



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Permutaciones de las asas de Ts1 por aquellas de la neurotoxina CsslI: análisis del plegamiento y especificidad sobre canales de sodio dependientes de voltaje

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

Presenta:

GERMÁN OBED AGUILAR CARLOS

Tutor principal

Dr. Gerardo Corzo Burguete
Instituto de Biotecnología UNAM

Miembros del comité tutor

Dr. Ismael Secundino Velázquez
Instituto de Biotecnología UNAM

Dr. Georgina Estrada Tapia
Centro de Investigación Científica de Yucatán

Cuernavaca, Mor. Noviembre, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Resumen..... | 1 |
| 1. Introducción: | 3 |
| Alacranes y los compuestos de su veneno | 3 |
| Canales de Sodio dependientes de voltaje..... | 4 |
| Toxinas que afectan Na_v | 5 |
| Mecanismo de acción de las β -neurotoxinas de alacrán..... | 7 |
| Expresión heteróloga y plegamiento de neurotoxinas de alacranes | 9 |
| 2. Antecedentes | 11 |
| <i>Tityus serrulatus</i> y la neurotoxina Ts1 | 11 |
| <i>Centruroides suffusus suffusus</i> y la neurotoxina CssII..... | 15 |
| Superficie bioactiva de las toxinas de alacrán que afectan los Na_v | 16 |
| Dicroísmo circular en toxinas β de alacrán | 17 |
| Antivenenos y producción de anticuerpos contra Ts1 – CssII | 18 |
| 3. Hipótesis..... | 19 |
| 4. Objetivos | 19 |
| 4.1 Objetivo general | 19 |
| 4.2 Objetivos específicos..... | 19 |
| 5. Materiales y Métodos | 20 |
| 5.1 Diseño de las toxinas quiméricas de Ts1..... | 20 |
| 5.1.1 Predicción de estructura y análisis de las quimeras..... | 21 |
| 5.1.2 Obtención de la toxina recombinante 6His-FXa-rTs1..... | 22 |
| 5.1.3 Diseño de los oligonucleótidos mutagénicos | 23 |
| 5.1.4 Generación de las quimeras por mutación sitio dirigida. | 23 |
| 5.2 Clonación y ligación de los insertos mutantes en el vector pQE-30 | 25 |
| 5.3 Transformación de la cepa de <i>E. coli</i> XL1Blue y purificación del vector | 25 |
| 5.4 Pruebas de expresión de las quimeras de Ts1 | 26 |
| 5.5 Obtención y purificación de las toxinas recombinantes | 27 |
| 5.6 Electroforesis de proteínas | 28 |
| 5.7 Purificación por rpHPLC | 29 |
| 5.8 Espectrometría de masas. | 29 |
| 5.9 Ensayos de plegamiento <i>in vitro</i> | 29 |

| | |
|--|----|
| 5.9.1 Plegamiento con par redox GSH/GSSG | 30 |
| 5.9.2 Plegamiento con par redox Cys/Cis | 30 |
| 5.10. Dicroísmo circular..... | 30 |
| 5.11. Ensayos de toxicidad en ratón: Inyección intracraneal | 31 |
| 5.12. Ensayos de electrofisiología..... | 31 |
| 6. Resultados y Discusión | 33 |
| 6.1. Predicción de estructura y características de las quimeras | 33 |
| 6.2. Amplificación de los genes mutantes..... | 35 |
| 6.3. Digestión y ligación al vector pQE-30..... | 36 |
| 6.4. Secuenciación de DNA..... | 37 |
| 6.5. Prueba de expresión de Ts1a en diferentes cepas de expresión..... | 37 |
| 6.6. Pruebas de expresión en la cepa Shuffle | 37 |
| 6.7. Purificación de proteínas | 39 |
| 6.8. Espectrometría de masas..... | 39 |
| 6.9. Plegamiento <i>in vitro</i> de las toxinas recombinantes reducidas..... | 40 |
| 6.9.1 Plegamiento con glutatión oxidado/reducido (GSH/GSSG) | 40 |
| 6.9.1 Plegamiento con cisteína (Cys/Cis) | 41 |
| 6.10 Dicroísmo Circular | 45 |
| 6.11 Ensayos de toxicidad en ratones CD1: Vía intracraneal..... | 46 |
| 6.12 Ensayos de electrofisiología | 47 |
| 7. Conclusiones | 50 |
| 8. Perspectivas..... | 51 |
| 9. Referencias..... | 52 |
| 10. Anexos..... | 57 |

Índice de Figuras

| | |
|---|-------|
| Figura 1.- Representación de la estructura de la subunidad α de los Na_v | p. 5 |
| Figura 2.- Alineamiento de secuencia de β -toxinas de alacrán..... | p. 7 |
| Figura 3. Modelo de atrapamiento del sensor de voltaje..... | p. 9 |
| Figura 4. Aminoácidos cruciales para la actividad de Ts1 | p. 13 |
| Figura 5. Comparación de las secuencias de Ts1 - CsxII y diseño de las quimeras..... | p. 21 |
| Figura 6. Construcción del vector pQE-30 (QIAGEN) con el gen de la toxina Ts1..... | p. 22 |
| Figura 7. Esquema de la generación de las quimeras utilizando el método de megaprimer..... | p.24 |
| Figura 8. Esquema de la purificación de las toxinas recombinantes a con resina Ni-NTA..... | p. 28 |
| Figura 9. Protocolos de electrofisiología en modalidad célula completa | p. 32 |
| Figura 10. Estructura 3D de Ts1 y predicción de la estructura terciaria de las quimeras..... | p.34 |
| Figura 11. Electroforesis de la primera reacción de PCR..... | p. 35 |
| Figura 12. Electroforesis de la segunda reacción de PCR..... | p. 35 |
| Figura 13. Digestión de insertos de los genes mutantes con las enzimas BamH1 y Pst1..... | p. 36 |
| Figura 14. PCR de colonia de las clonas transformadas con la ligación..... | p. 36 |
| Figura 15. SDS-PAGE de las pruebas de expresión en cepas M15, Origami y Shuffle..... | p. 38 |
| Figura 16. SDS-PAGE de las pruebas de expresión a diferentes condiciones en la cepa Shuffle..... | p. 38 |
| Figura 17. Perfil cromatográfico de los plegamientos realizados con GSH/GSSG..... | p. 41 |
| Figura 18. Perfil cromatográfico de los plegamientos realizados con Cys/Cis de rTs1a y rTs1b..... | p. 42 |
| Figura 19. Perfil cromatográfico de los plegamientos realizados con Cys/Cis de rTs1c y rTs1d | p. 43 |
| Figura 20. Perfil cromatográfico de los plegamientos realizados con Cys/Cis de rTs1e y rTs1f..... | p. 43 |
| Figura 21. Perfil cromatográfico del plegamiento realizado con Cys/Cis de rTs1..... | p. 44 |
| Figura 22. Espectros de dicroísmo circular de Ts1 y quimeras plegadas in vitro | p. 45 |
| Figura 23. Registros realizados con la toxina Ts1a sobre el canal Na_v 1.3..... | p. 48 |
| Figura 24. Registros realizados con la toxina Ts1a sobre el canal Na_v 1.4..... | p. 48 |
| Figura 25. Registros realizados con la toxina Ts1a sobre el canal Na_v 1.6..... | p. 48 |
| Figura 26. Registros realizados con la toxina Ts1e sobre el canal Na_v 1.3..... | p. 49 |
| Figura 27. Registros realizados con la toxina Ts1e sobre el canal Na_v 1.4..... | p. 49 |
| Figura 28. Registros realizados con la toxina Ts1e sobre el canal Na_v 1.6..... | p. 49 |

Índice de Tablas

| | |
|--|-------|
| Tabla 1. Sitios de unión a neurotoxinas en canales de sodio..... | p. 6 |
| Tabla 2. Secuencias mutadas en las quimeras de Ts1-CssII | p. 21 |
| Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos mutagénicos para la construcción de las quimeras | p. 23 |
| Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos del vector pQE-30..... | p. 24 |
| Tabla 5. Concentraciones utilizadas para los ensayos de dicroísmo circular..... | p. 31 |
| Tabla 6. Propiedades bioquímicas de las quimeras analizadas en ProtParam | p. 33 |
| Tabla 7. Rendimiento de expresión de las quimeras | p. 39 |
| Tabla 8. Masas moleculares de las quimeras de Ts1 oxidadas | p. 40 |
| Tabla 9. Resultados de ensayos de toxicidad por vía intracraneal en ratones CD1. | p. 46 |

Glosario

| | |
|-----------------|--|
| Ca _v | Canal de calcio dependientes de voltaje |
| K _v | Canal de potasio dependientes de voltaje |
| Na _v | Canal de sodio dependientes de voltaje |
| AahIT | Toxina beta anti-insecto de <i>Androctonus australis hector</i> |
| BmKIT | Toxina beta anti-insecto de <i>Buthus martensi</i> |
| Bj-xtrIT | Toxina beta anti-insecto de <i>Buthotus judaicus</i> |
| BjIT2 | Toxina beta depresora anti-insecto de <i>Buthotus judaicus</i> |
| BotIT2 | Toxina beta depresora anti-insecto de <i>Buthotus judaicus</i> |
| CssII | Toxina beta de <i>Centruroides suffusus suffusus</i> |
| CssIV | Toxina beta de <i>Centruroides suffusus suffusus</i> |
| CeII9 | Toxina beta de <i>Centruroides elegans</i> |
| ClI2 | Toxina beta de <i>Centruroides limpidus limpidus</i> |
| Cn2 | Toxina beta de <i>Centruroides noxius</i> |
| Cn8 | Toxina beta de <i>Centruroides noxius</i> |
| LqhB1 | Toxina beta de <i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i> |
| LqhIT2 | Toxina beta depresora anti-insecto de <i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i> |
| Ts1 | Toxina beta de <i>Tityus serrulatus</i> |
| Tz1 | Toxina beta de <i>Tityus zulianus</i> |
| <i>BamHI</i> | Enzima de restricción de ADN, escinde la secuencia 5'GGATCC3', originaria de la bacteria <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> |
| <i>PstI</i> | Enzima de restricción de ADN, escinde la secuencia 5'CTGCAG3', originaria de la bacteria <i>Providencia stuarti</i> |

| | |
|-------------------|---|
| DL ₅₀ | Dosis letal media: es la cantidad de una sustancia que ocasiona la muerte del 50% de una población de individuos. |
| IC ₅₀ | Concentración inhibitoria media; concentración de un compuesto necesaria para reducir una actividad biológica <i>in vitro</i> , en un 50 por ciento. |
| NaSctx | Toxinas de alacrán que afectan los canales Na _v |
| KSctx | Toxinas de alacrán que afectan los canales K _v |
| CNBr | Bromuro de cianógeno |
| dNTP's | Desoxinucleótidos trifosfatos |
| OD ₆₀₀ | Densidad Óptica cuantificada a 600 nm |
| DTT | Ditiotreitol |
| GSH | Glutación (Glutación reducido) |
| GSSG | Glutación Disulfuro (Glutación oxidado) |
| HEPES | Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacilil-(1)] etanosulfónico |
| HPLC | Cromatografía Líquida de Alta Resolución |
| IC | Administración Intracraneal. |
| IPTG | Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido |
| Ni-NTA | Complejo organometálico formado por Ácido Nitriolotriacético y Níquel. |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>) |
| PDB | <i>Protein Data Bank</i> . Se hace mención como PDB a un tipo de archivos que contiene información sobre estructuras en tercera dimensión de proteínas. |
| PSA | Persulfato de amonio |
| rpHPLC | Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SDS | Dodecilsulfato de Sodio |
| SDS-PAGE | Electroforesis en Geles de Poliacrilamida |
| TFA | Ácido Trifluoroacético. |
| TFE | 2,2,2-Trifluoroetanol |
| T _m | Temperatura de Fusión del ADN, a esta temperatura las hebras del ADN se separan en cadenas independientes |

Resumen

Las toxinas de alacranes que afectan canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v) son los principales agentes responsables de los efectos neurotóxicos del envenenamiento por su picadura. Se consideran péptidos de cadena larga y se clasifican en α y β - neurotoxinas, que reconocen los Na_v s de insectos y mamíferos y producen una despolarización anómala en células excitables del sistema nervioso (Quintero-Hernández *et al.*, 2013).

Aunque durante muchos años las toxinas nativas fueron las únicas herramientas disponibles para estudiar sus mecanismos moleculares (De La Vega & Possani, 2005), la elucidación del modo de acción, la estructura tridimensional y superficie bioactiva de estas toxinas se aceleró notablemente una vez que se desarrollaron los métodos para la expresión de proteínas en sistemas heterólogos (p.ej. *E. coli*, *S. cerevisiae*) (Gurevitz & Gueta, 2016). Desafortunadamente, la obtención de algunas toxinas por metodologías recombinantes ha sido complicada, debido a la dificultad inherente de su plegamiento en sistemas de expresión heterólogos que no favorecen la correcta formación de puentes disulfuro, a la vez que tienden a agregarse en cuerpos de inclusión dando como resultado una variedad de isoformas inactivas, lo que implica pasos extra de purificación y un posterior proceso de renaturalización *in vitro* para que la molécula sea activa.

Uno de los puntos más importantes para la expresión heteróloga de las toxinas de alacrán es encontrar las condiciones de plegamiento correctas, especialmente para la formación de puentes disulfuro necesarios para que las moléculas recombinantes sean biológicamente activas (Estrada *et al.*, 2007). Desafortunadamente, cada toxina reacciona de manera independiente y única, al ser sometida a condiciones de plegamiento *in vitro*, siendo algunas de ellas (p.ej. Ts1) especialmente difíciles de plegar, limitando la posible aplicación de estas toxinas recombinantes.

En nuestro grupo de investigación se ha trabajado con la expresión heteróloga y el plegamiento de toxinas y péptidos ricos en puentes disulfuro, observando que algunas toxinas presentan un plegamiento *in vitro* favorable como la β -neurotoxina C_{ss}II de *Centruroides suffusus suffusus*, esta neurotoxina ha servido como modelo de plegamiento *in vitro* y ha sido estudiada ampliamente por diversos grupos de investigación. Por otro lado, la β -neurotoxina Ts1 de *Tityus serrulatus*, pese a ser una de las toxinas más estudiadas en los últimos cincuenta

años (Martin-Eauclaire *et al.*, 2018), poco se ha investigado de su expresión heteróloga (Mendes *et al.*, 2008) y su plegamiento *in vitro*.

Las principales diferencias entre las toxinas CssII y Ts1 en su secuencia primaria se encuentran entre las asas (regiones de aminoácidos expuestas al medio externo de la molécula localizadas entre las cisteínas conservadas) que conforman una estructura desordenada que aparentemente le brindan afinidad y especificidad hacia los diferentes subtipos de Na_v (Cohen *et al.*, 2005). Por lo tanto, en este proyecto se realizaron permutaciones de las asas de las toxinas Ts1 y CssII, generando seis construcciones quiméricas con naturaleza de ambas toxinas y expresándolas en un sistema bacteriano (*E. coli*), para posteriormente analizar su plegamiento *in vitro* y estudiar cómo estos intercambios afectan la capacidad de las toxinas de alcanzar su conformación activa.

Como resultado se logró expresar y plegar *in vitro* estas quimeras cuya estabilidad estructural fue analizada mediante dicroísmo circular y se analizaron sus características bioquímicas como su toxicidad *in vivo* en modelo de ratón (CD1) y su efecto en los canales Na_v 1.3, 1.4 y 1.6 de mamífero mediante ensayos de electrofisiología.

1. Introducción:

Alacranes y los compuestos de su veneno

Los alacranes son artrópodos venenosos de la clase *Arachnida*, orden *Scorpiones*. Desde el punto de vista médico, la familia *Buthidae* es la más importante debido a que en ella se encuentran 33 de las 34 especies de alacranes venenosos para humanos (Bordon *et al.*, 2015), y cuenta con más de 500 especies distribuidas en todo el mundo (Cologna *et al.*, 2009). Sus venenos son extremadamente versátiles, siendo efectivos tanto para paralizar a sus presas como para defenderse. Se ha sugerido que sus efectos sobresalientes y dramáticos se deben a la fuerte conservación de receptores celulares como los canales iónicos dependientes de voltaje a través de diversos taxones.

El análisis bioquímico de los venenos de alacrán muestra que están compuestos por una mezcla de componentes tóxicos (neurotoxinas altamente específicas para canales iónicos de células excitables) y no tóxicos (mucopolisacáridos, hialuronidasas, fosfolipasas, inhibidores de proteasa y bioaminas como serotonina e histamina). La fracción tóxica del veneno ha sido la más estudiada debido a su importancia médica (Gopalakrishnakone *et al.*, 2015).

Estos venenos son particularmente ricos en proteínas y péptidos neurotóxicos, que interactúan específicamente en canales iónicos dependientes de voltaje de sodio y potasio en membranas de células excitables (Cologna *et al.*, 2009). Se ha demostrado que varios de los péptidos de cadena larga son los mayores responsables de los efectos neurotóxicos, debido a su alta afinidad a los Na_v , y causar un deterioro en su función (Rodríguez & Possani, 2005).

Estas toxinas han sido utilizadas como sondas moleculares para estudiar la estructura y función de los Na_v , así como para estudiar sus mecanismos de acción, aislarlos de sus tejidos nativos y determinar su papel fisiológico en canalopatías, como epilepsia y arritmias cardíacas (Bordon *et al.*, 2015; Deuis *et al.*, 2017).

Canales de Sodio dependientes de voltaje

Los canales iónicos dependientes de voltaje de sodio (Na_v), calcio (Ca_v) y potasio (K_v) participan en la señalización eléctrica de células excitables. Son elementos críticos necesarios para la generación y conducción del potencial de acción. Dado que los canales iónicos juegan un papel importante en muchos procesos fisiológicos, son objetivos moleculares para una amplia gama de neurotoxinas (Bordon *et al.*, 2015). En particular, los Na_v son una gran superfamilia de proteínas transmembranales que juegan un papel clave en la iniciación y propagación del potencial de acción en las neuronas, así como en la mayoría de las células eléctricamente excitables (Cologna *et al.*, 2009). Los subtipos de este tipo de canales iónicos han sido identificados por registros electrofisiológicos, purificación bioquímica y clonación molecular. En mamíferos se han identificado y expresado funcionalmente nueve isoformas de Na_v denominados Na_v 1.1 a 1.9, con una identidad entre 50 y 90% en su secuencia primaria, sus respectivos genes han sido localizados en cromosomas de humano y de ratón (Goldin *et al.*, 2000; Goldin, 1999), mientras que se cree que puedan existir más de 100 Na_v en insectos, debido a un splicing alternativo y edición de RNA. Los Na_v de insecto están altamente conservados entre sí, pero poseen una baja identidad a los Na_v de mamíferos (Pedraza & Possani, 2013).

Los Na_v están compuestos por una subunidad α formadora de poros de 260 kDa, la cual puede estar asociada con una o dos subunidades β auxiliares (Figura 1). La subunidad α está compuesta de aproximadamente 2,000 aminoácidos organizados en cuatro dominios homólogos (D1-D4), cada uno de los cuales contiene seis segmentos transmembranales (S1-S6) y un segmento reentrante de membrana (SS1/SS2) conectados por asas internas y externas. Los segmentos S4 contienen 4-8 residuos cargados positivamente a intervalos de cada 3 residuos que sirven como sensores e inician la activación dependiente de voltaje de los Na_v moviéndose hacia el exterior bajo la influencia del campo eléctrico en la membrana celular. La inactivación está mediada por el lazo intracelular corto que conecta los dominios D1 y D4. Aunque no son estrictamente necesarias para el funcionamiento del canal, la coexpresión de subunidades β modulan la cinética y la dependencia de voltaje para la activación e inactivación, y poseen un dominio tipo inmunoglobulina extracelular que puede servir como moléculas de adhesión que interactúan con proteínas de la matriz extracelular (Catterall, 2014; Cestèle *et al.*, 1998).

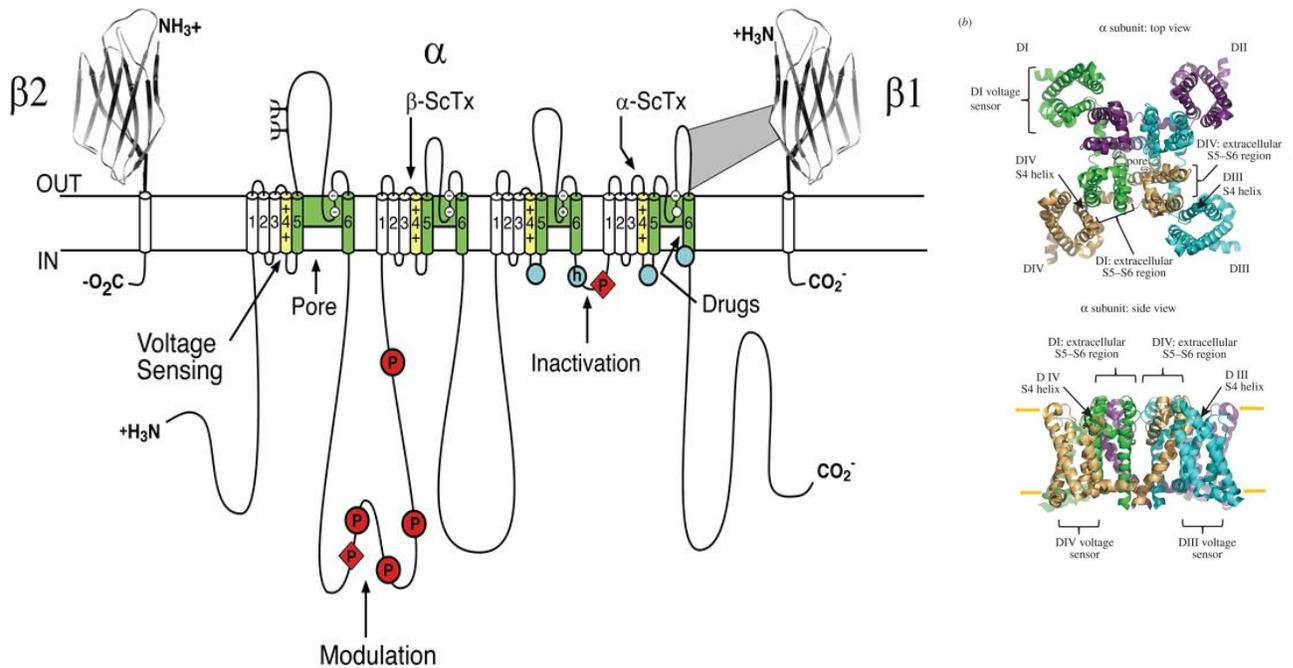


Figura 1.- Representación de la estructura de la subunidad α de los Nav . Tomado de Catterall, 2012. Los cilindros representan los segmentos de α -hélices, las líneas representan la cadena polipeptídica de cada subunidad con sus sitios de probables modificaciones postraduccionales. α -ScTx y β -ScTx representan sitios de unión (sitio 3 y sitio 4 respectivamente) de neurotoxinas de alacrán.

Toxinas que afectan Nav

Debido al papel fundamental que tienen los Nav en el correcto funcionamiento de neuronas y células musculares, una gran variedad de organismos ha desarrollado venenos, aparentemente de manera independiente, cuyas toxinas presentan propiedades similares y que interactúan con la unidad α de estos canales. Entre estos se encuentran péptidos aislados del veneno de alacranes, arañas, anémonas y caracoles marinos. Se han propuesto al menos ocho sitios de unión en los Nav (sitios 1-8), de los cuales seis son receptores de varias toxinas que inhiben o modulan la apertura de los canales Nav (Tabla 1) (Deuis *et al.*, 2017; French & Terlau, 2004). La interacción de las toxinas con los canales Nav puede ocurrir de dos maneras distintas, ya sea mediante bloqueo cuando la toxina ocluye físicamente el poro del canal inhibiendo el flujo de sodio, o mediante la modulación del canal por la toxina, modificando su cinética de activación y la dependencia de voltaje (Stevens *et al.*, 2011).

Tabla 1. Sitios de unión a neurotoxinas en canales de sodio. Modificado de Stevens *et al.* 2011

| Sitio | Neurotoxinas | Ejemplos | Péptido | Sitio de unión | Efecto | |
|-------|---|---|--------------|----------------|---|---|
| 1 | Toxinas Guanidino | Tetradotoxina (TTX) | - | DI-IV | Boqueo de la conducción de Na ⁺ | |
| | μ -Conotoxinas | Saxitoxina (STX) KIIIA, SIIIA, PIIIA | - Si | S5-S6 | | |
| 2 | Toxinas liposolubles pequeñas | Batracotoxina | - | DI DIV S6 | Cambio negativo en la activación dependiente de voltaje | |
| | | Veratridina | - | | Retardo de la inactivación | |
| | | Grayanotoxina Aconitina | - | | Boqueo de la conducción de Na ⁺ Alteración de la selectividad | |
| 3 | Toxinas α de alacrán | AaH II, LqHaIT, BMK M1 | Si | DIV S3-S4 | Retardo de la inactivación. | |
| | Toxinas de anemona | ATX-II, AFTII | Si | | | |
| 4 | Toxinas β de alacrán | CssIV, Ts1, AaHIT | Si | DII S3-S4 | Cambio negativo en la activación dependiente de voltaje. | |
| | Toxinas β de araña | Magi5, HWTX-IV MrVIA | Si | | | |
| 5 | μ O-conotoxinas | Compuestos de poliéter cíclicos | Brevetoxinas | - | DI S6 | Cambio negativo en la activación dependiente de voltaje |
| | | | Ciguatoxinas | - | | Retardo de la inactivación |
| 6 | δ -Conotoxinas | | Si | DIV S4 | Retardo de la inactivación | |
| 7 | Piretroides | DDT, Deltametrina | - | DII-DIII | Retardo de la inactivación | |
| LA | Anticonvulsivos Antiarrítmicos Antidepresivos | Lidocaina | - | DIV S6 | Bloqueo de la conducción de Na ⁺ | |

En el caso del veneno de alacrán, las toxinas que afectan estos canales son las proteínas más reactivas y los principales agentes responsables de los efectos neurotóxicos del envenenamiento. Se consideran péptidos de cadena larga y se pueden clasificar en dos clases: α - y β -neurotoxinas. (Quintero-Hernández *et al.*, 2013).

Las secuencias de aminoácidos de las toxinas α y β de alacrán muestran un grado variable de identidad. Hay varios residuos estrictamente conservados en la estructura primaria de estas toxinas, incluyendo ocho cisteínas formando puentes disulfuro. La interacción entre estas toxinas y el canal se produce a través de la superficie hidrofóbica de la toxina compuesta por aminoácidos aromáticos y alifáticos (Cologna *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2003).

Todas las estructuras tridimensionales determinadas de estas toxinas muestran un núcleo estructural común y conservado con una topología $\beta\alpha\beta\beta$, con asas altamente variables conectando los elementos estructurales secundarios (Mouhat *et al.*, 2004). Una excepción a esta

topología general es la toxina excitatoria de insectos Bj-xtrIT de *Buthotus judaicus*, donde se observan dos α - hélices cortas en vez de una (Oren *et al.*, 1998). Entre la diversidad de este grupo de toxinas pueden encontrarse inserciones, deleciones y mutaciones en las asas de su estructura que les confieren afinidad hacia diversos subtipos de Na_v de mamíferos e insectos.

Mecanismo de acción de las β -neurotoxinas de alacrán

Las toxinas β de alacrán (Figura 2), son polipéptidos de 6,500-8,500 Da con 58-76 residuos de longitud. Estas toxinas se unen al sitio 4 de los Na_v e inducen un cambio en la dependencia de voltaje de activación del canal hacia potenciales más negativos, así como una reducción del pico de amplitud en la corriente de sodio. Este cambio en la dependencia del voltaje para la activación del canal Na_v hace que se abran en, o cerca de, el potencial de reposo. El decremento en el potencial de activación del canal provoca una apertura repetitiva y constante del canal y, en consecuencia, aumenta el flujo de sodio en las terminales nerviosas incrementando significativamente la liberación de neurotransmisores presinápticos, entre los cuales se incluyen el ácido gamma amino-butírico, la acetilcolina, la dopamina y el glutamato (Cestèle *et al.*, 2006; Pedraza & Possani, 2013).

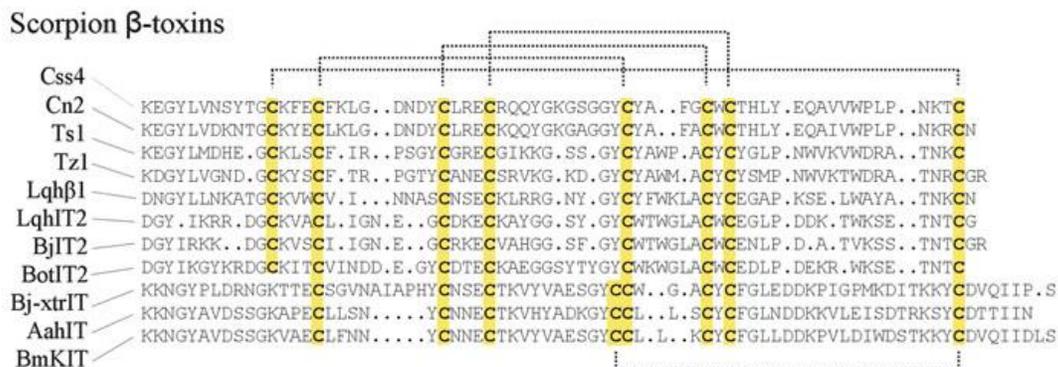


Figura 2.- Alineamiento de secuencia de β -toxinas de alacrán. Las secuencias fueron alineadas de acuerdo a los residuos de cisteína conservados (en amarillo), y se muestran los puentes disulfuro formados entre estos residuos. Cns *Centruroides suffusus suffusus*, Cn *Centruroides noxius*, Ts *Tityus serrulatus*, Tz *Tityus zulianus*, Lqh *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, Bj *Buthotus judaicus* (actualmente llamado *Hottentotta judaica*), Bot *Buthus occitanus tunetanus*, Aah *Androctonus australis hector*, Bm *Buthus martensi*. Tomado de Gurevitz *et al.*, 2013.

La clasificación de β -toxinas del alacrán se divide además en varios subgrupos según su preferencia por los Na_v de insectos y/o de mamíferos y los síntomas que evocan: (i) β -toxinas altamente tóxicas para mamíferos; ii) β -toxinas excitatorias anti-insectos que carecen de cualquier actividad en los mamíferos; (iii) β -toxinas depresoras de insectos que inducen parálisis

flácida tras su inyección en insecto, y (iv) β -toxinas activas tanto en N_{av} de insectos como de mamíferos (Stewart *et al.*, 1998).

Por otro lado, una serie de estudios extensivos ha sugerido que existen cuatro secciones funcionales comunes entre las toxinas β . 1) una región central denominada farmacóforo involucrada en la unión al receptor compuesta por un residuo cargado negativamente localizado en la α -hélice que se encuentra flanqueado por varios residuos hidrofóbicos; 2) un dominio de residuos aromáticos expuestos que son críticos para la actividad y se encuentran localizados principalmente en la hebras $\beta 1$ y $\beta 2$; 3) algunos residuos localizados al centro de la región N-terminal involucrados en la unión y anclaje del sensor de voltaje; y 4) ciertos residuos en la región C-terminal que incrementan la afinidad al sitio de unión al receptor. Sin embargo, las principales diferencias entre estas toxinas se encuentran localizadas en las asas con estructura desordenada que conectan a los elementos de estructura secundaria al núcleo de la toxina, y en el arreglo de la región C-terminal que está determinado principalmente por la formación del cuarto puente disulfuro, por lo cual cada toxina posee un patrón particular en la localización de regiones funcionales. Lo que explica la alta selectividad a blancos moleculares específicos (Pedraza & Possani, 2013).

En estudios realizados con la neurotoxina C β SSIV en el canal de sodio rNa $_v$ 1.2 (Cestèle *et al.*, 1998) se identificaron residuos importantes (Glu837, Leu840, Gly845) para su interacción en el asa S3-S4 del dominio II de este canal (D2S3-S4), los cuales actúan como sensor de voltaje para su activación. En base a estos resultados se propuso un modelo de “atrapamiento del sensor de voltaje” (Figura 3) para explicar la acción de las toxinas β . En este modelo, la toxina se une inicialmente al canal cuando se encuentra en un potencial de membrana de reposo y tras una fuerte despolarización, el segmento D2S3-S4, que sirve como sensor de voltaje, se mueve hacia la parte externa del canal asociándose con otro segmento de la toxina previamente unida, atrapándola en una posición externa activada. Este atrapamiento del sensor de voltaje implica un cambio negativo de dependencia de voltaje de activación, lo que normalmente se asocia con un efecto de toxina β (Cohen *et al.*, 2004).

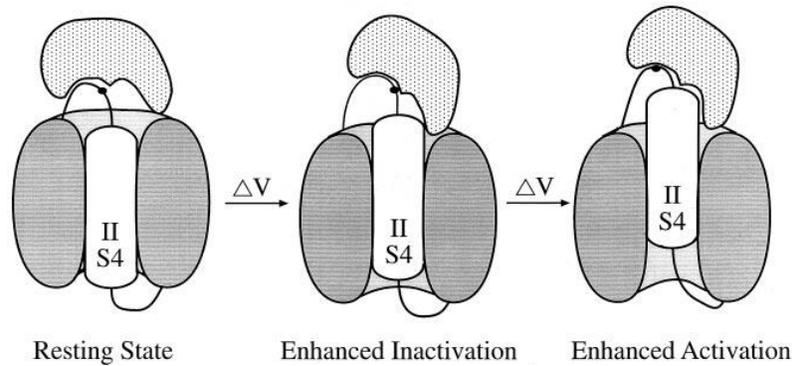


Figura 3. Modelo de atrapamiento del sensor de voltaje. Las tres imágenes muestran una toxina β cuando se une al canal en estado de reposo (izquierda), parcialmente (centro) y totalmente activado (derecha). Cuando el canal recibe un estímulo despolarizante, el sensor de voltaje D2S4 se desplazan hacia al exterior, lo que incrementa la superficie de contacto del sensor con la toxina, atrapando al sensor de voltaje y manteniéndolo en el estado activo, previniendo su reingreso al canal. Tomada de Cestéle *et al.*, 1998.

Expresión heteróloga y plegamiento de neurotoxinas de alacranes

Las toxinas de alacranes son una interesante herramienta para el estudio de receptores celulares, especialmente para los K_v y Na_v . Existen tres principales formas de obtener estas toxinas: por extracción natural del veneno, síntesis química y expresión heteróloga. Debido a la dificultad que a veces representa el mantener especímenes vivos para su ordeña, y al elevado costo de la síntesis química de estos componentes, la ingeniería genética se ha convertido en una importante herramienta para producir grandes cantidades de estos péptidos de interés con un costo relativamente bajo. Además de la posibilidad de expresar la forma “nativa”, también se pueden producir variantes de ésta utilizando mutagénesis sitio-dirigida (Quintero-Hernández *et al.*, 2011). La producción exitosa de una toxina de alacrán conlleva la elección de un sistema que permita el correcto plegamiento de esta, con una formación precisa de sus puentes disulfuro, asegurando con ello la efectividad de su actividad biológica.

La mayoría (85%) de los componentes proteicos del veneno de alacranes (de los cuales las neurotoxinas representan el 69%) han sido expresados utilizando *Escherichia coli* como sistema heterólogo, lo cual es un reflejo de las ventajas de este sistema microbiano de expresión accesible técnicamente, rápido y de bajo costo, con condiciones de cultivo sencillas, fácil-

mente escalable, además de ser un organismo sencillo de manejar para el cual se han desarrollado múltiples cepas y vectores, así como protocolos muy detallados para su manipulación genética (Amorim *et al.*, 2018; Terpe, 2006).

Sin embargo, este sistema también presenta importantes desventajas, ya que la presencia de enzimas reductoras (thioredoxinas y glutaredoxinas) en el citoplasma nativo de *E. coli* no favorecen la producción de proteínas con puentes disulfuro. Aunque estos puentes disulfuro se puedan formar de forma temporal, estos son rápidamente reducidos por las numerosas reductasas y moléculas pequeñas presentes en el citoplasma (Berkmen, 2012), lo que resulta en la agregación de ciertas proteínas ricas en puentes disulfuro (Baneyx & Mujacic, 2004). Por otro lado, el uso de codones de bacterias y de arácnidos difiere, lo que a veces se refleja en bajos rendimientos de expresión o la obtención de especies truncadas, por lo que, en ocasiones la secuencia codificante clonada obtenida a partir de cDNA no puede ser utilizada directamente para la expresión y un nuevo gen debe ser ensamblado con el uso preferencia de codones para *E. coli*.

2. Antecedentes

El estudio de las toxinas de alacrán que afectan a los Na_v recibió en su momento gran atención debido a la importancia médica y al interés en caracterizar sus efectos farmacológicos a nivel molecular (De La Vega & Possani, 2005). Debido al gran número de β -toxinas y sus diversos efectos documentados, la disección molecular de su acción farmacológica ha sido una meta perseguida durante mucho tiempo. El estudio de estas toxinas se aceleró notablemente una vez que se desarrollaron los métodos para la expresión de estas toxinas en sistemas heterólogos (p.ej. *E. coli*, *S. cerevisiae*) (Gurevitz & Gueta, 2016).

***Tityus serrulatus* y la neurotoxina Ts1**

Tityus serrulatus es considerado el alacrán más peligroso de Brasil. Está ampliamente distribuido, especialmente en la región sureste del país, y es responsable del mayor número de accidentes graves en la región. La picadura de *T. serrulatus* provoca dolor local y, dependiendo de la severidad del envenenamiento, parestesia, sudoración, vómitos, hipertensión, manifestaciones neurológicas, alteración entre agitación y agotamiento, alteraciones cardiorespiratorias, edema pulmonar y fallo circulatorio que desencadenan la muerte (Bordon *et al.*, 2015).

La sintomatología del envenenamiento de *Tityus serrulatus* es resultado principalmente de efectos de neurotoxinas en canales iónicos de sodio (NaSctx) y potasio (KSctx), causando una liberación masiva de neurotransmisores como catecolaminas y acetilcolina entre otros, conduciendo a la estimulación del sistema nervioso autónomo (Cologna *et al.*, 2009). Su veneno es una mezcla compleja compuesta de sustancias como mucosa insoluble, proteínas neurotóxicas pequeñas compuestas de 60 a 70 (NaSctx) o 30 a 42 (KSctx) residuos de aminoácidos que afectan respectivamente a los Na_v y K_v en membranas excitables, aminas bioactivas, hipotensinas, proteinasas, hialuronidasa, inhibidor de la calicreína, proteínas alergénicas y otros péptidos cuyas funciones biológicas aún no están determinadas (Bordon *et al.*, 2015).

Ts1 (también conocida como TsTX-I; toxina γ ; Ts VII) es la principal toxina del veneno de *Tityus serrulatus*, que representa alrededor del 15% (Cologna *et al.*, 2009), aunque se ha

encontrado que puede representar hasta el 22% del veneno soluble (Hassani *et al.*, 1999). Fue la primera toxina aislada y caracterizada de *Tityus serrulatus*. Pertenece a la familia de las β -toxinas y fue definida inicialmente como una toxina β de mamífero al competir con la β -toxina de referencia C_{ss}II purificada del alacrán mexicano *Centruroides suffusus suffusus* en la unión de canales Na_v presentes en cerebro de ratón (Barhanin *et al.*, 1982). Sin embargo, Ts1 también fue capaz de competir con AahIT, una toxina excitatoria anti-insecto proveniente del alacrán africano *Androctonus australis Hector* por su unión a diversos canales Na_v de insectos (De Lima *et al.*, 1986), por lo que se catalogó como β -toxina del tipo iv o β -like, es decir, activa tanto en Na_v de insectos como de mamíferos, razón por la cual ha sido objeto de intensa investigación.

Esta toxina está compuesta por 61 aminoácidos interconectados por cuatro puentes disulfuro y amidada en su extremo C-terminal, diez de sus residuos están cargados positivamente (Arg, Lys, His); cinco negativamente (Asp, Glu) y posee nueve residuos aromáticos (Trp, Tyr, Phe). La secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos de cDNA muestra que el precursor de la toxina contiene un péptido señal de 20 residuos, la toxina madura y un segmento adicional de Gly-Lys-Lys en la región C-terminal (Coelho *et al.*, 2014). Las modificaciones postraduccionales de Ts1 implican la eliminación del péptido señal, la escisión de residuos de lisina C-terminales por una carboxipeptidasa, la amidación de la toxina remanente por una peptidil-glicina monooxigenasa α -amidante que escinde el residuo de glicina y amida la cisteína en el extremo C-terminal y la formación de cuatro puentes disulfuro entre las cisteínas C1-C8, C2-C5, C3-C6 y C4-C7 (Martin-Eauclaire *et al.*, 1992).

Mediante estudios de modificación química (Figura 4) de los residuos de lisina y tirosina llevados a cabo por Hassani *et al.*, en 1999 se definió que la acetilación de esta toxina resulta en una variante monoacetilada en la lisina 12, la cual conlleva tanto a una pérdida de la toxicidad en modelo de ratón y la afinidad de unión en preparaciones de cerebro de ratón y sinaptosoma de cucaracha. Por otro lado, la sulfenilación química de la toxina Ts1 brindaba tres variantes modificadas en los residuos Trp39, Trp50 y Trp54. La modificación de Trp39 y Trp54 implica cambios similares a los observados con la acetilación de Lys12, por otra parte, el Trp50 afectó únicamente la toxicidad de forma moderada en ratón sin afectar sus propiedades de unión (Hassani *et al.*, 1999). Estos resultados indican además que los residuos

analizados, al ser susceptible a la modificación química, se encuentran accesibles al solvente en la superficie molecular de la toxina además que aquellos importantes para la actividad y unión se encuentran cerca entre sí en una región hidrofóbica conservada.

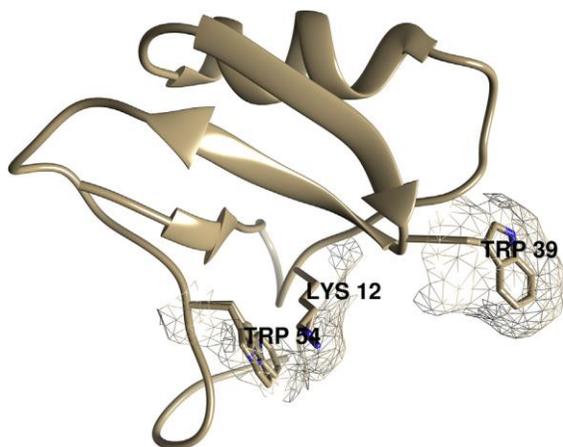


Figura 4. Aminoácidos cruciales para la actividad de Ts1, determinados por modificación química: K12 (acetilación); W39, W54 (sulfenilación). Tomado de Eauc Claire, 2018.

La estructura tridimensional de Ts1 se ha determinado a una resolución de 1.16 Å por cristalografía de rayos X (PDB: 1NP1) (Pinheiro *et al.*, 2003; Polikarpov *et al.*, 1999). En este modelo 3D, la lisina 12 de Ts1 se sobrepone con la lisina 13 de las toxinas CsEv3 y CssiI, lo que sugiere que Ts1 podría unirse por una interacción idéntica o muy similar a la de las toxinas de *Centruroides a* su sitio de unión en el canal.

Estudios realizados en 2007 mostraron que la unión de Ts1 a los canales Na_v 1.4 y Na_v 1.2 atrapa e inmoviliza el sensor de voltaje del dominio II en un estado activado y, de esta forma, propicia la activación en los otros sensores de voltaje del canal provocando cambios en la activación dependiente de voltaje hacia potenciales hiperpolarizantes. Estos hallazgos revelan el comportamiento cooperativo o acoplado de los sensores de voltaje en los Na_v y explican cómo Ts1 afecta el proceso de activación dependiente de voltaje (Bosmans, Martin Eauc laire, & Tytgat, 2007; Campos, Chanda, Beirão, & Bezanilla, 2007).

En un estudio más detallado realizado por Peigneur y colaboradores en 2015 se estudiaron los efectos de la toxina Ts1 sobre un amplia variedad de canales de sodio (Na_v 1.1 a 1.8 de mamífero) expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*. En este estudio observaron que, a 100 nM, Ts1 modificó la cinética de activación de los Na_v 1.2, 1.3, 1.4 y 1.6, mientras que no mostró actividad alguna en los Na_v 1.1, 1.7 y 1.8. En estos experimentos, Ts1 cambió el punto

medio de activación de estos canales hacia potenciales más negativos, causando que se abrieran a potenciales de reposo, el efecto clásico de las toxinas β (Peigneur *et al.*, 2015). También se observó que Ts1 tuvo un efecto inhibitorio en la corriente de sodio en el canal Na_v 1.5, el cual es un canal de músculo cardíaco, sobre esto se ha reportado que algunas β -toxinas son capaces de producir un efecto bloqueador en el canal Na_v 1.5 sin modular la cinética de activación dependiente de voltaje, este efecto particular solo se ha reportado este canal de sodio.

Pese a ser la toxina más estudiada del veneno de *Tityus serrultus*, existen pocos estudios sobre su expresión heteróloga. Mendes *et al.* (2008) expresaron la toxina Ts1 recombinante en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) utilizando el vector pET-11a para su uso como inmunógeno en la generación de anticuerpos de conejo, sin embargo, sus estudios se limitaron al uso de cuerpos de inclusión solubilizados sin ahondar en la estructura y el plegamiento de la toxina recombinante. En nuestro grupo, esta toxina se ha expresado en *E. coli* obteniéndola en forma insoluble como cuerpos de inclusión y en múltiples isoformas inactivas y, pese a que se han realizado estudios sobre su plegamiento por Hernández-Salgado (datos no publicados) las condiciones para su correcto plegamiento *in vitro* no habían sido bien definidas, limitando la investigación de esta toxina recombinante.

Como alternativa a la obtención de esta toxina, Dang y colaboradores establecieron un sistema para su obtención mediante la síntesis química de fragmentos de Ts1 y posteriormente su ligación en los sitios Tyr22-Cys23 y Ala41-Cys42. En este mismo grupo estudiaron diversas condiciones de plegamiento hasta obtener una isoforma con actividad biológica, la cual aparentemente mantenía su actividad comparada con la toxina nativa al analizar su efecto sobre el canal Na_v 1.4 (Dang *et al.*, 2014).

Recientemente, y posterior a la realización de los estudios de esta tesis, se publicó un artículo sobre la producción de Ts1 recombinante y su estructura/función por RMN y ensayos de electrofisiología sobre los canales Na_v 1.4 y 1.5 donde a partir de cuerpos de inclusión se realizó el plegamiento *in vitro* de esta toxina resaltando las dificultades inherentes a la expresión recombinante de esta particular toxina (Shenkarev *et al.*, 2019).

Aunque Ts1 es la toxina más abundante en el veneno de *Tityus serrulatus*, la α -toxina Ts3 es por lo menos 10 veces más activa por administración subcutánea (s.c.), la cual es la vía que

se considera como la ruta de inyección por picadura de alacrán y por lo tanto la principal responsable de la letalidad generada en mamíferos. Ts1 en cambio es mucho más activa que Ts3 cuando es administrada por la vía intracerebroventricular (intracraneal; i.c.v.), y junto con la toxina AaHIT de *Androctonus australis Hector* ($LD_{50} = 0.5\text{ng}/20\text{g}$ ratón), Ts1 es la toxina más letal descrita hasta la fecha cuando es administrada por esta vía (Eauclaire *et al.*, 2018).

***Centruroides suffusus suffusus* y la neurotoxina C_{ss}II**

C_{ss}II es la toxina más abundante (2.6 %) del veneno de *Centruroides suffusus suffusus*, un alacrán de la familia *Buthidae* que causa un grave problema de Salud Pública en el área centro y norte de México. C_{ss}II es un péptido compuesto por 66 aminoácidos interconectados por cuatro puentes disulfuro que tiene como blanco a los Na_v 1.6 de mamífero, se encuentra amidado en su extremo C-terminal, una característica molecular compartida por muchas toxinas de alacrán que mejora su afinidad al sitio receptor del Na_v y su toxicidad en modelo de ratón (Estrada *et al.*, 2007; Hernández-Salgado *et al.*, 2009).

El gen de la β -toxina C_{ss}II fue clonado a partir de cDNA y expresado de forma recombinante (rC_{ss}II) por (Estrada *et al.*, 2007) obteniendo varias fracciones peptídicas (múltiples formas oxidadas con distintos arreglos de puentes disulfuro). Estas isoformas de rC_{ss}II fueron reducidas y posteriormente replegadas *in vitro* para generar un único componente oxidado de rC_{ss}II. Esta toxina recombinante demostró poseer toxicidad similar a la C_{ss}II nativa cuando fue inyectada por vía intracraneal en ratones, además tanto nC_{ss}II como rC_{ss}II demostraron las propiedades electrofisiológicas típicas de las toxinas β al analizar su efecto sobre Na_v 1.6. Además, en un estudio posterior se demostró que la adición cargas positivas en el extremo C-terminal mediante la sustitución de una treonina y una asparagina que flanquean a la cisteína 65 por una arginina [T64R/N66R] incrementó su afinidad por el Na_v 1.6, atribuyendo a la amidación del extremo C-terminal un papel importante en la toxicidad de C_{ss}II (Estrada *et al.*, 2011) y otras toxinas de alacrán.

La estructura tridimensional de esta toxina fue elucidada en 2012 (Saucedo *et al.*, 2012) en su forma nativa y recombinante por resonancia magnética nuclear en un espectro NOESY

2D, utilizando la estructura de la toxina Cn2 previamente descrita como referencia debido a la identidad entre ambas toxinas (89%). En este estudio, la mayoría de los desplazamientos químicos de nCssII y HisrCssII se conservan sin cambios significativos, lo que confirma un correcto plegamiento y formación de puentes disulfuro de la toxina recombinante, también en este estudio determinaron indirectamente el plegamiento de CssII al analizar su efecto sobre los canales Na_v 1.5 y Na_v 1.6.

Schiavon *et al.*, en 2012 realizaron ensayos electrofisiológicos con diferentes toxinas β de alacranes del género *Centruroides* (CssII, CII1, CII2 and Cn8) en los subtipos Na_v 1.1 a 1.7 expresados constitutivamente en células HEK293, encontrando que estas toxinas afectan diferencialmente las distintas isoformas de Na_v s pese a compartir un alto grado de conservación (78% a 89%). En general, las toxinas de este género afectaron preferencialmente a las isoformas expresadas en sistema nervioso central (1.1, 1.2 y 1.6) con una clara preferencia hacia el subtipo 1.6, por lo que realizaron un estudio más detallado sobre este canal, donde se determinó la IC_{50} s de las toxinas: 67.7 ± 8.2 nM (Cn8), 307 ± 18 nM (CssII), 44.9 ± 4.5 nM (CII1) y 172 ± 21 nM (CII2). Una observación interesante de este trabajo fue que la toxina Cn8 podría ejercer su actividad en 4 subtipos de Na_v pese a carecer del aminoácido E15, en toxinas del género *Centruroides* el glutámico 15 ha sido descrito como el principal efector de la actividad tipo trampa del sensor de voltaje al mantener en un estado parcialmente activado al canal mediante la unión de este residuo con una arginina presente en el sensor de voltaje (Israel *et al.*, 2018)

Superficie bioactiva de las toxinas de alacrán que afectan los Na_v

Se ha sugerido que las superficies bioactivas están generalmente divididas en dos dominios tanto en las neurotoxinas tipo alfa como en las tipo beta, donde un dominio está asociado al núcleo de la molécula y el otro dominio lo representan residuos en el N- y C- terminal (Gurevitz & Gueta, 2016). En 1985 Possani *et al.* realizó un corte químico con CNBr de la toxina Ts1 en la metionina 6 de la región N- terminal, obteniendo como resultado un péptido de 55 aminoácidos (Ts1 7-61) que carecía totalmente de actividad en ratón pese a mantener sus puentes disulfuro intactos, implicando la importancia de esta región en la actividad de

estas toxinas. También se ha observado que la superficie bioactiva de las β -toxinas está compuesta por una región asociada con la hélice α , denominada "farmacóforo" debido a su carácter común en diversas toxinas, así como a una región variable de carácter hidrofóbico cuya topología probablemente determine la selectividad hacia distintos Na_v (Stewart *et al.*, 1998). Una observación más se refiere a la carga global de la molécula, ya que las neurotoxinas de arañas y alacranes que están amidadas en el extremo C-terminal tienen mayor afinidad por sus receptores, es decir, el intercambio de una carga aniónica por una neutra en el extremo C-terminal aumenta la carga positiva global del péptido que está correlacionada con sus afinidades al receptor (Estrada *et al.*, 2007).

Dicroísmo circular en toxinas β de alacrán

Dada la alta conservación en la estructura de β -toxinas, el dicroísmo circular ha sido una técnica muy utilizada para el estudio de su plegamiento, así como de estudios estructurales de las mismas. En 1990 el grupo de Loret realizó un estudio de la estabilidad que tienen tres subfamilias de estas toxinas cuando se encuentran suspendidas en agua y el solvente orgánico TFE (2,2,2-trifluoretanol) a diferentes concentraciones, en este estudio se utilizaron tres toxinas seleccionadas como representativas de su actividad farmacológica sobre Na_v : AaHIT2, una toxina anti-insecto del veneno de *Androctonus australis Hector*; CssII, toxina β anti-mamífero de *Centruroides suffusus suffusus* y Ts1 de *Tityus serrulatus* capaz de unirse a ambos tipos de preparaciones nerviosas. A diferencia de CssII y AaHIT2 que presentaron espectros de dicroísmo circular similares con lecturas máximas de 188-190 nm y mínimas de 206-207 nm, el espectro de la toxina Ts1 presentó menor intensidad y desplazamientos de las lecturas máximas a 184 nm y tres mínimas a 200, 204 y 212 nm. En presencia de TFE a concentraciones crecientes (25, 50 y 100%) la intensidad de lectura de Ts1 se incrementó hasta 5 veces, mientras que en las otras toxinas no se observó un incremento drástico en la intensidad, indicando una mayor flexibilidad conformacional de Ts1, este efecto podría conferir la capacidad de interactuar con los Na_v de insecto y de mamífero (Loret *et al.*, 1990).

Antivenenos y producción de anticuerpos contra Ts1 – CssII

El carácter policlonal de los antivenenos comerciales, obtenidos mediante la inmunización de animales con veneno completo, y que contienen varios anticuerpos neutralizantes que reconocen diferentes epítomos de las neurotoxinas garantiza la neutralización de los venenos (Riaño-Umbarila *et al.*, 2016). Sin embargo, se ha demostrado que los anticuerpos desarrollados contra las principales toxinas de los venenos de arácnidos (Ej. Cn2 de *C. noxius*, CssII de *C. suffusus suffusus*, ACTX1 de la araña *Atrax robustus*, Esfingomielinasa de *Loxocles reclusa*, Latrotoxina de *Latrodectus mactans*, entre otros) son suficientes para neutralizar los efectos tóxicos del veneno de estos animales (Hernández-Salgado *et al.*, 2009).

Hernández-Salgado *et al.* (2009) crearon variantes de péptidos recombinantes tóxicos y no tóxicos de CssII en un sistema de expresión heterólogo bacteriano con un correcto plegamiento *in vitro*. Estos péptidos recombinantes se utilizaron para la inmunización en conejo Nueva Zelanda para la generación de sueros neutralizantes capaces de proteger contra 3LD₅₀ de la toxina CssII, además de esto se observó reactividad cruzada en los anticuerpos generados, ya que también fueron capaces de neutralizar a la toxina Cn2 (la principal toxina presente en el veneno de la especie *C. noxius*), esto debido a la alta identidad (91%) entre ambas toxinas y, en general, en las toxinas de alacranes del género *Centruroides*.

El único trabajo reportado sobre generación de anticuerpos con la toxina recombinante Ts1 fue realizado por Mendes *et al.* (2008), donde evaluaron la producción de anticuerpos neutralizantes contra el veneno completo de *T. serrulatus* empleando la toxina Ts1 recombinante y en tándem (Ts1-Ts1) como inmunógeno expresadas en células de *E. coli* en forma de cuerpos de inclusión. Se inmunizaron conejos y ratones con las proteínas recombinantes solubilizadas a partir de cuerpos de inclusión y luego se ensayaron para la producción de anticuerpos neutralizantes. Los ensayos de neutralización mostraron que los sueros anti-Ts1 y anti-Ts1-Ts1 fueron capaces de reducir la letalidad del veneno de *T. serrulatus* en un 50% a 75% al ser retado contra 2 LD₅₀ (LD₅₀=12.14 mg/20 g).

3. Hipótesis

Los cambios de las asas (regiones no conservadas de las toxinas localizadas entre dos cisteínas conservadas) en la secuencia de la toxina Ts1 por secuencias de la CssII auxiliarán en su correcto plegamiento *in vitro*, manteniendo una conformación estructural activa ($\beta\alpha\beta\beta$) clásica de las β -toxinas, generando variantes tanto activas como no activas con especificidad hacia subtipos de Na_v de mamífero.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

- Determinar el papel del intercambio de las asas entre la toxina Ts1 y CssII sobre el plegamiento *in vitro* de la toxina Ts1, y su actividad hacia subtipos de Na_v .

4.2 Objetivos específicos

- Construir y expresar variantes de la toxina Ts1 insertando cambios en las asas con base a aquellos de la toxina CssII.
- Analizar el plegamiento *in vitro* de las variantes obtenidas.
- Caracterizar las variantes Ts1-CssII mediante ensayos bioquímicos y de toxicidad.
- Determinar el papel de estos cambios sobre el efecto de la toxina en subtipos de Na_v mediante ensayos electrofisiológicos.

5. Materiales y Métodos

5.1 Diseño de las toxinas quiméricas de Ts1

Las toxinas Ts1 y CssII que se utilizaron para este estudio fueron analizadas con el servidor Sequence Manipulation Suite (<http://www.bioinformatics.org/sms2/>) y se realizó un alineamiento (Figura 5A) con el software BioEdit v7.2.6 presentando entre ambas un porcentaje de identidad y similitud de 41% y 52%, respectivamente. Ambas toxinas son representativas de sus respectivos géneros en Norteamérica (CssII de *Centruroides suffusus suffusus*; distribuido en la zona noroeste de México) y Suramérica (Ts1 de *Tityus serrulatus*; distribuido en la zona sureste de Brasil) y han sido usadas como modelos para estudios de afinidad hacia subtipos de Nav.

Para el diseño de las quimeras de la toxina Ts1 se realizaron sustituciones de varios aminoácidos basándonos en el alineamiento con la toxina CssII para generar cambios en las asas que definimos como regiones intercisteína de la secuencia primaria de ambas toxinas (Figura 5B, Tabla 2), generando así 6 quimeras nombradas Ts1a, Ts1b, Ts1c, Ts1d, Ts1e y Ts1f. Al pertenecer a la misma familia de toxinas de alacrán (β -neurotoxinas), las quimeras generadas presentan una misma topología estructural ($\beta\alpha\beta\beta$) estabilizada por cuatro puentes disulfuro. Una característica importante de ambas toxinas es que las regiones que corresponden a la formación de estructura secundaria se encuentran altamente conservadas, a diferencia de las regiones desordenadas de la molécula sobre las cuales recaen las principales diferencias entre éstas y otras toxinas de la familia de las β -neurotoxinas.

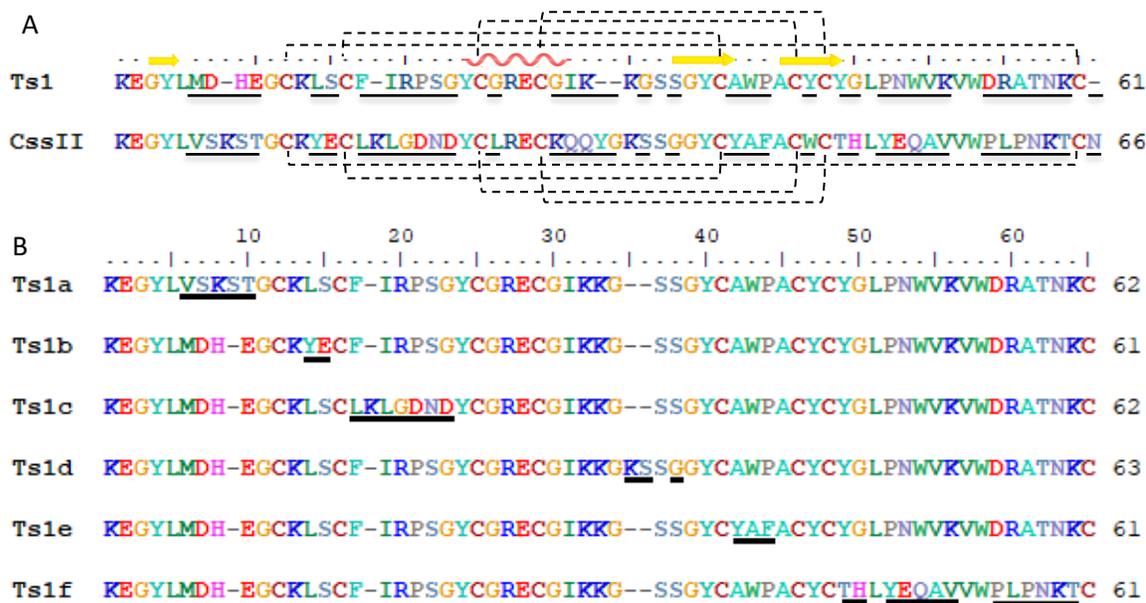


Figura 5. Comparación de las secuencias de Ts1 - CcssII y diseño de las quimeras. A: Alineamiento de secuencias primaria de Ts1 y CcssII, subrayado se encuentran los aminoácidos no conservados y con interlineado se representan los puentes disulfuro conformados por un par de cisteínas conservadas, →: lámina β, ~: hélice α. **B:** quimeras generadas entre las toxinas Ts1 y CcssII, los cambios en sus respectivas asas se hayan subrayados en negro.

Tabla 2. Secuencias mutadas en las quimeras de Ts1-CcssII. Secuencia de aminoácidos y su posición (no. de residuos) en la secuencia primaria de Ts1

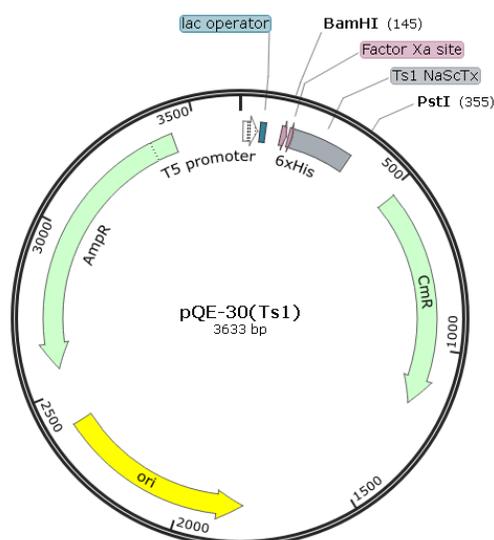
| Quimera | Mutación | No. de residuos |
|---------|--|-----------------|
| Ts1a | MDHE-VSKST | 6 a 9 |
| Ts1b | LS-YE | 13 y 14 |
| Ts1c | FIRPSG-LKLGDNDCY | 16 a 21 |
| Ts1d | SSGY-KSSGGY | 33 a 36 |
| Ts1e | AWP-YAF | 38 a 40 |
| Ts1f | YGLPNWVKVWDRATNK- THLYEQAVVWVPLPNKT | 45 a 60 |

5.1.1 Predicción de estructura y análisis de las quimeras

Las quimeras propuestas para este estudio fueron analizadas con el servidor ProtParam de ExPASy e I-TASSER con la finalidad de conocer las características bioquímicas de las mismas y predecir su estructura tridimensional, evaluando la correcta formación de puentes disulfuro y la conservación de su plegamiento βαββ.

5.1.2 Obtención de la toxina recombinante 6His-FXa-rTs1

La construcción de la toxina Ts1 ensamblada en el vector pQE-30 (Qiagen, CA, USA) (figura 6) generada por Hernández *et al.* (2009) fue utilizada como templado para las quimeras de la toxina Ts1. Esta construcción fue obtenida por el método de oligos solapantes considerando el uso preferencial de codones de *Escherichia coli* y tras su inducción con IPTG, expresa la toxina Ts1 madura unida a una proteína de fusión en el extremo N-terminal que contiene el sitio de corte proteolítico FXa y una cola de histidinas 6xHis tag para su purificación por afinidad a Ni-NTA.



```

ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCATCGAGGGAAGGAAAGAAGGCTATCTGATGGATCATGAAGGCTGCAAAC
M R G S H H H H H G S I E G R K E G Y L M D H E G C K

TGCTTTATTTCGCCGAGCGGCTATTGCGGCCGCGAATGCGGCATTAAAAAAGGCAGCAGCGGCTATTGCGCGTGGCCGGCGTGCT
C F I R P S G Y C G R E C G I K K G S S G Y C A W P A C

TATGGCCTGCCGAAC TGGGTGAAAGTGTGGGATCGCGCGACCAACAATGCTAGTAACTGCAG
Y G L P N W V K V W D R A T N K C * * L Q

```

Figura 6. Construcción del vector pQE-30 (Qiagen, CA, USA) con el gen de la toxina Ts1. El promotor T5 es inducible por IPTG. AmpR: confiere resistencia a ampicilina. CmR: confiere resistencia a cloranfenicol. El gen que codifica para la toxina Ts1 se expresa fusionado al sitio IEGR (sitio de corte reconocido por la proteasa factor FXa), a un segmento de 6 Histidinas y a 4 aminoácidos (MRGS) en el extremo N-terminal. Los sitios de restricción BamHI y PstI fueron utilizados para la ligación del gen al vector. Se muestra la secuencia de ADN y traducción de la toxina recombinante 6His-FXa-rTs1.

5.1.3 Diseño de los oligonucleótidos mutagénicos

Con base en la secuencia de la toxina C_{ss}II se diseñaron oligonucleótidos (Tabla 3) para modificar los codones correspondientes a los aminoácidos de la toxina Ts1, de modo que la secuencia de estos oligos incluyese una región no homóloga a la del gen de Ts1 (correspondiente a las mutaciones quiméricas) flanqueada por una secuencia de nucleótidos de 9 a 12 pb homóloga a la secuencia de Ts1 en los extremos 5' y 3'. Esto dando como resultado oligos de hasta 45nt que fueron purificados por PAGE previo a su uso en las reacciones de PCR. Dado que los cambios a realizar en la quimera Ts1F implicaban múltiples sitios de mutación en el sitio C-terminal se realizó esta mutación en tres pasos utilizando tres diferentes oligos (F-Ts1f M1, M2 y M3) para obtener la secuencia completa del gen.

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos mutagénicos para la construcción de las quimeras. Oligonucleótidos diseñados para generar cambios de los codones correspondientes a los aminoácidos de la toxina C_{ss}II. R: oligo reverso, F: oligo directo, nt: longitud del oligonucleótido, T_m: temperatura de fusión, T. Amp.: temperatura de hibridación utilizada para la amplificación del megaprimero. Señalados en rojo se encuentran los codones correspondientes a los cambios en la secuencia a insertar en el gen de Ts1.

| Oligo | Secuencia (5' - 3') | nt | %GC | T _m | T. Amp. |
|-----------|---|----|------|----------------|---------|
| R-Ts1a | CAG TTT GCA GCC TGT GCT CTT GCT TAC CAG ATA GCC | 36 | 52.8 | 66.6 | 57.5°C |
| R-Ts1b | CG AAT AAA GCA TTC GTA TTT GCA GCC | 26 | 42.3 | 57.1 | 57.5°C |
| R-Ts1c | CG GCC GCA ATA ATC GTT ATC TCC CAA TTT AAG GCA GCT CAG TTT G | 45 | 46.7 | 66.9 | 56.5°C |
| F-Ts1d | C ATT AAA AAA GGC AAA AGC AGT GGC GGC TAT TGC | 34 | 44.1 | 63.5 | 53°C |
| R-Ts1e | GCA ATA GCA CGC AAA AGC GTA GCA ATA GC | 29 | 48.3 | 62.1 | 56.5°C |
| F-Ts1f M1 | GTG AAA GTG TGG CCC CTT CCT AAT AAA ACA TGC TAG TAA C | 40 | 42.5 | 63.3 | 53°C |
| F-Ts1f M2 | C TAT GGC CTG TAC GAA CAA GCA GTG GTG TGG C | 32 | 56.2 | 66.3 | 55.5°C |
| F-Ts1f M3 | CG TGC TAT TGC ACA CAC CTG TAC GAA C | 27 | 51.9 | 61.5 | 55°C |

5.1.4 Generación de las quimeras por mutación sitio dirigida.

Para generar las variantes se utilizó el método de "Megaprimer" (Ke & Madison, 1997), dividido en dos etapas; en la primera se amplificó un segmento del gen (megaprimer) de la toxina Ts1 con los oligonucleótidos mutagénicos y con los oligos complementarios R-p30 o F-p30 (Tabla 4), los cuales se aparean con la secuencia que flanquea los sitios de restricción BamHI y PstI en el vector pQE-30 utilizado como templado. En la

segunda etapa, se utilizó el amplicón de la primera reacción de PCR como oligonucleótido (Megaprimer) para amplificar los genes mutantes completos como se muestra en la figura 7.

Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos del vector pQE-30. Oligonucleótidos complementarios del vector pQE-30 utilizados para la amplificación de los genes mutantes. R: oligo reverso, F: oligo directo, nt: longitud del oligonucleótido, Tm: temperatura de fusión

| Oligo | Secuencia (5' - 3') | nt | %GC | Tm |
|-------|------------------------------------|----|-----|------|
| F-P30 | GGA TCG CAT CAC CAT CAC CAT CAC | 24 | 54 | 59.9 |
| R-P30 | GCT CAG CTA ATT AAG CTT GGC TGC AG | 26 | 50 | 60.2 |

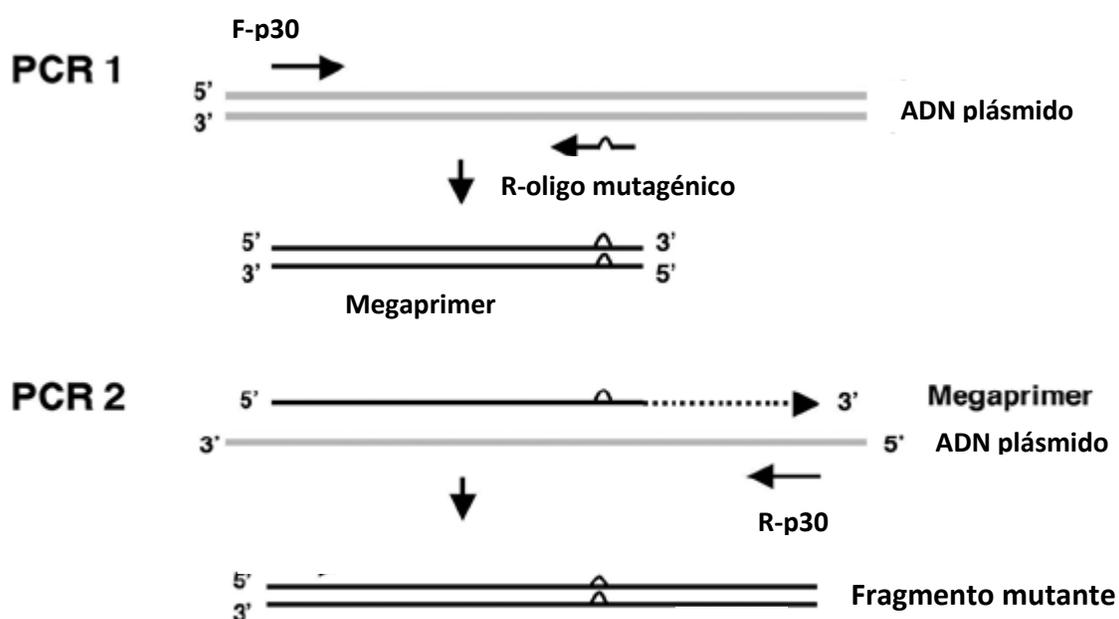


Figura 7. Esquema de la generación de las quimeras por la técnica de Megaprimer. El proceso se divide en dos etapas donde en la primera (PCR1) se amplifica un fragmento del gen de interés con las mutaciones deseadas, mientras que en la segunda (PCR2) se utiliza este fragmento como oligonucleótido (megaprimer) para la obtención del gen de interés completo.

Para las amplificaciones del megaprimer se utilizaron las siguientes condiciones: 200 μ M dNTP's; 1x Buffer de reacción ThermoPol® (NEB); 0.4 pM de cada oligonucleótido; 1 mM MgSO₄; 1U de enzima Vent ADN polimerasa y 25 ng de ADN plasmídico en 100 μ L de reacción. Las reacciones de PCR se realizaron en tres ciclos: el primero de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 30 s a 94°C, 40 s a T variable de

acuerdo con el oligo mutagénico empleado (Tabla 5) y 30 s a 72°C seguido de un ciclo de extensión final a 72°C por 10 min.

Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1.2%, se tiñeron con bromuro de etidio y se identificaron los megaprimers en el gel por su tamaño esperado, los megaprimers se purificaron con el kit de purificación de productos de PCR (Roche, Basel, Switzerland) y se utilizaron para amplificar los genes completos, empleando las mismas condiciones que la 1era reacción de PCR y utilizando una temperatura de hibridación de 58.5°C en todas las variantes.

5.2 Clonación y ligación de los insertos mutantes en el vector pQE-30

Los productos de la segunda reacción de PCR se purificaron bajo la misma metodología de la primera reacción y estos fueron digeridos con las enzimas de restricción BamHI y PstI en buffer de reacción 3 (New England BioLabs, MA, USA) durante 3 h a 37°C. El inserto digerido fue purificado a partir de un gel de agarosa 1.2% y ligado a un vector pQE-30 linearizado utilizando la enzima ligasa T4 (Fermentas, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) en relación 3:1 respectivamente en un volumen de reacción de 10 µL.

5.3 Transformación de la cepa de *E. coli* XL1Blue y purificación del vector

La cepa de *E. coli* XL1Blue se transformó por medio de choque térmico, utilizando tubos con 100 µL de células químico-competentes a las cuales se adicionó el total de volumen de reacción de ligación y se incubaron en hielo por 30 min, se indujo el choque térmico a 42°C durante 1 min; se dejaron reposar a 4°C por 10 min, para continuar, se adicionaron 400 µL de medio SOC (2% Triptona, 0.5% Extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20 mM Glucosa) y se mantuvieron a 37°C con agitación de 120 rpm por 1 h.

Las células se sembraron en medio sólido LB + ampicilina, los cultivos se incubaron a 37°C de 12 a 16 h. Se seleccionaron clonas obtenidas por este método para confirmar mediante PCR de colonia la presencia del gen mutante en el vector pQE-30 utilizando para su amplificación los oligos R-p30 y F-p30. El tamaño de los productos de la reacción se analizó en geles de agarosa al 1.2%, las colonias positivas fueron seleccionadas para extraer plásmido con el kit de aislamiento de plásmido (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche, Basel, Switzerland).

Los plásmidos seleccionados fueron secuenciados en la unidad de síntesis y secuenciación de ADN en el instituto de biotecnología y para el análisis de las secuencias obtenidas se utilizó el software BioEdit v7.2.6 y Serial Cloner v2.6.1 donde se confirmó que los cambios correspondieran a las mutaciones deseadas. En el análisis se buscó por alineamiento y traducción la secuencia de los genes mutantes, la secuencia codificante para el sitio de corte FXa y el sitio 6xHis tag para purificación por afinidad. Los plásmidos con las secuencias correspondientes fueron empleados para la expresión de las quimeras.

5.4 Pruebas de expresión de las quimeras de Ts1

Las cepas de expresión *E. coli* M15, Origami y Shuffle se utilizaron como huésped para expresión de las variantes de la toxina Ts1. Las células químico-competentes se transformaron con 50 ng de plásmido pQE-30 empleando la misma metodología que la transformación en cepa XL1Blue.

Con las transformantes obtenidas se prepararon cultivos en matraces con 50 mL de medio LB (ampicilina 100 µg/mL) y se realizaron pruebas de expresión con condiciones estándar de expresión a 16°C con 0.5 mM IPTG como agente inductor por 12 h; la expresión se indujo a una OD₆₀₀ de 0.6 a 0.8. Aunque las toxinas se obtuvieron en las tres cepas de expresión, se seleccionó la cepa Shuffle para proseguir con los experimentos posteriores, debido a una aparente producción de las toxinas en la fracción soluble en cultivos de 50 mL y la facilidad y experiencia con esta cepa en el laboratorio.

Las mutantes transformadas en la cepa Shuffle fueron probadas a diferentes condiciones de expresión utilizando concentraciones de IPTG a 0.1 y 0.5 mM, a temperaturas

de 16°C y 37°C, el tiempo de incubación, así como la densidad celular al inicio de la expresión se mantuvieron constantes, en todas las condiciones se determinó que la toxina se obtiene como cuerpos de inclusión tras su expresión.

5.5 Obtención y purificación de las toxinas recombinantes

Con los resultados obtenidos de las pruebas de expresión se establecieron las siguientes condiciones de expresión: En un litro de medio LB + ampicilina se inocularon 4 mL de células Shuffle transformadas con el vector pQE-30-Ts1 (con las mutaciones químéricas) crecidas 12 h a 37°C, 200 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.6 a 0.8, en ese momento se indujo la expresión con IPTG a una concentración final de 0.2 mM y se mantuvieron a 16°C por 12 h. Terminada la fase de expresión, los cultivos se centrifugaron a 6,500 rpm durante 15 min a 4°C. Las células se resuspendieron en 25 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 8 adicionado con 5U de lisozima (Roche, Basel, Switzerland) y 250U de Benzona (Sigma-Aldrich, Ontario, Canada) y se incubaron en agitación suave por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la suspensión celular se lisó por prensa francesa a 30,000 psi. El extracto resultante se centrifugó a 8,000 rpm por 20 min, y se separaron la fracción soluble (sobrenadante) y los cuerpos de inclusión (pellet). Los cuerpos de inclusión se lavaron con 20 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8 y se centrifugaron nuevamente a 9,000 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante y el pellet resultante se trató con 10 mL de una solución caotrópica de Tris-HCl 50 mM con 6 M cloruro de guanidina pH 8, la muestra se mantuvo en agitación suave por 24 h a 16°C. Finalmente se centrifugó a 8,000 rpm a 4°C durante 25 min para su purificación por afinidad donde el sobrenadante contenía la proteína de interés.

Los péptidos recombinantes se purificaron por afinidad a Ni-NTA (Qiagen, CA, USA, figura 8). En una columna de 10 mL se empacaron 2 mL de resina Ni-NTA, la resina se lavó con 10 mL de H₂O tetradestilada y se equilibró pasando 10 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8 + 6 M Cloruro de guanidina. Una vez equilibrada la columna, se pasó el extracto proteico dos veces para favorecer la unión de los péptidos de fusión a la columna y a continuación se hizo un lavado con 5 mL de Tris 50 mM pH 8, 6 M Cloruro de guanidina, Imidazol 25 mM. Por último, se hizo la elusión de los péptidos de fusión

con Tris 50 mM pH8, 6 M Cloruro de guanidina e Imidazol 400 mM. La elusión se colectó en varias alícuotas de 1 mL, y se verificó la presencia de la proteína de interés por SDS-PAGE.

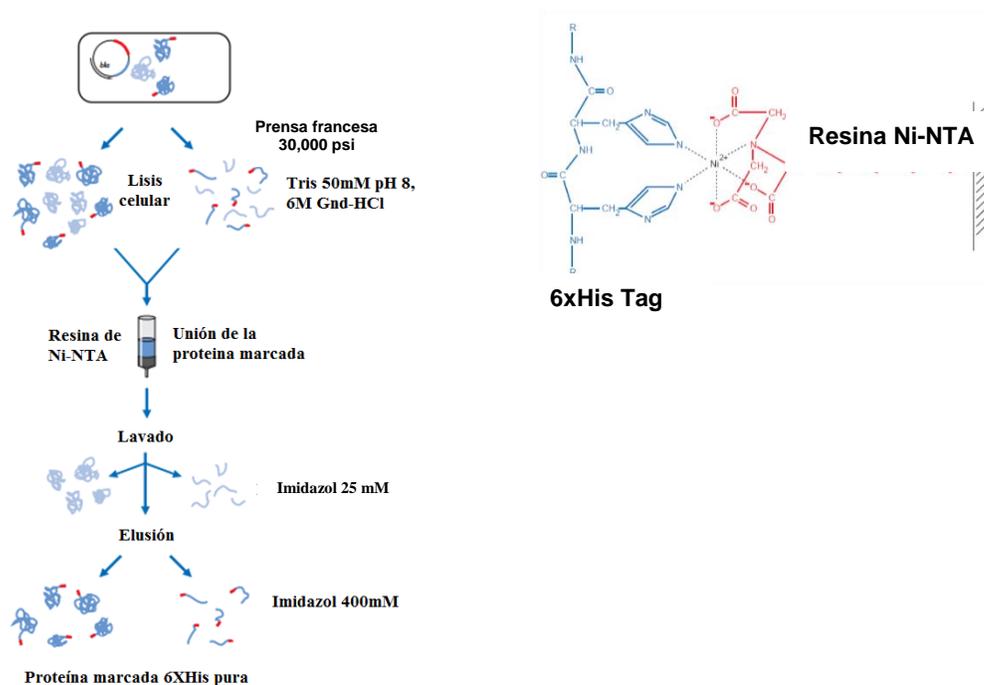


Figura 8. Esquema de la purificación de las toxinas recombinantes a con resina Ni-NTA. Las toxinas recombinantes son purificadas a partir de cuerpos de inclusión e interacción química de la resina Ni-NTA con el tag de histidina.

5.6 Electroforesis de proteínas

Para evaluar la calidad de la purificación por columna de Ni-NTA las proteínas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturilizantes (SDS-PAGE). Las muestras analizadas se incubaron durante 5 min a 95°C en presencia de una solución desnaturizante que contenía Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 10% β-mercaptoetanol y azul de bromofenol 0.05%. La migración proteica se efectuó en un voltaje de 120V. Después de la corrida, el gel se tiñó con una solución de: ácido acético (10%), metanol (40%) y azul de Coomassie R250 (0.2%) y se incubó en agitación por 3 h. Posteriormente, se destiñó el gel en una solución de ácido acético (10%) y metanol (50%) para quitar el exceso de colorante.

5.7 Purificación por rpHPLC

Los péptidos de fusión purificados por afinidad con Ni-NTA se sometieron a un nuevo paso de purificación por HPLC de fase reversa para determinar y obtener las diferentes isoformas en las que se encuentra la toxina recombinante, así como eliminar las sales presentes en la solución. Se utilizó como solvente A: 0.1% TFA en H₂O y como solvente B: 0.1% TFA en acetonitrilo. La separación se hizo con una columna C₁₈ analítica empleando un gradiente de 0 a 60% de solvente B en un tiempo de 60 min con un flujo 1 mL/min, los registros de los cromatogramas se hicieron usando longitudes de onda de 230 y 280 nm.

5.8 Espectrometría de masas.

La masa molecular de los péptidos obtenidos se determinó en el equipo Electrospray/ESILCQ Fleet de Thermo Scientific con la ayuda del Dr. Fernando Zamudio. Algunos de las variantes se mandaron a analizar también por espectrometría de masas en el equipo de alta resolución LC-MS bomba de nanoflujo EASY-nLC II (Thermo-Fisher, San José, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher, San José, CA, USA) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI) en la unidad de proteómica del Instituto de Biotecnología.

5.9 Ensayos de plegamiento *in vitro*.

Las toxinas recombinantes se redujeron con 50 mM DTT para deshacer puentes disulfuro por una hora a 37°C y tras ser purificados por rpHPLC, se cuantificaron por nanodrop y se almacenaron a 4°C para realizar los ensayos de plegamiento *in vitro*. Aunque se realizaron varios ensayos de plegamiento, solamente dos protocolos son reportados aquí. El primero reportado por Estrada *et al.*, 2007 para el plegamiento de la toxina C_{ss}II recombinante, mientras que el segundo protocolo (Cys/Cis), descrito por Dang *et al.*, 2014, fue empleado en el plegamiento de una variante sintética de Ts1.

5.9.1 Plegamiento con par redox GSH/GSSG

Las toxinas reducidas se plegaron bajo las siguientes condiciones: Cloruro de guanidina 2M en buffer Tris 50mM, pH 8 y 1mM glutatión reducido (GSH)/0.1 mM glutatión oxidado (GSSG), con una concentración de 100 µg de toxina/mL (11.4 µM). La reacción de plegamiento se mantuvo a 4°C durante 48 h antes de analizar nuevamente por HPLC de fase reversa de acuerdo lo reportado por Estrada *et al.* 2007.

5.9.2 Plegamiento con par redox Cys/Cis

Otro método de plegamiento que conllevó resultados más favorables fue el siguiente: Cloruro de guanidina 0.5M en buffer Tris 0.1 M, pH 8 y 8mM cisteína (Cys)/ 1 mM cistina (Cis), con una concentración de 10 µg de toxina/mL (1.1 µM). La reacción de plegamiento se mantuvo a 4°C durante 48 h y se acidificó con ácido trifluoroacético (TFA) llevándola a una concentración final de 1% antes de analizar nuevamente por HPLC de fase reversa de acuerdo al protocolo descrito por Dang *et al.*, 2014. Como alternativa para algunas mutantes que aparentemente tienden a agregarse durante el plegamiento, se probó acidificar con ácido acético en una concentración final de 100 mM e incubar a 4°C durante 24 h.

5.10. Dicroísmo circular

Posterior al plegamiento *in vitro*, las toxinas fueron purificadas por rpHPLC y posteriormente resuspendidas en una solución al 60% de 2,2,2 – Trifluoroetanol (TFE) a las concentraciones indicadas en la tabla 5. El registro de absorbancias por dicroísmo circular se obtuvo en un espectropolarímetro Jasco J-725 (Jasco, Japan) y se realizó en un rango de 260 a 190 nm por duplicado en una celda de 1 mm de longitud a 25 °C. Los datos se colectaron a 0.1 nm con una velocidad de detección de 50 nm/min y una constante de tiempo de 0.5 seg. Se realizó un registro de la toxina Ts1 como control. La predicción de estructura secundaria se realizó en el servidor BeStSel (<http://bestsel.elte.hu/index.php>) calculando la elipticidad molar por residuo ($[\Theta]_{\lambda mre}$) en el software GraphPad Prism versión 6.

Tabla 5. Concentraciones utilizadas para los ensayos de dicroísmo circular

| Toxina | [$\mu\text{g/mL}$] |
|--------|----------------------|
| Ts1 | 67 |
| Ts1a | 70 |
| Ts1b | 61 |
| Ts1c | 92 |
| Ts1d | 88 |
| Ts1e | 93 |
| Ts1f | 65 |

5.11. Ensayos de toxicidad en ratón: Inyección intracraneal

Las pruebas de toxicidad se realizaron por vía intracraneal (IC) en ratones CD1 ya que la toxina Ts1 presenta mayor actividad por esta vía (i.c.v. $\text{LD}_{50}=30 \text{ ng/kg}$, cepa C57/Bl6) (Eauclaire *et al.*, 2018), empleando tres ratones de tres semanas de edad y 20 a 25g de peso por toxina. A los ratones, previamente anestesiados con cloroformo, se les inyectaron intracerebroventricularmente dosis de 5 μg de las fracciones de toxina recombinante obtenidas por plegamiento *in vitro* diluidas en 5 μL de agua destilada estéril, esta dosis fue administrada para determinar si las toxinas presentaban o carecían de actividad. Los ratones se colocaron sobre una superficie plana y se inyectaron con una microjeringa de 10 μL en el centro de la cabeza, a la altura intermedia entre el ojo y la oreja izquierdos, se administraron 5 μL de agua destilada estéril como control. Los ratones inyectados se mantuvieron en observación durante 2 h para registrar síntomas y el desarrollo del envenenamiento y después de 24 h para confirmar la recuperación o muerte de los individuos envenenados.

5.12. Ensayos de electrofisiología

Se realizaron ensayos de electrofisiología con las quimeras que presentaron toxicidad en ratón por la vía intracraneal para registrar su efecto sobre los Na_v . Se utilizaron líneas celulares HEK293 (*Human embryonic kidney*) transfectadas para que expresaran constitutivamente un subtipo de hNa_v seleccionado para los ensayos (hNa_v s 1.3, 1.4 y 1.6), adicionalmente se analizó el efecto de la toxina Ts1a en el canal hNa_v 1.7 donde no se registró actividad (figura suplementaria S13). Los subtipos de Na_v de mamíferos 1.2, 1.3,

1.4 y 1.6 son sensibles a la toxina Ts1 a concentración 100 nM (Peigneur *et al.*, 2015), mientras que la toxina CsxII tiene afinidad sobre los subtipos 1.1, 1.2 y 1.6, adicionalmente se sabe que las toxinas del género *Centruroides* requieren un prepulso de +50 mV para ejercer su actividad sobre los canales de sodio cuando se registra su actividad electrofisiológica (Schiavon *et al.*, 2012).

Para el registro de actividad de las toxinas se utilizó la técnica de patch-clamp en la configuración de célula completa (*Whole cell*) usando un equipo de patch-clamp automatizado Port-a-patch (©nan]i[on). Las corrientes de sodio se obtuvieron con una serie de pulsos despolarizantes de -90mV a +40 mV, se usó un potencial de mantenimiento de -80 mV durante cada registro (figura 9). En ensayos preparativos se observó que las mutantes no requerían prepulso para modular la cinética de activación del canal por lo que éste se omitió en los ensayos realizados.

Se evaluó el efecto de las variantes rTsa y rTse, ya que estas toxinas presentaron actividad *in vivo* en modelo de ratón. La adquisición y procesamiento de los datos se realizó utilizando el programa Patch Master (versión 2x73.5 HEKA elektronik). Se graficó la conductancia normalizada contra en voltaje para obtener las curvas de activación dependiente de voltaje.

La composición de las soluciones estándar para los registros fueron las siguientes: Solución extracelular: NaCl 140 mM, KCl 4mM, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 2mM, D-glucosa 5mM, Hepes 10mM, NaOH pH 7.4. Solución intracelular: CsCl 50mM, NaCl 10mM, CsF 60mM, EGTA 20mM, Hepes/CsOH 10mM pH 7.2.

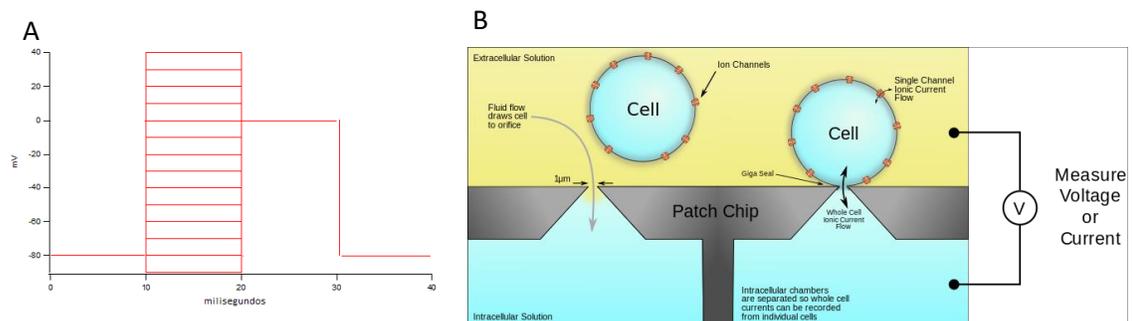


Figura 9. Protocolos de electrofisiología en modalidad célula completa A) Protocolo de activación utilizado para Nav. B) Esquema de Patch-clamp automatizado (port-a-patch) en configuración de célula completa (*Whole-cell*).

6. Resultados y Discusión

6.1. Predicción de estructura y características de las quimeras

Mediante la herramienta ProtParam de ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) se calcularon las propiedades bioquímicas de las quimeras (tabla 6), mientras que los pesos moleculares son muy similares, el punto isoelectrico teórico disminuye para tres toxinas (Ts1b, Ts1c, Ts1f) e incrementa en dos de ellas (Ts1a, Ts1d) y para Ts1e se mantiene idéntico, por otro lado el índice de hidropatía (GRAVY: grand average of hidropathy), que señala de forma muy general la naturaleza hidrofóbica de una proteína indica que las quimeras Ts1a, Ts1e y Ts1f incrementan su hidrofobicidad, caso contrario con las quimeras Ts1b, Ts1c y Ts1d donde la hidrofobicidad disminuye.

Tabla 6. Propiedades bioquímicas de las quimeras analizadas en ProtParam

| Toxina | Mutación | aa | mW | pI | GRAVY |
|-------------|-----------------------------------|----|---------|------|--------|
| Ts1 | | 61 | 6890.98 | 8.67 | -0.439 |
| Cs11 | | 66 | 7610.62 | 7.68 | -0.524 |
| Ts1a | MDHE-VSKST | 62 | 6881.01 | 9.13 | -0.331 |
| Ts1b | LS-YE | 61 | 6983.03 | 8.45 | -0.567 |
| Ts1c | FIRPSG-LKLGDND | 62 | 6989.03 | 8.16 | -0.548 |
| Ts1d | SSGY-KSSGGY | 63 | 7076.2 | 8.84 | -0.494 |
| Ts1e | AWP-YAF | 61 | 6918 | 8.67 | -0.374 |
| Ts1f | YGLPNWVKVWDRATNK-THLYEQAVVWPLPNKT | 61 | 6839.93 | 8.17 | -0.308 |

Mediante el servidor i-TASSER se realizó una predicción de estructura terciaria de las quimeras. En los modelos generados (Figura 10) se observa en que las mutaciones realizadas se encuentran principalmente en las regiones con estructura desordenada, indicando que existe un alto grado de conservación en los aminoácidos que conforman la estructura secundaria de estas toxinas, así como que los aminoácidos no conservados son aquellos que brindan a estas toxinas especificidad y afinidad a ciertos subtipos de canales Na_v . Todas las quimeras presentan una topología $\beta\alpha\beta\beta$ clásica de las toxinas β de alacrán y una correcta conformación de sus puentes disulfuro, con un C-score (índice de confianza) de 0.96 a 1.86, lo que indica que estos modelos poseen una alta confiabilidad, este es un valor que varía de -5 a 2 y es calculado basándose en la significancia del alineamiento entre el templado y los modelos generados, en cuyo caso el templado fue la estructura cristalográfica de Ts1 (PDB: INP1) para todas las quimeras.

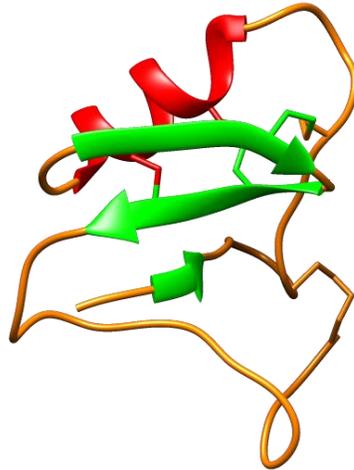


Figura 10A. Estructura 3D de la toxina Ts1. Generada a partir del registro PDB: 1NP1 publicado por Pinheiro *et al.*, 2003.

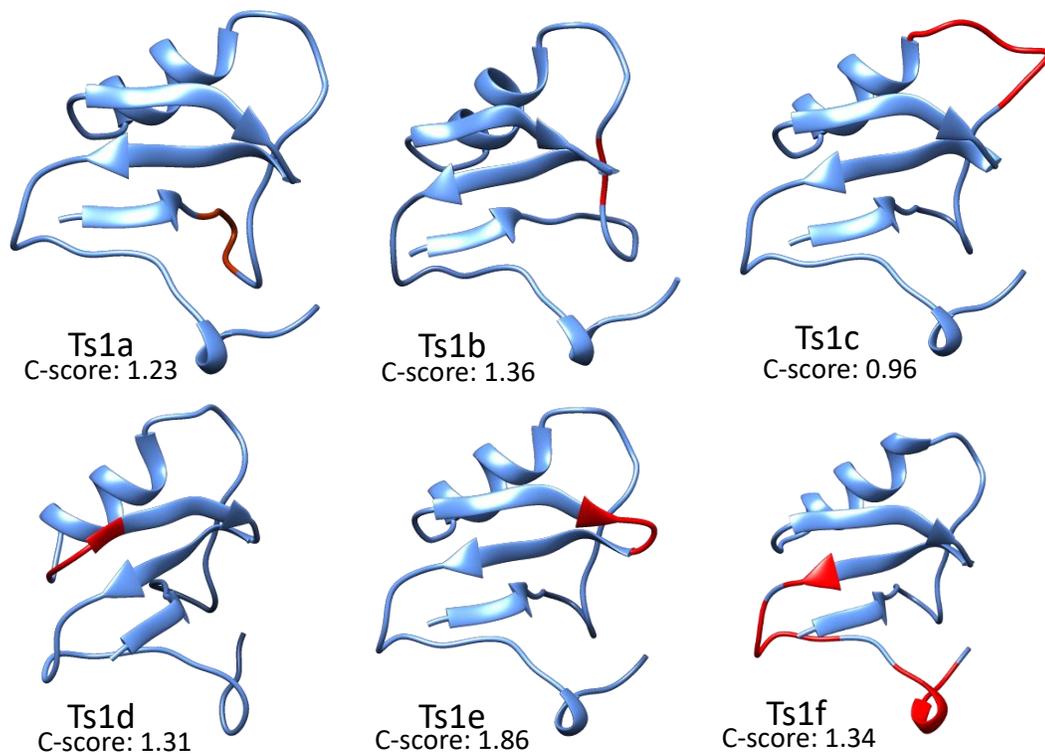


Figura 10B. Predicción de la estructura terciaria de las quimeras generadas en el servidor de i-TASSER. En rojo se resaltan las mutaciones realizadas para cada variante. C-score: rango de confianza para la calidad de los modelos entre los rangos de -5 y 2.

6.2. Amplificación de los genes mutantes

Los productos de la primera reacción de PCR fueron analizados en gel de agarosa 1.2%, en la figura 11 se observan los geles correspondientes a los megaprimers de Ts1a y Ts1b, los cuales presentaron una migración correspondiente al peso esperado de 84 y 95 pb respectivamente de la reacción de amplificación.

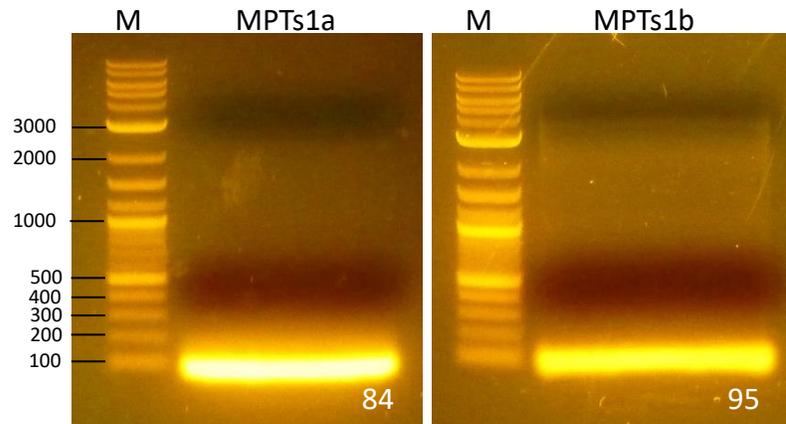


Figura 11. Electroforesis de la primera reacción de PCR. Electroforesis en gel agarosa 1.2% de los fragmentos amplificados correspondientes a los megaprimers de la primera PCR. M: Marcador de ADN. MP Ts1a: Megaprimer de la mutante a; MPTs1b: Megaprimer de la mutante b.

Después de la purificación de los megaprimers, se procedió a la amplificación de los genes completos en una segunda PCR, para ello, se emplearon 20 pmol de cada megaprimer y 20 pmol del oligonucleótido R-p30 en un volumen de 50 μ L. En el gel de agarosa se observaron los insertos correspondientes al gen completo, con un peso de 291 y 288 pb incluyendo sus sitios de restricción (figura 12).

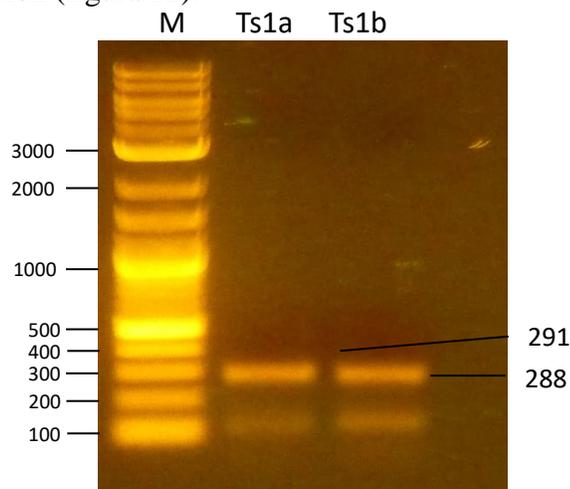


Figura 12. Electroforesis de la segunda reacción de PCR. Electroforesis en gel agarosa 1.2% de los fragmentos amplificados correspondientes al gen completo de las toxinas mutantes con sus respectivos sitios de digestión (BamHI-PstI).

6.3. Digestión y ligación al vector pQE-30

Los insertos obtenidos de la segunda reacción de PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción BamHI y PstI (figura 13) y a su vez fueron ligados al vector pQE-30 linearizado con las mismas enzimas. Los productos de esta ligación fueron utilizados para transformación en la cepa de *E. coli* XL1Blue, y se realizó una PCR de colonia con las clonas crecidas para detectar la presencia del gen de interés en una banda con migración aproximada de 257 pb (figura 14).

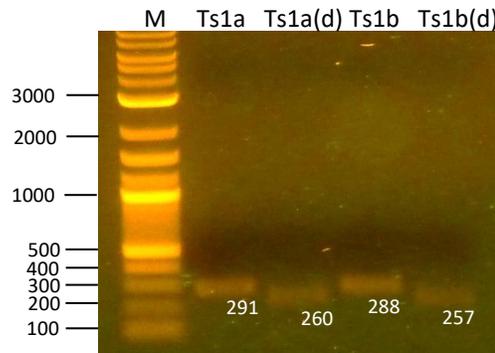


Figura 13. Digestión de insertos con las enzimas de restricción BamHI y PstI. Electroforesis en gel agarosa 1.2% de los fragmentos amplificados en la segunda reacción de PCR y los fragmentos digeridos (d) con las enzimas BamHI y PstI.

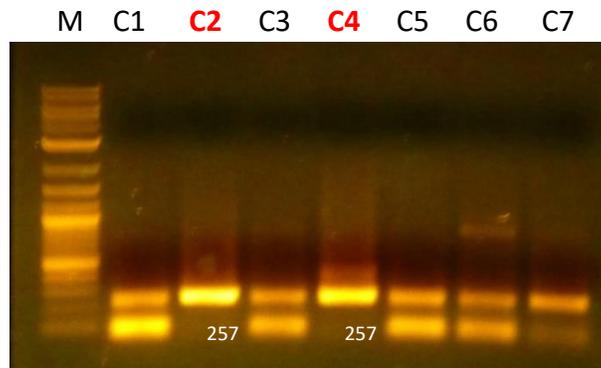


Figura 14. PCR de colonia de las clonas transformadas con la ligación. Las colonias positivas (C2 y C4) se seleccionaron para extracción de plásmido y secuenciación de DNA

El procedimiento de amplificación, digestión, ligación y clonación se repitió para cada una de las quimeras con solamente una diferencia en la generación de la quimera Ts1f, donde se realizó la mutación en tres pasos de clonación. Una vez obtenidos los plásmidos con las construcciones se procedió analizar por secuenciación.

6.4. Secuenciación de DNA

Las colonias positivas de la ligación y transformación en pQE-30 fueron secuenciadas en la unidad de síntesis y secuenciación de DNA del instituto de biotecnología, y los electroferogramas obtenidos se analizaron con el programa BioEdit v7.2.6, en estas construcciones se confirmaron: la secuencia del gen mutante, codones de paro e inicio de la traducción, codones codificantes para la secuencia de aminoácidos reconocida por la proteasa Factor Xa y los codones codificantes para la cola de histidina (Figuras suplementarias S1-S6, anexo 1).

6.5. Prueba de expresión de Ts1a en diferentes cepas de expresión.

Utilizando el plásmido de la quimera Ts1a se transformaron cepas de expresión de *E. coli* M15, Origami y Shuffle y se realizaron pruebas de expresión en matraces de 50 mL de medio LB + ampicilina induciendo la expresión con 0.5M IPTG. De la expresión en estas cepas se obtuvieron los cuerpos de inclusión y la fracción soluble y se confirmó la expresión de la toxina mutante por SDS-PAGE (figura 15) en una banda con un peso aproximado de 10 kDa. En estas pruebas se confirmó que la toxina recombinante se obtuvo principalmente como cuerpos de inclusión en todas las cepas utilizadas, pese a que se observó presencia de proteína en la fracción soluble, esta no pudo recuperarse al escalar la producción a 1 l de cultivo, por lo que se decidió trabajar con la proteína recuperada a partir de los cuerpos de inclusión.

6.6. Pruebas de expresión en la cepa Shuffle

Se realizó otra prueba de expresión en la cepa Shuffle con las mutantes Ts1a y Ts1b en tubos cónicos de 50 mL con un volumen de cultivo de 10 mL utilizando diferentes concentraciones de inductor (0.1 y 0.5 mM IPTG) y empleando diferentes temperaturas (16 y 37°C). De este se determinó que no hay mayor diferencia en los niveles de expresión utilizando una mayor concentración de inductor y que hay mayor expresión total de proteína a 37°C (figura 16) por lo que se utilizaron estas condiciones para las expresiones posteriores.

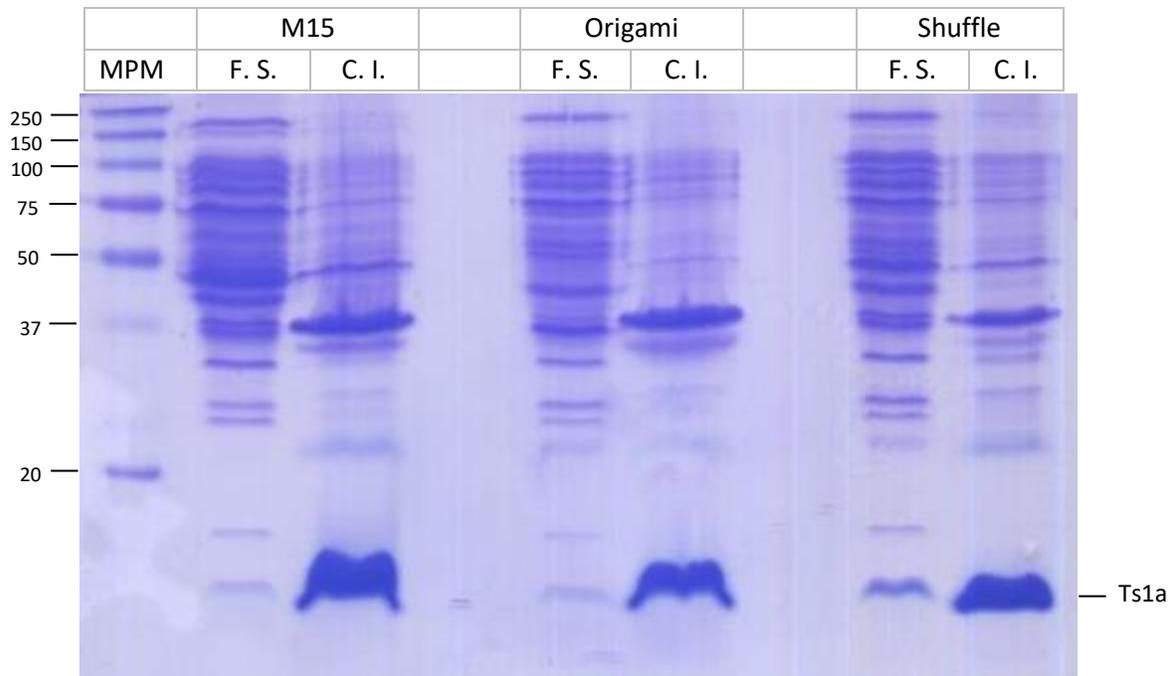


Figura 15. SDS-PAGE de las pruebas de expresión en cepas M15, Origami y Shuffle. MPM: marcador de peso molecular; F. S.: fracción soluble; C. I.: cuerpos de inclusión. La inducción se realizó a 16°C por 12 h con 0.5 mM IPTG.

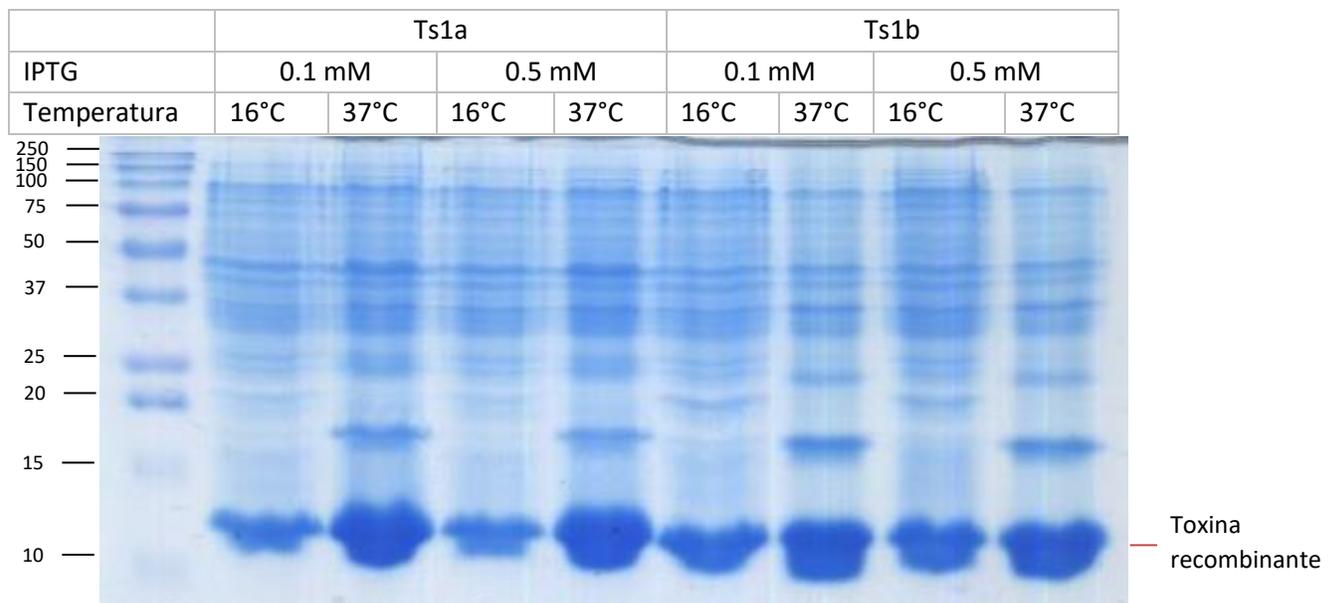


Figura 16. SDS-PAGE de las pruebas de expresión en la cepa Shuffle. SDS-PAGE (15%) de la expresión de rTs1a y rTs1b a diferentes concentraciones de inductor (IPTG) y temperatura. La inducción de la expresión se inició con una OD₆₀₀ de 0.7 en 10 mL de cultivo y un tiempo de expresión de 12 h, la banda observada a una altura de aprox. 11 kDa corresponde a la proteína total expresada.

Con estos resultados se definieron las siguientes condiciones de expresión de las quimeras recombinantes generadas durante este proyecto: se expresaron en la cepa Shuffle a 16 °C con 0.1 mM IPTG durante 12 h. Todas ellas se lograron expresar en *Escherchia coli* con rendimientos variables de 2 a 5 mg/L de cultivo (tabla 7), sin embargo, estas se obtuvieron a partir de cuerpos de inclusión ya que no se logró la expresión como fracción soluble al escalar los cultivos.

Tabla 7. Rendimiento de expresión de las quimeras.

| Toxina | Producción (mg/L) |
|---------------|------------------------------|
| rTs1 | 6.7 |
| rTs1a | 3.65 |
| rTs1b | 5.56 |
| rTs1c | 4.43 |
| rTs1d | 2.32 |
| rTs1e | 4.22 |
| rTs1f | 3.17 |

6.7. Purificación de proteínas

Las toxinas recombinantes se purificaron primeramente por cromatografía de afinidad a resina Ni-NTA y las eluciones proteicas recuperadas con Imidazol 400 mM se sometieron a un segundo paso de purificación por HPLC fase reversa. En esta purificación se observó que las toxinas recombinantes se obtuvieron como múltiples isoformas oxidadas (figuras suplementarias, S7 a S12), lo que es común al expresar este tipo de proteínas en sistemas heterólogos debido a los múltiples puentes disulfuro que pueden formarse (teóricamente 105 posibles isoformas para una proteína con 8 cisteínas) y el entorno poco favorable para su correcta formación en el citoplasma bacteriano. De esta cromatografía se seleccionaron las fracciones más definidas (*) y se analizaron por espectrometría de masas para determinar su masa molecular.

6.8. Espectrometría de masas

De las fracciones colectadas en rpHPLC se determinó la masa molecular experimental, y esta correspondió a las masas moleculares esperadas de las proteínas de fusión recombinantes

(Tabla 8). La diferencia de unidades de masa atómica entre las masas moleculares experimentales y teóricas puede deberse al error del instrumento de medición, en este caso al espectrómetro de masas ion trap (Thermo Scientific LCQ Fleet, San José, CA, USA). Adicionalmente, se detectó presencia de homodímeros de las toxinas Ts1b y Ts1f mediada por puentes disulfuro inespecíficos en cuerpos de inclusión, por lo que al reducirse se recuperaron las toxinas monoméricas.

Tabla 8. Masas moleculares de las quimeras de Ts1 oxidadas.

| QUIMERA | MASA TEÓRICA | MASA EXPERIMENTAL | Δ MASA |
|---------|--------------|-------------------|---------------|
| Ts1a | 8,727.01 Da | 8,728.5 Da | 1.49 Da |
| Ts1b | 8,829.03 Da | 8,830.4 Da | 1.37 Da |
| Ts1c | 8,835.03 Da | 8,835.5 Da | 0.47 Da |
| Ts1d | 8,922.2 Da | 8,923.5 Da | 1.3 Da |
| Ts1e | 8,764.0 Da | 8,764.6 Da | 0.6 Da |
| Ts1f | 8,685.9 Da | 8,684.6 Da | -1.3 Da |

6.9. Plegamiento *in vitro* de las toxinas recombinantes reducidas

Se emplearon varios protocolos de plegamiento *in vitro* partiendo de las toxinas recombinantes reducidas utilizando diferentes concentraciones de buffer, agentes caotrópicos y par redox para la correcta formación de puentes disulfuro, sin embargo, los resultados fueron sumamente variables y en general poco favorables por lo que se reportan únicamente los resultados de dos protocolos de plegamiento *in vitro*.

6.9.1 Plegamiento con glutatión oxidado/reducido (GSH/GSSG)

Se realizó el plegamiento *in vitro* de las toxinas recombinantes reducidas y purificadas por rpHPLC (figura 17) utilizando el par redox GSH/GSSG y la toxina unida al péptido de fusión 6His-tag en una concentración de 100 μ g/mL, los resultados de este plegamiento fueron analizados a las 48 h por rpHPLC inyectando 100 μ g de muestra al equipo, como resultado se obtuvo una cantidad variable de isoformas, ninguna de ellas particularmente favorecida, lo cual indica que estas condiciones pese a ser las que se han utilizado para el plegamiento *in vitro* de la toxina C_{ss}II no favorecen el de las quimeras, estas fracciones se separaron y posteriormente fueron ensayadas para su actividad toxica *in vivo* en modelo de ratón. Estos resultados se observaron en la mayoría de los protocolos de plegamiento que se ensayaron (datos no publicados).

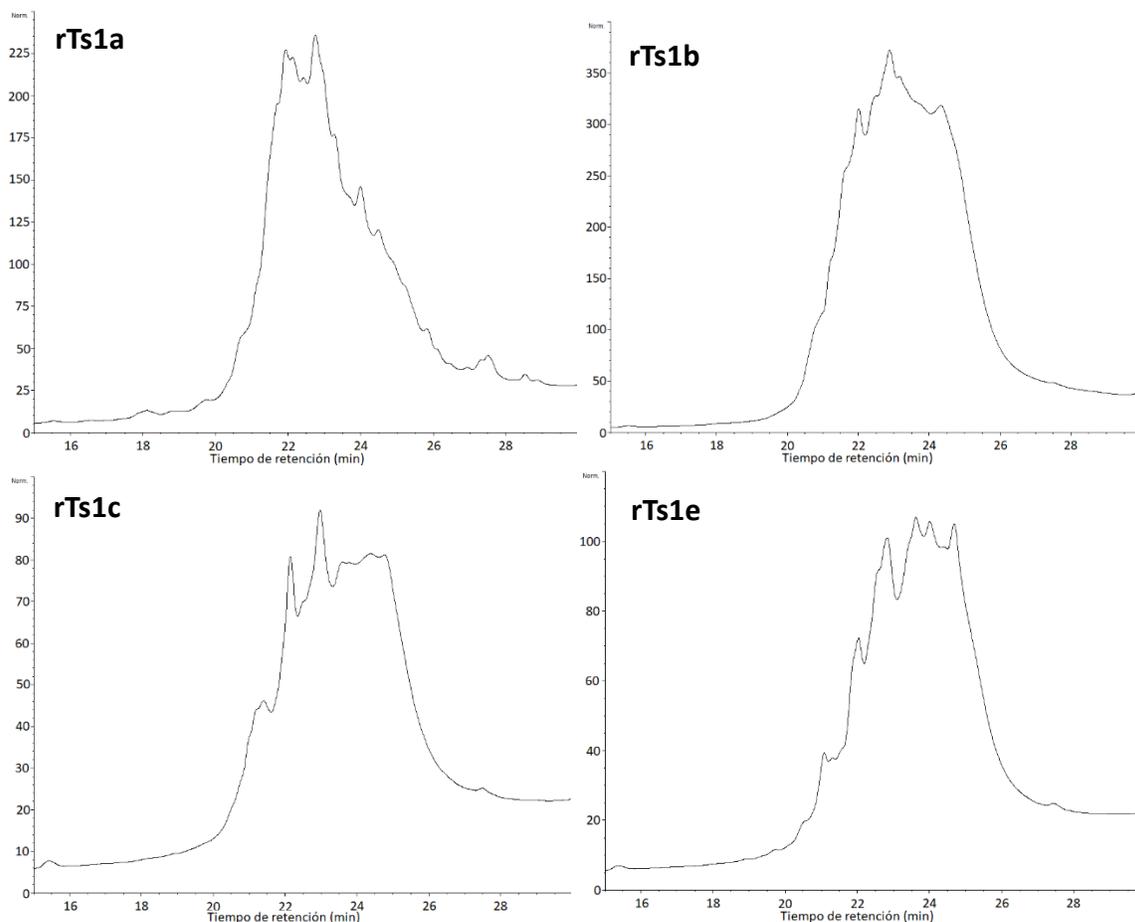


Figura 17. Perfil cromatográfico de los plegamientos realizados con GSH/GSSG. HPLC fase reversa. Se utilizó una columna C18 analítica. Gradiente 15-45% ACN+0.1%TFA en 30 minutos, A=230nm.

6.9.1 Plegamiento con cisteína (Cys/Cis)

Alternativamente para el plegamiento se utilizó cisteína/cistina como par redox y las toxinas unidas al péptido de fusión 6His-tag en baja concentración (10 $\mu\text{g/mL}$), se analizaron a las 48 h por rpHPLC inyectando 100 μg de muestra al equipo y los resultados se observan en las figuras 18 a 20. A partir de estos plegamientos se observó una menor cantidad de isoformas y, en general, fracciones más definidas. Las eficiencias de plegamiento, es decir, el porcentaje de proteína plegada con respecto al total de proteína sometida al protocolo de plegamiento se mantuvo en baja proporción (10% a 30%) para todas las quimeras con excepción de Ts1c. Para el plegamiento de Ts1a se obtuvieron tres isoformas mayoritarias con un perfil hidrofóbico similar, de modo que sus señales se sobrelaparon durante la cromatografía, En el caso de Ts1c y Ts1e se obtuvo un plegamiento más favorable, particularmente en el

caso de Ts1c donde se observó una isoforma plegada en alta concentración con un rendimiento de aproximadamente 70%, mientras que en Ts1e se obtuvo una isoforma mayoritaria, aunque en concentración menor que la descrita anteriormente. Para las quimeras Ts1b, Ts1d y Ts1f no se observaron isoformas particularmente favorecidas, sin embargo, se recuperaron varias fracciones con características muy similares, por lo que se observan como un cúmulo o aglomeramiento proteico en el perfil cromatográfico de HPLC.

Aparentemente la inserción del segmento LKLGDND en la secuencia de Ts1 tiene implicaciones muy notorias en el plegamiento de esta toxina, por un lado la sustitución del residuo de Prolina 19 podría estar favoreciendo el plegamiento *in vitro*, al ser la isomerización de prolinas uno de los pasos determinantes en el plegamiento de proteínas (Wedemeyer *et al.*, 2002), sin embargo, este genera un impedimento o una sustitución importante para la actividad de la toxina, pese a que ninguno de estos aminoácidos ha sido reportado como activo el cambio de este segmento podría estar provocando un impedimento estérico en la superficie molecular para generar la interacción con su canal de sodio.

Todas las fracciones se colectaron manualmente y, tras ser cuantificadas se utilizaron para realizar ensayos de dicroísmo circular y la evaluación de su toxicidad en ratones CD1. Aunque todas las fracciones se analizaron, se remarcen con * aquellas fracciones que retuvieron su actividad tóxica (en caso de haber más de una isoforma) o, en su caso, que se utilizaron para el ensayo de dicroísmo circular.

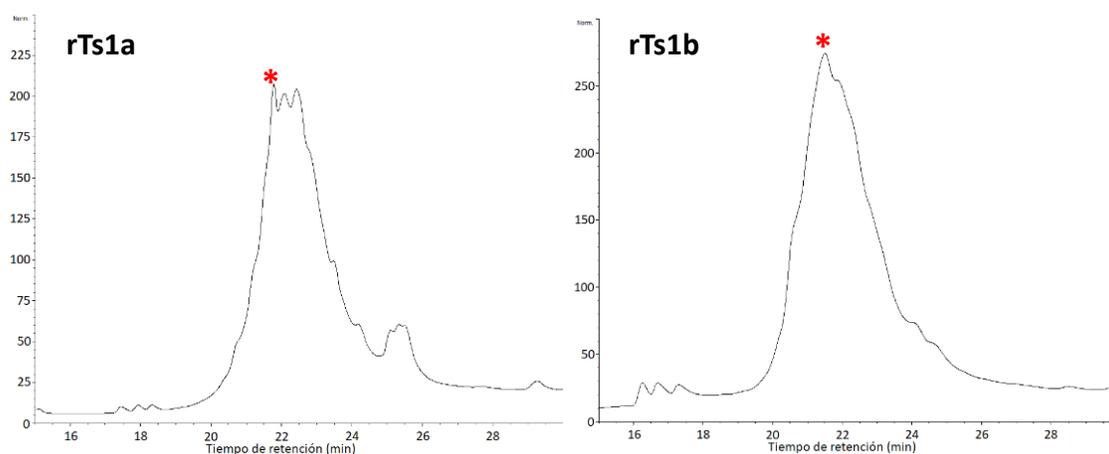


Figura 18. Perfil cromatográfico de los plegamientos realizados con Cys/Cis de rTs1a y rTs1b. HPLC fase reversa. Se utilizó una columna C18 analítica. Gradiente 15-45% ACN+0.1%TFA en 30 minutos, A=230nm

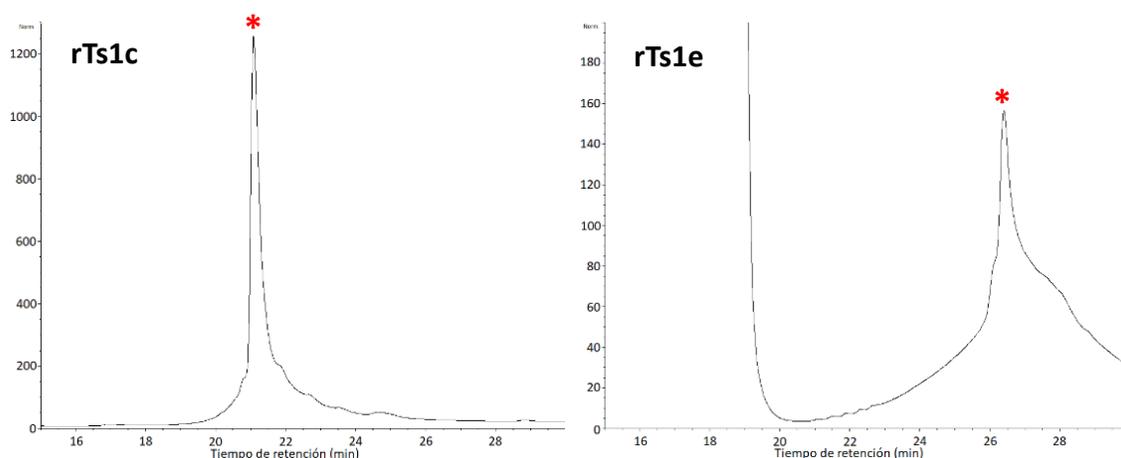


Figura 19. Perfil cromatográfico de los plegamientos realizados con Cys/Cis de rTs1c y rTs1e. HPLC fase reversa. Se utilizó una columna C18 analítica. Gradiente 15-45% ACN+0.1%TFA en 30 minutos, A=230nm

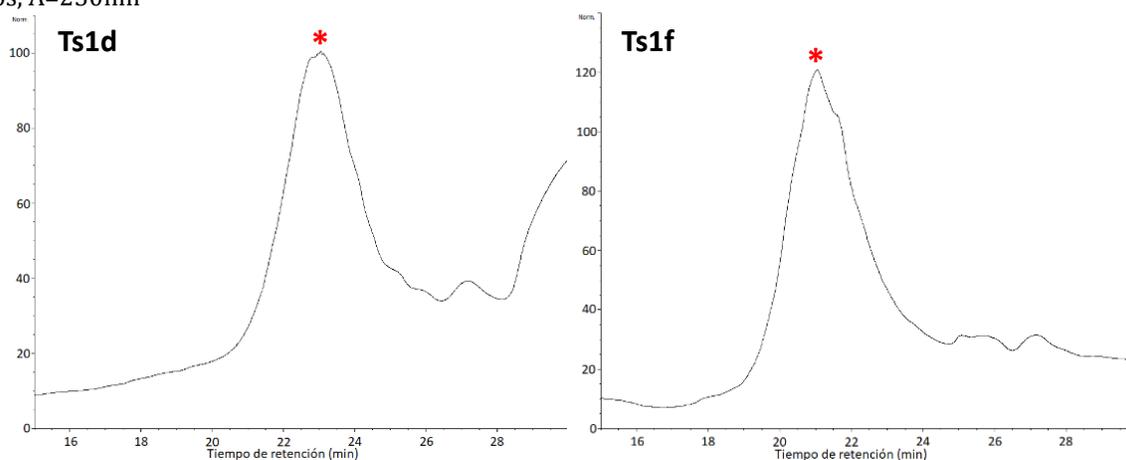


Figura 20. Perfil cromatográfico de los plegamientos realizados con Cys/Cis de rTs1d y rTs1f. HPLC fase reversa. Se utilizó una columna C18 analítica. Gradiente 15-45% ACN+0.1%TFA en 30 minutos, A=230nm

Adicionalmente se expresó la toxina recombinante Ts1 y se sometió a las mismas condiciones de plegamiento con cisteína/cistina (figura 21), como resultado se obtuvieron dos isoformas mayoritarias, sin embargo, la concentración de proteína recuperada fue sumamente baja, debido a una potencial pérdida de la proteína durante el proceso de purificación. Debido a la alta hidrofobicidad de Ts1 (3 residuos de triptófano además de 5 residuos de tirosina), esta puede adherirse y formar dímeros en soluciones acuosas. Mediante estudios de espectro infrarrojo y Raman se propuso que 4 de los residuos de tirosina, además de sus tres residuos de triptófano se encuentran expuestos en la superficie de la molécula creando una

superficie altamente hidrofóbica (Areas *et al.*, 1987). Por otro lado, estudios de dicroísmo circular (Loret *et al.*,1990) demostraron que, comparada con otras toxinas de alacrán, Ts1 tiene una estructura altamente desordenada y es altamente flexible lo que sugiere que tiene una amplia capacidad para adoptar cambios conformacionales. Estas características pueden estar relacionadas con la dificultad de plegamiento de Ts1 en condiciones *in vitro*, así como las quimeras generadas, siendo este posible ante condiciones estrictas de baja concentración de proteína (0.01 mg/mL), similar a lo reportado por Dang *et al.* (2014) y Shenkarev *et al.*(2019). Con respecto a las otras toxinas, las quimeras Ts1c y Ts1e mostraron un mejor plegamiento, además de un mayor plegamiento y rendimiento que Ts1, mientras que para Ts1a, aunque se recuperaron tres isoformas principales se obtuvo un mayor rendimiento por fracción que para Ts1. Para las otras quimeras (Ts1b, Ts1d y Ts1f) el plegamiento no mostró mejoría, ya que las fracciones recuperadas no se definen claramente en el cromatograma, indicando una acumulación de isoformas con propiedades hidrofóbicas muy similares.

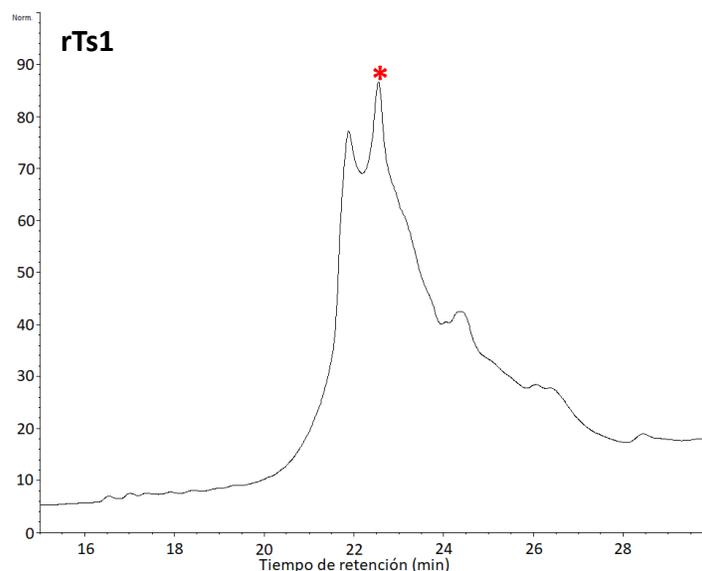


Figura 21. Perfil cromatográfico del plegamiento realizado con Cys/Cis de rTs1. HPLC fase reversa. Se utilizó una columna C18 analítica. Gradiente 15-45% ACN+0.1%TFA en 30 minutos, A=230nm

6.10 Dicroísmo Circular

Para comparar la estructura secundaria de las quimeras con la toxina nativa Ts1 se realizaron ensayos de dicroísmo circular en el intervalo de 180 a 260 nm. Como resultado de este ensayo (figura 22) se observan similitudes con la toxina nativa.

Los datos de dicroísmo circular demostraron que el espectro de la toxina Ts1 presentó una intensidad máxima de lectura a 191nm, mientras que las lecturas máximas de las quimeras presentaron un intervalo similar (190 a 194 nm). A su vez la intensidad mínima de Ts1 fue 206 nm y para las quimeras 206 a 207, lo cual concuerda con lo reportado por Loret en 1990 para toxinas de alacrán. Estos resultados indican que, aparentemente, las toxinas plegadas con Cys/Cis presentan una estructura similar a la de la toxina nativa, particularmente en el apareamiento correcto de sus puentes disulfuro, ya que una formación incorrecta podría disruptir la estructura secundaria de la molécula, dando como resultado alteraciones en el espectro de dicroísmo circular.

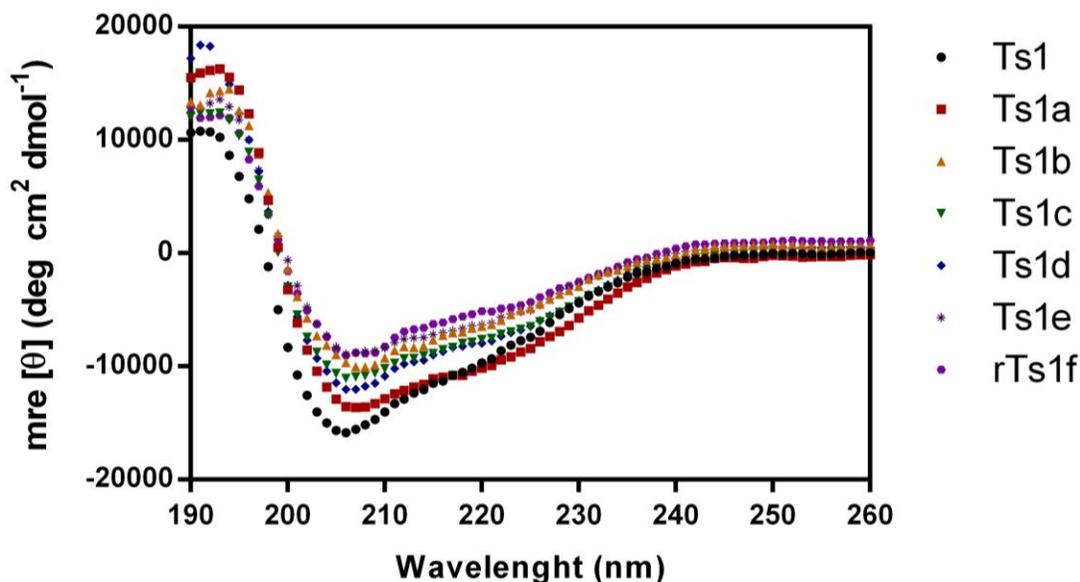


Figura 22. Espectros de dicroísmo circular de Ts1 y quimeras plegadas *in vitro*. Los datos fueron normalizados en la media de elipticidad residual (mre) para su interpretación.

6.11 Ensayos de toxicidad en ratones CD1: Vía intracraneal

Para los ensayos de toxicidad se inyectaron por triplicado las toxinas recombinantes plegadas *in vitro* purificadas por rpHPLC por vía intracraneal en las concentraciones indicadas en la tabla 9, inicialmente se utilizaron 5 µg de toxina por ratón para determinar el efecto tóxico de las fracciones obtenidas, en aquellas que presentaron toxicidad (Ts1a y Ts1e) se ensayaron a concentraciones menores (3 µg), mientras que la forma recombinante de Ts1 se ensayó a 1 µg. En estos ensayos, se observó toxicidad para tres de las mutantes evaluadas (Ts1a, Ts1e y Ts1f) mientras que solo dos fueron letales al administrarse por esta vía (Ts1a y Ts1e). En el caso del individuo control no presentó síntoma alguno con la administración de 5 µL de agua destilada. Las fracciones colectadas de las toxinas plegadas con GSH/GSSG y otros métodos de plegamiento presentaron nula toxicidad (datos no publicados), con excepción de rTs1a, la cual poseía una toxicidad muy reducida comparada con la obtenida del protocolo Cys/Cis.

Tabla 9. Resultados de ensayos de toxicidad por vía intracraneal en ratones CD1. Los ratones presentaron un peso de 25 g en promedio. Control: agua tetradestilada estéril (5µL).

| VARIANTE | VOLU- MEN (µL) | CANTI- DAD (µG) | SÍNTOMAS DE INTOXI- CACIÓN | MUERTE | TIEMPO (MIN) |
|----------|-------------------|--------------------|-------------------------------|----------|-----------------|
| Ts1 | 5 | 0.25 | Síntomas graves | Sí | 5 |
| rTs1 | 5 | 1 | Síntomas graves | Sí | 12 |
| rTs1a | 5 | 3 | Síntomas graves | Sí | 20 |
| rTs1b | 5 | 5 | Síntomas leves | No | |
| rTs1c | 5 | 5 | Sin síntomas | No | |
| rTs1d | 5 | 5 | Sin síntomas | No | |
| rTs1e | 5 | 3 | Síntomas graves | Si | 13 |
| rTs1f | 5 | 5 | Síntomas leves | Si (1/3) | >120 |

Entre los síntomas observados durante el envenenamiento del ratón se observó una parálisis rígida, inicialmente en las patas posteriores y después extendiéndose en cola, patas anteriores y torso, acompañado de convulsiones espontáneas de corta duración y respiración agitada, la última fase del envenenamiento se caracterizó por una parálisis corporal generalizada, disnea y eventualmente la muerte del ratón por paro respiratorio. Los ratones control (así como los ratones asintomáticos) no presentaron ninguna de estas afectaciones, mientras que aquellos con síntomas leves de envenenamiento solo tuvieron dificultades para respirar.

Estos síntomas son similares al desarrollo del envenenamiento por la toxina nativa Ts1, acentuados solamente por la velocidad del desarrollo de los síntomas y muerte del individuo.

6.12 Ensayos de electrofisiología

Se realizaron ensayos de electrofisiología con las toxinas quimeras recombinantes rTs1a y rTs1e, ya que estas fueron la que mostraron toxicidad y letalidad en los ensayos de toxicidad en ratón. Los Na_v empleados para las pruebas iniciales fueron los Na_v de humano 1.3, 1.4 y 1.6, expresados constitutivamente en células HEK293 utilizando el protocolo descrito en la sección experimental 5.12, los resultados de estos ensayos se muestran en las figuras 23 a 28.

La quimera Ts1a mantiene su actividad moduladora de la activación en los Na_vs 1.3, 1.4 y 1.6, como fue reportado por Peigneur *et al.* en 2015 para la toxina Ts1. Interesantemente se observó un efecto previamente no reportado para Ts1 u otras toxinas clásicas de sodio sobre el aumento de la conductancia o pico de corriente máxima en los canales hNa_v 1.3 y 1.4 en presencia de 400 nM de la toxina Ts1a, contrario a la disminución de la conductancia que normalmente está asociada al efecto β de esta familia de toxinas, este aumento de conductancia no se observó en el canal 1.6, por lo que aparentemente este efecto podría estar dado por la unión de la toxina a una región no conservada en los Na_v ausente en el canal 1.6. Con respecto a la quimera Ts1e se observó que mantenía su actividad tóxica en los canales Na_v 1.3 y 1.6 reduciendo el potencial de apertura del canal y disminuyendo la conductancia, aunque este último efecto de manera reducida sobre el Na_v 1.6. Con respecto al canal Na_v 1.4 no se observó alteración en la cinética de activación del canal mientras que, si se registró una disminución de la conductancia, este efecto se suele presentar en el canal Na_v 1.5, el cual posee una interacción única con estas toxinas con respecto al resto de isoformas de Na_v, sin embargo, al observarse en el canal 1.4 implica que la actividad tipo atrapamiento del sensor de voltaje sobre este canal se pierde, lo que conlleva a una pérdida de la modulación de la activación dependiente de voltaje.

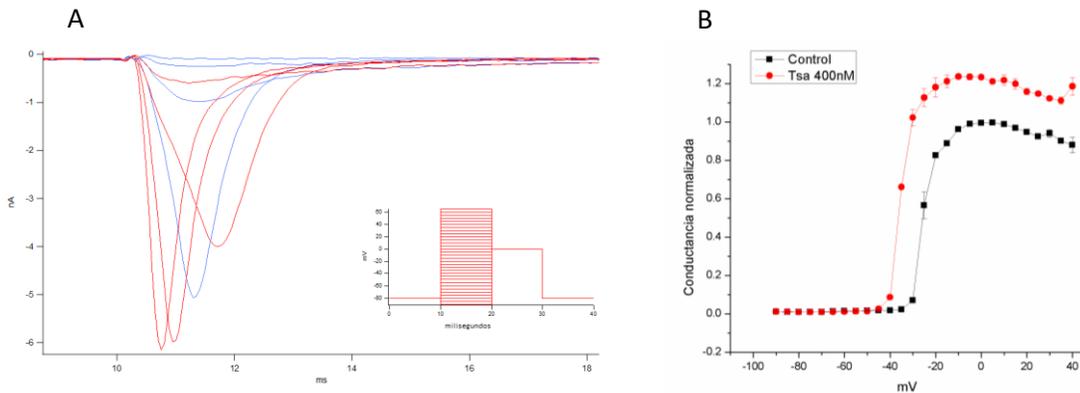


Figura 23. Registros realizados con la toxina Ts1a sobre el canal hNa_v 1.3. A.) Trazos de corriente representativos de -40 a -25 mV. Azul: control; Rojo: 400 nM toxina recombinante Ts1a. **B)** Curvas de activación dependiente de voltaje. Negro: control; Rojo: 400 nM toxina recombinante Ts1a

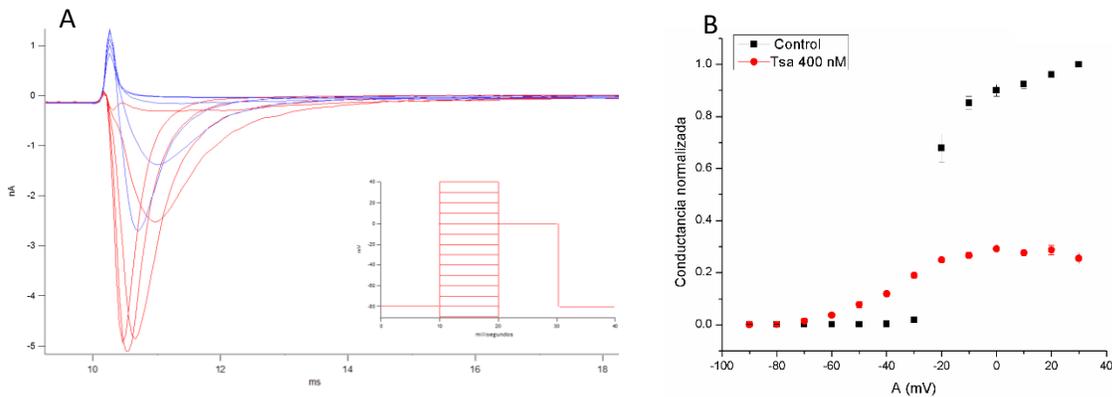


Figura 24. Registros realizados con la toxina Ts1a sobre el canal hNa_v 1.4. A.) Trazos de corriente representativos de -40 a 0 mV. Azul: control; Rojo: 400 nM toxina recombinante Ts1a. **B)** Curvas de activación dependiente de voltaje. Negro: control; Rojo: 400 nM toxina recombinante Ts1a.

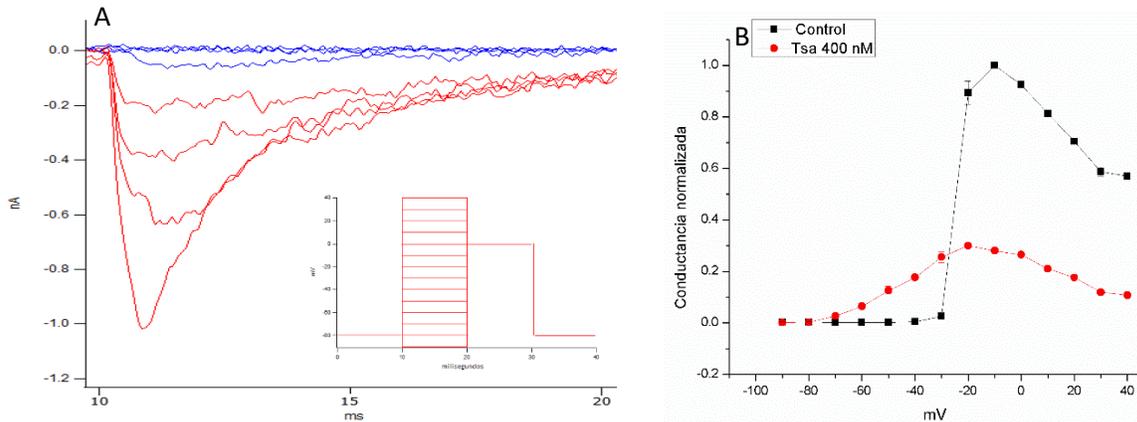


Figura 25. Registros realizados con la toxina Ts1a sobre el canal hNa_v 1.6. A.) Trazos de corriente representativos de -60 a -30 mV. Azul: control; Rojo: 400 nM toxina recombinante Ts1a. **B)** Curvas de activación dependiente de voltaje. Negro: control; Rojo: 400 nM toxina recombinante Ts1a.

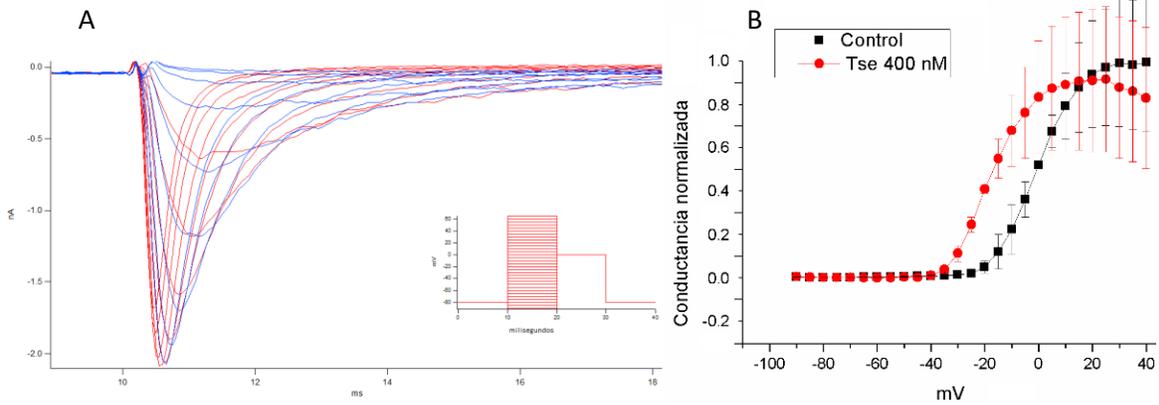


Figura 26. Registros realizados con la toxina Ts1e sobre el canal hNav 1.3. A). Trazos de corriente representativos de -50 a -10 mV. Azul: control; Rojo: 400 nM toxina recombinante Ts1a. **B)** Curvas de activación dependiente de voltaje. Negro: control; Rojo: 400 nM toxina recombinante Ts1a.

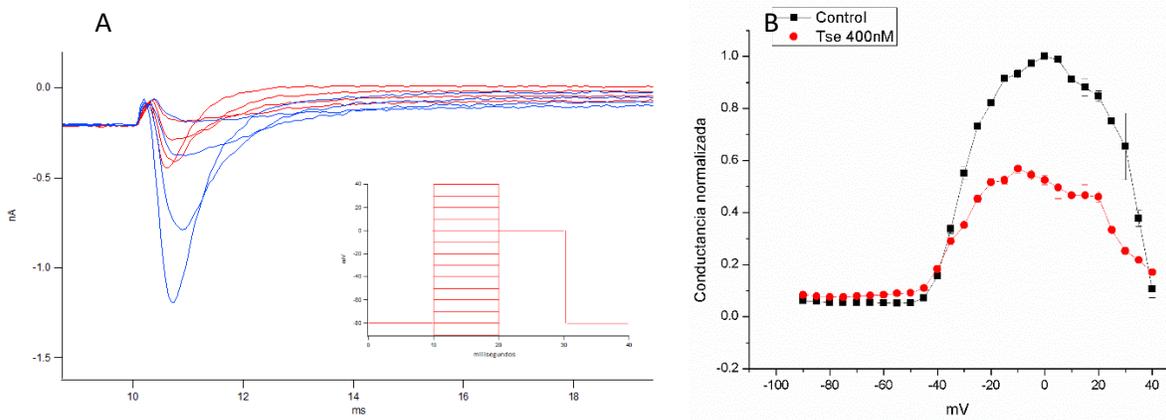


Figura 27. Registros realizados con la toxina Ts1e sobre el canal hNav 1.4. A). Trazos de corriente representativos de -50 a -30 mV. Azul: control; Rojo: 400 nM toxina recombinante Ts1a. **B)** Curvas de activación dependiente de voltaje. Negro: control; Rojo: 400 nM toxina recombinante Ts1a.

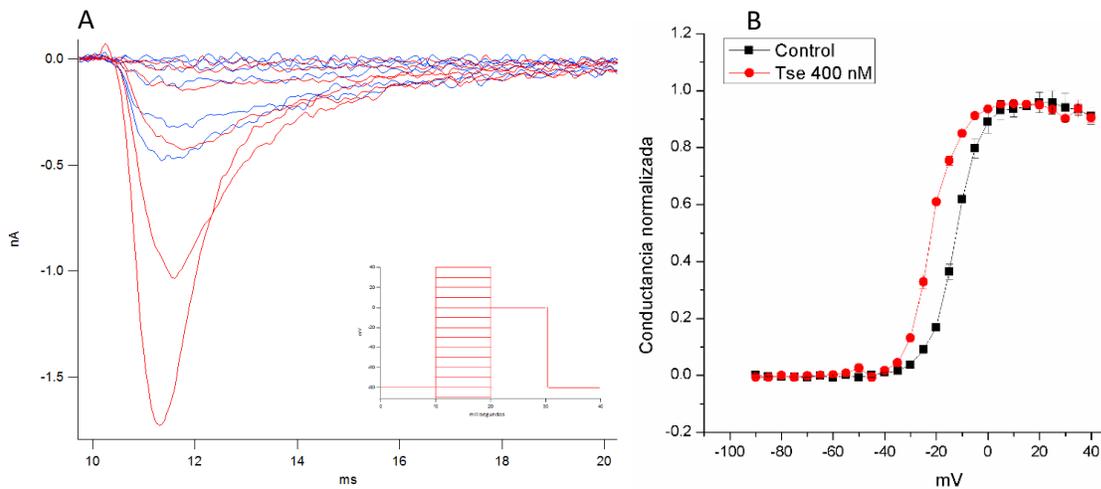


Figura 28. A). Registros realizados con la toxina Ts1e sobre el canal hNav 1.6. **A).** Trazos de corriente representativos de -40 a -20 mV. Azul: control; Rojo: 400 nM toxina recombinante Ts1a. **B)** Curvas de activación dependiente de voltaje. Negro: control; Rojo: 400 nM toxina recombinante Ts1a.

7. Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos en el transcurso de este proyecto se observó que con la generación de quimeras de dos toxinas de alacrán mediante el intercambio de sus asas es posible obtener proteínas funcionales con cambios implícitos en su plegamiento *in vitro*, así como su efecto tóxico en mamífero y su actividad moduladora en canales de sodio.

El papel que juegan los residuos no conservados de las asas en el plegamiento *in vitro* de las toxinas recombinantes es variado, teniendo algunas regiones un papel dramático en el plegamiento, mientras que otras regiones implican cambios en su actividad *in vivo* y en la forma en que ejercen dicha actividad, al modificar parámetros como la conductancia del canal. En general, la facilidad o dificultad de estas proteínas de plegarse correctamente en condiciones controladas está dada por un conjunto de factores que involucran tanto las cargas de los aminoácidos, sus posiciones en la cadena, así como su tamaño, sus interacciones y las que estas tienen con el medio.

Aunque estas propiedades pueden ser modificadas para facilitar el plegamiento, resulta complicado el predecir el efecto que tendrán sobre las propiedades moleculares de estas proteínas, por lo que estos cambios deberían estudiarse a mayor detalle para poder definir su posible aplicación en el campo de la biotecnología y en el diseño de proteínas.

En conclusión, se logró expresar y realizar el plegamiento *in vitro* de las quimeras, así como se definió la actividad de estas en mamífero y en canales Na_v , observando cambios en la afinidad y el tipo de interacción con los mismos. Aunque algunos de estos cambios conllevaron una pérdida de actividad, en algunos casos favorecieron el plegamiento *in vitro* bajo determinadas condiciones, esto podría aplicarse a futuro en el diseño de proteínas particularmente difíciles de obtener por metodologías recombinantes con las complicaciones inherentes que implican las mutaciones de estas moléculas.

8. Perspectivas

Las perspectivas de este trabajo son:

- Los análisis más específicos de residuos involucrados en el plegamiento *in vitro* de las toxinas generadas, especialmente en aquellas que presentaron un plegamiento muy favorable (Ts1c) así como la conservación de actividad toxica (Ts1a y Ts1e).
- Analizar el mecanismo de modulación que ejerce la quimera Ts1a sobre los subtipos de Nav 1.3 y 1.4, donde se observó un aumento en la conductividad del canal, esto no se había reportado previamente para las toxinas Ts1 ni CssII, por lo que se requerirían más estudios para analizar como ejerce este efecto la toxina Ts1a.
- La generación de mutantes de la quimera Ts1a sobre el aminoácido K8 y K12 para determinar su función y la posible interacción con los dominios de esta toxina sobre los sensores de voltaje en canales de sodio.
- Debido a que la neutralización de toxinas de importancia médica es uno de los objetivos del laboratorio, la inmunización y generación de anticuerpos utilizando estas quimeras como antígenos y así determinar su capacidad de generar anticuerpos neutralizantes tanto para Ts1 como para CssII como alternativa para la producción de antivenenos.

9. Referencias

- Amorim, F. G., Boldrini-França, J., de Castro Figueiredo B, K., Cardoso, I. A., De Pauw, E., Quinton, L., & Arantes, E. C. (2018). Heterologous expression of rTsHyal-1: the first recombinant hyaluronidase of scorpion venom produced in *Pichia pastoris* system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(7), 3145–3158.
- Areas, Elizabeth; Giglio, J., & Kawano, Eliana; Kawano, Y. (1987). Comparison of Raman spectra in the lyophilized state and in buffer solution Polypeptide backbone conformation. *Biochimica et Biophysica Acta*, *915*, 292–298.
- Baneyx, F., & Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, *22*(11), 1399–1408.
- Barhanin, J., Giglios, J. R., Leopold, P., Schmid, A., Sampaio, S. V., & Lazdunski, M. (1982). Tityus serrulatus Venom Contains Two Classes of Toxins. *Molecules*, 12553–12558.
- Berkmen, M. (2012). Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, *82*(1), 240–251.
- Bordon, K. de C. F., Cologna, C. T., & Arantes, E. C. (2015). Scorpion Venom Research Around the World: *Tityus serrulatus*. In *Scorpion Venoms* (pp. 411–437). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Bosmans, F., Martin Eaucclair, M., & Tytgat, J. (2007). Differential effects of five ‘classical’ scorpion β -toxins on rNav1.2a and DmNav1 provide clues on species-selectivity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *218*(1), 45–51.
- Campos, F. V., Chanda, B., Beirão, P. S. L., & Bezanilla, F. (2007). β -Scorpion Toxin Modifies Gating Transitions in All Four Voltage Sensors of the Sodium Channel. *The Journal of General Physiology*, *130*(3), 257–268.
- Catterall, W. A. (2012). Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *The Journal of Physiology*, *590*(11), 2577–2589.
- Catterall, W. A. (2014). Structure and function of voltage-gated sodium channels at atomic resolution. *Experimental Physiology*, *99*(1), 35–51.
- Cestèle, S., Qu, Y., Rogers, J. C., Rochat, H., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1998a). Voltage sensor-trapping: Enhanced activation of sodium channels by β -scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neuron*, *21*(4), 919–931.
- Cestèle, S., Qu, Y., Rogers, J. C., Rochat, H., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1998b). Voltage Sensor-Trapping: Enhanced Activation of Sodium Channels by β -Scorpion Toxin Bound to the S3-S4 Loop in Domain II. *Neuron*, *21*(4), 919–931.
- Cestèle, S., Yarov-Yarovoy, V., Qu, Y., Sampieri, F., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2006). Structure and Function of the Voltage Sensor of Sodium Channels Probed by a β -Scorpion Toxin. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(30), 21332–21344.
- Coelho, V. A., Cremonez, C. M., Anjolette, F. A. P., Aguiar, J. F., Varanda, W. A., & Arantes, E. C. (2014). Functional and structural study comparing the C-terminal amidated β -neurotoxin Ts1

- with its isoform Ts1-G isolated from *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon*, *83*, 15–21.
- Cohen, L., Karbat, I., Gilles, N., Froy, O., Corzo, G., Angelovici, R., & Gurevitz, M. (2004). Dissection of the Functional Surface of an Anti-insect Excitatory Toxin Illuminates a Putative “Hot Spot” Common to All Scorpion β -Toxins Affecting Na⁺ Channels. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(9), 8206–8211.
- Cohen, L., Karbat, I., Gilles, N., Ilan, N., Benveniste, M., Gordon, D., & Gurevitz, M. (2005). Common Features in the Functional Surface of Scorpion β -Toxins and Elements That Confer Specificity for Insect and Mammalian Voltage-gated Sodium Channels. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(6), 5045–5053.
- Cologna, C., Marcussi, S., Giglio, J., Soares, A., & Arantes, E. (2009). *Tityus serrulatus* Scorpion Venom and Toxins: An Overview. *Protein & Peptide Letters*, *16*(8), 920–932.
- Dang, B., Kubota, T., Correa, A. M., Bezanilla, F., Kent, S. B. H., Bezanilla, F., & Kent, S. B. H. (2014). Total Chemical Synthesis of Biologically Active Fluorescent Dye-Labeled Ts1 Toxin. *Angewandte Chemie International Edition*, *53*(34), 8970–8974.
- De Lima, M. E., Martin, M. F., Diniz, C. R., & Rochat, H. (1986). *Tityus serrulatus* toxin VII bears pharmacological properties of both β -toxin and insect toxin from scorpion venoms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *139*(1), 296–302.
- Deuis, J. R., Mueller, A., Israel, M. R., & Vetter, I. (2017). The pharmacology of voltage-gated sodium channel activators. *Neuropharmacology*, *127*, 87–108.
- Estrada, G., Garcia, B. I., Schiavon, E., Ortiz, E., Cestele, S., Wanke, E., & Corzo, G. (2007). Four disulfide-bridged scorpion beta neurotoxin Cssl: Heterologous expression and proper folding in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1770*(8), 1161–1168.
- Estrada, G., Restano-Cassulini, R., Ortiz, E., Possani, L. D., & Corzo, G. (2011). Addition of positive charges at the C-terminal peptide region of Cssl, a mammalian scorpion peptide toxin, improves its affinity for sodium channels Nav1.6. *Peptides*, *32*(1), 75–79.
- French, R. J., & Terlau, H. (2004). Sodium channel toxins-receptor targeting and therapeutic potential. *Current Medicinal Chemistry*, *11*(23), 3053–3064. Retrieved from
- Goldin, A L, Barchi, R. L., Caldwell, J. H., Hofmann, F., Howe, J. R., Hunter, J. C., & Catterall, W. A. (2000). Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, *28*(2), 365–368. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11144347>
- Goldin, Alan L. (1999). Diversity of mammalian voltage-gated sodium channels. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *868*, 38–50.
- Gopalakrishnakone, P., Possani, L. D., & Schwartz, E. F. (2015). *Scorpion Venoms*. (P. Gopalakrishnakone, L. D. Possani, E. F. Schwartz, & R. C. Rodríguez de la Vega, Eds.). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Gurevitz, M., Gordon, D., Barzilai, M. G., Kahn, R., Cohen, L., Moran, Y., & Karbat, I. (2013). Molecular Description of Scorpion Toxin Interaction with Voltage-Gated Sodium Channels. In *Toxinology* (pp. 1–19). Dordrecht: Springer Netherlands.

- Gurevitz, M., & Gueta, H. A. (2016). The Paradox of Scorpion Toxin Interactions with Portable Na^v Receptors. *JSM Chemistry*, 4(Figure 2), 1–5.
- Hassani, O., Mansuelle, P., Cestele, S., Bourdeaux, M., Rochat, H., & Sampieri, F. (1999). Role of lysine and tryptophan residues in the biological activity of toxin VII (Ts gamma) from the scorpion *Tityus serrulatus*. *European Journal of Biochemistry*, 260(1), 76–86.
- Hernández-Salgado, K., Estrada, G., Olvera, A., Coronas, F. I., Possani, L. D., & Corzo, G. (2009). Heterologous expressed toxic and non-toxic peptide variants of toxin CsxII are capable to produce neutralizing antibodies against the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. *Immunology Letters*, 125(2), 93–99.
- Israel, M. R., Thongyoo, P., Deuis, J. R., Craik, D. J., Vetter, I., & Durek, T. (2018). The E15R Point Mutation in Scorpion Toxin Cn2 Uncouples Its Depressant and Excitatory Activities on Human Na^v 1.6. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(4), 1730–1736.
- Ke, S., & Madison, E. L. (1997). Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube “megaprimer” PCR method. *Nucleic Acids Research*, 25(16), 3371–3372.
- Loret, E. P., Sampieri, F., Roussel, A., Granier, C., & Rochat, H. (1990). Conformational flexibility of a scorpion toxin active on mammals and insects: A circular dichroism study. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 8(2), 164–172.
- Martin-Eauclaire, M.-F., Bougis, P. E., & de Lima, M. E. (2018). Ts1 from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*: A half-century of studies on a multifunctional beta like-toxin. *Toxicon*, 152(July), 106–120.
- Martin-Eauclaire, M. F., Céard, B., Ribeiro, A. M., Diniz, C. R., Rochat, H., & Bougis, P. E. (1992). Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding the main β -neurotoxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. *FEBS Letters*, 302(3), 220–222.
- Mendes, T. M., Dias, F., Horta, C. C. R., Pena, I. F., Arantes, E. C., & Kalapothakis, E. (2008). Effective *Tityus serrulatus* anti-venom produced using the Ts1 component. *Toxicon*, 52(7), 787–793.
- Mouhat, S., Jouirou, B., Mosbah, A., De Waaerd, M., & Sabatier, J.-M. (2004). Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochemical Journal*, 378(3), 717–726.
- Oren, D. A., Froy, O., Amit, E., Kleinberger-Doron, N., Gurevitz, M., & Shaanan, B. (1998). An excitatory scorpion toxin with a distinctive feature: an additional α helix at the C terminus and its implications for interaction with insect sodium channels. *Structure*, 6(9), 1095–1103.
- Pedraza Escalona, M., & Possani, L. D. (2013). Scorpion beta-toxins and voltage-gated sodium channels: interactions and effects. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 18, 572–587. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23276943>
- Peigneur, S., Cologna, C. T., Cremonez, C. M., Mille, B. G., Pucca, M. B., Cuypers, E., & Tytgat, J. (2015). A gamut of undiscovered electrophysiological effects produced by *Tityus serrulatus* toxin 1 on Na^v-type isoforms. *Neuropharmacology*, 95, 269–277.

- Pinheiro, C. B., Marangoni, S., Toyama, M. H., & Polikarpov, I. (2003). Structural analysis of Tityus serrulatus Ts1 neurotoxin at atomic resolution: insights into interactions with Na⁺ channels. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 59(3), 405–415.
- Polikarpov, I., Matilde, M. S., Marangoni, S., Toyama, M. H., & Teplyakov, A. (1999). Crystal structure of neurotoxin Ts1 from Tityus serrulatus provides insights into the specificity and toxicity of scorpion toxins. Edited by R. Huber. *Journal of Molecular Biology*, 290(1), 175–184.
- Possani, L. D., Martin, B. M., Svendsen, I., Rode, G. S., & Erickson, B. W. (1985). Scorpion toxins from Centruroides noxius and Tityus serrulatus. Primary structures and sequence comparison by metric analysis. *Biochemical Journal*, 229(3), 739–750.
- Quintero-Hernández, V., Jiménez-Vargas, J. M., Gurrola, G. B., Valdivia, H. H., & Possani, L. D. (2013). Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon*, 76, 328–342.
- Quintero-Hernández, V., Ortiz, E., Rendón-Anaya, M., Schwartz, E. F., Becerril, B., Corzo, G., & Possani, L. D. (2011). Scorpion and spider venom peptides: Gene cloning and peptide expression. *Toxicon*, 58(8), 644–663.
- Riaño-Umbarila, L., Ledezma-Candanoza, L. M., Serrano-Posada, H., Fernández-Taboada, G., Olamendi-Portugal, T., Rojas-Trejo, S., & Becerril, B. (2016). Optimal Neutralization of Centruroides noxius Venom Is Understood through a Structural Complex between Two Antibody Fragments and the Cn2 Toxin. *Journal of Biological Chemistry*, 291(4), 1619–1630.
- Rodríguez De La Vega, R. C., & Possani, L. D. (2005). Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: Biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon*, 46(8), 831–844.
- Saucedo, A. L., del Rio-Portilla, F., Picco, C., Estrada, G., Prestipino, G., Possani, L. D., & Corzo, G. (2012). Solution structure of native and recombinant expressed toxin CssII from the venom of the scorpion Centruroides suffusus suffusus, and their effects on Nav1.5 Sodium channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1824(3), 478–487.
- Schiavon, E., Pedraza-Escalona, M., Gurrola, G. B., Olamendi-Portugal, T., Corzo, G., Wanke, E., & Possani, L. D. (2012). Negative-shift activation, current reduction and resurgent currents induced by β -toxins from Centruroides scorpions in sodium channels. *Toxicon*, 59(2), 283–293.
- Shenkarev, Z. O., Shulepko, M. A., Peigneur, S., Myshkin, M. Y., Berkut, A. A., Vassilevski, A. A., & Kirpichnikov, M. P. (2019). Recombinant production and structure-function study of ts1 toxin from the Brazilian scorpion Tityus serrulatus. *Доклады Академии Наук*, 484(1), 112–116.
- Stevens, M., Peigneur, S., & Tytgat, J. (2011). Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. *Frontiers in Pharmacology*, 2 NOV(November), 1–13.
- Stewart, E. J., Åslund, F., & Beckwith, J. (1998). Disulfide bond formation in the Escherichia coli cytoplasm: An in vivo role reversal for the thioredoxins. *EMBO Journal*, 17(19), 5543–5550.
- Sun, Y., Bosmans, F., Zhu, R., Goudet, C., Xiong, Y., Tytgat, J., & Wang, D. (2003). Importance of the Conserved Aromatic Residues in the Scorpion α -Like Toxin BmK M1. *Journal of Biological Chemistry*, 278(26), 24125–24131.

Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2), 211–222.

Wedemeyer, W. J., Welker, E., & Scheraga, H. A. (2002). Proline cis-trans isomerization and protein folding. *Biochemistry*, 41(50), 14637–14644.

10. Anexos

Figuras adicionales

Secuencia Ts1a en vector pQE-30

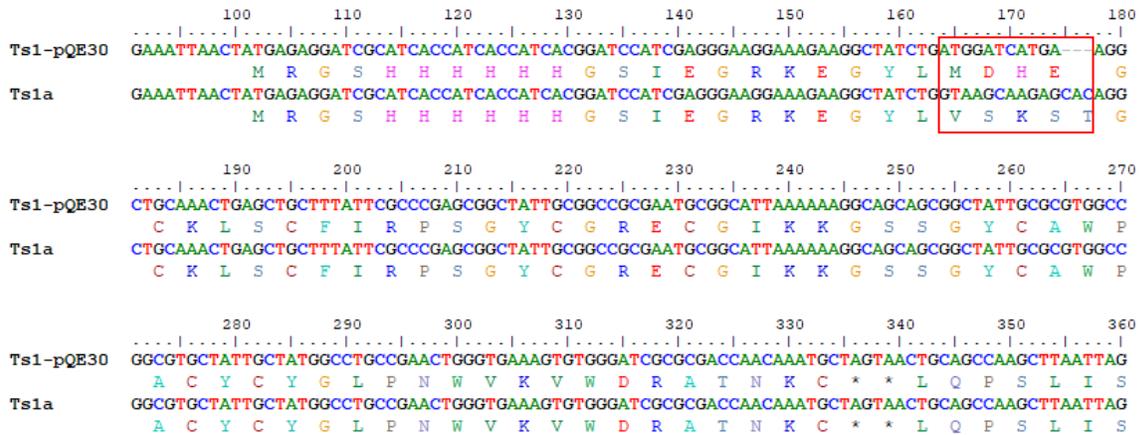


Figura S1. Alineamiento de la secuencia mutante Ts1a con la secuencia Ts1 insertada en el vector pQE-30. En recuadro rojo las mutaciones insertadas en la secuencia.

Secuencia Ts1b en vector pQE-30

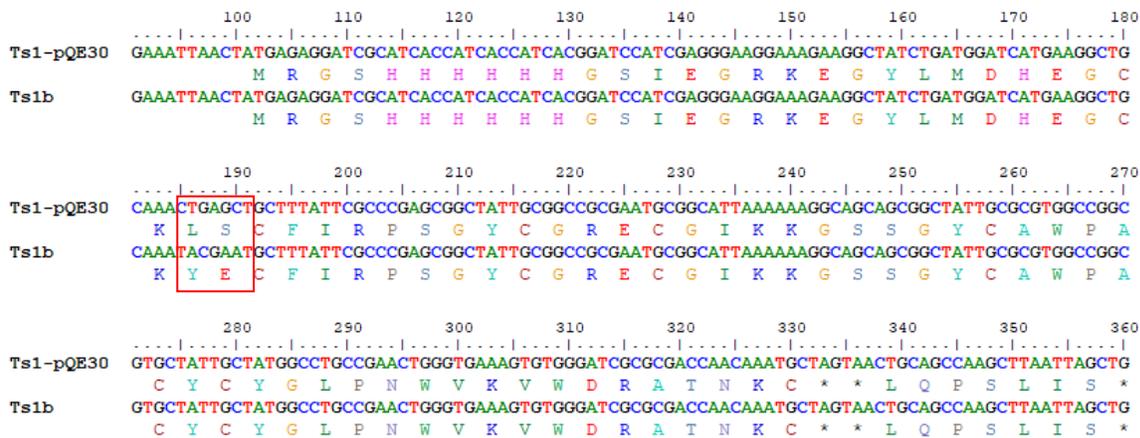


Figura S2. Alineamiento de la secuencia mutante Ts1b con la secuencia Ts1 en vector pQE-30.

Secuencia Ts1c en vector pQE-30

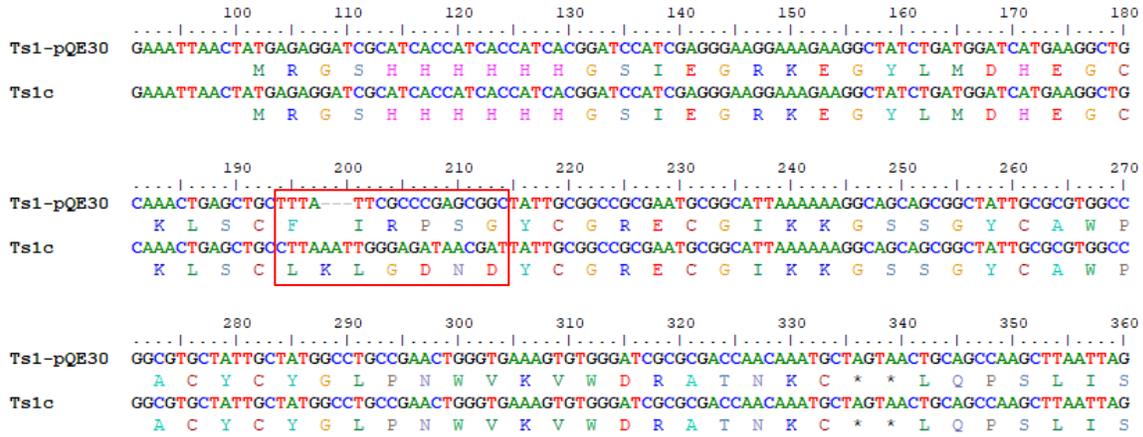


Figura S3. Alineamiento de la secuencia mutante Ts1c con la secuencia Ts1 en vector pQE-30. En recuadro rojo las mutaciones insertadas en la secuencia.

Secuencia Ts1d en vector pQE-30

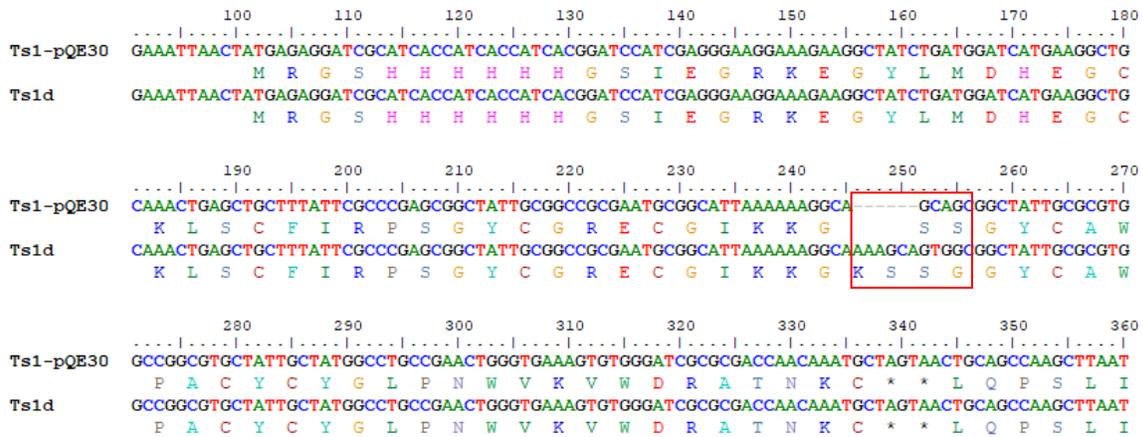


Figura S4. Alineamiento de la secuencia mutante Ts1d con la secuencia Ts1 en vector pQE-30. En recuadro rojo las mutaciones insertadas en la secuencia.

Secuencia Ts1e en vector pQE-30

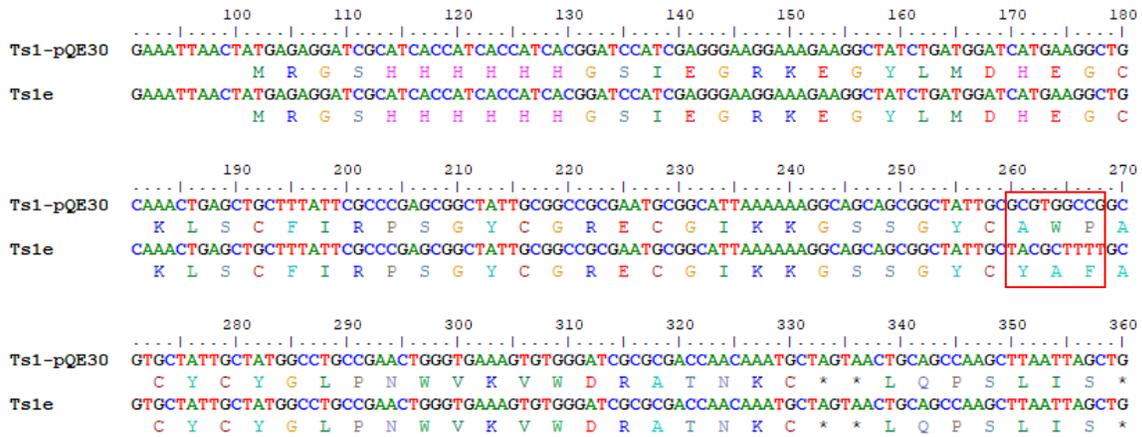


Figura S5. Alineamiento de la secuencia mutante Ts1e con la secuencia nTs1 en vector pQE-30. En recuadro rojo las mutaciones insertadas en la secuencia.

Secuencia Ts1f en vector pQE-30

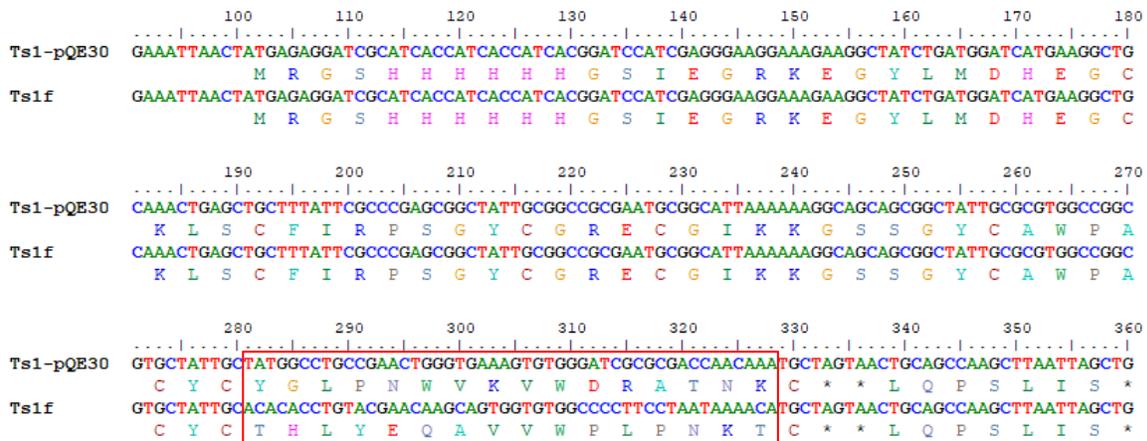


Figura S6. Alineamiento de la secuencia mutante Ts1f con la secuencia nTs1 en vector pQE-30. En recuadro rojo las mutaciones insertadas en la secuencia.

Purificación por rpHPLC de la quimera Ts1a (cuerpos de inclusión)

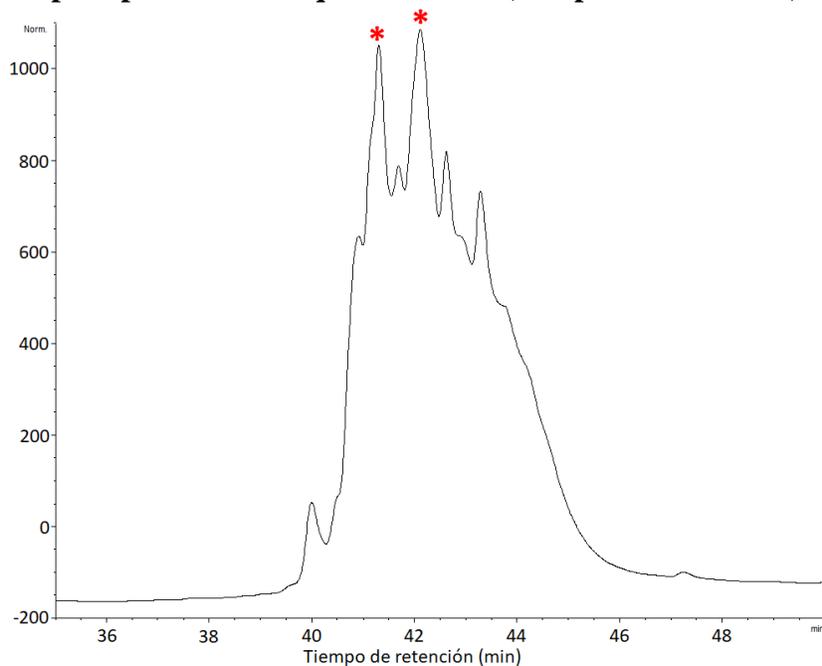


Figura S7. Perfil cromatográfico de la purificación a partir de cuerpos de inclusión de rTs1a. HPLC fase reversa. Se utilizó una columna C18 analítica. Gradiente 0-60% ACN+0.1%TFA en 60 minutos, A=230nm.

Purificación por rpHPLC de la quimera Ts1b (cuerpos de inclusión)

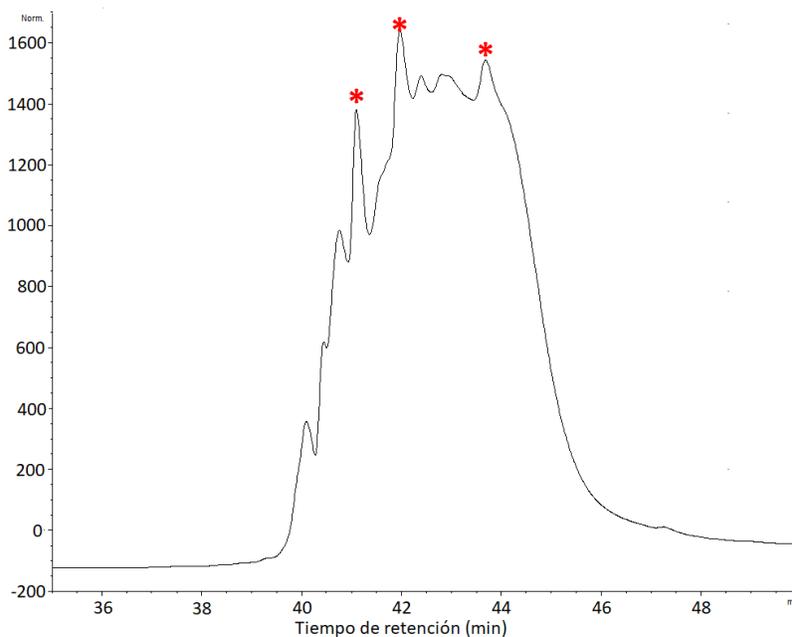


Figura S8. Perfil cromatográfico de la purificación a partir de cuerpos de inclusión de rTs1b. HPLC fase reversa. Se utilizó una columna C18 analítica. Gradiente 0-60% ACN+0.1%TFA en 60 minutos, A=230nm

Purificación por rpHPLC de la quimera Ts1c (cuerpos de inclusión)

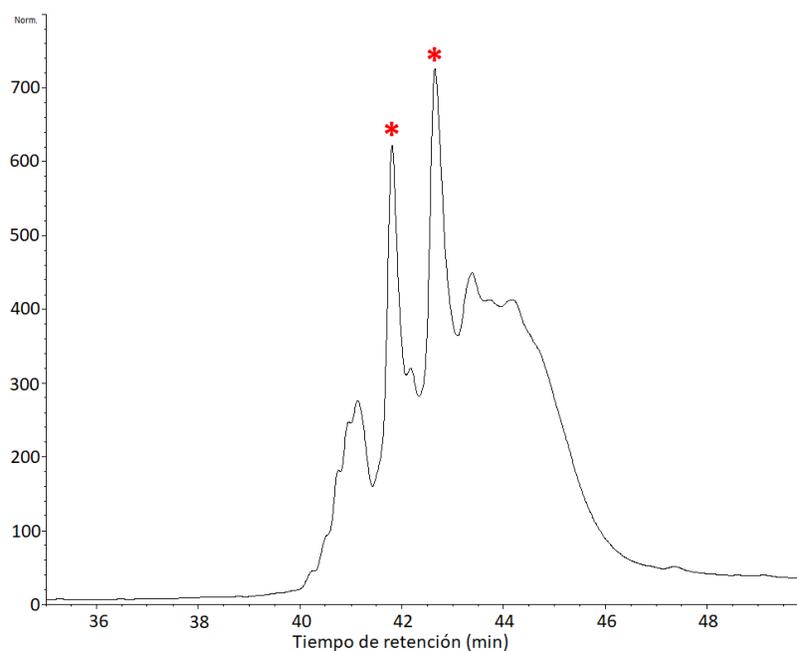


Figura S9. Perfil cromatográfico de la purificación a partir de cuerpos de inclusión de rTs1c. HPLC fase reversa. Se utilizó una columna C18 analítica. Gradiente 0-60% ACN+0.1%TFA en 60 minutos, A=230nm

Purificación por rpHPLC de la quimera Ts1d (cuerpos de inclusión)

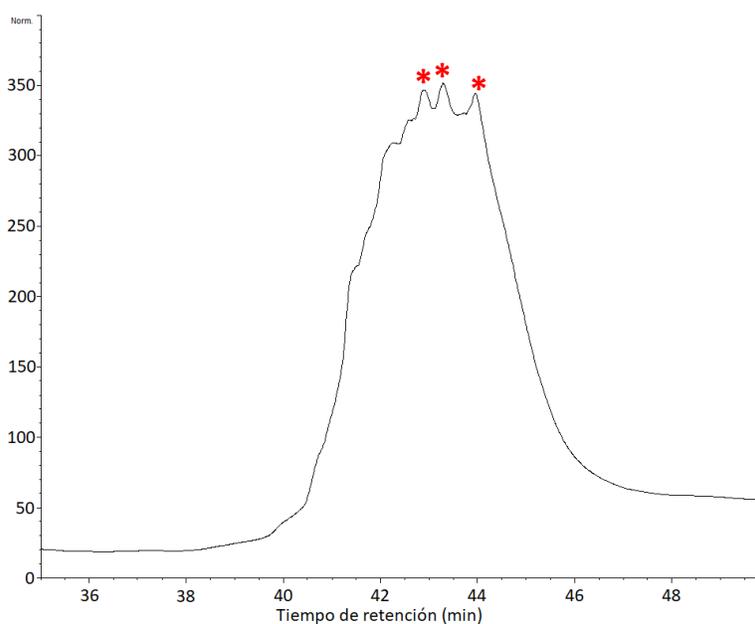


Figura S10 Perfil cromatográfico de la purificación a partir de cuerpos de inclusión de rTs1a. HPLC fase reversa. Se utilizó una columna C18 analítica. Gradiente 0-60% ACN+0.1%TFA en 60 minutos, A=230nm.

Purificación por rpHPLC de la quimera Ts1e (cuerpos de inclusión)

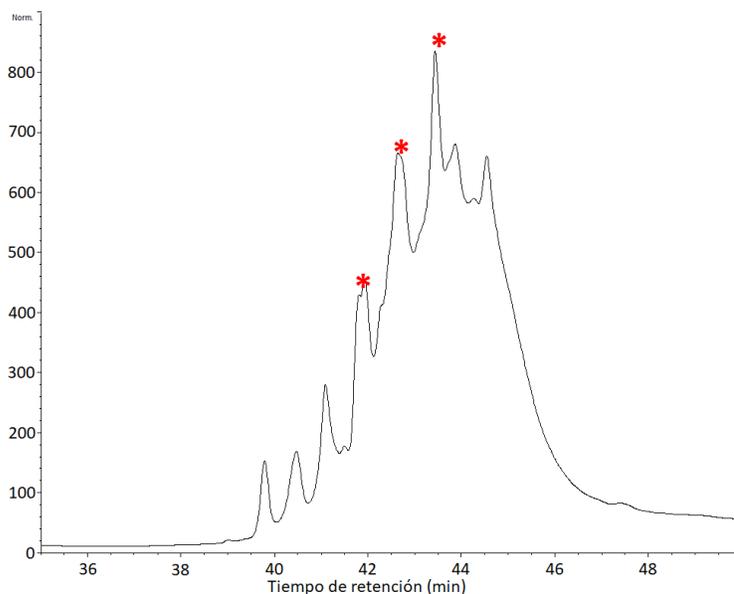


Figura S11. Perfil cromatográfico de la purificación a partir de cuerpos de inclusión de rTs1a. HPLC fase reversa. Se utilizó una columna C18 analítica. Gradiente 0-60% ACN+0.1%TFA en 60 minutos, A=230nm.

Purificación por rpHPLC de la quimera Ts1f (cuerpos de inclusión)

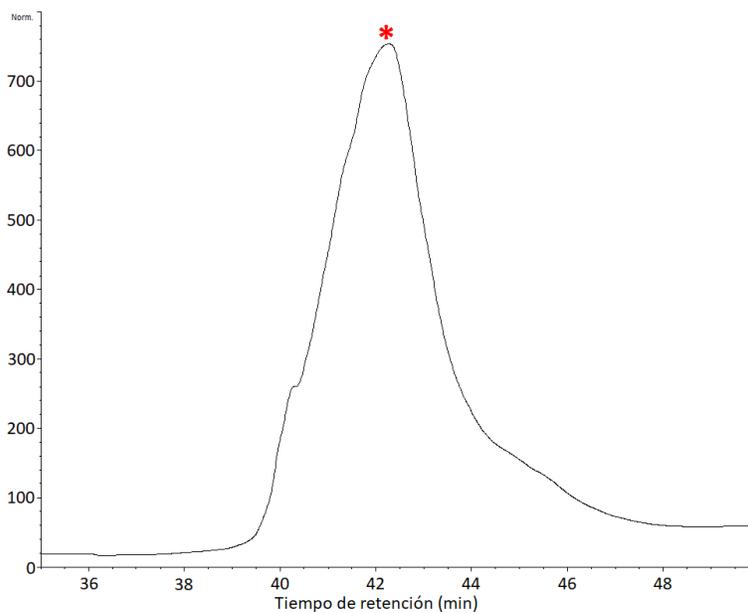


Figura S12 Perfil cromatográfico de la purificación a partir de cuerpos de inclusión de rTs1a. HPLC fase reversa. Se utilizó una columna C18 analítica. Gradiente 0-60% ACN+0.1%TFA en 60 minutos, A=230nm.

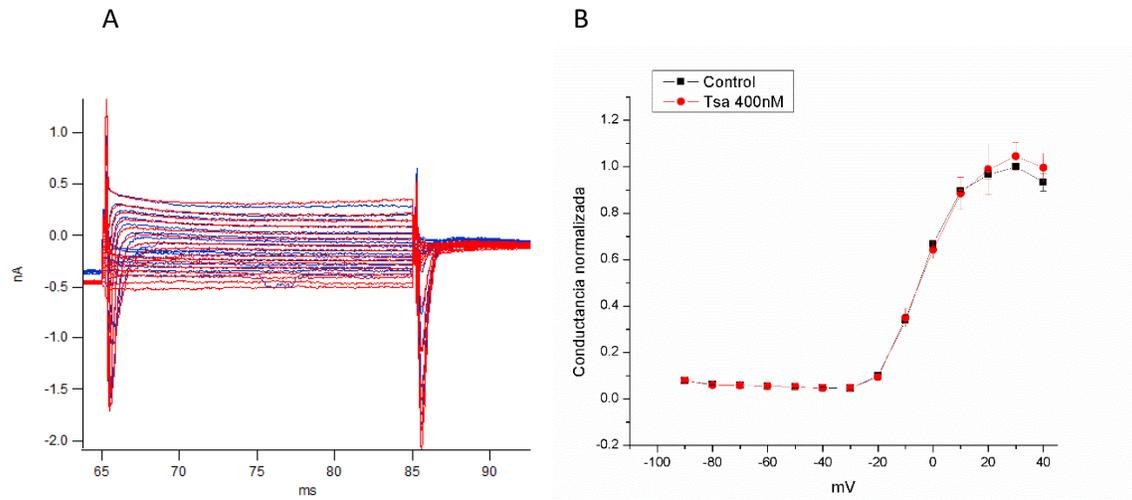


Figura S13. Registros realizados con la toxina Ts1a sobre el canal hNav 1.7. A) Trazos de corriente sobre el canal Na_v 1.7. Azul: control; Rojo: 400 nM toxina recombinante. **B)** Curva de activación dependiente de voltaje. Negro: control; Rojo: 400 nM toxina recombinante Ts1a.