2014*.
30. Jimenez, L.P y Merchant, H. (2003). En *Capítulo 25 Drosophila como organismo modelo en la Biología experimental* (783-785 pp.). *Biología celular y molecular*. México: Pearson. 912 pp.
31. Agrichem Nanotech Partiche Size. (2015). 7 plagas que afectan más a México.  
<https://agrichem.mx/7-plagas-que-afectan-los-cultivos-en-mexico/>
32. Zepeda-Jazo, I. (2018). Manejo sustentable de plagas agrícolas en México. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 15(1): 99-108.
33. King, F.G. y Hardy, M.C. (2013). Spider-venom peptides: structure, pharmacology and potencial for control on insect pests. *Annu. Rev. Entomol*, 58: 475-496.
34. The university of Melbourne. What is venom?. Recuperado de:  
<https://biomedicalsciences.unimelb.edu.au/departments/pharmacology/engage/avru/discover/what-is-venom>.
35. Mendoza, J. y Francke, O. (2019). Revision sistemática de tarántulas Mexicanas amenazadas *Brachypelma* (Araneae: Theraphosidae: Theraphosinae), con descripción de un nuevo género e implicaciones para la conservación. *Zool J Linn Soc*, 188 (1): 82-147.
36. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., et al. (2016). *Biología Molecular de la Célula*. México. Omega. 1472pp.
37. Zhang, F., Xu, X., Li, T. y Liu, Z. (2013). Shellfish toxins targeting voltage-gated sodium channels.
38. OMS. *Escherichia coli*. [https://www.who.int/topics/escherichia\\_coli\\_infections/es](https://www.who.int/topics/escherichia_coli_infections/es).
39. Madigan, M.T. et al. (2015). En *Capítulo 11: Ingeniería genética y biotecnología* (349 p.). Brock, *Biología de los microorganismos*. España: Pearson. 1200 pp.
40. INEGI. (1995). *Clasificador de Actividades Económicas de la Encuesta Nacional de Empleo 8CAE-ENE-94*.

41. INEGI, Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA). (2017). Resultados de la Encuesta Nacional Agropecuaria 2017.
42. Ferrer-Miralles N., Saccardo P., Corchero J.L., Xu Z., García-Fruitós E. (2015). General Introduction: Recombinant Protein Production and Purification of Insoluble Proteins. En: García-Fruitós E. (eds) *Insoluble Proteins. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 1258. Humana Press, Nueva York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5_1)
43. Campbell, P.N, Smith, A.D. y Peters T.J. (2005). En *Capítulo 2: Introducción a las proteínas y los péptidos* (14-15 pp.). *Bioquímica ilustrada, Bioquímica y biología molecular en la era posgenómica*. México. ELSEVIER. 240pp.
44. Martínez, M., Andrés, D., Zubillaga, M. (2006). Conceptos actuales del metabolismo del glutatión. Utilización de los isotopos estables para la evaluación de su homeostasis. *Acta bioquím Clín Latinoam*, 40 (1): 45-51.
45. Vetter, R.S. e Isbister, G.K. (2008). Medical aspects of spider bites. *Annu. Rev. Entomol.* 53, 409-429.
46. Wang, X., Tang, X., Xu, D. y Yu, D. (2019). Molecular basis and mechanism underlying the insecticidal activity of venoms and toxins from *Latrodectus* spiders. *Pest Manag Sci*, 75: 318-323.
47. Ortuño, L.P.E. y Ortiz, S.N.P. (2009). Latrodectismo. *Revista Científica Ciencia Médica*, 12(1): 25-28.
48. Senji, L.R.R., Suranse, V. y Sunagar, K. (2019). Arthropod venoms: Biochemistry, ecology and evolution. *Toxicon*, 158: 84-103.
49. Hong C.H., Ganetzky B. (1994). Spatial and temporal expression patterns of two sodium channel genes in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, 14(9): 5160–5169.
50. Loughney K, Kreber R, Ganetzky B. 1989. Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. *Cell* 58(6): 1143–1154.
51. Zlotkin, E. (1999). The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Rev. Entomol* 44: 429-455.
52. Pichon Y. (1984). Ionic basis of electrical activity in insect nerve cells and synapses. En *Insect Biochemistry and Neurophysiology*, ed Borkovec B., TJ Kelly, pp. 23-50. Nueva York. Londres: Plenum.
53. Pelhate, M. y Satelle, D.B. (1982). Pharmacological properties of insect axons. *Journal of Insect Physiology*, 28(11): 889-903.
54. Cleland, W.W. (1964). Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry*. 3(4): 480-482.

## Anexos

### Anexo 1: Medios de cultivo

<b>Medio SOC (g/L)</b>	
<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
Glucosa	3.6
KCl	0.186
Triptona	20
Cloruro de magnesio anhidro	0.96
NaCl	0.5
Extracto de levadura	5

<b>Medio LB (g/L)</b>	
<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
Triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10

<b>Medio de expresión</b>	
<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
Triptona	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	10 g/L
IPTG	0.5 mM

## Anexo 2: Soluciones

### Solución para gel separador

Reactivos	Cantidad
Lower Buffer	1.5 mL
Acrilamida	3 mL
Agua miliQ	1.5 mL
TEMED	5 $\mu$ L
Persulfato de amonio 10%	20 $\mu$ L

### Solución para gel concentrador

Reactivos	Cantidad
Upper Buffer	0.63 mL
Acrilamida	0.33 mL
Agua miliQ	1.54 mL
TEMED	2.5 $\mu$ L
Perulfato de amonio 10%	12.5 $\mu$ L

### Solución del primer lavado

Reactivos	Cantidad
50 mM TrisHCl pH 8 + 6 M GndCl	10 mL

### Solución del segundo lavado

Reactivos	Cantidad
40 mM Imidazol en 50 mM TrisHCl pH 8 + 6 M GndCl	10 mL

### Solución del tercer lavado

Reactivos	Cantidad
400 mM Imidazol en 50 mM TrisHCl pH 8 + 6 M GndCl	15 mL

### Anexo 3: Amortiguadores

#### Solución para desteñir geles

Reactivos	Cantidad
Ácido acético	10%
Isopropanol	10%

#### Buffer PBS

Reactivos	Cantidad
NaCl	140 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.2 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	2.8 mM

#### Buffer de transferencia

Reactivos	Cantidad
Tris-base	25 mM
Glicina	192 mM
Metanol pH 8.3	20%

#### Buffer de bloqueo

Reactivos	Cantidad
Leche en polvo 5%	1 g
TBST 1x	19 mL

#### Buffer factor Xa proteasa

Reactivos	Cantidad
Tris-HCL pH 8	20 mM
NaCl	50 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM

Cuernavaca, Morelos a 11 de febrero de 2022

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

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **GALILEA JAIMES PESCADOR**, con el título del trabajo: **Expresión heteróloga de las toxinas Bs1 y Bs2 provenientes de la tarántula *Brachypelma smithi*, con potencial actividad insecticida.**

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

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

**JURADO REVISOR**

**FIRMA**

PRESIDENTE: DRA. MARÍA DEL CARMEN GUTIÉRREZ  
VILLAFUERTE

\_\_\_\_\_

SECRETARIO: DR. ALEXIS JOAVANY RODRÍGUEZ SOLÍS

\_\_\_\_\_

VOCAL: DRA. HERLINDA CATALINA CLEMENT CARRETERO

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: M. EN B. LUIS ENRIQUE CRUZ TRUJILLO

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: DR. GERARDO ALFONSO CORZO BURGUETE

\_\_\_\_\_



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

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

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

### Sello electrónico

**HERLINDA CATALINA CLEMENT CARRETERO | Fecha:2022-02-11 16:01:20 | Firmante**

vR9I7FZIPDUgGMFTzBRq/6v/d+3WYtRWx1YP4+owLEK6CAXUm7Pol5z+01ks03mHwkLnprKy7zHn7LF0Tt6Xgnt0iB3gaLj20qaMLGPAveqVKeuffHwi+i0rFMJ3xz65DCXCFP8aFR+7vS5tko9FRly3M1VnKQVgVvy+oOHxVgtdUf/M5BvOTHOATwx5inGuydFhmr15i0NHbV01ynpUyk72RbUc3wDRGQwyuf6R/a1z7IOLVdIF427mtEblbhaE0HTzWsw8W6vxn0NdxDEJ+Wk0qbkOnkuXQkymxCqXTSUpFPfMgslSZBBgp4Tqu9lxu9+D/1Lkq1WK4WbLMylg==

**ALEXIS JOAVANY RODRIGUEZ SOLIS | Fecha:2022-02-11 17:12:53 | Firmante**

CkQQYGHAgIE0kHL+nZ88O+syIWWQI/WunA+sF/1EMKk+UPFoRwuFMli2wxuyDvdFHNsUZ2uXq4e8/qNzzKEgOzva72xwSZUS7McA8HGd7VUxxn8zcOBgyEUA1UgN8ZImJzZpUTP0TgXYg+ic01O6QtJVbhmITlh3axkKfqbD+1y+DFJdRENeOR2cPJVaH5trDcPx88vvodKxbUYqxKF0jM2Xnc1y4uvT6ITmNafPml/0zFSMKPVhe/Yz7LYxckNSFTTYeEZSm59UJm+BeEAbEJl3T3WJeY/1AKmIxVNsT3h6ji6UXB81NtKQjv0ylo4ileFZLzy5RWWCNXBXsa2Ag==

**GERARDO ALFONSO CORZO BURGUETE | Fecha:2022-02-11 18:37:37 | Firmante**

LQvXYSn74sbW5vshDQXN8DSBfDWDXs0a0q9xcBYx3Jp+ou8VxkYSAAdWK1is4NpxE/SlZoWxn7MuEBoZUtN4VHQDjabx381eCj05jgTvDdzbp07IzNeq1UEiBFvVRp5OIAyGD51vaYagTjkSW4MkRDB1emWdwq6OK/6rBBJfW8xBVnSZRXKGE+/ZuciqXtjwMMm6NzEGIOw5Ftt4nnBjtq+2DEiRBn5rKtXRbypV4Ofw59FKF/asXBwUXxgi5Xjqa4MvzlibVwq08APuoGKdcj2lulnHwY5kr+dHXZiwW5KKBy4udkTSORyJ8MyDVqA7ibbjuc3FvMF7AsHhg==

**LUIS ENRIQUE CRUZ TRUJILLO | Fecha:2022-02-14 09:38:50 | Firmante**

fGvT1U89DnksMqAWR92ogO95Ggf4N8/G8NIsG2tsEq/+s1Kx5x35I55lcJDxqtRdzboTtZRW+4jqrevKqjfxcl594i9XryaVq7b9xTcR6PMMBbrkq/6kP6Je+WsFrXX0qZQRiHYHCWKfKRJCmU3MC2Me9YrJAGmi7UBI3lk7XHDx9HB8lVRcArbc/9mqWRn/pjXKXm6LNZ0+6ry3FLDf3fopKs/2Cv0ubiwaXVQVJUXTSbGsmuoJSdsQWvx8FD6MTvnCGea6254v2uJP3grdlvfqRytI2wt2C/PjN2A6+G2fVr1fOv/ewy/SlzIAJStghJibpaw68jfkfWNGWhrg==

**MARIA DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE | Fecha:2022-02-14 13:23:27 | Firmante**

VTZSVT3TARu9g6i7wgAxmQnHsaUGt2wH9HjoTX4guMRBYOagqvz/GRxCOQaHlu99PDEx2BDP9fSGc/QnS9yRsQo2BBEwkJcP1IEvmVfIvI6lLhe+g57J13mnGIX4f3Oxeb3yb36OHuHtvYQUJRf69v9y+jQWrxNJ+NQzhgN4R8aW4OlvKXNTMQgYP+wDrYJk049wrf87T0bavAOH1MY9G+55yo2fE8hfhEKzs8A6lkCkpkZGR+n48kX8pBZY3JxFZbxvoalG/pSNiSy/srwovsnEPC6WwVLLyoXiqInGkOr2hKrKvZQbYrbmpMpyCFNKszOfX0cFseBZMxB2UxQ==

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



qH4Dlzo2u

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/INslWn4lg6c8jSrO4FVgTifgWQjqBIUb>

