



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**“Estudio del efecto de la orientación de los dominios
VL y VH sobre las propiedades del scFv LR”**

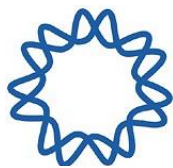
Tesis presentada para obtener el grado de:

LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
IRVING UTRERA ESPINDOLA

DIRECTORA DE TESIS: **Dra. Lidia Riaño Umbarila**

CODIRECTOR: **Dr. Baltazar Becerril Luján**



Instituto de Biotecnología
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DICIEMBRE 2019

El proyecto de tesis de licenciatura aquí presentado fue llevado a cabo en el laboratorio del Dr. Baltazar Becerril Luján, bajo la dirección de la Dra. Lidia Riaño Umbarila, Catedrática Conacyt adscrita al Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Este trabajo se realizó con el apoyo económico de los proyectos: Atención a Problemas Nacionales Conacyt 246924 y DGAPIN 201918

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lidia Riaño, por su apoyo, tiempo y paciencia en este proyecto, por su ayuda a sacarlo adelante y toda la asesoría experimental.

Al Dr. Baltazar Becerril, por haberme permitido ser partícipe de su grupo de trabajo y del IBt, por el apoyo y consejos.

A mis sinodales, la Dra. Maria Lilia Cedillo y la Dra. Nora Hilda Rosas por su apoyo, sus valiosas sugerencias y tiempo invertido en la revisión de esta tesis.

A Timoteo Olamendi, por su ayuda en las purificaciones de las toxinas necesarias para los experimentos.

Al Dr. Everardo Rodríguez por su apoyo en las correcciones de este escrito.

Al Dr. Fernando Zamudio, por su apoyo en la determinación de las masas de los scFvs.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	6
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 Proteínas recombinantes	8
1.2 Inmunoglobulinas o Anticuerpos	8
1.3 Formatos de anticuerpos	9
1.4 F(ab') ₂ y Fab	10
1.5 Fragmento variable de cadena sencilla o scFv	10
1.6 Expresión de scFvs	11
1.7 Sistemas de expresión	12
1.8 <i>Escherichia coli</i>	13
1.9 Expresión de fragmentos de Ab en <i>E. coli</i>	14
1.10 Alacranismo	15
1.11 Alacranes	15
1.12 Morfología	16
1.13 Alacranes en México	17
1.14 Envenenamiento y sintomatología	19
1.15 Veneno de los alacranes	20
1.16 Antiveneno	21
1.17 Alacramyn	21
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	22
JUSTIFICACIÓN	24
HIPÓTESIS	24
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA	26
3.1 Construcción de scFv LR VL-VH	26
3.2 Amplificación de los dominios	26
3.3 Empalme en la nueva orientación	27
3.4 Digestión	27

3.5 Ligación	27
3.6 Transformación	28
3.7 Expresión de las construcciones en ambas orientaciones	28
3.8 Extracción periplásmica.....	29
3.9 Purificación por afinidad a Níquel.....	29
3.10 Purificación por exclusión molecular	29
3.11 Evaluación preliminar del reconocimiento en biosensor de interacciones moleculares BIACORE a Cn2	30
3.12 Análisis de la actividad en presencia de un agente desnaturizante.....	30
3.13 Efecto de la temperatura en la actividad funcional	31
3.14 Ensayos de neutralización.....	31
CAPÍTULO 4. RESULTADOS	32
4.1 Construcción del gen en orientación VL-VH de LR	32
4.2 Caracterización	34
4.2.1 Expresión	34
4.3 Evaluación de la actividad Funcional.....	37
4.3.1 Reconocimiento: BIACORE.....	37
4.3.2 Actividad funcional en presencia de un agente desnaturizante	40
4.3.3 Actividad funcional en diferentes temperaturas.....	41
4.4 Actividad biológica.....	42
CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN	43
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES	49
PERSPECTIVAS	50
BIBLIOGRAFIA	51
ANEXOS	55
Definiciones	55
Protocolos	56

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ORIENTACIÓN DE LOS DOMINIOS VL Y VH SOBRE LAS PROPIEDADES EL scFv LR

RESUMEN

Un scFv (*single chain variable fragment*, por sus siglas en inglés), es una proteína de fusión conformada por el dominio variable de la cadena pesada (VH) y el dominio variable de la cadena ligera (VL) de una inmunoglobulina, unidas por un péptido conector. En el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, el grupo de investigación liderado por el Dr. Baltazar Becerril Luján ha desarrollado scFvs capaces de neutralizar las principales toxinas de los venenos de alacranes mexicanos, destacándose la generación del scFv LR, el cual es capaz de neutralizar las toxinas Cn2 y Css2, importantes por su abundancia y toxicidad; además de pertenecer a dos de los alacranes más tóxicos del país, *Centruroides noxious* y *Centruroides suffusus* respectivamente.

El scFv LR posee una estructuración VH-conector-VL, sin embargo, diversos estudios muestran que la orientación de los dominios variables puede influir significativamente en algunas propiedades de las moléculas. Es por tal motivo que se decidió analizar los efectos del cambio en el orden, de los dominios del scFv LR, hacia la orientación VL-conector-VH.

El segmento de ADN que codifica para el scFv LR en la nueva orientación fue construido amplificando cada dominio por separado y luego empalmándolos en la orientación deseada. Esta construcción (VL-VH) y la original VH-VL fueron producidas en el sistema de expresión periplásmica usando el vector pSyn 1 y finalmente insertadas en la cepa TG1 de células de *E. coli*. Fue interesante determinar en varios ensayos de expresión, que la nueva orientación del scFv LR VL-VH se expresó más que la orientación VH-VL (4.9 mg/L y 3.6 mg/L respectivamente).

La caracterización de las proteínas purificadas permitió confirmar que el cambio en la orientación no alteró su capacidad de reconocimiento por las toxinas Cn2 y Css2. Tampoco se observaron grandes diferencias al ser evaluado en presencia de un agente desnaturizante y al ser incubado a diferentes temperaturas.

El scFv LR es una molécula con futuros propósitos terapéuticos, por lo que fue necesario conocer su comportamiento en un sistema vivo. La evaluación de la capacidad de neutralización de las construcciones contra la toxina Cn2, se realizó en ratones y se determinó que el cambio de la orientación no modificó la capacidad de neutralización del scFv original.

El trabajo realizado, muestra que el cambio en la orientación del scFv LR de VH-VL a VL-VH no presenta grandes alteraciones en su actividad. Lo cual contrasta con varios reportes donde se han modificado considerablemente su funcionalidad, donde la pierden o al contrario la adquieren y/o mejoran. Por lo que es recomendable explorar las características de los scFvs en ambas orientaciones.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Proteínas recombinantes

Los avances en el campo de la ingeniería genética han llevado al desarrollo de las tecnologías que permiten la generación de proteínas que incluso superan el diseño y evolución de algunas proteínas presentes en la naturaleza, gracias a la capacidad de manipular y modificar los genes que las codifican. Es en esta área donde sobresalen los anticuerpos recombinantes sobre los cuales ha sido posible configurar y modificar la capacidad de unión por sus antígenos, así como optimizar la actividad biológica. A los anticuerpos recombinantes también se les puede incorporar etiquetas y proteínas de fusión para permitir una buena detección y/o seguimiento y purificación. Así mismo es posible aumentar el tiempo de vida media en anaquel y dentro del organismo blanco, logrando nuevas aplicaciones a nivel de investigación, terapia y diagnóstico (Ma & O’Kennedy, 2017).

1.2 Inmunoglobulinas o Anticuerpos

Existen distintas clases de anticuerpos o inmunoglobulinas naturales (IgG, IgM, IgA, IgD e IgE) que proporcionan a los animales una de las principales defensas contra organismos patógenos, sustancias extrañas y toxinas entre otros.

Los anticuerpos tipo IgG (**Figura 1**) están compuestos por dos cadenas pesadas HC (*heavy chain*) idénticas y dos cadenas ligeras LC (*light chain*) idénticas; las cuales se estructuran en algo parecido a una letra “Y” y la interacción entre estas cadenas está estabilizada por enlaces disulfuro.

Los anticuerpos tienen un peso molecular aproximado de 150,000 Daltons (Da), y están constituidos por dos cadenas pesadas “H” de 50,000 Da cada una y dos cadenas ligeras “L” de 25,000 Da cada una. Cada H y L se subdividen en una región variable ubicada en el extremo amino terminal y de regiones constantes (1 en el caso de la cadena ligera y 3 en el caso de las cadenas pesadas). Los dominios constantes 2 y 3 de las cadenas pesadas constituyen la región Fc (fragmento cristizable) que es responsable de importantes funciones efectoras de los anticuerpos.

Los sitios de unión al antígeno están formados por la combinación de la región variable de la H (VH) y de la región variable de la L (VL), por lo que cada anticuerpo posee dos sitios de unión idénticos (**Figura 1**). Dentro de las regiones variables VH y VL hay 3 regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de la complementariedad o CDRs (*complementarity determining region*), y 4 regiones de andamiaje o regiones marco FR (*framework region*). La mayor variación en la secuencia de aminoácidos en los anticuerpos ocurre dentro de los CDR, mientras que los FR están más conservados. Las regiones CDR de VH y VL constituyen el sitio de unión al antígeno o paratopo ya que en esta zona se encuentran la mayoría de los aminoácidos que interactúan de manera directa con el antígeno.

1.3 Formatos de anticuerpos

Como ya se describió, la estructura modular de los anticuerpos ha sido ampliamente caracterizada. Y se sabe que es posible manipular y separar estos módulos o dominios manteniendo su función primaria. Por esta razón ha sido posible generar nuevos formatos de anticuerpos de menor tamaño los cuales pueden tener ciertas ventajas terapéuticas. Los más conocidos son: el fragmento de unión al antígeno (Fab: *antigen binding fragment*), el fragmento variable de cadena sencilla (scFv: *single chain variable fragment*), y recientemente el anticuerpo de dominio único (sdAb: *single-domain antibody*) entre otros (**Figura 1**) (Wen Ch'ng *et al.*, 2016). Estos fragmentos de anticuerpos mantienen la especificidad ya que presentan el sitio de unión al antígeno, y tienen ventajas relacionadas con una menor talla molecular, la cual les permite distribuirse rápidamente en el organismo y pueden ser capaces de infiltrarse en algunos tejidos en comparación de un anticuerpo completo. Por otro lado, también pueden ser expresados en sistemas procariontes, lo cual ahorra tiempo y costo comparado con otros sistemas. Al no poseer un dominio Fc, se reduce considerablemente la posibilidad de que estos fragmentos induzcan una respuesta inmune y los hace más fácilmente eliminables en un organismo (Johnson, 2013), aspecto favorable en tratamientos de intoxicación.

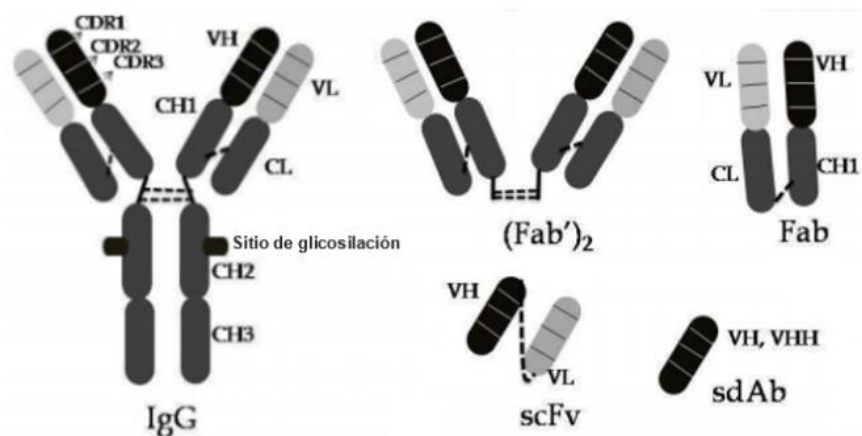


Figura 1. Anticuerpo completo (IgG); fragmento de unión al anticuerpo (Fab); fragmento de unión al anticuerpo bivalente ($(Fab')_2$); fragmento variable de cadena sencilla (scFv); y anticuerpo de dominio único (sdAb). (Ban & Blake, 2012)

1.4 $(Fab')_2$ y Fab

Los fragmentos de anticuerpos $(Fab')_2$ son generados típicamente por digestión enzimática con pepsina, a partir de anticuerpos IgG íntegros que separan la región Fc del anticuerpo y manteniendo la región bisagra. Mientras que la digestión con papaína genera F(ab) (**Figura 1**). Después de la digestión enzimática son requeridos varios pasos de purificación para obtener productos de alta pureza y eficacia con mínimos efectos secundarios (Kittipongwarakarn *et al.*, 2011).

De manera recombinante es posible manipular y expresar estos Fab, mediante el uso de vectores con unidades transcripcionales monocistrónicas o bicistrónicas, cuando el objetivo es expresar los dos segmentos de proteína, los cuales incluyen los dominios variables y constantes.

1.5 Fragmento variable de cadena sencilla o scFv

El fragmento variable de cadena sencilla es una proteína de fusión de los dominios variables de una IgG unidos por un péptido conector que une el extremo carboxilo de un dominio con el extremo amino del otro dominio (Bird *et al.*, 1988). La configuración más ampliamente usada del péptido conector que une a los dominios variables VH y VL es $(Gly_4 - Ser)_3$, y gracias a la flexibilidad otorgada es

posible la interacción y la correcta formación de la interfase de los dos dominios, además de una configuración monomérica.

Los scFvs pueden ser orientados de forma VH-conector-VL o VL-conector-VH (Bühler *et al.*, 2010; Kellmann *et al.*, 2017; Weatherill *et al.*, 2012), aunque la orientación VH-VL es la más ampliamente usada. Este fragmento de anticuerpo de tipo monocatenario, tiene un peso molecular aproximado de 27,000 kDa; siendo esto una ventaja en comparación con anticuerpos de tipo IgG o Fab debido a que presenta una biodistribución acelerada y una eliminación comparativamente más rápida, posicionándolos como ideales para algunas aplicaciones médicas (Huston *et al.*, 1993).

El uso de estos fragmentos de anticuerpos es cada vez más popular debido a su alta especificidad, sensibilidad y estabilidad, además de que estos pueden ser fácilmente optimizados por modificación genética y química (Verma *et al.*, 1998). Pero existen algunos aspectos a considerar para generar exitosamente anticuerpos recombinantes, como la utilización del sistema de expresión adecuado para el tipo de anticuerpo o fragmento que se desea producir.

1.6 Expresión de scFvs

La producción de los scFvs se realiza empleando sistemas de expresión heterólogos. El proceso incluye la incorporación de los genes que codifican para los scFvs en vectores o plásmidos inducibles, los cuales pueden ser introducidos en distintos huéspedes como bacterias, levaduras, células de mamífero, células de insecto (**ver Tabla 1**). Para lograr una expresión correcta, el gen clonado debe transcribirse y traducirse de manera eficiente en el sistema de expresión seleccionado.

Los fragmentos de anticuerpos, así como otras proteínas recombinantes, se han producido en varios sistemas de expresión, como el bacteriano, mamífero, insecto, levadura y planta (Fischer *et al.*, 2003; McKenzie & Abbott, 2018; Sim *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018). Para elegir el sistema de expresión adecuado hay varios factores a tenerse en cuenta: ¿Cuál es el huésped adecuado?, ¿En qué compartimento se

espera sea recuperado?, ¿Cuál es el tiempo de inducción óptimo?, ¿A qué temperatura debe llevarse a cabo la inducción?, ¿Cuál es la cantidad y la pureza requerida del producto final?

En cuanto al rendimiento y la actividad biológica de las proteínas recombinantes también existen otros factores intrínsecos de la molécula a considerar, como la solubilidad, la estabilidad y el tamaño de la molécula, pues cada proteína requiere de condiciones óptimas para su expresión. Estas particularidades, se están determinadas por la secuencia única de aminoácidos, por lo que un sistema de expresión que puede ser adecuado para una secuencia de anticuerpo puede no serlo para otro. Cabe señalar que los problemas en la expresión bacteriana parecen reducirse en el caso de los fragmentos de anticuerpos obtenidos de procesos previos de despliegue en fagos; esto ya que la mayoría de scFvs aislados de bibliotecas presentan un rendimiento razonable; probablemente debido a que el proceso de escrutinio o tamizaje funciona no solo para aislar "buenos ligandos" sino también para identificar "eficientes expresores", que estarán relativamente bien representados en las bibliotecas (Verma *et al.*, 1998).

1.7 Sistemas de expresión

La selección de un huésped apropiado es el primer paso para obtener una expresión de anticuerpos óptima. Una serie de hospederos procariotas o eucariotas están disponibles para la expresión de anticuerpos y sus fragmentos, los cuales poseen su propio conjunto de ventajas y desventajas (**Tabla 1**). Las líneas celulares de mamíferos como CHO ó HEK293 son las preferidas para la expresión de anticuerpos terapéuticos completos debido a que la maquinaria celular es responsable del correcto plegamiento, la secreción y las modificaciones postraduccionales. Sin embargo, los hospederos de origen mamífero tienen ciertos inconvenientes como mayores costos de producción y dificultades en la manipulación genética. Esto hace que los hospedadores microbianos sean la opción más conveniente para la producción de anticuerpos recombinantes (Ayyar *et al.*,

2017). Entre los huéspedes de expresión microbiana, *Escherichia coli* es sin duda el sistema de expresión más ampliamente utilizado.

Característica	Bacterias	Levaduras	Células de mamífero	Células de insecto	Plantas transgénicas	Animales transgénicos
<i>Costo de Mantenimiento</i>	Bajo	Bajo	Alto	Alto	Bajo	Alto
<i>Complejidad de los Medios</i>	Bajo	Bajo	Alto	Alto	-	-
<i>Costo de Producción</i>	Medio	Medio	Alto	Alto	Bajo	Alto
<i>Facilidad de Manejo</i>	Fácil	Fácil	Difícil	Difícil	-	-
<i>Tiempo Requerido</i>	Bajo	Bajo	Moderado	Moderado	Alto	Muy alto
<i>Crecimiento</i>	Rápido	Rápido	Lento	Lento	Lento	Lento
<i>Vector/Disponibilidad de Cepas</i>	Alto	Limitado	Limitado	Limitado	Limitado	Limitado
<i>Manipulación Genética</i>	Fácil	Moderado	Difícil	Difícil	Difícil	Difícil
<i>Escalabilidad</i>	Muy fácil	Muy fácil	Moderado	Moderada	Muy fácil	Desconocido
<i>Propagación</i>	Fácil	Fácil	Difícil	Difícil	Fácil	-
<i>Tamaño del Producto Expresado</i>	Pequeño	Grande	Grande	Grande	Grande	Grande
<i>Puentes Disulfuro</i>	Limitado	No limitado	No limitado	No limitado	No limitado	No limitado
<i>Rendimiento</i>	Medio	Alto	Medio-alto	Medio-alto	Alto	Alto
<i>Plegado</i>	Generalmente se requiere replegamiento	Replegado puede ser requerido	Plegado correcto	Plegado correcto	Plegado correcto	Plegado correcto
<i>Glicosilación</i>	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
<i>Modificaciones Postraduccionales</i>	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
<i>Secreción</i>	Periplasma (Gram-); Medio extracelular (Gram+)	Medio extracelular	Medio extracelular	Medio extracelular	Productos vegetales (semillas, hojas...)	Productos animales (leche, huevo...)
<i>Seguridad</i>	Bajo	Moderado	Moderado	Moderado	Alto	Alto

Tabla 1. Comparación de los diferentes sistemas de expresión (modificado de Ayyar et al., 2017).

1.8 *Escherichia coli*

Entre las ventajas del uso de *E. coli* como sistema de expresión se encuentra el rápido crecimiento en comparación con las células de mamíferos que facilita alcanzar altas densidades celulares. Por otro lado, los medios de cultivo utilizados son económicos, la genética, fisiología y metabolismo del organismo en general son conocidos, existe disponibilidad de una variedad de cepas así como vectores de

clonación y expresión, la transformación con ADN exógeno es rápida, entre otras (Ahmad *et al.*, 2018; Ayyar *et al.*, 2017). A pesar de que este sistema tiene limitantes como la ausencia de maquinaria para realizar modificaciones postraduccionales tales como la glicosilación, para ciertas proteínas este sistema resulta adecuado.

1.9 Expresión de fragmentos de Ab en *E. coli*

Uno de los principales obstáculos en la producción de anticuerpos recombinantes en sistemas biológicos es la degradación de estos por la acción de proteasas. Para ello algunas estrategias han sido abordadas, tales como el diseño de cepas deficientes de proteasas (Kuroda *et al.*, 2007), o el uso de inhibidores de estas en los cultivos, evitando la degradación de las proteínas.

La productividad en la expresión de los scFvs también puede estar influenciada por otros factores como son el uso preferencial de codones de *E. coli*, (Kaur *et al.*, 2018; Tiwari *et al.*, 2010), la orientación de los propios dominios variables de esta construcción artificial (Bühler *et al.*, 2010) y la naturaleza del péptido conector (Paudel *et al.*, 2017). En el caso de la orientación de los dominios en la mayoría de las construcciones de los scFv reportadas, se han usado preferentemente la orientación VH-VL, aunque existen otros ejemplos funcionales en la orientación VL-VH (Ayyar *et al.*, 2017).

Son pocos los trabajos realizados sobre los efectos del cambio en la orientación de los dominios de VH y VL de un determinado scFv. En algunos casos se han reportado diferencias importantes en cuanto a rendimiento y funcionalidad (Kellmann *et al.*, 2017), por lo que cada scFv debería ser estudiado en ambas orientaciones, para determinar cuál es más favorable para la actividad funcional del fragmento de anticuerpo. Con respecto al trabajo del grupo del Dr. Becerril se han generado fragmentos de anticuerpos humanos contra los componentes tóxicos de venenos de alacranes mexicanos que serán descritos más adelante, los cuales son idóneos para evaluar el efecto del cambio de la orientación de los dominios variables.

1.10 Alacranismo

La incidencia de la picadura de alacranes en humanos es conocida como alacranismo. En México, estos accidentes son causados por especies del género *Centruroides*, los cuales constituyen un importante problema de salud pública. El alacranismo afecta a 16 entidades del centro y occidente del país, donde se registran alrededor de 300 mil casos anuales. Las defunciones por esta causa han ido en descenso como resultado de la atención oportuna y el tratamiento con el antídoto específico. En 1990 se registraron 285 muertes, mientras que en 2012 fueron 49 (Secretaría de Salud, 2013). Son los estados de Colima, Morelos, Nayarit y Guerrero; los que reportan una mayor incidencia de envenenamiento por picadura de alacrán en el país (Secretaría de Salud, 2016).

1.11 Alacranes

El orden *Scorpionida* es un grupo de artrópodos pertenecientes a la clase de los arácnidos cuyos fósiles corresponden a los más antiguos, ya que se remontan a casi 433-438 millones de años y se han mantenido casi sin cambios desde que se volvieron completamente terrestres. Pueden encontrarse desde cavernas profundas como el *alacrán tartarus*, encontrado en México a 900 metros bajo el suelo hasta picos altos como en la cordillera de los Andes, como el *Orobothriurus huascaran* a 4,910 metros sobre el nivel del mar. Es decir, habitan diversos ambientes excepto en la Antártida, áreas boreales y algunas islas oceánicas. Existe una gran diversidad de alacranes en áreas subtropicales que disminuye hacia el ecuador y los polos. El orden *escorpionida* abarca más de 2231 especies, distribuidas en 208 géneros y 20 familias (Santibáñez *et al.*, 2015).

1.12 Morfología

Los alacranes están cubiertos por un exoesqueleto formado principalmente por queratina, el cual está constituido por placas y segmentos unidos por tejido conjuntivo, dándole el aspecto inconfundible, propio de este orden. El cuerpo del alacrán se divide en tres regiones: prosoma o cefalotórax, mesosoma o abdomen y metasoma o cauda (**Figura 2**).

Prosoma. Está cubierto por una placa de forma trapezoidal; es el caparazón, sobre el cual están situados los ojos medianos y dos grupos de ojos latero-frontales, cuyo número varía entre dos y cinco. En el lado abdominal se encuentran las coxas de los pedipalpos, de las patas ambulatorias y los procesos maxilares; bajo el borde frontal están situados los quelíceros.

Mesosoma. El dorso está cubierto por siete tergitos; los cuales son placas transversas, generalmente lisas o granuladas. En el lado ventral se encuentra el esternón e inmediatamente detrás, la abertura genital. A ésta le sigue la placa pectínea, en cuyos lados se encuentran los dos órganos sensoriales denominados peines; el resto está cubierto por los esternitos; (formados por cinco placas transversas), encontrando en cada lado un estigma o abertura respiratoria.

Metasoma. Está formada por cinco segmentos, y en el extremo está situado el telson con las glándulas productoras de veneno. El telson es un segmento cuya forma varía entre ovoide y subesférica; el cual posee un aguijón debajo del cual puede o no haber un tubérculo (D'Suze *et al.*, 2011).

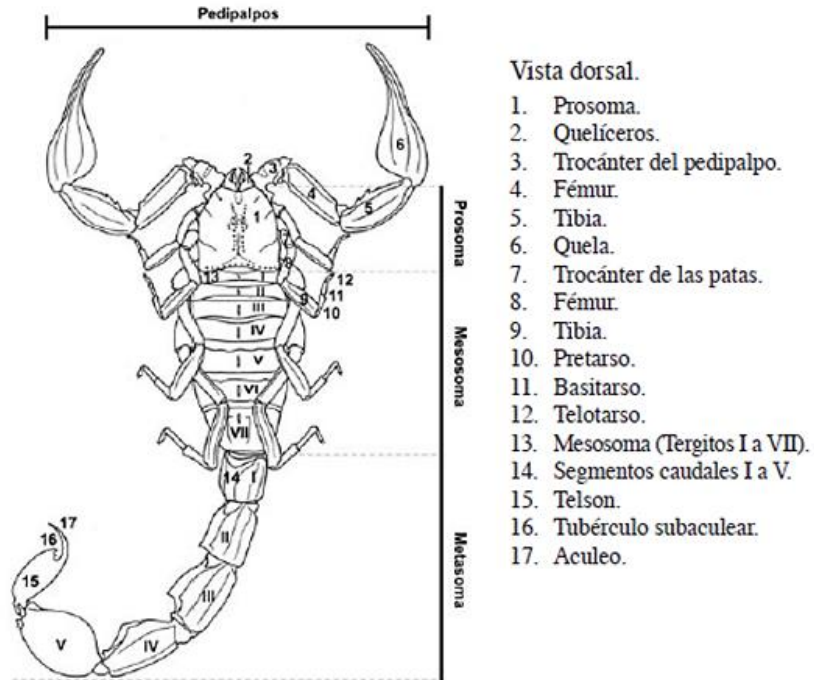


Figura 2. Principales partes del alacrán; modificado de (D'Suze *et al.*, 2011).

1.13 Alacranes en México

México es uno de los países con mayor diversidad de alacranes; con 38 géneros y 289 especies agrupadas en 8 familias.

La familia *Buthidae* Koch, resalta por su distribución y toxicidad; la cual comprende 2 géneros, representados por 48 especies; el género *Centruroides* Marx, es el más diverso de la familia y comprende 44 especies. Aunque este género es encontrado en casi todo el país, son los estados de Michoacán, Guerrero y Oaxaca los que tienen mayor diversidad (**Tabla 2**).

Entre las especies más representativas del género *Centruroides* se encuentran: *Centruroides sculpturatus*, *Centruroides limpidus*, *Centruroides infamatus*, *Centruroides elegans*, *Centruroides tecomanus* y *Centruroides noxius*, *Centruroides suffusus* entre otros. El veneno de estas especies es tóxico y potencialmente mortal para los humanos (Ponce-Saavedra *et al.*, 2015).

<i>Centruroides</i>	AGS.	B.C.	B.C.S.	CAMP.	CHIH.	COAH.	COL.	DGO.	EDO. MEX.	GRO.	GTO.	HGO.	JAL.	MICH.	MOR.	MAY.	N.L.	OAX.	PUE.	QRO.	QROO.	SIN.	SLP.	SON.	TAB.	TAMP.	VER.	YUC.	ZAC.
<i>C. beeryi</i>																													
<i>C. baltesensis</i>									X	X				X	X														
<i>C. bermollii</i>														X	X														
<i>C. bonito</i>										X																			
<i>C. chamele</i>													X																
<i>C. chermulaensis</i>									X																				
<i>C. chiapensis</i>																													
<i>C. edwardsii</i>																													
<i>C. elegans</i>																													
<i>C. eximicauda</i>																													
<i>C. flavopictus</i>																													
<i>C. francisci</i>																													
<i>C. fulvipes</i>																													
<i>C. gracilis</i>																													
<i>C. hisutopalpus</i>																													
<i>C. hotmanini</i>																													
<i>C. huichol</i>																													
<i>C. infamatus</i>																													
<i>C. insularis</i>																													
<i>C. limpidus</i>																													
<i>C. mascola</i>																													
<i>C. meisel</i>																													
<i>C. nigrescens</i>																													
<i>C. nigritianus</i>																													
<i>C. nigroviridatus</i>																													
<i>C. noxius</i>																													
<i>C. ochraceus</i>																													
<i>C. ortzabi</i>																													
<i>C. ornatus</i>																													
<i>C. pallidiceps</i>																													
<i>C. ponceli</i>																													
<i>C. rieyi</i>																													
<i>C. rodolfoi</i>																													
<i>C. ruana</i>																													
<i>C. schmidt</i>																													
<i>C. sculpuratus</i>																													
<i>C. serrano</i>																													
<i>C. sissoni</i>																													
<i>C. summus</i>																													
<i>C. tapachulaensis</i>																													
<i>C. tecomanus</i>																													
<i>C. tuxtla</i>																													
<i>C. villagasi</i>																													
<i>C. vittatus</i>																													

Tabla 2. Especies del género *Centruroides* en México y su registro por estados (*CDMX y TLAX sin registro)
(modificado de Ponce-Saavedra et al., 2016)

1.14 Envenenamiento y sintomatología

En los casos de envenenamiento por picadura de alacrán existen una serie de factores determinantes para el pronóstico médico de la víctima. Entre los factores relacionados al alacrán están: la especie, la condición del telson (aguijón), el número de picaduras y la cantidad de veneno inyectado. Así como, factores relacionados a la víctima: la edad, peso y salud, así como presencia de otras enfermedades y la efectividad del tratamiento (Dehesa-Dávila & Possani, 1994).

Los síntomas de intoxicación por picadura de alacrán incluyen dolor local, inmediato, intenso y persistente, con sensación de recuperación parcial y recaídas del individuo. Lo cual dura 10-15 horas e incluso hasta 24 horas. En gran parte de los casos, el dolor es el único signo clínico y persiste principalmente por 2 horas posteriores a la picadura. Puede estar acompañada de síntomas generales como agitación, fiebre, sudores, náuseas, sensación de desmayo, presión sanguínea alternante (hipertensión e hipotensión).

El paso a las siguientes etapas es imprevisible y rápido. Se ha observado que el período crítico oscila entre las horas 3 a 12 después de la picadura, en las cuales el riesgo de una complicación es más alto. La segunda etapa corresponde a un envenenamiento severo; ocurre la aparición de síntomas como sudores, dolor epigástrico, vómitos, cólicos, diarrea, priapismo, hipotensión, bradicardia, obstrucción pulmonar, disnea, aumento de temperatura. La tercera etapa corresponde a un envenenamiento muy severo y potencialmente letal. El riesgo de colapso cardiovascular es alto, asociado con complicaciones respiratorias como edema pulmonar, broncoespasmo y cianosis. Hipertermia, arritmia cardíaca y signos electrocardiográficos de isquemia miocárdica se han observado (Espino-Solis *et al.*, 2009)

En niños los síntomas como; dolor local, hiperemia local, sialorrea, disfagia, taquicardia, irritabilidad, odinofagia, parestesia, prurito nasal y vómitos son frecuentemente observados y varían de acuerdo con la gravedad del envenenamiento. Los síntomas sistémicos predominan en los casos graves,

mientras que los síntomas locales son prevalentes en los casos leves (Osnaya-Romero *et al.*, 2001).

Complicaciones sistémicas graves como la insuficiencia cardíaca, edema pulmonar, shock circulatorio, convulsiones y coma, empeoran el pronóstico de supervivencia. La insuficiencia respiratoria suele ser la causa de muerte, pero otras complicaciones graves como el choque cardiocirculatorio también pueden provocarla. La capacidad del veneno de estos animales de provocar daños a la salud hizo necesaria su catalogación como de importancia médica.

1.15 Veneno de los alacranes

El veneno de alacrán es una mezcla compleja de diferentes componentes, conteniendo principalmente proteínas y péptidos de bajo peso molecular. Estos últimos son clasificados de acuerdo con; su estructura, modo de acción y sitio de unión hacia diferentes canales o subtipos de canales. Los principales componentes activos del veneno de los alacranes peligrosos para humanos son los péptidos neurotóxicos conocidos como “toxinas largas”, las cuales contienen alrededor de 60-66 aminoácidos y cuatro puentes disulfuros. Se encuentran presentes en pequeñas cantidades (inferior al 5 % del peso seco del veneno), y son las principales responsables de la toxicidad del veneno debido a que actúan sobre los canales iónicos de sodio (Na^+) dependientes de voltaje de las células excitables del sistema neuromuscular. Las toxinas de Na^+ se clasifican en; toxinas tipo α y β (Chippaux & Goyffon, 2008). Las primeras, (α) afectan los mecanismos de cierre del canal de sodio, sin modificar el potencial de apertura, actúan solo cuando se abre el canal. La consecuencia de esto es una fuerte despolarización de la membrana, seguida en una segunda vez de una pérdida de excitabilidad.

Las segundas toxinas (β) tienen una actividad independiente del potencial de la membrana. Los venenos de escorpión contienen otras neurotoxinas que se unen a los canales iónicos de las membranas de las células excitables o no, en particular las toxinas que se unen a los canales de potasio (toxinas cortas) o los canales de cloro.

1.16 Antiveneno

El tratamiento comúnmente usado para tratar los accidentes por la picadura del alacrán consiste en la administración de un antiveneno producido por hiperinmunización en ganado, principalmente caballo; con el macerado de la glándula venenosa de una o varias especies de alacranes tóxicos (Dehesa-Dávila & Possani, 1994). Las inmunoglobulinas del plasma del caballo se digieren con pepsina para eliminar la porción Fc, y los fragmentos F(ab')₂ purificados son liofilizados y comercializados en el país.

1.17 Alacramyn

En México este antiveneno es producido bajo el nombre de Faboterápico Antialacrán Alacramyn™ y en caso de intoxicación es recomendada la aplicación de dos ampollitas en el caso de los niños, y una para adultos; administrada por vía intravenosa. Dosis secundarias del antiveneno son administradas en caso de ser necesarias; sin embargo, no son deseables ante la posible aparición de reacciones anafilácticas por administraciones de un mayor número de ampollitas (Osnaya-Romero *et al.*, 2001).

CAPITULO 2. ANTECEDENTES

En el Instituto de Biotecnología (IBT-UNAM) el grupo de investigación liderado por el Dr. Baltazar Becerril Luján, se ha dedicado a la generación de fragmentos de anticuerpos recombinantes humanos neutralizantes de las toxinas principales en los venenos de alacranes mexicanos. Este desarrollo, alternativo al antiveneno generado en caballo, se inició con la construcción de una biblioteca no inmune humana de scFvs a partir de una muestra de sangre periférica de un individuo sano. Esta biblioteca fue evaluada usando el sistema de despliegue en fagos y de este proceso se aislaron dos anticuerpos a los cuales fueron denominados scFv 3F y scFv C1 (Riaño-Umbarila *et al.*, 2005). Estos dos han fungido como fragmentos de anticuerpos parentales, los cuales en procesos independientes de evolución dirigida han permitido la obtención de variantes neutralizantes de toxinas de alacranes mexicanos (Riaño-Umbarila *et al.*, 2005, 2011, 2016).

En particular se destaca la obtención del scFv LR (Riaño-Umbarila *et al.*, 2011) a partir de procesos de maduración del parental scFv 3F. El scFv LR es capaz de reconocer y neutralizar a dos toxinas principales en términos de su abundancia y toxicidad; Cn2 y Css2 pertenecientes a los venenos de dos de los alacranes de importancia médica en México: *C. noxius* y *C. suffusus* (Riaño-Umbarila *et al.*, 2017). Este scFv se ha expresado en periplasma de *E. coli* TG1, ya que permite la correcta formación de los puentes disulfuros, y se obtiene de manera soluble y funcional cuyos rendimientos varían entre 2.5 - 4 mg/L de cultivo.

El scFv 3F y sus derivados están constituidos por un dominio VH proveniente de la línea germinal VH3 (con los segmentos de genesIGHV3-9*01, IGHD2-8*02, IGHJ3*02) y el dominio VL proveniente de la línea germinal Vk1 (con los segmentos de genes IGK3-11*01, IHKJ1*01). Estos dominios son ampliamente usados por el sistema inmune debido a que corresponden a las líneas germinales más estables comparadas con las demás familias (Ewert *et al.*, 2003).

Como se mencionó anteriormente, la obtención de un buen scFv depende de varios factores. Uno de los descritos, es la relacionada con el propio sistema de expresión y mientras que otro aspecto es la molécula. Varios estudios han demostrado que el orden de los dominios variables junto con la secuencias del péptido conector pueden influir significativamente en el rendimiento de los scFvs, en la estabilidad y la actividad funcional (Ayyar *et al.*, 2015; Kipriyanov *et al.*, 2003; Koerber *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2015).

JUSTIFICACIÓN

El scFv LR es un anticuerpo potencialmente útil para ser parte de un nuevo antiveneno, debido a su capacidad de neutralización de toxinas de venenos de alacranes. Como parte de su caracterización, resulta importante conocer el efecto del cambio en la orientación de los dominios variables del scFv. Este tipo de enfoque no se había realizado, dado que la construcción del banco a partir del cual se generó el scFv parental fue realizada con la orientación VH conector VL, que ha sido la más utilizada desde los inicios del despliegue en fagos de anticuerpos. Ahora nos interesa conocer si el cambio de la orientación de los dominios (VL-conector-VH) resulta ser más favorable para la molécula ya que este scFv podría formar parte de un antiveneno recombinante para ser empleado en humanos. Los resultados que se obtengan nos ayudaran a conocer cual resulta un mejor agente terapéutico.

HIPÓTESIS

El cambio en la orientación de los dominios VH y VL del scFv LR puede tener efectos sobre varias propiedades del fragmento de anticuerpo. La construcción y caracterización del scFv con orientación VL-VH permitirá estudiar tales efectos a nivel de expresión y estabilidad funcional de la proteína.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del cambio de la orientación de los dominios VH-VL del scFv LR a VL-VH en sus propiedades.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir el gen del scFv LR con orientación VL-VH.
- Expresar scFv LR VL-VH en la cepa TG1 de *E. coli*.
- Analizar y comparar las propiedades del scFv LR en las dos orientaciones.

CAPITULO 3. METODOLOGÍA

3.1 Construcción de scFv LR VL-VH

Para construir la versión del scFv LR con la orientación VL-VH se diseñaron dos pares de oligonucleótidos para la amplificación de cada fragmento que incluyen los sitios de restricción (*Sfi* I y *Not* I) y la secuencia del conector:

Para el dominio Ligero:

K6Sfi (5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CC-3')

JK4.Link (5'- CCA CCA GAA CCT CCG CCT CCT GAT CCG CCA CCT CCT ACG TTT GAT CTC CAC CTT GGT CCC-3')

Para el dominio Pesado:

H3.Link (5'-GGC GGA TCA GGA GGC GGA GGT TCT GGT GGA GGT GGG AGT GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG-3')

JH3.Not (5'-GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC TGA AGA GAC GGT GAC CAT TGT CCC-3')

3.2 Amplificación de los dominios

Las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usadas para la amplificación de cada dominio fueron un primer ciclo de desnaturalización a 94 °C por 5 min; 30 ciclos de amplificación (94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min y 72 °C por 1 min); y un paso final de extensión 72 °C por 7 min. Amplificando por separado cada dominio con su par de oligonucleótidos correspondientes; VL (K6Sfi con JK4.link) y VH (H3.Link con JH3.Not)

Se corroboró la correcta amplificación de cada dominio mediante electroforesis en gel analítico de agarosa y el producto de PCR se purificó mediante electroforesis usando un gel preparativo de agarosa al 1 %. Las bandas correspondientes a los dos dominios fueron cortadas y posteriormente procesadas con el kit comercial *High*

Pure PCR Product Purification (Roche). Se corroboró la purificación de los fragmentos de VL y VH y se estimó la concentración de ADN.

3.3 Empalme en la nueva orientación

Con los dos productos anteriores, se realizó el empalme del scFv en orientación VL-VH usándose: Buffer de PCR 10x 10 µL; MgCl₂ (25 mM) 6 µL; dNTPs 2 µL (10 nM); Dominio VH (300 ng); Dominio VL (300 ng), Taq-polimerasa (1 µL de 5 U/µL); H₂O *mQ* estéril (csp 100 µL).

Las condiciones de la reacción de amplificación (PCR) usadas fueron; un primer ciclo de desnaturalización a 94 °C por 5 min; 7 ciclos de empalme (94 °C por 1 min, 64 °C por 1.5 min y 72 °C por 1 min) sin la adición de oligonucleótidos; y luego con los oligonucleótidos K6Sfi y JH3.Not, 30 ciclos de amplificación (94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 1 min) y un paso final de extensión a 72 °C por 7 min.

Se confirmó el ensamble de los dominios mediante electroforesis en gel analítico de agarosa, y se purificó el producto de PCR en gel preparativo de agarosa.

3.4 Digestión

El producto de PCR purificado fue digerido con la enzima Not I (*New England Biolabs, Beverly MA. USA*) (80 µL ADN; 2 µL enzima Not I; 9 µL buffer 3.1) durante toda la noche a 37 °C. Se purificó la primera digestión mediante el kit *High Pure PCR Product Purification* (Roche). Se realizó la segunda digestión usando la enzima Sfi I (80 µL ADN; 2 µL enzima Sfi I; 9 µL buffer Smart-Cutter) incubado a 50 °C por al menos 6 horas.

Paralelamente, el vector de expresión pSyn1 fue digerido con las mismas enzimas y condiciones.

3.5 Ligación

Se colocó una reacción de ligación usando el vector pSyn1 (**Figura 6**) doblemente digerido con Not I y Sfi I (0.5 µL vector pSyn1 (50 ng); 5 µL del inserto (50 ng); 1 µL

Buffer de ligasa; 0.5 µL de ligasa T4 y 2 µL de agua) y se incubó durante la noche a 4 °C.

3.6 Transformación

Se usaron 60 µL de células electrocompetentes de *E. coli* TG1 para ser transformadas con 5 µL de la ligación, en celdas de 1 mm y un pulso de 1.8 mA. Las células fueron recuperadas con 1 ml de medio YT2X e incubadas colocadas a 37 °C por 1 hora. Posteriormente se platearon 10 µL, 50 µL, 200 µL y el resto (~740 µL) en placas Petri con medio sólido YT2X (Glucosa 2 %; Amp. 200 µg/ml) y se incubaron toda la noche a 37 °C. A partir de las colonias aisladas se realizó PCR de colonia para corroborar la correcta construcción de 850 pb del gen de LR VL-conector-VH presente en el plásmido de las células recuperadas en el medio de selección con ampicilina. De las colonias positivas se recuperó el ADN plasmídico para confirmar la construcción mediante secuenciación. Para ello el material fue enviado a la unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología-UNAM, usando el oligonucleótido Dir (5'-ATA CCT ATT GCC TAC GGC-3')

3.7 Expresión de las construcciones en ambas orientaciones

El ADN de cada construcción de LR en las dos orientaciones verificadas fue usado para transformar de forma independiente células electrocompetentes de *E. coli* TG1 (**Anexos. Protocolos**). Las células recuperadas en medio sólido YT2X (Glucosa 2%; Amp. 200 µg/ml) se usaron para hacer los respectivos preinóculos en 3 ml de medio YT2X (Glucosa 2%; Amp. 200 µg/ml); los cuales fueron incubados toda la noche a 37°C. Posteriormente, cada preinóculo fue colocado en un matraz con 500 ml de medio YT2X (Glucosa 0.1 %; Amp. 200 µg/ml). La inducción se realizó a la densidad óptica determinada por la longitud de onda de 600nm ($D.O_{600\text{ nm}} = 0.9$) agregando IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1 mM. Los cultivos se incubaron a 30 °C por 4 horas a 150 rpm (Riaño-Umbarila *et al.*, 2005a).

3.8 Extracción periplásmica

Pasadas las 4 horas de incubación, los cultivos inducidos fueron centrifugados por 15 min, 4000 rpm a 4 °C. El sobrenadante fue desechado y el pellet celular fue resuspendido en 15 ml de buffer PPB (sacarosa 20%; EDTA 1 mM; Tris-HCl 30mM) y se incubó por 20 min en hielo. Posteriormente, se centrifugó la muestra por 15 min a 10,000 rpm a 4°C. El sobrenadante se recuperó y nuevamente se resuspendió el pellet en 15 ml de una solución de MgSO_4 5 mM y se incubó por 20 min en hielo. Posteriormente, se centrifugó por 15 min a 10,000 rpm a 4°C recuperando nuevamente el sobrenadante. Los 2 sobrenadantes de cada construcción, recuperados fueron mezclados y dializados dos veces en PBS 1 X a 4°C.

3.9 Purificación por afinidad a níquel

Los sobrenadantes dializados fueron pasados a través de una columna empacada con 1 ml de resina de níquel agarosa (Ni-NTA) (una columna por cada construcción), la cual fue equilibrada con imidazol 20 mM. Los sobrenadantes fueron pasados 2 veces por la columna. Un lavado fue realizado con 5 ml de imidazol 35 mM. Finalmente, se eluyeron las proteínas con 700 μL de imidazol 250 mM.

3.10 Purificación por exclusión molecular

Usando una columna Superdex 75 (Amersham Biosciences UPC 900), acoplada a un equipo de FPLC (Ackta) a un flujo de 0.5 ml/min de PBS 1x se purificaron los imidazoles de las muestras recuperadas de la columna por afinidad a níquel. Los scFv una vez purificados, fueron cuantificados por espectrofotometría ($\lambda = 280 \text{ nm}$) y realizando las estimaciones usando el coeficiente de extinción molar del scFv LR (37150).

Los detalles de los protocolos pueden encontrarse en **Anexos. Protocolos.**

3.11 Evaluación preliminar del reconocimiento en biosensor de interacciones moleculares BIACORE a Cn2

El equipo Biacore (Biosensor Biacore X, Uppsala, Suecia) permite determinar las interacciones en tiempo real que ocurren entre un ligando y un analito (toxina y scFv, en este caso, respectivamente), siendo el primero inmovilizado en una superficie sólida (Chip). Cada evaluación se realiza usando una determinada concentración de anticuerpo, la interacción es registrada inmediatamente por un detector y transducida a una curva de interacción. Dicha curva es denominada sensograma, en donde se pueden distinguir dos fases: una de asociación, la cual representa la unión al receptor inmovilizado (toxina) que depende de la concentración del ligando (scFv) y del tiempo. La otra fase es de disociación, la cual corresponde a la velocidad con la que se pierde la unión entre el scFv y la toxina y solo depende del tiempo.

El comportamiento ideal para un scFv de alta afinidad como lo es el scFv LR (K_D 5×10^{-11} M) es que una vez que se une a la toxina inmovilizada, este sea capaz de mantenerse unido el mayor tiempo posible. Este comportamiento es fácil de identificar por que la curva de la fase de disociación tiene una pendiente mínima. Inicialmente, la idea fue determinar los parámetros cinéticos de la interacción las constantes de asociación y disociación de las moléculas, donde se requieren realizar al menos 6 evaluaciones o 6 curvas a diferentes concentraciones.

3.12 Análisis de la actividad funcional en presencia de un agente desnaturante

Las proteínas en las dos orientaciones del scFv LR a una concentración de 100 nM fueron incubados en presencia de un agente desnaturante (cloruro de guanidinio); a concentraciones de 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25 y 1.5 M por 12 horas a 37 °C usando PBS 1x como diluyente. Posteriormente las muestras fueron inyectadas en el equipo BIACORE X con PBS 1x bajo un flujo de 50 μ L/min y a una temperatura de 25 °C usando el chip con la toxina Cn2 (300 RU). El nivel de reconocimiento de cada tratamiento fue comparado con el control (0 M).

3.13 Efecto de la temperatura en la actividad funcional

Las muestras de proteína del scFv LR en ambas orientaciones, a una concentración de 100 nM fueron incubadas por 1 hora a las temperaturas: 4 °C, T.A. (Temperatura ambiente ~24 °C), 40 °C, 50 °C, 60 °C y 70 °C usando buffer del Biacore (HBS-EP) como diluyente y fueron inyectados en el equipo BIACORE con buffer HBS-EP (Biacore, General Electric) a un flujo de 50 µL/min y a una temperatura de 25 °C usando el chip con la toxina Cn2 (300 RU). El nivel de reconocimiento de cada tratamiento fue comparado con el control (4 °C).

3.14 Ensayos de neutralización

Grupos de ratones hembra de la cepa CD1 con un peso entre 18-20 g fueron ocupados en este ensayo; las inyecciones se realizaron vía intraperitoneal. La prueba consistió en evaluar la capacidad neutralizante del scFv LR en ambos formatos sobre la toxina Cn2 del alacrán *Centruroides noxius*; LR en su orientación original (VH-VL) y la generada (VL-VH) que será llamada **Construcción 4**. Se emplearon 5 grupos de 4 ratones; un grupo control fue inyectado con 2 DL₅₀ de la toxina Cn2.

El grupo 1 fue inyectado con una mezcla de 2 DL₅₀ de la toxina Cn2 y el scFv LR a una relación molar 1:2 respectivamente. Antes de ser inyectada, la mezcla se dejó incubando por 30 min a temperatura ambiente y en agitación. La mezcla se administró en cada ratón ajustando el peso de cada ratón a razón de 100 µL, por 20 g de ratón. Al grupo 2 le fue administrada una mezcla de 2 DL₅₀ de la toxina Cn2 y el scFv LR en una relación molar 1:2 respectivamente y siguiendo el mismo procedimiento del grupo 1.

Al grupo 3 y el grupo 4 fue administrado con una mezcla de 2 DL₅₀ de la toxina Cn2 y el scFv LR y 4 respectivamente, a una relación molar 1:1 siguiendo el mismo procedimiento de administración que el grupo 1.

Los ratones fueron observados tras la inyección y se monitorearon sus síntomas.

CAPITULO 4. RESULTADOS

Para determinar el efecto del cambio en la organización de los dominios del scFv LR, inicialmente se construyó el gen que codifica para el scFv en orientación VL-VH, posteriormente se expresó y caracterizó como se describe a continuación.

4.1 Construcción del gen en orientación VL-VH de LR

El cambio de la orientación de los dominios se realizó mediante la amplificación por PCR de los dominios VH y VL con oligonucleótidos diseñados para tal fin (*ver Metodología*). A partir del ADN que codifica para el scFv LR original, primero se amplificó el segmento que codifica para el dominio variable de la cadena ligera en el cual se incorporó un sitio de restricción para Sfi I y en el extremo correspondiente a la zona que codifica para el extremo carboxilo de este dominio, se incorporó la secuencia que codifica para la mitad del péptido conector. El segmento que codifica para el dominio variable de la cadena pesada se amplificó incluyendo la secuencia que codifica para la otra mitad del péptido conector y la secuencia que codifica para sitio de restricción Not I.

En la **Figura 3** se puede observar el producto de la amplificación y correspondencia de los pesos moleculares esperados, en el caso de la ligera se encuentra alrededor de los 400 pb, mientras que la pesada se observa alrededor de los 450 pb.

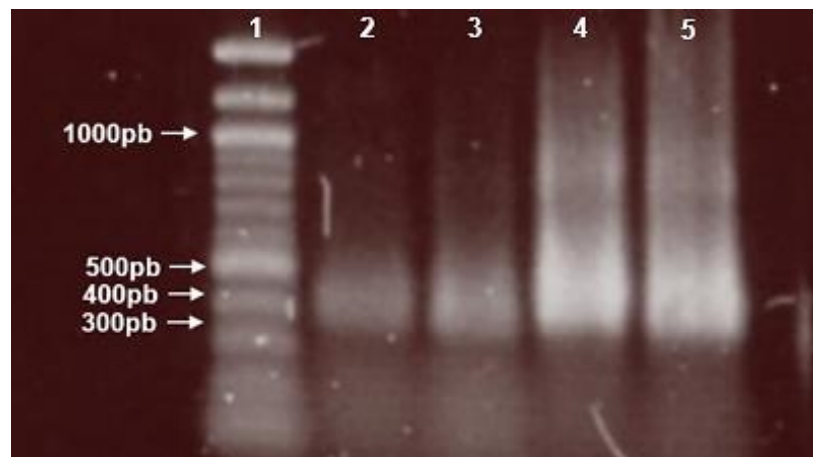


Figura 3. Amplificación de los dominios. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2-3: Dominio ligero (VL), Carril 4-5: Dominio pesado (VH) (Autoría propia).

Con el producto de PCR puro de los dominios VL y VH se realizó una segunda reacción de PCR de empalme, la región del conector se forma gracias a la hibridación de las bases del final del dominio VL y al inicio del dominio VH. En la **Figura 4** se observa la banda de 800 pb. correspondiente al inserto del tamaño esperado producto del ensamble correcto.

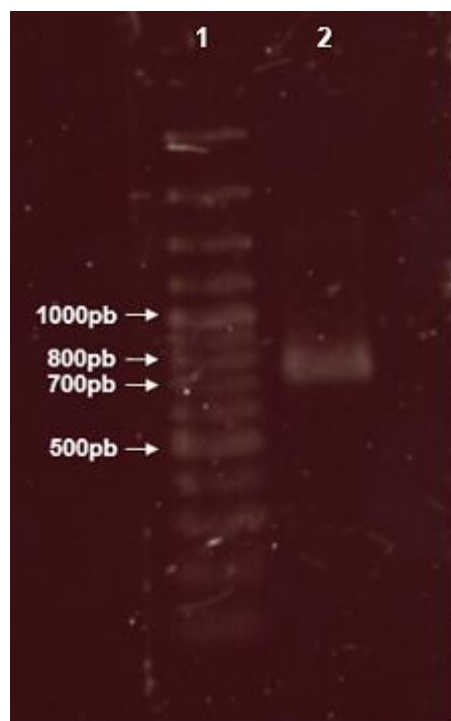


Figura 4. Empalme de los dominios VL y VH; Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2-Empalme (Autoría propia).

De la manera previamente descrita, se purificó el producto empalmado, y se digirió con las enzimas de restricción Not I y Sfi I en procesos independientes de digestión. El inserto fue ligado al vector de expresión pSyn1 (**Figura 6**) que fue previamente digerido con las mismas enzimas de restricción y purificado. Una vez que la construcción fue ligada en el vector de expresión, se usó para transformar células electrocompetentes de *E. coli* TG1. Las células transformadas se recuperaron en cajas con medio sólido para obtener colonias aisladas, lo que permitió la evaluación individual mediante PCR de colonia. En la **Figura 5** se muestra el corrimiento del producto de PCR de 9 colonias donde se confirmó la presencia de la construcción (tamaño de 800 pb) en todas las colonias.

De estas 9 colonias positivas se eligieron dos al azar, de las cuales se purificó plásmido (**ver Metodología**) y el ADN fue secuenciado. De esta manera se pudo confirmar la correcta construcción del scFv LR VL-VH (**Construcción 4**).

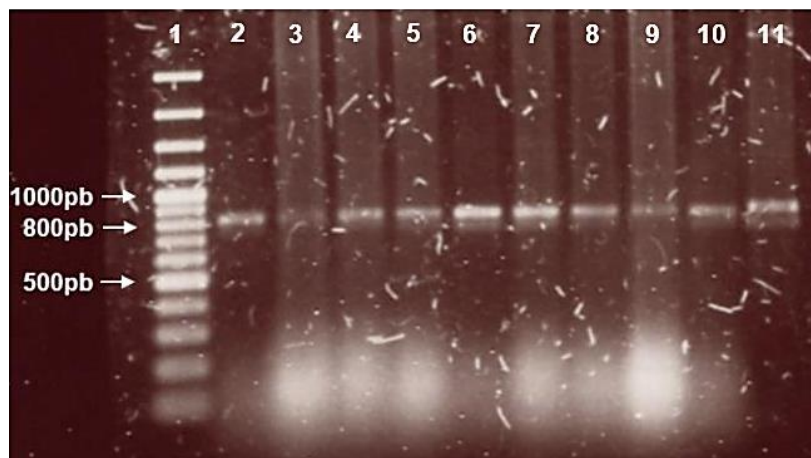


Figura 5. Gel de la PCR de las colonias de *E. coli* transformadas; Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2-10: Colonias Transformadas, Carril 11: Control Positivo (Autoría propia).

4.2 Caracterización

4.2.1 Expresión

Las construcciones del scFv LR (VH-VL) y 4 (VL-VH) fueron expresados en *E. coli* TG1 siguiendo el mismo protocolo descrito en la sección de Metodología. El vector pSyn1 tiene un promotor Lac es cual es reprimido por la presencia de glucosa e inducido en presencia de IPTG. La secuencia de cada anticuerpo esta precedida de la secuencia que codifica para el Pel B, que es péptido que dirige a la proteína sintetizada al periplasma de *E. coli*, donde se corta y se libera la proteína del scFv para ser plegada correctamente en las condiciones oxidantes, que le permiten formar los puentes disulfuro intradominio. Por esta razón, se espera que la proteína recuperada sea totalmente funcional, cosa que no pasaría si se recupera del citoplasma bacteriano. El vector pSyn1 también permite la fusión del scFv a una etiqueta C-myc, en el caso de que se requiera ser identificada mediante anticuerpos y una marca final de 6 histidinas que permiten su purificación mediante la unión a níquel.

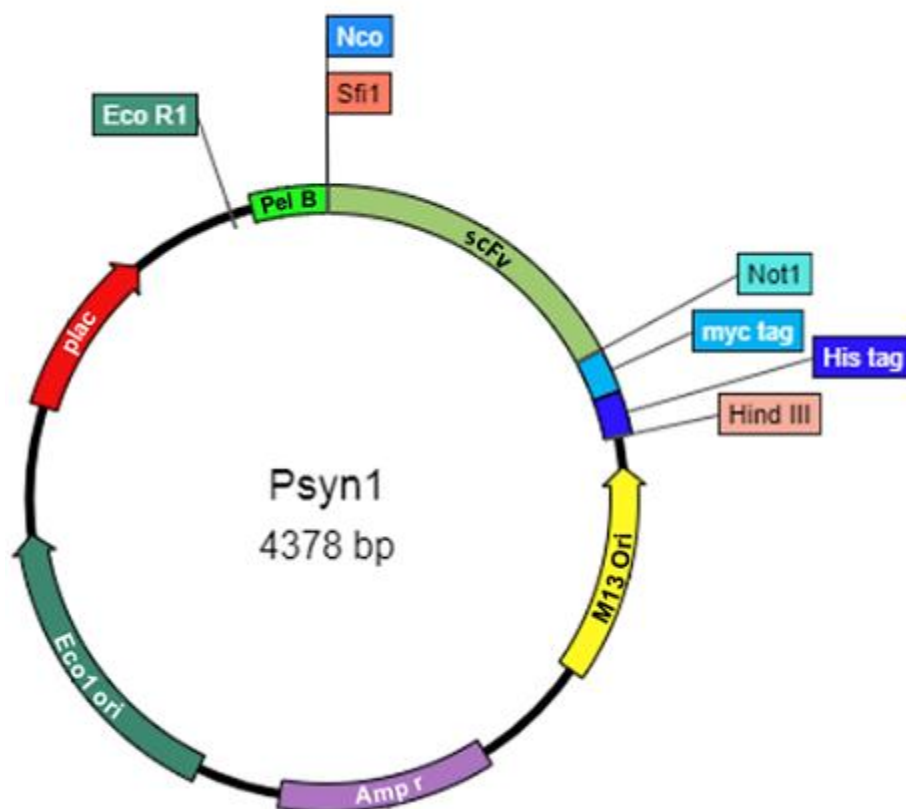


Figura 6. Vector de expresión pSyn1.

La proteína soluble recuperada de la extracción periplásmica (**ver 3.8**), se purificó por cromatografía de afinidad a una columna de Ni-agarosa y de ahí fue sometida a un último proceso de purificación por exclusión molecular por medio de FPLC. En la **Figura 7** se muestran los cromatogramas resultantes de la purificación.

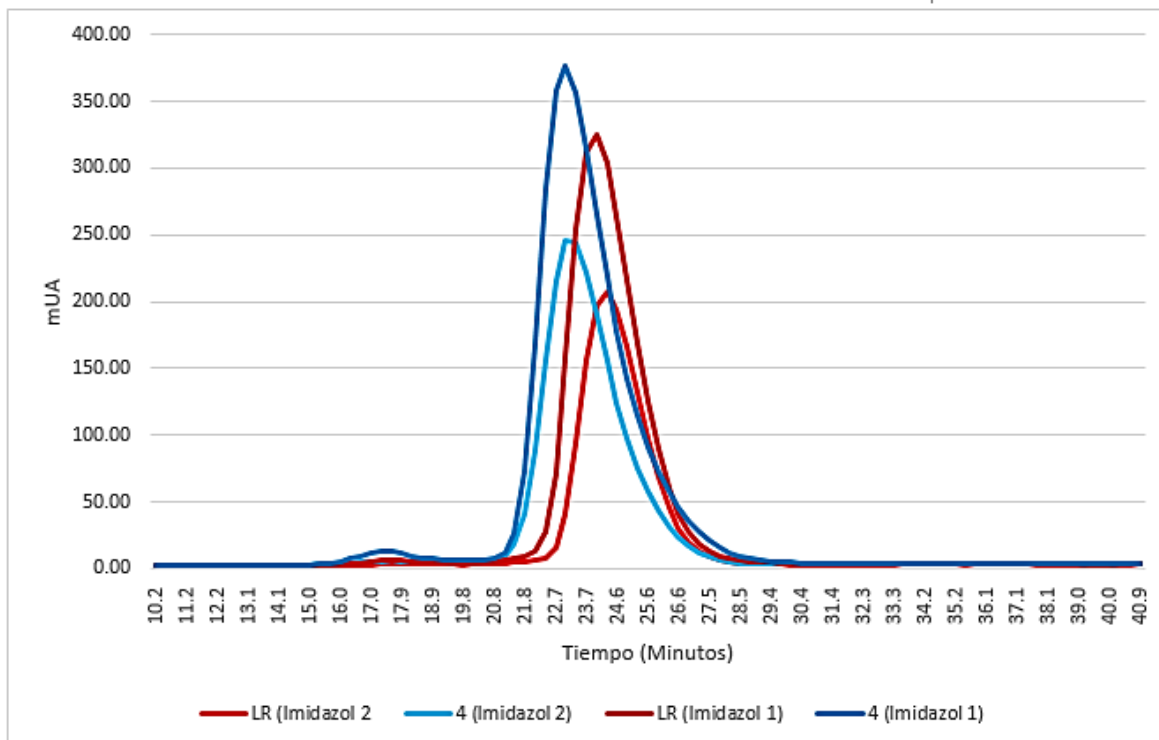


Figura 7. Cromatogramas superpuestos de la purificación de los scFv LR y 4 a un flujo de 0.5 ml/min de PBS 1X. La recuperación del pico de elución de los scFv LR y 4 fueron a los tiempos 24 y 23 min respectivamente (Autoría propia).

En la **Figura 7** se comparan los cromatogramas de la purificación por exclusión molecular de las proteínas del scFv LR en ambas orientaciones. En todos los casos se recuperó un pico principal bien definido, lo que llama la atención es la diferencia en los tiempos de retención, ya que para LR (VH-VL) fue de 24 min mientras que para 4 (VL-VH) fue de 23 min. Teniendo en cuenta los principios de la exclusión molecular esto podría implicar que la construcción del scFv 4 es de mayor tamaño que LR y en realidad se espera que sean del mismo tamaño. Ante esta duda, las muestras fueron cuantificadas y analizadas por medio de espectroscopía de masas (análisis realizado por el Dr. Fernando Zamudio IBT-UNAM). Los valores de las masas fueron similares al teórico (27948.8 Da) tal como se esperaba, siendo de 27941.4 para el parental LR y de 27942.56 Da para el scFv 4. Las variaciones de los tiempos de retención no están relacionadas con la masa, estas pueden estar

relacionados con el plegamiento y/o empaquetamiento de las proteínas como se discutirá más adelante.

Para establecer los niveles de expresión para las dos construcciones, se realizaron tres ensayos independientes de expresión y recuperación de los scFv. En la **Tabla 3** se resume el rendimiento de cada uno de los ensayos. En todos los casos la expresión de la proteína de la Construcción 4 fue mayor comparado con la expresión de la proteína del scFv LR.

		Rendimiento Ensayo 1	Rendimiento Ensayo 2	Rendimiento Ensayo 3	PROMEDIO	DESV. EST.
scFv	LR	3.198 mg	3.16 mg	4.5 mg	3.619 mg	0.762
	4	4.012 mg	4.835 mg	6.1 mg	4.982 mg	1.051

Tabla 3. Rendimiento calculado para cada construcción por litro de cultivo.

4.3 Evaluación de la actividad Funcional

4.3.1 Reconocimiento: BIACORE

La primera evaluación en Biacore consistió en verificar el reconocimiento del scFv LR (VH-VL) y compararlo con el nivel de reconocimiento de la construcción 4 (VL-VH) a la misma concentración de proteína (10 y 25 nM). Los sensogramas de reconocimiento de las dos construcciones contra la toxina Cn2 (**Figura 8**) muestran que la orientación VL-VH tiende a asociarse más que la orientación original VH-VL, sin embargo, el comportamiento en la fase de disociación es similar entre ellas (casi líneas paralelas). Este resultado muestra que el reconocimiento del scFv 4 por la toxina Cn2, no se pierde y del igual forma el tipo de interacción no se ve alterado de manera drástica por el cambio en la orientación de los dominios.

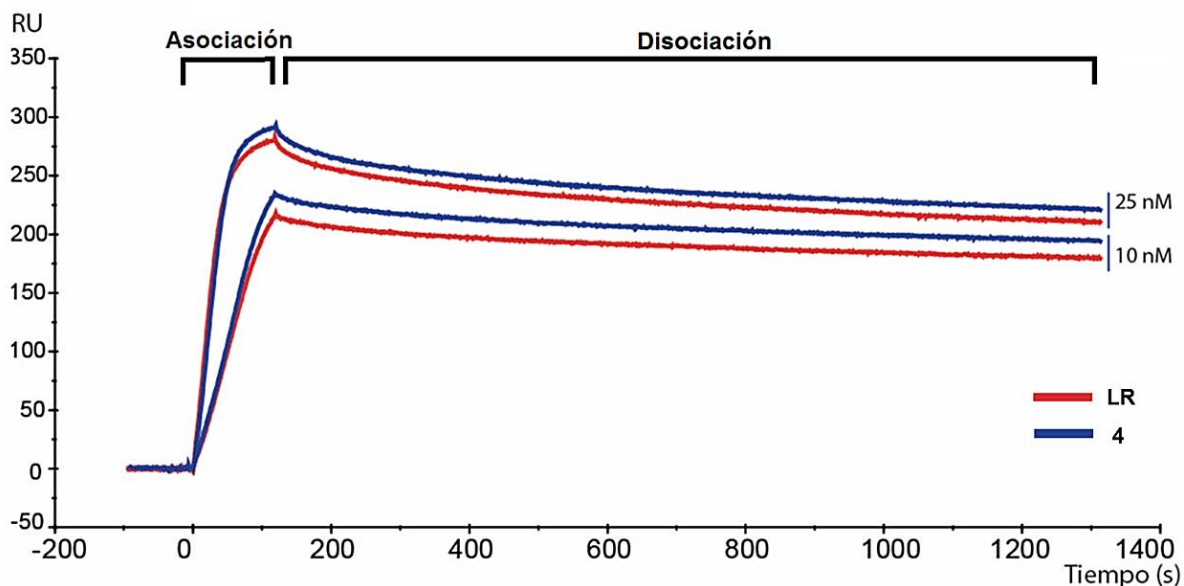


Figura 8. Sensogramas de reconocimiento a Cn2 del scFv LR y la construcción 4. Evaluados a las concentraciones indicadas. Las mediciones se realizaron a 25 °C, aplicando un flujo de 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ (Autoría propia).

Posteriormente, se intentó realizar una determinación preliminar de la afinidad de cada construcción por la toxina Cn2, realizando varias inyecciones de los scFv a diferentes concentraciones. Los sensogramas (**Figuras 9 y 10**) obtenidos fueron analizados en el programa BiaEvaluation 3.1, desafortunadamente el equipo, no cumplió con los parámetros óptimos de calibración, por lo que la determinación de la afinidad no pudo concluirse; aunque se espera que la afinidad del scFv 4 sea similar a la del scFv LR que fue reportado previamente $5 \times 10^{-11} \text{ M}$ (Riaño *et al.*, 2011).

Del conjunto de curvas podemos ver que ambas orientaciones de scFv se comportan de manera muy similar. Algunas diferencias pueden apreciarse solamente en la primera fase, correspondiente a la fase de asociación donde el scFv 4 parece reconocer sutilmente más a la toxina Cn2. Mientras que en la fase de disociación parecen mostrarse de forma similar, (ya que son prácticamente paralelas) con una mínima pérdida de la asociación entre el analito (scFv) y el ligando inmovilizado (toxina Cn2).

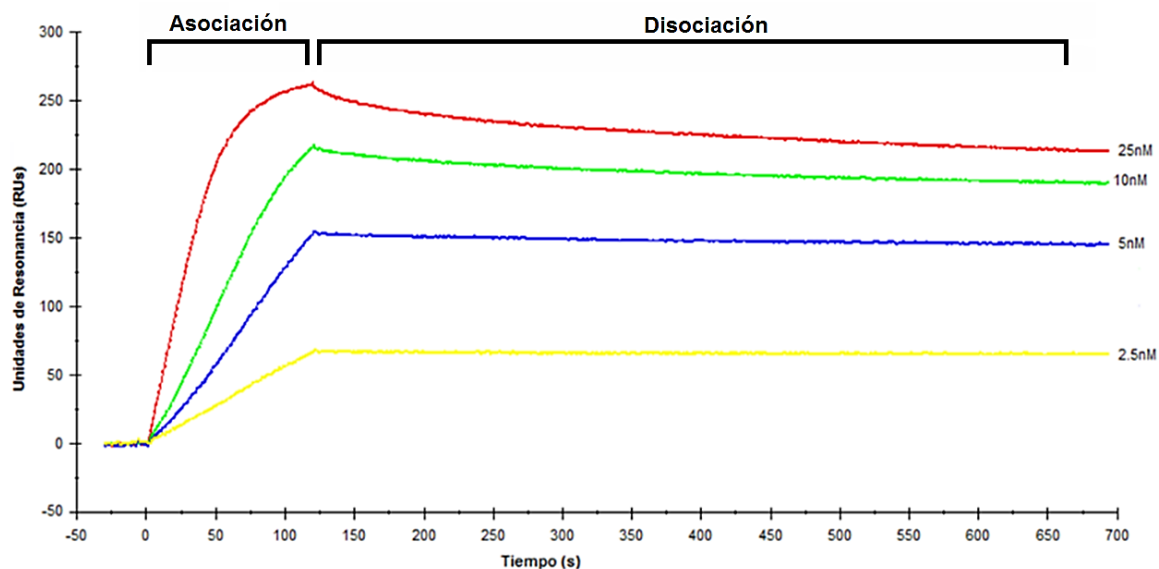


Figura 9. Sensograma de unión del scFv LR a la toxina Cn2 en BIACORE. Las mediciones se realizaron a 25 °C, aplicando un flujo de 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ (Autoría propia).

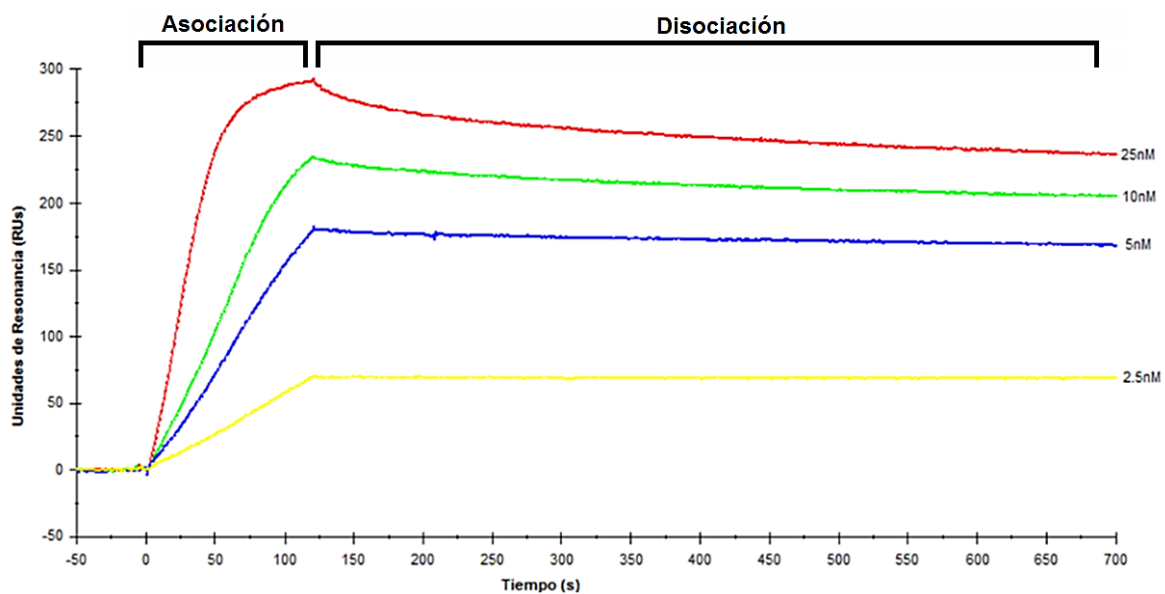


Figura 10. Sensograma de unión del scFv 4 a la toxina Cn2 en BIACORE. Las mediciones se realizaron a 25 °C, aplicando un flujo de 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ (Autoría propia).

Una vez que se determinó que las dos construcciones reconocen de manera similar a la toxina Cn2 se decidió evaluar el reconocimiento en frente a otros factores como fueron el efecto de un agente desnaturizante y temperatura para identificar si hay diferencias entre ellos.

4.3.2 Actividad funcional en presencia de un agente desnaturante

Siguiendo el protocolo descrito se determinó el nivel de reconocimiento de los scFv hacia la toxina Cn2 sin cloruro de guanidinio en el Biacore midiendo las unidades de resonancia (RU) que corresponden al 100 % de reconocimiento. Simultáneamente se comparó con los valores obtenidos de las muestras los scFv incubados a diferentes concentraciones de cloruro de guanidinio a 37 °C toda la noche; lo que nos permitió comparar la actividad funcional en las condiciones mencionadas. La gráfica obtenida, nos muestra cómo se modifica la interacción de los scFv con la toxina Cn2 en presencia del cloruro de guanidinio (**Figura 11**).

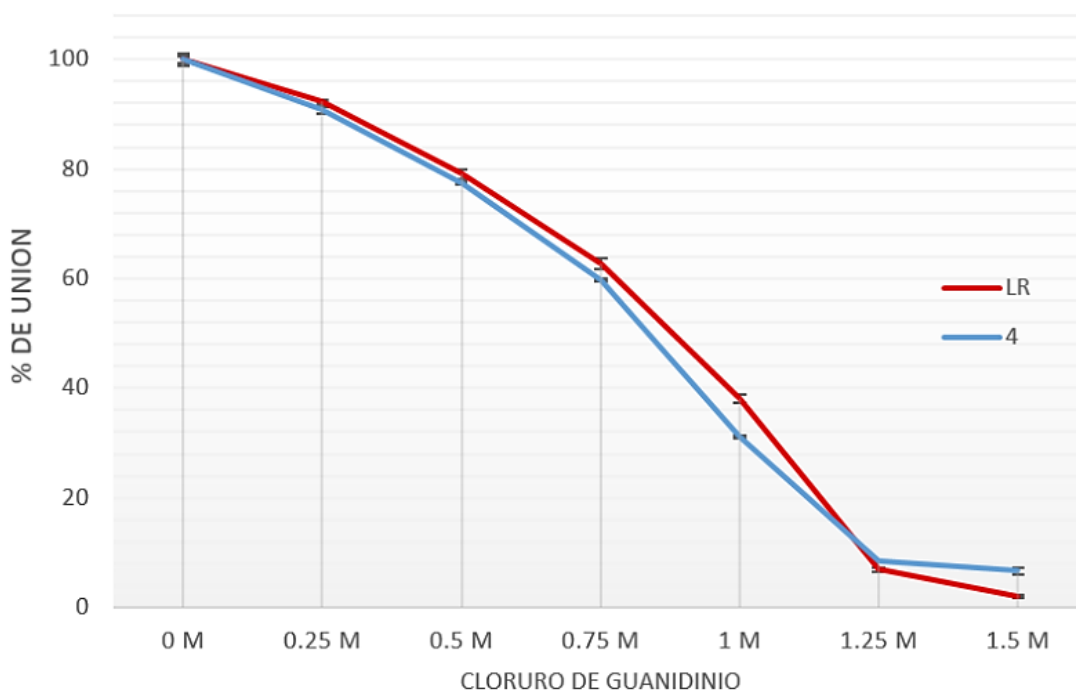


Figura 11. Estabilidad del scFv en ambos formatos ante la presencia de cloruro de guanidinio determinado en BIACORE. Las mediciones se realizaron a 25 °C, aplicando un flujo de 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ por triplicado, mostrándose también la desviación estándar (Autoría propia).

El resultado fue muy interesante ya que los dos anticuerpos se comportan de manera similar, sin embargo, LR en la mayoría de las condiciones mostró un reconocimiento ligeramente superior que la construcción 4 a excepción de la última concentración.

4.3.3 Actividad funcional en diferentes temperaturas

Se evaluó la capacidad de reconocimiento de los scFvs LR y 4 después de ser sometidos a diferentes temperaturas durante 1 hora, el efecto de la temperatura en el reconocimiento de la toxina Cn2 se evaluó en el Biacore. Para ello se determinó el nivel de reconocimiento (medido como RUs), de cada scFv a un tiempo fijo (120s). En este caso las muestras no tratadas, fueron los scFv almacenados a 4 °C los cuales muestran el 100 % de reconocimiento a la toxina Cn2 (**Figura 12**).

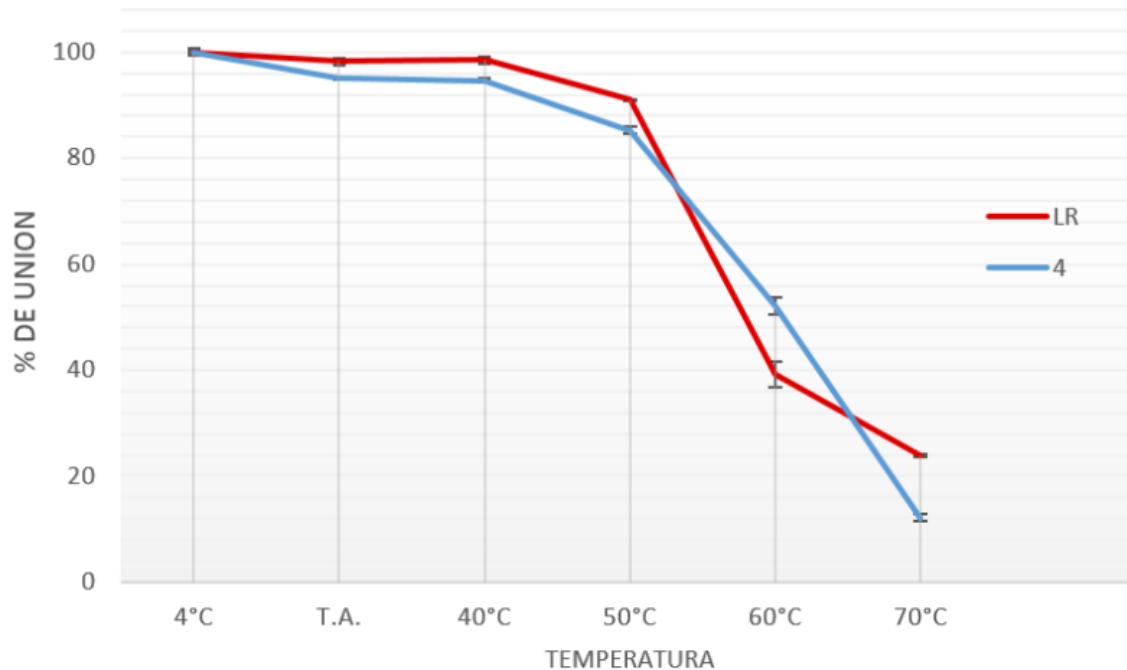


Figura 12. Estabilidad del scFv en ambos formatos ante diferentes temperaturas, determinado en BIACORE. Las mediciones se realizaron a 25 °C, aplicando un flujo de 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ por triplicado, mostrándose también la desviación estándar (Autoría propia).

El resultado muestra que el efecto de la temperatura en el reconocimiento por la toxina Cn2 es similar entre las dos orientaciones de los scFv, en algunas temperaturas (**Figura 12**) LR presenta un mayor porcentaje de interacción con la toxina Cn2, algo similar a lo observado en presencia de cloruro de guanidinio.

4.4 Actividad biológica

Teniendo en cuenta que el scFv LR fue generado para ser neutralizante de toxinas de alacranes (Riaño-Umbarila et al., 2011), se decidió evaluar la capacidad neutralizante del scFv 4 y compararla con la del scFv LR. Para ello, la prueba se realizó en ratones CD1, los cuales fueron inyectados por vía intraperitoneal con 2 DL₅₀ de toxina Cn2 o con una mezcla de toxina y anticuerpo. Todos los ratones tratados con LR en ambas orientaciones sobrevivieron y no se observaron síntomas de intoxicación. Mientras que en el grupo control 3 ratones murieron y uno sobrevivió; todo el grupo control presento síntomas graves de intoxicación (**Tabla 4**).

scFv	Toxina 2DL ₅₀	Sobrevivientes [Relación Molar (Toxina:scFv)]	
		1:2	1:1
LR	Cn2	4/4	4/4
4	Cn2	4/4	4/4
Control	2DL₅₀	Sobrevivientes	
	Cn2	1/4 ^a	

Tabla 4. Prueba de neutralización con 2DL₅₀ de la toxina Cn2. Presencia e intensidad de los síntomas de intoxicación: **a**, síntomas graves (contracciones abdominales, movimientos incontrolados, parálisis casi total en patas, salivación y dificultad respiratoria presentes en el control).

Por el buen nivel de protección, se decidió disminuir la relación molar de toxina: anticuerpo, 1 a 1, siendo más drástica la condición, lo interesante es que las dos orientaciones LR (VH-VL) y 4 (VL-VH) protegen de igual forma, y solo se observó algunos síntomas de incomodidad de los ratones, sin ser evidente los síntomas de intoxicación.

CAPITULO 5. DISCUSIÓN

El scFv es una proteína artificial, que permite el ensamble de los dominios VH y VL de un anticuerpo en una sola unidad polipeptídica, la cual requiere para su conformación de un proceso acoplado de plegamiento y asociación de los dominios (Tan *et al.*, 1998). Cada dominio de inmunoglobulinas se pliega en una estructura secundaria tipo β -sándwich, y la formación de la región Fv depende de la correcta interacción de los residuos ubicados en la interfase de cada dominio. Estos aspectos determinarán las propiedades de cada construcción (Rees *et al.*, 1994; Wörn & Plückthun, 2001).

Los scFvs pueden ser obtenidos a partir de anticuerpos monoclonales o de bibliotecas de scFvs. Es importante reiterar que el scFv LR (motivo de este trabajo) fue generado mediante varios procesos de evolución dirigida y de la combinatoria de cambios del scFv humano 3F. Esto permitió lograr que el scFv LR neutralizara a las toxinas Cn2 y Css2 de los venenos de los alacranes *C. noxius* y *C. suffusus* (Riaño-Umbarila *et al.*, 2011).

La finalidad de este trabajo fue determinar si el cambio en la orientación de los dominios variables modifica las propiedades del scFv LR, esto basados en algunos trabajos que reportan incrementos en el nivel de expresión, reconocimiento, actividad biológica y estabilidad. Por ejemplo, en el trabajo realizado por Ayyar *et al.*, 2015 donde cambiaron la orientación de los dominios VH y VL en un scFv de conejo, los resultados revelaron que es posible mejorar el nivel de expresión. Cheng *et al.*, 2015 en sus estudios demostraron las ventajas de invertir la orientación de VH-VL a VL-VH. Al evaluar las dos orientaciones los resultados mostraron que el cambio de orientación no tuvo mayores repercusiones en la estabilidad, capacidad de unión, pero si una eficacia protectora *in vivo* del scFv VL-VH. Algo similar ocurrió en la investigación realizada por Lu *et al.*, 2004 donde la disposición de los dominios VH y VL en diferentes orientaciones también mostro cambios sobre la expresión aunque si describe mejoras en la capacidad de unión al antígeno del scFv, así como una mejor estabilidad. También, hay varios trabajos como los reportados por Kipriyanov *et al.*, 2003; Koerber *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015 que por las

variaciones observadas nos acentúan la importancia de evaluar el efecto del cambio de la orientación de los dominios VH y VL como una vía para la optimización de la actividad funcional de los scFvs.

En la **Figura 13**, se esquematiza el efecto estructural del cambio en la orientación, donde se aprecia que básicamente es el conector el que se mueve de lugar, sin embargo, esto puede tener mayores implicaciones si consideramos, que la secuencia en si puede tener efectos a nivel de la transcripción, traducción y plegamiento de las proteínas (Bühler *et al.*, 2010).

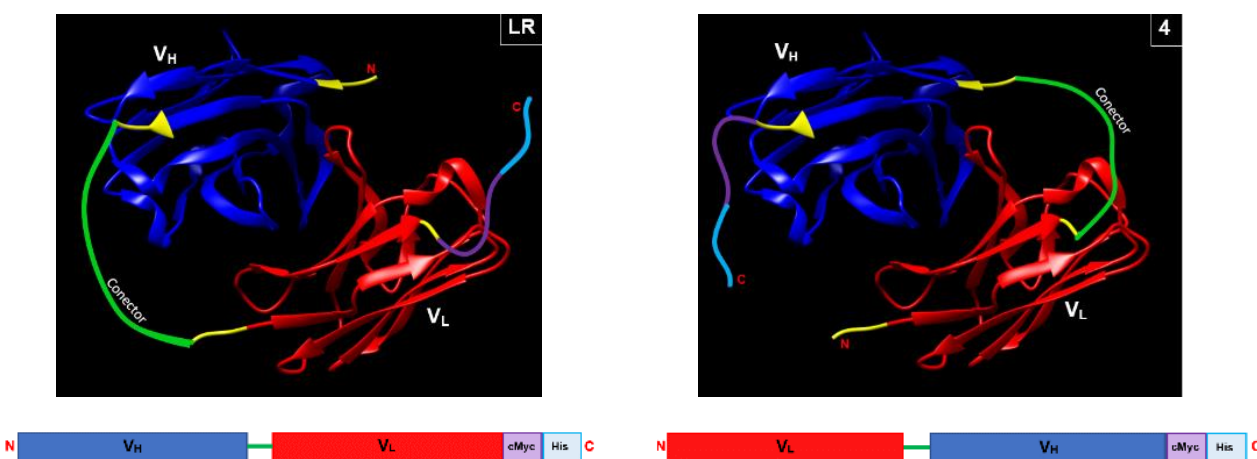


Figura 13. Representación en forma de modelo estructural y esquemática del scFv LR en dos orientaciones distintas. El dominio variable de la cadena pesada (VH) está representado en azul. El correspondiente a la cadena ligera (VL) está representado en rojo y el péptido que los mantiene unidos está indicado en verde. Los extremos amino (N) y carboxilo (C), están indicados con letras rojas (ChimeraX; Autoría propia).

Para comparar las propiedades del scFv neutralizante LR, en las dos posibles orientaciones de los dominios; VH-VL y VL-VH. A partir de LR se realizó la construcción del formato alternativo, el cual fue realizado exitosamente. El diseño de los oligonucleótidos permitió lograr la correcta de amplificación y empalme de los dominios en orientación VL-VH (**Figura 3 y 4**). Este inserto, fue ligado al vector de expresión pSyn1 (**Figura 6**) para la expresión de las proteínas. Posteriormente insertado en células de *E. coli* TG1 por electroporación. Y se confirmó por PCR de colonia y por secuenciación la obtención de la correcta construcción del scFv LR en la orientación VL-VH.

Para cada ensayo de expresión, se usaron los plásmidos con las construcciones en las dos orientaciones para transformar células electrocompetentes de *E. coli*. Las células fueron recuperadas y sembradas en medio sólido de selección (incubadas por 8 horas). A partir de las colonias frescas se hicieron los inóculos correspondientes. Este procedimiento continuo, en nuestra experiencia permite un mayor rendimiento de los scFv expresadas; en comparación con inóculos generados a partir de glicerolos o células almacenadas a 4 °C. Los procedimientos de expresión (**ver Metodología**) se realizaron de forma simultánea para las dos construcciones con la finalidad de mantener las mismas condiciones y periodos de incubación y extracción periplásmica. Lo anterior permite hacer una mejor comparación de la recuperación de las proteínas de las dos orientaciones.

Dentro de los pasos de purificación, el de afinidad a níquel es posible realizarlo pues la construcción posee una secuencia de 6 histidinas que facilitan la purificación mediante el uso de una resina de Ni-agarosa empacada en una columna. En la **Figura 14**, se describe el mecanismo de unión entre el Ni^{2+} y las histidinas; donde los residuos de histidina pueden unirse con el ion Ni reemplazando a las moléculas de agua unidas (líneas rojas). Posteriormente se utilizó imidazol para recuperar a la proteína.

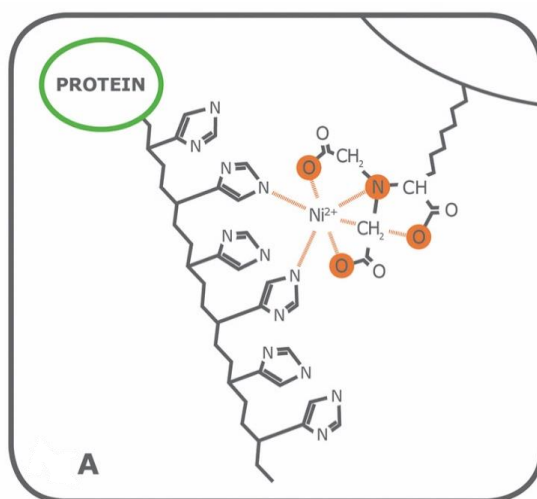


Figura 14: Ligando Ni-NTA unido covalentemente a una matriz de agarosa entrecruzada para la purificación selectiva de proteínas etiquetadas con una secuencia de poli histidina (Biotech, 2018).

Es importante resaltar que en la purificación mediante cromatografía de afinidad de Ni^{2+} se emplearon los mismos volúmenes de recuperación con el imidazol 250 mM, los cuales fueron sometidos a la exclusión molecular. Este último paso de purificación de los scFvs permitió observar diferencias respecto a niveles de expresión y tiempos de retención de las dos construcciones (**Figura 7**). Los cromatogramas resultantes de la purificación por FPLC, muestran el imidazol 1, que corresponde a la primera elución (donde se observa más proteína) y el imidazol 2, la segunda elución (menor cantidad de proteína). Para las dos construcciones se aprecia la recuperación de un pico principal, que corresponde a la forma monomérica (los dímeros de otras variantes de esta familia presentan tiempos de exclusión alrededor de los 19 min – comunicación personal grupo Dr. Becerril). Al comparar el nivel de expresión de las dos construcciones fue claro que la nueva construcción del scFv LR en orientación VL-VH (Construcción 4) presenta una mejor expresión (**ver Tabla 3**) con un rendimiento promedio de 4.9 mg en la orientación (VL-VH) comparada con la orientación original (VH-VL) de 3.6 mg. Estas variaciones en el rendimiento de la proteína ya se habían observado en algunos trabajos como (Yu-Jin *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2015).

Además de las diferencias a nivel de expresión, fue llamativo observar que las dos construcciones difieren en el tiempo de retención, mientras que la proteína del scFv VH-VL fue de aproximadamente 24 min, la proteína de VL-VH fue de 23 min. Como se mencionó en los resultados, la diferencia en el tiempo de retención no se debe a que presenten diferentes masas (**ver 4.21**). Esto sugiere, que la diferencia de los tiempos de retención puede estar relacionada con una mayor compactación de la molécula en la orientación VH-VL, mientras que la orientación VL-VH puede estar en una condición más relajada y de allí la razón que su tiempo de elución sea un minuto mayor.

El equipo Biacore X nos permitió analizar la interacción que ocurre entre un analito y un ligando (en este caso scFv y toxina) (**ver Metodología**). Fue muy importante establecer que la proteína en la nueva orientación mantuvo el reconocimiento por

su antígeno original. Los sensogramas de una buena interacción se caracterizan porque una vez que el scFv se une a su analito, es capaz de mantenerse unido el mayor tiempo posible (manteniendo así una curva con una mínima pendiente; línea casi horizontal) y por tanto una menor velocidad de disociación. Esta tendencia hacia la horizontalidad de la fase de disociación puede ser observado en los sensogramas de la **Figura 8**; mostrando que las construcciones tienen un comportamiento muy similar en cuanto al reconocimiento hacia la toxina Cn2, con una leve mejora en la asociación del scFv 4 a comparación del scFv LR a las mismas concentraciones de proteína. Si bien no fue posible determinar las constantes cinéticas de los scFvs, los resultados obtenidos nos aportan importante información acerca de los efectos favorables en la orientación de los dominios VL-VH en cuanto a expresión y reconocimiento.

Otra forma de observar si existen diferencias entre las dos construcciones es mediante la comparación del nivel de reconocimiento a la toxina Cn2 frente a un agente desnaturalizante. El resultado de este ensayo mostró un comportamiento o tendencia muy similar en la disminución del reconocimiento ante el aumento del agente desnaturalizante en los dos scFvs (**Figura 11**). En donde se puede observar que el trazo correspondiente al scFv 4 está ligeramente más abajo del scFv LR. Los ensayos por triplicado presentaron mostrando valores muy cercanos (desviaciones estándar muy pequeñas) lo que nos permite confirmar que los experimentos fueron realizados con precisión.

En cuanto a la evaluación de la estabilidad térmica (**ver metodología**) en la **Figura 12** el scFv LR fue levemente más estable y de forma general el comportamiento fue similar ya que al aumentar la temperatura en ambos casos (LR y 4) se disminuyó el reconocimiento por la toxina Cn2. A la temperatura de 50 °C aún se conservó hasta un 85 % de funcionalidad, condiciones a las que es poco probable que un fármaco sea expuesto, los dos formatos son igualmente interesantes.

Para evaluar la capacidad de neutralización de los scFv contra la toxina Cn2 se realizaron pruebas *in vivo* en ratones. Los resultados resumidos se encuentran en la **Tabla 4**; en donde se mostró que los scFv (LR y 4) neutralizan 2DL₅₀ de toxina Cn2, usando una relación molar 1:2 respectivamente (toxina:scFv). La supervivencia fue del 100 % de los sujetos en ambas orientaciones del scFv LR. Estos resultados nos motivaron a realizar una prueba más drástica; reduciendo a la mitad la relación molar del scFv, a 1:1. Las dos versiones del scFv LR lograron neutralizar la toxina en el 100 % de los individuos. En los dos casos los ratones protegidos después de dos horas mostraron un comportamiento normal.

Este resultado es importante para el scFv LR en sus dos versiones, ya que contrasta con el grupo control que presentó 75 % de mortalidad con las 2DL₅₀ de la toxina Cn2, y el animal que sobrevivió presentó el cuadro completo de síntomas graves de intoxicación, sobreviviendo posiblemente por una subestimación de la toxicidad de la toxina Cn2.

Básicamente el cambio de la orientación de los dominios no afecta las propiedades del scFv LR (excepto que en el nivel de expresión en *E. coli* fue mayor para la orientación VL-VH). Es probable que las pocas diferencias se deban a que el scFv LR fue madurado, presenta alta afinidad por la toxina Cn2 y que por las características individuales de los dominios variables que lo constituyen (VH3-VK3), hacen que la combinación sea también muy estable.

CAPITULO 6. CONCLUSIONES

El estudio realizado en la presente tesis muestra que el cambio en la orientación de los dominios variables del scFv LR no tuvo mayores repercusiones en las propiedades, es decir, no alteró la interacción con la toxina Cn2, ni su capacidad neutralizante. Sin embargo, el principal efecto favorable, se apreció en el mayor nivel de expresión del scFv 4 (VL-VH) en la cepa TG1 de *E. coli* comparado con la orientación original del scFv LR (VH-VL).

Este trabajo nos ha permitido conocer que las propiedades del scFv LR no tuvieron cambios drásticos por el cambio de orientación en los dominios variables. Estos resultados difieren con algunos reportados en la literatura donde las diferencias de la afinidad y la estabilidad son considerables (Bühler *et al.*, 2010; Kellmann *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2004).

PERSPECTIVAS

- Evaluar el comportamiento del scFv 4 con otras toxinas de los venenos de *C. suffusus* y *C. sculpturatos*, para conocer si el cambio de orientación tuvo algún efecto en el reconocimiento a otras toxinas.
- Determinar las constantes de afinidad de las dos construcciones contra las toxinas mencionadas.
- Realizar una prueba formal de estabilidad mediante calorimetría de barrido diferencial con el fin de determinar si existen diferencias entre los valores de T_m de las dos construcciones y si la capacidad replegarse está presente en la construcción en la orientación VL-VH, tal como ocurre con la orientación VH-VL (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2012).
- Para nuevos procesos de maduración se podría iniciar la construcción de bancos con esta orientación, de esta manera se tendría una ventaja de iniciar el proceso de una molécula monomérica que presenta buenos niveles de expresión en *E. coli*.
- Evaluar si la mejor expresión en orientación VL-VH, es exclusiva de *E. coli* o si al utilizar otro organismo como *P. pastoris* este patrón de expresión es diferente.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmad, I., Nawaz, N., Darwesh, N. M., ur Rahman, S., Mustafa, M. Z., Khan, S. B., & Patching, S. G. (2018). Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 144(November 2017), 12–18.
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.11.005>
- Ayyar, B. V., Arora, S., & Ravi, S. S. (2017). Optimizing antibody expression: The nuts and bolts. *Methods*, 116, 51–62.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.01.009>
- Ayyar, B. V., Hearty, S., & O’Kennedy, R. (2015). Facile domain rearrangement abrogates expression recalcitrance in a rabbit scFv. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(6), 2693–2703. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6268-4>
- Ban, B., & Blake, D. A. (2012). Recombinant Antibodies and Non-Antibody Scaffolds for Immunoassays. In *Advances in Immunoassay Technology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/35983>
- Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S. M., ... Whitlow, M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science (New York, N.Y.)*, 242(4877), 423–426.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.3140379>
- Bühler, P., Wetterauer, D., Gierschner, D., Wetterauer, U., Beile, U. E., & Wolf, P. (2010). Influence of Structural Variations on Biological Activity of Anti-PSMA scFv and Immunotoxins Targeting Prostate Cancer, 3380, 3373–3379.
- Cheng, Y., Li, Z., Xi, H., Gu, T., Yuan, R., Chen, X., ... Wu, Y. (2015). A V L - linker-V H orientation dependent single chain variable antibody fragment against rabies virus G protein with enhanced neutralizing potency in vivo. . *Protein & Peptide Letters*, 23(1), 24–32.
<https://doi.org/10.2174/0929866522666151026122752>
- Chippaux, J. P., & Goyffon, M. (2008). Epidemiology of scorpionism: A global appraisal. *Acta Tropica*, 107(2), 71–79.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.05.021>
- D´Suze Gina, Corzo Gerardo A., P. J. F. (2011). *Emergencias por animales ponzoñosos en las Américas*.
- Dehesa-Dávila, M., & Possani, L. D. (1994). Scorpionism and serotherapy in Mexico. *Toxicon*, 32(9), 1015–1018. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90383-2](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90383-2)
- Espino-Solis, G. P., Riaño-Umbarila, L., Becerril, B., & Possani, L. D. (2009). Antidotes against venomous animals: State of the art and perspectives. *Journal of Proteomics*, 72(2), 183–199.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.020>
- Ewert, S., Huber, T., Honegger, A., & Plückthun, A. (2003). Biophysical Properties of Human Antibody Variable Domains. *Journal of Molecular Biology*, 325(3), 531–553. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01237-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01237-8)
- Fischer, R., Twyman, R. M., & Schillberg, S. (2003). Production of antibodies in plants and their use for global health. *Vaccine*, 21(7–8), 820–825.
[https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00607-2](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00607-2)

- Huston, J. S., McCartney, J., Tai, M.-S., Mottola-hartshorn, C., Jin, D., Warren, F., ... Oppermann, H. (1993). Medical Applications of Single-Chain Antibodies. *International Reviews of Immunology*, 10(2–3), 195–217. <https://doi.org/10.3109/08830189309061696>
- Johnson, M. (2013). Antibody Structure and Fragments. *Materials and Methods*, 3. <https://doi.org/10.13070/mm.en.3.160>
- Kaur, J., Kumar, A., & Kaur, J. (2018). Strategies for optimization of heterologous protein expression in E. coli: Roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 803–822. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.08.080>
- Kellmann, S., Dübel, S., & Thie, H. (2017). A strategy to identify linker-based modules for the allosteric regulation of antibody-antigen binding affinities of different scFvs. *mAbs*, 9(3), 404–418. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1277302>
- Kipriyanov, S. M., Moldenhauer, G., Braunagel, M., Reusch, U., Cochlovius, B., Le Gall, F., ... Little, M. (2003). Effect of Domain Order on the Activity of Bacterially Produced Bispecific Single-chain Fv Antibodies. *Journal of Molecular Biology*, 330(1), 99–111. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00526-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00526-6)
- Kittipongwarakarn, S., Hawe, A., Tantipolphan, R., Limsuwun, K., Khomvilai, S., Puttipipatkachorn, S., & Jiskoot, W. (2011). New method to produce equine antirabies immunoglobulin F(ab')₂ fragments from crude plasma in high quality and yield. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78(2), 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.02.018>
- Koerber, J. T., Hornsby, M. J., & Wells, J. A. (2015). An Improved Single-Chain Fab Platform for Efficient Display and Recombinant Expression. *Journal of Molecular Biology*, 427(2), 576–586. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2014.11.017>
- Kuroda, K., Kitagawa, Y., Kobayashi, K., Tsumura, H., Komeda, T., Mori, E., ... Jigami, Y. (2007). Antibody expression in protease-deficient strains of the methylotrophic yeast *Ogataea minuta*. *FEMS*, 7, 1307–1316. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00291.x>
- Lu, D., Jimenez, X., Witte, L., & Zhu, Z. (2004). The effect of variable domain orientation and arrangement on the antigen-binding activity of a recombinant human bispecific diabody. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 318(2), 507–513. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2004.04.060>
- Ma, H., & O'Kennedy, R. (2017). Recombinant antibody fragment production. *Methods*, 116, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.11.008>
- McKenzie, E. A., & Abbott, W. M. (2018). Expression of recombinant proteins in insect and mammalian cells. *Methods*, 147, 40–49. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2018.05.013>
- Osnaya-Romero, N., de Jesus Medina-Hernández, T., Flores-Hernández, S. S., & León-Rojas, G. (2001). Clinical symptoms observed in children envenomated by scorpion stings, at the children's hospital from the State of Morelos, Mexico. *Toxicon*, 39(6), 781–785. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00204-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00204-X)
- Paudel, M. K., Sakamoto, S., Van Huy, L., Tanaka, H., Miyamoto, T., & Morimoto,

- S. (2017). The effect of varying the peptide linker length in a single chain variable fragment antibody against wogonin glucuronide. *Journal of Biotechnology*, 251, 47–52. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2017.04.002>
- Ponce-Saavedra Javier, Francke B Oscar F., Quijano-Ravell Ana F., C. S. R. (2016). ALACRANES (ARACHNIDA: SCORPIONES) DE IMPORTANCIA PARA LA SALUD PÚBLICA EN MÉXICO. *Folia Entomológica Mexicana*, 2(3), 45–70. Retrieved from http://www.folia.socmexent.org/revista/folia/Num_2016_3/45-70.pdf
- Rees, A. R., Staunton, D., Webster, D. M., Searle, S. J., Henry, A. H., & Pedersen, J. T. (1994). Antibody design: Beyond the natural limits. *Trends in Biotechnology*, 12(5), 199–206. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(94\)90083-3](https://doi.org/10.1016/0167-7799(94)90083-3)
- Riaño-Umbarila, L., Contreras-Ferrat, G., Olamendi-Portugal, T., Morelos-Juárez, C., Corzo, G., Possani, L. D., & Becerril, B. (2011). Exploiting cross-reactivity to neutralize two different scorpion venoms with one single chain antibody fragment. *Journal of Biological Chemistry*, 286(8), 6143–6151. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.189175>
- Riaño-Umbarila, L., Juárez-González, V. R., Olamendi-Portugal, T., Ortiz-León, M., Possani, L. D., & Becerril, B. (2005a). A strategy for the generation of specific human antibodies by directed evolution and phage display. *FEBS Journal*, 272(10), 2591–2601. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04687.x>
- Riaño-Umbarila, L., Juárez-González, V. R., Olamendi-Portugal, T., Ortiz-León, M., Possani, L. D., & Becerril, B. (2005b). A strategy for the generation of specific human antibodies by directed evolution and phage display. An example of a single-chain antibody fragment that neutralizes a major component of scorpion venom. *FEBS Journal*, 272(10), 2591–2601. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04687.x>
- Riaño-Umbarila, L., Ledezma-Candanoza, L. M., Serrano-Posada, H., Fernández-Taboada, G., Olamendi-Portugal, T., Rojas-Trejo, S., ... Becerril, B. (2016). Optimal neutralization of *Centruroides noxius* venom is understood through a structural complex between two antibody fragments and the Cn2 toxin. *Journal of Biological Chemistry*, 291(4), 1619–1630. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.685297>
- Riaño-Umbarila, L., Rodríguez-Rodríguez, E. R., Santibañez-López, C. E., Güereca, L., Uribe-Romero, S. J., Gómez-Ramírez, I. V., ... Becerril, B. (2017). Updating knowledge on new medically important scorpion species in Mexico. *Toxicon*, 138, 130–137. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2017.08.022>
- Rodríguez-Rodríguez, E. R., Ledezma-Candanoza, L. M., Contreras-Ferrat, L. G., Olamendi-Portugal, T., Possani, L. D., Becerril, B., & Riaño-Umbarila, L. (2012). A single mutation in framework 2 of the heavy variable domain improves the properties of a diabody and a related single-chain antibody. *Journal of Molecular Biology*, 423(3), 337–350. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.07.007>
- Santibañez-López, C. E., Francke, O. F., Ureta, C., & Possani, L. D. (2015). Scorpions from Mexico: From species diversity to venom complexity. *Toxins*, 8(1), 1–18. <https://doi.org/10.3390/toxins8010002>
- Secretaria de Salud. (2013). Programa de Acción Específico Prevención y Control

- de la Intoxicación por Picadura de Alacrán, 1–70.
- Secretaria de Salud. (2016). Incidencia de Intoxicación por picadura de alacrán (T63.2, X22) por grupos de edad, 5693.
- Sim, D.-W., Song, J., Kim, J.-H., Lee, J.-K., Chung, D.-Y., Jo, K.-S., ... Won, H.-S. (2018). Enhancing bacterial production of a recombinant cetuximab-Fab by partial humanization and its utility for drug conjugation. *Process Biochemistry*, 69, 123–130. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2018.03.012>
- Tan, P. H., Sandmaier, B. M., & Stayton, P. S. (1998). Contributions of a Highly Conserved VH/VL Hydrogen Bonding Interaction to scFv Folding Stability and Refolding Efficiency. *Biophysical Journal*, 75(3), 1473–1482. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)74066-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)74066-4)
- Tiwari, A., Sankhyani, A., Khanna, N., & Sinha, S. (2010). Enhanced periplasmic expression of high affinity humanized scFv against Hepatitis B surface antigen by codon optimization. *Protein Expression and Purification*, 74(2), 272–279. <https://doi.org/10.1016/J.PEP.2010.06.006>
- Verma, R., Boleti, E., & George, a J. T. (1998). Antibody engineering: Comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *Journal of Immunological Methods*, 216, 165–181.
- Wang, Y., Shan, Y., Gao, X., Gong, R., Zheng, J., Zhang, X. D., & Zhao, Q. (2018). Screening and expressing HIV-1 specific antibody fragments in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Immunology*, 103, 279–285. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2018.10.013>
- Weatherill, E. E., Cain, K. L., Heywood, S. P., Compson, J. E., Heads, J. T., Adams, R., & Humphreys, D. P. (2012). Towards a universal disulphide stabilised single chain Fv format: importance of interchain disulphide bond location and vL – vH orientation, 25(7), 321–329. <https://doi.org/10.1093/protein/gzs021>
- Wen Ch'ng, A. C., Choong, Y. S., & Lim, T. S. (2016). Phage Display-Derived Antibodies: Application of Recombinant Antibodies for Diagnostics. In *Proof and Concepts in Rapid Diagnostic Tests and Technologies*. InTech. <https://doi.org/10.5772/63927>
- Wörn, A., & Plückthun, A. (2001). Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *Journal of Molecular Biology*, 305(5), 989–1010. <https://doi.org/10.1006/JMBI.2000.4265>
- Yu-Jin, Kim; Mi-Ae, Heo; Su-Hyun, Kim; Junho, Chung; Min-Kyu, Oh; Sun-Gu, L. (2006). Functional expression of single-chain variable fragment antibody against c-Met in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 47(1), 203–209. <https://doi.org/10.1016/J.PEP.2005.12.003>
- Zhang, K., Geddie, M. L., Kohli, N., Kornaga, T., Kirpotin, D. B., Jiao, Y., ... Lugovskoy, A. A. (2015). Comprehensive optimization of a single-chain variable domain antibody fragment as a targeting ligand for a cytotoxic nanoparticle Comprehensive optimization of a single-chain variable domain antibody fragment as a targeting ligand for a cytotoxic nanopart, 862(February 2016), 42–52. <https://doi.org/10.4161/19420862.2014.985933>

ANEXOS

Definiciones

- Dolor epigástrico: Es una sensación de malestar y de dolor en la boca del estómago.
- Priapismo: Es una erección no deseada y prolongada del pene.
- Hipertermia: Aumento de la temperatura por encima de la temperatura corporal normal, de 37 °C a 37.5 °C
- Arritmia cardíaca: Alteración o trastorno del ritmo cardíaco.
- Isquemia miocárdica: Es una enfermedad en la que se produce una disminución del flujo de sangre rica en oxígeno a una parte del organismo.
- Edema pulmonar: Es una acumulación anormal de líquido en los pulmones que provoca dificultad respiratoria.
- Shock circulatorio: Es un estado fisiológico en el que, en etapas iniciales, la perfusión (el intercambio gaseoso) de los tejidos es insuficiente para cubrir la demanda de oxígeno y nutrientes para la respiración aeróbica celular.
- Reacciones anafilácticas: Una reacción alérgica grave en todo el cuerpo a un químico que se ha convertido en alérgeno.
- Hiperemia local: Es el aumento en la irrigación sanguínea en un órgano o tejido.
- Sialorrea: También llamada ptialismo, es la excesiva producción de saliva.
- Disfagia: Es la dificultad para la deglución (problemas para tragar).
- Taquicardia: Es el incremento o aceleración de la frecuencia cardíaca
- Odinofagia: Es el dolor producido en la garganta al intentar tragar fluidos
- Parestesia: Es una sensación anormal de los sentidos o de la sensibilidad general como una sensación de hormigueo o adormecimiento
- Prurito nasal: Picor nasal

PROTOCOLOS

Protocolo 1. Extracción de ADN plasmídico por kit

El siguiente es el protocolo de aislamiento de plásmido por kit de Roche (*High Pure Plasmid Isolation Kit*) modificado.

1. Hacer un inóculo de 5 ml de medio líquido YT2X (glucosa 2%, Amp 200 µg/ml), a partir de la colonia a la cual se desea extraer ADN plasmídico.
 - 1.1. Incubar a 37°C con agitación toda la noche.
 - 1.2. Centrifugar el cultivo a 5000 rpm por 15 min a 4°C.
 - 1.3. Desechar sobrenadante.
2. Agregar 250 µL de “Solución 1” (Buffer de suspensión).
 - 2.1. Resuspender las células y pasar el contenido a un tubo de 1.5 ml.
3. Agregar 250 µL de “Solución 2” (Buffer de lisis).
 - 3.1. Mezclar suavemente por inversión de 3 a 5 veces.
 - 3.2. Incubar por 5 min a temperatura ambiente.
4. Agregar 350 µL de “Solución 3 fría” (Buffer de unión).
 - 4.1. Mezclar suavemente por inversión de 3 a 6 veces.
 - 4.2. Incubar la muestra por 5 min en hielo.
 - 4.3. Centrifugar a 14000 rpm por 10 min
5. Recuperar sobrenadante y cargarlo en una columna de recuperación en un tubo de colecta.
 - 5.1. Dejar el sobrenadante atravesar por acción de la gravedad de 10 a 15 min
 - 5.2. Centrifugar la columna a 3000 rpm por 1 min
 - 5.3. Centrifugar nuevamente la columna a 14000 rpm por 30 segundos.
 - 5.4. Desechar el filtrado.
6. Agregar 500 µL de “Solución 4” (Buffer de lavado 1) a la columna.
 - 6.1. Centrifugar a 12000 rpm por 1 min
 - 6.2. Desechar el filtrado.
 - 6.3. Centrifugar a 14000 rpm por 1 min
 - 6.4. Desechar el filtrado.
7. Agregar 500 µL de “Solución 5” (Buffer de lavado 2) a la columna.
 - 7.1. Centrifugar a 14000 rpm por 1 min
 - 7.2. Desechar el filtrado.
8. Agregar 200 µL de “Solución 5” a la columna.
 - 8.1. Centrifugar a 14000 rpm por 1 min
 - 8.2. Desechar el filtrado.
 - 8.3. Centrifugar a 14000 rpm por 1 min
 - 8.4. Cambiar la columna de filtrado del tubo de colecta a un tubo de 1.5 ml nuevo y estéril.
9. Agregar 100 µL de “Solución 6” (Buffer de elución) a la columna.
 - 9.1. Dejar la solución en la columna 5 min

- 9.2. Centrifugar a 14000 rpm por 1 min
10. El ADN recuperado se cuantifica por espectrometría a Abs: 230 nm.

Protocolo 2. PCR

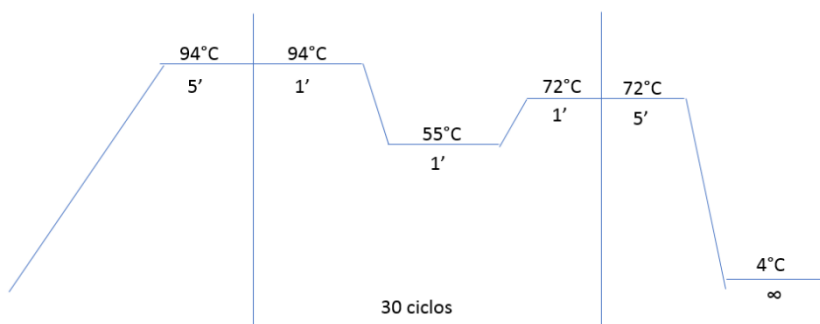
PCR de colonia

Componente	Volumen
H2O Tetradestilada	73 μ L
Buffer 10 X	10 μ L
MgCl ₂ 30 mM	6 μ L
Oligonucleótido Directo 10 pmol/ μ L	4 μ L
Oligonucleótico Reverso 10 pmol/ μ L	4 μ L
dNTPs 5 mM	2 μ L
TaqPol 5 U/ μ L	1 μ L
Volumen final	100 μL

Se coloca una pequeña asada de la colonia en cada tubo de reacción.

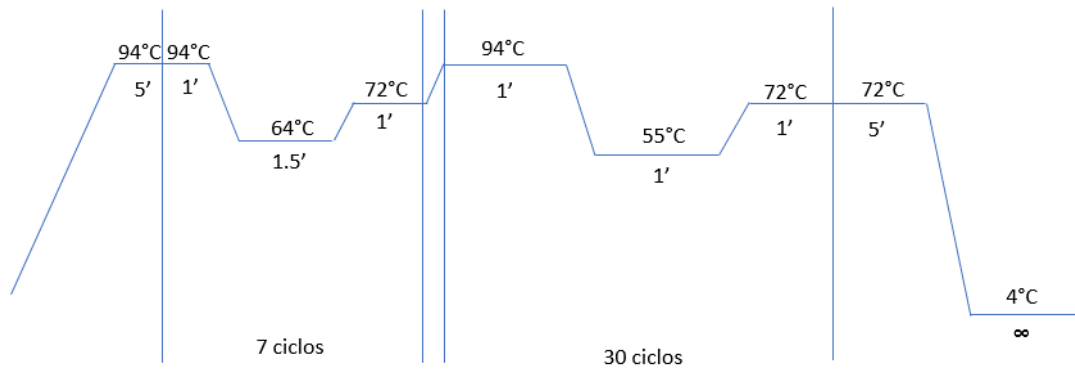
Condición de reacción

Las condiciones usadas para las reacciones de amplificación por PCR fueron: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, 30 ciclos de amplificación (94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 1 min) y una extensión final a 72 °C por 5 min.



PCR de empalme

Las condiciones usadas para la PCR de empalme fue: un primer ciclo de desnaturalización a 94 °C por 5 min; 7 ciclos de empalme (94 °C por 1 min, 64 °C por 1.5 min y 72 °C por 1 min)(sin la adición de oligonucleótidos); 30 ciclos de amplificación (94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 1 min) (adicionando los oligonucleótidos K6Sfi y JH3.Not) y un paso final de extensión a 72 °C por 7 min.



Protocolo 3. Electroforesis de ADN

A menos que se mencione lo contrario, la electroforesis de ADN se realizó en gel de agarosa 1% (TBE, agarosa 1%).

Se corrió el gel en buffer TBE (Tris base; H_3BO_3 ; EDTA) a 80~90 mA por un tiempo de 30~45 min.

Tinción

Todas las tinciones de los geles se realizaron con GelRed™.

Protocolo 4. Purificación de ADN digerido

El siguiente es el protocolo de aislamiento de ADN por kit de Roche (*High Pure PCR Product Purification Kit*) modificado.

1. Agregar 300 μ L de Solución 1 al tubo de la Digestión 1
 - 1.1. Mezclar vigorosamente
2. Cargar la mezcla en una columna de filtrado en un tubo de colecta.
 - 2.1. Centrifugar a 3000 rpm por 1 min
3. Cargar el filtrado en la columna nuevamente.
 - 3.1. Centrifugar a 3000 rpm por 1 min
 - 3.2. Desechar el filtrado
 - 3.3. Centrifugar la columna a 14000 rpm por 1 min
4. Colocar 500 μ L de Solución 2 a la columna.
 - 4.1. Centrifugar a 14000 rpm por 1 min
 - 4.2. Desechar el filtrado.
5. Agregar 200 μ L de Solución 2 a la columna.
 - 5.1. Centrifugar a 14000 rpm por 1 min
 - 5.2. Desechar el filtrado.
 - 5.3. Centrifugar a 14000 rpm por 1 min

6. Cambiar la columna de filtrado del tubo de colecta a un tubo de 1.5 ml nuevo y estéril.
7. Colocar 100 µL de Solución 3 en la columna.
 - 7.1. Dejar la solución en la columna por 5 min
 - 7.2. Centrifugar a 14000 rpm por 1 min
8. El filtrado es cuantificado por espectrofotometría a una Abs. de 280 nm.

Protocolo 5. Purificación de ADN por corte de banda de agarosa

El siguiente es el protocolo de aislamiento de fragmentos de ADN de gel de agarosa por kit de Roche (*High Pure PCR Product Purification Kit*) modificado.

1. Teñir el gel
 - 1.1. Con mucho cuidado y con medidas de seguridad apropiada (guantes, bata).
2. Visualizar el gel en el transiluminador con luz UV a intensidad baja.
 - 2.1. Identificar la banda deseada.
 - 2.2. Cortar con ayuda de una navaja desinfectada el gel para obtener la banda deseada.
3. Colocar la banda en un tubo de 1.5 ml.
4. Pesar la banda restando el peso del tubo
5. Por cada 100 mg de agarosa se usará 300 µl de Solución 1
 - 5.1. Se divide en tubos de 1.5ml (los necesarios).
6. Se calienta el contenido del tubo a 60 °C hasta lograr disolver la agarosa.
 - Opcional: Agregar 1µL de isopropanol por cada 1 mg de agarosa.
7. Cargar la agarosa disuelta con la Solución 1 en la columna de filtrado en un tubo de colecta (una columna por cada tubo de 1.5 ml usado).
 - 7.1. Centrifugar a 5000 rpm por 1 min
 - 7.2. Desechar filtrado.
 - 7.3. Centrifugar a 14000 rpm por 1 min
8. Agregar 500 µL de Solución 2.
 - 8.1. Centrifugar a 14000 rpm por 1 min
 - 8.2. Desechar filtrado.
9. Agregar 200 µL de Solución 2.
 - 9.1. Centrifugar a 14000 rpm por 1 min
 - 9.2. Desechar filtrado.
 - 9.3. Centrifugar a 14000 rpm por 1 min
10. Cambiar la columna de filtrado del tubo de colecta a un tubo de 1.5 ml nuevo y estéril.
11. Colocar 100 µL de Solución 6 en la columna.
 - 11.1. Dejar la solución en la columna por 5 min
 - 11.2. Centrifugar a 14000 rpm por 1 min
12. Usar la misma solución para cada columna usada con el objetivo de concentrar el ADN.
 - Opcional: Correr gel de electroforesis para confirmar presencia del ADN de interés.

Protocolo 6. Transformación

1. En 60 μ L de células de *E. coli* TG1 electrocompetentes, se colocan 5 μ L de reacción de ligación.
2. En celdas de electroporación (Bio-Rad) se coloca la mezcla de células con reacción de ligación.
3. Dar un pulso de 1.8 mA con el electroporador (Bio-Rad).
4. Recuperar las células inmediatamente de la celda con 1 ml de medio YT2X (sin glucosa, sin ampicilina).
5. Recuperar las células por 1 hora a 37 °C con agitación (150 rpm).
6. Platear 10 μ L y 50 μ L en cajas Petri con medio YT2X solido (glucosa 2%, Amp 200 μ g/ml).
7. Platear el cultivo restante en una caja Petri (70 ml) con medio YT2X solido (glucosa 2 %, Amp).

Transformantes

- Realizar conteo de las unidades formadoras de colonias (UFCs).

Realizar PCR de colonia para corroborar la correcta inserción del plásmido en las células.

Protocolo 7. Expresión de proteínas

1. Hacer un preinóculo de la colonia en medio YT2X (glucosa 2%, Amp 200 μ g/ml).
 - 1.1. Incubar toda la noche a 37 °C con agitación.
2. Colocar el cultivo (preinóculo) en 500 ml (relación 1:100) de medio YT2X (glucosa 0.1 %, Amp 200 μ g/ml).
 - 2.1. Incubar a 37 °C por ~3 horas hasta alcanzar una densidad óptica de Abs 600nm: 0.9
3. Agregar IPTG como inductor a una concentración final de 1 mM y Amp 200 μ g/ml.
 - 3.1. Incubar a 30 °C en agitación por 4 horas
4. Centrifugar el cultivo a 5000 rpm por 15 min
 - 4.1. Desechar sobrenadante

Protocolo 7.1

Extracción periplásmica

5. Resuspender el pellet celular en buffer de lisis PPB (sacarosa 200 mg / ml, EDTA 1 mM, Tris HCl 30 mM, pH 8); adicionar 15 ml de buffer PPB por cada 500 ml de cultivo.
 - 5.1. Mantener en hielo por 20 min mientras se resuspende el pellet con ayuda de una pipeta.
 - 5.2. Centrifugar a 10000 rpm por 15 min
6. Recuperar sobrenadante "Sobrenadante 1".

7. Resuspender pellet en buffer de MgSO_4 5 mM, usando 15 ml de buffer por cada 500 ml de cultivo.
 - 7.1. Mantener en hielo por 20 min mientras se resuspende el pellet con ayuda de una pipeta.
 - 7.2. Centrifugar a 10000 rpm por 15 min
8. Recuperar sobrenadante “Sobrenadante 2”.
9. Dializar “Sobrenadante 1” y “Sobrenadante 2”.

Protocolo 7.2

Dializado

10. Preparar 5 L de PBS 1x
 - 10.1. Hidratar la membrana de dializado con agua Mili Q y luego remojar en PBS.
 - 10.2. Sellar un extremo de la membrana con una pinza.
11. Colocar en la membrana la mezcla del “Sobrenadante 1” y “Sobrenadante 2”.
 - 11.1. Sellar el otro extremo de la membrana con una pinza procurando dejar una pequeña burbuja con la intención de que flote.
 - 11.2. Colocar la membrana de dializado en un recipiente con 5 L de PBS 1X.
12. Mantener el PBS en agitación a 4°C toda la noche.
 - 12.1. Cambiar la membrana a otro recipiente con otros 5 L de PBS 1X por 2 horas.

Protocolo 7.3

Cromatografía de afinidad

13. Colocar a una columna de cromatografía 1 ml de resina Ni-NTA
 - 13.1. Se equilibra o “empaca” con 5 ml de solución imidazol 20 mM en PBS 1X
14. Se carga la muestra dializado de a poco y se deja pasar a través de la columna por gravedad de 2 a 3 veces.
15. Cargar 5 ml de solución imidazol 35 mM en PBS 1X con el objetivo de “lavar” la columna, es decir retirar contaminantes y proteínas no relevantes.
16. Se agrega de 1 ml de solución imidazol 250 mM en PBS 1X a la columna con el objetivo de eluir la proteína retenida en la columna.
 - 16.1. Se colecta la elución en tubos silanizados (Imidazol 1).
17. Se agregan 1 ml de solución imidazol 250 mM a la columna y se coloca a 4°C toda la noche y posteriormente es recuperado (Imidazol 2).