

**Clonación, expresión y caracterización de la toxina de tres dedos
Mipartoxin-I, Mayor componente toxico del veneno de *Micrurus mipartitus*
(serpiente coral rabo de ají)**

Uday Daniel Torres Lamus

**Tesis presentada para optar al título de Maestría en Ciencias Farmacéuticas
y Alimentarias**

Tutora

Vitelbina Nuñez Rangel MsC, PhD

Profesora Escuela de Microbiología

Comité tutorial

Marcel Marín Villa PhD, Leidy Johana Vargas PhD, Andrés Augusto Arias PhD

Universidad de Antioquia

Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Medellín, 2016

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis tutores Vitelbina Núñez Rangel y Marcel Marín Villa, por el acompañamiento en mi proceso de formación.

A los profesores Andrés Augusto Arias y Leidy Johana Vargas, quienes participaron en el comité tutorial, y gracias a sus aportes pude mejorar bastante el planteamiento de este trabajo.

A la profesora Blanca Lucia Ortiz Reyes, quien contribuyo en mi formación en la técnica de SDS-PAGE de péptidos.

A mi compañera y amiga Paola Rey Suárez, por el apoyo en la parte técnica y discusión de algunos resultados.

A todos los compañeros del laboratorio quienes me brindaron su apoyo y su amistad durante la realización de este trabajo.

Al Programa de Ofidismo / Escorpionismo de la Universidad de Antioquia, es un privilegio hacer parte del equipo de investigación de este grupo.

Al serpentario de la universidad de Antioquia, y a sus integrantes, quienes proporcionaron la glándula venenosa, al igual que realizaron el acompañamiento administrativo de este proyecto.

A mis compañeros del PECET y de Biotecnología y a sus grupos de investigación, quienes me permitieron hacer uso de algunos de sus equipos e instalaciones.

Al instituto Clodomiro Picado, quien realizo el análisis por MALDI-TOF TOF de la Mipartoxin-IC

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Investigación – COLCIENCIAS, proyecto Colciencias RC 582-2013 y programa de Jóvenes Investigadores Colciencias N°645 de 2014.

Al Programa Estrategia de Sostenibilidad de los Grupos de Investigación año 2013/2014 del Grupo Programa de Ofidismo/Escorpionismo.

Finalmente agradezco a toda mi familia, principalmente a mi madre, por su comprensión y paciencia durante todo este proceso y a Janeth Catalina Reyes, quien me brindo siempre su apoyo emocional y su constante incentivo.

CONTENIDO

Resumen.....	5
Abreviaturas	5
Introduccion.....	7
Estado del arte	9
Serpientes coral.....	9
Toxinas de los venenos de las serpientes	10
Toxinas tres-dedos (3FTx).....	11
Clonación y Expresión de 3FTx.....	12
Objetivos	13
Objetivo general.....	13
Objetivos específicos.....	13
Metodologia.....	14
Purificación del mRNA de la glándula venenosa de <i>M. mipartitus</i>	14
Obtención de la secuencia putativa de la Mipartoxin-I.....	14
Procedimientos bioinformáticos	15
Construcción del vector de expresión y transformación en <i>Pichia pastoris</i>	15
Expresión de la proteína recombinante Mipartoxin-I.....	17
Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)	17
Ensayos de hibridación de anticuerpos	18
Cromatografía de Afinidad a Ni.....	19
Análisis por RP-HPLC	19
Espectrometría de masas	20
Ensayo de letalidad	20
Resultados	20

Identificación de la secuencia codificante de la Mipartoxin-I	20
Modelamiento de las secuencias codificantes para proteínas de tres dedos	26
Constructos para la expresión PICA, PICB, P ICC	31
Producción de la proteína recombinante	33
Purificación de la Mipartoxin-I recombinante	35
Cromatografía líquida de alta definición (HPLC)	35
Cromatografía de afinidad.....	36
Caracterización de la Mipartoxin-I recombinante.....	37
Espectrometría de masas de la Mipartoxin-IC recombinante.....	37
Ensayo de letalidad.....	39
Discusión.....	40
Proteínas de tres dedos identificadas en el ARNm de la glándula venenosa de M. mipartitus	40
Producción y Caracterización de la Mipartoxin-I recombinante	44
Conclusiones.....	49
Agradecimientos.....	2
Bibliografía.....	50

RESUMEN

Cinco secuencias precursoras para la familia de las alfa-neurotoxinas de cadena corta fueron identificadas a partir del ADNc de la glándula venenosa de la *Micrurus mipartitus* (serpiente coral rabo de ají). Entre ellas la secuencia precursora para la Mipartoxin-I, la Mipartoxin-Ia, isoforma de la anterior, y 3 proteínas más las cuales fueron denominadas Mipartoxin-II, Mipartoxin-III y Mipartoxin-IV. Estas secuencias codificaron para un propéptido de 79-82 aminoácidos, el cual contiene un péptido señal de 21 aminoácidos y un péptido maduro entre 58-61 aminoácidos. A partir de la secuencia codificante para la Mipartoxin-I, se clonaron tres constructos en el plásmido pPICzαC en *Pichia pastoris* cepa X33: Mipartoxin-IA (secuencia propéptido Mipartoxin-I), Mipartoxin-IB (secuencia Mipartoxin-I), y Mipartoxin-IC (secuencia Mipartoxin-I más epítipo c-myc y marcador de 6 histidinas). Sin embargo solamente la Mipartoxin-IC fue la que evidenció una producción aceptable con una concentración de 2-5 mg/L de proteína recombinante con una pureza de 95%. No obstante no mostró efecto letal en el modelo de ratón, pero indujo una leve toxicidad a 100ug/ratón. Por análisis de digestión con tripsina en gel por MALDI-TOF-TOF se confirmaron péptidos de la Mipartoxin-IC, igualmente por anticuerpos anti-His se confirmó la expresión de la proteína. Finalmente por migración en SDS-PAGE y LS/MSD se determinó que su masa molecular fue de 11.715 Da.

Palabras clave: *Micrurus mipartitus*, Mipartoxin-I, Clonación, Expresión de proteínas recombinantes.

ABREVIATURAS

3D	Tridimensional
3FTxs	Toxina de tres dedos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BCA	Ensayo del ácido bicinconínico
Blast	Buscador de Alineamiento Local Básico
BMMG	Medio complejo con buffer y glicerol
BMMY	Medio complejo con buffer y metanol
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
DL50	Dosis letal 50
<i>M. mipartitus</i>	<i>Micrurus mipartitus</i> (Coral rabo de ají)
MDH	Medio mínimo con dextrosa
MMH	Medio mínimo con metanol
Ni-NTA	Columna de agarosa acoplada a níquel
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Protein Data Bank (Banco genético de proteínas)
PLA2	Fosfolipasa A2
TFA	Ácido trifluoroacético
SDS-PAGE	Gel de electroforesis de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
YNB	Medio de Base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos
YPDS	Medio extracto de levadura, peptona, dextrosa, sorbitol

INTRODUCCION

La incidencia de accidente ofídico mundial es de aproximadamente 2.5 millones de mordeduras y a consecuencia de ellos quedan cerca de 250.000 personas con secuelas y por lo menos 85.000 muertes. Para América se estiman aproximadamente 300.000 mordeduras, con 12.000 secuelas, y cerca de 4.000 muertes (1). En Colombia en el año 2014 ocurrieron 4232 accidentes ofídicos (2), y la mayor incidencia fue en el departamento de Antioquia con 637 accidentes (3). Debido a las costumbres de la población de acceder a curanderos y chamanes en casos de accidente ofídico se estima que un número importante de mordeduras no son registradas, por lo tanto la incidencia de accidentes ofídicos es probablemente mayor ((4).

Aproximadamente del 85 % al 90% de los accidentes ofídicos ocurren en comunidades rurales, y del total solamente el 10 al 20% de los casos acontecen en el interior de las viviendas o los alrededores de las casas (5). El 54% de los accidentes ocurren en los jóvenes y adultos entre los 15 - 45 años, de los cuales un 75% es en hombres. Sin embargo, un 30% de los casos se presentan también en niños (5,6). Con relación al caso de las serpientes coral, la mayoría de las mordeduras ocurren en los niños, especialmente en las manos, esto debido a que por el carácter dócil de las corales y sus colores llamativos, es manipulada indebidamente con frecuencia por ellos (7–9). Sin embargo, los accidentes por corales solo representan el 2% del total de los accidentes ofídicos, pero la mayoría de estos se consideran graves, debido al carácter neurotóxico de su veneno (9). En relación a lo anterior se ha descrito que dosis entre los 4 a 5 mg/Kg de veneno de *Micrurus spp* son letales para los humanos (10). Para *Micrurus mipartitus* se describió una dosis letal 50 (DL50) de 0.47ug de veneno / g de peso (11).

En Colombia, no se produce antiveneno para las serpientes del genero *Micrurus*, por lo cual se tienen que importar de otros países como Brasil y Costa Rica. En el primer caso el suero se produce con el veneno de las especies de corales de mayor importancia clínica brasileras, como son *M. coralinus*, *M. lemniscatus*, y *M. frontalis* (12,13). Para el segundo caso se produce un suero empleando venenos de para *M. carinicaudus*, *M. fulvius* y *M. nigrocinctus*. Además, en este antiveneno se especifica que no tiene actividad para tratar el envenenamiento causado por *M. mipartitus* (14).

Se ha encontrado en casos de envenenamiento moderado y severo por *Micrurus*, que las manifestaciones neurológicas asociadas a parálisis se presentan en las primeras 2-4 h a partir del envenenamiento, aunque en algunos casos pueden aparecer tardíamente a las 7-18 h después de la mordedura (13). Además la parálisis empeora rápidamente si no se inicia el tratamiento adecuado, y se puede requerir ventilación artificial. La completa recuperación de una parálisis severa puede durar hasta dos meses (13,15).

La falta de antiveneno, en parte se debe a la poca disponibilidad de veneno de *Micrurus spp.* y esto se relaciona con los estrictos hábitos alimenticios y ambientales de las serpientes coral, que dificultan su manutención en cautiverio, y a que por sus características morfo-anatómicas, producen una escasa cantidad de veneno (16–18). La cantidad de veneno varía de acuerdo a la especie por ejemplo para la especie *Micrurus mipartitus* es de aproximadamente 2,5mg por extracción (11).

Como un acercamiento para solucionar esta problemática, en trabajos anteriores se realizó la caracterización proteómica y biológica del veneno de la serpiente coral rabo de ají, *M. mipartitus* (11), serpiente coral de mayor importancia clínica de Colombia. Así mismo, se identificó una de sus toxinas mayoritarias,

correspondiente al grupo de tres dedos (3FTxs), y la cual se denominó Mipartoxin-I (19).

El objetivo de esta investigación fue la producción de esa toxina de forma recombinante en *Pichia pastoris*, con el propósito de utilizarla como una alternativa para incrementar la disponibilidad de materia prima para la inmunización, la obtención de anticuerpos y el posterior desarrollo de un antiveneno para *M. mipartitus*.

ESTADO DEL ARTE

Serpientes coral

La familia *Elapidae* comprende un diverso grupo de serpientes proteroglifas altamente venenosas tanto terrestres como marinas con más de 60 géneros y por lo menos 300 especies (20). Para el continente americano, sus representantes son conocidos como serpientes corales, grupo que abarca 3 géneros: *Micrurus*, *Micruroides* y *Leptomicrurus*; distribuidos desde los Estados Unidos hasta el norte de Argentina, con más de 120 especies (20). La mayoría de las serpientes coral, son pequeñas y se alimentan principalmente de otras serpientes, además de pequeños lagartos y anfibios. En Colombia, se encuentran más de 23 especies de *Micrurus* y 3 especies de *Leptomucurus*, distribuidas en diversos hábitats desde bosques tropicales lluviosos y llanuras hasta bosque de niebla. Entre las representantes más importantes del género *Micrurus*, debido a su mayor interacción con ambientes humanos, se encuentra la coral rabo de ají o *M. mipartitus*, distribuida a lo largo de las tres cordilleras de los Andes y encontrada entre los 0 y 2400 msnm (20).

Las serpientes coral poseen un potente veneno neurotóxico, DL₅₀ entre 7-76 µg veneno/18-22 g ratón (21), que induce manifestaciones clínicas neurotóxicas

periféricas como: ptosis bilateral, oftalmoplegía, parálisis de mandíbula, laringe, y músculos de la faringe, sialorrea, parálisis de la nuca y músculos de las extremidades y parálisis respiratoria que puede llevar a la muerte (22,23). Además, estudios experimentales han demostrado un amplio espectro de actividades adicionales como son actividad cardiotoxica, hemolítica y miotóxica (21,24).

Toxinas de los venenos de las serpientes

Los venenos de serpiente son una mezcla compleja de moléculas activas incluyendo fracciones proteicas y no-proteicas (25–27). Sin embargo, el número de estructuras que comprende esta vasta cantidad de proteínas y péptidos es limitada, y usualmente no excede la docena de familias de proteínas (7,28). Entre ellas se destacan las toxinas de tres dedos (3FTxs), las fosfolipasas A₂ (PLA₂), los inhibidores de proteinasas, las lecitinas, las serina proteasas, y la familia de las metaloproteinasas (29), entre otras. Más influyente que el número de proteínas y péptidos diferentes que se encuentran en el veneno, es la abundancia de cada uno de sus componentes. Por ejemplo en el veneno de los Elapidos las 3FTxs son uno de los componentes mayoritarios (30).

El análisis de proteómica del de *M. mipartitus*, mostró a las 3FTxs como la familia de proteína predominante con un 60%. Seguido por las PLA₂ con un 30%, y el 10% restante distribuido entre L-amino oxidasas, P-III metaloproteinasas, inhibidores tipo Kunitz, Serina proteasas, y familias lectina/like-lectina tipo-C (11). En un trabajo posterior Rey Suárez, identificó a una 3FTxs, llamada Mipartoxin-I, como el mayor componente neurotóxico del veneno de *M. mipartitus*, y correspondió a una α -neurotoxina de cadena corta de 7030 Da, que presentó una dosis letal (LD₅₀) en ratón de 0,06 ug/g de peso corporal, y demostró una acción post-sináptica predominante, que se asoció al bloqueo de los receptores nicotínicos colinérgicos en cérvix biventral de pollo (19). En este trabajo, se concluyó que la caracterización funcional y la información estructural descrita podrían ser de utilidad en el desarrollo

de un recombinante inmunogénico sintético para superar la escasez de veneno para inmunización.

Toxinas tres-dedos (3FTx)

Esta familia de polipéptidos no enzimáticos de 60 – 74 amino ácidos, se caracteriza por un patrón similar de plegamiento a causa de 4 a 5 puentes disulfuro muy conservados en todos sus miembros: en el cual tres loops de hojas- β se extienden desde un núcleo central y se entrelazan entre ellos, dispuestos con una apariencia de tres dedos (29,31). Los miembros de esta familia difieren entre ellos por sus actividades biológicas, los cuales incluyen: las α -neurotoxinas provenientes de los géneros *Naja* y *Micrurus*, las cuales antagonizan con los receptores nicotínicos musculares de la acetilcolina (nAChR) (11,32), bungarotoxinas provenientes de *Bungarus* (kraits), las cuales reconocen los receptores nicotínicos neurales (33), las toxinas muscarínicas provenientes de *Dendroaspis* (mambas) que actúan sobre los receptores muscarínicos (34,35), las fasciculinas provenientes de *Dendroaspis* que inhiben la acetilcolinesterasa (36,37), las calciseptinas provenientes de *Dendroaspis* que bloquean los canales de calcio tipo-L (38), y las cardiotoxinas provenientes de *Naja* (cobra) que forman poros en las membranas celulares (39).

Las α -neurotoxinas, se enlazan con gran afinidad y selectividad, y en la mayoría de los casos, de forma irreversible, a los receptores nicotínicos postsinápticos de la acetilcolina produciendo bloqueo de la transmisión neuromuscular (Nirthanan et al., 2003). Estas han sido clasificadas en tres subgrupos: α -neurotoxinas de cadena-corta que tienen 60-62 residuos y cuatro enlaces disulfuro conservados; α -neurotoxinas de cadena-larga con 66-75 residuos y cinco puentes disulfuro, el puente disulfuro adicional se localiza en el bucle intermedio (bucle II); y las α -neurotoxinas no-convencionales que son monómeros de 62-68 residuos y cinco puentes disulfuro, pero con la diferencia de que el quinto puente disulfuro se encuentra en el bucle I (31,40).

Al respecto de la organización genética de las 3FTx, esta no ha sido evaluada para serpientes *Micrurus*, sin embargo si ha sido descrita para varias serpientes como por ejemplo: el gen de la neurotoxina de cadena corta de *Laticuda semidasciata* (41), la cobratoxina y la cobratoxina b de *Naja atra* (42), la α -bungarotoxina y la k-bungarotoxina de *Bungarus multicinctus* (43,44), las neurotoxinas débiles de *Naja sputatrix* (45) y la neurotoxina de cadena larga de *Pseudonaja textiles* (46). Producto de esta información se sabe que los genes de las 3FTx son bastante conservados, tienen tres exones y dos intrones, de los cuales, el primer exón codifica para la región 5'UTR y parte del péptido señal, el segundo exón codifica para la última parte del péptido señal y la mitad N-terminal de la proteína, y finalmente el tercer exón codifica para la otra mitad C-terminal de la proteína y la región 3'UTR (47). Igualmente, se han identificado elementos represores localizados en los promotores Sntx-1, Sntx-2 y Pt-bp, además de una inserción de tetra nucleótido (TCCC) (47). Esas regiones promotoras también han revelado varios elementos reguladores como son NF-1, AP-2, TBP GR y LF-A1 implicando que las 3FTx poseen mecanismos comunes de expresión genética (47).

Clonación y Expresión de 3FTx

Se han realizado varios estudios de expresión de proteínas 3FTx de algunos animales venenosos entre ellos de la cobra, *Naja sputatrix* (48–50); la serpiente de mar, *Hydrophis cyanocinctus* (51); y el escorpión, *Mesobuthus eupeus* (52). De las corales (*Micrurus*) se han realizado estudios de expresión de 3FTx de *Micrurus corallinus* (24,53); y *Micrurus laticollaris* (54), empleando como modelo de expresión *Escherichia coli*. Para *M. laticollaris*, se evidenció reconocimiento por anticuerpos de conejo desarrollados para la toxina nativa, lo que demostró la homología entre las dos proteínas. Sin embargo, la proteína recombinante no presentó actividad biológica, evento que fue atribuido a dificultades en el plegamiento asociados a la falta de puentes disulfuro (54).

Un modelo alternativo a la expresión en bacterias, es la expresión en levaduras, las cuales al ser organismos eucariotas, combinan la eficiencia de la formación de los puentes disulfuro con condiciones de cultivo comparablemente tan simples como las de bacteria (33,55). El sistema de expresión en *Pichia pastoris* es un sistema que permite poner el gen de interés bajo el control del gen de la alcohol oxidasa inducible por metanol, permitiendo de esta manera la producción de mayores niveles de expresión de proteína. Además, de permitir la yuxtaposición del péptido señal factor alfa, permitiendo la excreción al medio de la proteína de interés y facilitando su posterior aislamiento y purificación (33,56).

En relación a lo anterior, se han expresado algunas 3FTx en *Pichia pastoris*, como la k-bungarotoxina (33) y la α -bungarotoxina (57) de *Bungarus multicinctus*, la toxina muscarinica m1-Toxin1 de *Dendroaspis angusticeps* (58), la Dendroaspina de *Dendroaspis jamesoni* (59) y la Erabutoxina b de *Laticuda semifasciata* (60). Con excepción de la Dendroaspina, todas las otras 3FTxs expresadas en *P. pastoris* presentaron funcionalidad y capacidad de unión a sus receptores específicos (33,57,60).

OBJETIVOS

Objetivo general

- Sintetizar la toxina Mipartoxin-I recombinante a partir de la glándula venenosa de *Micrurus mipartitus*, en un modelo Eucariota.

Objetivos específicos

- Identificar la secuencia que codifica para la expresión de la toxina Mipartoxin-I, mediante secuenciación y análisis bioinformático.
- Expresar y Purificar la toxina Mipartoxin-I recombinante purificada.
- Caracterizar la toxina Mipartoxin-I recombinante y compararla con la toxina nativa.

METODOLOGIA

Purificación del mRNA de la glándula venenosa de *Micrurus mipartitus*

Se tomó una glándula venenosa de un ejemplar fallecido de *Micrurus mipartitus*, y se le extrajo el RNA por el método de Trizol con Bio-homogeneizador (Ambion) este se cuantifico por nanodrop, se trató con DNasa I (ThermoScientific) y se retro-transcribió con la Maxima first strand cDNA synthesis kit (ThermoScientific).

Obtención de la secuencia putativa de la Mipartoxin-I

Los oligonucleótidos sentido Miparto-F (GGA TCC ATG CTG AAA TGC TAT) y antisentido Miparto-R (AGA TCT TTT GTT GCA CAG GTC) se diseñaron a partir de la traducción inversa de la estructura primaria de la proteína Mipartoxin-I obtenida en trabajos previos (19) y combinado con la frecuencia de uso de codones de *Micrurus corallinus*. Con el objetivo de utilizar una ruta alternativa a lo anterior, se diseñaron también los oligonucleótidos sentido AntiTFT-F (GGC TCCA GAG AAG ATC ACA A) y antisentido AntiTFT-R (AAG GAA TTT AGC CAC TCG TA), los cuales se diseñaron a partir de las regiones conservadas de los extremos 3'UTR y 5'UTR de genes de toxinas de tres dedos de Elápidos publicados en el genbank. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) inicio con la desnaturalización inicial a 94°C 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C 1 min, alineamiento a 51°C 1 min, y polimerización a 72°C 30 seg, la extensión final se realizó a 72°C por 5 min con la enzima polimerasa Platinum Master Mix (Invitrogen), despues el producto se extrajo y purifico con el Qiaquick gel purification kit (Qiagen). Finalmente se clonó el producto de PCR en el plásmido pGEMt-easy (Promega Corporation) en bacterias de *Escherichia coli* DH5a competentes utilizando el método de cloruro de calcio y choque térmico, la selección se realizó en agar LB + ampicilina 100ug/ul. Los clones transformados se verificaron por PCR.

Para secuenciar se seleccionaron 12 clones, los cuales se cultivaron en 1mL de LB 37°C 200 rpm toda la noche, y se les extrajo el DNA plásmidico por Purelink miniprep

(Invitrogen), la secuenciación fue realizada en un 3730 DNA Analyzer por el método de secuenciación de Sanger en MacroGen Corea.

Procedimientos bioinformáticos

La búsqueda de Secuencias de Toxinas de tres dedos se realizó utilizando la base de datos del GenBank por medio de la herramienta Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (61), las características fisicoquímicas de los cebadores se evaluaron con el software oligo analyser integrated DNA technologies (<https://www.idtdna.com/calc/analyser>) y el peso molecular teórico exacto de las proteínas se calculó con el software Compute pI/Mw tool (http://web.expasy.org/compute_pi/). La predicción de la función de las proteínas de tres dedos se realizó a partir del software NTXpred (<http://www.imtech.res.in/raghava/ntxpred/index.html>) (62). Los análisis sobre la estructura, traducción corte y pegue de fragmentos de proteínas y nucleótidos, clustalW se realizaron por medio de los software Generunner ver 5.0.998 Beta (Hastings Software Inc., Hastings, NY, USA; <http://generunner.net/>), BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) (63), y ApE plasmid editor (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>). Para el modelamiento de la estructura terciaria de las proteínas se utilizó el programa SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) (64).

Construcción del vector de expresión y transformación en *Pichia pastoris*

A partir de los productos obtenidos de la secuenciación, se diseñaron dos cebadores sentido que incluían el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *ClaI* (*Bsu15I*) llamados Miparto-F1 (ATC GAT GAA AAC TCT GCT GCT G) el cual amplificaría para la Mipartoxin-I desde el péptido señal y Miparto-F2 (ATC GAT GCT AAA ATG TTA CGT T) que amplificaría la Mipartoxina desde el codón de inicio; y dos cebadores antisentido que incluían el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *XbaI* llamados Miparto-R1 (TCT AGA AAT CAC TTG TTG CAG AGG TC) con el codón de parada (CAC) y Miparto-R2 (TCT AGA AAC TTG TTG CAG AGG TC) sin el codón de parada. A partir de estos cebadores se realizaron tres Mix de

PCR: MixA (Miparto-F1 y Miparto-R1, Tm: 54°C), MixB (Miparto-F2 y Miparto-R1, Tm: 57°C) y MixC (Miparto-F2 y Miparto-R2, Tm: 54°C). La PCR inicio con la desnaturalización inicial a 94°C 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C 1 min, alineamiento a la Tm de cada Mix por 1 min, y polimerización a 72°C 30 seg, la extensión final se realizó a 72°C 5 min con la enzima polimerasa Platinum Master Mix (Invitrogen), la secuencia amplificada se corrió en gel de agarosa 2% 45 min. Posteriormente se extrajo y se purifico como se describió previamente, para continuar con la clonación del producto en el plásmido pGEMt-easy (Invitrogen) en bacterias de *E. coli* DH5α competentes utilizando el método de cloruro de calcio y choque térmico, la selección se realizó en agar LB + zeocina 25ug/ul.

Para secuenciar se seleccionaron 5 clones de cada producto de cada Mix, los cuales se cultivaron en 1mL de LB 37°C 200 rpm toda la noche, y se les extrajo el DNA plásmidico por Purelink miniprep (Invitrogen), la secuenciación fue realizada en un 3730 DNA Analyzer por el método de secuenciación de Sanger en MacroGen Corea.

Con el objetivo de realizar la clonación en *Pichia pastoris*, a un clon previamente verificado por secuenciación de cada Mix (MixA, MixB y MixC) se le extrajo el plásmido con el constructo por Purelink miniprep (Invitrogen). Los plásmidos con el constructo y el vector pPICzaC de Invitrogen, fueron digeridos con las enzimas de restriccion *ClaI* (ThermoScientific) y *XbaI* (ThermoScientific) en Tango Buffer e incubación de 37°C por 16 horas. Posteriormente se les ligo con la T4 ADN ligasa (ThermoScientific) a 20°C por una hora. El producto de ligación fue empleado para transformar células quimio-competentes de *Pichia pastoris* GS115 y X33 seleccionados en agar YPDS (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% dextrosa, 1M sorbitol, 2% agar) + Zeocina 100ug/ul, por el método de choque térmico con el EasyComp Kit (Invitrogen), los clones transformados se verificaron por PCR.

Para la prueba de fenotipo *mut* se cultivaron en agar MDH (1.34% Base Nitrogenada de levadura sin aminoácidos, 4x10⁻⁵% Biotina, 2% Dextrosa, 0.004% Histidina, 15%

agar) y agar MMH (1.34% Base Nitrogenada de levadura sin aminoácidos, 4×10^{-5} % Biotina, 2% Metanol, 0.004% Histidina, 15% agar) por 96 horas (65).

Expresión de la proteína recombinante Mipartoxin-I

Para la selección de clones transformados se cultivó cada clon en 4 mL de caldo BMGY (1% Extracto de Levadura, 2% Peptona, 100mM Fosfato de Potasio, 1,34% Base Nitrogenada de levadura sin aminoácidos, 0.0016mM Biotina, 1% Glicerol) 29°C 230 rpm 48 horas, y se expresó en 2 mL de caldo BMMY (1% Extracto de Levadura, 2% Peptona, 100mM Fosfato de Potasio, 1,34% Base Nitrogenada de levadura sin aminoácidos, 0.0016mM Biotina, 05% Metanol) 29°C 230 rpm 120 horas, con adición de metanol cada 24 horas a volumen final de 0,75%. El sobrenadante fue recolectado por centrifugación a 4500 rpm 10 min y se analizó por electroforesis de proteínas (Invitrogen).

Con los clones seleccionados se realizó un pre cultivo en 5mL BMGY + Zeocina 100ug/ul, a las 24 horas fue transferido a 70 mL de caldo BMGY 29°C, agitado a 230 rpm por 48 horas, el cultivo se centrifugó a 4500 rpm 20 min y se resuspendió para expresión en 35 mL caldo BMMY 29°C 230 rpm 6 días, alimentando cada 24 horas con metanol a volumen final de 0,75% y se recolectaron muestras de 1 mL cada 24 horas. Al finalizar el cultivo, se centrifugó a 4500 rpm 25 min para obtener el sobrenadante, el cual fue dializado por 48 horas en membranas con tamaño de poro de 3500 Da y analizado por electroforesis de proteínas, HPLC y cromatografía de afinidad con níquel.

Electroforesis de proteínas (SDS - PAGE) de tris - tricina

El análisis de las proteínas se realizó en geles de poliacrilamida al 12%. Las muestras fueron corridas en condiciones reducidas en buffer de muestra 1X (0.1M Tris-HCL pH 6.0, 24% glicerol, 1% SDS, 20% β-mercaptoetanol, 0.02% Azul de Coomassie G-250). Los geles fueron corridos en buffer tris-tricina (1M Tris Base, 1M Tricina, 1% SDS) a 130 voltios por 140 minutos. Posteriormente los geles fueron

fijados (10% Ácido Acético, 40% Metanol), y tenidos con azul de Coomassie G-250 (66,67).

Ensayos de hibridación de anticuerpos

Dot Blot

Para evaluar la expresión de la proteína por la levadura y realizar selección de colonias se realizó el método de Dot Blot en caja, para ello se cultivaron clones en agar MMH a 29 °C, y a las 24 horas se colocó una membrana de nitrocelulosa en contacto directo con las colonias y se continuó el cultivo por 72 horas, pero adicionando cada 24 horas 1 mL de metanol al 100%. Posteriormente la membrana de nitrocelulosa se retiró y se incubó 24h en una solución de bloqueó (albumina al 2% en Buffer fosfato pH 7.3 (PBS) a temperatura ambiente, luego se adicionó un anticuerpo monoclonal Anti-His (ThermoScientific) 1:2000 preparado en buffer de bloqueó (leche semidescremada al 3% en PBS) y se incubó por 4 horas a temperatura ambiente, se realizó lavado con el buffer muestras y se realizó hibridación por 2h con anticuerpo monoclonal Anti-ratón marcado con peroxidasa (Sigma) 1:5000 diluido en buffer muestras, se realizó lavado dos veces. Finalmente se reveló con una solución de 4-Cloro-1-naftol 16%, 0.004%, Peróxido de Hidrogeno, 0.02M Tris, 1M NaCl, y 0,005% de Metanol pH 7.5 (68).

Western Blot

El gel obtenido en una electroforesis SDS-PAGE de tris-tricina del producto del sobrenadante de un cultivo, fue transferido a una membrana de nitrocelulosa previamente humedecidas en Buffer de Transferencia (20% Metanol, 0,025M Tris-Base, 0,2M Glicina, pH 8.3). La transferencia se evaluó con rojo Ponceau. La membrana fue bloqueada con albumina 2% en PBS por 24 horas. Después de lavar con buffer de lavado (0,2% albumina en PBS) se adicionó una solución que contenía un anticuerpo monoclonal Anti-His 1:2000 e incubó a 4°C toda la noche, se lavó dos veces y se hibrido con anticuerpo monoclonal Anti-ratón marcado con peroxidasa

por 2 horas a temperatura ambiente, se lavó dos veces en buffer lavado, y 2 veces en agua destilada. Finalmente se realizó revelado con un solución de 4-cloro-1-naftol 16%, 0.004%, Peróxido de Hidrogeno, 0.02M Tris, 1M NaCl, y , 0,005% de Metanol pH 7.5 (68,69).

Cromatografía de Afinidad a Ni.

Se realizó purificación en condiciones nativas por gradiente de pH y de imidazol. En el primer caso el sobrenadante del cultivo se mezcló con un volumen de buffer base (100mM NaHPO₄, 10mM Tris-Cl, 300mM NaCl, pH 8.0) y se aplicó a una columna de 2-3 mL de agarosa acoplada a Ni-NTA (Invitrogen) a un flujo de 0.1 mL/min empleando un cromatógrafo ECONO de Bio-Rad, posteriormente se lavó la columna con buffer base hasta alcanzar la línea Base a 280nm a 1 mL/min, se realizó un lavado posterior con 10 volúmenes de buffer base pH 6.3 a 1 mL/min, la elución se realizó con buffer base a pH 5.7 y 4.5 monitoreando a 280 nm, y recolectando las fracciones con mayor absorbancia a un flujo de 1mL/min, utilizando como buffer receptor el buffer base pH 8.0 (100mM NaHPO₄, 10mM Tris-Cl, 300mM NaCl,) a una proporción 1:1 con la fracción. Para las condiciones del gradiente de imidazol se utilizó buffer de lavado (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20mM imidazol) a 1mL/min, y se realizó la elución con 1 volumen a cada gradiente 100, 200, 300, 400 y 500mM de imidazol en buffer de lavado a un flujo de 0.4 mL/min (Qiagen). Las fracciones se dializaron en una membrana de poro de 3 kDa, con intercambios de buffer PBS en gradiente 1X, 0.1X y 0.01X. Finalmente fueron concentradas hasta 1 mL por evaporación utilizando un rotaevaporador (speedvac).

Análisis por Cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (RP-HPLC)

De 2 a 3 mg del sobrenadante del cultivo dializado y concentrado fueron disueltos en 200 ul de ácido trifluoroacetico (TFA) al 0,1%, centrifugados a 10 000 rpm por 5 min y el sobrenadante fue inyectado en una columna C₁₈ utilizando un cromatografo Shimadzu. La elución se realizó a 1 mL/min por aplicación de un gradiente de

acetonitrilo en 0,1% de TFA, comenzando con 5% Acetonitrilo por 5 min, seguido por 5-70% acetonitrilo por 35 min, finalizado por una saturación de 70% acetonitrilo por 5 min con una lectura de la absorbancia a 215 nm (11).

Espectrometría de masas

La masa de la proteína recombinante fue evaluada por LC/MSD VL y MALDI_TOF_TOF, en un espectrómetro Applied Biosystems 4800-Plus (ABSciex) de acuerdo a lo descrito por (70).

Ensayo de letalidad

Con el objetivo de verificar la actividad biológica de la proteína recombinante, grupos de dos ratones Swiss webster de 16 -18 g, se inyectaron por vía intraperitoneal con 10 y 100ug de la toxina recombinante disuelta en solución salina estéril. Los ratones fueron observados a las 2,4, 24 y 48 horas para registrar la letalidad.

RESULTADOS

Identificación de la secuencia codificante de la Mipartoxin-I

El ADNc obtenido a partir del ARNm extraído de la glándula venenosa de *Micrurus mipartitus* evidenció material genético entre 100 y 500pb (Figura 1.a), con una intensidad mayor cerca a las 200pb, correspondiente a la masa molecular aproximada esperada para la secuencia codificante de las proteínas de tres dedos (71,72). Con los primers AntiTFT-F y AntiTFT-R se amplificó un fragmento de ADN entre 200 a 300pb (Figura 1.b), el cual se purificó, se ligó al pGEM-t-easy y se empleó para transformar en células de *E. coli* DH5α para finalmente enviar a secuenciar 12 clones positivos escogidos al azar.

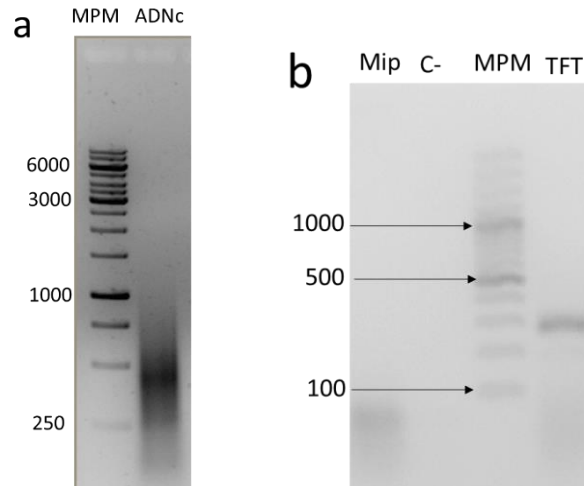


Figura 1. a. Electroforesis en gel de agarosa del ADNc del ARN de la glándula venenosa de *Micrurus mipartitus*. MPM: marcador de peso molecular, ADNc: ADNc obtenido del ARN extraído de la glándula venenosa b. Electroforesis en gel de agarosa de la PCR del ADNc con los oligonucleótidos para 3FTXs, Mip: PCR con oligonucleótidos Miparto-F y Miparto-R, MPM: marcador de peso molecular, TFT: PCR con los oligonucleótidos AntiTFT-F y AntiTFT-R.

A partir de esos clones se obtuvieron cinco secuencias codificantes diferentes para toxinas de tres dedos, incluida la secuencia codificante para la Mipartoxin-I (Figura 2), la cual estuvo constituida por una región 5' no traducida (1 a 21 pb), seguido por la secuencia codificante para el propéptido de la Mipartoxin-I de 81 aa (22 a 264 pb), y que termina en una región 3' no traducida (265 a 290). La Mipartoxin-I madura estuvo constituida por 60 aa y un peso molecular de 7.039 kDa.

```

1 GGC TCC AGA GAA GAT CAC AAG ATG AAA ACT CTG CTG CTG ACC TTG 45
1 Met Lys Thr Leu Leu Leu Thr Leu 8
46 GTG GTG GTG ACA ATC GTG TGC CTG GAC TTA GGG AAC AGC CTA ATA 90
9 Val Val Val Thr Ile Val Cys Leu Asp Leu Gly Asn Ser Leu Lys 23
91 TGT TAC GTT TCA AGG GAG GGG AAG ACG CAG ACT TGT CCA GAA GGA 135
24 Cys Tyr Val Ser Arg Lys Gly Gln Thr Gln Thr Cys Pro Glu Gly 38
136 ATG AAC CTA TGC GAG AAA TAT GCG GTT TCG TAT TTT CAT GAT GGT 180
39 Glu Lys Leu Cys Glu Lys Tyr Ala Val Ser Tyr Phe His Asp Gly 53
181 AGA TAT TTC TTC ACA TAC GAA TGT ACT TCT ACT TGC CAT CGA GGA 225
54 Arg Trp Arg Tyr Arg Tyr Glu Cys Thr Ser Ala Cys His Arg Gly 68
226 GAC CGT AAT GTG TGT TGC TCA ACA GAC CTC TGC AAC AAG TAG CTC 270
69 Pro Tyr Asn Val Cys Cys Ser Thr Asp Leu Cys Asn Lys Fin 81
271 TAC GAG TGG CTA AAT TCC TT 290

```

Figura 2. Secuencia putativa de la Mipartoxin-I: región subrayada cebadores AntiTFT-F y AntiTFT-R; gris: péptido señal; verde: Mipartoxina-I, rojo: codón de parada.

Se encontró una segunda secuencia codificante constituida por una región 5' no traducida (01 a 21 pb), seguido por la secuencia codificante para el propéptido de la Mipartoxin-Ia de 81 aa (22 a 264 pb), finalizando con la región 3' no traducida (265 a 290) (Figura 3). La Mipartoxin-Ia madura tuvo 60 aa y un peso molecular de 7.039 kDa, esta proteína es un homólogo de la Mipartoxin-I (Figura 7).

```

1 GGC TCC AGA GAA GAT CAC AAG ATG AAA ACT CTG CTG CTG ACC TTG 45
1 Met Lys Thr Leu Leu Leu Thr Leu 8
46 GTG GTG GTG ACA ATC GTG TGC CTG GAC TTA GGG AAC AGC CTA ATA 90
9 Val Val Val Thr Ile Val Cys Leu Asp Leu Gly Asn Ser Leu Lys 23
91 TGT TAC GTT TCA AGG GAG GGG GAG ACG CAG ACT TGT CCA GAA GGA 135
24 Cys Tyr Val Ser Arg Lys Gly Lys Thr Gln Thr Cys Pro Glu Gly 38
136 ATG AAC CTA TGC GAG AAA TAT GCG GTT TCG TAT TTT CAT GAT GGT 180
39 Glu Lys Leu Cys Glu Lys Tyr Ala Val Ser Tyr Phe His Asp Gly 53
181 AGA TAT TTC TTC ACA TAC GAA TGT ACT TCT ACT TGC CAT CGA GGA 225
54 Arg Trp Arg Tyr Arg Tyr Glu Cys Thr Ser Ala Cys His Arg Gly 68
226 GAC CGT AAT GTG TGT TGC TCA ACA GAC CTC TGC AAC AAG TAG CTC 270
69 Pro Tyr Asn Val Cys Cys Ser Thr Asp Leu Cys Asn Lys Fin 81
271 TAC GAG TGG CTA AAT TCC TT 290

```

Figura 3. Secuencia putativa de la Mipartoxin-Ia: región subrayada cebadores AntiTFT-F y AntiTFT-R; gris: péptido señal; verde: Mipartoxina-Ia, rojo: codón de parada.

La tercera secuencia codificó para una toxina de tres dedos que se le asignó el nombre de Mipartoxin-II (Figura 4), con 60 aa y un peso molecular de 6.949 kDa. La cual estuvo constituida por una región 5' no traducida (01 a 21 pb), seguida por la secuencia codificante para un propéptido de la Mipartoxin-II de 81 aa (22 a 264 pb) y una región 3' no traducida (265 a 290 pb).

```

1 GGC TCC AGA GAA GAT CAC AAG ATG AAA ACT CTG CTG CTG ACC TTG 45
  1 Met Lys Thr Leu Leu Leu Thr Leu 8
46 GTG GTG GTG ACA ATC GTG TGC CTG GAC TTA GGG AAC AGC CTA ATA 90
  9 Val Val Val Thr Ile Val Cys Leu Asp Leu Gly Asn Ser Leu Ile 23
91 TGT TAC GTT TCA AGG GAG GGG CAG ACG CAG ACT TGT CCA GAA GGA 135
  24 Cys Tyr Val Ser Arg Glu Gly Gln Thr Gln Thr Cys Pro Glu Gly 38
136 ATG AAC CTA TGC GAG AAA TAT GCG GTT TCG TAT TTT CAT GAT GGT 180
  39 Met Asn Leu Cys Glu Lys Tyr Ala Val Ser Tyr Phe His Asp Gly 53
181 AGA TAT TTC TTC ACA TAC GAA TGT ACT TCT ACT TGC CAT CGA GGA 225
  54 Arg Tyr Phe Phe Thr Tyr Glu Cys Thr Ser Thr Cys His Arg Gly 68
226 GAC CGT AAT GTG TGT TGC TCA ACA GAC CTC TGC AAC AAG TAG CTC 270
  69 Asp Arg Asn Val Cys Cys Ser Thr Asp Leu Cys Asn Lys Fin 81
271 TAC GAG TGG CTA AAT TCC TT 290

```

Figura 4. Secuencia de la Mipartoxin-II: región subrayada cebadores AntiTFT-F y AntiTFT-R; gris: péptido señal; verde: Mipartoxina-II; rojo: codón de parada.

La secuencia de los clones R53 y R74, la cual codificó para una proteína de tres dedos a la que se le asignó el nombre de Mipartoxin-III (Figura 5) con 58 aa y un peso molecular de 6.373 kDa. Esta secuencia está constituida por una región 5' no traducida (01 a 21 pb), seguido por la secuencia codificante para el propéptido de la Mipartoxin-III de 79 aa (22 a 257 pb) y una región 3' no traducida (258 a 284 pb).

```

1 GGC TCC AGA GAA GAT CAC AAG ATG AAA ACT CTG CTG CTG ACC TTG 45
1 Met Lys Thr Leu Leu Leu Thr Leu 8

46 GTG GTG GTG ACA ATC GTG TGC CTG GAC TTA GGG AAC AGC CTA AAA 90
9 Val Val Val Thr Ile Val Cys Leu Asp Leu Gly Asn Ser Leu Lys 23

91 TGT TAC GAT AAA CTG AAG AAG GAG GTT ACT TGT CCA GAA GGA ATG 135
24 Cys Tyr Asp Lys Leu Lys Lys Glu Val Thr Cys Pro Glu Gly Met 38

136 AAG TTT TGC CAT AAA GAT GTG CTT CCG GCT ACG CAT GGT AAT TCG 180
39 Lys Phe Cys His Lys Asp Val Leu Pro Ala Thr His Gly Asn Ser 53

181 GTA CTC GTA ATG GGA TGT ACT TAT AGT TGC GGT TTA GGA CCA CGT 225
54 Val Leu Val Met Gly Cys Thr Tyr Ser Cys Gly Leu Gly Pro Arg 68

226 AAT ATG TGT TGC TCA ACA GAC CTC TGC AAC AAG TAG CTC TAC GAG 270
69 Asn Met Cys Cys Ser Thr Asp Leu Cys Asn Lys Fin 79

271 TGG CTA AAT TCC TT 284

```

Figura 5. Secuencia de la Mipartoxin-III: región subrayada cebadores AntiTFT-F y AntiTFT-R; gris: péptido señal; verde: Mipartoxina-III; rojo: codón de parada.

Finalmente la secuencia del clon R73, codificó para una proteína de tres dedos que se le asignó el nombre de Mipartoxin-IV (Figura 6) con 62 aa y un peso molecular de 6.875 kDa. La cual estuvo constituida por una región 5' no traducida (01 a 21 pb), seguido por la secuencia codificante para el propéptido de la Mipartoxin-IV de 82 aa (22 a 267 pb) que finalmente madura en la Mipartoxin-IV de, seguido por una región 3' no traducida (268 a 293 pb).

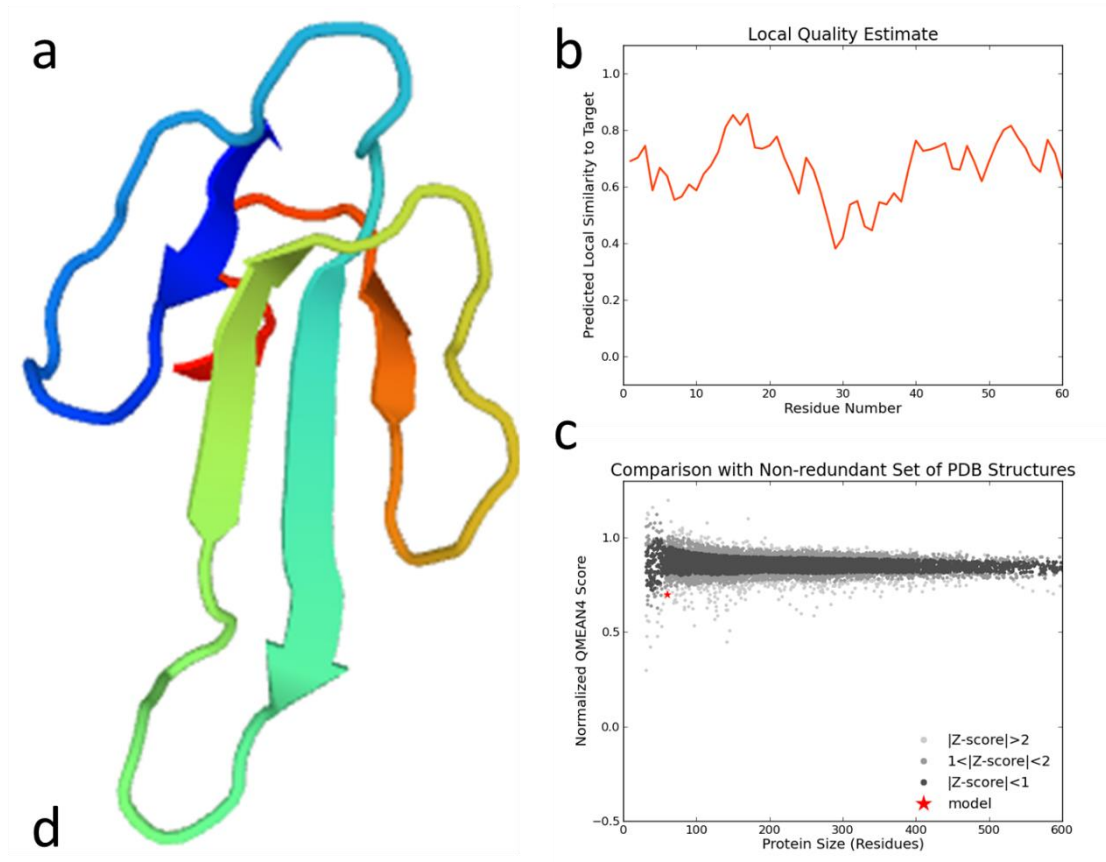

```

1 GGC TCC AGA GAA GAT CAC AAG ATG AAA ACT CTG CTG CTG ACC TTG 45
1 Met Lys Thr Leu Leu Leu Thr Leu 8
46 GTG GTG GTG ACA ATC GTG TGC CTG GAC TTA GGA TAC ACC AGG AAA 90
9 Val Val Val Thr Ile Val Cys Leu Asp Leu Gly Tyr Thr Arg Lys 23
91 TGT CAC ACA AAG AAC TCC CCG GGT CGT GAA ACC TCT CAG GCT TGT 135
24 Cys His Thr Lys Asn Ser Pro Gly Arg Glu Thr Ser Gln Ala Cys 38
136 CCA ACT GGG CAG AAC ATA TGC TTT AAA AAG TGG AAG AAG GGA GAG 180
39 Pro Thr Gly Gln Asn Ile Cys Phe Lys Lys Trp Lys Lys Gly Glu 53
181 ATA ATC TCC AAG GGA TGT GCT GTT ACT TGC CCT AAA CCG AAA AAG 225
54 Ile Ile Ser Lys Gly Cys Ala Val Thr Cys Pro Lys Pro Lys Lys 68
226 GAT GAG ACC TTT CAA TGT TGC CTA AAA AAC AAT TGC AAT CGT TAG 270
69 Asp Glu Thr Phe Gln Cys Cys Leu Lys Asn Asn Cys Asn Arg Fin 82
271 CTC TAC GAG TGG CTA AAT TCC TT 293

```

Figura 6. Secuencia de la Mipartoxin-IV: región subrayada cebadores AntiTFT-F y AntiTFT-R; gris: péptido señal; verde: Mipartoxina-III; rojo: codón de parada.

Las secuencias de la Mipartoxin-Ia, Mipartoxin-II, Mipartoxin-III y Mipartoxin-IV no tuvieron 100% de identidad con ninguna de las proteínas de tres dedos publicadas hasta el momento, pero mostraron identidad con el dominio conservado Snake Toxin (cd00206), presente en las alfa neurotoxinas de cadena corta y de cadena larga. La Mipartoxin-Ia en comparación con la Mipartoxin-I evidenció una identidad de 98% y la Mipartoxin-II una identidad de 82% (Figura 7). Por otro lado, la Mipartoxin-III mostró una mayor identidad con el precursor de la Short neurotoxin 6 de *Pseudonaja textilis* con un 48%(Q9W7J7.1), y la Mipartoxin-IV una identidad de 83% con el precursor de la secuencia putativa de la proteína de tres dedos de *Micrurus altirostris* (AED89558.1). Adicionalmente, al realizar la predicción de la función de las secuencias por el software NTXpred con la predicción por PSI-Blast, las 5 proteínas tendrían una interacción con el receptor nicotínico de la acetilcolina.



Model-Template Alignment

```

Model_05 LKCYVSR--EGKTQTCPPEGEKLC EKYAVSYF--HDGRWRYRYECTSACHRGP---YNVCCSTDLCKNK 60
2qc1.1.A FVCEHATSPISAVTCCPPGENLCYRKMDVDFSSR-GKVVVELGCDATCPSKKPYE EVTCCSTDKCNP 67
  
```

Figura 8: Modelamiento de la Mipartoxin-I. a: modelo tridimensional de la Mipartoxin-I a partir de la alfa-bungarotoxina (2qc1.1.A) en el SWISS MODEL; b: estimado de calidad local del modelo; c: comparación con las estructuras no redundantes del PDB (protein data bank) por medio del QMEAN4 normalizado; d: alineamiento de la Mipartoxin-I con la alfa-bungarotoxina, Model_05: Mipartoxin-I, 2qc1.1.A: alfa-bungarotoxina.

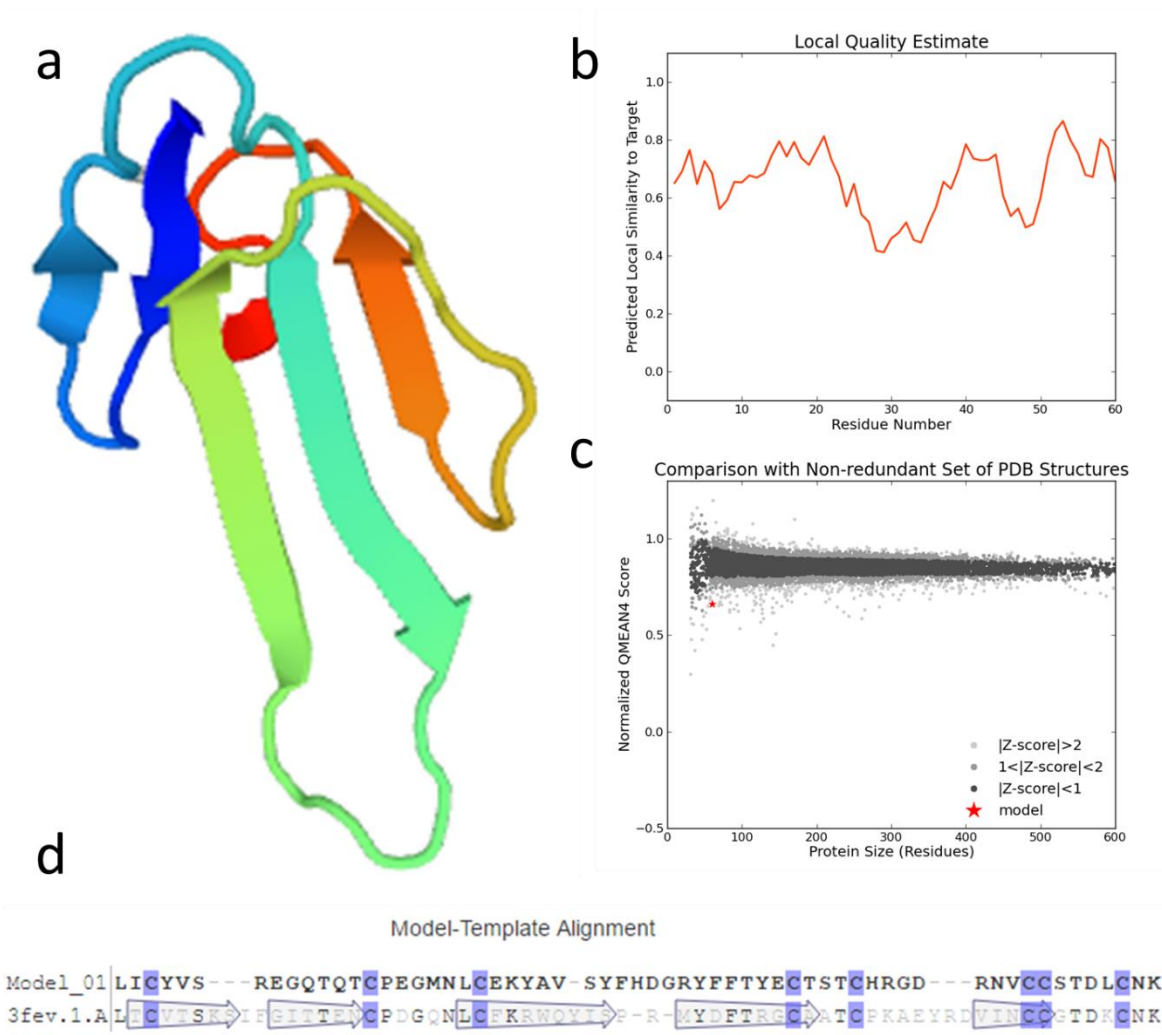


Figura 9: Modelamiento de la Mipartoxin-II. a: modelo tridimensional de la Mipartoxin-II a partir de la toxina Muscarinica-1 m1 (3fev.1.A) en el SWISS MODEL; b: estimado de calidad local del modelo; c: comparación con las estructuras no redundantes del PDB (protein data bank) por medio del QMEAN4 normalizado; d: alineamiento de la Mipartoxin-II con la toxina Muscarinica-1 m1, Model_01: Mipartoxin-II, 3fev.1.A: toxina Muscarinica-1 m1.

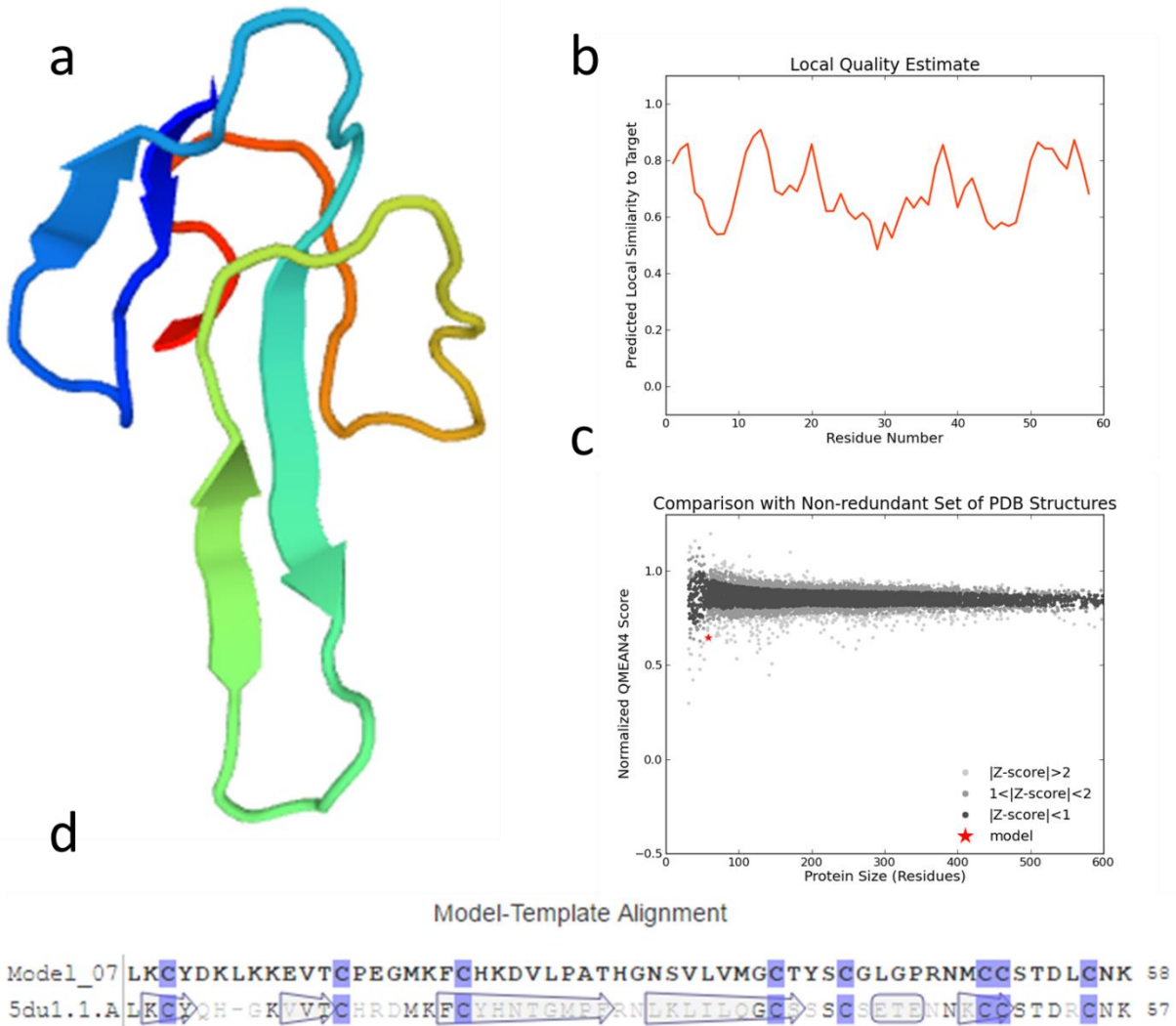


Figura 10: Modelamiento de la Mipartoxin-III. a: modelo tridimensional de la Mipartoxin-III a partir de la Manbaglabina-I (5du1.1.A) en el SWISS MODEL; b: estimado de calidad local del modelo; c: comparación con las estructuras no redundantes del PDB (protein data bank) por medio del QMEAN4 normalizado; d: alineamiento de la Mipartoxin-III con la Manbaglabina-III, Model_07: Mipartoxin-I, 5du1.1.A: Manbaglabina-I.

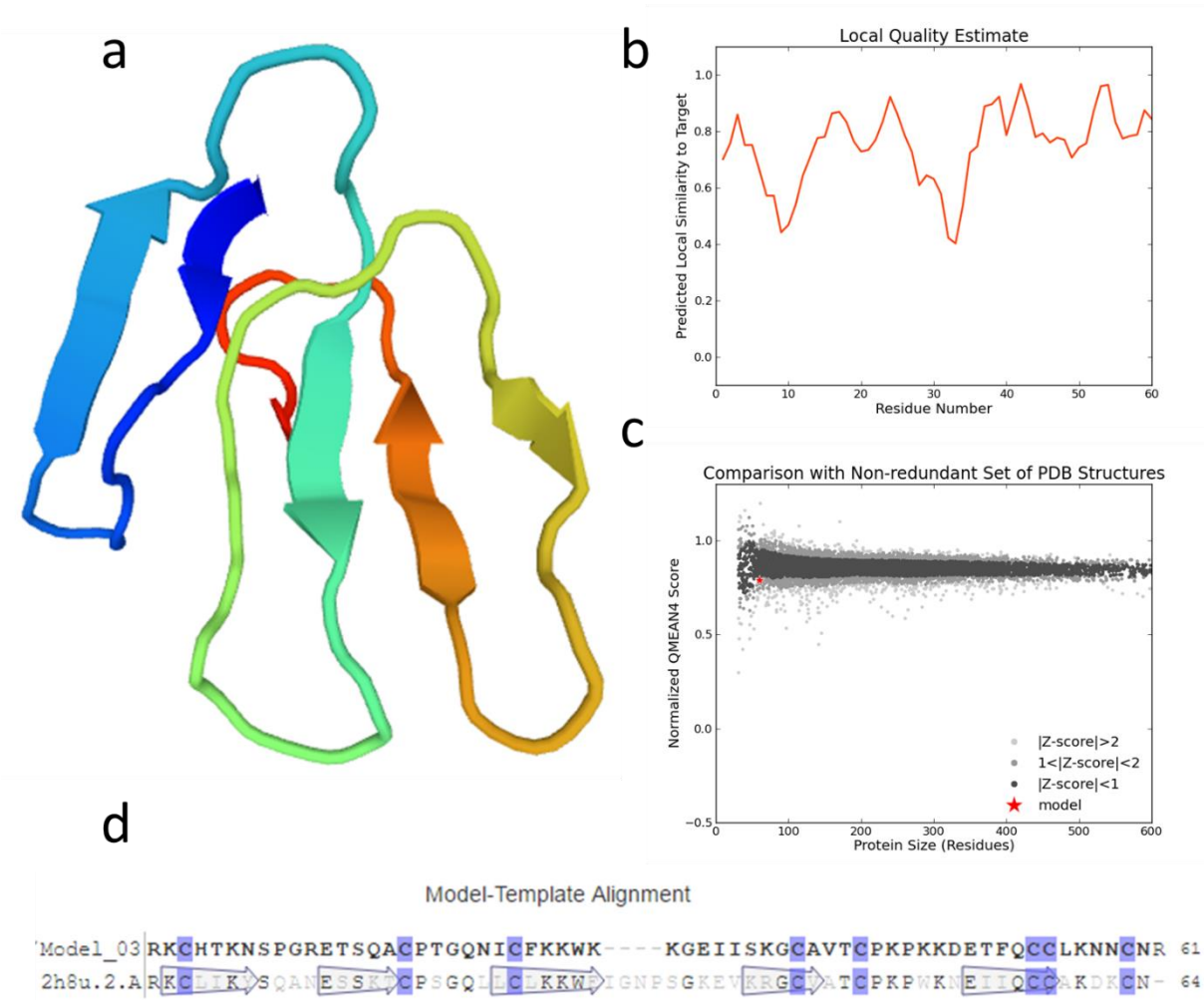


Figura 11: Modelamiento de la Mipartoxin-IV. a: modelo tridimensional de la Mipartoxin-IV a partir de la Bucaina (2h8u.2.A) en el SWISS MODEL; b: estimado de calidad local del modelo; c: comparación con las estructuras no redundantes del PDB (protein data bank) por medio del QMEAN4 normalizado; d: alineamiento de la Mipartoxin-IV con la Bucaina, Model_03: Mipartoxin-IV, 2h8u.2.A: Bucaina.

Constructos para la expresión PICA, PICB, PICC

El DNA codificante para la mipartoxin I fue ligado al plásmido pPICzαC de tres formas y obteniéndose tres constructos (Figura 12), el primero correspondió a la Mipartoxin-I con el péptido señal que codifica para una proteína de 84aa y 9,554 kDa aproximadamente, el segundo a la mipartoxin I sin el péptido señal que codifica para una proteína de 64aa y 7,457 kDa aproximadamente y el tercero a la mipartoxin I acoplada al epitope c-myc y a un marcador de 6 histidinas que codifica para una proteína de 87aa y 10,212 kDa aproximadamente, designándose con los nombres PIC-A, PIC-B y PIC-C respectivamente. A los clones transformados con el PIC-A, PIC-B y PIC-C en *Pichia pastoris* cepa X33 se les designo con el nombre de XP-A (del 1 al 10), XP-B (del 1 al 10) y XP-C (del 1 al 16) respectivamente.

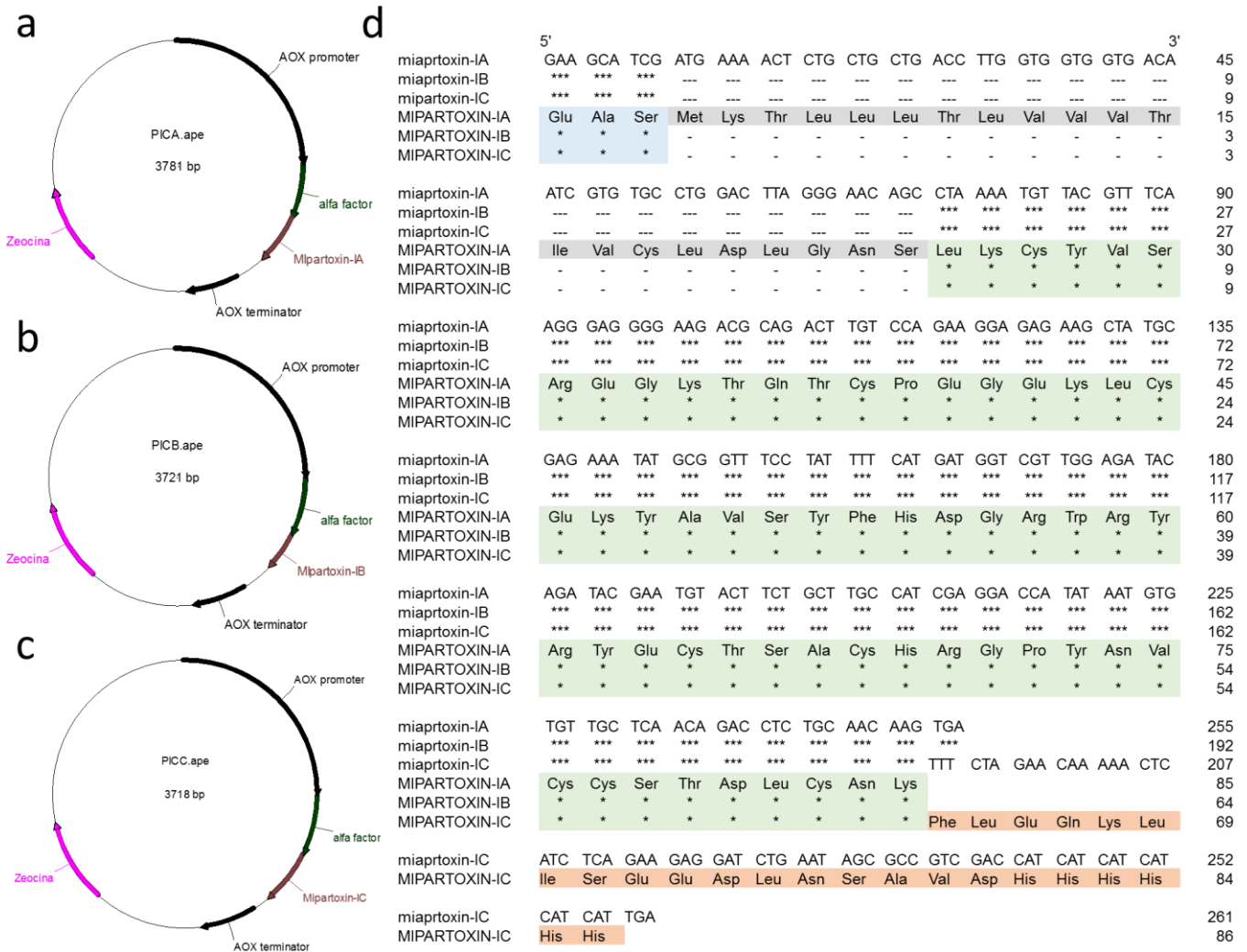


Figura 12. Mipartoxin-IA, -IB y -IC. a, b y c: modelo del plásmido PIC-A, PIC-B, y PIC-C respectivamente; negro: promotor y terminador AOX; Verde: alfa factor; Violeta: región codificante para la zeocina; Café: Mipartoxin-IA, B y C respectivamente. d: Secuencias de nucleótidos codificantes de los constructos clonados en *P. pastoris* X33, la mipartoxin-IA, mipartoxin-IB, mipartoxin-IB y sus secuencias deducidas MIPARTOXIN-IA, MIPARTOXIN-IB, MIPARTOXIN-IC; Posiciones idénticas tanto de nucleótidos como aminoácidos indicadas con (*); Gaps indicados con (-); Azul, corresponde a los aminoácidos del péptido señal alfa factor producto de la maduración de la proteína; Gris, péptido señal de la Mipartoxin-I; Verde, Mipartoxin-I; Naranja, epítopo c-myc y marcador de 6 histidinas.

Producción de la proteína recombinante

La selección de los clones que expresaban la proteína se realizó por PCR y por el ensayo de dot blot en caja. Los clones de XPC del 1 al 10, 14 y 16 (Figura 13) expresaron la mipartoxin IC. Sin embargo, los de mayor expresión fueron el 2, 4, 8 y 10 (Figura 14). A pequeña escala el clon XPA8 no presentó expresión detectable de la Mipartoxin-IA (resultados no mostrados), En el caso de XPB4 y XPC4 se evidenció expresión de la Mipartoxin-IB (Figura 14b). El cultivo a pequeña escala de los clones en medio BMMH evidenció la presencia de la proteína en el sobrenadante a los dos días del cultivo, pero a partir del tercer día no fue evidenciada, por lo tanto se cambió al medio de cultivo BMMY, en el cual se observó incremento en la producción de la proteína con los días, lo cual fue evidenciado por electroforesis y western blot con anti His (Figura 14a y 15).

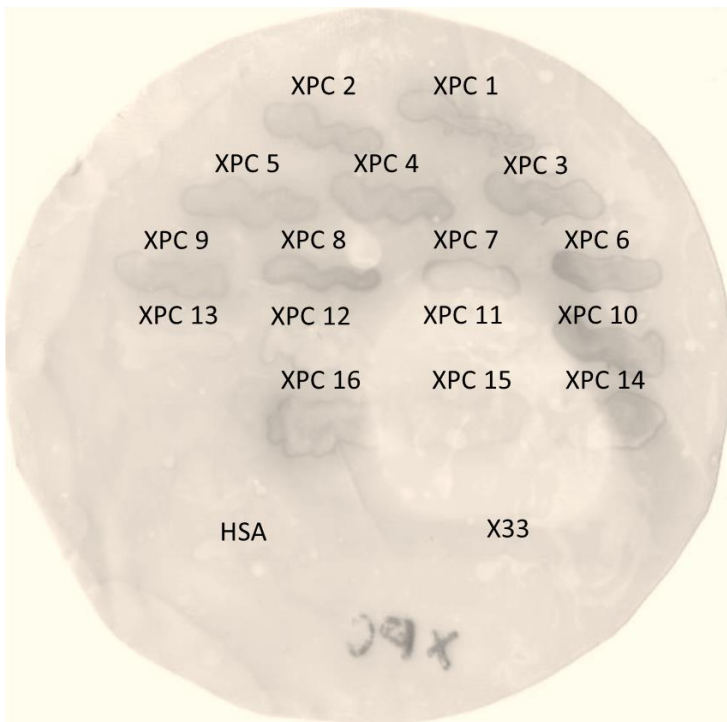


Figura 13. Ensayo de dot-blot en caja para los clones XPC con Anti-His. XPC1-XPC16, clones de *Pichia pastoris* X33 transformadas con el constructo PICC. X33, cepa de *Pichia pastoris* X33 sin transformar (control negativo de expresión). HSA, cepa de *Pichia pastoris* GS115/Albumin (control positivo de expresión, y control negativo de anti-His).

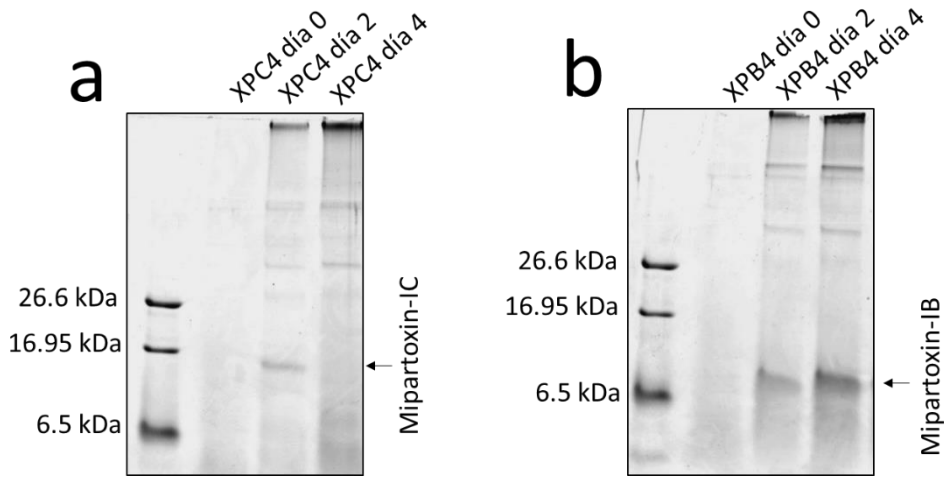


Figura 14: Expresión de la Mipartoxin-IB y-IC. a: SDS-PAGE de péptidos del clon XPC4 al día 0, 2 y 4 de expresión. b: SDS-PAGE de péptidos del clon XPB4 al día 0, 2 y 4 de expresión.

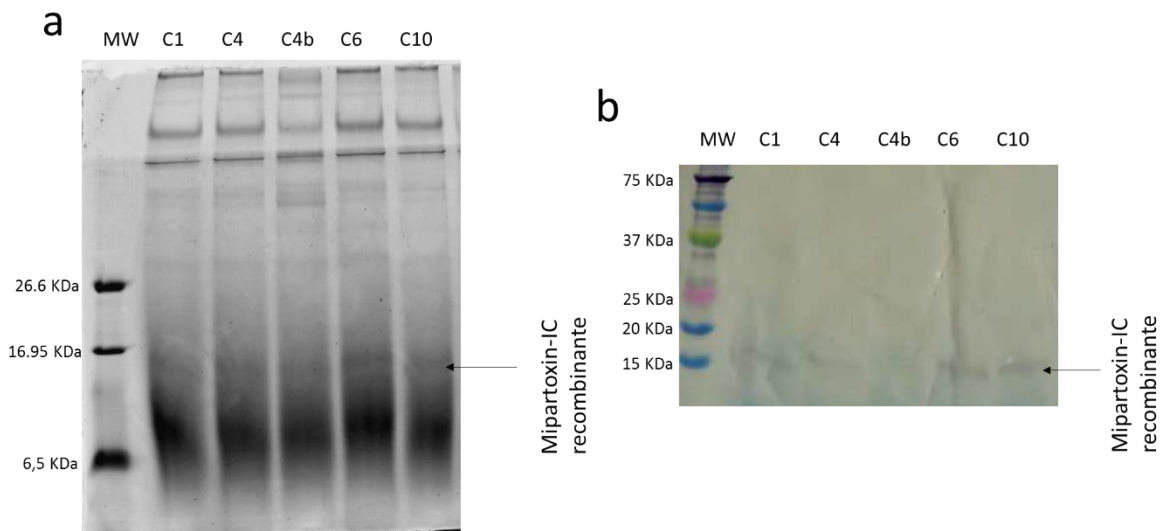


Figura 15. Expresión de la Mipartoxin-IC en BMMY. a: SDS-PAGE de péptidos con tinción de coomassie G-250, MW: marcador de peso molecular; C1: clon XPC1 al día 6; C4 y C4b: clon XPC4 al día 6; C6: clon XPC6 al día 6; C10: clon XPC10 al día 6. b: Western blot con anticuerpos anti-His del ensayo de expresión en BMMY.

Purificación de la Mipartoxin-I recombinante

Cromatografía líquida de alta definición (HPLC)

El sobrenadante del cultivo de expresión de XPC también fue evaluado por HPLC (Figura 16) y se evidenció una alta absorbancia a 215 nm que no correspondió a la proteína de interés. Sin embargo la fracción 28 con un tiempo de retención de 25 fue identificada en electroforesis y western blot como correspondiente a la Mipartoxin-IC (datos no mostrados).

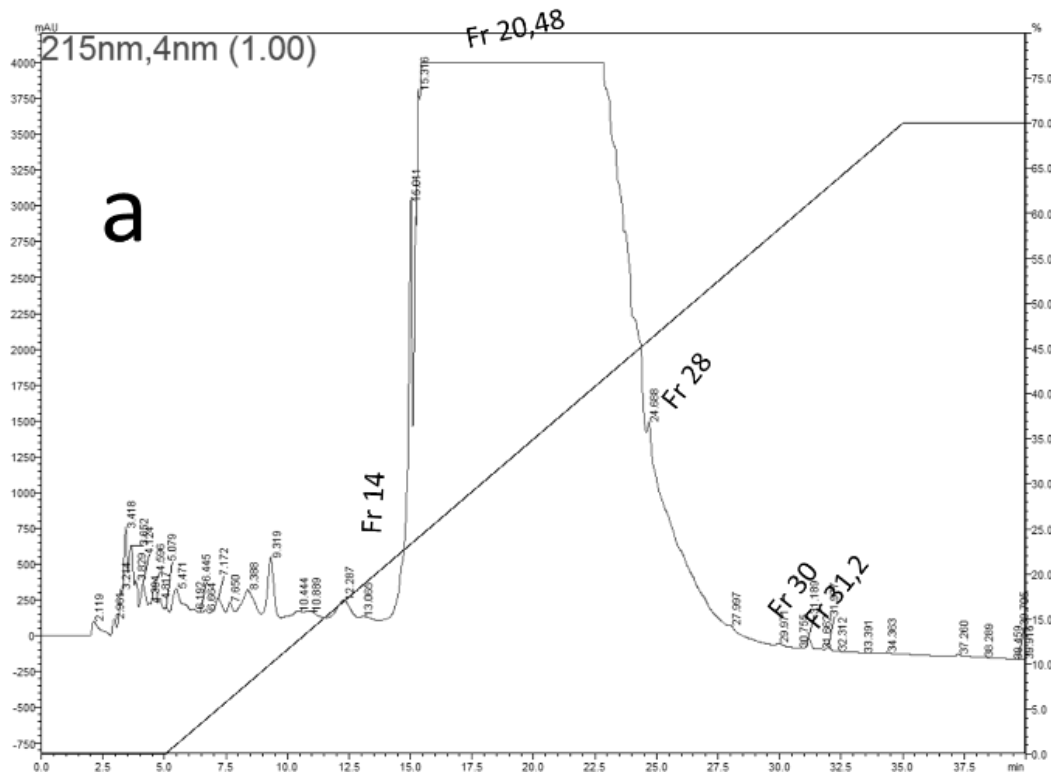


Figura 16: Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del sobrenadante de expresión clon XPC4 en medio complejo (BMMY); eje Y izquierda: absorbancia a 215 nm; eje Y derecho: porcentaje de acetonitrilo; eje X: tiempo; Fr #: fracción recolectada para análisis de la cromatografía.

Cromatografía de afinidad

Con el propósito de obtener mayores cantidades adecuadas de la proteína recombinante de interés se realizó una cromatografía de afinidad Ni-NTA purificándose exitosamente la Mipartoxin-IC empleando en el buffer de elución gradiente de imidazol (Figura 17a) o gradiente de pH (Figura 17b). Para el primer caso en la fracción de 200mM (Fr 2) eluyó la mayor cantidad de la proteína recombinante. En el segundo caso la proteína eluyo a un pH de 4.5 (E3). La pureza fue evaluada en HPLC evidenciándose una fracción en el minuto 34,6 (Figura 18).

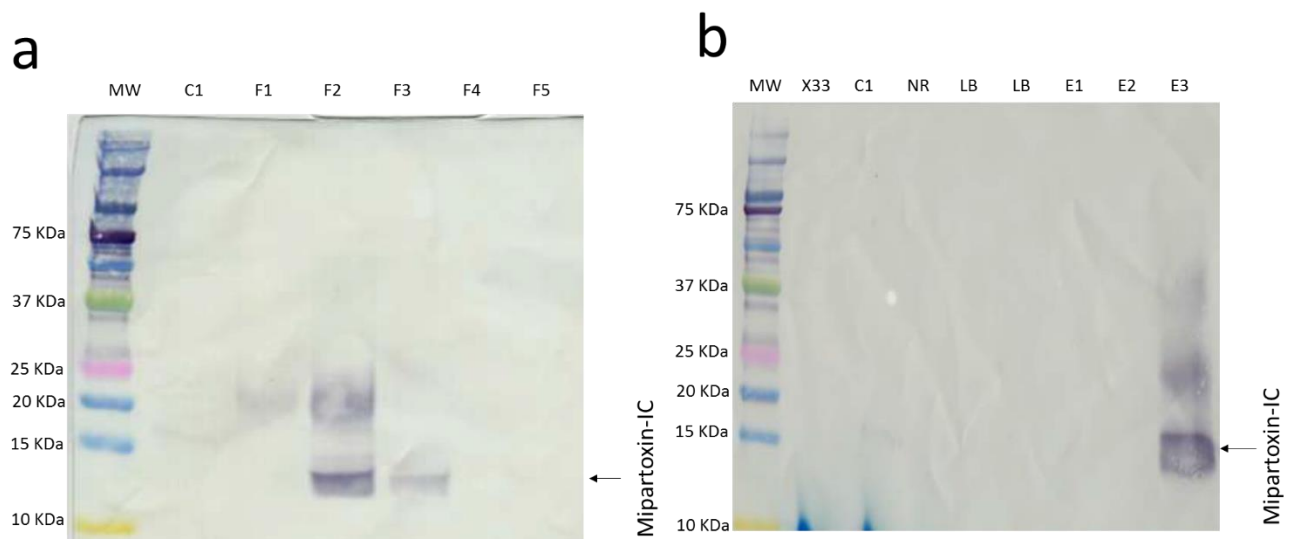


Figura 17: western blot de las cromatografías de afinidad. a: western blot de la purificación con imidazol; MW: marcador de peso molecular; C1: XPC1 antes de purificar; F1: fracción 1 (100mM de imidazol); F2: fracción 2 (200mM de imidazol); F3: fracción 3 (300mM de imidazol); y F5: fracción 5 (500mM de imidazol). b: western blot de la purificación en gradiente de pH; MW: marcador de peso molecular; X33: control negativo cultivo de *Pichia pastoris* X33; C1: cultivo de XPC1 en el día 6; NR: recuperado de lo no retenido por la columna; LB: fracción de pH 8.0 o línea base; E1: elución 1 o fracción de pH 6.3; E2: elución 2 o fracción de pH 5.9; E3: elución 3 o fracción de pH 4.5.

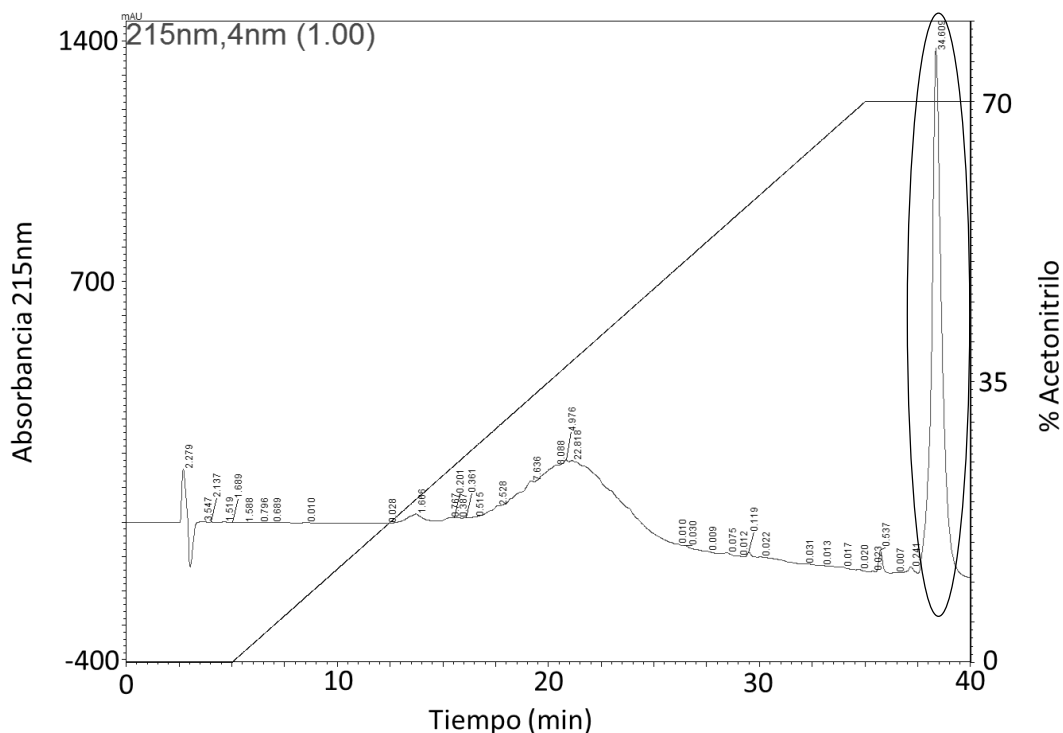


Figura 18: Prueba de pureza en HPLC de la Fracción obtenida en cromatografía de afinidad; eje Y izquierda: absorbancia a 215 nm; eje Y derecho: porcentaje de acetonitrilo; eje X: tiempo; región con círculo negro: fracción de tiempo de retención 34,6 tomada para análisis.

Caracterización de la Mipartoxin-I recombinante

Espectrometría de masas de la Mipartoxin-IC recombinante

Con la proteína obtenida en cromatografía de afinidad se realizó una electroforesis en SDS-PAGE y la banda correspondiente a la masa molecular de la mipartoxinC, esta fue recortada y enviada a análisis por MALDI-TOF-TOF en el Instituto Clodomiro Picado, donde se identificaron dos péptidos (Tabla 1), de 14 y 11 aminoácidos respectivamente, los cuales hacen parte de la secuencia de la Mipartoxin-IC. (Figura 19). Adicionalmente en el análisis por LS/MSD de la proteína purificada por HPLC se identificó que la Mipartoxin-IC recombinante tenía una masa de 11.715 Da (Figura 23). Datos que concuerdan con la masa teórica de la secuencia de la mipartoxin C.

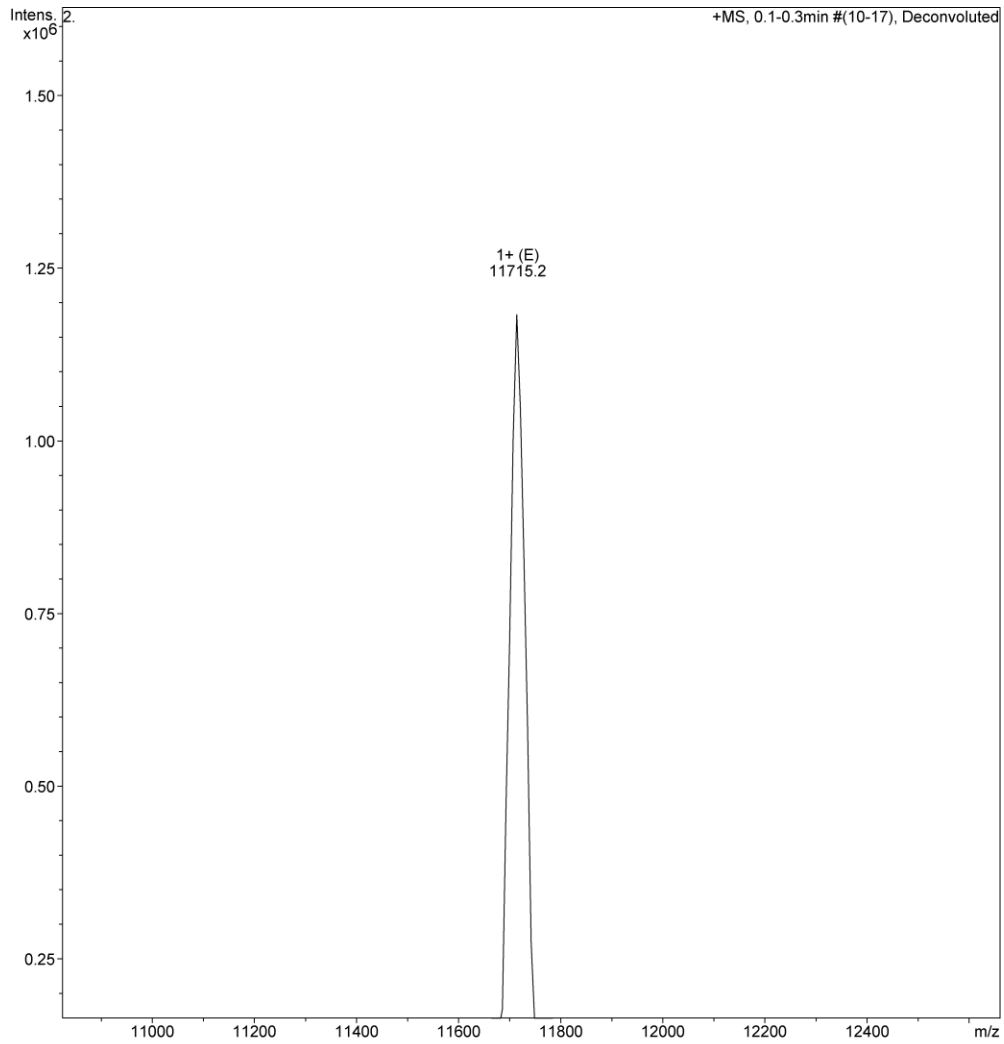


Figura 20: LS-MSD de la Mipartoxin-I purificada por HPLC.

Ensayo de letalidad

La Mipartoxin-IC fue evaluada en su capacidad de inducir toxicidad, sin embargo solamente se observaron leves cambios en el ratón que no condujeron a toxicidad o muerte de los animales aun en dosis de 100 µg/ratón. Indicando diferencias con la toxina nativa (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

Proteínas de tres dedos identificadas en el ARNm de la glándula venenosa de *M. mipartitus*

En trabajos previos Rey Suárez (19), por análisis proteómico del veneno de la serpiente *M. mipartitus* identificó y secuenció la Mipartoxin-I como el mayor componente tóxico del veneno de la serpiente, sin embargo también evidenció la presencia de otras toxinas de tres dedos, pero no se describió su secuencia. Por ello en este trabajo a partir del ARNm de la glándula venenosa de un espécimen de *M. mipartitus* y por medio de PCR se amplificaron secuencias codificantes para proteínas de tres dedos, las cuales posteriormente fueron secuenciadas. Como resultado se obtuvo la secuencia codificante para cinco proteínas precursoras de alfa-neurotoxinas de cadena corta, con 8 cisteínas conservadas, entre ellas la de la Mipartoxin-I, una isoforma de la Mipartoxin-I, la cual fue llamada Mipartoxin-Ia y tres más las cuales se les asignó el nombre de Mipartoxin-II, Mipartoxin-III y Mipartoxin-IV. Siendo las últimas secuencias nuevas para toxinas de tres dedos, (no publicadas previamente).

El péptido señal (MKTLLLTIVVVTIVCLDLGNS) para cuatro de las proteínas aisladas correspondió a la misma secuencia (Figura 5). De acuerdo con la literatura esta secuencia es muy conservada en las toxinas de tres dedos de Elápidos (48,73). En este sentido, al realizar el blast de esta secuencia, se encontró que tuvo un 100% de identidad y un 100% de cobertura con el péptido señal de algunas toxinas de tres dedos de otros Elápidos como son: *Austrelaps labilis* (ABX58166.1), *Micrurus laticollaris* (AKN63193.1), *Micrurus corallinus* (C6JUP1.1), y *Drysdalia coronoides* (ACR78491.1). Por el contrario, el péptido señal de la Mipartoxin-IV (MKTLLLTIVVVTIVCLDLGYT) (Figura 5), difiere de los anteriores en el extremo C-terminal sustituyendo la Asp20 y la Ser21 por una tirosina y una treonina, respectivamente. Sin embargo este péptido señal es más frecuente que el péptido señal de la Mipartoxin-I, Ia, II y III, debido a que al realizar el blast del mismo, este tuvo un 100% de identidad y un 100% de cobertura con los péptido señal de la

Cardiotoxina 3 de *Naja naja* (CAA90963.1), el precursor de la toxina de tres dedos B.F de *Micrurus browni* (AKO63244.1), la neurotoxina 3FTx-LK de *Bungarus fasciatus* (P0C552.1), la neurotoxina corta truncada de *Aipysurus eydouxii* (AAT11123.1), la Citotoxina 1c de *Naja atra* (P79810.1), y la Citotoxina 1 de *Naja sputatrix* (O93471.1).

Al comparar la Mipartoxin-I (Figura 2) y la Mipartoxin-Ia (Figura 3), se encontró que las dos comparten el mismo número de aminoácidos, con la diferencia que la isoforma presenta una sustitución de la Glu31 por Lys31, en termino de codones la mutación fue dada por la sustitución de la guanina de la posición 91 (G91) por adenina (A91), cambiando la tripleta GAG por AAG. Sustitución que cambió propiedades como la masa molecular y el punto isoeléctrico que fue para la Mipartoxin-I de 7.037,96 Da y 8.46 respectivamente; mientras para la Mipartoxin-Ia fue de 7.038,9 Da y 7.70 respectivamente. Homologías similares entre las isoformas se han descrito en otras toxinas de tres dedos (42,74–76).

La masa molecular teórica de la Mipartoxin-II fue de 6.948,79 Da, con un punto isoeléctrico de 6.05, igualmente al restar los hidrógenos perdidos por la formación de los cuatro puentes disulfuro en el plegamiento de la proteína y un hidrógeno que pierde al ionizarse la molécula en masas, tendría un m/z de 6.939,79. Al respecto, la 3FTXs Mm-14 del trabajo de Rey Suárez (11), tuvo la misma masa molecular de la Mipartoxin-II, y el péptido descrito para esta toxina (XXCYVSR) alinea en un 100% con la secuencia de la Mipartoxin-II (Figura 21). Lo cual sugiere que la Mm-14 sería la misma Mipartoxin-II.

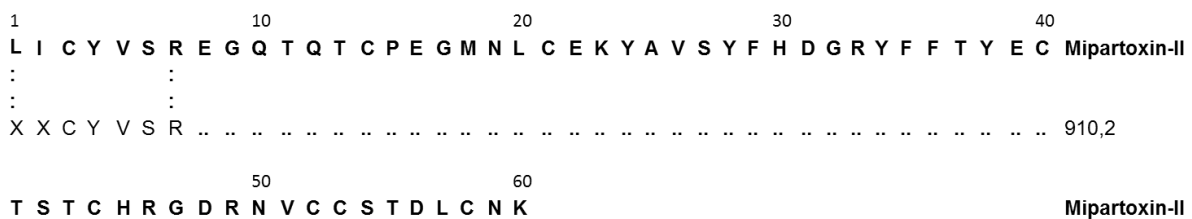


Figura 21: Alineamiento del péptido identificado para la Mm-14 por Rey-Suárez 2011 con la secuencia de la Mipartoxin-II. X puede ser Leu (L) o Ile (I).

Por otro lado, la Mipartoxin-III; cuya secuencia correspondió a 58 aminoácidos y una masa molecular teórica de 6.372,56 Da, con un punto isoeléctrico de 8.48, y una m/z de 6367.56, no coincidió con ninguno de los péptidos descritos por Rey-Suárez et al., 2011. Sin embargo, al compararla con los péptidos para la *Micrurus mipartitus* de costa rica, se encontró que la Mipartoxin-III alinea con uno de los dos péptidos de la fracción 11 del veneno de esta serpiente (Figura 22). La Mipartoxin-II también tuvo identidad (48%) con el precursor de la neurotoxina 6 de *Pseudonaja textilis* (Q9W7J7.1). Este resultado es acorde con los descrito para otras secuencias de las 3FTxs, las cuales se caracterizan por una secuencia muy poco conservada en la región de la proteína madura, pero se conservan los codones de las ocho cisteínas y otros pocos aminoácidos (73).

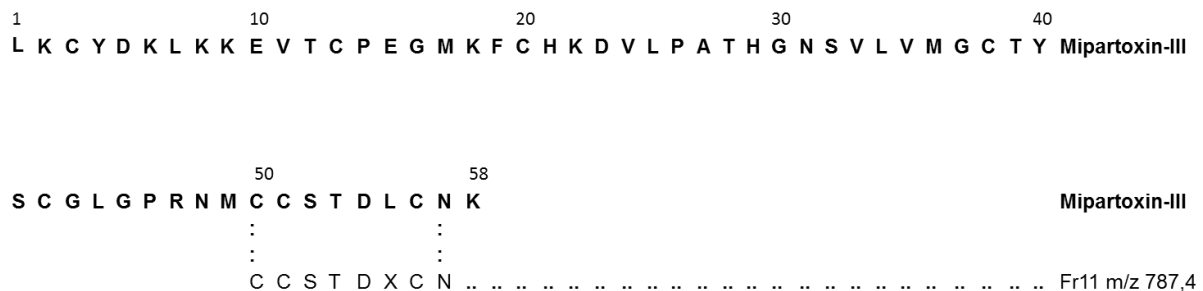


Figura 22: Alineamiento del péptido identificado para la fracción 11 de la *Micrurus mipartitus* de costa rica por Rey-Suárez 2011 con la secuencia de la Mipartoxin-III. X puede ser Leu (L) o Ile

Finalmente la Mipartoxin-IV; con 61 aminoácidos, una masa molecular teórica de 6.372,56 Da y un punto isoeléctrico de 8.48, alinea 100% con los péptidos de la fracción 10: Fr10 757.3 (GBNXCFK) y Fr10 664.7 (BDETFBCCXK) (Figura 23) del veneno de la *Micrurus mipartitus* publicados por Rey Suárez (11). Lo cual sugiere que esta secuencia correspondería a esta proteína.

```

1           10           20           30           40
R K C H T K N S P G R E T S Q A C P T G Q N I C F K K W K K G E I I S K G C A V Mipartoxin-IV
          :           :           :           :
          :           :           :           :
          :           G B N X C F K .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. Fr10 757,3

          50           60
T C P K P K K D E T F Q C C L K N N C N R Mipartoxin-IV
          :           :
          :           :
          B D E T F B C C X K .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. Fr10 664,7

```

Figura 23: Alineamiento de los péptidos identificados de la fracción 10 de la *Micrurus mipartitus* colombiana por Rey-Suárez 2011 con la secuencia de la Mipartoxin-IV. X: puede ser Leu (L) o Ile (I), B: puede ser glutamina (Q) o lisina (K).

Los modelos de la estructura terciaria de la Mipartoxin-I, II, III y IV fueron obtenidos a partir del QMEAN4, herramienta que describe la calidad local y global del modelo, a partir de cuatro descriptores: la geometría local por ángulo de torsión, dos potenciales de interacción distancia dependiente (Allatom y Cbeta) y un potencial de solvatación. El QMEAN4 genera un valor Z, el cual si es superior a -1 indica que es el mejor modelo para la estructura primaria de la proteína (77).

Los modelos de referencia escogidos, fueron proteínas de tres dedos. Sin embargo, debido a la falta de identidad y a los bajos QMEAN4, fue imposible definir una sola proteína molde como referencia para la producción de los modelos 3D de las 3FTxs identificadas en este trabajo en la glándula de *M. mipartitus*. El plegamiento de las proteínas de tres dedos se caracteriza por tres bucles adyacentes provenientes de un núcleo central estabilizados por 4 puentes disulfuro (31). Sin embargo, el plegamiento se ve influenciado por una variedad de desviaciones significativas y sutiles como son el número de láminas- β , el tamaño de los bucles y el extremo C-terminal, al igual que los giros y torceduras de los bucles (78). Este comportamiento en el plegamiento es acorde con la alta variabilidad en la secuencia de las proteínas de tres dedos, donde solo se conserva las 8 cisteínas y unos pocos aminoácidos (73). Por ello, se debe destacar que es importante realizar un sondeo de los modelos conocidos de proteínas de tres dedos, a partir de estimados de calidad como son el

QMEAN4 y GMQE, y de esta forma escoger el modelo de referencia más adecuado para la predicción de la estructura 3D de este tipo de proteínas.

Según el valor QMEAN4 obtenido de los modelos realizados para la Mipartoxin-I, el mejor candidato para la construcción de su modelo fue la Alfa bungarotoxina (2qc1.1.A) con -2.39, resultado que difiere con lo reportado para la misma toxina, que fue realizado a partir de la estructura de la Cardiotoxina V. Para este caso, a partir del criterio utilizado QMEAN4, la Cardiotoxina V (1cvo.1.A) tiene un QMEAN de -8.32. Sin embargo, un QMEAN de -2.39 se encuentra entre -3.85 y -2, lo que indica que el modelo es de calidad baja (Figura 8.c), además el GMQE del modelo 0.70 (Figura 8.b), indica que el modelo aun difiere de lo esperado para la estructura cristalizada de la Mipartoxin-I.

Producción y Caracterización de la Mipartoxin-I recombinante

Este es el primer trabajo de investigación produce una toxina de tres dedos de una serpiente coral en el modelo eucariota *Pichia pastoris*. Microorganismo que se utiliza frecuentemente para la expresión de proteínas con alto contenido de puentes disulfuro (79).

En el presente trabajo se desarrollaron tres rutas para la expresión extracelular de la Mipartoxin-I. En la primera, Mipartoxin-IA, se mantuvo el péptido señal original de la proteína nativa, más el factor señal alfa, con el fin de comprobar si la presencia de este péptido permite una mayor expresión de la toxina recombinante al medio extracelular, dado que en la literatura está bien documentado que no siempre el factor-alfa es suficiente para llevar la proteína recombinante al espacio extracelular, y que en algunos casos es necesario utilizar los péptidos señales nativos de la proteína de interés (80–82). Sin embargo en los ensayos de expresión no se logró estandarizar la producción de la Mipartoxin-IA en el medio extracelular, debido a

que en la mayoría de los experimentos desarrollados tanto en medio mínimo, como en medio complejo, no evidenció la expresión de la Mipartoxin-IA en el medio (resultados no mostrados). En el año 1998 Brocca y sus colaboradores encontraron resultados similares, quien comparó la expresión de la lipasa Slip1 de *Cándida rugosa* en *Pichia pastoris*, y encontró una reducción significativa de la secreción o nivel de producción de la slip1 en las levaduras transformadas con plásmidos que contenían la secuencia que codifica para el péptido señal nativo (pPIC-nl-slip1), en comparación con los que poseían el factor alfa (pPIC-pp-slip1 y pPIC-p-slip1) (83).

En la segunda ruta, Mipartoxin-IB, se utilizó la región codificante para la Mipartoxin-I madura y el factor señal alfa en el extremo N-terminal, buscando expresar una proteína recombinante muy similar a la nativa. Para este caso se pudo evidenciar la expresión de la toxina recombinante tanto en el medio mínimo (Figura 14b), como en el medio complejo (resultados no mostrados). Pero con el fin de facilitar la purificación de la proteína se estandarizó solamente la expresión en medio mínimo. Al purificar la Mipartoxin-IB por HPLC se identificó que esta eluye en un tiempo de retención entre 25 a 26 minutos, a una concentración de 45% de acetonitrilo en 0,1%TFA (resultado no mostrado), resultado que contrasta con la migración de la Mipartoxin-I nativa en esta misma prueba, la cual eluye a un tiempo de retención de 31.2 min, a una concentración de 60% acetonitrilo en 0.1% TFA (resultados no mostrados). Adicional a lo anterior la evidencia en el SDS-PAGE de péptidos demostró que en condiciones semi-desnaturalizantes la Mipartoxin-IB forma posiblemente un dímero el cual se encuentra en mayor concentración que el monómero de la proteína recombinante (resultado no mostrado). Sin embargo, la Mipartoxin-IB no demostró toxicidad en el modelo de ratón. Esto podría estar relacionado con la formación de dímeros, y cambios en el perfil de elución en el HPLC.

La tercera ruta, correspondiente a la Mipartoxin-IC, en la cual se realizó un constructo que contenía el factor señal alfa en el extremo N-terminal, seguido por la secuencia de la Mipartoxin-I madura, y en el extremo C-terminal, dos epítomos de reconocimiento, el epítomo c-myc y el marcador de 6 histidinas. Los clones obtenidos con este constructo PICC permitió la expresión de la proteína y la selección de los clones que presentaban mayor expresión de la Mipartoxin-IC (XPC1, XPC4, XPC6, y XPC10), siendo el clon XPC1 el que presentó mayor expresión de la proteína recombinante. Concluyéndose que la producción de la proteína recombinante fue óptima en el medio complejo y presenta menor proteólisis. Se ha descrito que en cultivos de *P. pastoris*, especialmente de alta densidad celular, se producen enzimas proteolíticas en concentración significativa que podrían degradar la proteína recombinante (84–86). Por ello, el cambio en las características del medio como pH, temperatura y adición de peptona o extracto de levadura (presentes en el medio complejo) son factores importantes que pueden disminuir la proteólisis de la proteína recombinante en el medio de cultivo (87).

La cromatografía de afinidad a níquel, permitió separar de forma selectiva y en gran cantidad del medio de cultivo la Mipartoxin-IC, para ello se emplearon dos metodologías para la elución de la proteína, la primera fue por gradiente de imidazol, compuesto que compite por el níquel en la columna y despega la proteína acoplada a la columna (88), sin embargo, en los ensayos realizados de toxicidad en ratón de las fracciones purificadas por gradiente de imidazol, estas no presentaron toxicidad. La segunda alternativa fue la purificación en gradiente de pH, pero dado que la Mipartoxin-I nativa evidenció pérdida de actividad al pH de elución, se utilizó un buffer amortiguador a pH 8.0 con el fin de equilibrar el pH de la toxina recombinante al momento de ser liberada de la columna. Sin embargo, no se pudo evidenciar actividad biológica en la toxina recombinante. Adicional a lo anterior, al evaluar la proteína purificada por gradiente de pH en el HPLC (Figura 12), se encontró que esta cambió el tiempo de elución a 34 min en presencia de 70% acetonitrilo en 0.1% TFA. Resultado que indica un cambio en la hidrofobicidad de la proteína

recombinante, posiblemente mediado por un cambio en el plegamiento de la proteína.

A partir de la cuantificación de proteínas por BCA (ensayo del ácido bicinconínico) de la Mipartoxin-IC purificada en gradiente de pH se determinó que el rendimiento de la producción de la proteína recombinante se encuentra entre 2-5 mg/L de cultivo con una pureza de aproximadamente 95% determinada por HPLC y SDS-PAGE (Figura 14 y 15) con la cepa X33 en los clones XPC1 y XPC4. Este resultados es acorde con los rendimientos descritos para proteínas de tres dedos en *Pichia pastoris* cepa X33: 0.5-10 mg/L para la Dendoasina de *Dendroaspis jamesoni* (59); 10-15 mg/L para la Rhodostomina de *Calloselasma rhodostoma* (89) y 10-15 mg/L para la Erabutoxina b de *Laticauda semifasciata* (60). Aunque la Mipartoxin-IC indujo algún efecto como letargo y ptosis palpebral leve en el ratón solo fueron evidenciadas en dosis de 100 ug/ratón, dosis muy superior a la DL50 descrita para esta toxina nativa (19). Lo anterior podría estar relacionado a diferencias entre la Mipartoxin-I nativa que tendría 60 aminoácidos, mientras que la Mipartoxin-IC recombinante posee el epítipo de reconocimiento (c-myc y el marcador de 6 histidinas), por lo cual tendría 87 aminoácidos. En la expresión de proteínas recombinantes puede ser necesario probar diferentes epítipos dado que estos pueden generar diferentes efectos tanto positivos como negativos sobre el plegamiento y función de la proteína recombinante (90,91).

Finalmente por los fragmentos de péptidos identificados por MALDI-TOF-TOF obtenidos por digestión con tripsina a partir de gel (tabla 1, Figura 19), y al reconocimiento por los anticuerpos anti-histidinas se puede concluir que la proteína expresada y purificada correspondió a la Mipartoxin-IC recombinante. Sin embargo, la Mipartoxin-IC con el corte de la enzima de restricción Ste13, el péptido maduro debería tener 87 aminoácidos con un peso molecular de 10.212 Da. Lo que contrasta con el peso molecular identificado para la Mipartoxin-IC purificada por

HPLC en LS/MSD que es de 11.715 Da. Este resultado concuerda con lo observado en la migración en SDS-PAGE de péptidos bajo condiciones semi-desnaturalizantes donde se observa la banda a una altura aproximada de 12 kDa (Figura 17.b, 18.b, 19.b-c, 20.b-c). No obstante la presencia de esos residuos adicionales podría haber contribuido en la disminución de la actividad biológica observada. El procesamiento del alfa-factor ocurre en tres etapas: primero, parte del péptido señal es removido por peptidasas de señal en el retículo endoplasmático; a continuación, la Kex2 endopeptidasa corta la secuencia del propéptido entre las argininas y lisinas (secuencia KR); finalmente en el aparato de Golgi la proteína Ste13 corta las regiones repetidas de ácido-glutámico y alanina (secuencia EA) (92). Así, en el sitio de corte kex2p puede presentarse impedimento estérico (92), y la ste13p presentar incapacidad de procesar grandes cantidades de proteína recombinante (93). Por tales motivos es muy común reportar variabilidad en el número de amino ácidos en el N-terminal con la expresión de proteínas recombinantes utilizando el factor señal alfa-factor (55,94–99). Adicionalmente la presencia de las regiones repetidas Glu-Ala en el N-terminal pudo causar problemas en la estructura y función de la proteína recombinante (100).

Como perspectivas de este trabajo, se considera importante optimizar la producción de la Mipartoxin-IC recombinante para aumentar la cantidad de proteína obtenida en el sistema de expresión en *P. pastoris*. Además, también sería importante optimizar el sistema de purificación, dado que este evidencio un efecto sobre la viabilidad de la toxina recombinante después de ser purificada. Adicional a lo anterior y teniendo en cuenta que la proteína recombinante indujo cambios en el ratón, se considera importante evaluar si hay producción de anticuerpos neutralizantes, ya que si se evidencia su producción, esta proteína por tener baja toxicidad podría ser un buen candidato para la producción de anticuerpos anti-Mipartoxin-I de *M. mipartitus* en ratón.

CONCLUSIONES

- Las secuencias codificantes para la Mipartoxin-I, Mipartoxin-Ia, Mipartoxin-II, Mipartoxin-III y Mipartoxin-IV obtenidas a partir del ADNc de la glándula venenosa de *M. mipartitus*, demostraron la diversidad de toxinas de tres dedos que hay en su veneno.
- Se describió la secuencia codificante de la Mipartoxin-Ia, la cual es una isoforma de la Mipartoxin-I, que se diferencia por la sustitución del ácido glutámico de la posición 31 por lisina, dada por una mutación de la glutamina en la posición 91 por adenina.
- Se realizaron los modelos 3D para las secuencias de las 3FTXs obtenidas, los cuales tienen estimados de calidad aceptables. Sin embargo, el modelo de la Mipartoxin-IV obtuvo estimados de buena calidad local y global. Por lo tanto es un modelo que compartiría gran similitud con la versión cristal que tendría esta proteína.
- Este es el primer trabajo de investigación que produjo una toxina de tres dedos de una serpiente coral en el modelo eucariota *Pichia pastoris*.
- La expresión de la Mipartoxin-I, solamente se logró para los clones que incluyeron el péptido señal o la cola de histidinas empleando el modelo de *P. pastoris* X33.
- Se identificó que la proteína expresada y purificada es la Mipartoxin-IC recombinante.
- La Mipartoxin-IC no presentó toxicidad a las dosis empleadas en el modelo de ratón. Sin embargo, debido a que este presentó cambios leves, es necesario realizar ensayos adicionales para determinar si anticuerpos anti 3FTXs recombinante logran neutralizar el efecto letal de la toxina nativa, lo cual permitiría tener disponibilidad de toxinas con baja toxicidad para la producción de anticuerpos anti-Mipartoxin-I de *M. mipartitus*.

BIBLIOGRAFIA

1. Gutiérrez JM, Williams D, Fan HW, Warrell D a. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon* [Internet]. 15 de diciembre de 2010 [citado 20 de julio de 2015];56(7):1223-35. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19951718>
2. SIVIGILA instituto nacional de salud. Boletín Epidemiológico semanal, semana número 52 de 2013. 2013. p. 16.
3. Instituto Nacional de Salud. Sistema de Vigilancia en Salud Pública - SIVIGILA. Casos confirmados por evento. 2014. p. 80.
4. Otero-Patiño R, Tobón GGS, Gómez LF, Osorio R, Valderrama R, Hoyos D, et al. Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. *Acta Médica Colomb* N° 4 [Internet]. 1992 [citado 27 de agosto de 2015];Vol. 17:229-49. Recuperado a partir de: <http://www.actamedicacolombiana.com/anexo/articulos/04-1992-04-.pdf>
5. Otero-Patiño R. Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Bothrops asper* bites. *Toxicon* [Internet]. 1 de diciembre de 2009 [citado 27 de agosto de 2015];54(7):998-1011. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19591857>
6. Sasa M, Vazquez S. Snakebite envenomation in Costa Rica: a revision of incidence in the decade 1990–2000. *Toxicon*. enero de 2003;41(1):19-22.
7. Corrêa-Netto C, Junqueira-de-Azevedo IDLM, Silva D a, Ho PL, Leitão-de-Araújo M, Alves MLM, et al. Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*. *J Proteomics* [Internet]. Elsevier B.V.; 24 de agosto de 2011 [citado 25 de agosto de 2015];74(9):1795-809. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21515432>
8. Pardal PPDO, Pardal JSDO, Gadelha MADC, Rodrigues LDS, Feitosa DT, Prudente ALDC, et al. Envenomation by *Micrurus* coral snakes in the Brazilian Amazon region: report of two cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. diciembre de 2010 [citado 27 de agosto de 2015];52(6):333-7. Recuperado a partir de: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652010000600009&lng=en&nrm=iso&tlng=en
9. Charry Restrepo H. El accidente micrúrico en Colombia. (Mordeduras por serpientes de coral verdaderas.). En: *Memorias del primer simposio de Toxinología Clínica “César Gómez Villegas*. Bogota: Facultad de medicina Fundación Universitaria San Martín; 2006. p. 1-9.
10. Fix JD. Venom Yield of the North American Coral Snake and its Clinical Significance. *South Med J*. 1980;73(6).
11. Rey-Suárez P, Núñez V, Gutiérrez JM, Lomonte B, Nuñez V, Gutiérrez JM, et al. Proteomic and biological characterization of the venom of the redbelt coral

- snake, *Micrurus mipartitus* (Elapidae), from Colombia and Costa Rica. J Proteomics [Internet]. Elsevier B.V.; 21 de diciembre de 2011 [citado 25 de agosto de 2015];75(2):655-67. Recuperado a partir de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.09.003>
12. Aguilar I, Sanchez E, Giron M. Coral snake antivenom produced in chickens (*Gallus domesticus*). Rev do Inst ... [Internet]. 2014 [citado 27 de agosto de 2015];56(1):61-6. Recuperado a partir de: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0036-46652014000100061&script=sci_arttext
 13. Bucarechi F, Hyslop S, Vieira R. Bites by coral snakes (*Micrurus spp.*) in Campinas, state of São Paulo, southeastern Brazil. Rev do Inst ... [Internet]. 2006 [citado 27 de agosto de 2015];48(3):141-5. Recuperado a partir de: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0036-46652006000300005&script=sci_arttext
 14. Instituto Clodomiro Picado. suero antiofidico anti-coral. 2011. p. 1.
 15. Kitchens C, Van Mierop L. Envenomation by the eastern coral snake (*micrurus fulvius fulvius*): A study of 39 victims. JAMA. septiembre de 1987;258(12):1615-8.
 16. Roodt AR De, de Titto E, Dolab JA, Chippaux J-P, de Roodt AR. Envenoming by coral snakes (*Micrurus*) in Argentina, during the period between 1979-2003. Rev Inst Med Trop Sao Paulo [Internet]. febrero de 2013 [citado 27 de agosto de 2015];55(1):13-8. Recuperado a partir de: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652013000100003&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 17. Fix JD, Jr SM. Venom extraction and yields from the North American coral snake, *Micrurus fulvius*. Toxicon. 1976;14:143-5.
 18. De Oliveira UC, Assui A, Da Silva Álvaro RDBP, De Oliveira JS, Ho PL, de Brandão Prieto da Silva ÂR, et al. Cloning and characterization of a basic phospholipase A2 homologue from *Micrurus corallinus* (coral snake) venom gland. Toxicon [Internet]. septiembre de 2003 [citado 21 de agosto de 2015];42(3):249-55. Recuperado a partir de: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010103001399>
 19. Rey-Suárez P, Floriano RS, Rostelato-Ferreira S, Saldarriaga-córdoba M, Núñez V, Rodrigues-Simioni LLL, et al. Mipartoxin-I, a novel three-finger toxin, is the major neurotoxic component in the venom of the redbell coral snake *Micrurus mipartitus* (Elapidae). Toxicon [Internet]. octubre de 2012 [citado 25 de agosto de 2015];60(5):851-63. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22677806>
 20. Campbell JJAJ, Lamar WWW, Brodie ED. The venomous reptiles of the western hemisphere [Internet]. Associates CP, editor. 2004 [citado 1 de diciembre de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=SIBE01.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=029454>

21. Tanaka GD, Furtado MFD, Portaro FC V, Sant'Anna OA, Tambourgi D V. Diversity of *Micrurus* snake species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. enero de 2010 [citado 25 de julio de 2015];4(3):1-12. Recuperado a partir de: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2834742&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
22. Otero-Patiño R. Manual de diagnóstico y tratamiento del accidente ofídico. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia; 1994. p. 1-15.
23. Brazil OV. Coral Snake Venoms: Mode of Action and Pathophysiology of Experimental Envenomation. Rev Ins Med Trop. 1987;29(3):119-26.
24. Silveira de Oliveira J, Rossan de Brandão Prieto da Silva A, Soares MB, Stephano M a, de Oliveira Dias W, Raw I, et al. Cloning and characterization of an alpha-neurotoxin-type protein specific for the coral snake *Micrurus corallinus*. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 27 de enero de 2000 [citado 25 de agosto de 2015];267(3):887-91. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10673386>
25. Markland FS. Snake venoms and the hemostatic system. Toxicon. 1998;36(12):1749-800.
26. Li S, Wang J, Zhang X, Ren Y, Wang N, Zhao K, et al. Proteomic characterization of two snake venoms: *Naja naja atra* and *Agkistrodon halys*. Biochem J. noviembre de 2004;384(Pt 1):119-27.
27. Fry BG. Structure-function properties of venom components from Australian elapids. Toxicon. enero de 1999;37(1):11-32.
28. Calvete JJ, Marcinkiewicz C, Sanz L. Snake Venomics of *Bitis gabonica gabonica*. Protein Family Composition, Subunit Organization of Venom Toxins, and Characterization of Dimeric Disintegrins Bitisgabonin-1 and Bitisgabonin-2 research articles. 2007;326-36.
29. Kini RM. Molecular moulds with multiple missions: Functional sites in three-finger toxins. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2002;29(9):815-22.
30. Utkin YN. Three-finger toxins, a deadly weapon of elapid venom--milestones of discovery. Toxicon [Internet]. Elsevier Ltd; febrero de 2013 [citado 16 de julio de 2015];62:50-5. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23000250>
31. Nirathanan S, Gopalakrishnakone P, Gwee MCE, Khoo HE, Kini RM. Non-conventional toxins from Elapid venoms. Toxicon [Internet]. marzo de 2003 [citado 21 de agosto de 2015];41(4):397-407. Recuperado a partir de: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010102003884>
32. Tsetlin V. Snake venom alpha-neurotoxins and other «three-finger» proteins. Eur J Biochem. septiembre de 1999;264(2):281-6.
33. August I, Fiordalisi JJ, James PL, Zhang Y, Grant G a. Facile production of native-like kappa-bungarotoxin in yeast: an enhanced system for the production of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor probe. Toxicon.

febrero de 1996;34(2):213-24.

34. Karlsson E, Jolkkonen M, Mulugeta E, Onali P, Adem A. Snake toxins with high selectivity for subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochimie*. 2000;82(9-10):793-806.
35. Servent D, Blanchet G, Mourier G, Marquer C, Marcon E, Fruchart-Gaillard C. Muscarinic toxins. *Toxicon* [Internet]. Elsevier Ltd; noviembre de 2011 [citado 25 de agosto de 2015];58(6-7):455-63. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21906611>
36. Falkenstein RJRJ, Peña C, Pena C. Synthetic peptides derived from the central loop of fasciculin : structural analysis and evaluation as inhibitors of acetylcholinesterase. *Biochim Biophys Acta*. junio de 1997;1340(1):143-51.
37. Harel M, Kleywegt GJ, Ravelli RB, Silman I, Sussman JL. Crystal structure of an acetylcholinesterase-fasciculin complex: interaction of a three-fingered toxin from snake venom with its target. *Structure*. diciembre de 1995;3(12):1355-66.
38. Weille JANRDE, Schweitz H, Maest P, Tartart A, Lazdunski M, de Weille JR, et al. Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. marzo de 1991;88(March):2437-40.
39. Bilwes A, Rees B, Moras D, Ménez R, Ménez A. X-ray structure at 1.55 Å of toxin gamma, a cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom. Crystal packing reveals a model for insertion into membranes. *J Mol Biol*. mayo de 1994;239(1):122-36.
40. Larréché S, Mion G, Clapson P, Debien B, Wybrecht D, Goyffon M. Neurotoxines ophiidiennes. *Ann Fr Anesth Reanim* [Internet]. abril de 2008 [citado 25 de agosto de 2015];27(4):310-6. Recuperado a partir de: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0750765808001044>
41. Fuse N, Tsuchiya T, Nonomura Y, Menez A, Tamiya T. Structure of the snake short-chain neurotoxin , erabutoxin c , precursor gene. *Eur J Biochem*. 1990;633:629-33.
42. Chang L, Lin J, Chou Y, Hong E. Genomic Structures of Cardiotoxin 4 and Cobrotoxin from *Naja Naja Atra* (Taiwan Cobra). *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;762(239):756-62.
43. Chang L, Lin S, Huang H, Hsiao M. Genetic organization of α -bungarotoxins from *Bungarus multicinctus* (Taiwan banded krait): evidence showing that the production of α -bungarotoxin isotoxins is not derived from edited mRNAs. *Nucleic Acids Res*. 1999;27(20):3970-5.
44. Chang L, Chung C, Lin J, Hong E. Organization and phylogenetic analysis of κ -bungarotoxin genes from *Bungarus multicinctus* (Taiwan banded krait). *Genetica*. 2002;115:213-21.
45. Jeyaseelan K, Poh SL, Nair R, Armugam A. Structurally conserved α -neurotoxin genes encode functionally diverse proteins in the venom of *Naja*

- sputatrix*. FEBS Lett. octubre de 2003;553(3):333-41.
46. Gong N, Armugam a, Jeyaseelan K. Molecular cloning, characterization and evolution of the gene encoding a new group of short-chain alpha-neurotoxins in an Australian elapid, *Pseudonaja textilis*. FEBS Lett. mayo de 2000;473(3):303-10.
 47. Phui Yee JS, Nanling G, Afifiyan F, Donghui M, Siew Lay P, Armugam A, et al. Snake postsynaptic neurotoxins: gene structure, phylogeny and applications in research and therapy. Biochimie. febrero de 2004;86(2):137-49.
 48. Afifiyan F, Armugam A, Gopalakrishnakone P, Tan NH, Tan CH, Jeyaseelan K. Four new postsynaptic neurotoxins from *Naja naja sputatrix* venom: cDNA cloning, protein expression, and phylogenetic analysis. Toxicon. 1998;36(12):1871-85.
 49. Armugam A, Jeyaseelan K. a -Neurotoxin gene expression in *Naja sputatrix*: identification of a silencer element in the promoter region. 2002;404:98-105.
 50. Gong N, Armugam A, Jeyaseelan K. Postsynaptic short-chain neurotoxins from *Pseudonaja textilis*. 1999;989:982-9.
 51. Peng L-S, Zhong X-F, Huang Y-S, Zhang Y, Zheng S-L, Wei J-W, et al. Molecular cloning, expression and characterization of three short chain alpha-neurotoxins from the venom of sea snake--Hydrophiinae *Hydrophis cyanocinctus* *Daudin*. Toxicon. diciembre de 2003;42(7):753-61.
 52. Eskandari G, Jolodar A, Seyfiabad Shapouri MR, Bahmainmehr A, Navidpour S. Production of Recombinant Alpha Neurotoxin of Scorpion Venom *Mesobuthus eupeus* and Analysis of its Immunogenicity. Iran Red Crescent Med J [Internet]. enero de 2014 [citado 25 de agosto de 2015];16(1):e9666. Recuperado a partir de: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3964439&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 53. de Brandão P. da S. ÁR. Clonagem, expressão e estudo de alguns cDNAs codificando proteínas estruturalmente relacionadas às alfa neurotoxinas da glândula de veneno da cobra coral *Micrurus corallinus* (Serpentes , Elapidae). Álvaro Rossan de Brandão Prieto da Silva. Universidade de São Paulo; 2002.
 54. Carbajal-Saucedo A, López-Vera E, Bénard-Valle M, Smith EN, Zamudio F, de Roodt AR, et al. Isolation, characterization, cloning and expression of an alpha-neurotoxin from the venom of the Mexican coral snake *Micrurus laticollaris* (Squamata: Elapidae). Toxicon [Internet]. Elsevier Ltd; mayo de 2013 [citado 21 de agosto de 2015];66:64-74. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23438486>
 55. Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol Rev. 2000;24(1):45-66.
 56. Company Invitrogen. Pichia Expression Kit Cat No K1710-01. Manual. Invitrogen; 2014. p. 100.

57. Levandoski MMM, Caffery PMPM, Rogowski RSRS, Lin Y, Shi QQL, Hawrot E. Recombinant Expression of alpha -Bungarotoxin in *Pichia pastoris* Facilitates Identification of Mutant Toxins Engineered to Recognize Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *J Neurochem.* marzo de 2000;74(3):1279-89.
58. Krajewski JLJ, Dickerson IANM, Potter LTL. Site-directed mutagenesis of m1-toxin1: two amino acids responsible for stable toxin binding to M1 muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* [Internet]. octubre de 2001 [citado 25 de agosto de 2015];60(4):725-31. Recuperado a partir de: <http://molpharm.aspetjournals.org/content/60/4/725.short>
59. Chen C-Y, Cheng C-H, Chen Y-C, Lee J-C, Chou S-H, Huang W, et al. Preparation of amino-acid-type selective isotope labeling of protein expressed in *Pichia pastoris*. *Proteins* [Internet]. 1 de enero de 2006 [citado 25 de agosto de 2015];62(1):279-87. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16283643>
60. Cheng C-H, Chen C-C, Chen Y-C, Chen C-Y, Chuang W-J. Expression in *Pichia pastoris* and Backbone Dynamics of Dendroaspin and Erabutoxin b: Motion Variability within Three-fingered Toxins. *FASEB J.* 2009;23:894-8.
61. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PS I-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1997;25(17):3389-402. Recuperado a partir de: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
62. Saha S, Raghava GPS. Prediction of neurotoxins based on their function and source. *In Silico Biol* [Internet]. 2007;7(4-5):369-87. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18391230>
63. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* [Internet]. 1999;41:95-8. Recuperado a partir de: <http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>
64. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.* 2006;22(2):195-201.
65. Company Invitrogen. User manual - EasySelect™ *Pichia* Expression Kit [Internet]. Cat. no. K1740-01. 2013. Recuperado a partir de: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/easyselect_man.pdf
66. Judd RC. Electrophoresis of Peptides. En: Walker JM, editor. *Basic Peptide and Protein Protocols.* 1994. p. 49-57.
67. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-5.
68. Lomonte B, Rojas C LG. Western Blotting. En: *Inmunologia (MB-3403) Manual de Laboratorio.* 1996. p. 37-48.
69. You W, Choi W, Koh Y, Shin H. Functional characterization of recombinant

- batroxobin, a snake venom thrombin-like enzyme, expressed from *Pichia pastoris*. FEBS Lett [Internet]. 2004 [citado 27 de agosto de 2015]; Recuperado a partir de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579304008063>
70. Rey-Suárez P, Núñez V, Fernández J, Lomonte B. Integrative characterization of the venom of the coral snake *Micrurus dumerilii* (Elapidae) from Colombia: Proteome, toxicity, and cross-neutralization by antivenom. J Proteomics [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;136:262-73. Recuperado a partir de: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187439191630029X>
 71. Leão LI, Ho PL, Junqueira-de-Azevedo I de LM. Transcriptomic basis for an antiserum against *Micrurus corallinus* (coral snake) venom. BMC Genomics [Internet]. enero de 2009 [citado 17 de julio de 2015];10:112. Recuperado a partir de: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2662881&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 72. Margres MJ, Aronow K, Loyacano J, Rokyta DR. The venom-gland transcriptome of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) reveals high venom complexity in the intragenomic evolution of venoms. BMC Genomics [Internet]. BMC Genomics; 2013;14(1):531. Recuperado a partir de: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/531>
 73. Ohno M, Menez R, Ogawa T. Molecular evolution of snake toxins: is the functional diversity of snake toxins associated with a mechanism of accelerated evolution? Prog nucleic acid 1997;59.
 74. Chang L, Lin J, Wu P, Chang C, Hong E. cDNA Sequence Analysis and Expression of k-Bungarotoxin from Taiwan Banded Krait 1. Biochem Biophys Res Commun. 1997;195(230):192-5.
 75. Chang L-S, Kao P-H. Origin of Functional Diversities in Taiwan Banded Krait (*Bungarus multicinctus*) Three-finger Proteins. Fooyin J Heal Sci [Internet]. Fooyin University; noviembre de 2009 [citado 11 de noviembre de 2015];1(2):57-64. Recuperado a partir de: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187786071060001X>
 76. Lin S, Huang H, Wu B, Chang L. Characterization and cloning of long neurotoxin homolog from *Naja naja atra*. Biochem Mol Biol Int. 1998;46(6):1211-7.
 77. Benkert P, Biasini M, Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. Bioinformatics. 2011;27(3):343-50.
 78. Servent D, Menez A. Snake neurotoxins that interact with nicotinic acetylcholine receptors. En: Handbook of neurotoxicology. 2001. p. 385-425.
 79. White CE, Kempf NM, Komives E a. Expression of highly disulfide-bonded proteins in *Pichia pastoris*. Structure. 1994;2(11):1003-5.
 80. Lin Cereghino GP, Lin Cereghino J, Ilgen C, Cregg JM. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. Curr Opin Biotech [Internet]. 2002;13(4):329-32. Recuperado a partir de: <Go to

ISI>://000177248000008

81. Lin-Cereghino GP, Stark CM, Kim D, Chang JWJ, Shaheen N, Poerwanto H, et al. The effect of α -mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. Gene [Internet]. Elsevier B.V.; 1 de mayo de 2013 [citado 22 de julio de 2015];519(2):311-7. Recuperado a partir de: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3628533&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
82. Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. Yeast. 2005;22(4):249-70.
83. Brocca S, Schmidt-Dannert C, Lotti M, Alberghina L, Schmid RD. Design, total synthesis, and functional overexpression of the *Candida rugosa* lip1 gene coding for a major industrial lipase. Protein Sci. 1998;7(6):1415-22.
84. Isbister GK, Fan HW. Spider bite. Lancet [Internet]. diciembre de 2011 [citado 29 de junio de 2015];378(9808):2039-47. Recuperado a partir de: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673610622301>
85. Cereghino GPL, Sunga AJ, Cereghino JL, Cregg JM. Genetic Engineering: Principles and Methods: Principles and Methods. En: Setlow JK, editor. Boston, MA: Springer US; 2001. p. 157-69. Recuperado a partir de: http://dx.doi.org/10.1007/0-306-47572-3_9
86. Kang H a, Choi ES, Hong WK, Kim JY, Ko SM, Sohn JH, et al. Proteolytic stability of recombinant human serum albumin secreted in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol. 2000;53(5):575-82.
87. Jahic M. Process techniques for production of recombinant proteins with *Pichia pastoris*. 2003. p. 57.
88. QIAGEN, Company Qiagen. The QIAexpressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. Fifth. 2003. 128 p.
89. Guo R, Chou L, Chen Y, Chen C, Pari K, Jen CJ, et al. Expression in *Pichia pastoris* and Characterization by Circular Dichroism and NMR of Rhodostomin. PROTEINS Struct Funct Genet. 2001;508(February):499-508.
90. Dickson JMJ, Lee W-J, Shepherd PR, Buchanan CM. Enzyme activity effects of N-terminal His-tag attached to catalytic sub-unit of phosphoinositide-3-kinase. Biosci Rep [Internet]. 2013;33(6):857-63. Recuperado a partir de: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3817851&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
91. Panek A, Pietrow O, Filipkowski P, Synowiecki J. Effects of the polyhistidine tag on kinetics and other properties of trehalose synthase from *Deinococcus geothermalis*. Acta Biochim Pol. 2013;60(2):163-6.
92. Brake a J, Merryweather JP, Coit DG, Heberlein U a, Masiarz FR, Mullenbach GT, et al. Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984;81(15):4642-6.

93. Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE, Blankenship DT, Tsay JT, Smith PL, et al. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*. 1997;190(1):55-62.
94. Almeida MS, Cabral KS, de Medeiros LN, Valente a P, Almeida FC, Kurtenbach E. cDNA cloning and heterologous expression of functional cysteine-rich antifungal protein Psd1 in the yeast *Pichia pastoris*. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2001;395(2):199-207. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11697857>
95. Monsalve RI, Lu G, King TP. Expressions of recombinant venom allergen, antigen 5 of yellowjacket (*Vespula vulgaris*) and paper wasp (*Polistes annularis*), in bacteria or yeast. *Protein Expr Purif*. 1999;16:410-6.
96. Koganesawa N, Aizawa T, Masaki K, Matsuura A, Nimori T, Bando H, et al. Construction of an expression system of insect lysozyme lacking thermal stability: the effect of selection of signal sequence on level of expression in the *Pichia pastoris* expression system. *Protein Eng*. 2001;14(9):705-10.
97. Kim T, Goto Y, Hirota N, Kuwata K, Denton H, Wu S, et al. High-level expression of bovine β -lactoglobulin in *Pichia pastoris* and characterization of its physical properties. *Protein Eng*. 1997;10(11):1339-45.
98. Li Z, Xiong F, Lin Q, d'Anjou M, Daugulis a J, Yang DS, et al. Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*. 2001;21(3):438-45.
99. Raemaekers RJM, De Muro L, Gatehouse JA, Fordham-Skelton AP. Functional phytohemagglutinin (PHA) and *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) expressed in *Pichia pastoris*. Correct N-terminal processing and secretion of heterologous proteins expressed using the PHA-E signal peptide. *Eur J Biochem*. 1999;265(1):394-403.
100. Daly R, Hearn MTW. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit*. 2005;18(2):119-38.