

TESIS DEFENDIDA POR
CARMEN ELVIRA VARGAS PERALTA
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dra. Edna Sánchez Castrejón

Director del Comité

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

Miembro del Comité

Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida

Miembro del Comité

M.C. Juan Manuel Espinosa Cardaña

Miembro del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez

*Coordinador del programa de posgrado en
Ciencias en Ciencias de la Vida*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

Director de Estudios de Posgrado

14 de diciembre de 2010.

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS EN CIENCIAS DE LA VIDA
CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

**OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS vNAR DE ANTICUERPOS DEL
TIBURÓN *Heterodontus francisci* CON AFINIDAD POR IL-18
HUMANA**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

CARMEN ELVIRA VARGAS PERALTA

Ensenada, Baja California, México, diciembre.

RESUMEN de la tesis de Carmen Elvira Vargas Peralta, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en Ciencias de la Vida con orientación en **Biotecnología Marina**. Ensenada, Baja California. Diciembre 2010.

OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS vNAR DE ANTICUERPOS DEL TIBURÓN
Heterodontus francisci **CON AFINIDAD POR IL-18 HUMANA**

Resumen aprobado por:

Dra. Edna Sánchez Castrejón
Director de Tesis

El síndrome metabólico (SM) es un concepto clínico que se compone por la asociación de varias enfermedades como obesidad, resistencia a insulina, diabetes mellitus tipo 2, aterosclerosis, entre otras, las cuales se encuentran vinculadas fisiopatológicamente por un estado inflamatorio que contribuye al desarrollo de estas enfermedades. La interleucina 18 (IL-18) es una citocina pro-inflamatoria multifuncional con efecto pleiotrópico altamente implicada con los componentes del SM, lo que remarca su importancia como blanco terapéutico.

El objetivo de esta tesis fue el aislamiento de fragmentos variables (vNAR) de anticuerpos de tipo IgNAR del tiburón *Heterodontus francisci* con capacidad de unión hacia la IL-18 humana a partir de una biblioteca inmune y otra no inmune. Como resultado de este trabajo se obtuvieron, por medio de la técnica de despliegue en fagos, dos clonas que producen anticuerpos vNAR con capacidad de unión a IL-18, provenientes de la biblioteca no inmune. Se ha reportado que los vNAR son moléculas que poseen una elevada estabilidad, alta afinidad conferida por un CDR3 largo y diverso, además de ser termoestables y de tamaño pequeño; debido a lo anterior, los hacen ideales para aplicarlos como herramientas que permitan determinar el papel de IL-18 en el SM, así como en el diagnóstico de alguna patología e incluso en terapia.

Palabras Clave: Síndrome Metabólico, IL-18, IgNAR.

ABSTRACT of the thesis presented by Carmen Elvira Vargas Peralta as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in Life Science with orientation in **Marine Biotechnology**. Ensenada, Baja California. December 2010.

**OBTENTION OF vNAR FRAGMENTS OF ANTIBODIES FROM SHARK
Heterodontus francisci WITH AFFINITY FOR HUMAN IL-18**

The metabolic syndrome (MS) is a clinical concept composed for the association of several diseases that includes obesity, insulin resistance, diabetes mellitus type 2, atherosclerosis, among others, which are physiopathological related by an inflammatory state that contributes to its development. Interleukin 18 (IL-18) is a multifunctional pro-inflammatory cytokine with pleiotropic effect highly implicated with the components of the MS, which remarks its importance like therapeutic target.

In this thesis work we present the generation of an immune library and the isolation of variable fragment of shark single domain antibodies (vNAR) with binding capacity for the human IL-18 from a nonimmune library. Two vNAR with binding capacity to IL-18 were isolated by phage display technique from a nonimmune library. The reported features of vNAR like small size, high affinity, stability and a long and diverse CDR3 make them ideals to apply as potential tools to clarify the role of IL-18 in the MS, in diagnosis of some pathology and even in therapy.

Keywords: Metabolic syndrome, IL-18, IgNAR.

Dedicatorias

Para ti papá, que aunque no alcanzaste
a verla sabías que así sería*

Te quiero y extraño

¡CVL!:

~ o ~

Agradecimientos

- ❖ A mis padres Eliud y RosaM^a, por su apoyo, confianza y aliento. A hermanos (Hiram y Rosita) que me inspiran a ser mejor cada día y por darme alegría.
- ❖ A ti Ignacio por tu infinito amor.
- ❖ A mi asesora Dra. Edna Sánchez Castrejón. Edna gracias por todo tu apoyo, consejo y dedicación, porque supiste ser una guía en lo profesional y como persona.
- ❖ A mi comité Dr. Alexei F. Licea Navarro, Dr. Leonardo Lizárraga y al M.C. Juan Manuel Espinosa por su apoyo y consejos. En especial al Dr. Alexei por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y hacerme ver que todo parece tan fácil y al Maestro Juan Manuel por brindarme su amistad.
- ❖ Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por la oportunidad que me brindó para realizar mis estudios de posgrado, en especial a Ivonne Best que si no fuera por ella mi maestría no hubiera sido la misma.
- ❖ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT (267876) por haberme beneficiado con una beca durante mi maestría.
- ❖ A mis Profesores que me dieron armas para sacar adelante este trabajo.
- ❖ A mis compañeros y amigos de maestría y del laboratorio por su apoyo, amistad, hermosas palabras, reuniones, vivencias que hicieron mi estancia de maestría muy placentera.
- ❖ A mis amigos los químicos por seguir la amistad y brindarme su apoyo a pesar de la distancia.

CONTENIDO

	Página
Resumen	i
Abstract	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Contenido (continuación)	vi
Lista de figuras	viii
Lista de figuras (continuación)	ix
Lista de tablas	x
I Introducción	1
I.1 Síndrome metabólico y estado inflamatorio	3
I.1.1 Interleucina-18 y Síndrome metabólico.....	4
I.2 Anticuerpos	7
I.2.1 Anticuerpos de tiburón IgNAR.....	12
I.2.2 Anticuerpos contra IL-18.....	15
I.3 Justificación	17
I.4 Objetivo general.....	18
I.4.1 Objetivos específicos	18
I.5 Hipótesis	18
II. Materiales y métodos	19
II.1 Biblioteca inmune.....	21

CONTENIDO (continuación)

	Página
II.1.1 Inmunización	21
II.1.2 Purificación del ARN total a partir del bazo del tiburón.....	21
II.1.3 Síntesis de la primera cadena de ADNc a partir del ARN total	22
II.1.4 Construcción de la biblioteca vNAR	23
II.2 Biblioteca no inmune.....	28
II.2.1 Reamplificación de la Biblioteca no Inmune	28
II.2.2 Rondas de selección de los fagos que reconocen la IL-18	29
II.2.3 Búsqueda de clonas con el inserto vNAR por PCR y purificación de plásmido.....	30
II.2.4 Expresión de la proteína vNAR recombinante	31
II.2.5 Extracción de la proteína vNAR recombinante.....	32
II.2.6 Análisis de las proteína vNAR recombinante	34
II.2.7 Obtención del vNAR que reconoce a la citocina IL-18	36
III. Resultados	38
III.1 Biblioteca inmune	38
III.1.1 Construcción de la biblioteca vNAR.....	38
III.2 Biblioteca no inmune	45
III.2.1 Reamplificación de biblioteca.....	45
III.2.2 Rondas de selección	45
III.2.3 Búsqueda de clonas positivas por PCR.....	46
III.2.4 Expresión de la proteína vNAR recombinante.....	51
III.2.5 Obtención de la proteína recombinante vNAR que reconoce a la citocina IL-18.....	55
IV. Discusiones	61

CONTENIDO (continuación)

	Página
IV. 1 Conclusiones	66
IV. 2 Perspectivas.....	67
V. Bibliografía	68
Anexos	73

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Estado inflamatorio y síndrome metabólico (SM).....	4
2.	Esquema de la estructura de un anticuerpo IgG de humano.....	8
3.	Técnica de despliegue en fagos.. ..	11
4.	Estructura de diferentes anticuerpos.....	13
5.	Estrategia general para la obtención de fragmentos de dominio sencillo vNAR con afinidad por IL-18.....	20
6.	Fagémido pComb3X (modificado de Barbas <i>et al.</i> 2001).....	24
7.	Electroforesis de ARN total obtenido del bazo de un tiburón inmunizado con IL-18.. ..	38
8.	Electroforesis en geles de agarosa (1.8%) de los fragmentos vNAR amplificados por PCR.....	39
9.	Electroforesis en gel de agarosa (0.8%) del fagémido pComb3X purificado.. ..	40
10.	Electroforesis del fragmento vNAR y el fagémido pComb3X digerido y purificado.....	42
11.	Representación gráfica de los títulos de salida de cada ronda de selección expresados en ufc.....	46
12.	Electroforesis en gel de agarosa (1.8 %) de las clonas de la ronda 4 analizadas por PCR.....	47
13.	Electroforesis en gel de agarosa (0.8%) de los plásmidos purificados correspondientes a las clonas que fueron positivas para el fragmentos vNAR.	48
14.	Alineamiento de las secuencia de aminoácidos de las clonas aisladas contra IL-18.	49
15.	Alineamiento de las secuencia de aminoácidos de las clonas aisladas de una misma biblioteca naïve.. ..	50
16.	Electroforesis de los productos amplificados por PCR de las clonas <i>E. coli</i> TOP10F' transformadas con plásmidos que incluyen fragmentos vNAR.....	51
17.	Inmunodetección de la proteína recombinante vNAR # 1 obtenida mediante extracción periplásmica, mecánica y con urea.....	53
18.	ELISA de reconocimiento de las proteínas recombinantes vNAR #1 y #14 contra IL-18.	55

19. Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (12%) de proteínas vNAR recombinantes purificadas mediante cromatografía de afinidad a níquel (Ni-NTA, QIAGEN).....	56
20. Western blot de las proteínas vNAR recombinantes purificadas mediante cromatografía de afinidad a níquel (Ni-NTA, QIAGEN).....	57
21. Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (12%) de las proteínas vNAR recombinantes purificadas mediante cromatografía de afinidad a níquel (HisTrap HP affinity columns, GE Healthcare).	58
22. Western blot de las proteínas recombinantes vNAR #1 y #14 purificadas mediante columnas HisTrap HP.	59
23. ELISA de reconocimiento de los vNAR #1 y #14 por IL-18... ..	60

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Componentes del síndrome metabólico (González-Chávez <i>et al.</i> , 1999).....	2
II. Protocolo de inmunización.	21
III. Lista de oligonucleótidos empleados en este trabajo.....	22
IV. Estrategia de ligación a pequeña escala.....	43
V. Concentración de los plásmidos extraídos de las clonas con inserto vNAR.	48

I Introducción

La obesidad es una enfermedad progresiva y crónica originada por muchas causas, una vez que se padece trae consigo un importante número de complicaciones, se caracteriza por el exceso de grasa en el organismo y se presenta cuando el índice de masa corporal es mayor a 25 unidades, o bien cuando el peso supera en un 20% o más el punto medio de la escala de peso, según el valor estándar peso/altura. La organización mundial de la salud (OMS) reportó en el 2005, que había ~1600 millones de adultos (mayores de 15 años) y 20 millones de menores de 5 años con sobrepeso y al menos 400 millones de adultos obesos a nivel mundial. Este problema crece día con día, se calcula que para el 2015 habrá ~2300 millones de adultos con sobrepeso y más de 700 millones con obesidad.

Existe una fuerte asociación entre la obesidad y la diabetes no dependiente de insulina o diabetes mellitus tipo 2 (DM2), por lo que es de esperarse que también aumenten los casos de ésta; de hecho, la DM2 es de las enfermedades endócrinas, metabólicas y nutricionales que aporta el mayor número de muertes. La DM2 tiene su origen en la incapacidad del cuerpo para utilizar eficazmente la insulina, por lo general a consecuencia del exceso de peso o inactividad física (OMS, 2005), sin embargo existen otras causas que pueden desencadenarla.

El desarrollo de la DM2 es precedido por la resistencia a insulina (RI). La RI es una condición en la que se produce una respuesta tisular menor a la esperada a la acción de la insulina, lo que lleva a un aumento de la secreción de insulina (hipersulinemia) como mecanismo compensatorio por la respuesta reducida a la hormona. Si este mecanismo se prolonga, aparece la intolerancia a la glucosa y posteriormente la DM2. A su vez, la RI es generada por un aumento de ácidos grasos por parte del tejido adiposo intra-abdominal (Araya, 2002). En este sentido, la obesidad que trae consigo un aumento de ácidos grasos libres (AGL) conduce a la RI, la cual puede desarrollar DM2, por lo que el padecimiento de

alguna de estas predispone la posibilidad de sufrir alguna otra, complicando cada vez más el estado fisiológico del enfermo.

Lo anterior hace evidente la asociación que existe entre estas enfermedades, siendo el aumento de AGL el factor común o lo que las desencadena. El aumento de AGL contribuye en la patogénesis al provocar un estado inflamatorio crónico al aumentar la expresión de citocinas pro-inflamatorias y otros mediadores (incluyendo moléculas de adhesión), lo que vincula otros problemas, como la presencia de eventos cardiovasculares (Chávez Tapia *et al.*, 2004).

La obesidad central, hipertensión arterial, RI e hiperinsulinemia se encuentran asociadas en una entidad clínica, conocida como el síndrome metabólico (SM) o síndrome X. Este concepto clínico se diagnostica por la presencia de RI y/o intolerancia a la glucosa o DM2, además de hipertensión arterial, obesidad o dislipidemia característica (con aumento de triglicéridos plasmáticos y descenso del colesterol HDL, High density lipoprotein, por sus siglas en inglés), entre otros trastornos asociados. Aún cuando existe controversia en los factores que se deban tomar en cuenta para el diagnóstico del SM, en general se incluyen los factores mostrados en la Tabla 1 (Araya, 2002 y González Chávez, 1999).

Tabla I. Componentes del síndrome metabólico (González Chávez, 1999)

-
1. Diabetes mellitus tipo 2 o intolerancia a la glucosa.
 2. Hipertensión arterial primaria (TA > 140/90 mm Hg)
 3. Obesidad central (índice cintura cadera >0.90 en hombres, en mujeres > 0.85 y/o IMC > 27 kg/m²).
 4. Dislipidemias: hipertrigliceridemia (> 200 mg/dL) y disminución de C-HDL (< 35 en hombres y < 45 mg/dL en mujeres).
 5. Hiperinsulinemia.
 6. Hiperuricemia.
 7. Microalbuminuria (de 30 mg a 300 mg en orina/24 horas) o (20 µg/minuto) o (albúmina/creatinina > 20mg/g).
 8. Hiperfibrinogenemia.
 9. Aterosclerosis.
-

Abreviaturas: IMC = Índice de masa corporal.

C-HDL = Colesterol de lipoproteínas de alta densidad

I.1 Síndrome metabólico y estado inflamatorio

El SM se compone por varias enfermedades que tienen como factor común un desequilibrio en mediadores inflamatorios, probablemente desencadenado por el aumento de AGL.

La acumulación de lípidos dentro de las fibras musculares contribuye significativamente a la aparición y desarrollo de la RI. Se ha observado que el aumento de AGL reduce la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4), lo cual altera la captación de glucosa e interfiere con la señalización intracelular desencadenada por la insulina, es por ello que se relaciona a los AGL como causa y consecuencia de la RI y DM2. Esto es agravado por una lipólisis mal regulada por parte de los adipocitos (células del tejido adiposo) en pacientes con RI que presentan una mayor liberación de AGL y con ello un estado inflamatorio (Lastra, 2005 y Palomer *et al.*, 2005).

El aumento de tejido adiposo, principalmente a nivel visceral, genera que los adipocitos secreten citocinas que inducen la síntesis y liberación de factores quimioatrayentes, con infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, perpetuando la inflamación. Es por ello que el tejido adiposo tiene una relación directa con los componentes del SM, ya que promueve un estado inflamatorio al aumentar la expresión de citocinas pro-inflamatorias, y la acumulación de moléculas de adhesión en la superficie de células endoteliales, con infiltración de lípidos. Esas reacciones inflamatorias tienen como consecuencia, disfunción en tejido muscular, hígado, páncreas y endotelio vascular, promoviendo complicaciones como hiperlipidemia, hipersulinemia, inflamación arterial e hipertensión, que desarrollan enfermedades como RI, DM2 y aterosclerosis; es decir, componentes del SM (Araya, 2002; Chávez Tapia *et al.*, 2004; Gómez *et al.*, 2008; Gozález Chávez *et al.*, 1999 y Lastra, 2005) (Figura 1).

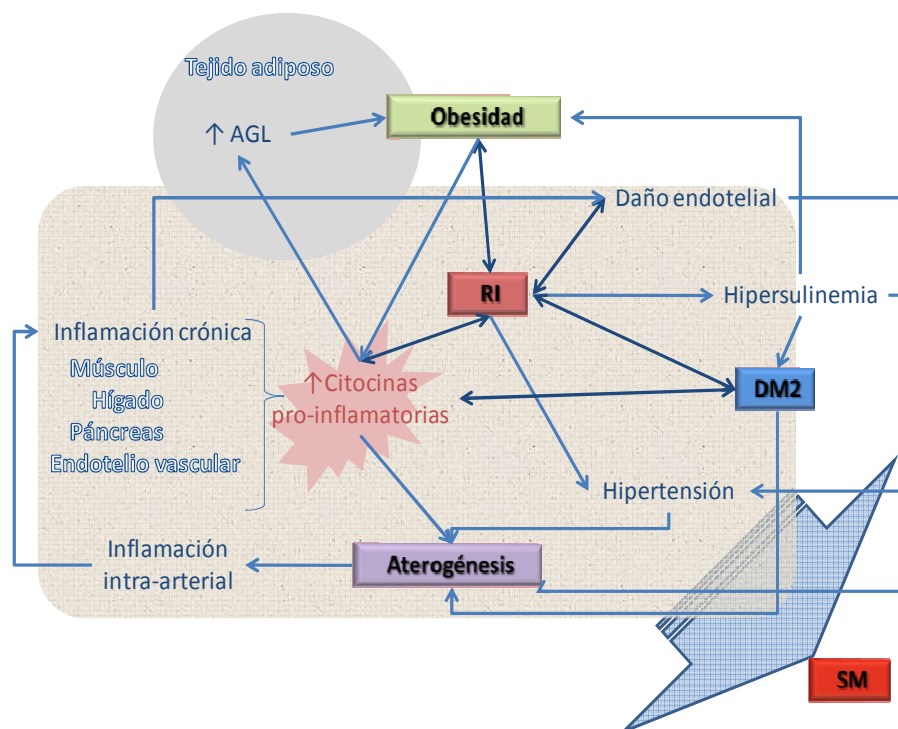


Figura 1. Estado inflamatorio y síndrome metabólico (SM). AGL: ácidos grasos libres, DM2: diabetes mellitus tipo 2, RI: resistencia a insulina. Modificado de Chávez Tapia *et al.*, 2004; Gómez *et al.*, 2008 y González Chávez, 1999.

I.1.1 Interleucina-18 y Síndrome metabólico

La interleucina (IL)-18 es miembro de la familia de la IL-1, por presentar una estructura semejante a la IL-1 β . La IL-18 e IL-1 β actúan en la inmunidad innata y presentan un procesamiento y secreción similar. IL-18 es sintetizada a partir de una proteína precursora (pro-IL-18) inmadura, la cual es procesada a su forma madura o activa (IL-18) por una cisteína proteasa caspasa-1 (Puren *et al.*, 1998). Es la única citocina con capacidad de estimular la diferenciación de los linfocitos T vírgenes en linfocitos Th1 (actúan en la defensa contra microbios intracelulares e inflamación) o linfocitos Th2 (importantes en las reacciones alérgicas y defensa contra parásitos), dependiendo del contexto inmunológico,

por lo que es una citocina pro-inflamatoria multifuncional con efecto pleiotrópico (Biet *et al.*, 2002 y Nakanishi *et al.*, 2001).

IL-18 es producida constitutivamente por varios tipos celulares, entre ellos están los monocitos, macrófagos, dendríticas, Kuppfer, Langerhans, corteza adrenal, adipocitos, linfocitos B, osteoblastos, condrocitos, astrocitos, queratinocitos, células del epitelio intestinal, entre otros (Biet *et al.*, 2002). Aunque no todos presentan los componentes necesarios para expresarla, esta citocina activa genes inflamatorios regulados por el factor nuclear de transcripción kappa B (NF-kB) y la proteína activadora-1(AP-1), los cuales a su vez inducen la síntesis de otras citocinas (el factor de necrosis tumoral TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e interferón IFN- γ), moléculas de adhesión (molécula intercelular de adherencia, ICAM-1), factores de crecimiento, entre otras moléculas pro-inflamatorias. La síntesis de estas moléculas da como resultado el reclutamiento de linfocitos T, células dendríticas, entre otras células que expresan el receptor de IL-18 (Barak *et al.*, 2004; Puren *et al.*, 1998 y Sahar *et al.*, 2005).

La IL-18, es una citocina pro-inflamatoria potente que contribuye en la migración celular y activación de macrófagos, los cuales conducen a un incremento de la respuesta inflamatoria. De tal modo que al ser liberada la IL-18 en el área de la lesión causada por la migración celular, aumenta aún más el daño de tejido tisular, es por ello que se le involucra en la patogénesis de enfermedades que presentan un estado inflamatorio (Grace *et al.*, 1999 y Maffia *et al.*, 2006).

La relación de IL-18 y otras citocinas se comprobó en un estudio realizado por Maffia y colaboradores (2006). Este estudio realizado en ratas con lesión vascular, se observó que presentaban alta concentración de IL-18, con una fuerte actividad inmunológica en proliferación y migración de células del músculo liso, las cuales presentaron daño inflamatorio. Al bloquear la acción de esta citocina, observaron que se redujo la proliferación de células así como la expresión de IFN- γ , IL-6 e IL-8.

La IL-18 induce el incremento de las citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-6, las cuales causan inflamación en la pared de los vasos sanguíneos, por lo que IL-18 contribuye en el desarrollo, extensión y complicaciones de enfermedades vasculares; además de interferir con la acción de la glucosa y otras complicaciones presentes en el concepto del SM que involucran el aumento de las citocinas pro-inflamatorias (Muntaner *et al.*, 1999; Sahar *et al.*, 2005 y Sierra *et al.*, 2005).

Se ha encontrado que la alta concentración de IL-18 predice mortalidad en pacientes con aterosclerosis, por lo que en pacientes con SM, la concentración de esta citocina puede representar un marcador de riesgo a sufrir eventos cardiovasculares ya que el riesgo a presentar estos eventos se incrementa aun más cuando hay concentración elevada de glucosa (Mallat *et al.*, 2004; Sierra *et al.*, 2005 y Troised *et al.*, 2009).

Fisher y colaboradores (2005) en su estudio proponen a IL-18 como un mejor marcador de diagnóstico de SM que IL-6, TNF- α y la proteína C reactiva (CRP). Si bien, se ha observado que la concentración de IL-18 aumenta a medida que aumentan los factores de riesgo del SM, la relación de esta citocina con IL-6 y CRP lo hace un mejor marcador, ya que IL-18 muestra una asociación dependiente de la presencia de otros factores de riesgo del SM como son obesidad y DM2 (Hung *et al.*, 2005; Everett *et al.*, 2009 y Zirlik *et al.*, 2007).

Adicionalmente se ha encontrado la asociación de esta citocina al peso, grasa abdominal, alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) (Esposito *et al.*, 2002 y López Bermejo *et al.*, 2005). ALT y AST son marcadores de daño hepático (presentes en pacientes con RI) y desarrollo a DM2. Las personas más propensas a desarrollar DM2 presentan concentración elevada de varios marcadores inflamatorios (Esposito *et al.*, 2003). Thorand y colaboradores (2005) en su estudio sugieren que se puede indicar el desarrollo a DM2 por la relación IL-18 y CRP ó IL-18 y IL-6.

Aunque no se puede tomar la concentración de IL-18 como marcador único en el diagnóstico del SM, la asociación que presenta esta citocina con sus componentes la destaca como un posible blanco terapéutico, por su efecto pro-inflamatorio pleiotrópico. Sin embargo, es necesario estudiar la vía que desencadena el aumento en la concentración de IL-18, así como lo que la lleva a causar una acción normal en las respuestas inmunitarias a tener una implicación patogénica.

En la actualidad existe la necesidad de encontrar marcadores que ayuden a diagnosticar a un paciente con SM en sus diferentes etapas en base a los marcadores o factores de riesgo que presente y con ello su prevención o un buen tratamiento si este ya se padece. Siendo los componentes del síndrome metabólico las enfermedades que afectan más en nuestros días, el padecimiento de alguno de ellos puede llevar a su complicación y a la predisposición de desarrollar algún otro; por lo que es necesario contar con herramientas que permitan su detección. Es por ello que el empleo de anticuerpos contra IL-18 puede contribuir no solo a su detección sino también en el estudio de sus implicaciones patogénicas, lo cual podría llevar a emplearlos como herramientas terapéuticas en el futuro.

I.2 Anticuerpos

El sistema inmune es el conjunto de células y moléculas, que de manera coordinada se encargan de proteger al organismo contra enfermedades causadas por agentes infecciosos o sustancias extrañas al organismo, capaces de provocar un daño. Las respuestas inmunitarias ocurren por el estímulo de un antígeno (sustancia extraña inmunogénica), donde es necesario un reconocimiento (como una sustancia ajena y no una propia) y en consecuencia, hay transmisión de señales necesarias para activar a las células efectoras que se encargaran de su eliminación (Lodish *et al.*, 2005).

Los anticuerpos son parte del sistema inmunitario adaptativo y tienen la capacidad de unirse a los antígenos para neutralizarlos y marcarlos para que sean detectados y procesados más rápidamente (opsonizar). Los anticuerpos son inmunoglobulinas (Ig) que

pueden estar de forma soluble (secretada) o anclados a membrana y son producidos por los linfocitos B (que se diferenciaron a células plasmáticas). Al unirse a un antígeno se forma el complejo anticuerpo y antígeno con el que se inicia una cascada de reacciones en las células del sistema inmune para la degradación de este complejo (Abbas *et al.*, 2007).

Generalmente los anticuerpos están constituidos por dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L). Son moléculas con forma de Y donde cada brazo lo integra una cadena L unida a una cadena H por enlaces disulfuro, a su vez las cadenas H se encuentran unidas por la región bisagra que les da flexibilidad. Cada cadena está constituida por dominios constantes y uno variable con diferente función. Los dominios variables (V) de cada cadena H y L se encuentran en el extremo de cada brazo del anticuerpo y forman la región variable (VH-VL) que es el sitio de unión al antígeno (Figura 2).

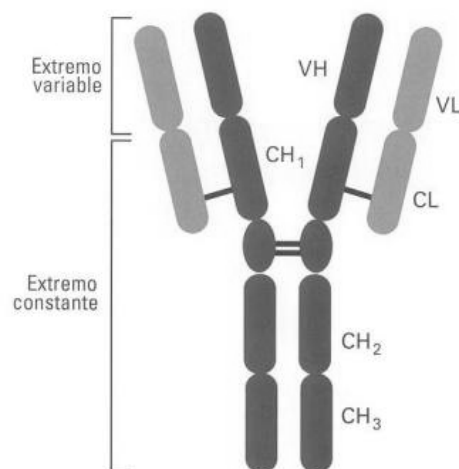


Figura 2. Esquema de la estructura de un anticuerpo IgG de humano. Las cadenas pesadas (H) se muestran en color gris oscuro y las cadenas ligeras (L) en gris claro. Cada cadena está integrada por dominios variables (V) y constantes (C). La región variable está formada por los dominios VH-VL.

La estructura general de los anticuerpos es semejante, pero difieren en la región variable, lo que permite que haya gran diversidad de variantes de anticuerpos, cada uno con capacidad de unirse a un antígeno diferente. Esto se debe por que en la región VH-VL se encuentran las “regiones determinantes de complementariedad” (CDR), que forman los sitios de unión al antígeno. Cada anticuerpo presenta diferentes secuencias en su CDR, permitiéndole presentar afinidad por diferentes antígenos. Para que se de la unión antígeno-anticuerpo, el sitio de contacto del anticuerpo con el epítipo (sitio de contacto con el antígeno) o determinante antigénico debe ser complementario, por lo que los anticuerpos son específicos para distintos antígenos por la diversidad que le confieren las regiones CDR. Hay tres secuencias de CDR por cada dominio V, CDR1, CDR2 y CDR3. La región CDR3 presenta mayor variabilidad, debido a la adición y remoción de nucleótidos, que se produce durante la unión de los segmentos génicos que dan lugar a la generación de los dominios VH y VL.

Los genes que codifican los dominios V de las Ig, están en configuración germinal (sin rearrreglos) en todas las células, excepto los linfocitos B. Durante la maduración de los linfocitos B, los diferentes genes presentes en el ADN de la línea germinal sufren rearrreglos por recombinación somática. Las diferentes combinaciones resultantes hacen posible la gran diversidad de los dominios V de los anticuerpos. Las diferentes especificidades de anticuerpos generadas se denominan repertorio primario de anticuerpos. La diversidad del repertorio primario de los linfocitos B maduros puede aumentar aún más con el proceso maduración de la afinidad, para generar anticuerpos con especificidad más alta por el antígeno que produce el estímulo.

Debido a la gran especificidad que presentan los anticuerpos por sus antígenos, estos tienen diversas aplicaciones en el campo de la investigación, como herramientas de técnicas moleculares, con gran utilidad también en el área de la medicina. En el caso particular de la medicina, los anticuerpos se han venido empleando para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Es por medio de la biotecnología y los avances en estudios moleculares los

que han permitido mejorar la manera de obtenerlos e incrementar a la vez su eficiencia y estabilidad.

En los últimos años se ha dado un gran avance en la tecnología para la producción de anticuerpos. En un principio se obtenían inmunizando animales como antiseros o anticuerpos policlonales y se utilizaban como seroterapia. El problema con estos era que los anticuerpos obtenidos variaban mucho de un animal a otro, tanto en cantidad como en especificidad y afinidad, además de las reacciones secundarias por la presencia de otras proteínas en el antisuero. Por lo que se desarrollaron los anticuerpos monoclonales, por medio de la formación de hibridomas, los cuales implican procesos laboriosos. Más recientemente, con los avances en técnicas de ADN recombinante, se ha conseguido la creación de anticuerpos. Estos anticuerpos se pueden obtener insertando la secuencia que lo codifica en un sistema bacteriano, para que lo produzca como proteína recombinante. Pero para obtener estos anticuerpos, es necesario contar con un sistema que pueda expresarlo, así como con la secuencia que codifique un anticuerpo con especificidad al antígeno que se desee.

A partir de una biblioteca genómica diversa del repertorio inmunológico, se pueden aislar anticuerpos específicos empleando un proceso de selección eficiente. La técnica de despliegue en fagos se ha empleado para la obtención de anticuerpos recombinantes ya que facilita su obtención de manera rápida y económica.

Esta técnica, consiste en generar proteínas como los anticuerpos para un antígeno específico, mediante el empleo de un vector de clonación con características de plásmido y de fago filamentoso (fagémido) que infecta a la bacteria *Echerichea coli* (Figura 3). El ADN que codifica la proteína de interés (en estos casos, un anticuerpo), se clona dentro del genoma del fago, como proteína de fusión al gen que codifica una de las proteínas de superficie de la cápside del fago. Para el bacteriófago M13, generalmente se clona al gen de la proteína pIII, que permite desplegar insertos largos de ADN. Posteriormente se seleccionan los fagos que hayan expresado la proteína de interés en su superficie, mediante

su exposición con el antígeno en estudio (una citocina). Los fagos que se unieron al antígeno son recuperados para infectar más bacterias *E. coli*, repitiéndose este procedimiento en varias rondas de selección, para obtener en la última ronda los anticuerpos con más afinidad al blanco de interés (Barbas *et al.*, 2001).

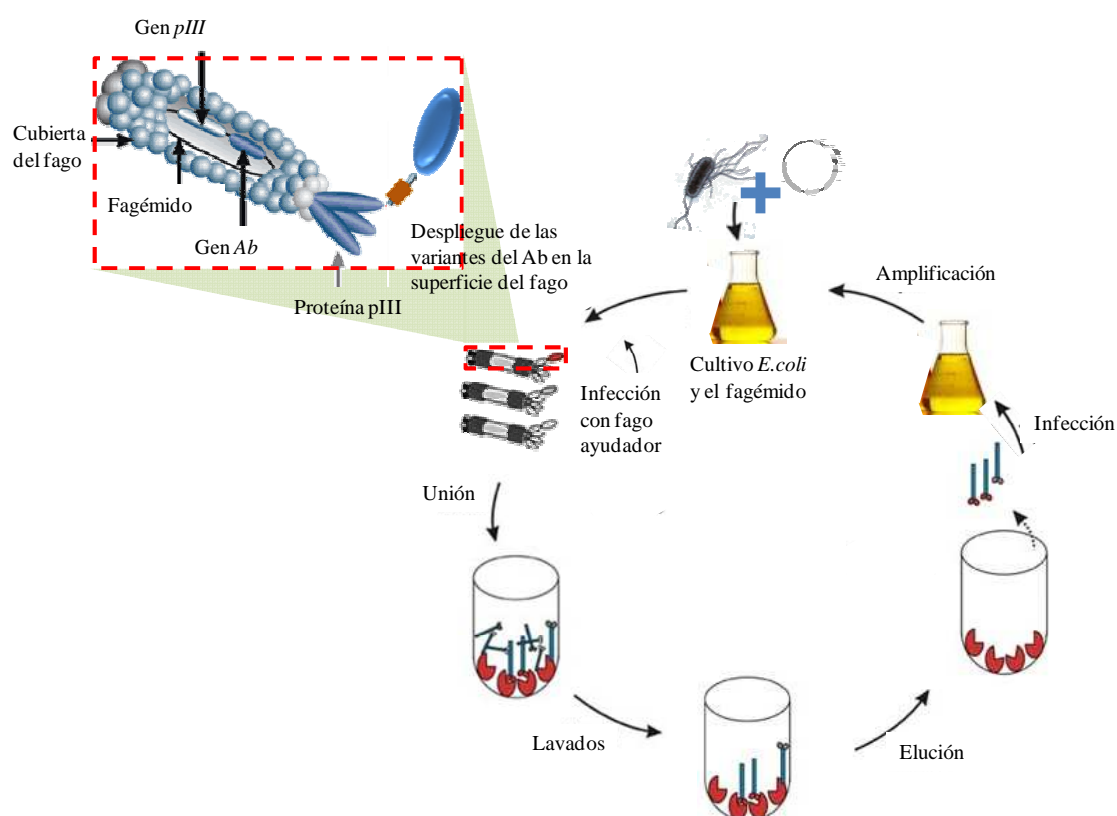


Figura 3. Técnica de despliegue en fagos. Modificado de www.creative-biolabs.com/phagedisplay1.htm. www.oem.abdserotec.com/custom_monoclonals/hucal-368.html.

Es posible clonar la secuencia de la región variable de un anticuerpo (VH-VL) en sistemas bacterianos, para producirlas como proteínas recombinantes capaces de unirse a un antígeno de interés. Sin embargo, al tratar de producir un sólo dominio de la región VH-

VL, presentan problemas de estabilidad, es por ello que una alternativa a emplear son un tipo de anticuerpos que presenten dominios V sencillos, presentes en peces cartilagosos (tiburones, rayas y quimeras) y camélidos. (Greenberg *et al.*, 1995 y Nuttall *et al.* 2001).

I.2.1 Anticuerpos de tiburón IgNAR

El sistema inmunológico adaptativo de los tiburones se encuentra constituido por las inmunoglobulinas (Ig), los receptores de células T (TCR) y el complejo mayor de histocompatibilidad. Los tiburones ante la exposición a un antígeno tienen la capacidad de generar una respuesta humoral específica con otros receptores de antígeno, además de las Ig y TCR (Greenberg *et al.*, 1995).

En el tiburón nodriza (*Ginglymostoma cirratum*) se encontró un nuevo miembro de la superfamilia de las Ig denominado nuevo receptor de antígeno (IgNAR), el cual se encuentra en forma soluble o anclado a membrana. Con una alta expresión en el bazo. Estructuralmente, un IgNAR consiste en un dímero de dos cadenas pesadas, cada una consta de cinco dominios constantes (C), uno variable (V) y carecen de cadena ligera (L), por lo que la región variable de estos anticuerpos consta de un dominio V (vNAR) por cada cadena. Los dos dominios vNAR no se encuentran asociados, por lo que esto les confiere a los IgNAR un tamaño menor (Greenberg *et al.*, 1995 y Roux *et al.*, 1998) (Figura 4).

La diferencia estructural del dominio vNAR que permite se encuentre de forma independiente también se ha observado en camélidos, haciendo que la región variable constituida por dos dominios en este tipo de anticuerpos sea más pequeña con respecto a la región variable que presenta 4 dominios en anticuerpos de humano o convencionales. A pesar de tener sólo dos dominios vNAR, la alta especificidad de los IgNAR hacia los antígenos no se ve limitada.

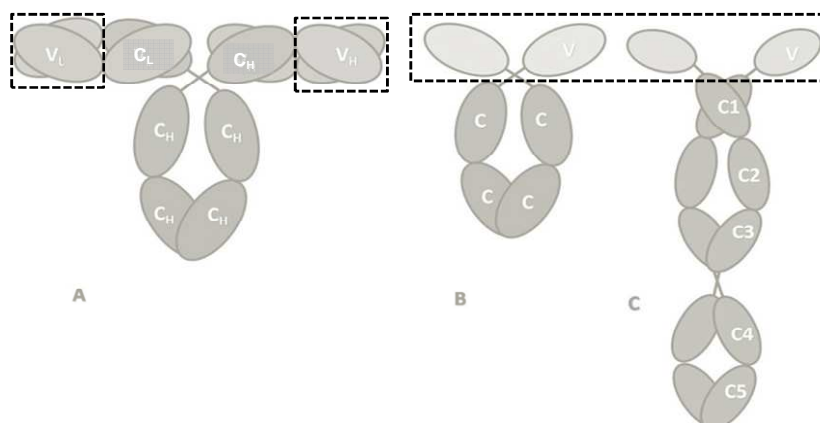


Figura 4. Estructura de diferentes anticuerpos. A: Anticuerpo IgG humano (~150 kDa), compuesto por dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L). Los dominios variables de los extremos de las cadenas H y L constituyen la región variable. B: Anticuerpo de camélidos (~78 kDa), compuesto por dos cadenas pesadas, cada una consta de dos dominios constantes y un dominio variable (región variable). C: Anticuerpo de tiburón IgNAR (~95 kDa), compuesto por dos cadenas pesadas, cada una formada por cinco dominios constantes y un dominio variable (región variable). Las regiones variables se encuentran remarcadas en negro. Basada en Dooley *et al.*, 2003 y Stanfield *et al.*, 2004.

Existen tres clases de vNAR, dos de ellas se clasifican dependiendo de la presencia o ausencia de cisteínas no canónicas (no conservadas). La clase I tiene cisteínas en las secuencias altamente conservadas “*framework*” (FR) 2, FR4 y otras 2 ó 4 cisteínas dentro de la secuencia del CDR3, mientras que la clase II presenta una cisteína no canónica en las secuencias del CDR1 y CDR3 (Roux *et al.*, 1998). El vNAR clase III se caracteriza por presentar un residuo conservado de triptófano dentro del CDR1. La clase III fue encontrado en las primeras etapas de desarrollo de estos organismos y presenta una diversidad limitada, por lo que probablemente actúa como mecanismo de defensa previo al desarrollo de las otras dos clases de vNAR (Nuttall *et al.* 2001).

Los vNAR, concentran su diversidad en sus CDR (CDR1 y CDR3) permitiéndoles reconocer una amplia variedad de antígenos. El CDR3 de los vNAR es más largo comparado con los CDR3 de las Ig de humano y ratones, confiriéndole posiblemente un

mayor alcance a sitios antigénicos generalmente no accesibles por anticuerpos convencionales (Nuttall *et al.* 2001y Streltsov *et al.*, 2004).

Los vNAR generan su diversidad por rearrreglos, resultando en un repertorio primario diverso. El repertorio primario puede sufrir maduración de afinidad ante la presencia de un antígeno con lo que se incrementa. Esto ocurre mediante cuatro eventos de recombinación con adición de nucleótidos y una alta tasa de hipermutaciones, lo que incrementa considerablemente la diversidad del CDR3 (Greenberg *et al.*, 1995; Diaz *et al.*, 1998; Roux *et al.*, 1998 y Stanfield *et al.*, 2004).

Se ha reportado que mediante la construcción de bibliotecas genómicas a partir del repertorio primario de anticuerpos de tiburón, es decir bibliotecas naïve o sin inmunizar, se pueden obtener clonas que expresan vNAR con unión específica por un antígeno. Por lo que las bibliotecas naïve de vNAR representan una fuente valiosa de agentes con alta afinidad (Nuttall *et al.* 2002). Lo anterior, aunado a las características de su tamaño pequeño, CDR3 diverso y largo, gran estabilidad, además de ser termoestables, los hace idóneos para su uso biotecnológico y biomédico.

En trabajos realizados previamente en el laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas del Departamento de Biotecnología del CICESE, se han obtenido fragmentos de anticuerpos de tiburón vNAR contra diferentes antígenos a partir de bibliotecas fasmídicas. Entre estos se puede mencionar, para el caso de bibliotecas inmunes, los vNAR aislados contra las citocinas TNF- α y VEGF₁₆₅ (Camacho Villegas, 2007), péptidos de la telomerasa (Quezada Iñiguez, 2008) y para bibliotecas naïve, se seleccionaron vNAR contra: veneno de alacrán (*Androctonus australis*) (Montoya Bonillas, 2010), la proteína PA de *Bacillus anthracis* (Mendoza Porras, 2008), las citocinas TNF- α y VEGF₁₆₅ (Camacho Villegas, 2007), entre otros. Los vNAR aislados en estos trabajos presentaron afinidad por sus antígenos con capacidad de neutralizarlo, incluso en aquellos obtenidos de bibliotecas naïve. Lo anterior denota la amplia aplicación que pueden tener los vNAR como herramientas potenciales en la investigación, diagnóstico y medicina, lo que da la pauta

para la obtención de los fragmentos de dominio sencillo vNAR de anticuerpos de tiburón con afinidad por IL-18, para emplearlos en las diferentes patologías involucran a esta citocina.

I.2.2 Anticuerpos contra IL-18

Las citocinas forman parte del sistema inmunitario e intervienen en la regulación de las funciones celulares ya que son las mediadoras de la comunicación extracelular, activando la señalización intracelular mediante la unión a su receptor correspondiente, lo cual conduce a la activación de factores de transcripción que se encargan de la regulación de la expresión de genes particulares.

Cuando el sistema inmunológico sufre un desbalance y expresa de manera desregulada sus componentes, como las citocinas, estas dan lugar a respuestas inmunitarias inadecuadas que pueden causar lesión tisular, hecho que se asocia a patologías y si no se controlan las respuestas inadecuadas pueden llegar a ser fatales (Abbas *et al.*, 2007 y Rosado Perez *et al.*, 2007).

IL-18 es un claro ejemplo de las complicaciones que se pueden desencadenar cuando ocurre un desbalance del sistema inmunológico. A pesar de su implicación en varias patologías, la neutralización de esta citocina a nivel terapéutico se encuentra realmente relegada. Aunque se ha documentado en estudios la obtención de anticuerpos de tipo monoclonal contra IL-18, así como anticuerpos recombinantes, principalmente de origen murino (Argiriadi *et al.*, 2009 y Takayuki *et al.*, 2005); estos aún no se aplican terapéuticamente, por lo que posiblemente, es necesario proporcionar herramientas con características ideales para esclarecer la implicación patológica de IL-18 y con ello avanzar a bloquear su acción fisiológica, en el caso de que su neutralización mejore la salud del paciente.

Una alternativa a lo anterior, es el aislamiento de anticuerpos vNAR, haciéndolos ideales por sus características estructurales (tamaño pequeño, gran estabilidad, CDR3 diverso y largo), además, pueden ser obtenidos por la técnica de despliegue en fagos, que presenta las ventajas de permitir producirlos de manera rápida, eficiente y con menores costos, por lo que en este proyecto se propone la obtención de un vNAR con afinidad por IL-18, que pueda ser empleado para elucidar las implicaciones de la IL-18 en el SM, así como un método de diagnóstico e incluso como una posible herramienta para el tratamiento de alguna enfermedad que la involucre.

I.3 Justificación

El síndrome metabólico (SM) es un concepto clínico que se compone por la asociación de varias enfermedades como obesidad, resistencia a insulina, diabetes mellitus tipo 2 y aterosclerosis, entre otras, las cuales se encuentran vinculadas fisiopatológicamente por un estado inflamatorio que contribuye al desarrollo de estas enfermedades. Se ha documentado que en ese estado inflamatorio está implicada IL-18, lo que remarca su importancia como blanco terapéutico.

Dado lo anterior el aislamiento de fragmentos vNAR de anticuerpos de tiburón con afinidad por IL-18, puede ser una herramienta factible que contribuya a elucidar las implicaciones de esta citocina en el SM, así como en el diagnóstico e incluso en el tratamiento de alguna enfermedad que la involucre.

I.4 Objetivo general

Obtener fragmentos vNAR de los anticuerpos del tiburón *Heterodontus francisci* con afinidad por IL-18 humana.

I.4.1 Objetivos específicos

- Construir una biblioteca inmune de los fragmentos vNAR de anticuerpos del tiburón *Heterodontus francisci* contra IL-18.
- Aislar fragmentos vNAR que reconozcan IL-18 a partir de una biblioteca no inmune.
- Expresar y purificar los fragmentos vNAR que presenten reconocimiento por IL-18.

I.5 Hipótesis

Los fragmentos vNAR de anticuerpos del tiburón *Heterodontus francisci* presentan afinidad por la IL-18 humana.

II. Materiales y métodos

La estrategia general que se siguió para la obtención de fragmentos variables de dominio sencillo vNAR que reconocen a la citocina humana recombinante IL-18 mediante la técnica de despliegue en fago se muestra en la Figura 5. En ella se indica la construcción de una biblioteca inmune así como el empleo de una no inmune (naïve).

Para la biblioteca inmune se inmunizó un tiburón *Heterodontus francisci* con IL-18. Una vez concluido el periodo de inmunización se procedió con la extracción del ARN total del bazo y la síntesis el ADN complementario (ADNc). Posteriormente los fragmentos vNAR fueron amplificados y ligados en un vector previamente digerido con una endonucleasa.

Considerando que existen evidencias de la obtención de vNAR de bibliotecas no inmune mediante la técnica de despliegue en fago (Nuttall *et al.*, 2002), se empleó una biblioteca naïve elaborada previamente en el Laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas del Departamento de Biotecnología del CICESE. A partir de esta se llevó a cabo la bioselección mediante cuatro rondas contra IL-18. Una vez que se evaluaron las secuencias de las clonas seleccionadas se procedió con la expresión de las proteínas recombinantes, el análisis de reconocimiento contra IL-18, su purificación y cuantificación.

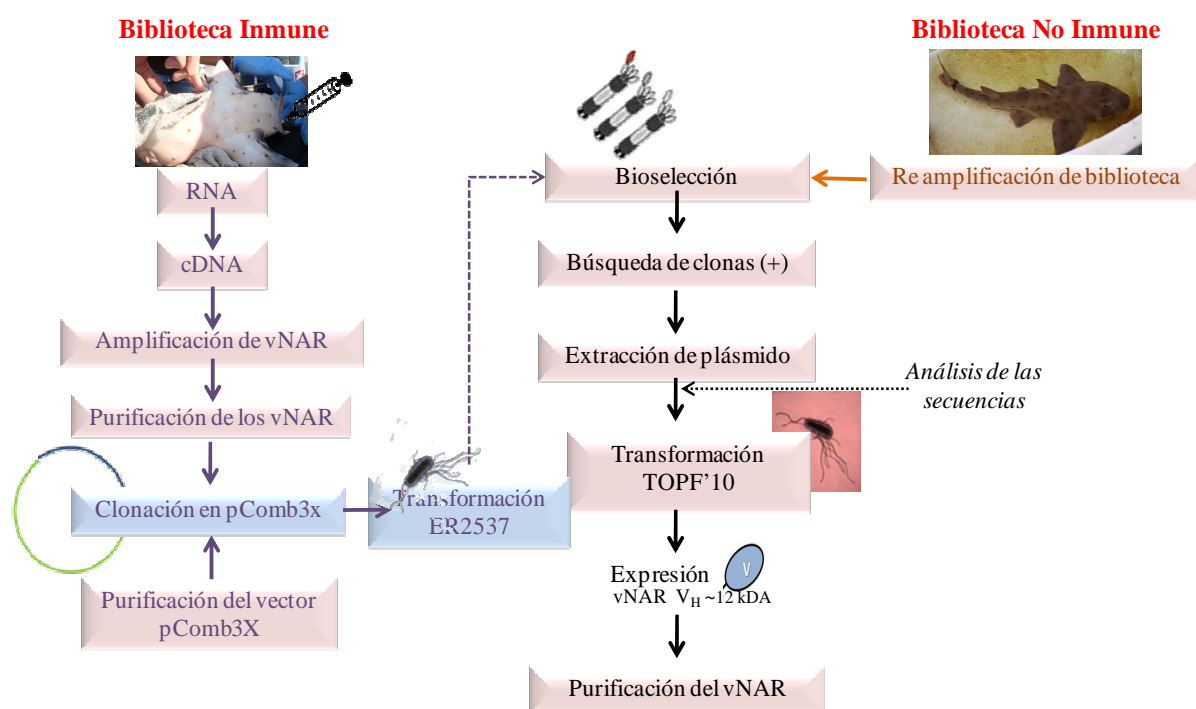


Figura 5. Estrategia general para la obtención de fragmentos de dominio sencillo vNAR con afinidad por IL-18.

II.1 Biblioteca inmune

II.1.1 Inmunización

Se inmunizó un tiburón *Heterodontus francisci* con IL-18 humana recombinante (Medical & Biological Laboratories) durante un periodo de 143 días, de acuerdo al protocolo de inmunización que se presenta en la Tabla II.

Tabla II. Protocolo de inmunización.

Inmunización	Día	Vía de administración	Inmunógeno
1	0	Intravenosa	Ag + AC de Freund
2	15	Intramuscular	Ag + AI
3	30	Intramuscular	Ag + PBS
4	45	Intramuscular	Ag + PBS
5	60	Intramuscular	Ag + PBS
6	75	Intramuscular	Ag + PBS
Refuerzo	143	Intramuscular	Ag + PBS

Ag: 2.5 µg de IL-18.

AC: Adyuvante completo de Freund (Sigma).

AI: Adyuvante incompleto de Freund (Sigma).

II.1.2 Purificación del ARN total a partir del bazo del tiburón

Una vez concluido el periodo de inmunización se sacrificó el tiburón y se obtuvo el bazo (5.42 g). Para la extracción del ácido ribonucleico (ARN) total, el bazo fue homogenizado en un tubo cónico mediante un homogenizador mecánico (ProScientific, PRO250) con 15 ml de reactivo Tri Reagent (Sigma) e incubado a temperatura ambiente durante 5 min. La mezcla se centrifugó (10 min, 4000 x g, 4°C) y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, se adicionó 1.5 ml de 1-bromo,3-cloropropano (BCP, Sigma), se mezcló vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente 15 min. Se centrifugó (15 min, 12,000 x g, 4°C) y se observó la formación de tres capas, acuosa (que contiene el ARN), interfase y

fase orgánica. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo, se agregó 7.5 ml de isopropanol y se incubó 10 min a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó (10 min, 12,000 x g a 4°C) y se descartó el sobrenadante. El ARN precipitado fue lavado con etanol al 75% (Agua-DEPC) y centrifugado (30 min, 14,000 x g a 4°C), se descartó el sobrenadante y el pellet se secó a temperatura ambiente. El ARN se disolvió en 500 µl de agua-DEPC y se hicieron alícuotas de 30 µl las cuales fueron almacenadas a -70°C. El ARN purificado fue visualizado en un gel desnaturalizante de agarosa (1.4%) (Sambrook y Russell, 2001) y su concentración y pureza determinada mediante un espectrofotómetro NanoVue (GE Healthcare).

II.1.3 Síntesis de la primera cadena de ADNc a partir del ARN total

La síntesis de ADNc se realizó por medio del kit First-Strand (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del proveedor. En cada reacción de 20 µl se empleó 50 ng de ARN total y el oligonucleótido reverso R-BamH1 como oligonucleótido específico (Tabla III). Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su posterior empleo.

Tabla III. Lista de oligonucleótidos empleados en este trabajo.

a) Síntesis de ADNc
R-BamH1- TCAAAGGGATCCCACAGTCAGCACGGTGCCAGC
b) Amplificación de fragmentos vNAR
F-557 – AGGCGGGGCCAGGCGGCCATGGCC-GCACGGCTTGAACAAACACC
F-558 – AGGCGGGGCCAGGCGGCCATGGCC-CAACGGGTTGAACAAACACC
F-559 – AGGCGGGGCCAGGCGGCCATGGCC-ACAAGGGTAGACCAAACACC
F-560 – AGGCGGGGCCAGGCGGCCATGGCC-GCAAGGGTGGACCAAACACC
F-561 – AGGCGGGGCCAGGCGGCCATGGCC-GCATGGGTAGACCAAACACC
F-562 – AGGCGGGGCCAGGCGGCCATGGCC-GCAAGCCTGGACCAAACACC
F-563 – AGGCGGGGCCAGGCGGCCATGGCC-GCAAGCCTGGACCAAACACC
R-564 – GTGGAGCAGGCCGGCCTGGCCGTTACAGTCAGCACGGTGCCAGCTC
c) Secuenciación
ompseq – AAGACAGCTATCGCGATTGCAG
gback – GCCCCCTTATTAGCGTTTGCCATC

Nota: En cursiva se indica el sitio de restricción para la endonucleasa *Sfi*I.

II.1.4 Construcción de la biblioteca vNAR

II.1.4.1 Amplificación de los fragmentos vNAR mediante PCR

Los fragmentos variables del IgNAR (vNAR) se amplificaron por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleado como templado el ADNc previamente sintetizado y reacciones individuales de oligonucleótidos (F557-563 y R564), los cuales incluyen sitios de restricción para la endonucleasa *Sfi*I (Tabla III). El volumen de reacción de PCR fue de 50 μ l, la cual contenía amortiguador de PCR 1X, $MgCl_2$ 3 mM, dNTPS 0.2 mM, 2 μ l de ADNc, 3U Taq HotStart DNA polimerasa (GeneChoice) y 0.4 μ M de cada oligonucleótido. Las condiciones del PCR fueron las siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización de 95°C por 15 min, 40 ciclos de 95°C por 30 s, 56°C por 45 s y 72°C por 45 s, y un ciclo final de extensión a 72°C por 5 min.

Los productos amplificados por PCR fueron evaluados en un gel de agarosa al 1.8%. Una vez que se corroboró el tamaño del fragmento esperado se realizaron reacciones de PCR suficientes, con el fin de obtener la cantidad de ADN necesario para la generación de la biblioteca inmune. Dichas reacciones se purificaron a partir de un gel preparativo de agarosa al 1.8%, empleando el kit Wizard SV gel and PCR Clean-up System (Promega). El ADN eluído en agua destilada estéril, fue evaluado en un gel de agarosa y cuantificado con un espectrofotómetro NanoVue (GE Healthcare).

II.1.4.2 Obtención del fagémido pComb3X

El vector empleado en este trabajo fue el fagémido pComb3X (Barbas *et al.* 2001), el cual presenta sitios de restricción para la endonucleasa *Sfi*I para la inserción de un gen y su despliegue en fago, el promotor LacZ inducible por IPTG (isopropil- β -D-tio-galactósido) que promueve su expresión, así como secuencias específicas que permiten su purificación (6xHis), inmunodetección (HA) y un codón de paro ámbar para detener la traducción de la

proteína de interés (Figura 6). Con el propósito de obtener plásmido suficiente para este trabajo, se transformaron 50 μ l de células electrocompetentes de la cepa *E. coli* ER2537 con 1 μ g del fagémido pComb3X. La mezcla de células y plásmido se transfirió a una celda (0.2 mm) previamente enfriada y se electroporó con un electroporador Micropulser marca BioRad (2.5 kV, 25 μ F, 200 Ω). Las células se recuperaron en 3 ml de medio SOC (super optimal broth with catabolite repressor) e incubaron 1 h, a 37°C y 250 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron 7 ml de medio SB (super broth) con carbenicilina (100 μ g/ml) y se extendieron diferentes volúmenes (10, 50 y 100 μ l) en placas de medio LB (Luria Bertani) agar con carbenicilina (100 μ g/ml) las cuales se incubaron por 12h a 37°C.

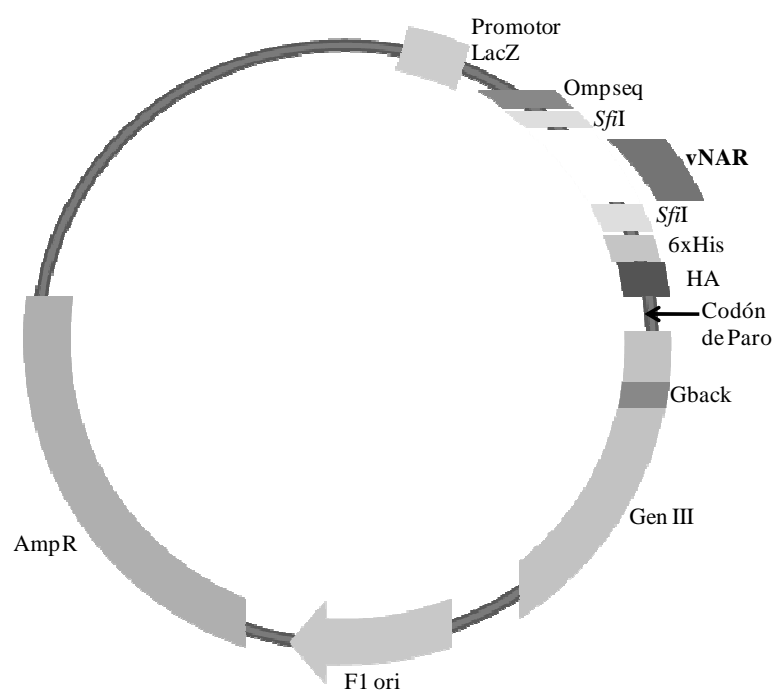


Figura 6. Fagémido pComb3X (modificado de Barbas *et al.* 2001).

Una vez que se observó el crecimiento en placa, se tomó una colonia aislada para inocular 2 ml de medio SB (Super Broth) con 2 μ l de carbenicilina (100 mg/ml) y se incubó durante 8

h (37 °C, 250 rpm). De este cultivo se tomaron 100 µl para inocular 100 ml de medio SB con carbenicilina (100 µg/ml) y se incubó por 12 h, mismas condiciones de temperatura y agitación.

A partir del cultivo anterior, se purificó el fagémido pComb3X empleando el kit QIAfilter Midi (Qiagen). El ADN purificado fue resuspendido en 250 µl de agua destilada estéril, evaluado en un gel de agarosa al 0.8% y cuantificado en un espectrofotómetro NanoVue (GE Healthcare). El plásmido purificado fue almacenado a -20°C hasta su empleo.

II.1.4.3 Digestión enzimática de los vNAR y el fagémido pComb3X

Mediante la endonucleasa *Sfi*I HC (Promega), se llevó a cabo la digestión enzimática de los fragmentos amplificados por PCR (II.1.4.1) y el fagémido purificado (II.1.4.2).

Un total de 9 µg de fragmentos amplificados por PCR, fueron digeridos en nueve reacciones individuales. El volumen de reacción fue de 20 µl y contenía 1 µg de ADN, 5U de enzima *Sfi*I, amortiguador B 1X y 2 µg de BSA (Albúmina de suero bovino). La reacción se incubó a 50°C por 5h, mezclando manualmente cada 30 min. Concluido el tiempo de incubación, se inactivó la enzima a 65°C por 15 min.

En el caso del fagémido pComb3X, se emplearon 24 µg de ADN en 3 reacciones con un volumen de 20 µl cada una. La reacción contenía 7 µg de ADN, 40 U de enzima *Sfi*I, amortiguador B 1X y 2 µg de BSA. Las condiciones de incubación e inactivación son como se las describió para los fragmentos amplificados por PCR.

Una vez concluida la digestión, tanto los productos de PCR como el vector digerido, fueron purificados con el kit comercial QIAquick Spin Handbook Gel Extraction kit (Qiagen). En el caso de los productos amplificados por PCR, estos fueron purificados directamente de la mezcla de digestión. Sin embargo, para el fagémido se llevó a cabo su electroforesis en un

gel preparativo al 0.8% de agarosa, recuperando los fragmentos de 3500 pb y 1500 pb, los cuales corresponden al vector digerido en ambos sitios de corte y al fragmento del relleno (stuffer), respectivamente. En ambos casos el ADN fue eluido con agua destilada estéril.

El ADN purificado (fragmentos vNAR, fagémido y stuffer) fue evaluado en un gel de agarosa, cuantificado con un espectrofotómetro NanoVue y almacenado a -20°C hasta su empleo.

II.1.4.4 Ligación

A partir del vNAR y el vector obtenido en el paso anterior, se procedió a su ligación empleando la enzima T4 ligasa (Promega).

Como parte del procedimiento de ligación, se realizó una reacción de prueba a pequeña escala, la cual consistió en lo siguiente:

- 1) Vector digerido en ambos sitios de corte, fragmento de relleno y enzima (control positivo).
- 2) Vector digerido en ambos sitios de corte, sin fragmento de relleno y enzima (control negativo).
- 3) Vector digerido en ambos sitios de corte, sin fragmento de relleno y sin enzima (control negativo).
- 4) Vector digerido en ambos sitios de corte, inserto vNAR y enzima (muestra).

El volumen de cada reacción fue de 10 µl y se emplearon 3U de T4 ligasa, amortiguador de ligación 1X y 100 ng vector en una proporción 1:1, 1:3 y 1:5 (vector:inserto). Posterior a su incubación por 12 h a temperatura ambiente, la enzima fue inactivada a 65°C por 15 min y la reacción fue almacenada a -20°C hasta su empleo posterior.

II.1.4.5 Transformación

Los productos de cada ligación se emplearon para transformar células electrocompetentes de *E. coli* cepa ER2537. Se mezclaron 50 μ l de células y 2.0 μ l de la reacción de ligación y se procedió como se describe en el apartado II.1.4.2. Los volúmenes de cultivo extendidos en las placas de agar fueron 1, 10 y 100 μ l. La eficiencia de ligación y transformación se expresó como unidades formadoras de colonias (ufc).

II.2 Biblioteca no inmune

A partir de una biblioteca de fagos procedente de un tiburón *H. francisci* no inmunizado (Biblioteca Naïve) se realizaron rondas de selección contra la citocina humana IL-18 recombinante.

II.2.1 Reamplificación de la Biblioteca no Inmune

Se emplearon 50 μ l de células *E. coli* cepa ER2537 electrocompetentes para inocular 50 ml de medio SB, el cual se incubó (37°C, 250 rpm) hasta que alcanzó una densidad óptica de $DO_{600}=1$. Posteriormente, se agregaron 10 μ l de la biblioteca de fagos no inmune (Biblioteca Naïve), se incubó a temperatura ambiente durante 15 min y agregaron 10 μ l de carbenicilina (100 mg/ml).

El cultivo de 50 ml se transfirió a un matraz de 500 ml y se incubó por 1 h a 37°C y 300 rpm. Se agregaron 15 μ l de carbenicilina (100 mg/ml) y se incubó nuevamente bajo las mismas condiciones. Posterior a este tiempo, se agregó 2 ml de fago ayudador VCM13 (10^{12} - 10^{13} ufc/ml), 148 ml de medio SB (precalentado a 37°C), 75 μ l de carbenicilina (100 mg/ml) y se incubó por 2h en las condiciones de temperatura y agitación previamente descritas. Finalmente, se agregaron 280 μ l de kanamicina (50 mg/ml) y se incubó por 12 h, mismas condiciones.

El cultivo se transfirió a tubos de 50 ml y se centrifugó (3,000 x g, 15 min, 4°C). Para precipitar los fagos, el sobrenadante fue transferido a un matraz de 500 ml, se agregó 8 g de Polietilenglicol 8000 (PEG), 6 g de cloruro de sodio (NaCl) y se mezcló (5min, 37°C, 300 rpm). El cultivo fue vertido en tubos de 50 ml y se incubó en hielo por 30 min. Previa centrifugación (15,000 x g, 15 min a 4°C), el sobrenadante fue descartado y el botón de fagos secado a temperatura ambiente. Los fagos fueron resuspendidos en 2 ml de BSA 1% en PBS 1X y centrifugados nuevamente (13,800 x g 5 min, a 4°C). El sobrenadante fue

filtrado (0.2 μm), etiquetado como la ronda 0 (R0) y empleado para la ronda 1 de selección (R1).

II.2.2 Rondas de selección de los fagos que reconocen la IL-18

Se inmovilizaron 50 μl de IL-18 (5 $\text{ng}/\mu\text{l}$) en dos pozos de una placa de ELISA COSTAR EIA/RIA Plate (Corning Inc.) durante 12 h a 4°C. La citocina fue descartada y se bloqueó por 1 h a 37° con 150 μl de solución de bloqueo (BSA 3% en PBS 1X). Posterior al bloqueo, se agregaron 50 μl de los fagos obtenidos de la reamplificación (R0) y se incubó por 2h a 37°C. Una vez concluido el tiempo de incubación se prosiguió con los lavados astringentes, los cuales consistieron en subir y bajar cinco veces 150 μl de PBST (0.05% Tween-20 en PBS 1X) en cada pozo, incubando 5 minutos a temperatura ambiente entre cada lavado. Este proceso se repitió en cada una de las rondas de la siguiente manera: 5 lavados para la ronda 1; 10 para la ronda 2; 15 para la ronda 3 y 20 para la ronda 4. Después de los lavados, se agregaron 50 μl de tripsina (10 mg/ml en PBS 1X) y se incubó por 30 min a 37°C. Posteriormente, se lavó vigorosamente 10 veces y los fagos fueron transferidos a un cultivo de 2 ml de células *E. coli* cepa ER2537 con una $\text{DO}_{600} = 1$. Se incubó 15 minutos a temperatura ambiente para permitir la infección y se agregó 6 ml de medio SB y 1.6 μl de carbenicilina (100 mg/ml).

Con el propósito de establecer el título de entrada, en paralelo se creció un cultivo de células *E. coli* cepa ER2537 en 2 ml de medio SB a una $\text{DO}_{600} = 1$, se tomaron 50 μl y se infectaron con 1 μl de una dilución 10^{-8} de la preparación de fagos (obtenidos en la ronda 0 ó la ronda anterior a la que se va a obtener). Las células infectadas fueron incubadas 15 minutos a temperatura ambiente y sembradas en una placa de LB agar con carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), la cual se incubó 12h a 37° C.

La estimación de las clonas infectadas después de los lavados, es decir el título de salida, se calculó a partir del cultivo de 8 ml. Para lo cual, se tomaron 2 μl y se diluyeron en 200 μl

de medio SB, de los cuales se sembraron 10 y 100 μ l en placas de LB agar con carbenicilina (100 μ g/ml). Los títulos de entrada y de salida, se determinaron calculando el número de transformantes al multiplicar el número de colonias por el volumen de cultivo y dividir entre el volumen extendido en placa, todo multiplicado por el factor de dilución.

El cultivo de 8 ml se incubó por 1 h, a 37°C y 250 rpm, se agregaron 2.4 μ l de carbenicilina (100 mg/ml) y se incubó nuevamente bajo las mismas condiciones. Posteriormente, se transfirió a un matraz de 500 ml, se adicionó 1 ml de fago ayudador VCSM13, 91 ml de medio SB y 46 μ l de carbenicilina (100 mg/ml) y se incubó por 2 h más. Finalmente, se agregó 140 μ l de kanamicina (50 mg/ml) y se incubó por 12 h, a 37°C y 250 rpm.

Este proceso se repitió en cada una de las rondas de selección, exceptuando porque en las siguientes rondas se empleó un pozo de la placa de ELISA con la citocina inmovilizada y se incrementó el número de lavados.

II.2.3 Búsqueda de clonas con el inserto vNAR por PCR y purificación de plásmido

A partir de la última ronda de selección (Ronda 4) se aislaron 20 clonas, las cuales fueron evaluadas por PCR de colonia para identificar aquellas que presentaran el fragmento de interés. Para la reacción de PCR, se empleó una mezcla de oligonucleótidos sentido (F-557-F563) y el antisentido (R-564) (Tabla III). El volumen de reacción de PCR fue de 50 μ l, la cual contenía amortiguador de PCR 1X, MgCl₂ 3 mM, dNTPS (desoxirribonucleótidos trifosfato) 0.2mM, una fracción de colonia como templado, 2U GoTaq Flexi DNA polimerasa (Promega) y la mezcla de oligonucleótidos 0.4 μ M. Las condiciones del PCR fueron las siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización de 95°C por 2 min, 30 ciclos de 95°C por 45 s, 56°C por 45 s y 72°C por 45 s y un ciclo final de extensión a 72°C por 5 min. Los productos de la amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 1.8%.

A partir de las clonas que presentaron el fragmento esperado, se realizó un cultivo de 6 ml en medio SB con carbenicilina (100 µg/ml) y se purificó el fagémido por lisis alcalina (Sambrook y Russel, 2001). El ADN purificado fue evaluado en un gel de agarosa al 0.8 % y cuantificado con un espectrofotómetro NanoVue.

Los plásmidos purificados fueron enviados al laboratorio Seqxcel (San Diego, California) para su secuenciación de acuerdo a las indicaciones sugeridas por el mismo. Cada reacción consistió en 750 ng de ADN (templado) y 6.4 pmoles del oligonucleótido en un volumen final de 12 µl. Los oligonucleótidos empleados fueron ompseq y gback (Tabla III).

Una vez que se recibieron las secuencias, estas fueron analizadas con los servidores: ExPASy Proteomics Server (<http://www.expasy.org/>) y el paquete informático Multiple Sequence Alinment (Corpet, 1988). Las características que se analizaron de cada secuencia fueron, la presencia de fragmentos de vNAR, la ausencia de sitios de paro dentro del fragmento vNAR y su correcto marco de lectura. Finalmente, las secuencias con estas características fueron seleccionadas y comparadas con otras previamente aisladas de la misma biblioteca.

II.2.4 Expresión de la proteína vNAR recombinante

Una vez que se seleccionaron aquellos plásmidos con los vNAR en correcto marco de lectura, estos fueron empleados para transformar células de *E. coli* de la cepa TOP10F' y proceder con la expresión de la proteína recombinante. La proteína vNAR recombinante expresada bajo el control del promotor inducible por IPTG (isopropil-β-D-tio-galactósido) presenta secuencias específicas para su inmunodetección (epítipo HA) y purificación (6xHis).

La transformación se realizó como se describe en el apartado II.1.4.2. Con el propósito de confirmar la presencia del inserto de interés, se analizaron cinco colonias mediante PCR

como se describe en el apartado II.2.3 empleando los oligonucleótidos ompseq y gback (Tabla III),

Las clonas seleccionadas se crecieron en 5 ml de medio SB con carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 12 h a 37°C y 250 rpm. De cada cultivo, se tomaron 3 ml para inocular 300 ml de medio SB con carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubaron (37°C a 250 rpm) hasta llegar a una $\text{DO}_{600} = 0.7$. Una vez alcanzada la DO, se indujo con 600 μl de IPTG 0.5M y se incubó durante 5 h. Transcurrido el tiempo de inducción, cada cultivo se dividió en tres partes (100 ml, cada una) y se centrifugó (4000 x g, 15 min). El sobrenadante fue descartado y el botón bacteriano almacenado a -20°C hasta su procesamiento.

Adicionalmente, como control negativo se empleó un cultivo de la cepa TOP10F' sin transformar (virgen), el cual se procesó de la misma manera, excepto que en este caso no se adicionó carbenicilina al medio de cultivo.

II.2.5 Extracción de la proteína vNAR recombinante

A partir del botón celular obtenido de la inducción, se procedió a extraer la proteína vNAR recombinante mediante tres métodos con el fin de evaluar el rendimiento. Se emplearon dos métodos en condiciones nativas: extracción periplásmica por choque osmótico y extracción mediante homogenización mecánica con un homogenizador Mini Bead Beater (BioSpec Products). El tercer método fue en condiciones desnaturizantes.

II.2.5.1 Extracción en condiciones nativas

II.2.5.1.1 Extracción periplásmica

Una vez que se determinó el peso húmedo del botón celular, este se resuspendió en 1 volumen (1 volumen = 10 ml /g de células) de amortiguador A (30 mM Tris HCl, 20 %

sacarosa, pH 8). La mezcla se mantuvo en hielo y se agregó EDTA 500 mM hasta una concentración final de 1 mM. Se incubó en hielo por 10 min más, se centrifugó (8,000 x g, 20 min a 4°C) y el sobrenadante se transfirió a un tubo de 50 ml. El botón celular se resuspendió nuevamente en 1 volumen de 5 mM de MgSO₄ (frío), se agitó manualmente en baño de hielo por 10 min y se centrifugó (8,000 x g, 20 min a 4°C). Se recuperó el sobrenadante, se mezcló con el previamente obtenido y se almacenó a -20°C. Esta mezcla se denominó Extracto Crudo Periplásmico (ECP).

Los ECP fueron dializados contra PBS 1X empleando membrana Spectra/Por Dialysis membrane MWCO:2000 (Spectrumlabs) siguiendo las indicaciones del fabricante. Concluida la diálisis se procedió con su purificación.

II.2.5.1.2 Extracción por homogenización mecánica

El botón celular se resuspendió en amortiguador de lisis (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl y 10 mM Imidazol) en una proporción de 5 ml/g de células, se agregó lisozima a una concentración final de 1mg/ml y se incubó en hielo por 30 min. La mezcla fue transferida en tubos de 2 ml, los cuales contenía aproximadamente 1 ml de esferas de zirconia de 0.5 mm de diámetro y se homogenizó en un Mini Bead Beater 8 (BioSpec Products). Las condiciones empleadas fueron 2 repeticiones de 1 min en el modo homogenizar (~ 1,400 rpm) incubando en baño de hielo entre cada repetición. El extracto fue recuperado con una jeringa de insulina y transferido a un tubo de microcentrífuga para su centrifugación (13,800 x g, 30 min a 4°C). El sobrenadante denominado Extracto Crudo Mini-BeadBeater (ECM) fue transferido a un tubo nuevo y almacenado a -20°C hasta su purificación.

II.2.5.2 Extracción de proteínas por condiciones desnaturalizantes

II.2.5.2.1 Extracción con urea

Para la extracción con urea, el botón celular fue resuspendido en amortiguador B (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris base y 8M urea) en una proporción de 5 ml/g de células. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 h con agitación manual. Una vez que ésta se tornó traslúcida, se centrifugó (10,000 x g, 30 min) y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. El sobrenadante se denominó Extracto Crudo Urea (ECU) y se almacenó a -20°C para su purificación posterior.

II.2.6 Análisis de las proteína vNAR recombinante

II.2.6.1 ELISA de expresión

Los ECP, ECM y ECU fueron evaluados mediante un inmunoensayo ELISA, para confirmar la expresión de la proteína. Para lo cual se inmovilizó 50 µl del extracto crudo de cada método (ECP, ECM y ECU) por triplicado en una placa para ELISA durante 12h a 4°C. Posteriormente, se agregó 150 µl de solución de bloqueo (BSA 3% en PBS 1X) y se incubó 1 h a 37°C. Se hicieron tres lavados con PBST (0.05% Tween-20 en PBS 1X), se añadió 50 µl de una dilución 1:50 de un anticuerpo monoclonal de ratón generado contra un vNAR puro, con una concentración de 2.5 mg/ml y se dejó incubando 2h a 37°C. Posteriormente se descartó el anticuerpo, se lavó con PBST y se añadió 50 µl de una dilución 1:1000 de un anticuerpo anti-ratón HA (Sigma) en BSA 1% en PBS 1X y se procedió de la misma forma que con el anticuerpo anterior. Por último, se llevó a cabo el revelado utilizando 50µl de sustrato ABTS (Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) en amortiguador de citratos (50 mM ácido cítrico, 50 mM citrato de sodio, pH

4.1) y peróxido de hidrógeno al 30%. La placa se incubó por 30 min en oscuridad y se determinó su absorbancia a 405 nm en un lector para placas ELISA (BioRad).

II.2.6.2 Electroforesis desnaturalizante en tricina (Tricina-SDS- PAGE)

Previo al análisis de la proteína en geles de poliacrilamida, 200 μ l de muestra fueron concentrados mediante la precipitación con ácido tricloroacético (TCA) y resuspendida en amortiguador de carga 2x (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, b-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0.004%). La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida al 12% de acuerdo a lo descrito por Schägger y von Jagow (1987). Las condiciones de corrida, fueron de 50 mA con un voltaje \geq 150 V, hasta que el frente de azul de bromofenol alcanzó la base del gel. Los geles fueron teñidos con azul de coomassie R-250 y secados con un desecador de geles Gel Dryer (BioRad). Las muestras analizadas por este método incluyen los extractos crudos de cada método (ECP, ECM y ECU), así como las fracciones purificadas mediante cromatografía de afinidad.

II.2.6.3 Inmunodetección (Western Blot)

La presencia de las proteínas vNAR recombinantes tanto en los extractos crudos (ECP, ECM y ECU) como en las fracciones purificadas, fue evaluada por el método de Western blot. Para ello, fue necesario, como primer paso, realizar su electroforesis desnaturalizante en tricina, como se describe en el apartado II.2.6.2

La transferencia de proteínas se realizó mediante la técnica de transferencia semiseca (Harlow y Lane, 1988) en la que se utilizó una membrana de nitrocelulosa Trans-Blot Transfer Medium de 0.45 μ m (BioRad), amortiguador Towbin 1X (25 mM Tris base, 192 mM glicina y 20% metanol) y un sistema de transferencia Semi-Dry Electrobloetter (CLP). Las transferencia se llevó a cabo por 1 h a 200 mA constante, manteniendo el voltaje menor a 20 V.

Concluida la transferencia, se procedió con su inmunodetección empleando el anticuerpo anti-HA (Roche). Para ello, la membrana fue incubada en PBST durante 5 min y posteriormente bloqueada, en leche descremada 5% (Svelty) en PBST por 2 h a temperatura ambiente con agitación moderada. Posteriormente, se incubó durante 12 h a 4°C en leche descremada 1% en PBST y el anticuerpo anti-HA (Roche) con una dilución 1:500. La membrana se lavó tres veces por 5 min en PBST y se procedió con su detección por quimioluminiscencia con el reactivo Pierce ECL Western Blotting Substrate (Pierce) en una placa fotográfica (Kodak) de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el proveedor.

II.2.6.4 ELISA de reconocimiento de la proteína vNAR recombinante por IL-18

Se realizó un ELISA de reconocimiento con los extractos crudos (ECP, ECM y ECU). Cada muestra fue evaluada por triplicado, para lo cual se inmovilizó 250 ng de IL-18 por pozo en una placa de ELISA durante 12 h a 4°C. Posteriormente se bloqueó con 150 µl de BSA al 3% en PBS 1X durante 2 h a 37°C y se lavó tres veces con PBST. Se agregaron 50 µl de proteína recombinante (extractos crudo o fracción purificada) y se incubó por 2 h a 37°C. El resto del procedimiento se realizó como se describe en el apartado II.2.6.1. Se emplearon controles negativos de la expresión (TOP10F' virgen) así como de reconocimiento (BSA, lisozima).

II.2.7 Obtención del vNAR que reconoce a la citocina IL-18

Una vez que se estableció el método de extracción a seguir, se procedió con la extracción de las proteínas recombinantes y su purificación a partir de un cultivo a mayor escala (500 ml).

II.2.7.1 Purificación de la proteína vNAR recombinante

El extracto crudo obtenido, se purificó por cromatografía de afinidad empleando la resina Ni-NTA spin column (Qiagen), la cual tiene afinidad por la secuencia de histidinas que presenta la proteína vNAR recombinante. Una segunda purificación se llevó a cabo con columnas HisTrap HP affinity columns (GE Healthcare) de 5ml. En ambos casos se procedió de acuerdo a las indicaciones del proveedor.

Las proteínas recombinantes vNAR purificadas fueron evaluadas en geles desnaturalizantes de tricina teñidos con azul de comassie (II.2.6.2) y por western blot (II.2.6.3). Se evaluó el reconocimiento de los extractos crudos y las fracciones purificadas por IL-18 mediante un ensayo de ELISA (II.2.6.4).

II.2.7.2 Cuantificación de proteínas

Las proteínas vNAR purificadas fueron cuantificadas por duplicado mediante el método de Lowry previa diálisis con los casetes Slide A Lyzer (Pierce).

III. Resultados

III.1 Biblioteca inmune

III.1.1 Construcción de la biblioteca vNAR

III.1.1.1 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

A partir del bazo de un tiburón *H. francisci* inmunizado con IL-18, se obtuvo 2.5 mg de ARN total con una concentración de 4.9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La integridad de ARN purificado fue evaluada en un gel desnaturalizante al 1.4% de agarosa (Figura 7) y a partir de este se realizó la síntesis del ADNc de los fragmentos de vNAR.

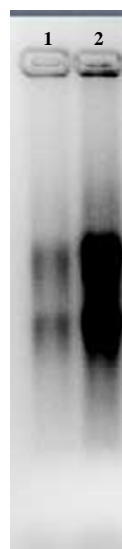


Figura 7. Electroforesis de ARN total obtenido del bazo de un tiburón inmunizado con IL-18. Carriles 1 y 2 corresponden a 2.5 μg y 5 μg de ARN total, respectivamente.

III.1.1.2 Fragmentos vNAR amplificados por PCR

Para la amplificación de los fragmentos vNAR se realizaron reacciones de PCR por duplicado para cada uno de los oligonucleótidos, empleando como templado al ADNc. Los productos de PCR amplificados mostraron una variación en la intensidad de banda entre las diferentes reacciones (Figura 8A). Mientras que en aquellas reacciones donde se emplearon los oligonucleótidos F-560, F-562 y F-563 la intensidad de la banda fue mayor, en el resto fue notablemente menor. Los fragmentos amplificados de cada reacción fueron mezclados y purificados, los cuales presentaron el tamaño esperado (~350pb, Figura 8B).

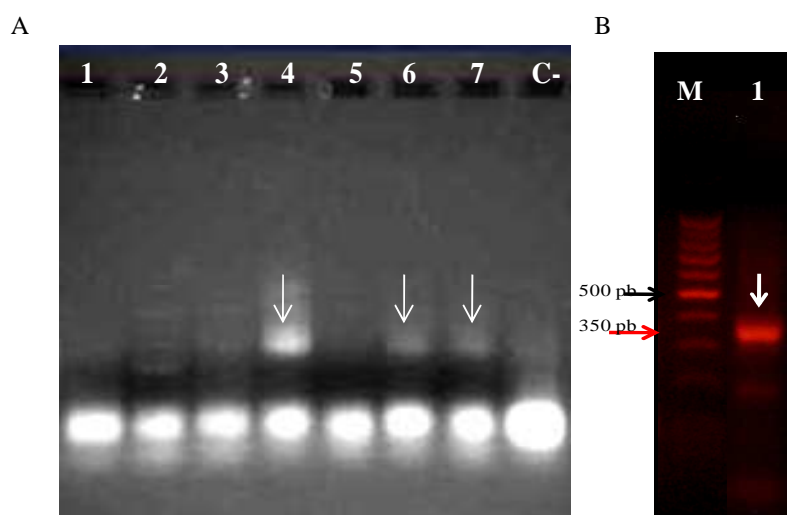


Figura 8. Electroforesis en geles de agarosa (1.8%) de los fragmentos vNAR amplificados por PCR. A Fragmentos amplificados con los diferentes oligonucleótidos empleados. Carriles 1 al 7 corresponden a los oligonucleótidos sentido F-557, F-558, F-559, F-560, F-561, F-562 y F-563, respectivamente, carril 8, control negativo del PCR. B Mezcla de los fragmentos vNAR. Carril M, marcador de peso molecular 100 pb (Promega), carril 1 fragmentos vNAR.

III.1.1.3 Obtención del fagémido pComb3X

A partir de un cultivo de 100 ml de células de *E. coli* ER2537 transformadas con el fagémido pComb3X, se purificó 325 μg de plásmido con una concentración de 1.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y una pureza de 1.9. La integridad del fagémido purificado fue evaluada en un gel de agarosa al 0.8%, en el cual se observó dos bandas correspondientes a la conformación relajada y super-enrollada del vector, esta última aparentemente más pesada, pero no es más que su forma compacta que le confiere una migración accidentada en la matriz del gel de agarosa (Figura 9).



Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa (0.8%) del fagémido pComb3X purificado. Carriles 1 y 2 corresponden a 0.5 μg y 1 μg del plásmido, respectivamente.

III.1.1.4 Digestión enzimática de los vNAR y del fagémido pcomb3x

El fagémido y los fragmentos vNAR amplificados por PCR fueron digeridos con la endonucleasa *Sfi*I y purificados nuevamente. Mientras que en el caso de los fragmentos vNAR, estos fueron purificados directamente de la reacción de digestión; para el fagémido fue necesario realizar una electroforesis en un gel preparativo de agarosa (0.8%). El

propósito de la electroforesis en un gel preparativo fue recuperar los dos fragmentos que se generan de su digestión con la endonucleasa *Sfi*I. El tamaño esperado de los fragmentos fue de 3500 y 1500 pb, que corresponden al vector digerido en ambos sitios de corte y al fragmento de relleno (stuffer), respectivamente.

La integridad de los fragmentos digeridos y purificados se analizó en un gel de agarosa, donde se observó a estos como bandas bien definidas y del tamaño esperado, lo que indicó que no hubo degradación de los mismos (Figura 10). De los 2.5 µg de vNAR que fueron digeridos con la endonucleasa sólo se recuperaron 1.25 µg, con un porcentaje de recuperación del 51.2%, muy por debajo del 90-95% que se menciona en el kit de purificación empleado (QIAquick Spin Handbook Gel Extraction kit, Qiagen). La misma tendencia se observó para el fagémido, ya que sólo se recuperaron 12.8 µg (8.2 µg vector linearizado y 4.6 µg del fragmento de relleno) de los 24 µg inicialmente digeridos, con un porcentaje de recuperación del 53.3%, sin embargo para el caso del vector era probable que el rendimiento fuera poco puesto que se empleó una mayor cantidad de ADN al adecuado, lo cual no ocurrió con los fragmentos. A pesar de la baja recuperación, las cantidades obtenidas de los fragmentos y el vector fueron suficientes para proceder con la ligación.

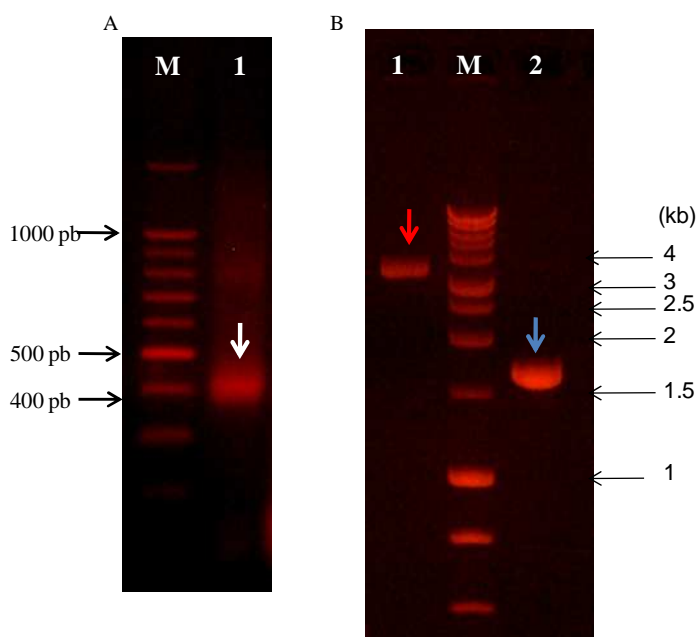


Figura 10. Electroforesis del fragmento vNAR y el fagémido pComb3X digerido y purificado. A Fragmento vNAR. Carril M, marcador de peso molecular 25 pb (Invitrogen); carril 1, fragmento vNAR. B Fagémido pComb3X. Carril 1, vector linearizado; carril 2, fragmento de relleno; carril M, marcador de peso molecular 1 Kb (Promega).

III.1.1.5 Ligación y transformación

Los resultados de la transformación de las células *E. coli* TOP10F' con las diferentes reacciones de ligación a pequeña escala se presentan en la Tabla IV.

Tabla IV. Estrategia de ligación a pequeña escala

Ligación	Vector	Inserto	T4 Ligasa	ufc
C -	pComb3X	X	X	No se observó
C -	pComb3X	X	✓	No se observó
C +	pComb3X	Fragmento relleno	✓	1.5X10 ⁶
Muestra	pComb3X	vNAR	✓	No se observó

ufc: Unidades formadoras de colonia

C-: Control negativo

C+: Control positivo

Como era lo esperado para los controles negativos, no se observaron transformantes. Lo anterior confirmó que el vector empleando en las reacciones de ligación estaba digerido correctamente en sus dos sitios de restricción para la endonucleasa *Sfi*I y que no había presencia de vector no digerido ni vector digerido en un solo sitio de restricción. La reacción empleada como control positivo nos permitió corroborar que los reactivos empleados estaban en condiciones óptimas. Se ha observado que el cofactor ATP (Adenosin trifosfato) presente en el amortiguador de ligación, es altamente inestable y se degrada fácilmente, lo cual afecta de manera directa la ligación de los fragmentos. Sin embargo, esto no fue el caso ya que a partir del control positivo se obtuvieron transformantes.

La ligación de los fragmentos vNAR y el fagémido no fue exitosa a pesar de que se emplearon diferentes razones equimolares de vector e inserto (1:1, 1:3 y 1:5) como se recomienda para estos casos. Considerando que el vector fue digerido correctamente y que los reactivos empleados estaban en condiciones óptimas, el que no se hayan obtenido transformantes con los fragmentos vNAR probablemente se debió a que estos no fueron digeridos correctamente por la endonucleasa *Sfi*I. Se ha observado que algunas enzimas no digieren eficientemente cuando sus sitios de reconocimiento se localizan en los extremos de

los fragmentos de ADN. Para los fragmentos amplificados por PCR a los cuales se les inserta sitios de restricción mediante los oligonucleótidos, el adicionar algunas bases contiguas a este sitio incrementa la eficiencia de algunas endonucleasas. Sin embargo este incremento no lo presenta la enzima *Sfi*I, la cual mantiene una eficiencia de digestión 50-100% en todos los fragmentos de PCR a los cuales se les adicionó de 1 a 6 bases en sus extremos. En este trabajo se emplearon oligonucleótidos que incluyen 6 bases adicionales al sitio de reconocimiento de la enzima *Sfi*I (Tabla III) por lo tanto era de esperarse que los fragmentos vNAR fueron digeridos con una eficiencia del 50-100%, sin embargo esta debió ser mucho menor ya que no se logró ligar ninguno de estos fragmentos al vector.

Dado que la clonación de los fragmentos vNAR no fue exitosa, se decidió seguir la estrategia de emplear biblioteca no inmune la cual presenta un repertorio primario diverso de IgNAR a partir de la cual es posible aislar vNAR que presenten afinidad por un antígeno, en este caso para IL-18.

III.2 Biblioteca no inmune

III.2.1 Reamplificación de biblioteca

La biblioteca naïve que fue reamplificada presentó 1.1×10^{11} colonias, en un volumen de cultivo de 50 μ l de la dilución 10^{-8} de fagos del título de entrada de la primera ronda de selección. Este tamaño es en un orden menor al rango de entrada óptimo (10^{12}) (Barbas *et al.*, 2001).

III.2.2 Rondas de selección

Las titulaciones de salida para cada ronda de selección se representaron de manera gráfica en la Figura 11. Donde se observa, que para el título de fagos de la ronda 3 desciende con respecto a las otras rondas, pero en la ronda 4 el título aumenta ligeramente. Esto coincide con la tendencia esperada, al presentarse una disminución de fagos con variantes vNAR; ya que a medida que aumentan los lavados durante la selección, se eliminan aquellos que no son afines a IL-18 y se seleccionan los vNAR más afines, por lo que al amplificar el cultivo en la obtención de la última ronda se espera que las variantes presentes posean mayor especificidad por la citocina.

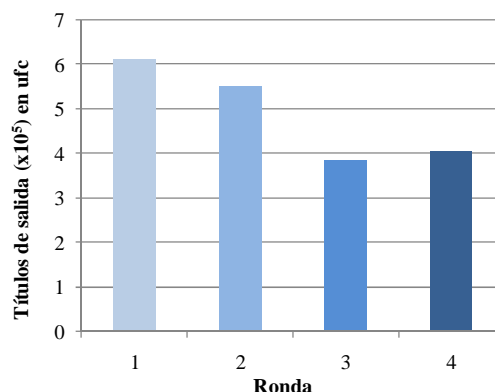


Figura 11. Representación gráfica de los títulos de salida de cada ronda de selección expresados en ufc.

III.2.3 Búsqueda de clonas positivas por PCR

A partir de las clonas obtenidas de la ronda 4, se eligieron 20 al azar. El análisis de estas clonas mediante PCR de colonia indicó que todas fueron positivas; ya que el tamaño del fragmento amplificado fue de alrededor de 350 pb, el cual corresponde al tamaño esperado de un fragmento vNAR cuando se emplean los oligonucleótidos específicos (Figura 12). Una análisis a detalle del tamaño de los fragmentos amplificados evidenció ligeras diferencias entre las clonas analizadas, lo que nos permitió agruparlas en tres grupo, clonas con fragmentos grandes (3, 10, 13 y 17), intermedios (1, 2, 4-9, 14, 15 y 17) y pequeños (11, 12, 16, 18, 19 y 20).

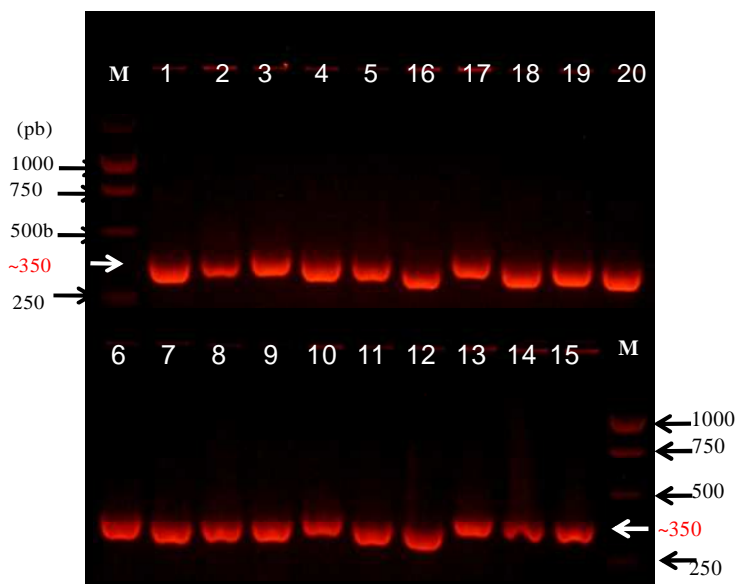


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa (1.8 %) de las clonas de la ronda 4 analizadas por PCR. Carril M, marcador de peso molecular de 1 Kb (Promega), carriles 1-20, corresponde al número de clona analizada.

De las veinte clonas que fueron positivas por PCR, sólo se eligieron diez para el análisis de su secuencia. Considerando que hubo pequeñas diferencias en el tamaño del fragmento amplificado se eligieron clonas de cada grupo, grandes (3), intermedios (1, 2, 4, 6, 7, 9, 14) y pequeños (12 y 20).

Una vez que se eligieron las clonas para el análisis de su secuencia, se procedió a la extracción de su ADN plasmídico mediante lisis alcalina. El plásmido purificado fue cuantificado (Tabla V) y su integridad evaluada a partir de un gel de agarosa (Figura 13). Finalmente, se prepararon las reacciones para su secuenciación empleando 750 ng de plásmido como templado y 6.4 pg del oligonucleótido antisentido gback (Tabla III).

Tabla V. Concentración de los plásmidos extraídos de las clonas con inserto vNAR.

Clona	[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Clona	[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]
1	4.7	7	6.0
2	5.1	9	4.2
3	5.3	12	5.3
4	5.1	14	5.0
6	4.7	20	5.1



Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa (0.8%) de los plásmidos purificados correspondientes a las clonas que fueron positivas para el fragmentos vNAR Carril M, marcador de peso molecular 1 Kb (Promega), carriles 1 al 10 corresponde al número de la clona 1, 6, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 19 y 20, respectivamente; de las cuales se purificó el plásmido.

El análisis de las secuencias mostró inconsistencia en la lectura de los cromatogramas obtenidos, atribuibles a la calidad del ADN plasmídico enviado para su secuenciación. Con el propósito de corroborar los resultados obtenidos previamente, se decidió secuenciar nuevamente el plásmido de seis de las diez clonas inicialmente analizadas. Las seis clonas que se eligieron fueron aquellas que presentaron cromatogramas con picos más definidos y/o secuencias incompletas. El plásmido fue repurificado y la reacción de secuenciación se preparó con el oligonucleótido sentido omseq (Tabla III). Una vez que se contó con las

secuencias estas fueron alineadas con las previamente obtenidas y se procedió con su análisis previa traducción de sus codones a aminoácidos (Figura 14).

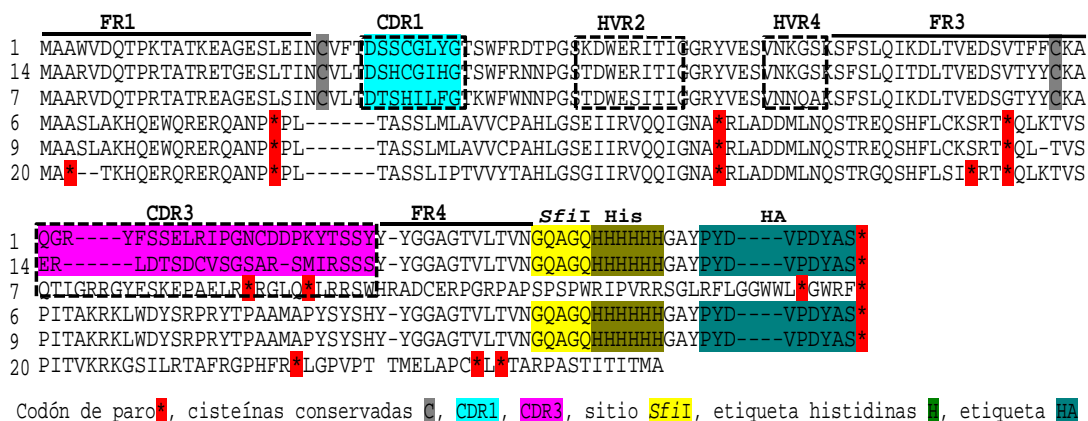


Figura 14. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las clonas aisladas contra IL-18.

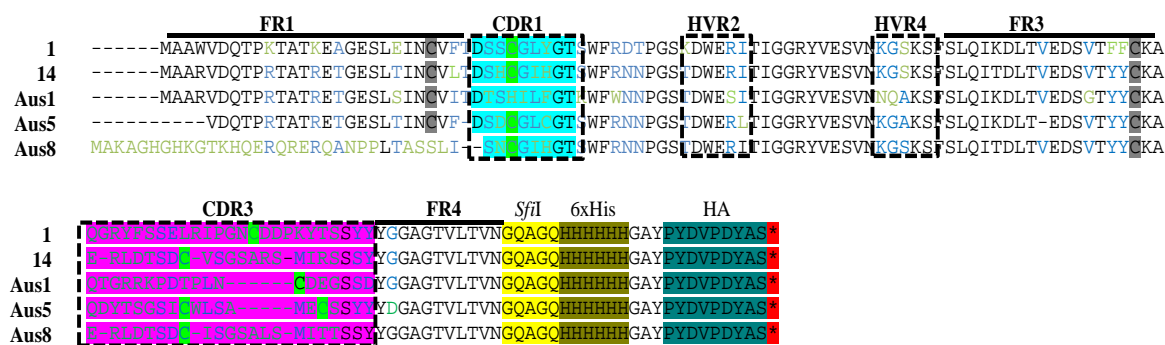
Los resultados del análisis de las secuencias de las seis clonas indicaron que: dos presentaron vNAR integrales (#1, #14), dos presentaron codones de paro dentro de la secuencia (#6, #9) y dos presentaron cambios (frame shift) que afectaron el marco de lectura (#7, #20) (Figura 14). Si bien sólo se analizaron seis clonas, el que ninguna de las secuencias se repitió sugiere variabilidad, lo que aunado al hecho que el 30% fueron vNAR da la pauta para realizar una búsqueda más exhaustiva dentro de las clonas previamente aisladas.

Los vNAR identificados (#1 y #14) presentaron dos cisteínas canónicas y las regiones que los caracterizan, FR1 (Frame work region 1), CDR1 (complementarity-determining region 1), HVR2 (Hipervariable region 2), HVR4, FR3, CDR3 y FR4. Como era de esperarse, la diferencia más notable entre estas secuencias se observó en la composición y tamaño del CDR3, siendo de 24 aminoácidos en la #1 y de 21 en la # 14 (Figura 14). El análisis de las secuencias también permitió determinar que las etiquetas empleadas para la purificación

(6xHis) e inmunodetección (HA) de los vNAR recombinantes se encontraban en marco de lectura para su correcta traducción una vez que estos fueron expresados.

Finalmente se determinó el tamaño de los vNAR aislados con respecto a su número de pares de bases nucleotídicas así como de aminoácidos. El vNAR de la clona # 1 es de 369 pb que corresponden a 123 aminoácidos con un peso teórico de 13.6 kDa, para la clona #14 es de 360 pb, 120 aminoácidos y 13.1 kDa, respectivamente.

Anteriormente Montoya Bonillas (2010) aisló e identificó tres vNAR (Aus1, Aus5 y Aus8) mediante una bioselección contra dos fracciones con actividad tóxica de veneno de alacrán (*Androctonus australis*) a partir de la biblioteca utilizada en este trabajo. Sin embargo, el análisis de esas secuencias con las aisladas en este trabajo contra IL-18 mostró que eran diferentes al comparar sus CDR3 (Figura 15), lo cual nos permiten identificarlos como vNAR distintos.



Codón de paro *, cisteínas conservadas C, cisteínas no conservadas c, CDR1, C, CDR3, C, sitio *SfiI*, S, etiqueta histidinas H, etiqueta HA

Figura 15. Alineamiento de las secuencia de aminoácidos de las clonas aisladas de una misma biblioteca naïve. Las secuencias Aus1, Aus5 y Aus8 se obtuvieron a partir de una bioselección contra dos fracción de veneno de alacrán (*A. australis*). Las secuencias #1 y # 14 contra IL-18 (este trabajo).

Una vez que se realizó el análisis de las secuencias de las clonas aisladas y se corroboró que correspondían a vNAR que no habían sido previamente aislados, se procedió a transformar células de *E. coli* de la cepa TOP10F' con los respectivos plásmido (#1 y #14). A partir de las transformantes obtenidas se eligieron cinco de cada caso y se analizaron mediante PCR de colonia en el que se emplearon los oligonucleótidos ompseq y gback (Tabla III). El análisis electroforético de los productos de PCR indicó que todas las clonas evaluadas presentaron un fragmento con el tamaño esperado de ~500 pb (Figura 16), el cual incluye el inserto vNAR, las secuencias de las etiquetas para su purificación (6xHis) e inmunodetección (HA), así como regiones del vector pComb3X que flanquean las regiones previamente mencionadas.

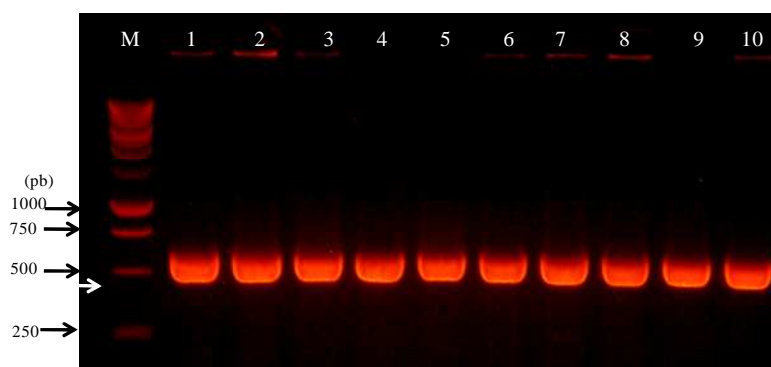


Figura 16. Electroforesis de los productos amplificados por PCR de las clonas *E. coli* TOP10F' transformadas con plásmidos que incluyen fragmentos vNAR. Carril M, marcador de peso molecular 1 Kb (Promega); carriles 1-5, clonas transformadas con el plásmidos #1; carriles 6-10, con el plásmido 14.

III.2.4 Expresión de la proteína vNAR recombinante

De las clonas de *E. coli* cepa TOP10F' transformadas con los plásmidos #1 y #14 se eligió una de cada construcción para la expresión de sus respectivos vNAR recombinantes. En la

extracción de las proteínas recombinantes se emplearon tres métodos, extracción periplásmica y homogenización mecánica, ambos en condiciones nativas y un tercero con urea o en condiciones desnaturizantes. Los extractos crudos obtenidos fueron evaluados por un ensayo de ELISA, el cual indicó que la proteína vNAR recombinante fue expresada pero en niveles bajos ($Abs < 0.100$).

La presencia de los vNAR recombinantes se corroboró mediante un ensayo de inmunodetección o western blot en el que además del sobrenadante se evaluaron los restos celulares o pellet. El propósito de incluir los restos celulares, fue determinar la presencia y/o ausencia de proteína recombinante insoluble en esta fracción cuando se emplean condiciones nativas para su extracción. Los resultados del western blot indicaron la presencia de una banda de alrededor de 16 kDa, la cual correspondió al tamaño esperado del vNAr recombinante #1 en todas las fracciones analizadas. Esta banda de alrededor de 16 kDa no fue detectada en los extractos de la cepa empleada como control negativo, lo que reforzó la idea de que se trataba de la proteína recombinante (Figura 17).

Al comparar la banda en las diferentes fracciones analizadas, se observó que esta fue más intensa en el sobrenadante obtenido a partir de la extracción desnaturizante con urea y la de menor intensidad para el sobrenadante periplásmico. Si bien este fue un análisis meramente cualitativo, las comparaciones entre los métodos se basaron considerando las siguientes acotaciones: el volumen de cultivo empleado en cada método de extracción fue el mismo (100 ml), el volumen de amortiguador empleado para la extracción periplásmica fue cinco veces mayor (~75 ml) que en los otros dos métodos (~15 ml), finalmente, el volumen de muestra analizado en el ensayo de inmunodetección fue el mismo para el caso de los sobrenadantes (200 μ l). Tomando en cuenta lo anterior, podemos sugerir que el método con urea fue el más eficiente para la extracción de proteína recombinante, siguiendo en orden decreciente la extracción mecánica y por último la periplásmica.

Con respecto a la extracción en condiciones nativas, era de esperarse que las proteínas recombinantes estuvieran principalmente en la fracción del sobrenadante, sin embargo

fueron los pellet o restos celulares los que presentaron una señal mayor. Lo anterior podría deberse a que la proteína recombinante se presentó en mayor proporción en forma insoluble que soluble por lo cual su detección en el sobrenadante fue menor. Por otro lado, una extracción deficiente podría haber ocasionado una recuperación baja de la proteína en el sobrenadante. Finalmente, pero no menos importante, es que la diferencia en la intensidad de las señales sólo fue debido a la cantidad de muestra analizada, ya que en el caso de los sobrenadantes se analizaron 200 μ l, mientras que de los restos celulares o pellet fue una porción no cuantificable.

A partir del análisis de inmunodetección se detectaron bandas adicionales tanto en las extractos recombinantes como en el control negativo (*E. coli* cepa TOP10F' virgen), las cuales presentaron un tamaño mayor al de los vNAR. La presencia de estas bandas adicionales podría deberse a diferentes causas o a una combinación de ellas, como es inespecificidad del anticuerpo, exceso de muestra empleado o un bloqueo ineficiente, entre otras.

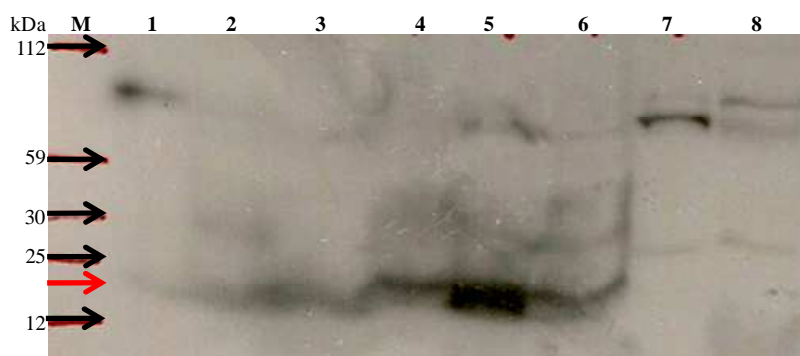


Figura 17. Inmunodetección de la proteína recombinante vNAR # 1 obtenida mediante extracción periplásmica, mecánica y con urea. Carril M, marcador de peso molecular Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad). Carriles 1 y 2, extracción periplásmica, sobrenadante y pellet, respectivamente. Carriles 3 y 4, extracción mecánica, sobrenadante y pellet, respectivamente. Carriles 5 y 6, extracción con urea, sobrenadante y pellet, respectivamente. Carriles 7 y 8, control negativo sobrenadante, extracción con urea y mecánica, respectivamente.

Se llevó a cabo un ELISA de reconocimiento en el cual se evaluaron los sobrenadantes obtenidos con los diferentes métodos de extracción para cada proteína vNAR recombinante (Figura 18). Este análisis mostró que ambas proteínas reconocen a la IL-18 (antígeno) aunque en diferente grado, ya que fue la proteína recombinante #1 fue la que presentó los valores de reconocimiento más altos, excepto para el extracto obtenido por homogenizador mecánico (ECM) que fue similar para ambas clonas. El valor obtenido para el extracto con urea (ECU) de la proteína recombinante #1 indicó que a pesar de haber empleado condiciones desnaturizantes esta fue capaz de reconocer el antígeno, lo anterior podría deberse a que es una proteína estable en esas condiciones (urea 8M) o a su alta afinidad a pesar de su grado de desnaturización. Sin embargo esta tendencia no se observó para la proteína recombinante #14, donde el valor de reconocimiento fue similar al del control negativo. Dada la diferencia obtenida con los extractos desnaturizantes y los valores reducidos obtenidos para el extracto periplásmico (ECP), se optó por seleccionar a la homogenización mecánica como método de extracción que sería empleado en lo subsecuente.

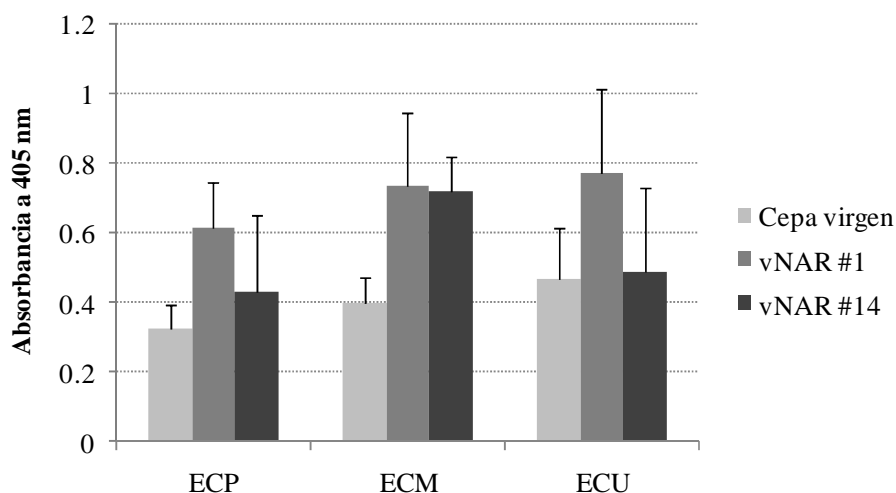


Figura 18. ELISA de reconocimiento de las proteínas recombinantes vNAR #1 y #14 contra IL-18. Se analizaron los extractos crudos obtenidos de las clonas 1 y 14 por tres métodos de extracción: periplásmica (ECP), homogenización mecánica (ECM) y con urea (ECU). Como control negativo se proceso por los mismos métodos de extracción una cepa TOP10F' virgen.

III.2.5 Obtención de la proteína recombinante vNAR que reconoce a la citocina IL-18

Una vez que se seleccionó el método de extracción se llevó a cabo el escalamiento del cultivo (500 ml), a partir de los cuales se hizo una primera purificación de las proteínas vNAR recombinantes mediante columnas con resina Ni-NTA spin column (QIAGEN). Las fracciones obtenidas fueron analizadas en geles desnaturizantes de tricina (SDS-PAGE) teñidos con azul de coomassie. Dicho análisis indicó una baja afinidad de las proteínas recombinantes por la resina, ya que estaban presentes tanto en las fracciones correspondientes a los lavados como en el extracto una vez que este había pasado por la columna (extracto purificado, EP). Adicionalmente, se observó la presencia de bandas inespecíficas en las fracciones correspondientes a la elusión y donde se esperaba obtener las proteínas recombinantes puras (Figura 19). Un análisis mediante western blot de estas

fracciones permitió corroborar la presencia de las proteínas vNAR recombinantes tanto en las eluciones como en el EP (Figura 20).

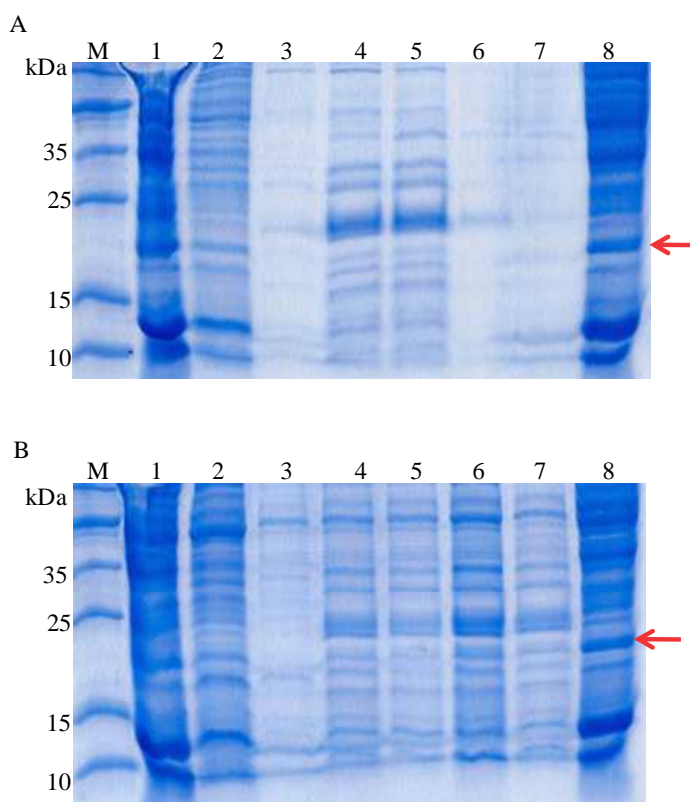


Figura 19. Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (12%) de proteínas vNAR recombinantes purificadas mediante cromatografía de afinidad a níquel (Ni-NTA, QIAGEN). A Proteína vNAR recombinante #1. B Proteína vNAR recombinante #14. Carril M, marcador de peso molecular Broad Range (Promega); carril 1, EC; carriles 2 y 3, primer y segundo lavado, respectivamente; carriles 4-7 eluciones 1-4, respectivamente; carril 8, EP. EC: extracto crudo y EP: extracto purificado.

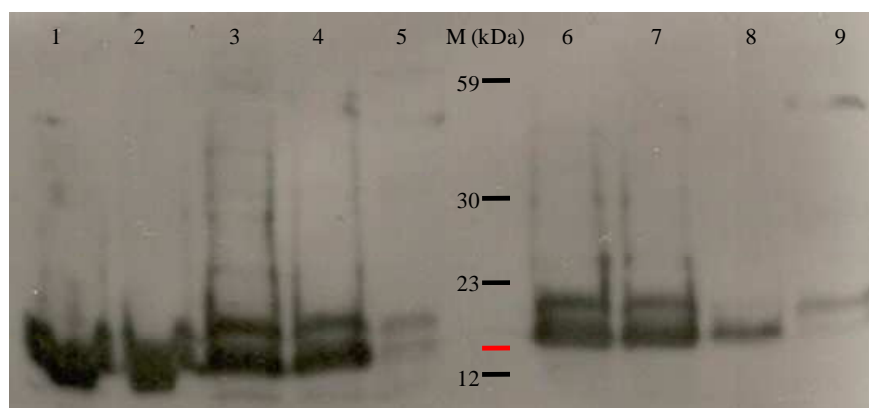


Figura 20. Western blot de las proteínas vNAR recombinantes purificadas mediante cromatografía de afinidad a níquel (Ni-NTA, QIAGEN). Carril M, marcador de peso molecular Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad). Carriles 1-5 proteína vNAR recombinante #1, carriles 1-4 corresponde a las eluciones 1-4, respectivamente y carril 5 al EP. Carriles 6-9 proteína vNAR recombinante #14, carriles 6-8 corresponde a las eluciones 1-3, respectivamente y carril 9 al EP. EP:extracto purificado.

Dado que la purificación por cromatografía de afinidad empleando la resina Ni-NTA, (QIAGEN) no permitió obtener fracciones puras de las proteínas recombinantes vNAR, se decidió llevar a cabo una nueva purificación mediante columna HisTrap HP affinity columns (GE Healthcare) de 5ml de capacidad. La purificación se realizó a partir de nuevos cultivos. Las fracciones obtenidas fueron evaluadas en geles desnaturalizantes de tricina teñidos con azul de coomassie, donde se observó que las proteínas recombinantes eluyeron entre las fracciones 5-9 (Figura 21). A diferencia del caso anterior, donde se empleó la resina Ni-NTA (QIAGEN), la purificación con las columnas HisTrap HP affinity eliminó en gran medida bandas adicionales inespecíficas por lo que podemos sugerir que la purificación fue más eficiente. Adicionalmente el extracto purificado (EP) no evidenció la presencia de la proteína vNAR recombinante, lo que sugiere que esta fue capturada por la resina. En el análisis electroforético se incluyó el extracto crudo filtrado (ECF) y sin filtrar (EC) como una medida para corroborar que en este paso no había pérdida de proteína, sin embargo, no se observó diferencias entre los extractos.

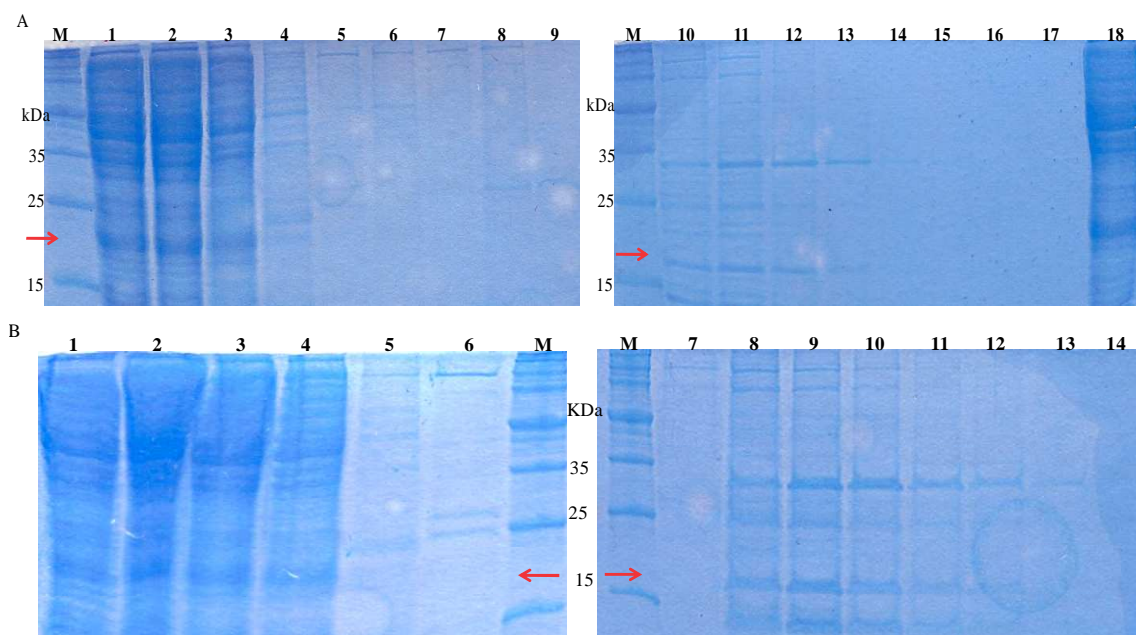


Figura 21. Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (12%) de las proteínas vNAR recombinantes purificadas mediante cromatografía de afinidad a níquel (HisTrap HP affinity columns, GE Healthcare). A Proteína vNAR recombinante #1. Carril M, marcador de peso molecular Broad Range (Promega); carril 1, ECF; carriles 2 y 3 primer y segundo lavado, respectivamente; carril 4, EP; carriles 5-15 elución 1-10, respectivamente; carril 16 y 17 mezcla de las eluciones 11-15 y 16-20, respectivamente; carril 18, EC. B Proteína vNAR recombinante #14. Carril M, marcador de peso molecular Broad Range (Promega); carril 1, EC; carril 2, ECF; carriles 3, 4 y 5 primero, segundo y tercer lavado, respectivamente; carril 6, EP; carril 7, mezcla de las eluciones 1-4; carriles 7-13 eluciones 5-10, respectivamente y carril 14, mezcla de eluciones 11-15. EC: extracto crudo, ECF: extracto crudo filtrado, EP: extracto purificado.

El análisis por western blot de las fracciones purificadas evidenció la presencia de las proteínas vNAR recombinantes, asimismo se corroboró que estas fueron retenidas por la resina ya que no se detectó su presencia en el EP (Figura 22).

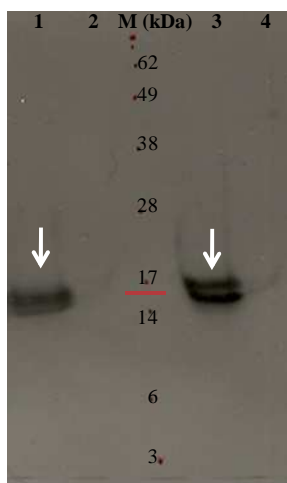


Figura 22. Western blot de las proteínas recombinantes vNAR #1 y #14 purificadas mediante columnas HisTrap HP. Carriles 1 y 2, vNAR #1 elusión 6 y EP, respectivamente. Carril M, marcador de peso molecular (Invitrogen). Carriles 3 y 4 vNAR #14 elusión 7 y EP, respectivamente. EP: extracto purificado.

Una vez que se obtuvieron las fracciones purificadas de las proteínas recombinantes vNAR #1 y #14 se llevó a cabo un ELISA de reconocimiento para cada una contra IL-18. Se incluyeron lisozima y BSA como controles negativos de reconocimiento (Figura 23). Este análisis evidenció que los extractos crudos presentaron un reconocimiento mayor, siendo extracto vNAR #1 el que presentó el valor más alto, mientras que para las fracciones puras, el mayor reconocimiento lo presentó la proteína recombinante vNAR #14. Las diferencias entre los extractos crudos y las fracciones purificadas pueden deberse a posible inespecificidad, principalmente por parte de los EC.

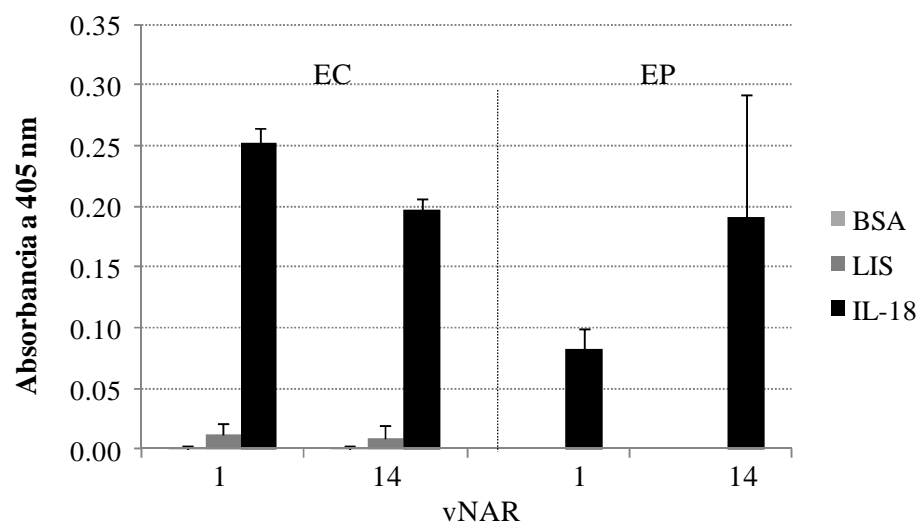


Figura 23. ELISA de reconocimiento de los vNAR #1 y #14 por la IL-18. Se utilizó BSA al 3% en PBS 1X y lisozima (1 mg/ml) como controles negativos (BSA y LIS), vNAR #1 y #14 del extracto crudo (EC) por homogenización mecánica y del extracto purificado (EP) las eluciones e5 y e6, respectivamente.

Posterior al análisis de reconocimiento de las fracciones purificadas por la IL-18, se dializaron para su cuantificación mediante el método de Lowry, donde se obtuvo una concentración de 0.15 mg/ml vNAR #1 y 0.2 mg/ml vNAR #14.

IV. Discusiones

El síndrome metabólico (SM) es un concepto clínico que se diagnostica por el padecimiento de varias enfermedades fisiopatológicamente asociadas, entre las que se encuentran obesidad, resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2 y aterosclerosis. Así mismo se ha encontrado que existe una relación de la citocina pro-inflamatoria interleucina (IL)-18 en cada una de estas enfermedades y por tanto en el padecimiento del SM.

Dado que los componentes del SM son enfermedades que afectan a un gran número de personas en nuestros días, es importante contar con herramientas que nos permitan identificar aquellos marcadores de riesgo a padecerlas, en etapas tempranas de su desarrollo y con ello prevenirlas, por lo que la implicación de IL-18 en el desarrollo del SM la sitúa como un blanco factible a emplearse.

Una solución a lo anterior podría ser el uso de anticuerpos. Los avances en la biotecnología y en las técnicas moleculares, han permitido aprovechar la capacidad que tienen los anticuerpos de unirse a sus antígenos, para emplearlos como herramientas de gran aplicación en la investigación y en áreas de la medicina para diagnóstico y terapia. Actualmente se cuenta con métodos que permiten mejorar la eficiencia, estabilidad y rápida obtención en grandes cantidades de anticuerpos, mediante técnicas recombinantes, dejando de lado procesos laboriosos y prolongados como son la formación de hibridomas.

Una opción de anticuerpos son los vNAR de dominio variable sencillo; los cuales presentan alta afinidad, tamaño pequeño, gran estabilidad y una región CDR3 más larga comparada con los anticuerpos convencionales, confiriéndole gran variabilidad, más superficie de contacto con el antígeno y posiblemente un mayor alcance a sitios antigénicos no accesibles para otro tipo de anticuerpos (Nuttall *et al.*, 2002).

En el laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas del Departamento de Biotecnología del CICESE, se han realizado previamente trabajos para la obtención de vNAR contra diferentes antígenos a partir de bibliotecas fasmídicas inmunes y naïve. Para el caso de bibliotecas inmunes se aislaron vNAR contra: las citocinas TNF- α y VEGF₁₆₅ (Camacho Villegas, 2007), péptidos de la telomerasa (Quezada Iñiguez, 2008) y para bibliotecas naïve, se seleccionaron vNAR contra: veneno de alacrán (*Androctonus australis*) (Montoya Bonillas, 2010), la proteína PA de *Bacillus anthracis* (Mendoza Porras, 2008), las citocinas TNF- α y VEGF₁₆₅ (Camacho Villegas, 2007), entre otros.

Por lo que en este trabajo se decidió construir una biblioteca inmune y emplear una naïve para la obtención de vNAR con afinidad por la citocina humana IL-18. Sin embargo, la clonación de los fragmentos vNAR no fue exitosa, posiblemente debido a que las condiciones empleadas no fueron las adecuadas para este caso, ya que en trabajos anteriores han tenido resultados satisfactorios; por lo que es necesario, buscar aquellas condiciones que si permitan la clonación, ya sea el empleo de otras enzimas de restricción, alternar condiciones de reacción u otras.

La probabilidad de encontrar variantes de anticuerpos con una alta afinidad por un antígeno es mayor si se parte de una biblioteca inmune. Sin embargo, se ha encontrado que a partir del repertorio primario de los tiburones es posible encontrar vNAR con capacidad de unión a diferentes antígenos, como es el caso del estudio de Nuttall y colaboradores (2002), que encontraron dos vNAR con afinidad a la proteasa Kgp de *Porphyromonas gingivalis* a partir de una biblioteca naïve, además de los trabajos realizados en el laboratorio, anteriormente mencionados.

Siguiendo con el objetivo de obtener anticuerpos de dominio sencillo vNAR, se optó por la estrategia de emplear una biblioteca naïve, la cual al reamplificarla presentó un número de 1.1×10^{11} ufc el cual fue adecuado, sobre todo si se considera que Barbas y colaboradores (2001) sugieren un tamaño de 10^{12} como ideal para el caso de la reamplificación de una

biblioteca de animales como gallina, conejo o ratones. Lo anterior nos permitió emplear esta biblioteca ya que el valor de entrada de la ronda 0 sugirió diversidad.

A partir del amplio espectro de variantes de vNAR de la biblioteca naïve, se procedió con la bioselección de vNARs con afinidad por IL-18, observándose un descenso a partir de la tercera ronda de selección y un aumento en la cuarta, tendencia esperada de acuerdo a lo estipulado por Barbas y colaboradores (2001), ya que a medida que aumentan los lavados con la ronda subsecuente, se van descartando aquellas variantes de vNAR que no son afines a la citocina y se aíslan aquellas con mas afinidad.

Después de las rondas de bioselección se analizaron las secuencias de las clonas que expresaron vNAR, ninguna de las secuencias se repitió sugiriendo variabilidad, considerando que el 30% correspondió a clonas que expresaban vNAR, da la pauta para realizar una búsqueda más exhaustiva dentro de las clonas previamente aisladas.

Al haberse aislado dos vNAR (#1 y #14) con afinidad por IL-18 a partir de la biblioteca naïve nos sugiere que esta presenta diversidad, aunado a que fue empleada previamente. Montoya Bonillas (2010), aisló tres vNAR (Aus1, Aus5 y Aus8) con afinidad por dos fracciones del veneno de alacrán (*Androctonus australis*) a partir de esta misma biblioteca. Donde el análisis de las secuencias de los vNAR previamente aislados y los vNAR seleccionados en este trabajo, mostró que eran diferentes en sus CDR3, lo cual nos permite identificarlos como vNAR distintos con afinidad diferente, a partir de una misma biblioteca naïve. Además, los vNAR seleccionados contra IL-18 presentaron afinidad por la citocina y no por las proteínas empleadas como controles negativos (Albúmina de suero bovino y lisozima), indicando que en la última ronda de bioselección sólo se encontraban aquellas variantes con mayor afinidad por IL-18.

Los vNAR identificados como #1 y #14, presentaron dos cisteínas canónicas y las regiones que los caracterizan, FR1 (Frame work region 1), CDR1 (complementarity-determining region 1), HVR2 (Hipervariable region 2), HVR4, FR3, CDR3 y FR4; adicionalmente

mostraron una distribución de cisteínas no canónicas dentro de las regiones del CDR1 y CDR3, lo que nos permite identificarlas como fragmentos variables de anticuerpos NAR tipo II, conforme a lo descrito por Roux y colaboradores (1998).

Los dominios vNAR concentran gran parte de su diversidad en la región CDR3 (Nuttall *et al.*, 2001). Como era de esperarse, la diferencia más notable entre las secuencias de las proteínas recombinantes #1 y #14, se presentó en la composición y tamaño del CDR3, siendo de 24 aminoácidos en el #1 y de 21 en el # 14, quedando dentro del rango de residuos que integran el CDR3 de los vNAR, que es de 15 a 27 (Dooley *et al.*, 2003 y Stanfield *et al.*, 2004). Si bien, los vNAR se caracterizan por su tamaño pequeño, se encontró que a pesar de presentar un CDR3 largo, los vNAR #1 y #14 tienen tamaños de ~13 kDa que cae dentro del tamaño esperado, ya que el vNAR #1 es de 369 pb correspondientes a 123 aminoácidos con un peso teórico de 13.6 kDa y el vNAR #14 es de 360 pb equivalente a 120 aminoácidos con un peso teórico de 13.1 kDa; por lo que el tamaño pequeño de estas proteínas recombinantes podría conferirles una mejor penetración de tejidos, permitiéndoles acceder hasta donde se encuentre su antígeno con una rápida eliminación.

Con respecto a la obtención de las proteínas recombinantes vNAR #1 y #14 al emplear el método de extracción periplásmica por choque osmótico, se encontró que se obtenía muy poca cantidad de proteína, posiblemente debido a que la proteína expresada por la clona no alcanzaba a translocarse totalmente al área periplásmica, por lo que se decidió emplear otros métodos de extracción, que fueron homogenización mecánica y un método desnaturizante con urea. De los cuales, se encontró que el método más eficiente fue el de extracción desnaturizante, siguiendo en orden decreciente la extracción mecánica y por último la periplásmica. Lo anterior concuerda con la presencia de mayor señal obtenida en el análisis por wester blot de la proteína en la parte de los pellets o restos celulares y no en la fracción del sobrenadante, indicando que la mayor porción de la proteína recombinante, se encontraba en mayor proporción de forma insoluble que de forma soluble y por ello se

obtuvo una mayor señal por los métodos de extracción con urea y mecánica, que con la extracción periplásmica usualmente empleada.

Si bien, el valor obtenido para el extracto desnaturizante de la proteína recombinante #1 presentó el valor más alto de reconocimiento, se consideró como mejor al método de extracción por homogenización mecánica, debido a que el empleo de un método desnaturizante conlleva al uso de un proceso de re-naturalización que podría poner en juego la actividad de las proteínas recombinantes. Cabe mencionar que el valor elevado de reconocimiento por parte de la proteína #1, podría deberse a que es estable en esas condiciones desnaturizantes (urea 8M), a su alta afinidad a pesar de las condiciones de desnaturalización o posiblemente por la destrucción de cuerpos de inclusión que hayan secuestrado a la proteína; sin embargo, no se observó un valor elevado de reconocimiento por parte de la proteína recombinante #14 obtenida en condiciones desnaturizantes, por el contrario el valor fue similar al del control negativo. Debido a lo anterior y que los valores de reconocimiento para el extracto obtenido por el homogenizador mecánico fue similar para ambas clonas y por encima de los valores del control negativo es que se consideró como óptimo, además que el método de extracción mecánica nos permitió extraer de manera más eficiente los vNAR #1 y #14 que presentan reconocimiento por la IL-18.

Aun con los problemas para la generación de la biblioteca inmune, se logró el objetivo principal al obtener fragmentos de dominio sencillo de anticuerpos del tiburón *Heterodontus francisci* con afinidad por IL-18 humana, mediante el empleo de la biblioteca naïve, que demostró la presencia de variantes vNAR con capacidad de unión por la citocina. La capacidad de unión de las proteínas recombinantes #1 y #14, aunado a las características de los vNAR, las hace idóneas para su aplicación como herramienta de diagnóstico en áreas de investigación y medicina que involucren a IL-18.

IV. 1 Conclusiones

La construcción de la biblioteca inmune no fue exitosa, sin embargo se aislaron dos fragmentos vNAR con afinidad por IL-18 a partir de una biblioteca naïve.

Los fragmentos vNAR con capacidad de unión a IL-18 son una alternativa para su empleo en la investigación y diagnóstico de enfermedades donde se encuentre involucrada esta citocina.

El repertorio primario del tiburón *Heterodontus francisci* empleado en la construcción de la biblioteca naïve fue diverso, considerando los vNAR aislados previamente así como los dos obtenidos en este trabajo contra IL-18.

El método de homogenización mecánica permitió una extracción más eficiente de las proteínas vNAR recombinantes, comparado con el método de extracción periplásmica comúnmente empleado.

IV. 2 Perspectivas

Evaluar la capacidad de los vNAR #1 y #14 recombinantes para neutralizar la acción biológica de la citocina humana IL-18, por medio de bioensayos.

Analizar la capacidad que presentan estos vNAR para unirse a la citocina, después de someterlos a diferentes concentraciones de agentes desnaturalizantes y después de un proceso de re-naturalización.

Optimizar las condiciones empleadas en el proceso de clonación al construir la biblioteca inmune e identificar cuáles son más adecuadas.

Comparar el método de homogenización mecánica con otros métodos de extracción como el de sonicación y analizar cuál presenta mejor rendimiento.

V. Bibliografía

- Abbas, A.K., A.H. Lichtman y S. Pillai. 2007. Cellular and molecular immunology. Saunders. Sexta edición. Philadelphia. 566 pp.
- Araya, V. 2002. Resistencia a la Insulina, Obesidad y Esteatohepatitis. *Gastr. Latinoam.* 13(1): 31-33 p.
- Argiriadi, M.A., T. Xiang, Ch. Wu, T. Ghayur, y D.W. Borhani. 2009. Unusual water-mediated antigenic recognition of the pro-inflammatory cytokine interleukin-18. *The J. of Biol. Chem.* 1: 1-24 p.
- Barak V., U. Elchalal, M. Edelstein, I. Kalickman, A. Lewin y Y. Abramov. 2004. Interleukin-18 ñevels correlate with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertility & sterility* .82(2): 415-420 p.
- Barbas, C.F III., D.R. Burton, J.K. Scott, G.J. Silverman. 2001. Phage Display: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab Press; Primera edición. New York. 763 pp.
- Biet F., C. Loch y L. Kremer. 2002. Immunoregulatory functions of interleukin 18 and its role in defense against bacterial pathogens. *J. Mol.* 80:147-162 p.
- Camacho Villegas, T.A. 2007. Obtención de fragmentos de anticuerpos de dominio sencillo V_HNAR del tiburón *Heterodontus Francisci* neutralizantes de las citocinas TNF- α y VEGF₁₆₅. Tesis de maestría. Centro de investigación científica y de educación superior de Ensenada, B. C., México. 86 pp.
- Chávez-Tapia, N.C., P. Almeda Valdés, D. Motola Kuba, K. Sánchez, N. Méndez-Sánchez. 2004. Síndrome metabólico. Aspectos disiopatológicos e importancia epidemiológica. *Medica Sur.* 11(3):160-169 p.
- Corpet F.1998. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* 16 (22): 10881-10890 p. <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>. última modificación 28/03/2000. última consulta .
- Diaz, M., A.S. Greenberg, M.F. Flajnik. 1998. Somatic hypermutation of the new antigen receptor gene (NAR) in the nurse shark does not generate the repertoire: possible role in antigen-driven reactions in the absence of germinal centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 14343-14348 p.
- Dooley H., M.F. Flajnik, A.J. Porter. 2003. Selection and characterization of naturally occurring single-domain (IgNAR) antibody fragments from immunized sharks by phage display. *Molecular Immunology.* 40:25-33 p.

- Esposito K., A. Pontillo, M. Ciotola, C. Di Palo, E. Grella, G. Nicoletti y D. Giugliano. 2002. Weight loss reduces interleukin-18 levels in obese women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87(8):3864-3866 p.
- Esposito, K., F. Nappo, F. Giugliano, P.C. Di, M. Ciotola, M. Barbier. 2003. Cytokine milieu tends toward inflammation in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 26:1647 p.
- Everett B.M., S. Bansal, N. Rifai, J.E. Buring y P.M. Ridker. 2009. Interleukin-18 and the risk of future cardiovascular disease among initially Healthy women. *Atherosclerosis.* 202(1):282-288 p.
- Fisher, C.P., L.B. Perstrup, A. Berntsen, P. Eskildsen, B.K. Pedersen. 2005. Elevated plasma interleukin-18 is a marker of insulin-resistance in type 2 diabetic and non-diabetic humans. *Clin Immunol.* 117:152-160 p.
- Gómez M.B., M. Bustos, J. Prieto, J.A. Martínez, M.J. Moreno Aliaga. 2008. Obesidad, inflamación e insulino-resistencia: papel de los ligandos del receptor gp 130. *An. Sist. Sanit. Navar.* 31 (2): 113-123 p.
- González Chávez, A. 1999. Consenso Mexicano de Resistencia a la Insulina y Síndrome Metabólico. *Rev Mex Cardiol.* 10(1): 3-19 p.
- Grace, J.A., R.J. Forsey, W.L. Chan, A. Gilmour, B.P. Leung, M.R. Greer, K. Kennedy, R. Carter, X.Q. Wei, M. Field, A. Foulis, F.Y. Liew, I.B. McInnes. 1999. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 104:1393-401 p.
- Greenberg, A.S., D. Avila, M. Hughes, A. Hughes, E.C. McKinney y M.F. Flajnik. 1995. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature.* 374:168-173 p.
- Harlow E. y D. Lane D. 1988. *Antibodies. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. 726 pp.
- [Http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html). Organización Mundial de la Salud. Obesidad y sobrepeso. Centro de prensa. Nota descriptiva, 311. Septiembre 2006.
- Hung, J., B.M. McQuillan, C.M. Chapman, P.L. Thompson, J.P. Beilby. 2005. Elevated interleukin-18 levels are associated with the metabolic syndrome independent of obesity and insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25:1268-1273 p.
- Lastra, G., M. Manrique, Lastra L. 2005. Síndrome cardiometabólico Inflamación, tejido adiposo, resistencia a la insulina y aterogénesis. *Acta Med Colomb.* 30: 100-111 p.

- Lodish, H., A. Berk, P. Matsudaira, C.A. Kaiser, M. Krieger, M.P. Scott, S.L. Zipursky y J. Darnell. 2005. *Biología celular y molecular*. Quinta edición. Editorial medica panamericana. Buenos Aires. 973p.
- López Bermejo, A., M. Bosch, M. Recasens, J. Biarne, E. Esteve, R. Casamitjana, J. Vendrell, W. Ricart y J.M. Fernández Real. 2005. Potential role of interleukin-18 in liverdisease associated with insuline resistance. *Obes Res*. 13:1925-1931 p.
- Maffia, P., G. Grassia, P. Di Meglio, R. Carnuccio, L. Berrino, P. Garside, A. Ianaro y A. Ialenti. 2006. Neutralization of interleukin-18 inhibits neointimal formation in a rat model of vascular injury. *Circulation*. 114:430-437 p.
- Mallat, Z., C. Heymes, A. Corbaz, D. Logeart, S. Alouani, A. CoenSolol, T. Seidler, G. Hasenfuss, Y. Chvatchko, A.M. Shah y A. Tedgui. 2004. Evidence for altered interleukin (IL)-18 pathway in human heart failure. *The FASEB Journal*. 10:04-24 p.
- Mendoza Porras, O. 2008. Obtención de anticuerpos del tipo vNAR del tiburón *Heterodontus Francisci* no inmune capaces de reconocer a la proteína PA de *Bacillus anthracis*. Tesis de maestría. Centro de investigación científica y de educación superior de Ensenada, B. C., México. 71 pp.
- Montoya Bonillas, D.A. 2010. Obtención de anticuerpos tipo vNAR que reconocen y neutralizan venenos de alacrán. Tesis de maestría. Centro de investigación científica y de educación superior de Ensenada, B. C., México. 87 pp.
- Muntaner, J.A., H.L. Luciardi y R. Altman. 1999. Aterosclerosis: ¿por qué una enfermedad inflamatoria? *Fed. Arg. Cardiol*. 28: 201-216 p.
- Nakanishi, K., T. Yoshimoto, H. Tsutsui, H. Okamura. 2001. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol*. 19:423-474 p.
- Nuttall, S.D., U.V. Krishnan, L. Doughty, N. Alley, P.J. Hudson, R.N. Pike, A.A. Kortt y R.A. Irving. 2002. A naturally occurring NAR variable domain against the Gingipain K protease from *Porphyromonas gingivalis*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 516: 80-86 p.
- Nuttall, S.D., U.V. Krishnan, M. Hattarki, R. De Gori, R.A. Irving y P.J. Hudson. 2001. Isolation of the new antigen receptor from wobbegong sharks, and use as a scaffold for the display of protein loop libraries. *Molecular Immunology*. 38:313-326 p.
- Palomer, X., A. Pérez y F. Blanco Vaca. 2005. Adiponectina: un nuevo nexo entre obesidad, resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular. *Med Clin*. 124(10):388-95 p.

- Puren A.J., G. Fantuzzi, Y. Gu, M.S.-Su y C.A. Dinarello. 1998. Interleukin-18 (IFN-inducin Factor) Induces IL-18 and IL-1 β via TNF α Production from Non-CD14+ Human Blood Mononuclear Cell. *J.Clin. Invest.* 101 (3): 711-721 p.
- Quezada Iñiguez R. M. 2008. Obtención de anticuerpos de dominio sencillo tipo vNAR del tiburón *Heterodontus Francisci* con capacidad de unión al complejo HLA-B7/péptidos de la telomerasa. Tesis de maestría. Centro de investigación científica y de educación superior de Ensenada, B. C., México. 93 pp.
- Rosado Pérez, J. y V.M. Mendoza Núñez. 2007. Artículo de revisión: Inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes mellitus. *Bioquímica.* 32 (2): 58-69 p.
- Roux, K.H., A.S. Greenberg, L. Greene, L. Strelets, D. Avila, E.C. McKinney y M.F. Flajnik. 1998. Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR): Molecular convergence of NAR and unusual mammalian immunoglobulins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:11804-11809 p.
- Sahar, S, R.S. Dwarakanath, M.A. Reddy, L. Lanting, I. Todorov, R. Natarajan. 2005. Angiotensin II enhances interleukin-18 mediated inflammatory gene expression in vascular smooth muscle cells: a novel cross-talk in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res.* 96:1064-1071 p.
- Sambrook, J. y D.W. Russel .2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor. Tercera edición. NewYork. 1:7.73 pp.
- Schagger H., von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166(2):368-79 p.
- Sierra, A., S. Laborda, I.P. Gayà, M. Otermin y C. Benito. 2005. Los polimorfismos de los genes que codifican para Interferon- γ e Interleucina 18 no tienen influencia en la aparición o severidad de la enfermedad coronaria. *Investigación Cardiovascular.* 8(2): 112-124 p.
- Stanfield, R. L., H. Dooley, M.F. Flajnik y I.A. Wilson. 2004. Crystal Structure of a Shark Single-Domain Antibody V Region in Complex with Lysozyme. *Sci.* 305: 1770–1773 p.
- Streltsov, V.A., J.N. Varghese, J.A. Carmichael, R.A. Irving, P.J. Hudson y S.D. Nuttall. 2004. Structural evidence for evolution of shark Ig new antigen receptor variable domain antibodies from a cell-surface receptor. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America.* 101: 12444-12449 p.
- Swiss Institute of Bioinformatics. Proteomics server, translate tool. Última modificación 8/02/1999. <http://www.expasy.org/>.

- Takayuki, H., S. Hashiguchi, Y. Ito, Z. Kato, K. Nakanishi, T. Nakashima y K. Sugimura. 2005. Human Anti-Human IL-18 Antibody Recognizing the IL-18-Binding Site 3 with IL-18 Signaling Blocking Activity. *J. of Biochem.* 138(4):433-442 p.
- Thorand, B., Kolb H, Baumert J, Koenig W, Chambless L, Meisinger C. 2005. Elevated levels of interleukin-18 predict the development of type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg Study, 1984-2002. *Diabetes.* 54:2932-2938 p.
- Troised, M., I. Seljeflot, H. Arnesen. 2009. The role of interleukin-18 in the metabolic syndrome. *Cardio vascular diabetology.*9:11 p.
- Zirlik, A., S.M. Abdullah, N. Gerdes, L. MacFarlane, U. Schonbeck, A. Khera. 2007. Interleukin-18, the metabolic syndrome, and subclinical atherosclerosis: results from the Dallas Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27:2043-2049 p.

Anexos

Anexo 1: Abreviaturas

µg	Microgramos
µl	Microlitros
ABTS	Acido 6-sulfónico, 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolina)
BCP	1-bromo,3-cloropropano
BSA	Albúmina sérica bovina
cbp	Cuanto baste para
cADN	Ácido desoxirribonucleico complementario
DEPC	Dietil pirocarbonato
ADN	Acido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
EDTA	Acido etilen-diamina-tetra-acetico
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
IPTG	Isopropil-β-D-tio-galactósido
kb	Kilo base
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
M	Molar
mA	Mili ampere
mg	miligramo
ml	mililitro
mM	milimolar
MOPS	Acido 3-(N-morfolino) propano sulfonico
ng	nanogramo
nm	nanometro
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pg	picogramo
PSA	Persulfato de amonio
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SB	Medio de cultivo Super Broth
SDS	Sodio dodecil sulfato
SOB	Medio de cultivo Super Optimal Broth
SOC	Medio de cultivo Super Optimal Broth with Catabolite
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametil-etilen-diamina
U	Unidad
ufc	Unidad formadora de colonia
V	Volts

Anexo 2: Preparación de medios y soluciones

- ❖ Amortiguador A
 - 0.36 g tris HCl [30 mM]
 - 20 g sacarosa [20%]
 - Disolver en agua destilada, ajustar pH 8 y aforar a 100 ml.

- ❖ Amortiguador B
 - 13.8g NaH₂PO₄ [100 mM]
 - 1.2 g Tris-HCl [10 mM]
 - 480.0 g Urea [8M]
 - Disolver en agua destilada, ajustar pH a 8 con NaOH y aforar a 1 l.

- ❖ Amortiguador de carga 2X (SDS PAGE, desnaturalizante)
 - 900 µl de una solución (0.125 M tris HCl, pH 6.8, 20% Glicerol y 4% SDS)
 - Disolver 100 µl de beta-mercaptoetanol en la solución anterior.

- ❖ Amortiguador de carga para RNA
 - 25 µl glicerol [50%]
 - 1 µl EDTA 0.5M, pH 8
 - Azul de Bromo fenol [0.25 %]
 - Disolver y aforar al volumen con agua DEPC (cbp 50 µl).

- ❖ Amortiguador de citratos 10X
 - 2.45 g Ácido cítrico anhídrido
 - 10.96 g citrato trisódico dihidratado
 - 8.77 g NaCl
 - Disolver en agua destilada, ajustar pH a 5.5 y aforar a 1 l.

- ❖ Amortiguador del ánodo 10X
 - 242.28 g Tris base [2M], pH 8.9
 - Disolver en agua destilada, ajustar pH a 8.9 con HCl y aforar al 1 l.

- ❖ Amortiguador del cátodo 10X
 - 121.14 g Tris base [1M], pH 8.25
 - 179.17 g Tricina [1M]

- 10 ml SDS al 1%
 - Disolver en agua destilada, después agregar el SDS y aforar a 1 l.
-
- ❖ Amortiguador de lisis
 - 6.9 g NaH_2PO_4 [50 mM]
 - 17.54 g NaCl [300 mM]
 - 0.68 g Imidazol [10 mM]
 - Disolver en agua destilada, ajustar pH a 8 con NaOH y aforar a 1 l.
-
- ❖ Amortiguador MOPS 10X
 - 2.09 g MOPS
 - 1 ml Acetato de sodio 1M
 - 1 ml EDTA 0.5M, pH8
 - Disolver y aforar al volumen con agua DEPC (cbp 50 ml).
-
- ❖ Amortiguador para el gel de tricina
 - 18.17 g Tris base [3M], pH 8.45
 - 0.5 g SDS [0.3%]
 - Disolver en agua destilada, ajustar pH a 8.4 con HCl, agregar SDS, aforar al volumen (cbp 50 ml).
-
- ❖ Amortiguador para transferencia semi-seca, pH 8.3
 - 3.0 g Tris base [25mM]
 - 14.4 g Glicina [192mM]
 - 200 ml Metanol [20%]
 - Disolver en agua destilada y aforar a 1 l.
-
- ❖ LB agar
 - 10g de Triptona
 - 5g de Extracto de levadura
 - 10g de NaCl
 - Disolver en agua destilada, ajustar pH a 7 con NaOH, una vez ajustado el pH se le agrega el agar (11g), aforar al volumen (cbp 1 l) y sin disolver se mete a esterilizar. Sí se requiere con antibiótico, agregarlo cuando el medio este frío.
-
- ❖ PBS 10X
 - 80 g NaCl

- 2 g KCL
 - 17 g Na₂HPO₄
 - 1.63 g KH₂PO₄
 - Disolver en agua destilada, ajustar pH a 7.4 con HCl, aforar al volumen (cbp 1 l) y Esterilizar (autoclave).
- ❖ PBST
- 250 µl Tween-20 [0.05%]
 - Disolver en 500 ml de PBS 1X.
- ❖ SB
- 32 g Triptona
 - 20 g Extracto de levadura
 - 5 g NaCl
 - Disolver en agua destilada, ajustar pH a 7 con NaOH 1N, aforar al volumen (cbp 1 l) y esterilizar.
- ❖ SOB
- 20g de Triptona
 - 5.0 g de Extracto de levadura
 - 0.5 g de NaCl
 - 186 mg de KCl ó 10 ml de KCl 250 mM
 - cbp 1 L con agua destilada
 - Disolver en agua destilada, Ajustar pH 7 con NaOH, aforar al volumen (cbp 1 l) y esterilizar. Una vez frío, agregar 5 ml de MgCl₂ 2M (estéril).
- ❖ SOC
- 1 ml de glucosa 1M (estéril)
 - Disolver en 50 ml de medio SOB.
- ❖ Solución de bloqueo
- 1.5 g BSA [3%]
 - Disolver en 50 ml de PBS 1X.
- ❖ Solución para desteñir azul de Coomassie:
- 100 ml Metanol al 100% [40%]
 - 25ml Ac. Acético al 100 % [10%]

- Aforar con agua destilada a un volumen de 250 ml.

- ❖ Solución para teñir con azul de Coomassie:
 - 100 ml Metanol al 100% [40%]
 - 25ml Ac. Acético al 100 % [10%]
 - 0.125 g Azul de Coomassie [0.05%]
 - Disolver con agua destilada y aforar a 250 ml.

- ❖ Sustrato para peroxidasa
 - 100 μ l Amortiguador de citratos 10X
 - 20 μ l ABTS 50 X [20 mg/ml en agua]
 - Disolver en agua destilada, aforar al volumen (1 ml) y agregar al último 1 μ l H_2O_2 al 30%.

- ❖ TBE 10X
 - 108 g Tris Base
 - 55 g Acido Bórico
 - 40 ml EDTA 0.5 M, pH8
 - Disolver en agua destilada, ajustar pH a 7.4 y aforar al volumen (cbp 1 l).