

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Doctorado en Ciencias
en Ciencias de la Vida
con orientación en Biotecnología Marina**

**Caracterización de la actividad antifibrótica de dominios vNAR
neutralizantes de TGF- β en modelos dérmicos**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Doctor en Ciencias

Presenta:

Jahaziel Gasperin Bulbarela

Ensenada, Baja California, México
2021

Tesis defendida por
Jahaziel Gasperin Bulbarela

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Director de tesis

Dra. Patricia Juárez Camacho

Dra. Johanna Bernáldez Sarabia

Dra. Tanya Amanda Camacho Villegas



Dra. Patricia Juárez Camacho
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Jahaziel Gasperin Bulbarela** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Caracterización de la actividad antifibrótica de dominios vNAR neutralizantes de TGF- β en modelos dérmicos

Resumen aprobado por:

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Director de tesis

El factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β), es una citocina involucrada en la regeneración epitelial y genera fibrosis en los tejidos cuando se sobreexpresa. Se ha demostrado que los anticuerpos neutralizantes del TGF- β reducen la formación de cicatrices, mejorando la estética de la lesión. Sin embargo, la neutralización sistémica de TGF- β puede generar efectos adversos. Por tanto, en este trabajo se plantea una administración tópica. Para ello, obtuvimos andamios de Ca²⁺-Alginato-PEGMa cargados con anticuerpos 1D11.16.8, que mostraron la capacidad de liberar el anticuerpo en heridas dérmicas en ratones. El andamio cargado con 100 μ g de 1D11 generó una reducción del colágeno depositado y la inhibición de los marcadores *Tgfb1* y *Acta2*. Sin embargo, este andamio mostró un proceso de cicatrización deficiente. Por tanto, la administración debe evaluarse en una etapa tardía. Sin embargo, dadas las características de estos anticuerpos, probablemente no podrán penetrar el epitelio remodelado de la herida. Por lo cual, se evaluó el efecto de los dominios de anticuerpos vNAR, a los que se atribuye una mejor distribución dado su tamaño. En este trabajo se aislaron tres vNAR anti-TGF- β : TGF-10, TGF-21 y TGF-5.b. Los cuales, junto con vNAR T-1, mostraron la capacidad de reconocer la citocina por ELISA. Al evaluar la interacción de vNAR-hTGF- β 1 con modelos *in silico*, sólo T-1 y TGF-5.b interactúan con la citocina en los sitios de unión al receptor. Por el contrario, TGF-10 y TGF-21 se unen al sitio de dimerización de la citocina. Se evaluó la capacidad de estos vNAR para prevenir los efectos fibróticos de TGF- β en fibroblastos dérmicos a través del análisis *in vitro* de la expresión génica y la actividad en la remodelación de retículas de colágeno; sin embargo, sólo mostraron una inhibición parcial de TGF- β . Usando el sistema de secreción de fosfatasa alcalina activado por TGF- β , ninguno de los vNAR logró neutralizar la citocina en las concentraciones evaluadas (rango nM). Por lo tanto, es necesario evaluar otros métodos para producir vNAR en mayores cantidades para evaluar su actividad en el rango de μ M.

Palabras clave: TGF- β , vNAR, Cicatrización, Apósitos

Abstract of the thesis presented by **Jahaziel Gasperin Bulbarela** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Life Science with orientation in Marine Biotechnology.

Characterization of the antifibrotic activity of neutralizing vNAR domains of TGF- β in dermal models

Abstract approved by:

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Thesis Director

Transforming growth factor-beta (TGF- β) is a cytokine involved in epithelial regeneration and generates fibrosis in tissues when overexpressed. Neutralizing antibodies to TGF- β have shown to reduce scar formation, improving the aesthetics of the lesion. However, the systemic neutralization of TGF- β can generate adverse effects. Therefore, a topical administration is considered. For this, we obtained Ca-Alginate-PEGMA scaffolds loaded with 1D11.16.8 antibodies, which showed the ability to release the antibody in dermal wounds in mice. The scaffold loaded with 100 μ g of 1D11 generated a reduction in collagen deposited and inhibition of the markers *Tgfb1* and *Acta2*. However, this scaffold showed a poor healing process. Therefore, the administration must be evaluated at a late stage. However, given the characteristics of these antibodies, they will probably not be able to penetrate the reshaped wound epithelium. Therefore, the effect of vNAR antibody domains was evaluated, which indicates a better distribution by their size. In this work, three anti-TGF- β vNARs were isolated: TGF-10, TGF-21 and TGF-5.b. Which, together with vNAR T-1, showed the ability to recognize the cytokine by ELISA. When evaluating the vNAR-hTGF- β 1 interaction with in silico models, only T-1 and TGF-5.b interact with the cytokine at receptor binding sites. In contrast, TGF-10 and TGF-21 bind at the cytokine dimerization site. We evaluated the ability of these vNARs to prevent the fibrotic effects of TGF- β in dermal fibroblasts by assessing gene expression and activity in collagen reticulum remodeling in vitro; however, they only showed partial inhibition of TGF- β . Using the TGF- β -activated Alkaline phosphatase secretion system, none of the vNARs managed to neutralize the cytokine at the concentrations evaluated (nM Range). Therefore, it is necessary to evaluate other methods to produce vNARs in larger quantities to evaluate their activity in the μ M range.

Keywords: TGF- β , vNAR, Wound Healing, Wound dressings

Dedicatoria

A todos ustedes que de alguna forma apoyaron y facilitaron la realización de este proyecto.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca (No. 462358) otorgada durante mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por la oportunidad de incorporarme al posgrado, el apoyo y facilidades prestadas.

Al Dr. Alexei F. Licea Navarro por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, su dedicación, apoyo y todas sus enseñanzas.

A mi comité de tesis, Dra. Johanna Bernáldez Sarabia, Dra. Tanya A. Camacho Villegas y la Dra. Patricia Juárez Camacho, por su tiempo y aportaciones.

A todos los que forman y/o formaron parte del Departamento de Innovación Biomédica. A mi madre, padre y hermanos por su apoyo y confianza.

Y en especial, a mi esposa Elida Trinidad Díaz Castillo por ser parte de mi vida y brindarme su cariño y amor. ¡Te Amo!

Tabla de contenido

Resumen en español	iii
Resumen en inglés.....	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos.....	vi
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	xi
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1. Antecedentes	2
1.1.1. <i>Factor de crecimiento transformante beta</i>	2
1.1.2. <i>Tgf-β y su papel en el proceso de cicatrización</i>	6
1.1.3. <i>Anticuerpos neutralizantes de tgf-β</i>	7
1.1.4. <i>Apósitos de alginato en el tratamiento de lesiones dérmicas</i>	11
1.2. Justificación.....	13
1.3. Hipótesis.....	13
1.4. Objetivos	14
1.4.1. <i>Objetivo general</i>	14
1.4.2. <i>Objetivos específicos</i>	14
Capítulo 2. Metodología.....	15
2.1. Evaluación de la actividad de apósitos de alginato de calcio cargados con anticuerpos	15
2.1.1. <i>Generación de apósitos de alginato de calcio cargados con anticuerpos</i>	15
2.1.2. <i>Evaluación de la actividad in vivo</i>	17
2.2. Evaluación de la actividad de dominios vnar anti-tgf- β	19
2.2.1. <i>Generación de nuevos candidatos</i>	19
2.2.2. <i>Producción del vnar</i>	20
2.2.3. <i>Análisis in-silico de la interacción vnar-tgf-β1</i>	24
2.2.4. <i>Evaluación de la actividad in vitro</i>	26
Capítulo 3. Resultados	31
3.1. Evaluación de la actividad de apósitos de alginato cargados con anticuerpos.....	31
3.1.1. <i>Evaluación de la actividad in-vitro</i>	31
3.1.2. <i>Evaluación de la actividad in-vivo</i>	33
3.2. Evaluación de la actividad de dominios vnar anti-tgf- β	36
3.2.1. <i>Obtención de nuevos candidatos vnar anti-tgf-β</i>	36
3.2.2. <i>Evaluación de las clonas obtenidas</i>	41
3.2.3. <i>Producción de los vnar seleccionados</i>	42
3.2.4. <i>Análisis in-silico de la interacción vnar-tgf-β1</i>	44
3.2.5. <i>Evaluación de la actividad in vitro</i>	46
Capítulo 4. Discusión.....	54
Capítulo 5. Conclusiones	63
Literatura citada	64
Anexos.....	75

Lista de figuras

Figura	Página
1. Estructura tridimensional de TGF- β 1 humano (A). Esquema estructural del complejo latente de TGF- β (B). Alineamiento de las secuencias preproteicas de las isoformas TGF- β 1, 2 y 3, en el que se muestran las regiones conservadas (C).....	2
2. Esquema del complejo ternario de TGF- β con sus receptores. Los monómeros TGF- β 1 _A y TGF- β 1 _B son de color verde y verde pálido, respectivamente. T β RI y TGFBRII son de color guinda y amarillo, respectivamente. Modificado de Radaev et al. (2010).	4
3. Vías de señalización de TGF- β . Ruta dependiente de SMAD's: Después de la unión del ligando, los receptores de TGF- β dimerizan y fosforilan las proteínas SMAD intracelulares, las cuales se translocan al núcleo y regular la transcripción genética. Ruta independiente de SMAD's: el receptor T β RI puede fosforilar a otros factores de transcripción que no sólo regulan la señalización de SMAD's, sino que también generan respuestas independientes de ellas.	5
4. Representación esquemática de anticuerpos convencionales (IgG) y anticuerpos de sólo cadena pesada (HcAb). Los anticuerpos convencionales, formados por cadenas pesadas (cian) y ligeras (azul), se encuentran en todos los vertebrados, pero los camélidos y los peces cartilagosos también tienen anticuerpos carentes de cadenas ligeras. La organización del dominio variable de la cadena pesada de cada uno de estos anticuerpos se muestra usando tres estructuras representativas. El CDR1, CDR2 y CDR3 se representan en naranja, verde y rojo, respectivamente, excepto para el vNAR que carece de CDR2, y el color verde se usa para indicar la región HV4 que a veces participa en la unión del antígeno. Modificado de Gonzalez-Sapienza et al. (2017).....	8
5. Interacción de Fresolimumab (GC-1008) versión Fab, con la citocina TGF- β 3, en la cual se puede apreciar como el anticuerpo bloquea la zona de interacción entre TGF- β y sus receptores. Los monómeros de TGF- β 3 se representan en azul y rojo. Los fragmentos Fab de Fresolimumab se muestran en amarillo (cadena pesada) y verde (cadena ligera). Recuperado de (Grütter et al., 2008).	10
6. (A) Efecto de PEGMA en la retención de la forma de apósitos de alginato de calcio. La circunferencia original se muestra con una línea roja punteada y con flechas se señalan los cambios de forma. (B) Efecto de PEGMA en la degradación del material en medio acuoso. Se observa el apósito al instante en entrar en contacto con el medio (t=0h) y hasta 100 h después del contacto (t=110h). El contorno de los fragmentos se delineó con blanco para mostrar los cambios de forma y con flechas rojas se señalan pequeños segmentos. Recuperado de Rubio-Elizalde (2019).	12
7. Tiempo de liberación de anticuerpo anti-HA-HRP de apósitos de alginato de calcio. A) Liberación acumulada sin renovación de medio. B) Liberación del anticuerpo con renovación total del medio del apósito CAPH-aHA-50ng.	31
8. Actividad in-vitro de apósitos de alginato de calcio cargados con anticuerpo 1D11, en la gráfica se muestra el promedio (n=3) \pm SEM, ** = P< 0.01, **** = P< 0.0001.	32

9. *Panorama macroscópico de la cicatrización de la herida durante 10 días. Fotografías digitales representativas de heridas por escisión en ratones después de la aplicación del hidrogel..... 33*
10. *Evaluación macroscópica de cicatrización de la herida durante 10 días. Se evaluó la reducción del diámetro de la herida en milímetros (A), así como presencia de Re-epitelización (B) e Inflamación (C), evaluados en una escala semi-cuantitativa de cuatro puntos (0 – ausente, 1 – escaso, 2 – moderado y 3 – abundante) Los datos se presentaron como promedio (n = 5) ± SEM. * p <0.05, ** p <0.01. 34*
11. *Análisis histopatológico de lesiones cutáneas en el día 10 teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) y tricrómica de Masson (MT). Se realizaron dos heridas por escisión en la zona dorsal de ratones, posteriormente una lesión fue tratada con hidrogeles de Ca-alginato-PEGMA (CAPH) o CAPH cargado con anticuerpos anti-TGF-β a diferentes dosis: 10, 50 y 100 μg (CAPH-1D11-10, -50 y -100, respectivamente). La otra herida recibió tratamiento de desinfección estándar (Control). Micrografías tomadas a un aumento de 100x. ▲ Epidermis engrosada, Δ epidermis fragmentada, (→) fibras de colágeno fragmentadas y (*) zonas edematosas. 35*
12. *Expresión de ARNm de los genes Acta2 y Tgfb1 en lesiones cutáneas al día diez de tratamiento con los hidrogeles de Ca-alginato-PEGMA (CAPH) o CAPH cargado con anticuerpo 1D11.16.8, 10 o 100 μg por hidrogel (CAPH-1D11-10 y CAPH- 1D11-100, respectivamente). Los datos se normalizaron al ARNm de HPRT y se presentaron como el promedio de veces de inducción (n = 4-5 para los grupos tratados y 14 para el grupo de control) ± SEM. * p <0,05, *** p <0,001. 36*
13. *Títulos de entra (input) y salida (output) de cada una de las rondas de selección de fagos afines a TGF-β. A) Títulos para el panning con elución por digestión (Panning_A), B) Títulos para el panning con elución por competencia (Panning_B). 37*
14. *PCR de colonias. (A) colonias del panning_A aisladas de la cuarta ronda de selección, tres de las cuales no contienen el producto esperado de ~600pb (8, 27 y 40). (B) colonias del panning_B aisladas de la tercera ronda de selección, seis de las cuales no contienen el producto esperado (7, 8, 15, 19, 40). Como control positivo (C+) se usó el plásmido purificado pComb3x-T-1 y como control negativo (C-) se usó agua. Marcador de peso molecular de 1 kb (Promega). 38*
15. *Resultado del análisis espectrofotométrico del ensayo de ELISA de Fagos del el Panning_A (A y B) y el Panning_B (C y D). Se muestra el número asignado de la clona evaluada (A y C) y su absorbancia a 450 nm (B y D), en rojo se muestran aquellas clonas que se consideraron como positivas. Como control positivo (C+) se usó la mezcla de fagos obtenidos en la ronda 4, como control negativo se usó PBS (C-) o el Fago helper (FH). 39*
16. *ELISA de expresión (proteína total) de los vNAR seleccionados y su capacidad de reconocimiento por TGF-β, se incluyó como referencia el vNAR T-1. 41*
17. *Purificación por inmutafinidad a la etiqueta HA del anticuerpo vNAR TGF-21 purificado previamente por IMAC. M – Marcador peso molecular, I – muestra inicial procedente de IMAC, F – muestra post-purificar, L1 – Lavado con TBST, E – Eluciones con Gly 0.1M, L2 – Lavado con NaSCN 3M, L3 – Lavado con TBS, C+ – Control para inmunodetección. La flecha marca la región correspondiente a la presencia del vNAR (~16 kDa). 42*

18. *Análisis de la pureza final de los vNAR T-1, TGF-10, TGF-21 y TGF-5.b. En la imagen se muestra los resultados del SDS-PAGE teñido con Coomassie, la inmunodetección para confirmar la presencia de los vNAR, así como un análisis por densitometría de las bandas visualizadas en la tinción con Coomassie.* 43
19. *Evaluación in silico de la interacción de TGF- β con sus receptores (A), Fresolimumab (B), T-1 (C), TGF-5.b (D), TGF-10 (E) y TGF-21 (F). También se muestran los residuos que interactúan entre las diferentes combinaciones (G).* 45
20. *Calidad de ARN por electroforesis en gel de agarosa. Se muestran las tres replicas biológicas de los cuatro grupos evaluados: fibroblastos tratados con 0.1, 1 y 10 ng/mL de TGF- β y como control células sin TGF- β adicionado (C-).*..... 46
21. *Clasificación de los genes candidatos para los ensayos por qPCR de fibroblastos activados con TGF- β , muestra los valores de cada uno de los cuatro algoritmos diferentes evaluados por la herramienta web RefFinder. Método Δ Ct, NormFinder, geNorm, BestKeeper y la clasificación completa final.*..... 47
22. *Expresión relativa de los genes modulados por la vía de señalización de TGF- β , evaluados a diferentes concentraciones de la citocina. ANOVA 1-vía, Dunnet vs 0. *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001 **** P \leq 0.0001.* 48
23. *Análisis de la expresión genética en fibroblastos dérmicos, expuestos a TGF- β en combinación con los diferentes anticuerpos evaluados. ANOVA 1-vía, Dunnet vs ‘-/-’ . *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001 **** P \leq 0.0001.*..... 49
24. *Evaluación de la actividad del anticuerpo 1D11.16.8 para neutralizar los efectos de TGF- β en la contracción de retículas de colágeno pobladas con fibroblastos. (A) Registro fotográfico 24 h posterior a la aplicación de los tratamientos. (B) Gráfico del área de las retículas en pixeles. Promedio (n=3) \pm SEM, ANOVA Tukey test, (a) p <0.05 vs ‘-/-’, (b) p <0.05 vs ‘0.04/-’, (c) p <0.05 vs ‘0.4/-’* 50
25. *Efecto de la actividad del vNAR TGF-10 (A) y TGF-21 (B) para neutralizar a TGF- β 1, en el modelo de contracción de colágeno reticular. ANOVA 1-vía, Dunnet vs ‘TGF- β 1 0.4 nM’ . **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001.* 51
26. *Curva de la actividad de TGF- β para inducir la secreción de SEAP en células HEK-Blue. ANOVA 1-vía, Dunnet vs ‘PBS’ . **** P \leq 0.0001.*..... 52
27. *Actividad en el sistema de secreción de fosfatasa alcalina, de los anticuerpos anti-TGF- β 1D11.16.8 (A), T-1 (B), TGF-10 (C), TGF-21 (D) y TGF-5.b (E),. ANOVA vs TGF- β 0.02nM; *P \leq 0.05, ***P \leq 0.001, ****P \leq 0.0001.* 53

Lista de tablas

Figura	Página
1. Oligonucleótidos para el análisis por qPCR de tejidos de piel de ratón tratadas con CAPH cargados con anticuerpo 1D11.16.18.	18
2. Oligonucleótidos para la evaluación por qPCR de genes relacionados a la vía de señalización de TGF- β	28
3. Secuencias correspondientes a los CDR3 de las clonas secuenciadas. En rojo se marcan aquellas clonas seleccionadas para ensayos posteriores, en verde se marcan los codones de paro y en anaranjado a los residuos de cisteínas.	40
4. Concentración de la proteína total, estimado de la concentración del vNAR y rendimiento obtenido a partir del procesamiento de un litro de cultivo.	43
5. Resultados del gráfico de Ramachandran de las estructuras tridimensionales de los anticuerpos vNAR, generadas por modelado por homología y refinados por dinámica molecular.	75
6. Resultados del acoplamiento molecular entre cada uno de los vNAR seleccionados y hTGF- β 1.	77

Capítulo 1. Introducción

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , por sus siglas en inglés) es una proteína homodimérica de 25 kDa, producida por un amplio rango de células y que actúa como un potente regulador del crecimiento y diferenciación celular. Entre sus propiedades se encuentran: arrestar el ciclo celular, suscitar la apoptosis, promover la migración, diferenciación y activación celular, entre otros. Sin embargo, existen diversas patologías asociadas a una hiper-activación de TGF- β , como la fibrosis en órganos y tejidos, la cual se caracteriza por un exceso de tejido cicatricial, al elevarse exponencialmente la expresión de colágeno y la producción de matriz extracelular.

Diferentes tratamientos han sido desarrollados para inhibir los efectos biológicos de TGF- β , entre los que se encuentra el uso de anticuerpos. Un ejemplo de ello es 1D11, un anticuerpo murino capaz de inhibir de forma pan-específica a TGF- β . Este anticuerpo se ha empleado para dilucidar las funciones de TGF- β en el desarrollo y mantenimiento de los tejidos, así como para evaluar el efecto inhibitorio de las patologías asociadas a esta citocina.

En este trabajo se plantea el uso de dominios de anticuerpo vNAR, el fragmento variable de anticuerpos de tiburón IgNAR. Las características de este tipo de anticuerpos establecen un nuevo camino que podría resolver algunas de las deficiencias que presenta el uso de anticuerpos convencionales (IgG) para el tratamiento de patologías, entre las que se incluye su tamaño diez veces menor al de un IgG completo, una mayor estabilidad térmica y química, y por su tamaño pequeño, se alude a una mejor penetración de tejidos.

Para caracterizar la actividad de los vNAR en la neutralización de los efectos biológicos de TGF- β , se plantearon distintos ensayos *in vitro*, como lo son, el sistema de secreción de fosfatasa alcalina dependiente de TGF- β , o la estimulación de TGF- β en fibroblastos dérmicos y su efecto en la expresión genética o la remodelación de matrices de colágeno, así como ensayos *in vivo* empleando un modelo de cicatrización en ratones.

1.1. Antecedentes

1.1.1. Factor de crecimiento transformante beta

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es una citocina perteneciente a la superfamilia de factores de crecimiento transformante beta. Es una proteína homodimérica de 25 kDa (**Figura 1 A**), producida por un amplio rango de células que incluyen macrófagos, células asesinas naturales (NK), células T, células B, miocitos, condrocitos, astrocitos, células epiteliales, células de riñón, células de placenta y plaquetas, así como por algunas células tumorales (Kajdaniuk et al., 2013). TGF- β actúa como un potente regulador del crecimiento y diferenciación celular, teniendo un papel determinante en el desarrollo embrionario, la respuesta inmune y la reparación de tejido (Yang et al., 2001).

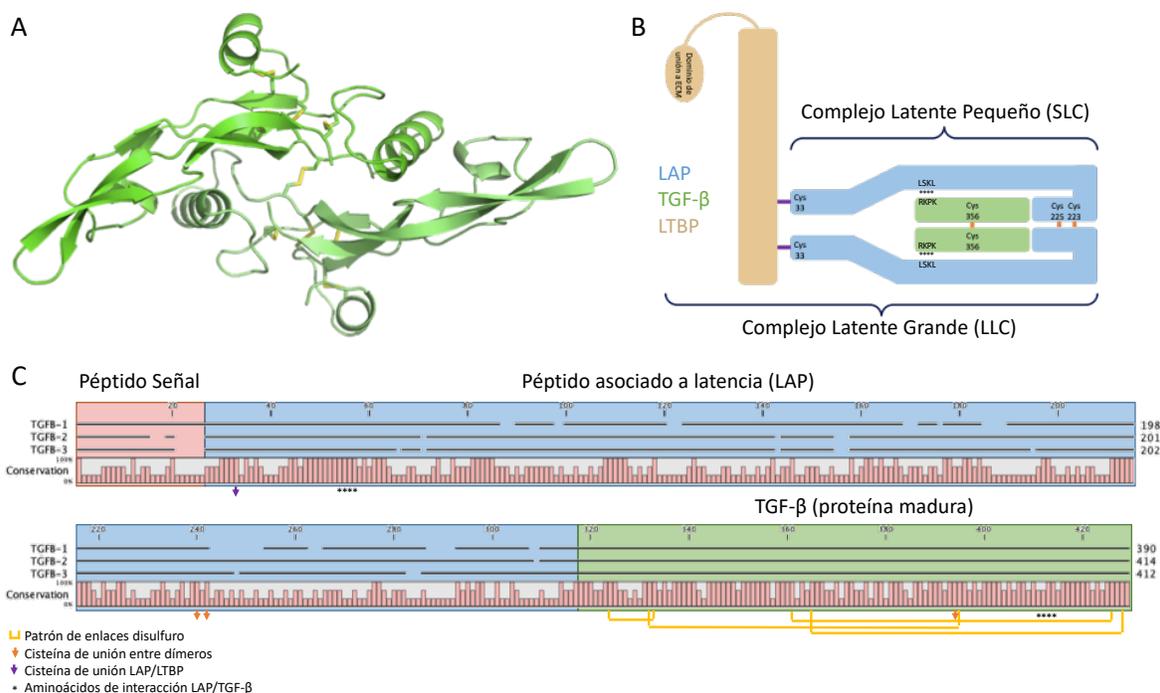


Figura 1 Estructura tridimensional de TGF- β 1 humano (A). Esquema estructural del complejo latente de TGF- β (B). Alineamiento de las secuencias preproteicas de las isoformas TGF- β 1, 2 y 3, en el que se muestran las regiones conservadas (C).

En humanos, el factor de crecimiento transformante beta se presenta en tres isoformas (TGF- β 1, 2 y 3) las cuales conservan una elevada homología estructural (**Figura 1 C**). La identidad en la secuencia de la proteína madura es de 71% entre las isoformas 1 y 2, 77% para 1 y 3, y 79% en 2 y 3.

Las isoformas de TGF- β son sintetizadas como un precursor proteico (pre-pro-proteína, **Figura 1 C**), TGF- β 1 consta de 390 aminoácidos mientras que TGF- β 2 y TGF- β 3 se componen de 412 aminoácidos (Katz et al., 2013). Para las tres isoformas, los primeros 20-30 aminoácidos corresponden al péptido señal (pre-) para su translocación al retículo endoplásmico; los siguientes 250-280 aminoácidos corresponden al pro-dominio denominado 'péptido asociado a la latencia' (LAP, por sus siglas en inglés) y los 112 aminoácidos del carboxilo terminal corresponden al monómero de TGF- β (Acton, 2013).

Después de que el precursor peptídico es translocado al retículo endoplásmico, se forma el homodímero y LAP es hidrolizado, pero permanece unido a TGF- β (complejo latente pequeño, SLC) por la interacción de cuatro parejas de aminoácidos, LSKL en LAP y RKPK en TGF- β . TGF- β es secretado al medio extracelular acoplado a LAP y a la proteína de unión a TGF- β latente (LTBP), formando un heterómero conocido como complejo latente grande (LLC, **Figura 1 B**). LTBP está unido a LAP por enlaces disulfuro entre la cisteína 33 de LAP y una de las cisteínas presentes en el tercer dominio 8-Cys de LTBP, la función principal de LTBP es asociar al complejo latente con la matriz extracelular (Kubiczkova et al., 2012).

Mientras TGF- β permanece unido a la matriz extracelular, este se encuentra en forma inactiva, por lo que se requiere separarse de LAP para que pueda llevar a cabo sus funciones. Existen diversos factores que promueven la activación de TGF- β , entre los que se encuentran: a) degradación de LAP por proteasas como plasmina o las metaloproteinasas de matriz MMP-2 y MMP-9; b) la interacción entre trombospondina-1 y LAP; c) fuerzas mecánicas generadas sobre LAP por las integrinas α V β 6 o α V β 8; d) o cambios fisiológicos, como el aumento en la temperatura, pH ácido o la acción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Murphy-Ullrich and Poczatek, 2000).

Una vez liberada la forma activa de TGF- β , esta se acoplará con receptores homodiméricos distribuidos en la superficie celular. Se han descrito tres tipos de receptores para TGF- β , el receptor tipo 1 (T β RI, ALK5) es un receptor de la familia serina/treonina cinasa y para activar su función

requiere ser fosforilado en su dominio GS. El receptor tipo 2 (TGFBR2) también pertenece a la misma familia, pero carece del dominio GS, por lo que está activado constitutivamente. El receptor tipo 3 (TGFBR3) es un proteoglicano que concentra en la superficie celular a la forma activa de TGF- β (Heldin and Moustakas, 2016).

Las tres isoformas de TGF- β pueden unirse directamente a TGFBR2, pero la presencia de TGFBR3 facilita la unión entre la citocina y TGFBR2, esto es especialmente útil para TGF- β 2, ya que su afinidad por TGFBR2 es de 200 a 300 veces menor en comparación con las otras isoformas (Villarreal et al., 2016). T β RI no tiene la capacidad para capturar a TGF- β , por lo que requiere primero de la unión de la citocina con TGFBR3; TGFBR3 al detectar a TGF- β , forma un complejo con T β RI, conteniendo dos copias de cada receptor (complejo heteromérico); formándose este complejo (**Figura 2**), TGFBR3 fosforila a T β RI en su dominio GS para activar su función cinasa, lo que desencadena diferentes vías de señalización que eventualmente regularán la transcripción de diversos genes (Lodish H, Berkman A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, 2008; Penn et al., 2012).

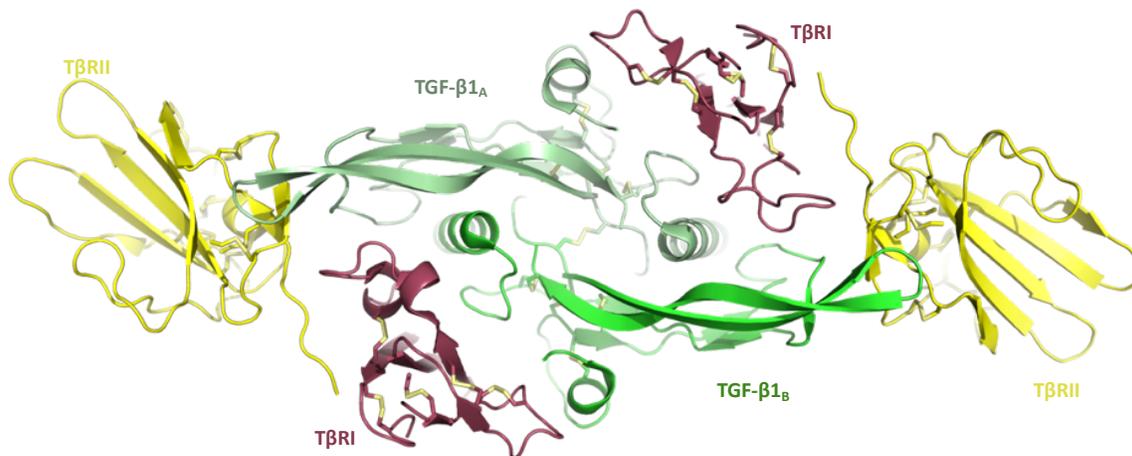


Figura 2 Esquema del complejo ternario de TGF- β con sus receptores. Los monómeros TGF- β 1_A y TGF- β 1_B son de color verde y verde pálido, respectivamente. T β RI y TGFBR2 son de color guinda y amarillo, respectivamente. Modificado de Radaev et al. (2010).

La ruta de las SMAD's (**Figura 3**), es la señalización principal desencadenada por TGF- β (señalización canónica), en esta, T β RI fosforila a las proteínas reguladoras SMAD2 y SMAD3 (R-SMAD), lo que

induce en ellas una oligomerización junto a SMAD4 (complejo SMAD2/3-4), necesaria para la translocación al núcleo. Ya en el núcleo, el complejo SMAD2/3-4 interactúa con diversos factores de transcripción que desencadenan la activación o represión de la transcripción de diversos genes, como por ejemplo la represión de myc y la expresión de p21, un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas, provocando un arresto del crecimiento celular; o provoca la muerte celular al inducir a BCL-2, DAPK1 y TIEG1 (Pickup et al., 2013).

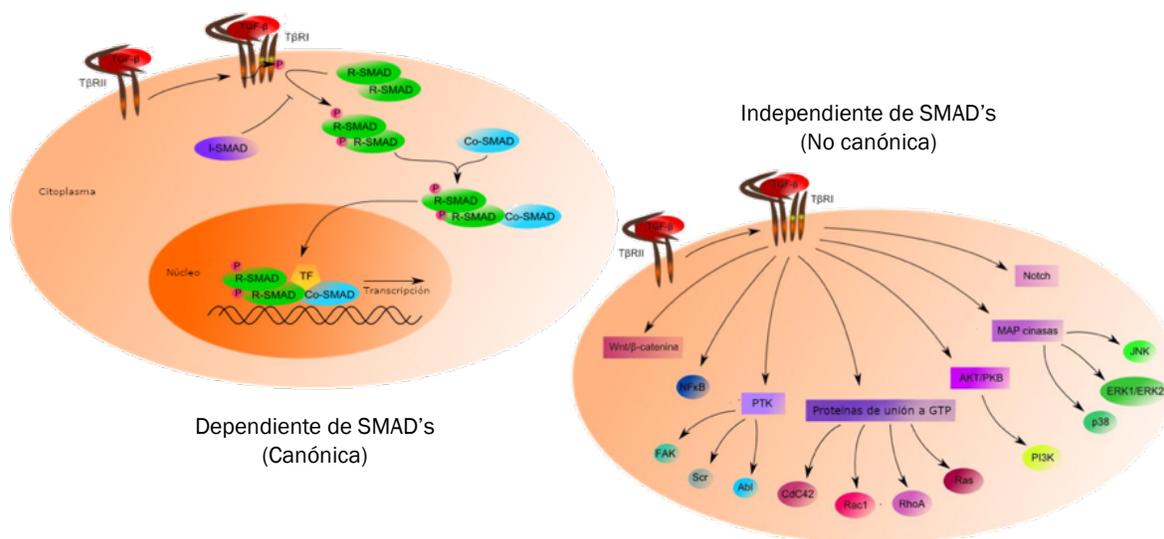


Figura 3 Vías de señalización de TGF-β. Ruta dependiente de SMAD's: Después de la unión del ligando, los receptores de TGF-β dimerizan y fosforilan las proteínas SMAD intracelulares, las cuales se translocan al núcleo y regular la transcripción genética. Ruta independiente de SMAD's: el receptor TβRI puede fosforilar a otros factores de transcripción que no sólo regulan la señalización de SMAD's, sino que también generan respuestas independientes de ellas.

Por otra parte, TβRI también puede fosforilar a otras proteínas (vía no canónica, **Figura 3**), generando señalizaciones independientes de SMAD. Algunas de las moléculas efectoras no canónicas estimuladas por TGF-β son las MAP cinasas: ERK1/ERK2, p38 MAPK y JNK; las cinasas de crecimiento y supervivencia: PI3K, AKT/PKB y mTOR; y las proteínas pequeñas de unión a GTP: Ras, RhoA, Rac1, y Cdc42 (Tian et al., 2011).

1.1.2. TGF- β y su papel en el proceso de cicatrización

La piel es uno de los órganos más grandes del cuerpo y funciona como la primera barrera de defensa contra agentes externos. La piel está compuesta por tres capas, la más externa es la epidermis, que consiste en un epitelio escamoso estratificado de queratinocitos y contiene melanocitos y células de Langerhans y Merkel. La dermis, es la capa interna que proporciona integridad estructural, elasticidad y nutrición, es un tejido conectivo compuesto por fibroblastos y matriz extracelular enriquecida con colágeno y fibras elásticas, también contiene vasos sanguíneos y linfáticos, glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas, terminaciones nerviosas y folículos pilosos. Como la piel se ve constantemente desafiada por una amplia variedad de factores, es muy susceptible a las lesiones (Zomer and Trentin, 2018).

Las cascadas de eventos desencadenadas después de una lesión cutánea y la formación de cicatrices, son muy similares a las del infarto de miocardio o la lesión de la médula espinal. En este sentido, y por su accesibilidad, la piel es uno de los mejores modelos para estudiar los mecanismos de reparación tisular y desarrollar nuevas estrategias en medicina regenerativa (Eming et al., 2014) .

TGF- β está involucrado en diversos procesos relacionados con la cicatrización de heridas, entre los que se encuentran: inflamación, estimulación de la angiogénesis, síntesis de colágeno y remodelación de la matriz extracelular; al regular la función de queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, monocitos entre otro tipo de células (Finsson et al., 2013).

Posterior a una lesión dérmica aguda, TGF- β 1 es rápidamente sobre expresado y secretado por los queratinocitos, plaquetas, monocitos, macrófagos y fibroblastos. TGF- β 1 es esencial para la inicialización de la inflamación y la formación de tejido granular. También estimula la contracción de la herida a través de la inducción de la expresión de alfa-actina de músculo liso en fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos. Esta citocina también está implicada en la angiogénesis, al regular la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) (Ramirez et al., 2014).

Las tres isoformas de TGF- β están presentes en el proceso de cicatrización, pero difieren en su nivel de expresión, el tiempo de residencia en la herida e incluso en su rol biológico. Sin embargo, una elevada expresión y exposición de estas citocinas, en el área lesionada, puede desencadenar una

cicatrización excesiva, al elevarse exponencialmente la expresión de colágeno y la producción de matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) (Lu et al., 2005; Penn et al., 2012).

La importancia de la regulación de TGF- β en la cicatrización de heridas se expone en diversos estudios en ratas, conejos y cerdos, a los que se les administran anticuerpos neutralizantes de TGF- β 1, para el tratamiento de heridas cutáneas, produciendo una reducción de la respuesta inflamatoria, la deposición temprana de ECM y reduciendo notablemente la formación de cicatrices (Lu et al., 2005; Shah et al., 1995; Singer et al., 2009).

1.1.3. Anticuerpos neutralizantes de TGF- β

1.1.3.1. Anticuerpos

Las inmunoglobulinas (Ig), comúnmente nombrados como anticuerpos, son glicoproteínas encontradas principalmente en la sangre y secreciones (como saliva o lágrimas) de vertebrados y clasificadas en el grupo de las gamma globulinas. Los anticuerpos son producidos por los linfocitos B como una de las principales líneas de defensa del sistema inmunológico, por el cual, se reconoce y neutraliza o elimina a un agente extraño para el organismo, como bacterias, hongos, virus, parásitos o moléculas producidas por estos (Papageorgiou et al., 2016).

Los organismos han mejorado evolutivamente su respuesta humoral para hacer frente a los ataques antigénicos, empleando anticuerpos en una amplia gama de formatos (IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, isotipos), en la sangre humana se encuentran principalmente anticuerpos tipo IgG (**Figura 4**), los cuales están conformados estructuralmente por dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) idénticas entre sí, cada cadena está compuesta de un dominio variable (V) y uno o más dominios constantes (C), que se encuentran en el extremo amino-terminal y carboxilo-terminal respectivamente (O'Kennedy, 2017).

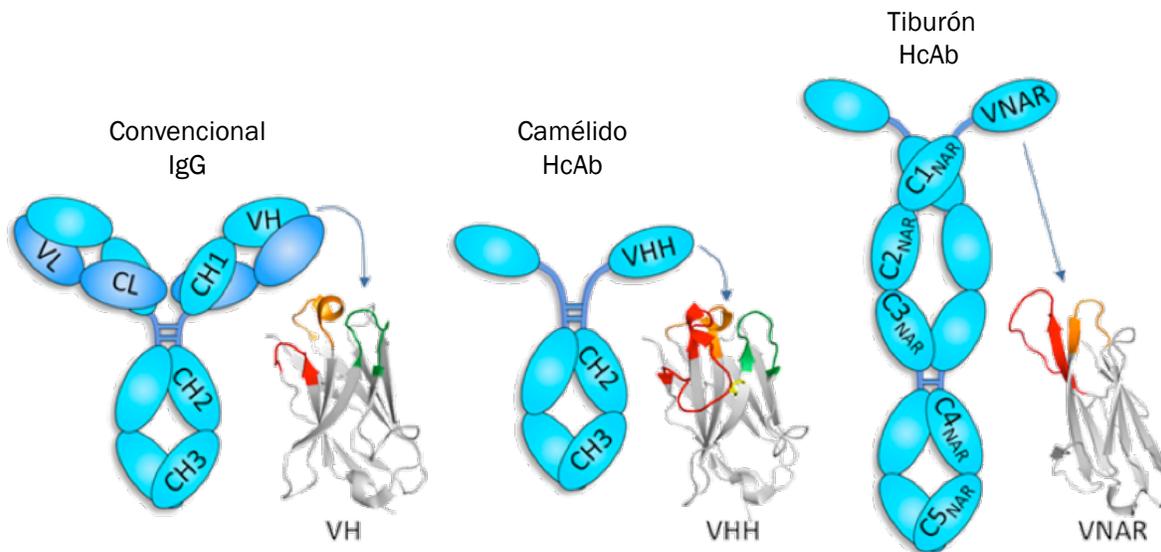


Figura 4 Representación esquemática de anticuerpos convencionales (IgG) y anticuerpos de sólo cadena pesada (HcAb). Los anticuerpos convencionales, formados por cadenas pesadas (cian) y ligeras (azul), se encuentran en todos los vertebrados, pero los camélidos y los peces cartilagosos también tienen anticuerpos carentes de cadenas ligeras. La organización del dominio variable de la cadena pesada de cada uno de estos anticuerpos se muestra usando tres estructuras representativas. El CDR1, CDR2 y CDR3 se representan en naranja, verde y rojo, respectivamente, excepto para el vNAR que carece de CDR2, y el color verde se usa para indicar la región HV4 que a veces participa en la unión del antígeno. Modificado de Gonzalez-Sapienza et al. (2017).

El dominio variable es llamado de esta forma, debido a que presenta la mayor diversidad en aminoácidos y distingue a los anticuerpos entre sí (ideotipo) en relación con el reconocimiento al antígeno. En él existen tres regiones de aminoácidos conocidas como región determinante de la complementariedad o CDR por sus siglas en inglés (CDR1, CDR2 Y CDR3), los cuales se caracterizan por ser bucles de aproximadamente 10 aminoácidos que se conectan con láminas beta conservadas denominadas andamios (FRW por sus siglas en inglés). Estos bucles sobresalen de la superficie del anticuerpo quedando expuestos para la interacción con el antígeno (Kindt et al., 2013).

El CDR3 es la región con más variabilidad de todas, y es donde se genera un contacto más amplio con el antígeno, aunque los CDR no son los únicos que se pueden unir al antígeno y en algunas ocasiones pueden llegar a quedar uno o más CDR excluidos de la unión antigénica.

1.1.3.2. Anticuerpos IgNAR

En elasmobranchios se ha descrito un isotipo distinto de inmunoglobulina al que se denominó como Nuevo Receptor de Antígeno o IgNAR (por sus siglas en inglés). Al igual que las inmunoglobulinas convencionales, los IgNAR (**Figura 4**) están conformados por dos cadenas pesadas unidas por enlaces disulfuro, pero estos carecen de cadenas ligeras (Greenberg et al., 1995). En sus cadenas pesadas se pueden observar cinco dominios constantes (cNAR) y un dominio variable (vNAR). Este tipo de anticuerpos carentes de cadenas ligeras también está presente en camélidos (denominados HcAb, **Figura 4**), pero difieren estructuralmente de un IgNAR, ya que sólo poseen en su cadena pesada dos dominios constantes y un dominio variable, estos anticuerpos HcAb son estructuralmente similares a un IgG pero carecen del primer dominio constante (CH1), el cual es necesario para la unión de la cadena ligera (Hamers-Casterman et al., 1993).

Al carecer de cadenas ligeras, los IgNAR sólo presentan dos dominios variables, a diferencia de las inmunoglobulinas convencionales que poseen cuatro, pero esta característica no limita su especificidad hacia los antígenos (Vargas Peralta, 2010). Por su parte, los vNAR no poseen un CDR2 ya que carecen de las dos láminas beta que lo forman, pero poseen otras dos regiones hipervariables (HV2 y HV4) que en ocasiones interactúan con el antígeno. Sin embargo, la especificidad de los vNAR se basa en un CDR3 más largo, lo que les ayuda a penetrar en sitios inaccesibles para otros anticuerpos.

Los vNAR pueden ser separados del resto de la cadena, obteniéndose fragmentos de dominio sencillo (sdAb, por sus siglas en inglés), los cuales además de no perder su especificidad, poseen características especiales que los convierte en candidatos idóneos para ser utilizados en medicina terapéutica; como lo son su estabilidad térmica, un tamaño más pequeño que ronda entre los 15 kDa, rapidez de difusión y de penetrabilidad en los tejidos, así como una mejor distribución corporal en comparación con las IgG (Kovalenko et al., 2013; Liu et al., 2014; Wesolowski et al., 2009).

1.1.3.3. Tratamientos anti-TGF- β basados en anticuerpos

Actualmente existen diversos tratamientos basados en anticuerpos neutralizantes de la citocina TGF- β o de alguno de sus receptores, como por ejemplo 1D11, Fresolimumab, Lerdelimimab, Metelimumab y 2g7, entre otros (Katz et al., 2013). El anticuerpo 1D11 es un potente inhibidor de la forma activa de TGF- β , pero al ser de origen murino, este anticuerpo no es apropiado para usarse como tratamiento en humanos, lo que dio origen a Fresolimumab (GC1008) un anticuerpo IgG4 monoclonal completamente humanizado derivado de 1D11, el cual presenta la capacidad para neutralizar a las tres isoformas de TGF- β (**Figura 5**), con una afinidad en el orden nanomolar (Moulin et al., 2014).

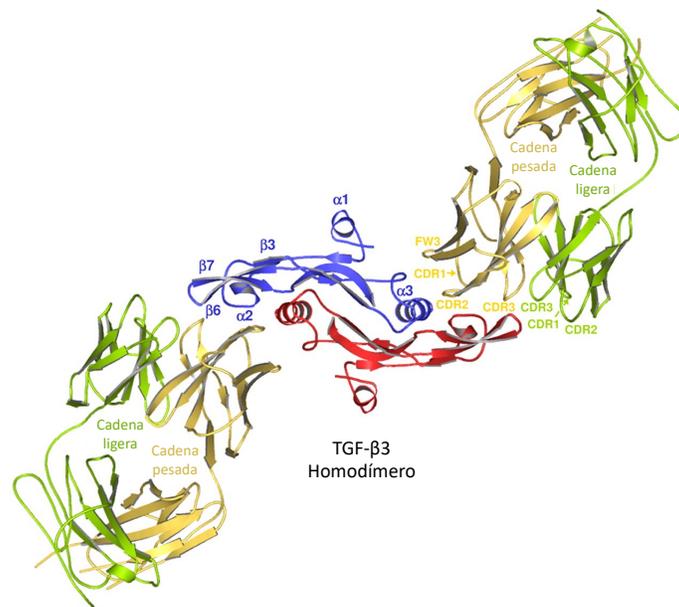


Figura 5 Interacción de Fresolimumab (GC-1008) versión Fab, con la citocina TGF- β 3, en la cual se puede apreciar como el anticuerpo bloquea la zona de interacción entre TGF- β y sus receptores. Los monómeros de TGF- β 3 se representan en azul y rojo. Los fragmentos Fab de Fresolimumab se muestran en amarillo (cadena pesada) y verde (cadena ligera). Recuperado de (Grütter et al., 2008).

Fresolimumab se ha estudiado en pruebas clínicas para el tratamiento de esclerosis sistémica (fase 1), glomeruloesclerosis (fase 2), Mielofibrosis (fase 1), o en diferentes tipos de cáncer, de los cuales sólo en el tratamiento de esclerosis sistémica se evidenciaron efectos significativos en la reducción de la enfermedad, en los otros casos los efectos no fueron perceptibles, o el tratamiento fue terminado antes de tiempo. Sin embargo, aunque no se determinaron efectos adversos severos en la dosis más alta administrada (15 mg/kg), algunos de los pacientes en los diferentes estudios

desarrollaron queratoacantomas (den Hollander et al., 2015; Formenti et al., 2018; Mascarenhas et al., 2014; Morris et al., 2014; Rice et al., 2015; Vincenti et al., 2017), un tipo de cáncer epidérmico caracterizado por su rápido crecimiento, principalmente en zonas de la piel dañadas por exposición solar, los cuales son producto de la inhibición de la señalización anticancerígena de TGF- β y que se reversionaron al detener la administración de Fresolimumab (Lacouture et al., 2015; Morris et al., 2014; Stevenson et al., 2013).

En 2012, Camacho Villegas describió el aislamiento y caracterización de T-1, un dominio variable de anticuerpo IgNAR (vNAR) obtenido a partir de una biblioteca no inmune del tiburón *Heterodontus francisci*. T-1 es un dominio de 118 aminoácidos de longitud (24 corresponden a la región CDR3), capaz de reconocer las tres isoformas de la citocina TGF- β y de neutralizar los efectos de las isoformas TGF- β 1 y TGF- β 2.

En un ensayo preliminar de citotoxicidad en cultivo primario de hígado de ratón, no se observaron efectos citotóxicos o citolíticos del anticuerpo T-1, también se estableció que éste genera una baja inmunogenicidad, al no poder apreciar una respuesta inmune en ratones de tipo silvestre.

1.1.4. Apósitos de alginato en el tratamiento de lesiones dérmicas

El alginato de sodio, es un polisacárido lineal y copolímero derivado de algas marinas pardas compuesto por residuos de β -D-manuronato (M) y α -L-guluronato (G) unidos covalentemente en diferentes secuencias alternas o aleatorias, como MMM, GGG o MGM (D'Ayala et al., 2008). El alginato se utiliza como polímero en hidrogeles debido a su alta capacidad de adsorción, alta rentabilidad, biodegradabilidad y características antibacterianas (Naghshineh et al., 2019). Los hidrogeles de alginato también son muy porosos, lo que contribuye a la funcionalidad de esta matriz en el tratamiento de heridas, al mantenerlas húmedas sin dañar el tejido recién formado (Ahmed et al., 2018). Este tipo de materiales también pueden ser empleados para evitar los efectos adversos asociados con la administración sistémica, al funcionar como sistemas de entrega tópica de compuestos. Se han explorado matrices poliméricas para la liberación controlada de proteínas y otras terapias, que prolongan la vida media de la circulación y la administración de un objetivo específico (Lee and Mooney, 2012; Sakai et al., 2016).

Sin embargo, los hidrogeles basados únicamente en alginato exhiben una escasa estabilidad estructural que se degrada aún más en contacto con fluidos biológicos debido a la pérdida del ion calcio (Ca^{2+}) que funciona como agente reticulante. Para aumentar la manipulación y la estabilidad de los hidrogeles de alginato, se puede emplear una reticulación covalente o iónica, o se puede combinar el alginato con otros biopolímeros como gelatina o quitosano (Afjoul et al., 2020; Boateng et al., 2015; Yeom and Lee, 1998). Los agentes plastificantes son otra excelente opción para aumentar la estabilidad del hidrogel porque reducen las fuerzas intermoleculares entre las cadenas de polímeros, disminuyen la fragilidad y aumentan la flexibilidad, tenacidad, tracción y resistencia; sin embargo, los plastificantes también comprometen la porosidad del gel resultante (Santana and Kieckbusch, 2013).

Rubio-Elizalde et al. (2019) describieron el impacto del metil éter metacrilato de poli(etilenglicol) (PEGMA) como agente plastificante en hidrogeles de alginato de calcio. La adición de PEGMA creó un material esponjoso compuesto de poros semiesféricos e interconectados de 50-100 μm con mayor estabilidad en medios acuosos y resistencia estructural a la manipulación y flexión (**Figura 6**).



Figura 6 (A) Efecto de PEGMA en la retención de la forma de apósitos de alginato de calcio. La circunferencia original se muestra con una línea roja punteada y con flechas se señalan los cambios de forma. (B) Efecto de PEGMA en la degradación del material en medio acuoso. Se observa el apósito al instante en entrar en contacto con el medio (t=0h) y hasta 100 h después del contacto (t=110h). El contorno de los fragmentos se delineó con blanco para mostrar los cambios de forma y con flechas rojas se señalan pequeños segmentos. Recuperado de Rubio-Elizalde (2019).

1.2. Justificación

La piel es nuestra primera línea de defensa contra los agentes adversos presentes en el medio, así como nuestra carta de presentación para definirnos como individuos. Este órgano está expuesto a sufrir lesiones, que pueden ser un importante problema de salud pública cuando ocurre una cicatrización excesiva (fibrosis), ocasionando una discapacidad física, psicológica y social, resultado de una desfiguración estética y/o el deterioro funcional. Por lo que es necesario desarrollar métodos efectivos para prevenir o reducir la formación excesiva de cicatrices (Singer et al., 2009).

Un posible tratamiento, es el uso de anticuerpos neutralizantes de TGF- β , una citocina implicada en la regeneración epitelial, y la cual genera fibrosis en los tejidos cuando es sobreexpresada. Estos tratamientos han demostrado reducir la formación de cicatrices, mejorando la estética de la lesión (Choi et al., 2015). Sin embargo, el uso de anticuerpos convencionales se ve limitado por su baja estabilidad y dado su reducida capacidad en la penetración del tejido, estos deben ser inyectados, lo cual puede ser doloroso o desencadenar efectos secundarios sistémicos.

Es por lo anterior, que se plantea el uso de dominios de anticuerpos vNAR. Estos presentan una mayor estabilidad y debido a su tamaño se alude una mejor penetración. Lo que los haría candidatos potenciales para ser aplicados por vía tópica en combinación con otros agentes protectores de la herida, como los apósitos a base de alginato.

1.3. Hipótesis

Un dominio de anticuerpo vNAR anti-TGF- β derivado de una biblioteca sintética, brindará una mejor capacidad para inhibir la fibrosis dérmica, en comparación con un anticuerpo IgG convencional.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Aportar nuevas opciones para inhibir la fibrosis dérmica estimulada por TGF- β , empleando un dominio vNAR.

1.4.2. Objetivos específicos

- Determinar la actividad antifibrótica del anticuerpo 1D11.16.8, aplicado de forma tópica en un modelo *in vivo* de lesión cutánea.
- Aislar y caracterizar un dominio vNAR anti-TGF- β a partir de bibliotecas sintéticas.
- Dilucidar la interacción vNAR - hTGF- β 1, a partir de modelos *in silico*.
- Evaluar la capacidad del vNAR para neutralizar los efectos de hTGF- β 1 en modelos *in vitro*, en comparación con el anticuerpo 1D11.16.8.

Capítulo 2. Metodología

2.1. Evaluación de la actividad de apósitos de alginato de calcio cargados con anticuerpos

2.1.1. Generación de apósitos de alginato de calcio cargados con anticuerpos

Se generaron apósitos de hidrogel de alginato de calcio plastificado con metil-éter-metacrilato de polietilenglicol (CAPH), con algunas modificaciones a lo descrito por Rubio-Elizalde y colaboradores (2019).

Para ello, se homogeneizó metil-éter-metacrilato de polietilenglicol (PEGMA) 0.375% (v/v) con alginato de sodio (Alg) al 1.5% (p/v), y se polimerizó con cloruro de calcio al 0.75% (p/v) en agitación intensa hasta que se obtuvo una solución suave. Para la formación de los apósitos, se mezcló 1, 5, 10, 50 y 100 µg (diluido en PBS pH 7.4) del anticuerpo 1D11.16.8 (BioxCel), con solución de CAPH (15 y 135 µL por apósito, respectivamente) y se vertieron en una placa de 96 pocillos, luego se congelaron durante 48 h a -20 °C y se liofilizaron durante otras 24 h a -52 °C en un liofilizador FreeZone de 1 litro (Labconco). Se prepararon también apósitos sin anticuerpo como control. Las muestras se almacenaron en refrigeración hasta su uso. Los apósitos CAPH-1D11 con 1 y 5 µg se usaron para ensayos *in vitro*, mientras que aquellos con 10, 50 y 100 µg fueron empleados en ensayos *in vivo*.

2.1.1.1. Evaluación de la liberación de anticuerpo

Para evaluar la capacidad de los apósitos para liberar al anticuerpo, se prepararon apósitos que contenían al anticuerpo IgG₁ de rata anti-HA-HRP (Roche), a diferentes dosis: 12.5, 25 y 50 ng por apósito. Los apósitos se transfirieron a una placa de 24 pozos, se les adicionó 1 mL de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (SFB) y 1% de solución antibiótica-antimicótica (A/A) compuesta por penicilina (10,000 UI/mL), estreptomina (10.000 µg/mL) y anfotericina B (25 µg/mL), al que se denominó DMEM10, y se

incubaron a 37 °C, como controles se incluyeron 12.5 ng de anticuerpo disuelto en 1 mL de medio DMEM y 12.5 ng de anticuerpo procesado de la misma forma que los apósitos (congelado y liofilizado), resuspendido en 1 mL de medio DMEM10.

Para evaluar la liberación acumulada, se realizaron muestreos a diferentes tiempos: 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 6, 12 y 24 h, para ello, se tomaron 10 µL de cada medio y se evaluó la actividad de la peroxidasa presente en el anticuerpo, empleando un ensayo colorimétrico con el reactivo 1-Step TMB Turbo (Thermofisher), para lo cual los 10 µL de medio se mezclaron con 40 µL de PBS y 50 µL de TMB, se incubaron durante 30 min a 37 °C y se detuvo la reacción con 100 µL de HCl 2 N, se leyó la absorbancia a 450 nm.

Para evaluar la liberación puntual, se realizaron muestreos a diferentes tiempos: 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 6 y 12 h, en los que se recuperó por completo el medio y se renovó con 1 mL de DMEM10, para este ensayo sólo se emplearon los apósitos con 50 ng de anti-HA-HRP. Se evaluaron 10 µL de cada medio como lo descrito en el párrafo anterior.

2.1.1.2. Evaluación de la viabilidad de 1D11.16.8 cargado en CAPH

Se empleó el sistema de secreción de fosfatasa alcalina inducida por TGF-β, para la evaluación de la actividad de los anticuerpos 1D11.16.8 cargados en los apósitos CAPH. Para esto, se incubaron previamente los apósitos en 1 mL de medio DMEM10 durante 2 h para inducir la liberación del anticuerpo al medio, posteriormente 50 µL del medio acondicionado se mezclaron con 10 µL de TGF-β1 20 pM y se procedió de igual forma a lo descrito en la sección **2.2.4.3**, ajustando el volumen de suspensión celular a 140 µL.

Los resultados se presentaron como el porcentaje de neutralización de TGF-β, los cuales se calcularon mediante una regresión lineal, considerando como el 100% de neutralización a la absorbancia obtenida de las células sin estímulo de TGF-β, mientras que el 0% corresponde a las células estimuladas por TGF-β.

2.1.2. Evaluación de la actividad *in vivo*

2.1.2.1. Modelo murino de cicatrización de heridas cutáneas por escisión

Se evaluó la actividad de andamios CAPH cargados con anticuerpo 1D11 en un modelo murino de cicatrización, para esto se emplearon ratones BALB/c hembra (12 semanas de edad y un peso de 23-26 g). Los animales se mantuvieron de forma individual y con acceso a alimento y agua *ad libitum*, en un ciclo de luz-oscuridad de 12h. El trabajo experimental se realizó en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C. (CIATEJ), bajo los requerimientos descritos por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) y apegado a la norma NOM-062-ZOO-1999.

Los ratones fueron anestesiados por vía inhalatoria con Isoflurano al 3%, y se mantuvieron con una concentración de 0.5-1% durante el proceso. Se rasuró y depiló el dorso de los animales, para posteriormente hacer bilateralmente dos heridas circulares de 2 mm, empleando un punzón desechable. Las heridas generadas fueron por escisión completa de la piel, incluyendo la capa del pánículo carnoso. A la herida del lado derecho (herida tratada) se le colocó un andamio de CAPH, libre o cargado con 10, 50 o 100 μg de anticuerpo anti-TGF- β (CAPH-1D11-10, -50 y -100, respectivamente). La herida del lado izquierdo se dejó libre y recibió los cuidados básicos (herida control).

Se tomó registro fotográfico de las heridas desde el día creación (Día 0) y los días 2, 3, 4, 7 y 10. También se evaluó el diámetro de la herida y se buscaron síntomas de hemorragia, necrosis, eritema, edema, pápula, exudado y granulosis. También se evaluó macroscópicamente el grado de inflamación y re-epitelización, bajo una cuantificación cualitativa en un rango de 0 a 3. La re-epitelización se puntuó como: (0) ausente, herida de color rojo brillante; (1) presencia moderada de epitelización alrededor del tejido de granulación, herida rosada; (2) la presencia de epitelización excede la del tejido de granulación, herida pálida; y (3) herida completamente curada. La inflamación de la herida se determinó por la presencia de tejido abultado acompañado de eritema y se calificó como (0) ausente, (1) escasa presencia en los alrededores de la herida, (2) presencia moderada fuera de los bordes de la herida y (3) rodeando completamente la herida.

Al décimo día, se realizó la eutanasia de los animales y se disecó la herida, incluyendo 5 mm de piel circundante. La mitad del tejido se procesó por histología y el resto se empleó para evaluar la expresión genética. Para el análisis histológico, los tejidos se fijaron en formalina al 10% durante 24 h, posteriormente se embebieron en parafina y se cortaron en secciones de 6-8 μm . Los especímenes obtenidos se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (H&E) o con Tricrómico de Masson (MT), y se evaluaron y fotografiaron por microscopía a una magnificación de 100x. Se evaluó la densidad óptica de colágeno empleando el software de análisis de imágenes FIJI/ImageJ (NIH, v 2.0.0), para lo cual se extrajo el canal azul de las micrografías obtenidas y se comparó la densidad en píxeles con respecto al área total.

La otra mitad de los tejidos se homogenizaron en RiboZol reagent (Amresco) y se procedió a la extracción de ARN de acuerdo con lo descrito por el fabricante. Posteriormente, 500 ng de ARN fueron retrotranscritos empleando el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) y el ADN complementario (ADNc) resultante fue evaluado por qPCR utilizando EvaGreen 5X qPCR mix (qARTA Bio Inc.), y 10 pmol/ μL de cada oligonucleótido.

La cuantificación se realizó en un LightCycler 96 (Roche Diagnostics). Con un programa que consistió en un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 15 min seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 s, alineamiento a 56 °C por 20 s, y una extensión final a 72 °C por 20 s. Se evaluaron los genes para TGF- β 1 y para la actina de músculo liso (*Acta2*), como gen endógeno se empleó Hipoxantina fosforribosiltransferasa (*Hprt*, **Tabla 1**). Se comparó la expresión de las heridas tratadas con el promedio de todas las heridas control, bajo el método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tabla 1 Oligonucleótidos para el análisis por qPCR de tejidos de piel de ratón tratadas con CAPH cargados con anticuerpo 1D11.16.18.

Nombre	Gen	Primer (5'-3')
Factor de crecimiento transformante beta	<i>Tgfb1</i>	F: CACTCCCGTGGCTTCTAGTG R: GGACTGGCGAGCCTTAGTTT
Actina de músculo liso	<i>Acta2</i>	F: TCAGCGCCTCCAGTTCCT R: AAAAAAACCACGAGTAACAAATCAA
Hipoxantina fosforribosiltransferasa	<i>Hprt</i>	F: GTAATGATCAGTCAACGGGGGAC R: CCAGCAAGCTTGCAACCTTAACCA

2.2. Evaluación de la actividad de dominios vNAR anti-TGF- β

2.2.1. Generación de nuevos candidatos

Se decidió ampliar el repertorio de anticuerpos vNAR neutralizantes de la citocina TGF- β , a partir de tres bibliotecas sintéticas generadas por Cabanillas Bernal (2019), en la que se mutó la región correspondiente al CDR3 del dominio vNAR por medio de la técnica conocida como mutagénesis de Kunkel (Kunkel, 1985), la cual consiste en emplear un oligonucleótido degenerado para alinearlo a un plásmido de cadena sencilla que contenía uracilo en lugar de timina, y generar una nueva cadena complementaria, mientras la cadena original con uracilo es degradada por el metabolismo bacteriano.

Estas bibliotecas sintéticas están basadas en vNAR que difieren en el número de enlaces disulfuro; la primera biblioteca nombrada como VS0, emplea como marco estructural al anticuerpo T-1, el cual presenta afinidad por TGF- β , y se caracteriza por tener sólo el enlace disulfuro canónico que conecta el FRW1 con el FRW3; VS1, es la biblioteca basada en T-20, este posee un enlace disulfuro adicional que conecta el CDR1 con el CDR3; por último, la biblioteca VS2 está basada en TN-16, un vNAR con dos enlaces disulfuro adicionales que conectan el CDR1 con el CDR3 y el CDR3 con el FRW4.

El repertorio de dominios vNAR que conforman a la biblioteca sintética se encuentran insertados en el vector fagémido pComb3x, el cual posee un promotor de lactosa para la expresión de la proteína recombinante, un gen de resistencia a ampicilina, la etiqueta correspondiente al péptido señal OmpA, que transporta a la proteína recombinante al espacio periplásmico de la bacteria, la secuencia nucleotídica del fragmento vNAR que se encuentra flanqueado por dos sitios distintos para la enzima de restricción Sfil, seguido de una etiqueta de seis histidinas (6His-tag) y una etiqueta de hemaglutinina (HA-tag), las cuales son utilizadas para la purificación y detección del fragmento respectivamente. El vector posee como proteína de fusión a la proteína de cubierta 3 (P3) del bacteriófago filamentoso M13, la cual se encuentra situada después de la HA-tag, entre ambos se encuentra un codón de paro (ámbar), con el objetivo de poder expresar al anticuerpo con o sin la proteína de fusión y sin requerir de una segunda clonación; esto mediante el uso de cepas de *E. coli* supresoras de este codón (Barbas, 2001).

Esta biblioteca sintética, con la capacidad de generar casi cualquier combinación de aminoácidos en el CDR3, fue sometida a un proceso de selección contra rhTGF- β 1, por medio de un despliegue en fagos (panning), de acuerdo con lo descrito por Barbas (2001). Para aprovechar al máximo el proceso de selección de fagos, se partió de una mezcla de fagos de las tres bibliotecas sintéticas antes mencionadas.

Para la elución de los fagos que se unieron al antígeno, durante las rondas de selección, se emplearon dos estrategias. (a) Elución por digestión: después del proceso de lavado, se adicionaron 50 μ L de tripsina (10 mg/mL), se incubó por 30 min a 37 °C y se recuperó el sobrenadante para infectar nuevamente. (b) Elución por competencia, después del proceso de lavado, se adicionaron 50 μ L de 1D11.16.8 (10 μ g/mL), anticuerpo monoclonal de ratón neutralizante de TGF- β , se incubó por 60 min a 37 °C y se recuperó el sobrenadante para infectar nuevamente.

Al finalizar las rondas de selección, se aislaron 45 colonias, que se analizaron por PCR con los Oligos específicos del vector, ompseq (5'-AAGACAGCTATCGCGAT TGCAG-3') y gback (5'-GCCCCCTTATTAGCGTTTGCCATC-3'); y por ELISA, en el que se hace un doble reconocimiento del fago, primero se captura al fago en la placa por medio de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-M13, y después se reconoce la etiqueta de hemaglutinina mediante un anticuerpo IgG₁ de rata anti-HA acoplado a peroxidasa (Roche).

De aquellas clonas que dieron positivo, se aisló su plásmido y se envió a secuenciar al laboratorio Seqxcel, Inc. (San Diego, CA) empleando el oligonucleótido gback. Para los ensayos posteriores se seleccionaron aquellas clonas que no contuvieran en su secuencia codones de paro o cisteínas adicionales.

2.2.2. Producción del vNAR

2.2.2.1. Expresión de la proteína recombinante

Los plásmidos de las clonas seleccionadas se transformaron por choque térmico en *E. coli* BL21 (DE3), seleccionándose una de las colonias que mostrara el fragmento amplificado por PCR.

Las colonias seleccionadas se cultivaron en 10 mL de medio SB suplementado con carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubaron durante 16-18 h, a 37 °C, una agitación de 5 x g y 40% \pm 5% de humedad relativa (para reducir la evaporación generada por el equipo), empleando una incubadora de resonancia acústica RAMbio (applikon®). Al día siguiente, los 10 mL de cultivo se transfirieron a un litro de medio SB con carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se repartió en 4 matraces de 1 L, los cultivos se incubaron a 37 °C y 10 x g hasta alcanzar una OD_{600} igual a 0.6 ± 0.2 (2-3 h aprox.). Alcanzada la densidad, a los cultivos se les adicionó isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM, para inducir la expresión de la proteína recombinante durante 6 h a las mismas condiciones de incubación.

Finalizada la expresión, el cultivo fue repartido en 10 tubos cónicos de 50 mL y centrifugado a 4,500 x g y 4 °C durante 20 min, se repitió el procedimiento para que al final cada tubo contuviera un pellet bacteriano correspondiente a 100 mL del cultivo. Los pellets se almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior.

2.2.2.2. *Extracción de proteína periplásmica*

Debido a que el vector pComb3x dirige la proteína recombinante al espacio periplásmico, se procedió con la extracción de proteína periplásmica, mediante el protocolo descrito en el manual QIAexpressionist™ (QIAGEN ©, 2003), con algunas modificaciones.

Cada uno de los 10 pellets obtenidos, se suspendieron en 15 mL de buffer Tris-Sacarosa (Tris-Cl 30 mM, sacarosa 20%, pH 8.0), se juntaron y se repartieron en 6 tubos (25 mL c/u), después se aforaron a 40 mL con el mismo buffer, se les adicionaron 80 μL de EDTA 500 mM, se colocaron horizontales sobre hielo incubándose por 10 min con agitación suave (40 rpm) en un agitador orbital. Posteriormente se centrifugaron a 8,000 x g y 4 °C durante 20 min, se almacenó el sobrenadante a 4 °C y el pellet de cada tubo se suspendió con una solución de MgSO_4 5mM en un volumen final de 40 mL, se incubaron nuevamente en hielo 10 min y se centrifugaron de igual forma. El pellet se descartó y el sobrenadante se juntó con el anterior, para ser centrifugado a 14,000 x g y 4 °C durante 30 min con el objetivo de sedimentar cualquier detrito celular que pudiese interferir con el proceso

de purificación posterior. Una muestra del pellet correspondiente a la fracción insoluble (P) se almacena a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.2.3. Purificación por cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados

Para la purificación del vNAR se utilizó la técnica de cromatografía por afinidad a metales inmovilizados (IMAC), aprovechando la capacidad que posee la etiqueta de histidinas para unirse al ion níquel (Ni^{2+}). Como fase estacionaria se empleó 1 mL de matriz de agarosa entrecruzada con Ácido nitrilotriacético cargado con níquel (Ni-NTA agarosa, QIAGEN). Tanto la preparación de la resina, los lavados y elución de la proteína recombinante se realizó de acuerdo con lo descrito en el manual QIAexpressionist (QIAGEN ©, 2003).

El sobrenadante obtenido de la extracción periplásmica (extracto), se pasó a través de la columna de agarosa, por gravedad o con ayuda de una bomba peristáltica a una velocidad de 2 mL/min. Se realizaron 5 eluciones de 1 mL cada una y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta ser utilizadas, también se almacenó una muestra de 100 μL de las etapas iniciales del proceso de purificación, las cuales fueron: extracto previo a la purificación (Inicial), extracto después de pasar por la resina (Final), elución de lavado (Lavado). El extracto se purificó dos veces más para obtener la mayor cantidad de proteína recombinante.

Al finalizar, las 15 eluciones obtenidas para cada vNAR se juntaron y dializaron contra solución salina tamponada con TRIS (TBS) pH 7.4, empleando una membrana SnakeSkin™ Dialysis Tubing, 3.5K MWCO, 22 mm (Thermo Fisher Scientific), se procedió de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

2.2.2.4. Purificación por inmunoafinidad

Para mejorar la pureza de los vNAR, la solución proteica dializada resultante de IMAC, se re-purificó empleando una columna de agarosa con anticuerpo anti-HA inmovilizado (Pierce™, Thermo Fisher Scientific), se procedió de acuerdo con las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones, la columna se equilibró con 10 mL de TBS, la solución proteica se pasó por gravedad tres veces, se

lavó la columna con 20 mL de TBS-Tween20 0.05% (TBS-T) y se realizaron 5 eluciones de 1 mL cada una con tiocianato de sodio 3M en TBS (NaSCN) y un lavado extra con 5 mL de NaSCN. Las eluciones se almacenaron a -20 °C hasta ser utilizadas, junto con una muestra de 100 µL de cada una de las etapas de purificación.

Las eluciones se juntaron y dializaron en una solución de Tris-HCl 50 mM y Glicina 10 mM, pH 8. Finalizada la diálisis, se concentraron por liofilización empleando un equipo FreeZone 4.5L -105 °C (LABCONCO). La proteína se resuspendió en 2 mL de agua destilada estéril y se dializó en PBS estéril. Los anticuerpos purificados se almacenaron a 4 °C para su uso próximo (días) o a -20 °C para periodos prolongados (semanas).

2.2.2.5. Evaluación de la purificación.

Se evaluaron los niveles de las proteínas recombinantes en las distintas etapas de purificación, a través de un ELISA directo. Para ello, en una placa de 96 pozos fondo redondo se adicionaron 50 µL de muestra y se incubaron toda la noche a 4 °C, posteriormente se descartó la solución, por inversión de la placa, se adicionaron 250 µL de solución de bloqueo, BSA 3% en PBS adicionado con 0.05% de Tween20 (PBST) y se incubaron 1 h a 37 °C. Se descartó la solución, se adicionaron 50 µL de solución PBST con BSA 1% y anticuerpo anti-HA-HRP a una concentración de 7.14 mU/mL (1:3,500), se incubó por 1 h a 37 °C. Se descartó la solución, se lavaron los pozos 5 veces con PBST y se revelaron los pozos con 50 µL de ABTS (1mg/mL), se incubaron a 37 °C hasta desarrollar coloración (15-30 min), las muestras se analizaron por espectrofotometría a 405 nm en un lector de placa Epoch (Biotek).

Para evaluar la pureza de las eluciones obtenidas, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida, Tricina-SDS-PAGE (Schägger and von Jagow, 1987). El gel se reveló por tinción de Coomassie R-250 y se corroboró la presencia del vNAR por inmunodetección utilizando anticuerpos IgG₁ de rata anti-HA acoplado a peroxidasa (Roche) y revelado con 1-Step™ Turbo TMB-ELISA (Thermo Fisher Scientific).

Se cuantificó la proteína purificada con el ensayo de ácido bicinconínico (BCA), empleando el Kit micro-BCA assay (Pierce™, Thermo Fisher Scientific), la reacción se llevó a cabo en una placa de 96 pozos a un volumen final de 100 μ L, 50 μ L BCA y 50% solución proteica. Para el caso de los vNAR, las muestras se diluyeron al 50% con PBS y como referencia se creó una curva de estándar con albumina de suero bovino (BSA) en un rango de concentración de 200 a 1.56 μ g/mL (dil. 1:2) en PBS, como control negativo de reacción se empleó PBS. La reacción se incubó a 37 °C durante 2 h. Posteriormente se leyó la placa a 560 nm, se graficó la curva estándar y por regresión lineal se obtuvieron las concentraciones de la proteína total. A partir del SDS-PAGE teñido con Coomassie, se realizó un análisis por densitometría empleando el software ImageJ/FIJI 1.52i (NIH), con el objeto de tener un mejor estimado de la concentración del vNAR con respecto a la proteína total.

Para verificar que los vNAR tenían la capacidad de reconocer a la citocina rhTGF- β 1, se realizó un ensayo de ELISA indirecto. En una placa de 96 pozos se adicionaron, por triplicado para cada muestra, 50 μ L de la citocina a una concentración de 5 mg/mL y se incubaron toda la noche a 4 °C; posteriormente se bloqueó el fondo del pozo con BSA3%-PBST por 1 h a 37 °C; se descartó la solución de bloqueo y adicionaron 50 μ L de vNAR (14 μ g/mL), se incubaron 1 h a 37 °C; se descartó la solución, se realizaron 3 lavados con PBST; se adicionó el anticuerpo anti-HA-HRP (7.14 mU/mL), se incubó por 1 h a 37 °C, se descartó la solución y se lavaron los pozos 5 veces con PBST; se reveló con 50 μ L de ABTS (1mg/mL) y se analizó por espectrofotometría a 405 nm.

2.2.3. Análisis *in-silico* de la interacción vNAR-TGF- β 1

2.2.3.1. Modelado por homología

Se realizó la predicción de la estructura terciaria de los vNAR, empleando la técnica de modelado por homología, la cual consiste en predecir la estructura de una proteína, a partir de la comparación de su secuencia con una o más proteínas homologas de estructura tridimensional resuelta por cristalografía de rayos x o resonancia magnética nuclear.

Se realizó un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de cada vNAR seleccionado contra la base de datos Protein Data Bank (Berman et al., 2000), empleando el algoritmo blastp del software

en línea BLAST® (Altschul et al., 1990). Se eligieron tres proteínas diferentes con el mayor porcentaje de identidad, que fueron utilizadas como marco de referencia por el software MODELLER 9.19 (Eswar et al., 2006), para la generación de cinco modelos tridimensionales para cada uno de los vNAR seleccionados en este trabajo. Con la aplicación en línea PROCHECK, se generó el gráfico de Ramachandran para cada uno de los cinco modelos obtenidos, seleccionándose aquel modelo con el mayor porcentaje de residuos en las regiones favorables.

2.2.3.2. Dinámica molecular

Se realizó el refinamiento de la estructura tridimensional generada por MODELLER mediante una dinámica molecular, la cual permite obtener una estructura más realista de la proteína, al simular computacionalmente la interacción de los átomos que conforman a la proteína con las moléculas de agua, durante un periodo de tiempo determinado.

Para esto, se prepararon los modelos seleccionados empleando el software VMD 1.9.3, la proteína fue solvatada en una caja de moléculas de agua y las cargas eléctricas del sistema fueron neutralizadas con iones Na⁺ o Cl⁻. Se realizó la dinámica molecular por un periodo de 50 ns, empleando el software NAMD 2.12, los cálculos de presión, energía y las coordenadas generadas se almacenaron cada 20ps.

La trayectoria de simulación obtenida fue analizada en VMD, se calculó la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) de cada coordenada con respecto a la inicial y se generó la gráfica correspondiente. Mediante el plugin Clustering para VMD, se agruparon las estructuras con respecto a su similitud en la cadena principal, formándose 5 grupos acomodados por el número de miembros, se seleccionó de forma aleatoria uno representante de cada grupo y fue seleccionado para los análisis posteriores, se seleccionó aquel con el mayor porcentaje de residuos en las regiones favorables en base a su gráfico de Ramachandran.

2.2.3.3. Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular o docking, es un método empleado para predecir el complejo de unión entre dos proteínas. En este trabajo se utilizó la herramienta en línea ClusPro (Kozakov et al., 2017), en la que se acoplaron: como ligando, el vNAR refinado y como receptor, una estructura de TGF- β 1 humano (1KLA) obtenida del PDB y refinada de acuerdo con lo descrito en el apartado anterior. Empleando el protocolo Peptiderive del servidor en línea Rosetta (Sedan et al., 2016), se analizó la interacción receptor-ligando de los cuatro primeros acoplamientos, generados con la ecuación de coeficientes balanceados. El modelo con la menor energía de interacción fue elegido como la predicción más probable de acoplamiento entre el vNAR y hTGF- β 1.

2.2.4. Evaluación de la actividad *in vitro*

2.2.4.1. Evaluación de la expresión de genes

Para evaluar la capacidad de los anticuerpos para inhibir los efectos fibróticos generados por TGF- β , se emplearon fibroblastos dérmicos de prepucio de neonato humano, línea celular CCD-1112Sk (ATCC® CRL-2429). Para su crecimiento, las células se mantuvieron en medio Dulbecco modificado de Iscove (IMDM, por sus siglas en inglés) suplementado con 10% SFB y 1% A/A, a este se denominó medio completo; para los ensayos donde se adicionó rhTGF- β 1, las células se mantuvieron en el mismo medio, pero reducido en SFB (1%), a lo que se denominó medio incompleto.

Se determinó la CME de TGF- β necesaria para activar una expresión genética perceptible por Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR), para ello se sembraron fibroblastos dérmicos en placas de 24 pozos, 3.5×10^4 células por pozo con 0.5 mL de medio completo. Las células se incubaron por 24 h a 37 °C y CO₂ al 5%, posteriormente se retiró el medio, se realizaron dos lavados con PBS y se sustituyó con medio incompleto, adicionado con rhTGF- β 1 en diferentes concentraciones: 0, 4, 40 y 400 pM, cada grupo se evaluó por triplicado. Al finalizar, las células se incubaron nuevamente por 24 h.

Al paso de las 24 h se realizó la extracción de ARN total, empleando el reactivo TRIzol™ (Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante. El ARN obtenido se resuspendió en 16 µL de agua libre de nucleasas, se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm empleando un NanoDrop™ Lite (Thermo Scientific™) y se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 2% con blanqueador comercial (hipoclorito de sodio 6%) al 1%, de acuerdo con lo descrito por Aranda, LaJoie y Jorcyk (2012).

Para la obtención de ADNc se retrotranscribieron 4 µL de cada muestra de RNA, con el kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen), empleando una mezcla de hexámeros aleatorios (25 ng) y Oligo(dT)₂₀ (2.5 µM), las reacciones se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para evaluar los perfiles de expresión de genes en los diferentes tratamientos, se utilizó la técnica de qPCR empleando el termociclador en tiempo real 7500 (Applied biosystems). Cada reacción de 10 µL contenía: 5 µL del reactivo Sybr Green Master Mix (Applied biosystems), 5 nmol de cada oligo y 15 ng de ADNc. Para la construcción de la curva estándar se realizaron reacciones similares, pero abarcaban un rango de 50-0.08 ng de ADNc en diluciones 1:5. Para la corrida se empleó el programa estándar: 95 °C por 10 min seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15s y 60 °C por 1min. Cada corrida se finalizó con una curva de fusión, para evaluar la calidad de la amplificación.

Se evaluó la estabilidad de los genes endógenos que se tomaron como referencia para la normalización. Para esto se realizó un ensayo de qPCR evaluando cuatro pares de Oligos para tres genes diferentes, Succinato deshidrogenasa subunidad A (SDHA), actina-β (ACTB) y dos pares diferentes para la enzima Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Tabla 2). Los Ct's obtenidos fueron analizados mediante la herramienta web 'RefFinder', la cual integra cuatro modelos computacionales (BestKeeper, DeltaCt, GeNorm y NormFinder) para comparar la estabilidad de diferentes genes de referencia (Xie et al., 2011).

Por medio de oligonucleótidos específicos (**Tabla 2**), se evaluaron los siguientes genes: cadena alfa 1 de colágeno tipo I (*COL1A1*), metaloproteinasas tipo 1 (*MMP1*), el receptor tipo 2 de TGF-β (*TGFBRII*) y la isoforma 1 de TGF-β (*TGFB1*), como referencia se utilizaron los genes endógenos GAPDH y ACTB.

Tabla 2 Oligonucleótidos para la evaluación por qPCR de genes relacionados a la vía de señalización de TGF- β .

Gen	Nombre		Secuencia 5' – 3'	Frag (pb)
Actina Beta	β -ACT	F	GCGAGAAGATGACCCAGATC	103
		R	CCAGTGGTACGGCCAGAGG	
Colágeno tipo 1 cadena alfa 1	COL-1	F	TGTTTCAGCTTTGTGGACCTC	126
		R	TCTGTACGCAGGTGATTGGT	
Factor de crecimiento transformante beta 1	TGFB-1	F	ACACATCAGAGCTCCGAGAA	140
		R	GAGGTATCGCCAGGAATTGT	
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	GAPDH (1)	F	CGAGATCCCTCCAAAATCAA	170
		R	TTCACACCCATGACGAACA	
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	GAPDH (2)	F	GCTCCTCCTGTTGACAGTCA	80
		R	ACCTTCCCATGGTGTCTGA	
Metaloproteinasa de matriz 1	MMP-1	F	CAAGAGCAGATGTGGACCA	145
		R	AAAGGAGAGTTGTCCCGATG	
Receptor del factor de crecimiento transformante beta 2	TGFBRII	F	CGTGTTGAGAGATCGAGG	95
		R	CCCAGCACTCAGTCAACGTC	
Succinato deshidrogenasa subunidad A	SDHA	F	GGAAGCATAAGAACATCGGAACTG	110
		R	CTGATTTTCCACAACCTTCTTGC	

Se cuantificó la expresión relativa, empleando el método descrito por Pfaffl (2001). Las diferencias se evaluaron empleando ANOVA de un factor con la prueba de Dunnett mediante el software GraphPad Prism 6.0c (GraphPad Software).

Obtenida la concentración mínima efectiva de TGF- β , se evaluó el efecto de los anticuerpos en la neutralización de esta citocina, a través de un ensayo como el descrito anteriormente, el cual varió en los tratamientos administrados; como control basal sólo se adicionó medio incompleto, como control de activación por TGF- β se adicionó la citocina rhTGF- β 1 a una concentración de 40 pM, y como tratamiento se evaluó cada anticuerpo a una concentración de 62.5 nM, se utilizó al anticuerpo 1d11.16.8 como control de neutralización.

2.2.4.2. Modelo de contracción de colágeno reticular

Se evaluó el efecto del anticuerpo en la remodelación de la matriz extracelular, mediante el método de Retículas de Colágeno Pobladas con Fibroblastos (FPCL, por sus siglas en inglés) descrito por Bell y colaboradores (1979).

Para la formación de la redícula, se mezcló colágeno de tendón de cola de rata en solución de ácido acético con una suspensión de fibroblastos dérmicos, a una concentración final de 1.25 mg/mL de colágeno y 5×10^4 células/mL, para aforar el volumen se empleó medio completo y para neutralizar la acidez se utilizó NaOH 1 M, hasta virar al tono rosáceo normal del medio (pH ~ 7.4). Posteriormente, en una placa de 24 pozos, se adicionaron 200 μ L de la suspensión a cada pozo y se dejaron gelificar 10 min a temperatura ambiente y 10 min a 37 °C. Se adicionaron 0.5 mL de medio incompleto a cada pozo y se suplementaron de acuerdo con el tratamiento. Se despegaron cuidadosamente las retículas del fondo del pozo, para que permanecieran flotando en el medio y se incubaron 24 h a 37 °C y CO₂ al 5%. Posteriormente, las retículas se fotografiaron empleando un microscopio estereoscópico y se midió su área empleando el software FIJI/ImageJ 1.52i (NIH). También se evaluó la traslucidez de las retículas mediante el promedio de la intensidad de los píxeles que forman cuatro líneas con intersección en el centro. Las diferencias se evaluaron empleando ANOVA de un factor con la prueba de Tukey mediante el software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software).

Para la obtención de la concentración mínima efectiva se evaluó rhTGF- β 1 a 40 y 400 pM. Para evaluar el efecto del anticuerpo, se emplearon los siguientes tratamientos: como control basal se adicionó sólo medio incompleto, como control de activación por TGF- β se adicionó medio incompleto con 40 y 400 pM de rhTGF- β 1. Para evaluar la inhibición de la citocina se evaluaron los vNAR a 62.5, 125 y 250 nM, mezclados con 400 pM de TGF- β 1, como control de neutralización se utilizó el anticuerpo 1D11.16.8 a 6.25 y 62.5 nM, mezclado con diferentes concentraciones de TGF- β 1 (0, 40 y 400 pM).

2.2.4.3. Sistema de secreción de fosfatasa alcalina inducida por TGF- β

Se empleó el sistema HEK-Blue TGF- β (Invivogen), para evaluar la capacidad del anticuerpo para neutralizar a TGF- β 1, este sistema está basado en células HEK-293T que permiten la detección de la actividad de TGF- β a través de la monitorización de la activación de la vía de señalización TGF- β /SMAD. Estas células se encuentran transfectadas con los genes para T β RI, SMAD 3 y SMAD 4, además de contener en el genoma al gen reportero para la fosfatasa alcalina embrionaria secretada

(SEAP, por sus siglas en inglés) acoplado a tres elementos de unión a SMAD (SBE). La estimulación de las células con TGF- β induce la secreción de SEAP al medio extracelular y la cual puede ser detectada con el sustrato colorimétrico QUANTI-Blue (Invivogen).

Para el crecimiento y mantenimiento de las células se empleó el medio DMEM, adicionado con glucosa (4.5 g/L), L-glutamina (2.5 mM), SFB al 10% y A/A al 1%. Para la estabilización de los plásmidos transfectados se adicionaron los antibióticos blastomicina S (30 μ g/mL), higromicina B (200 μ g/mL) y zeocina (100 μ g/mL). Las células se cultivaron a 37 °C y 5% de CO₂. Para la estimulación de las células se empleó rhTGF- β 1 (Preprotech).

Se evaluó la concentración mínima efectiva (CME) de TGF- β necesaria para activar la expresión de SEAP, mediante un gradiente de concentraciones de TGF- β : 0, 4, 20, 40, 120, 200 y 400 pM, como controles se evaluaron: medio sin células, células sin TGF- β , células adicionadas con PBS (vehículo). Se procedió de acuerdo con las instrucciones del fabricante, las cuales se resumen a continuación: se preparó cada uno de los tratamientos en un volumen máximo de 20 μ L/pozo, diluido en PBS, estos se adicionaron por triplicado en una placa de 96 pozos, junto con 180 μ L/pozo de suspensión celular (2.5×10^4 células/pozo) en medio DMEM suplementado, se incubaron por 24h y posteriormente, 20 μ L de cada sobrenadante se transfirió a un pozo nuevo que contenía 80 μ L de QUANTI-Blue, se incubaron por 0.5 – 1 h a 37 °C, se cuantificó la actividad de SEAP por espectrofotometría a 650 nm.

Determinada la CME de TGF- β 1 (0.5 ng/mL, 20 pM), se evaluó la actividad de los anticuerpos a diferentes concentraciones, la concentración máxima evaluada para TGF-10, TGF-21 y 1D11.16.8 fue de 100 nM, el vNAR T-1 se evaluó a partir de 625 nM y una concentración de 375 nM para TGF-5.b. Cada una de las concentraciones se mezcló con TGF- β 1 20 pM en un volumen final de 20 μ L, se incubaron una hora a 37 °C y se procedió de acuerdo con lo descrito anteriormente.

Capítulo 3. Resultados

3.1. Evaluación de la actividad de apósitos de alginato cargados con anticuerpos

3.1.1. Evaluación de la actividad *in-vitro*

3.1.1.1. Ensayo de liberación de anticuerpos

Se evaluó el tiempo de liberación del anticuerpo anti-HA-HRP de los apósitos de Ca^{2+} -alginato-PEGMA. En la **Figura 7-A** se puede apreciar una liberación parcial desde los primeros minutos, la cual alcanza su punto máximo a las dos horas (ver **Figura 7-B**). Es importante señalar que la cantidad relativa de anticuerpo liberado es menor a 12.5 ng, ya que el control de anticuerpo soluble (aHA 12.5 ng) muestra una absorbancia mayor que los apósitos con mayor cantidad de anticuerpo (CAPH-aHA-50ng). Esto puede deberse a que, aunque los apósitos de alginato confieren una protección al anticuerpo frente al proceso de liofilización, esta no es completa. Esta capacidad protectora queda demostrada, ya que el control de anticuerpo soluble liofilizado (Dry aHA 12.5 ng) perdió por

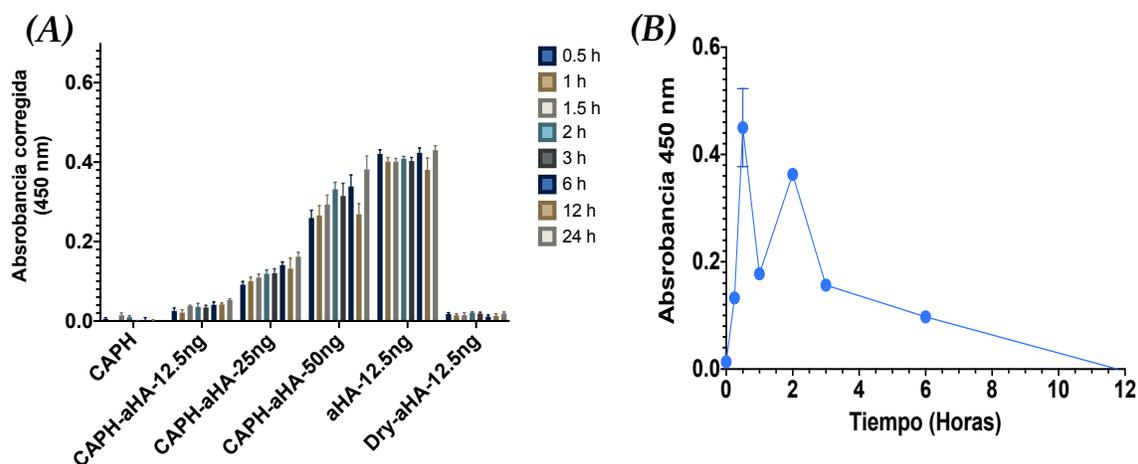


Figura 7 Tiempo de liberación de anticuerpo anti-HA-HRP de apósitos de alginato de calcio. A) Liberación acumulada sin renovación de medio. B) Liberación del anticuerpo con renovación total del medio del apósito CAPH-aHA-50ng.

completo la actividad de la peroxidasa. Otra razón, es que exista una retención permanente del anticuerpo con el apósito.

3.1.1.2. Actividad in-vitro de apósitos cargados con anticuerpos anti-TGF- β

Se evaluó si el anticuerpo 1D11.16.8 permanecía viable después del proceso de formación de los apósitos de alginato de calcio, a través de un ensayo colorimétrico con las células HEK-Blue. En la **Figura 8** se puede apreciar que a diferencia del anticuerpo anti-HA-HRP, 1D11.16.8 permanece activo a pesar del proceso de liofilización (Dry-1D11). Los anticuerpos liberados de los apósitos muestran actividad neutralizante de TGF- β , pero a una menor capacidad, 96% para los alginatos cargados con 5 μ g de anticuerpo (CAPH-1D11-5) y 69% para los que tienen 1 μ g (CAPH-1D11-1). Esto puede deberse a que, al igual que en el ensayo de liberación, sólo una parte de los anticuerpos quedan retenidos en el apósito. Cabe señalar que el apósito por sí solo mostró una actividad del 35%, la cual se especula es el efecto del calcio contenido en los apósitos.

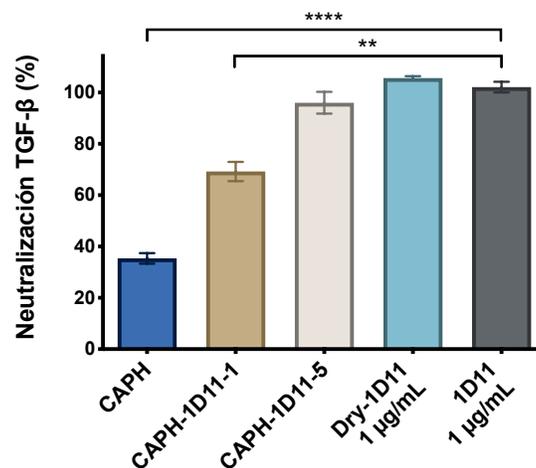


Figura 8 Actividad in-vitro de apósitos de alginato de calcio cargados con anticuerpo 1D11, en la gráfica se muestra el promedio (n=3) \pm SEM, ** = P < 0.01, **** = P < 0.0001.

3.1.2. Evaluación de la actividad *in-vivo*

3.1.2.1. Modelo murino de cicatrización de heridas cutáneas

Apósitos de Ca-alginato-PEGMA cargados con tres dosis de anticuerpo 1D11: 10, 50 y 100 μg (CAPH-1D11-10, -50 and -100, respectivamente) fueron evaluados en un modelo de cicatrización de heridas en ratones, para determinar su capacidad para transportar y liberar *in situ* anticuerpos viables. El progreso de la cicatrización fue valorado por 10 días, a través de un análisis macroscópico del tamaño de la lesión (**Figura 9**). Durante el periodo evaluado las heridas no mostraron pápula, exudado, edema o necrosis, y la formación de tejido de granulación fue similar entre todos los grupos.

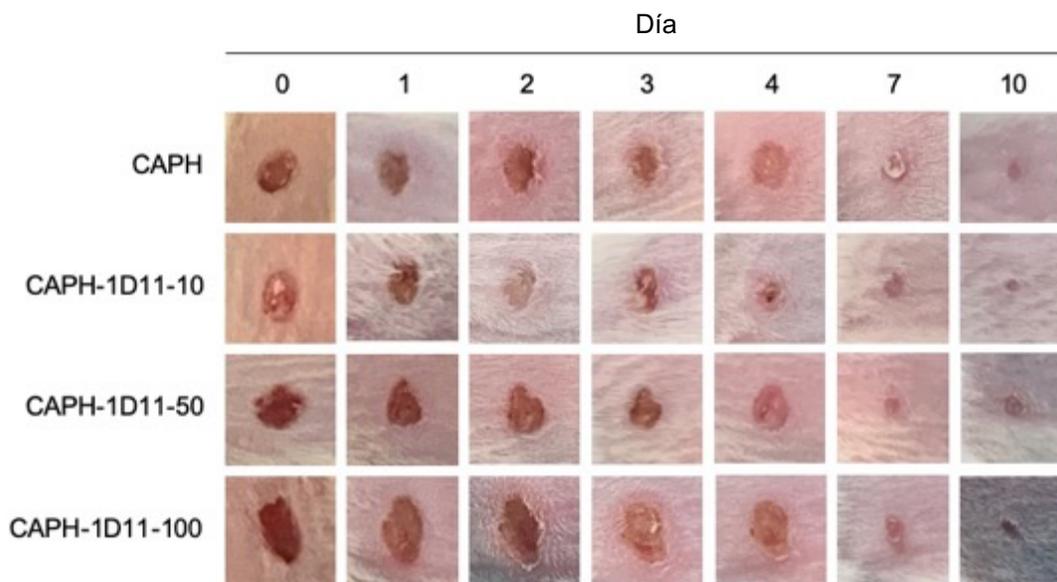


Figura 9 Panorama macroscópico de la cicatrización de la herida durante 10 días. Fotografías digitales representativas de heridas por escisión en ratones después de la aplicación del hidrogel.

Durante el proceso se evaluó el diámetro de la herida (**Figura 10 A**). También se evaluaron los grados de re-epitelización e inflamación (**Figura 10 B-C**), en los que se pudo observar una mejor re-epitelización en los grupos CAPH-1D11-10 y CAPH-1D11-50 comparados contra su respectivo control sin tratamiento. En el caso de la inflamación, sólo las heridas tratadas con anti-TGF- β en sus tres dosis mostraron una disminución significativa en el puntaje.

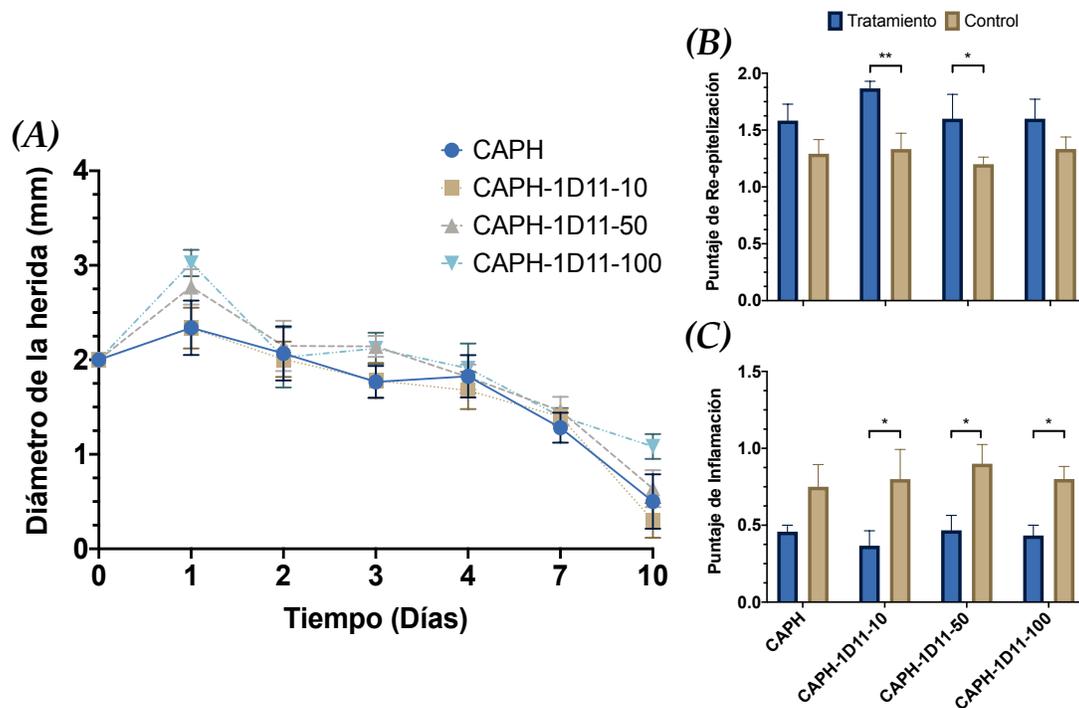


Figura 10 Evaluación macroscópica de cicatrización de la herida durante 10 días. Se evaluó la reducción del diámetro de la herida en milímetros (A), así como la presencia de re-epitelización (B) e Inflamación (C), evaluados en una escala semi-cuantitativa de cuatro puntos (0 – ausente, 1 – escaso, 2 – moderado y 3 – abundante) Los datos se presentaron como promedio ($n = 5$) \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Se realizó un análisis histológico de las lesiones al día 10, mediante tinción con H&E y MT (**Figura 11**). Los resultados muestran que todos los grupos tienen una formación de epidermis fina, aunque, en los grupos CAPH-1D11-100 y CAPH-1D11-50, esta es más irregular que en los otros grupos. Con respecto a la deposición de colágeno, los grupos CAPH-1D11-100 y CAPH-1D11-50 mostraron menor depósito de fibras de colágeno dérmico, con apariencia fragmentada y acompañada de edema. La infiltración de fibroblastos y células inmunes fue menor en CAPH-1D11-100, que también tiene la menor formación de nuevos vasos y folículos. CAPH-1D11-10 mostró un patrón histológico similar al CAPH con respecto al número de células infiltradas y formación de vasos o folículos.

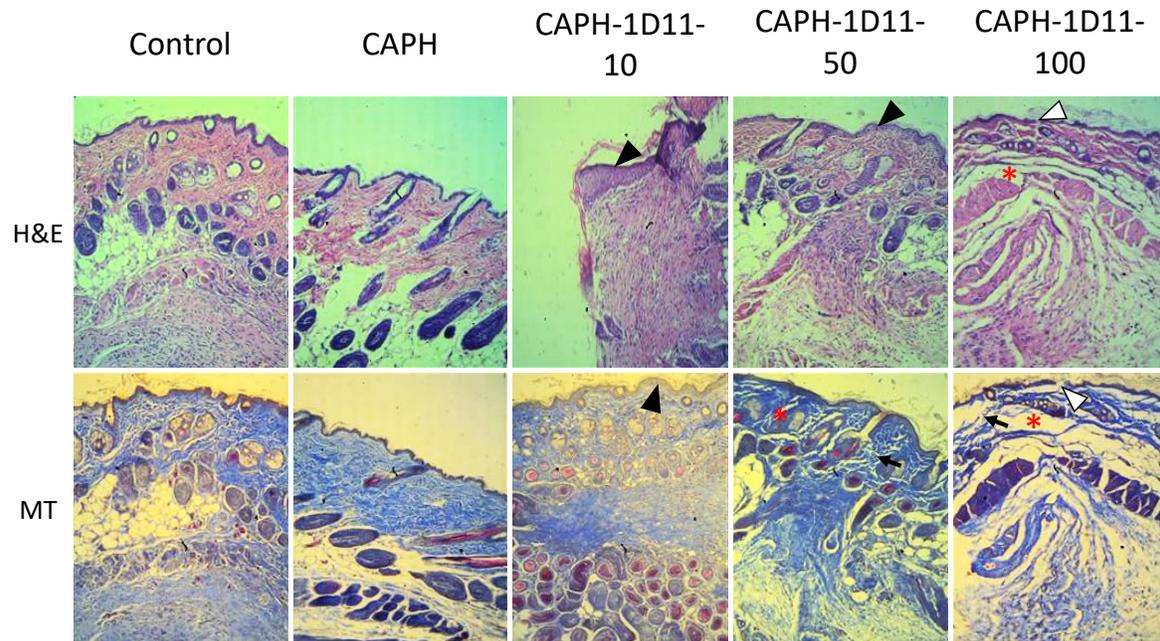


Figura 11 Análisis histopatológico de lesiones cutáneas en el día 10 teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) y tricrómica de Masson (MT). Se realizaron dos heridas por escisión en la zona dorsal de ratones, posteriormente una lesión fue tratada con hidrogeles de Ca-alginato-PEGMA (CAPH) o CAPH cargado con anticuerpos anti-TGF- β a diferentes dosis: 10, 50 y 100 μ g (CAPH-1D11-10, -50 y -100, respectivamente). La otra herida recibió tratamiento de desinfección estándar (Control). Micrografías tomadas a un aumento de 100x. ▲ Epidermis engrosada, △ epidermis fragmentada, (→) fibras de colágeno fragmentadas y (*) zonas edematosas.

Se utilizó un método basado en RT-PCR para cuantificar la expresión de ARNm de los genes *Tgfb1* y *Acta2* en las lesiones dérmicas al día diez (**Figura 12**). Se puede observar una inhibición de la expresión de ambos genes en las lesiones tratadas con CAPH-1D11-100, demostrando la capacidad del hidrogel para liberar anticuerpos neutralizantes de TGF- β en la herida. La inhibición aparente de la expresión de TGF- β puede observarse en hidrogeles de alginato solos (CAPH), pero esta no fue estadísticamente significativa.

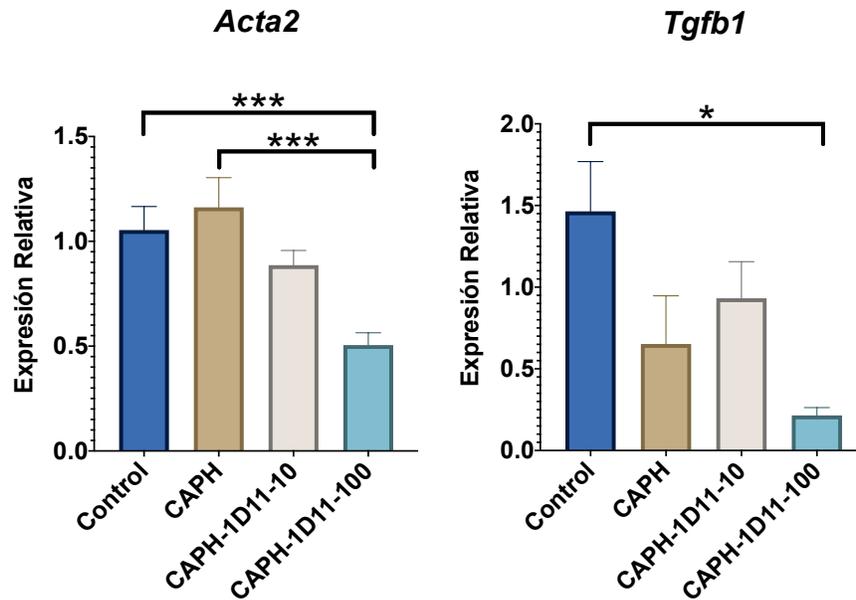


Figura 12 Expresión de ARNm de los genes *Acta2* y *Tgfb1* en lesiones cutáneas al día diez de tratamiento con los hidrogeles de Ca-alginato-PEGMA (CAPH) o CAPH cargado con anticuerpo 1D11.16.8, 10 o 100 μg por hidrogel (CAPH-1D11-10 y CAPH-1D11-100, respectivamente). Los datos se normalizaron al ARNm de HPRT y se presentaron como el promedio de veces de inducción ($n = 4-5$ para los grupos tratados y 14 para el grupo de control) \pm SEM. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

3.2. Evaluación de la actividad de dominios vNAR anti-TGF- β

3.2.1. Obtención de nuevos candidatos vNAR anti-TGF- β

Durante la selección por despliegue en fagos, se evaluaron los títulos de entrada (input) y salida (output) de cada una de las rondas de selección (**Figura 13**), para el panning con elución por digestión (Panning_A, **Figura 13 A**) se puede observar que en la ronda dos se obtuvo el input mayor (3.17×10^{12} PFU/mL) y la ronda 3 obtuvo el output menor (8×10^4 PFU/mL). Los porcentajes de fago retenido en la placa fueron de 6.47×10^{-4} , 1.99×10^{-5} , 1.88×10^{-5} y 4.52×10^{-4} PFU/mL para las rondas 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

Por otro lado, para el panning con elución por competencia (Panning_B, **Figura 13 B**) se observó un mayor input en las rondas 2 y 3 ($> 8 \times 10^{12}$ PFU/mL), mientras que el output en las tres rondas se mantuvo en el orden 10^5 , siendo la ronda 2 la menor.

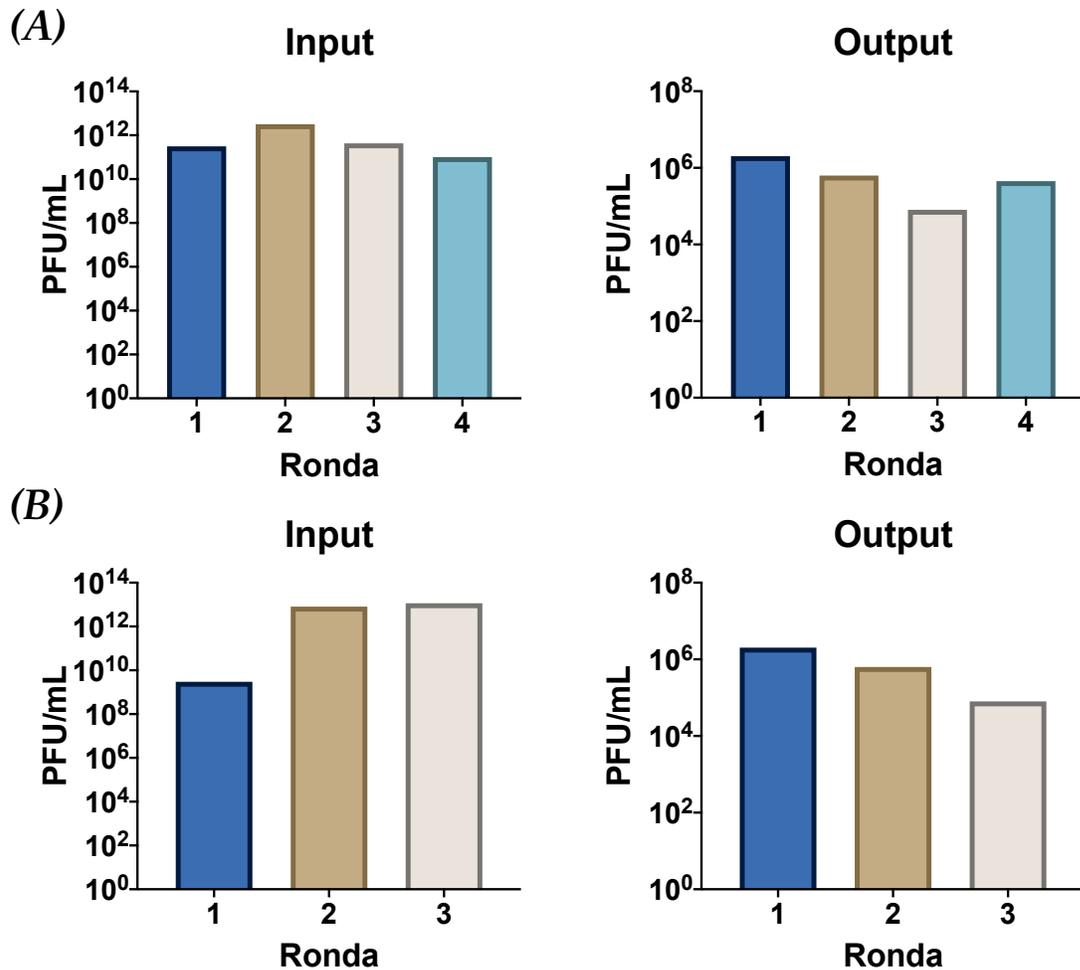


Figura 13 Títulos de entrada (input) y salida (output) de cada una de las rondas de selección de fagos afines a TGF- β . A) Títulos para el panning con elución por digestión (Panning_A), B) Títulos para el panning con elución por competencia (Panning_B).

Al finalizar, se aislaron colonias de las últimas rondas de selección, y se evaluaron por PCR, para discriminar aquellas clonas que no contuvieran al fagémido (**Figura 14 A**). El producto esperado de la reacción tiene una longitud teórica de 617 pb. En el Panning_A, se aislaron 45 clonas, de las cuales, las clonas 8, 27 y 40 no mostraron el producto esperado (~600pb). De las cuales, las clonas 8 y 40 mostraron un producto menor a los 500 pb y la clona 27 no mostró amplificación alguna.

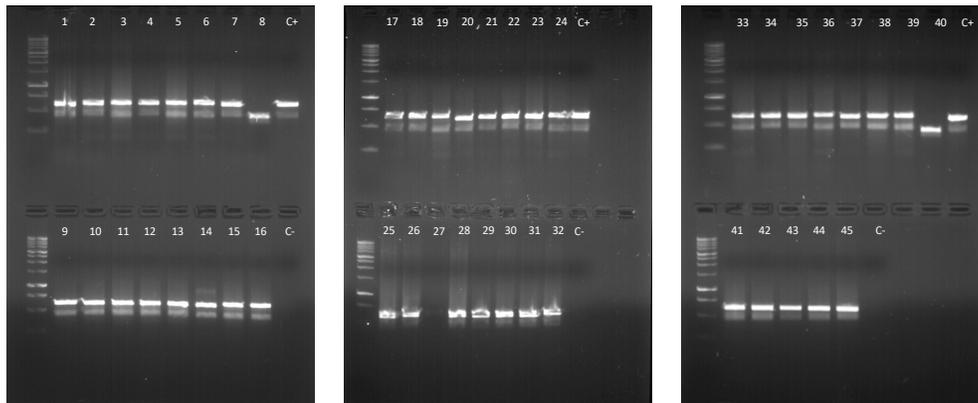
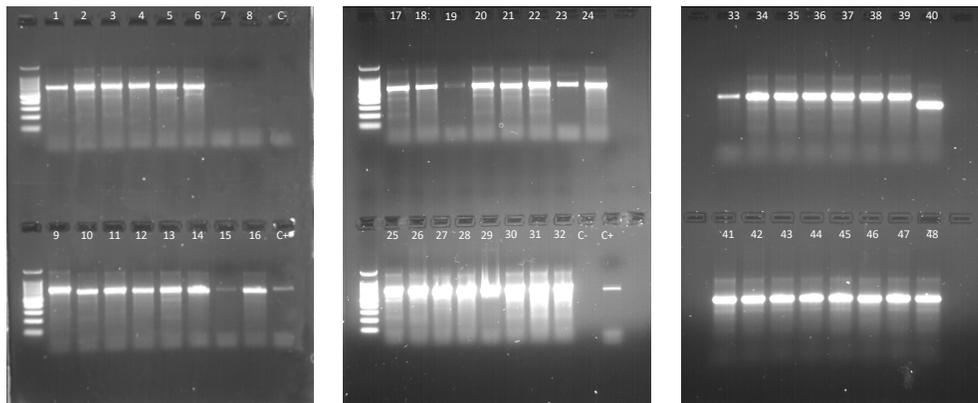
(A)**(B)**

Figura 14 PCR de colonias. (A) colonias del panning_A aisladas de la cuarta ronda de selección, tres de las cuales no contienen el producto esperado de ~600pb (8, 27 y 40). (B) colonias del panning_B aisladas de la tercera ronda de selección, seis de las cuales no contienen el producto esperado (7, 8, 15, 19, 40). Como control positivo (C+) se usó el plásmido purificado pComb3x-T-1 y como control negativo (C-) se usó agua. Marcador de peso molecular de 1 kb (Promega).

En el Panning_B se evaluaron 48 colonias (**Figura 14 B**), de las cuales, las clonas 7, 8, 15 y 19 se descartaron por no mostrar una amplificación del fragmento o esta fue muy tenue, también se descartó la clona 40 por mostrar un fragmento que no corresponde con el tamaño esperado.

También se evaluó cuáles de las colonias tenían la capacidad de formar un fago viable, a través de un ensayo de ELISA. Para el Panning_A, sólo 21 de las 45 clonas generaron una coloración

cuantificable por espectrofotometría (**Figura 15 A y B**). Mientras que para el Panning_B, sólo fueron positivas 17 clonas de 48 (**Figura 15 C y D**).

A)

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	1	2	3	4	5	6	7	8
B	9	10	11	12	13	14	15	16
C	17	18	19	20	21	22	23	24
D	25	26	27	28	29	30	31	32
E	33	34	35	36	37	38	39	40
F	41	42	43	44	45	C+	C-	Blanco

B)

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0.101	0.106	0.059	0.111	0.06	0.059	0.094	0.053
B	0.058	0.111	0.105	0.102	0.064	0.06	0.062	0.058
C	0.112	0.054	0.055	0.105	0.116	0.104	0.118	0.067
D	0.088	0.101	0.057	0.061	0.097	0.098	0.059	0.079
E	0.076	0.076	0.053	0.053	0.088	0.055	0.054	0.051
F	0.055	0.063	0.079	0.063	0.061	0.1	0.063	0.042

C)

	1	2	3	4	5	6	7
A	1	2	3	4	5	6	C-
B	7	8	9	10	11	12	C+
C	13	14	15	16	17	18	FH
D	19	20	21	22	23	24	
E	25	26	27	28	29	30	
F	31	32	33	34	35	36	
G	37	38	39	40	41	42	
H	43	44	45	46	47	48	

D)

	1	2	3	4	5	6	7
A	0.125	0.058	0.061	0.054	0.124	0.207	0.063
B	0.061	0.113	0.045	0.048	0.05	0.053	0.248
C	0.056	0.06	0.045	0.112	0.269	0.06	0.069
D	0.112	0.055	0.061	0.048	0.051	0.149	
E	0.061	0.113	0.115	0.051	0.049	0.053	
F	0.119	0.114	0.049	0.059	0.049	0.059	
G	0.13	0.05	0.052	0.048	0.049	0.049	
H	0.13	0.125	0.06	0.131	0.113	0.058	

Figura 15 Resultado del análisis espectrofotométrico del ensayo de ELISA de Fagos del el Panning_A (A y B) y el Panning_B (C y D). Se muestra el número asignado de la clona evaluada (A y C) y su absorbancia a 450 nm (B y D), en rojo se muestran aquellas clonas que se consideraron como positivas. Como control positivo (C+) se usó la mezcla de fagos obtenidos en la ronda 4, como control negativo se usó PBS (C-) o el Fago helper (FH).

Para el panning_A, de las 21 clonas enviadas a secuenciar, sólo 2 no pudieron ser secuenciadas, de las 19 colonias restantes, dos clonas (26 y 43) mostraron la misma secuencia, obteniéndose 18 clonas diferentes, 8 correspondientes a la biblioteca VS0, 5 correspondieron a VS1 y el resto a VS2. Sólo 5 secuencias (4, 7, 10, 21 y 22) no contuvieron codones de paro o cisteínas adicionales; de estas, la clona 4 proviene de la biblioteca VS2 y el resto de VS0 (**Tabla 3**).

Tabla 3 Secuencias correspondientes a los CDR3 de las clonas secuenciadas. En rojo se marcan aquellas clonas seleccionadas para ensayos posteriores, en verde se marcan los codones de paro y en anaranjado a los residuos de cisteínas.

Panning_A		
Clona	CDR3	Biblioteca
1	YYCNA-----GAR*TRYDYLF C LEYL----YDGA	VS1
2	FYCKA--GGMSG* R ARLWPLDGV C N C CGGLA--YDGA	VS2
4	FYCKA--NSTGRWRWGWWWPSNH C RW C WALS--YDGA	VS2
7	YYCKA---RWSISASMMVLRVSGVLGVEAW---YYGA	VS0
10	YYCKA---HTKWGFFPLSWKLVGAALINRS---YYGA	VS0
11	YYCKA---PG C SVA C LMHNPGQKWRW C PYE---YYGA	VS0
12	YYCKA---DRNYVPRWVFSSAMGVLL C SQ---YYGA	VS0
17	FYCKA--PWTRHSFWWPFHNAV C SRCMM N C--YDGA	VS2
20	YYCNA-----LDTY C *WPWEV C VAC R ----YDGA	VS1
21	YYCKA---QAKKWWAADPLLFLIGRWLNVG---YYGA	VS0
22	YYCKA---FGLNDFVRMLSFRWLWDLR G H---YYGA	VS0
25	YYCNA-----VGVLSVGLAL* C WVLK----YDGA	VS1
26	FYCKA-- C H C SGPLKFMLDWSS C LR C GRST--YDGA	VS2
29	YYCNA-----QI* D YPC S W* R AC R A----YDGA	VS1
30	YYCNA----- C *VATTLS C YW C LTMD----YDGA	VS1
33	FYCKA--DWFLRVYLVRG* G RCV C RW C LRL C --YDGA	VS2
34	YYCKA---R C LLYDIFE C SSYK V LSF N *---YYGA	VS0
37	YYCKA---* D STHNGIQDDEYGVGRV* M GR---YYGA	VS0
43	FYCKA-- C H C SGPLKFMLDWSS C LR C GRST--YDGA	VS2
Panning_B		
Clona	CDR3	Biblioteca
5	YYCNA-----YNRNAIDQWVLC R VTV----YDGA	VS1
6	YYCNA-----YFMVLAWWG P Q C SIT*----YDGA	VS1
16	YYCNA-----LKY* A CARNQW C H C EE----YDGA	VS1
17	FYCKA--RHPGEDMAWHGEIK* Y CEW C RMWP--YDGA	VS2
24	YYCKA---QTIGRRKR G PLASLAAMMGSSD---YYGA	VS0
27	YYCKA---QTIGRRKR G PLASLAAMMGSSD---YYGA	VS0
34	FYCKA--TGFRQYLLSWNSWSPG C V G CEW V V--YDGA	VS2
46	YYCKA---IGMTRMGT* N VIRWWYPAR P TR---YYGA	VS0

Del panning_B se obtuvieron 8 secuencias completas, de las cuales dos de ellas correspondían al vNAR T-1 empleado como marco para la biblioteca VS0 (24 y 27), del resto sólo las clonas 5 y 34 no contenían codones de paro o cisteínas adicionales (**Tabla 3**), estas clonas corresponden con las bibliotecas VS1 y VS2 respectivamente.

Las clonas seleccionadas se nombraron con el prefijo 'TGF-' seguido del número de clona correspondiente, y sólo para aquellas resultantes del panning B se les adicionó el sufijo '.b', quedando como: TGF-4, TGF-7, TGF-10, TGF-21, TGF-22, TGF-5.b y TGF-34.b.

3.2.2. Evaluación de las clonas obtenidas

Los vNAR se expresaron en un volumen de 250 mL, purificaron por IMAC y se evaluó la capacidad de cada uno de los vNAR para reconocer a la citocina TGF- β , mediante un ELISA indirecto. En este ensayo (**Figura 16**) TGF-10 y TGF-21 mostraron el mayor reconocimiento por la citocina, inclusive mayor que el vNAR parental T-1. TGF-4 y TGF-22 mostraron un reconocimiento menor. TGF-7 y TGF-34.b fueron los que menor expresión mostraron, y para el caso del vNAR TGF-5.b, aunque este tiene una baja expresión, la relación entre la proteína que reconoce a TGF- β y la proteína total es cercana al 80%.

Dado que T-1, TGF-10, TGF-21 y TGF-5.b obtuvieron la mayor relación entre el reconocimiento por TGF- β y su expresión ($\geq 80\%$), se decidió continuar con ellos para los posteriores ensayos *in vitro* de neutralización de la citocina.

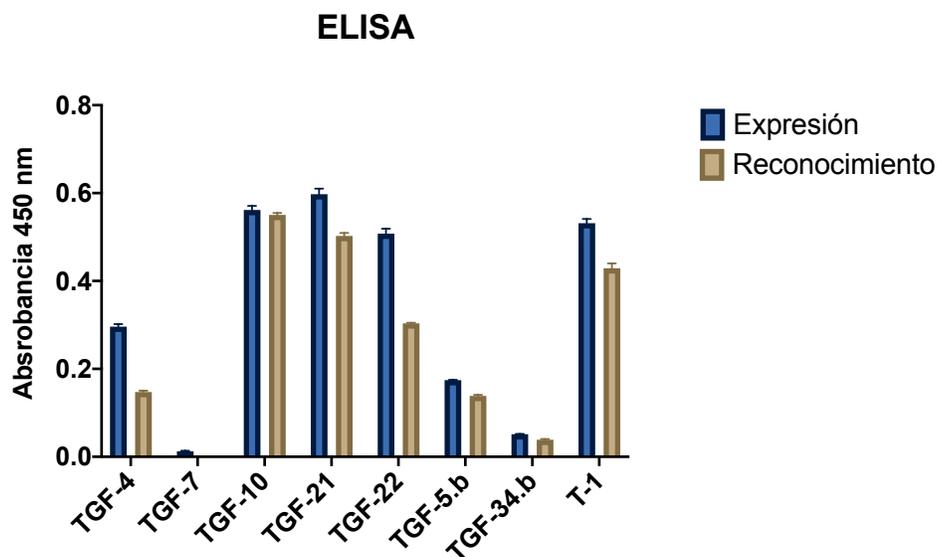


Figura 16 ELISA de expresión (proteína total) de los vNAR seleccionados y su capacidad de reconocimiento por TGF- β , se incluyó como referencia el vNAR T-1.

3.2.3. Producción de los vNAR seleccionados

Para poder llevar a cabo los ensayos *in vitro* de neutralización de TGF- β , se requirió de la obtención de una mayor cantidad y pureza de los anticuerpos seleccionados, cada uno se expresó en cultivos de 1L, se extrajo la proteína periplásmica y se purificó por IMAC, sin embargo, como la pureza obtenida era muy baja se decidió repurificar al vNAR por inmunoafinidad, aprovechando la especificidad de un anticuerpo para reconocer a la etiqueta HA del vNAR. En un principio se probó con la metodología recomendada por el fabricante, empleando como eluyente una solución ácida de Glicina 0.1M (pH 2), pero esta no logró disociar al vNAR del anticuerpo anti-HA, eluyendo la mayor parte del vNAR en el lavado con NaSCN 3M (**Figura 17**).

También se puede apreciar en la **Figura 17** que la pureza de la muestra aumenta (comparando carril I contra L2), al observarse una menor cantidad de bandas accesorias y reducirse en gran medida la proteína contaminante de ~ 25 kDa, sin embargo, aún es posible apreciar proteínas contaminantes. Debido a esto y aunado a la falla de la capacidad de elución de la solución ácida de Gly 0.1M, se decidió modificar el protocolo, aumentando el volumen de lavado con TBST al doble y emplear NaSCN como solución de elución.

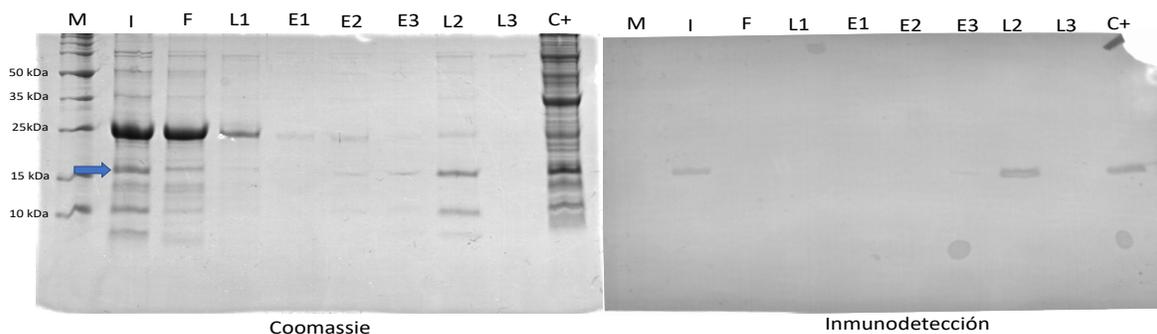


Figura 17 Purificación por inmunoafinidad a la etiqueta HA del anticuerpo vNAR TGF-21 purificado previamente por IMAC. M – Marcador peso molecular, I – muestra inicial procedente de IMAC, F – muestra post-purificar, L1 – Lavado con TBST, E – Eluciones con Gly 0.1M, L2 – Lavado con NaSCN 3M, L3 – Lavado con TBS, C+ – Control para inmunodetección. La flecha marca la región correspondiente a la presencia del vNAR (~ 16 kDa).

En la **Figura 18** se muestran los productos finales obtenidos con el protocolo modificado de repurificación, para cada uno de los vNAR seleccionados. Para T-1 se puede apreciar principalmente una proteína contaminante de ~12kDa, TGF-10 también mostró proteínas contaminantes de abundancia comparable con la cantidad de vNAR, para TGF-21 y TGF-5.b la concentración de contaminantes fue mucho menor, obteniendo una pureza del 90%.

Con respecto a la cantidad vNAR purificado, TGF-21 y T-1 obtuvieron el mayor rendimiento con 522 y 309 μg de proteína por litro de cultivo. Mientras que los vNAR TGF-10 y TGF-5.b obtuvieron un rendimiento mucho menor de 75 y 59 $\mu\text{g/L}$ (**Tabla 4**).

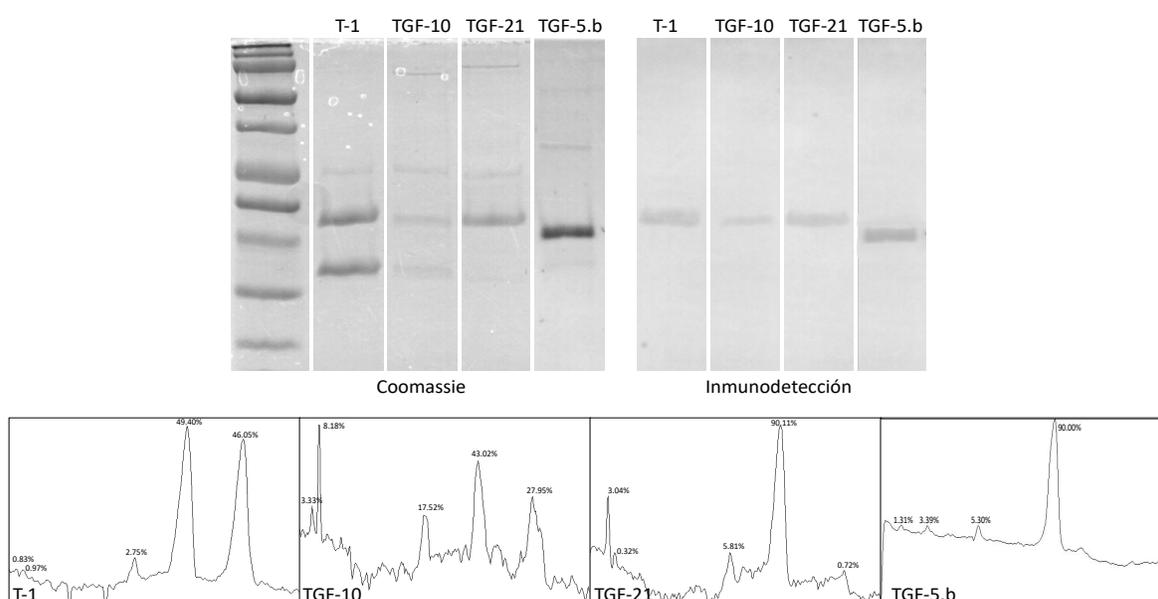


Figura 18 Análisis de la pureza final de los vNAR T-1, TGF-10, TGF-21 y TGF-5.b. En la imagen se muestra los resultados del SDS-PAGE teñido con Coomassie, la inmunodetección para confirmar la presencia de los vNAR, así como un análisis por densitometría de las bandas visualizadas en la tinción con Coomassie.

Tabla 4 Concentración de la proteína total, estimado de la concentración del vNAR y rendimiento obtenido a partir del procesamiento de un litro de cultivo.

vNAR	Proteína total ($\mu\text{g/mL}$)	Abundancia del vNAR (%)	Concentración vNAR ($\mu\text{g/mL}$)	Rendimiento ($\mu\text{g}_{\text{vNAR}}/\text{L}_{\text{cultivo}}$)
T-1	208.75	49.40	103.12	309.36
TGF-10	58.78	43.02	25.29	75.87
TGF-21	193.90	90.11	174.72	522.6
TGF-5.b	33.12	90.00	29.81	59.61

3.2.4. Análisis *in-silico* de la interacción vNAR-TGF- β 1

Se realizó un análisis *in-silico* de la interacción vNAR-TGF- β 1, para lo cual se generó la estructura tridimensional de los cinco vNAR seleccionados y se evaluó su interacción con la estructura resuelta por cristalografía de rayos X de hTGF- β 1 (1KLA), para el vNAR T-1 se emplearon los resultados generados por MC. Salvador Dueñas Espinoza (datos sin publicar).

Un análisis de las estructuras tridimensionales obtenidas, empleando el gráfico de Ramachandran, indica que los modelos satisfacen la distribución geométrica teórica permitida para una proteína (Anexo Tabla 5). Los vNAR T-1, TGF-10 y TGF-21 obtuvieron un porcentaje de residuos en regiones permitidas mayor al 90%, mientras que TGF-5.b obtuvo un porcentaje menor (87.0%), esto debido al enlace disulfuro adicional que contiene, el cual genera una rigidez en el CDR3 impidiendo un plegamiento favorable.

Se evaluaron los modelos de acoplamiento molecular (**Figura 19**) empleado el software Peptiderive-Rosetta, el cual calcula la energía de interacción entre dos cadenas proteicas (receptor-ligando) con unidades arbitrarias denominadas Unidades de Energía de Rosetta (REU). En un sentido simplista, esta energía puede ser correlacionada con la afinidad del anticuerpo con su antígeno y la cual tienen un comportamiento inversamente proporcional, a menor energía de interacción mayor es la afinidad.

Al evaluar los modelos *in-silico*, sólo T-1 y TGF-5.b mostraron una interacción en los sitios de unión a los receptores, mientras que TGF-10 y TGF-21 mostraron una interacción con la zona de dimerización de la citocina (Figura 19). Todos los modelos de los vNAR obtenidos en el Panning_A mostraron un sitio de unión semejante, el cual es aproximado a la región de dimerización de TGF- β (**Anexo Tabla 6**). La menor energía de interacción la obtuvo TGF-21 con -38.26 REU, seguido de TGF-5.b (-29.97 REU), TGF-10 (-27.24 REU) y T-1 (-27.20 REU).

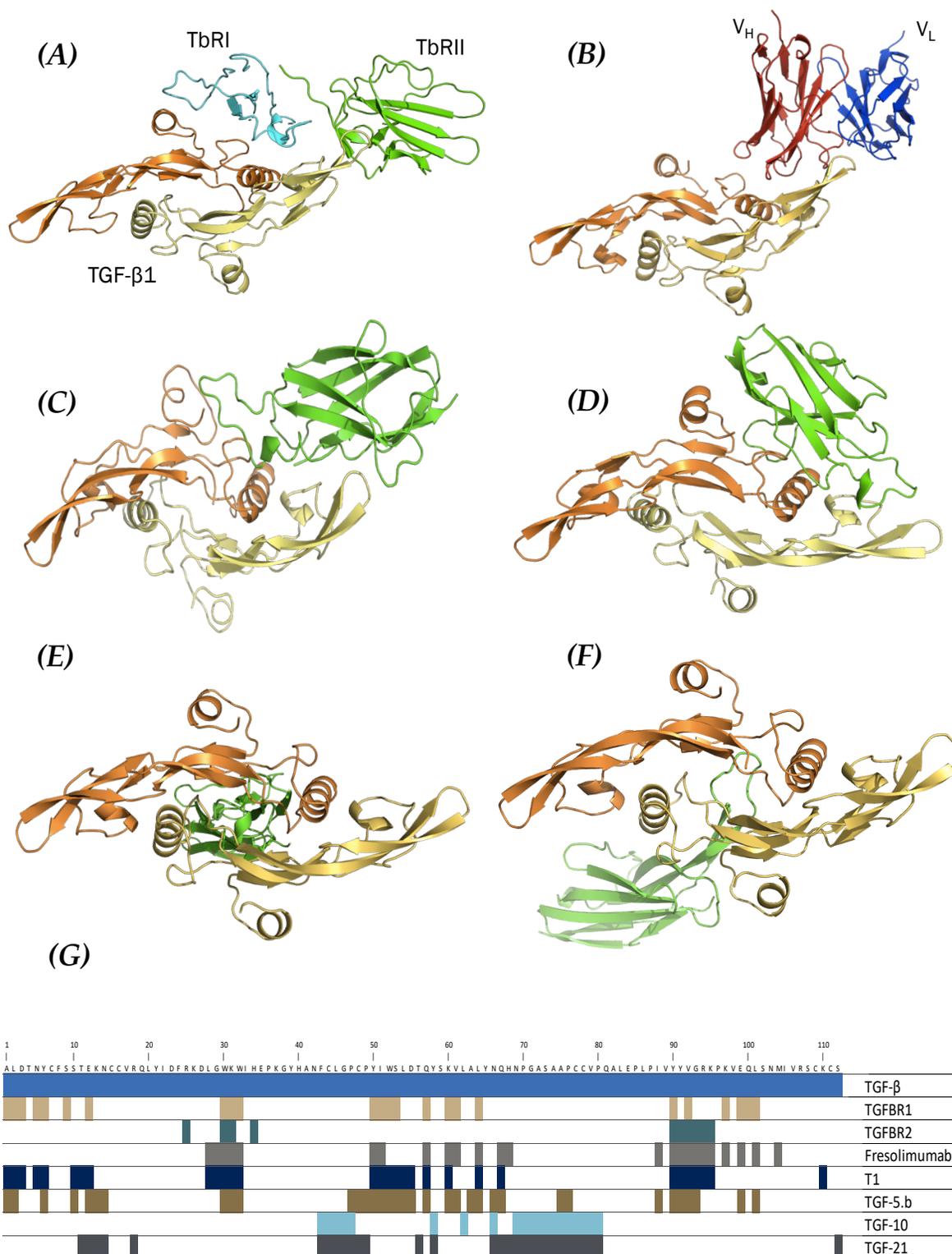


Figura 19 Evaluación in silico de la interacción de TGF- β con sus receptores (A), Fresolimumab (B), T-1 (C), TGF-5.b (D), TGF-10 (E) y TGF-21 (F). También se muestran los residuos que interactúan entre las diferentes combinaciones (G).

3.2.5. Evaluación de la actividad *in vitro*

3.2.5.1. Evaluación de la expresión de genes

Se evaluó la CME de TGF- β para la regulación de la expresión genética en fibroblastos dérmicos, para esto se realizó la extracción de ARN de cada uno de los tratamientos y se visualizó la calidad a través de un gel de agarosa (**Figura 20**), en el cual se pueden observar las tres bandas correspondientes a las subunidades 28s, 18s y 5/5.8s, esto las caracteriza como un ARN de buena calidad, clasificándolas en un número de integridad de ARN (RIN) mayor a 8 (Schroeder et al., 2006).

Se evaluaron tres genes endógenos para seleccionar al candidato más estable en los tratamientos con TGF- β . El par de oligonucleótidos GAPDH(1) no mostraron una buena amplificación por qPCR con una eficiencia calculada menor a 90%, lo que sugiere su baja estabilidad. Los otros oligonucleótidos evaluados mostraron una eficiencia en el rango de 90 a 110%.

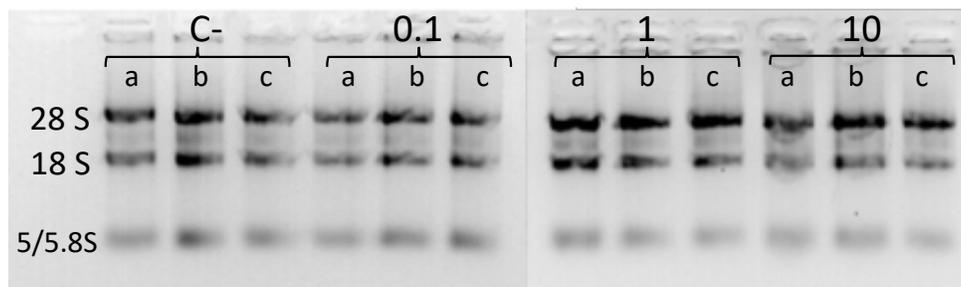


Figura 20 Calidad de ARN por electroforesis en gel de agarosa. Se muestran las tres replicas biológicas de los cuatro grupos evaluados: fibroblastos tratados con 0.1, 1 y 10 ng/mL de TGF- β y como control células sin TGF- β adicionado (C-).

Los resultados del análisis en RefFinder mostraron que el par de oligos GAPDH(2), obtuvieron la mayor estabilidad seguido de β -Actina, SDHA y GAPDH(1), ordenados de más a menos estable, respectivamente. De los cuatro métodos aplicados sólo BestKeeper difiere del resto colocando a SDHA como el más estable (**Figura 21**). Un análisis por separado con el método de geNorm, mediante el software qBase, sugirió que el emplear una doble normalización con GAPDH y β -Actina generaría un análisis más robusto de la comparación en los niveles de expresión genética.

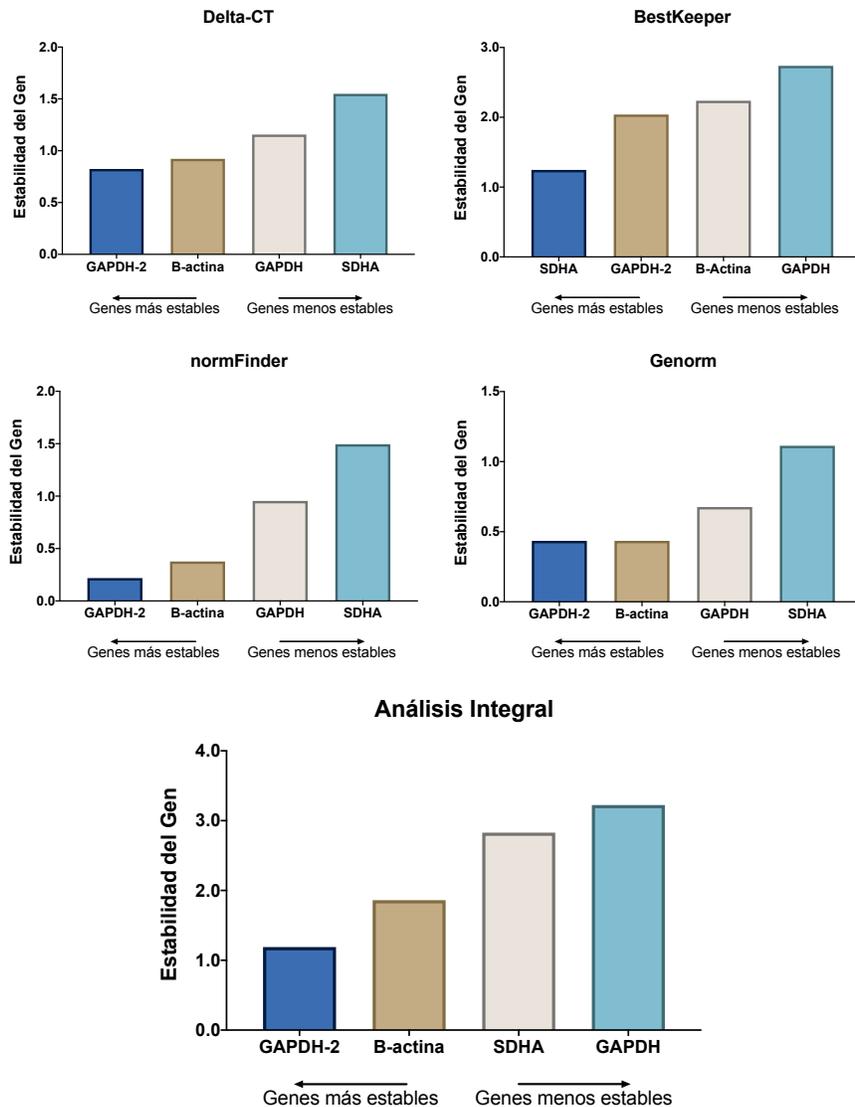


Figura 21 Clasificación de los genes candidatos para los ensayos por qPCR de fibroblastos activados con TGF- β , muestra los valores de cada uno de los cuatro algoritmos diferentes evaluados por la herramienta web RefFinder. Método Δ Ct, NormFinder, geNorm, BestKeeper y la clasificación completa final.

Una vez seleccionados los genes endógenos, se procedió a evaluar la expresión de los genes modulados por la vía de señalización de TGF- β : *COL1A1*, *MMP1*, *TGFBRII* y *TGFB1*. En la **Figura 22** se puede observar que al estimular a los fibroblastos dérmicos con TGF- β (a partir de 1 ng/mL) se promueve la expresión de *COL1A1* y *TGFB1*, y se reprime la expresión de los genes *MMP1* y *TGFBRII*.

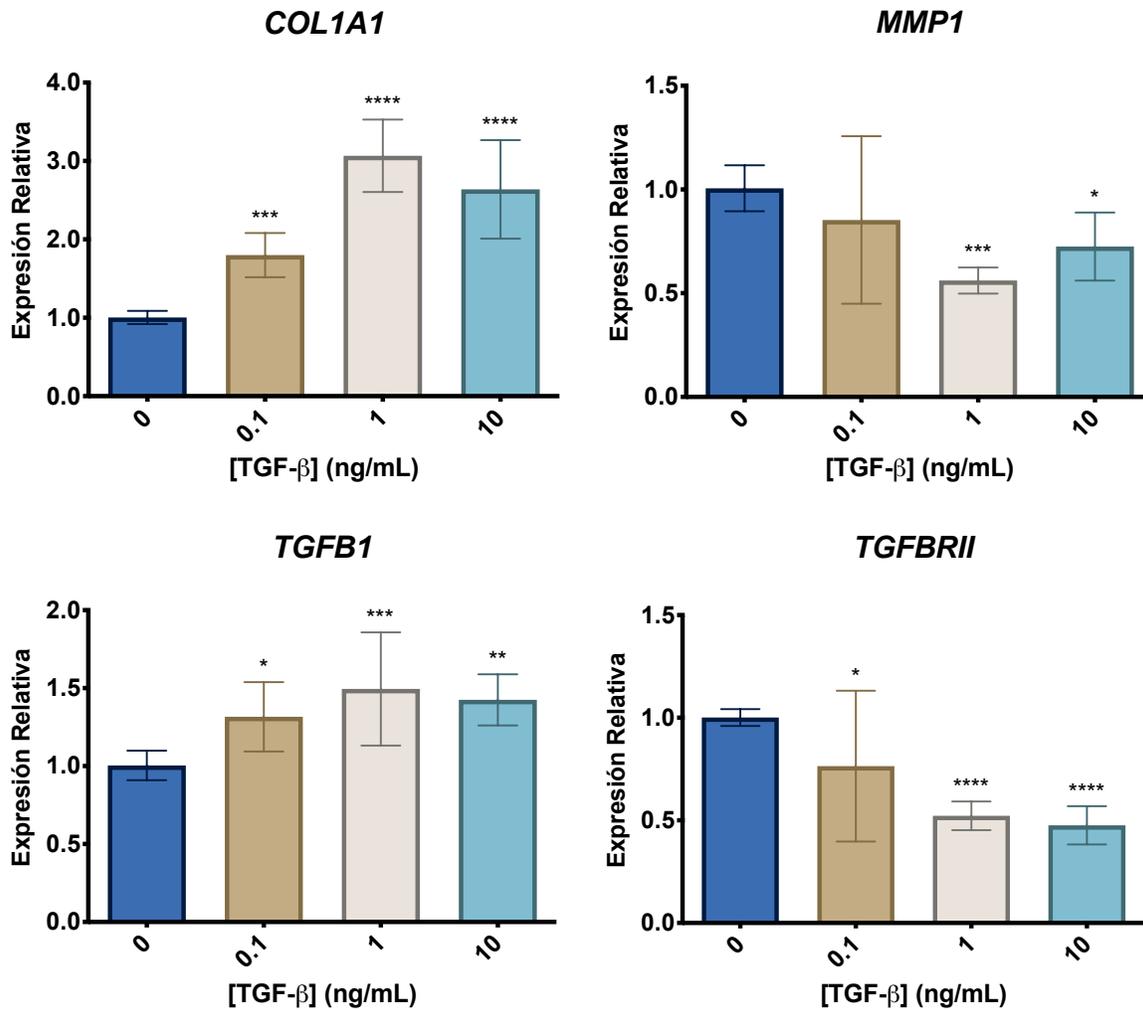


Figura 22 Expresión relativa de los genes modulados por la vía de señalización de TGF-β, evaluados a diferentes concentraciones de la citocina. ANOVA 1-vía, Dunnet vs 0. *P≤0.05, **P≤0.01, ***P≤0.001 **** P≤0.0001.

Se seleccionó la concentración de 1 ng/mL como la CME y se procedió a la evaluación de los anticuerpos, el anticuerpo control 1D11.16.8 mostró la capacidad para inhibir significativamente los efectos biológicos de la citocina con respecto a la expresión de los cuatro genes evaluados (**Figura 23**). En cambio, los vNAR T-1, TGF-10 y TGF-21, mostraron la capacidad para inhibir de forma parcial los efectos en los genes relacionados con la matriz extracelular: *COL1A1* y *MMP1*; pero no fue así para los genes relacionados con la retroalimentación: el propio gen de la citocina (*TGFB1*) y el de su receptor (*TGFBRII*).

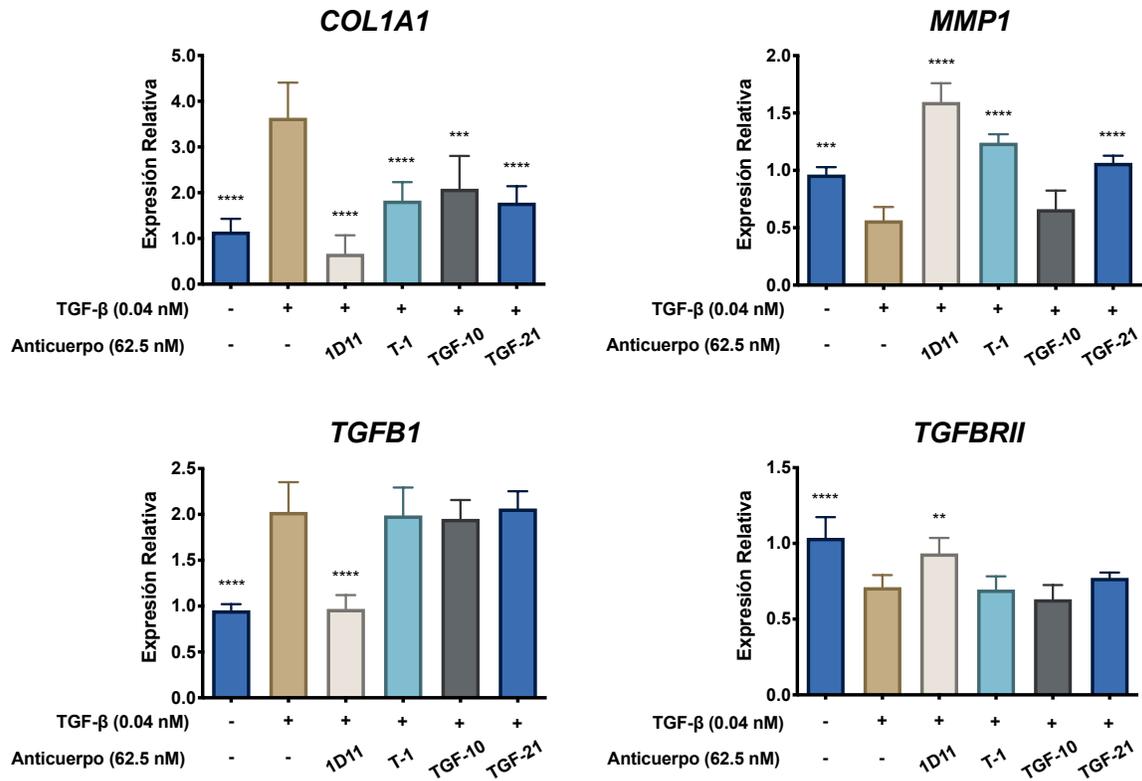


Figura 23 Análisis de la expresión genética en fibroblastos dérmicos, expuestos a TGF-β en combinación con los diferentes anticuerpos evaluados. ANOVA 1-vía, Dunnet vs '-/-'. *P≤0.05, **P≤0.01, ***P≤0.001 **** P≤0.0001.

3.2.5.2. Modelo de contracción de colágeno reticular

Se determinó la capacidad de la citocina TGF-β para promover la remodelación de la matriz extracelular, mediante el ensayo de contracción reticular con fibroblastos dérmicos (**Figura 24**). Se evaluó la actividad de TGF-β a 0.04 y 0.4 nM (1 y 10 ng/mL) en comparación con las células sin el estímulo. Mediante la evaluación del área final de la retícula, se puede observar una disminución significativa en las células tratadas con TGF-β a 0.4 nM. Se evaluó la actividad del anticuerpo

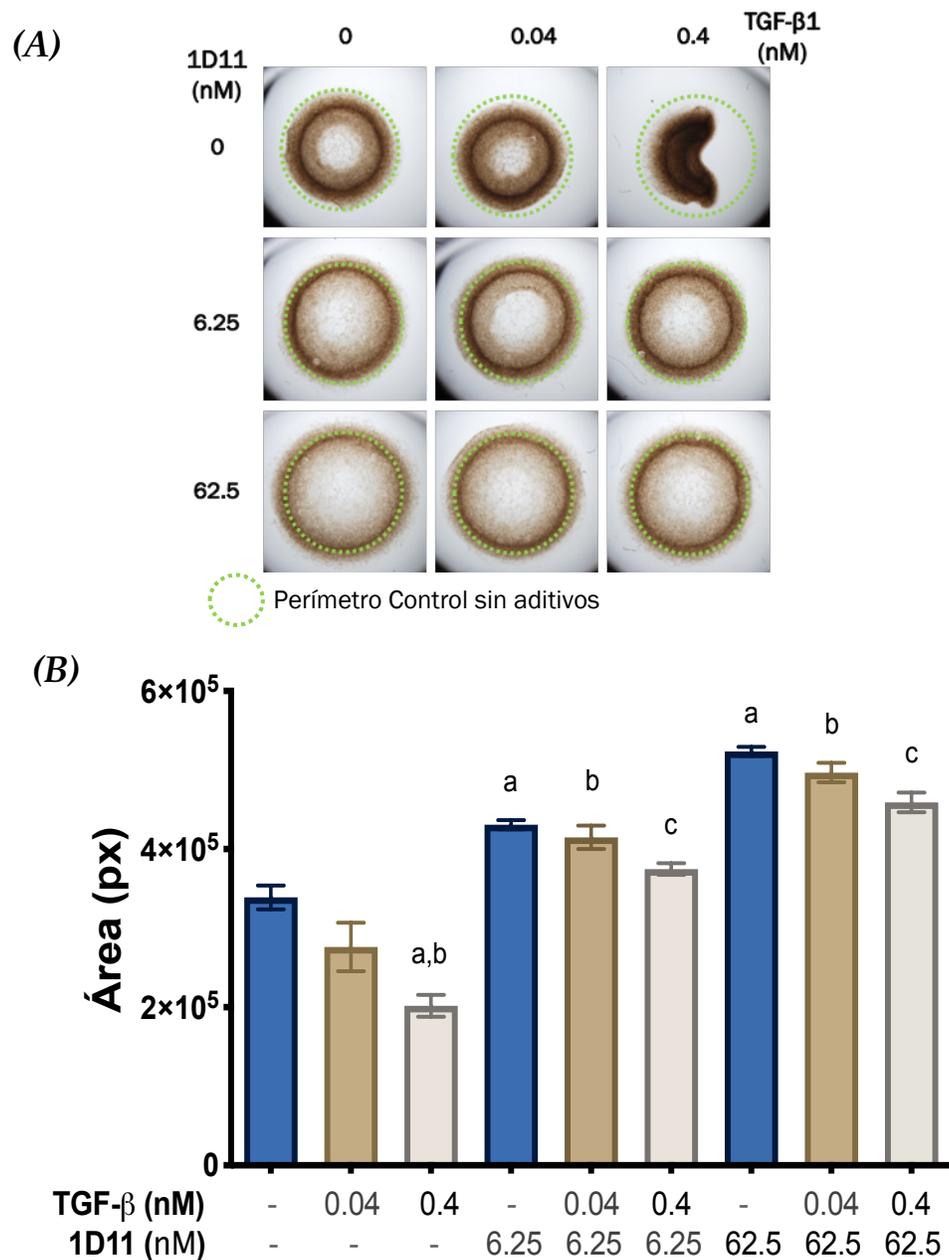


Figura 24 Evaluación de la actividad del anticuerpo 1D11.16.8 para neutralizar los efectos de TGF- β en la contracción de retículas de colágeno pobladas con fibroblastos. (A) Registro fotográfico 24 h posterior a la aplicación de los tratamientos. (B) Gráfico del área de las retículas en pixeles. Promedio (n=3) \pm SEM, ANOVA Tukey test, (a) $p < 0.05$ vs '-/-', (b) $p < 0.05$ vs '0.04/-', (c) $p < 0.05$ vs '0.4/-'

1D11.16.8 en dos concentraciones 6.25 y 62.5 nM (1 y 10 μ g/mL), para inhibir los efectos de TGF- β a 0.04 y 0.4 nM. El anticuerpo mostró la capacidad para neutralizar completamente a la citocina

desde 6.25 nM. Un efecto notable es que las retículas tratadas con 1D11.16.8 muestran una menor contracción incluso que las retículas sin aditivos. Mostrando su efecto en la inhibición de la citocina autócrina producida por los fibroblastos. En el caso del vNAR TGF-21, este también mostró una neutralización de TGF- β a partir de 125 nM, mientras que el vNAR TGF-10 no mostró actividad en ninguna de las concentraciones evaluadas (**Figura 25**).

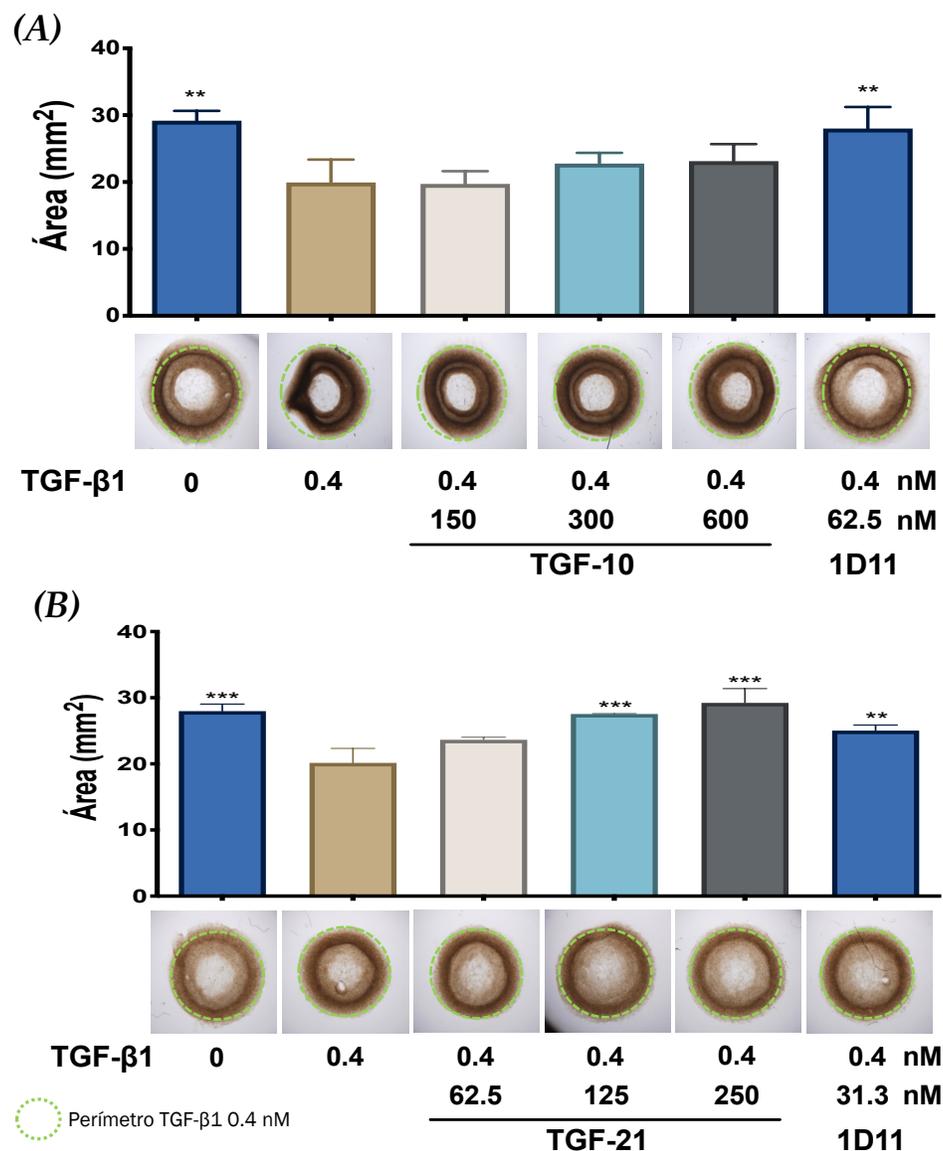


Figura 25 Efecto de la actividad del vNAR TGF-10 (A) y TGF-21 (B) para neutralizar a TGF- β 1, en el modelo de contracción de colágeno reticular. ANOVA 1-vía, Dunnet vs 'TGF- β 1 0.4 nM'. ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

3.2.5.3. Sistema de secreción de fosfatasa alcalina inducida por TGF- β

Se realizó un ensayo para evaluar la concentración mínima efectiva de TGF- β para estimular la secreción de SEAP en el sistema celular HEK-Blue, en la **Figura 26** se puede observar que a partir de 0.5 ng/mL (20 pM) de TGF- β se alcanza el efecto máximo en la secreción de SEAP.

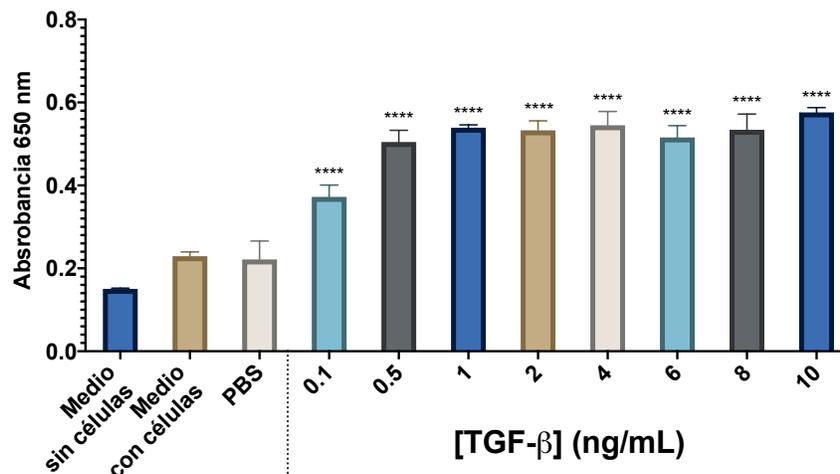


Figura 26 Curva de la actividad de TGF- β para inducir la secreción de SEAP en células HEK-Blue. ANOVA 1-vía, Dunnet vs 'PBS'. **** P \leq 0.0001.

Una vez conocida la CME de TGF- β (20 pM), se procedió a la evaluación del anticuerpo 1D11.16.8, el cual mostró la capacidad de inhibir a la citocina a partir de 0.8 nM, lo cual corresponde a una relación de 40 moléculas de anticuerpo por molécula de TGF- β , se debe de considerar que este anticuerpo es divalente, por lo que, de ser monovalente, la concentración real podría ser similar a 1.6 nM. La concentración más baja evaluada de 0.04 nM (relación 2:1) obtuvo un ~30% de inhibición (**Figura 27-A**).

Se evaluaron los vNAR TGF-10 y TGF-21 en un rango de concentración de 100 – 0.04 nM (dil. 1:5), que corresponden a una relación 5000:1 – 2:1 (mol de anticuerpo: mol de TGF- β) respectivamente, sin embargo, ninguno de los vNAR logró inhibir el efecto de TGF- β , en ninguna de las

concentraciones utilizadas. Lo mismo sucedió con el vNAR T-1 evaluado a concentraciones mayores, y sólo TGF-5.b mostró una mínima inhibición a la concentración de 375 nM (**Figura 27-E**).

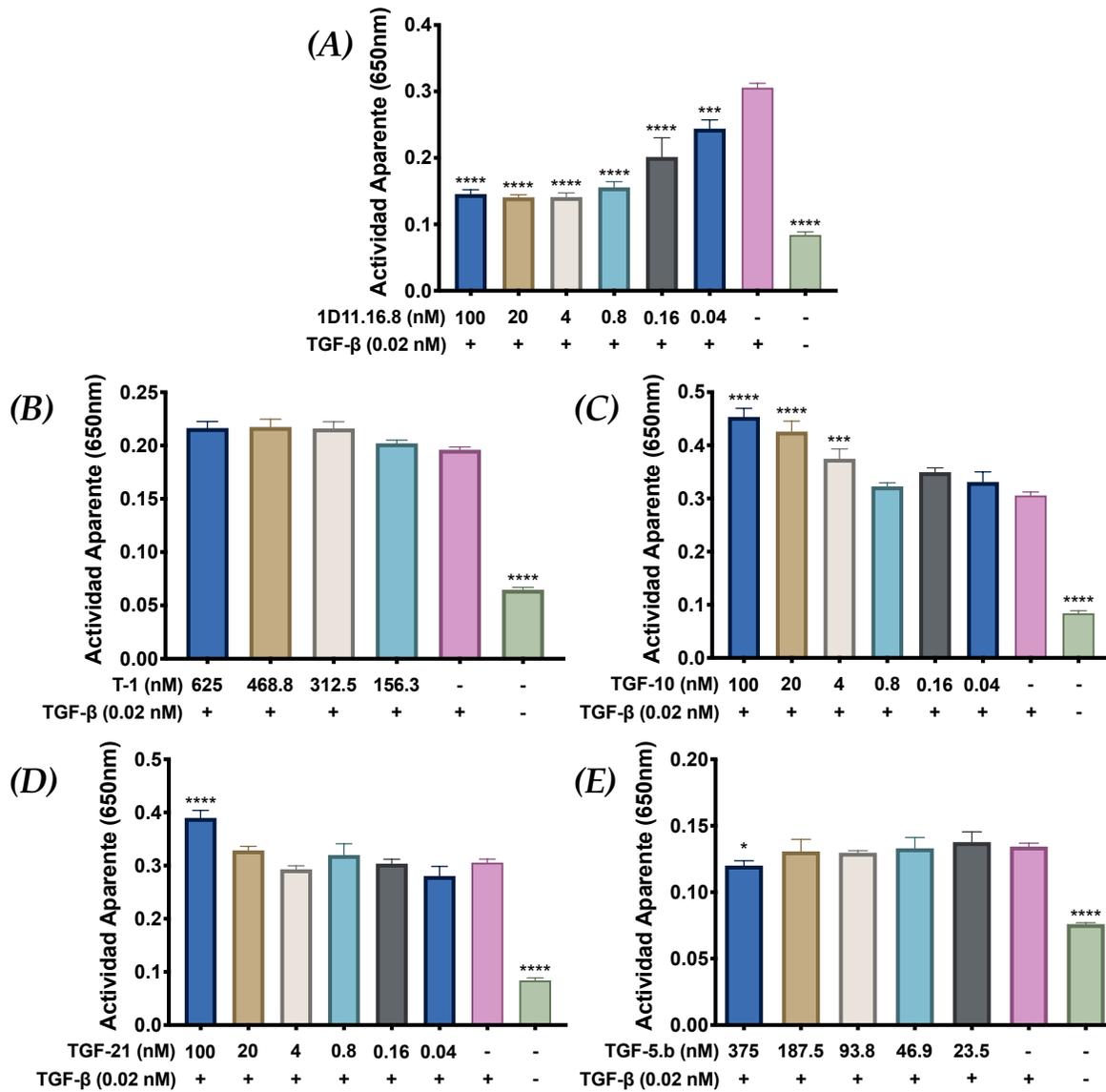


Figura 27 Actividad en el sistema de secreción de fosfatasa alcalina, de los anticuerpos anti-TGF- β 1D11.16.8 (A), T-1 (B), TGF-10 (C), TGF-21 (D) y TGF-5.b (E). ANOVA vs TGF- β 0.02nM; * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$.

Capítulo 4. Discusión

TGF- β es una citocina reguladora de la proliferación y diferenciación celular. En fibroblastos dérmicos activa su proliferación, así como su diferenciación a miofibroblastos, células especializadas en el mantenimiento de la matriz extracelular (Kubiczkova et al., 2012). A nivel genético, TGF- β induce la expresión de proteínas de matriz como colágeno o fibronectina, mientras reprime la expresión de enzimas degradadoras de la matriz como las metaloproteinasas (MMPs) (Ishida et al., 2006; Juhl et al., 2020). También es capaz de autoregularse, induciendo la expresión de su propio gen o de desensibilizar a la célula reduciendo la cantidad de sus receptores (Baugé et al., 2011; Ishida et al., 2006; Juhl et al., 2020).

Actualmente existen diversos tratamientos basados en anticuerpos neutralizantes de la citocina TGF- β , como por ejemplo 1D11, un anticuerpo IgG1 de origen murino, capaz de neutralizar todas las isoformas de TGF- β (Dasch et al., 1989), presentando una constante de disociación (K_D) calculada en el rango pico molar (Bedinger et al., 2016).

La actividad del anticuerpo 1D11 ha sido caracterizada en diversos modelos *in vivo* de patologías asociadas a TGF- β , entre los que se incluyen fibrosis hepática, metástasis de cáncer de mama, o resorción ósea (Biswas et al., 2011; Edwards et al., 2010; Ling et al., 2013). Sin embargo, para evaluar la actividad del anti-TGF- β , se requieren de múltiples administraciones de anticuerpo durante el periodo evaluado (3 veces por semana), lo que demanda la adquisición de una cantidad considerable de anticuerpo. Además, cuando se administra por vía intravenosa o intraperitoneal, este anticuerpo ejerce su efecto neutralizante de forma sistémica, lo cual puede generar efectos indeseables. Un ejemplo de esto, es lo reportado para el anticuerpo Fresolimumab en varias pruebas clínicas, donde algunos de los pacientes tratados con el anticuerpo desarrollaron queratoacantomas (Lacouture et al., 2015; Morris et al., 2014; Rice et al., 2015), un tipo de cáncer cutáneo, que surgió en pacientes que presentaban signos en la piel por exposición solar prolongada. Este cáncer mostró una remisión en cuanto se dejó de administrar el anticuerpo anti-TGF- β .

En este trabajo se planteó el uso de apósitos de alginato de calcio (Ca-Alg) como sistemas de entrega controlada de anticuerpos para su aplicación en ensayos *in vivo*, reduciendo así los efectos secundarios sistémicos. También se plantea que, al ser un sistema de administración directa en el

sitio de interés, se requiere una cantidad menor de anticuerpo en comparación con su administración por vía intravenosa o intraperitoneal.

Ca-Alg ha mostrado un efecto positivo en el tratamiento de heridas cutáneas, debido a su estructura porosa que les permite tener una alta capacidad de absorción, manteniendo a las heridas secas y sin dañar al nuevo tejido. Además, presentan una alta biodegradabilidad y propiedades antibacterianas (Ahmed et al., 2018; Naghshineh et al., 2019).

Sin embargo, por sí sólo, Ca-Alg presenta una baja estabilidad estructural, lo que dificulta su manipulación, además de que se degrada rápidamente cuando entra en contacto con fluidos (Stagnaro et al., 2018). Para mejorar las propiedades estructurales de Ca-Alg, este se mezcla con otros compuestos poliméricos, empleando principalmente, quitosano, colágeno o gelatina (Afjoul et al., 2020; Boateng et al., 2015; Yeom and Lee, 1998). El uso de plastificantes es otra excelente opción para incrementar la estabilidad, Rubio-Elizalde et al. (2019) describió el uso de PEGMa como agente plastificante en apósitos de Ca-Alg, los cuales mostraron una mayor estabilidad en medios acuosos, así como un incremento en su resistencia a la manipulación.

Dado que para la formación de CAPH se requiere del proceso de liofilización, se evaluó la capacidad de estos hidrogeles para mantener viables a los anticuerpos y liberarlos al contacto con medios acuosos, ya que en algunas ocasiones el proceso de congelación y liofilización puede ser perjudicial para la estructura de estas proteínas (Nielsen, 1995; Simon et al., 2020). CAPH mostró la capacidad para prevenir la pérdida de actividad catalítica de anticuerpos marcados con peroxidasa, posterior al proceso de liofilización. Ca-Alg tiene un efecto protector bajo, pero combinado con otros aditivos, puede mejorar la estabilidad de su carga después de la liofilización. Almalik et al. (2017) demostró que al adicionar PEG-2,000 ó PEG-10,000 al 20% (p / v), aumenta la estabilidad de las nanopartículas de quitosano sometidas a liofilización. CAPH tiene una concentración de PEGMa del 25%, relacionada con la cantidad de alginato, lo que concuerda con lo anteriormente descrito.

Estos apósitos también mostraron la capacidad para liberar a los anticuerpos desde los primeros minutos, alcanzando su pico máximo de liberación en 2 horas (Figura 7). Sin embargo, es importante señalar que la cantidad relativa de anticuerpo liberado es menor a lo cargado inicialmente, ya que el control de anticuerpo soluble (aHA 12.5 ng) muestra una mayor absorbancia que los hidrogeles con una mayor cantidad de anticuerpo (CAPH-aHA 50 ng).

Al evaluar al anticuerpo 1D11.16.8 cargado en CAPH, este mostró ser estable en solución, después de la liofilización y después de ser liberado del hidrogel. Sin embargo, la actividad neutralizante de TGF- β de los anticuerpos liberados de CAPH-1D11-1 μ g fue aproximadamente del 70% y significativamente menor a la actividad presentada por el anticuerpo en solución (1D11 1 μ g/mL) o al anticuerpo liofilizado y resuspendido (Dry-1D11 1 μ g/mL).

Esta reducción en la actividad puede deberse a que, la protección conferida por CAPH al anticuerpo, contra el proceso de liofilización, no es completa; o que la liberación es parcial y el resto del anticuerpo queda retenido en las fibras de alginato. Se ha descrito que la interacción entre el alginato y la molécula cargo, se da por fuerzas electrostáticas, y que el adicionar PEGMa, facilita la asociación formando enlaces de hidrógeno ácido-éter y uniones hidrofóbicas (Hussain et al., 2008; Jones et al., 2005).

Curiosamente, CAPH sin anticuerpos mostró una ligera actividad neutralizante de ~30%. Estudios previos han descrito que el alginato puede prevenir la señalización de TGF- β regulando negativamente la fosforilación de Smad2 y la expresión de TGF- β (Feng et al., 2020; W. R. Lee et al., 2009; Xia et al., 2020). Sin embargo, la liberación de calcio podría ser un factor que contribuya a la actividad neutralizante observada. Organista-Juárez et al. (2013) demostraron, en ensayos *in vitro* utilizando células C9 hepáticas y células HEK293 transfectadas, que la administración exógena de cloruro de calcio disminuye la actividad transcripcional dependiente de TGF- β a través del receptor sensible al calcio (CaSR), interfiriendo con la fosforilación de Smad2 e induciendo su degradación proteasomal.

Una vez confirmado que los anticuerpos permanecen viables durante el proceso de formación de CAPH, se procedió a determinar la capacidad de estos apósitos para administrar anticuerpos *in situ*, empleando un modelo murino de cicatrización de heridas por escisión dorsal bilateral (Dunn et al., 2013; Grada et al., 2018; Rhea and Dunnwald, 2020), en el que se evaluó el impacto de la neutralización de TGF- β en el proceso de cicatrización de heridas. El cierre de la herida se evaluó durante diez días, durante este período, se esperaría que el proceso de cicatrización se encontrara finalizando la fase de proliferación de fibroblastos y queratinocitos, e iniciando la etapa de remodelación de la matriz (desde el día siete) caracterizada por la formación de ECM y el depósito de colágeno (Sakai et al., 2016; Zomer and Trentin, 2018).

TGF- β es un potente inhibidor de la proliferación de queratinocitos mediante la inducción del arresto del ciclo celular en la fase G1 (Liarte et al., 2020; Suzuki et al., 2017). Después del tratamiento con CAPH-1D11-10 y CAPH-1D11-50, las puntuaciones de epitelización mejoraron, lo que sugiere que el anticuerpo impidió la inhibición proliferativa de queratinocitos asociada a TGF- β , promoviendo así la recuperación epidérmica. Estos hallazgos concuerdan con un estudio de Mandapalli et al. (2017) donde el tratamiento con un ARNsi de TGF- β aceleró la reepitelización y redujo los niveles de proteína y ARNm de TGF- β 1 y Smad3. Sin embargo, en el estudio que se presenta aquí, las puntuaciones de epitelización de las heridas tratadas con la concentración más alta de anticuerpo (CAPH-1D11-100) fueron similares a las de las heridas de control. Este efecto posiblemente se debió al impacto negativo de la neutralización excesiva de TGF- β en el entorno de la herida, lo que resultó en heridas crónicas que no cicatrizaron, debido a que la ECM no está organizada para que se lleve a cabo una queratinización eficiente (Kim et al., 2003; Pastar et al., 2010). Esta suposición también puede explicar el retraso aparente en el cierre de la herida observado después del tratamiento con CAPH-1D11-100.

En la fase de inflamación de la cicatrización de heridas, TGF- β tiene una doble función: es un potente quimioatrayente, antiinflamatorio y un regulador de la capacidad citotóxica de las células inmunes (Sanjabi et al., 2017). Al observar la respuesta inflamatoria obtenida por los tratamientos CAPH-1D11, estos mostraron un puntaje menor en comparación con las heridas sin tratamiento, esto puede explicarse por una disminución en la infiltración de células inmunes a través de la neutralización de la actividad quimioatrayente de TGF- β .

Estudios anteriores han demostrado que los apósitos a base de alginato pueden promover la proliferación de fibroblastos y la deposición de colágeno (Caetano et al., 2015; Doyle et al., 1996; W. R. Lee et al., 2009). En este estudio, la aplicación de CAPH combinada con una dosis baja de anti-TGF- β , como CAPH-1D11-10, mejoró la epitelización de la herida (evidenciada por una epidermis más desarrollada en comparación con el control) pero sin inhibir la deposición de colágeno. Sin embargo, las observaciones experimentales deben realizarse durante más de diez días para determinar si CAPH-1D11-10 podría mejorar la estructura del tejido cicatrizal. Sin embargo, el apósito CAPH-1D11-100 generó una epidermis irregular y fragmentada. En la cicatrización de heridas, el TGF- β no sólo promueve la síntesis de colágeno, sino que también es responsable de prevenir la degradación del colágeno al regular la síntesis de varias proteasas de ECM e inducir la

secreción de inhibidores de proteasa específicos (Meng et al., 2016; Roberts et al., 1992). La aparición de una menor deposición de colágeno y de estructura fragmentada, después de la aplicación de CAPH-1D11-50 y CAPH-1D11-100, podría atribuirse a una mayor actividad de proteasas de la matriz causada por la neutralización de TGF- β , mostrando un efecto negativo en la arquitectura de la cicatriz.

Aunque la afinidad del anticuerpo 1D11.16.8 está sesgada hacia TGF- β 3 (Bedinger et al., 2016), la isoforma descrita por mejorar la cicatrización, Lu et al. (2005) describieron que una mejor respuesta en la cicatrización de heridas está más asociada con el efecto temporal de neutralización de TGF- β , que con la neutralización específica de alguna isoforma. Ellos demostraron que la neutralización de las tres isoformas de TGF- β el mismo día de la formación de la herida, induce un retraso en la cicatrización de la herida sin una reducción de los marcadores hipertróficos. Pero la neutralización de TGF- β una semana después de generarse la herida mejora la hipertrofia. Este efecto se correlaciona con la cicatrización deteriorada inducida por CAPH-1D11-100, que se administró el mismo día de lesión.

Se evaluó a nivel transcriptómico, la actividad del anticuerpo 1D11.16 para inhibir a TGF- β , empleando los genes *Tgfb1* y *Acta2*. TGF- β regula positivamente su propia expresión en muchas células (Obberghen-Schillín et al., 1988) mientras que *Acta2* es un marcador de la transición de fibroblastos a miofibroblastos activada por TGF- β (Desmoulière et al., 1993). En este estudio, los niveles de ARNm de los genes *Tgfb1* y *Acta2* fueron significativamente más bajos en las lesiones tratadas con CAPH-1D11-100 en comparación con las lesiones de control. Esto es un indicador de que CAPH-1D11-100 puede liberar anticuerpos neutralizantes de TGF- β en la lesión. También se observaron niveles reducidos de ARNm de TGF- β en respuesta a CAPH, como se ha descrito previamente (W. R. Lee et al., 2009), pero esos no fueron estadísticamente diferentes al control.

En general, estas observaciones sugieren que los hidrogeles de alginato de Ca-PEGMA poseen suficiente resistencia mecánica para la administración tópica de agentes terapéuticos, y la capacidad para almacenar, transportar y liberar anticuerpos neutralizantes de TGF- β directamente en el sitio de la herida.

Aunque el anticuerpo 1D11.16.8 es altamente efectivo en la neutralización de TGF- β , el considerable tamaño de las IgG (~160 kDa) limita su rendimiento en condiciones que requieran una mejor difusión,

como es el caso de una epidermis formada a los 7 días posteriores a una lesión. Para contrarrestar esto, se ha tratado de minimizar el tamaño de los IgG mediante la fragmentación de sus cadenas (Fab o scFv). Sin embargo, estos muestran una pérdida en la estabilidad térmica o química, y un aumento en la formación de agregados (Famm et al., 2008). Pero esto no sucede con los anticuerpos de tipo IgNAR, los cuales al no poseer cadenas ligeras en sus no dominios variables (vNAR), les permite ser obtenidos en forma de monómero, sin perder su capacidad de reconocimiento y manteniendo su elevada estabilidad térmica o química (T. Camacho-Villegas et al., 2012).

En 2012, Camacho-Villegas reportó el aislamiento del vNAR T-1, un anticuerpo de dominio sencillo capaz de reconocer a las isoformas de TGF- β por ELISA, pero al evaluar su efecto neutralizante en un sistema de secreción de luciferasa inducido por TGF- β en células MV1Lu, se requiere una concentración de 6.6 mM para inhibir los efectos de la citocina (20 pM).

En la búsqueda de un vNAR con una mejor actividad para neutralizar TGF- β se realizó una nueva selección empleando tres bibliotecas sintéticas que se diferencian en la cantidad de enlaces disulfuro que presentan: 0, 1 y 2 enlaces no canónicos (entre el CDR3 y el CDR1 o el FRW) (Cabanillas-Bernal et al., 2019). Se evaluaron dos métodos en el proceso del despliegue en fagos, para la recuperación de los vNAR con reconocimiento a TGF- β . En el primero se empleó una hidrólisis con tripsina, separando del bacteriófago M13 a los vNAR que reconocieron a TGF- β . Este es un proceso de selección no-específico ya que las clonas eluidas, representan a la totalidad de los vNAR que se adherieron al antígeno, con lo cual se obtienen anticuerpos con múltiples epítomos en la citocina (Barbas, 2001). En el segundo método, se empleó al anticuerpo 1D11.16.8 para desplazar a los vNAR que reconocieron a TGF- β , con este método se obtiene una selección dirigida, ya que los vNAR obtenidos tendrán un epítomo de reconocimiento similar al del anticuerpo 1D11.16.8 (Meulemans et al., 1994).

Del despliegue en fagos empleando la hidrólisis con tripsina como método de elución, se seleccionaron a los vNAR TGF-10 y TGF-21, ambos pertenecientes a la biblioteca sin enlaces disulfuro adicionales (vNAR tipo IV). Los modelos *in silico* de estos vNAR mostraron un reconocimiento en la zona de dimerización de la citocina, y la cual difiere completamente de la zona de unión a los receptores (Radaev et al., 2010). Sin embargo, esta interacción corresponde a una de las cualidades que se le atribuyen a este tipo de vNAR, la cual es el reconocimiento de sitios crípticos,

que son difíciles de alcanzar por anticuerpos convencionales, atribuido a que poseen un CDR3 más extenso y flexible (Streltsov et al., 2004).

Empleando el método por competencia con 1D11.16.8, se seleccionó a TGF-5.b, el cual mostró *in silico* una interacción con su CDR3 al sitio de unión de TGFBRII, similar a la presentada por el dominio vH de Fresolimumab (Grütter et al., 2008), el análogo humanizado de 1D11. El vNAR T-1 también presentó una interacción con el sitio de unión a los receptores, pero orientando su CDR3 al sitio de unión de T β RI.

El análisis *in silico* de los dominios vNAR podría sugerir que T-1 y TGF-5.b logren inhibir la interacción de TGF- β con sus receptores de forma competitiva, pero la interacción de TGF-10 y TGF-21 podría sugerir que estos vNAR no presentan actividad para neutralizar a la citocina, o si lo hacen esta sería por una inhibición alostérica.

Se procedió a la expresión y purificación de los vNAR seleccionados, la pureza mostrada posterior a la purificación por inmunofinidad fue superior a lo obtenido sólo con IMAC, obteniéndose una pureza cerca del 90% para TGF-21 y TGF5.b, mientras que T-1 y TGF-10 aun presentaron proteínas adicionales. Sin embargo, los rendimientos obtenidos para estos vNAR fueron muy bajos, siendo TGF-21 la de mayor rendimiento recuperándose cerca de 520 μ g por litro de cultivo. Este rendimiento obtenido es similar a lo reportado para otros vNAR que en general ronda los 300-3000 μ g/L (Leow et al., 2019; Nuttall et al., 2003; Zielonka, 2015). Sin embargo este rendimiento, es inferior en comparación con otras proteínas expresadas de forma heteróloga, por ejemplo, se han reportado rendimientos de hasta 100 mg/mL para anticuerpos de dominio sencillo de camélido conocidos como VHH (Zarschler et al., 2013).

Al evaluar la actividad *in vitro* de los anticuerpos seleccionados, el anticuerpo 1D11.16.8 mostró ser un potente inhibidor de los efectos de TGF- β en fibroblastos dérmicos, al impedir la sobreexpresión de los genes *COL1A1* y *TGFB1*, o la represión de los genes *MMP1* y *TGFBRII*. Este anticuerpo también mostró la capacidad para inhibir la activación de fibroblastos dérmicos para contraer matrices tridimensionales de colágeno.

Un punto destacable es que al comparar la actividad de los fibroblastos que no recibieron algún tratamiento, con las células tratadas con 1D11.16.8, estas últimas muestran una menor expresión

de *COL1A1* y una mayor expresión de *MMP1*, junto con una menor capacidad en la contracción de retículas de colágeno. Lo que sugiere que la concentración de anticuerpo evaluada (62.5 nM) no sólo es capaz de inhibir la citocina adicionada al medio (0.04 nM), sino también del TGF- β autocrino secretado y activado por los fibroblastos (Takagawa et al., 2003), lo que supone un exceso en la cantidad de anticuerpo administrado.

Al evaluar el efecto de los vNAR para inhibir in vitro los efectos de TGF- β en fibroblastos dérmicos, T-1 y TGF-21 sólo mostraron una inhibición de la expresión de los genes relacionados con la remodelación de la matriz extracelular: *COL1A1* y *MMP1*, pero estos no mostraron actividad en los genes de *TGFB1* y *TGFBRII*. Esto puede deberse a que sólo hubo una inhibición parcial de TGF- β y que se requiere de una mayor cantidad de los anticuerpos para inhibir por completo la vía de señalización. No obstante, esta actividad para regular el efecto en la remodelación de matriz, fue comprobada para TGF-21, el cual pudo impedir la acción de TGF- β en la contracción de retículas de colágeno pobladas con fibroblastos.

Es con base a esto que se decidió determinar la CME para neutralizar a TGF- β . Aunque esto es posible con los ensayos planteados en fibroblastos dérmicos, el sistema de secreción de fosfatasa alcalina inducido por TGF- β en células HEK-Blue, permite evaluar de forma más sencilla y rápida, múltiples compuestos a diferentes concentraciones en un mismo ensayo. Al evaluar al anticuerpo 1D11.16.8 en este sistema, se obtuvo una CME de 0.8 nM, la cual fue menor a la reportada por Hinck et al. (2015), que mostró una CME de 10 nM en un ensayo similar, empleando a la enzima luciferasa como reportero inducido por TGF- β . A su vez, Bedinger et al. (2016) obtuvo una CME de \sim 5 nM en un ensayo de proliferación en linfocitos T (HT-2).

Sin embargo, no fue posible determinar la concentración mínima inhibitoria de los dominios vNAR seleccionados, ya que ninguno mostró actividad en el rango nanomolar evaluado. Esto sugiere que la actividad inhibitoria de los vNAR evaluados se encuentra en el rango micromolar, como lo descrito previamente para el vNAR T-1 (Camacho-Villegas, 2012).

Para evaluar a estos vNAR a una concentración mayor, se requiere de métodos de producción diferentes a los descritos en el presente trabajo. Como lo es el aislamiento y renaturalización de cuerpos de inclusión. Millán-Gómez et al. (2018) describe un rendimiento de hasta 7 mg por litro de cultivo para el vNAR V13 y una pureza mayor al 95% para cada una de las variantes evaluadas, a

partir del aislamiento de cuerpos de inclusión y su renaturalización por cromatografía empleando urea como agente solubilizador y L-Arg como agente de replegado.

Capítulo 5. Conclusiones

Se obtuvieron andamios de Ca-Alginato-PEGMa cargados con anticuerpo 1D11.16.8. Los cuales mostraron mantener activo al anticuerpo, con una liberación parcial en las primeras horas. En ensayos *in vivo*, los andamios mostraron la capacidad para liberar el anticuerpo (a pesar del tamaño del anticuerpo, 160 kDa) en heridas dérmicas en ratones. La cual se demuestra en el andamio que contenía 100 μg de 1D11, por la reducción en la cantidad de colágeno, así como de los marcadores de la vía de señalización, *Tgfb1* y *Acta2*. Sin embargo, este andamio mostró un proceso de cicatrización deficiente. El andamio cargado con 10 μg de anti-TGF- β mostró una mejor respuesta en la re-epitelización de la herida. Sin embargo, se requiere evaluar a largo plazo para determinar su efecto en la formación de cicatrices.

Se aislaron tres nuevos vNAR anti-TGF- β : TGF-10, TGF-21 y TGF-5.b. Los cuales, junto con T-1, mostraron la capacidad de reconocer a la citocina por ELISA. Al evaluar la interacción vNAR-hTGF- β 1 con modelos *in silico*, sólo T-1 y TGF-5.b interactúan con la citocina en zonas de unión a los receptores. Mientras que TGF-10 y TGF-21 se unen en el sitio de dimerización de la citocina.

Al evaluar el efecto en la expresión genética en fibroblastos dérmicos humanos, T-1 y TGF-21 sólo mostraron una inhibición parcial de los efectos de la citocina en los genes *COL1A1* y *MMP1*. TGF-10 sólo mostró efecto en *COL1A1*, y ninguno de los vNAR logró inhibir el efecto en *TGFB1* y *TGFBRII*. No fue posible evaluar a TGF-5.b. Al evaluar el efecto en la remodelación de fibras de colágeno, TGF-21 mostró un efecto inhibitorio a 125 nM, TGF-10 no mostró efecto en las dosis evaluadas. No se logró evaluar a T-1 y TGF-5.b. El anticuerpo 1D11.16.8 demostró ser un potente inhibidor de TGF- β , al neutralizar por completo los efectos biológicos de la citocina en fibroblastos dérmicos, a nivel transcriptómico o en la contracción de matrices de colágeno.

Empleando el sistema de secreción de SEAP activada por TGF- β , ninguno de los vNAR logró neutralizar a la citocina a las concentraciones evaluadas (rango nM). Sólo TGF-5.b mostró una mínima inhibición a la concentración máxima evaluada (375 nM). Por su parte, 1D11.16.8 logró inhibir a la citocina a partir de 0.8 nM. Se requiere evaluar otros métodos para producir de forma recombinante a los vNAR aislados en este proyecto pero en cantidades y rendimientos mayores, para así evaluar su actividad en el rango μM .

Literatura citada

- Acton, Q. A. 2013. TGF-beta Superfamily Proteins—Advances in Research and Application: 2013 Edition (First). ScholarlyEditions, Atlanta.
- Afjoul, H., Shamloo, A. and Kamali, A. 2020. Freeze-gelled alginate/gelatin scaffolds for wound healing applications: An in vitro, in vivo study. *Materials Science and Engineering C*, Elsevier Ltd, 113, p. 110957. doi:10.1016/j.msec.2020.110957
- Ahmed, A., Getti, G. and Boateng, J. 2018. Ciprofloxacin-loaded calcium alginate wafers prepared by freeze-drying technique for potential healing of chronic diabetic foot ulcers. *Drug Delivery and Translational Research*, *Drug Delivery and Translational Research*, 8(6), pp. 1751–1768. doi:10.1007/s13346-017-0445-9
- Almalik, A., Alradwan, I., Kalam, M. A. and Alshamsan, A. 2017. Effect of cryoprotection on particle size stability and preservation of chitosan nanoparticles with and without hyaluronate or alginate coating. *Saudi Pharmaceutical Journal*, Elsevier B.V., 25(6), pp. 861–867. doi:10.1016/j.jsps.2016.12.008
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, Academic Press, 215(3), pp. 403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Aranda, P. S., LaJoie, D. M. and Jorcyk, C. L. 2012. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*, NIH Public Access, 33(2), pp. 366–369. doi:10.1002/elps.201100335
- Barbas, C. F. 2001. Phage display : a laboratory manual (First). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.
- Baugé, C., Cauvard, O., Leclercq, S., Galéra, P. and Boumédiène, K. 2011. Modulation of transforming growth factor beta signalling pathway genes by transforming growth factor beta in human osteoarthritic chondrocytes: Involvement of Sp1 in both early and late response cells to transforming growth factor beta. *Arthritis Research and Therapy*, BioMed Central, 13(1), p. R23. doi:10.1186/ar3247
- Bedinger, D., Lao, L., Khan, S., Lee, S., Takeuchi, T. and Mirza, A. M. 2016. Development and characterization of human monoclonal antibodies that neutralize multiple TGF β isoforms. *MABs*, Taylor and Francis Inc., 8(2), pp. 389–404. doi:10.1080/19420862.2015.1115166
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. and Bourne, P. E. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, Narnia, 28(1), pp. 235–

242. doi:10.1093/nar/28.1.235

- Biswas, S., Nyman, J. S., Alvarez, J. A., Chakrabarti, A., Ayres, A., Sterling, J., Edwards, J., Rana, T., Johnson, R., Perrien, D. S., Lonning, S., Shyr, Y., Matrisian, L. M. and Mundy, G. R. 2011. Anti-transforming growth factor β antibody treatment rescues bone loss and prevents breast cancer metastasis to bone. *PLoS ONE*, Public Library of Science, 6(11). doi:10.1371/journal.pone.0027090
- Boateng, J., Burgos-Amador, R., Okeke, O. and Pawar, H. 2015. Composite alginate and gelatin based bio-polymeric wafers containing silver sulfadiazine for wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, Elsevier, 79, pp. 63–71. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.04.048
- Cabanillas-Bernal, O., Dueñas, S., Ayala-Avila, M., Rucavado, A., Escalante, T. and Licea-Navarro, A. F. 2019. Synthetic libraries of shark vNAR domains with different cysteine numbers within the CDR3. *PLOS ONE*, Public Library of Science, 14(6), p. e0213394. doi:10.1371/journal.pone.0213394
- Camacho-Villegas, T. A. 2012. Anticuerpos de tiburón de dominio sencillo y quimerizado neutralizantes de citocinas humanas. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California, pp. 1–154 .
- Camacho-Villegas, T., Mata-Gonzalez, T., Paniagua-Solis, J., Sanchez, E. and Licea, A. 2012. Human TNF cytokine neutralization with a vNAR from *Heterodontus francisci* shark: a potential therapeutic use. *MABs*, Landes Bioscience, 5(1), pp. 80–85. doi:10.4161/mabs.22593
- D’Ayala, G., Malinconico, M. and Laurienzo, P. 2008. Marine Derived Polysaccharides for Biomedical Applications: Chemical Modification Approaches. *Molecules*, Molecular Diversity Preservation International, 13(9), pp. 2069–2106. doi:10.3390/molecules13092069
- Dasch, J. R., Pace, D. R., Waegell, W., Inenaga, D. and Ellingsworth, L. 1989. Monoclonal antibodies recognizing transforming growth factor-beta. Bioactivity neutralization and transforming growth factor beta 2 affinity purification. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 142(5), pp. 1536–1541.
- den Hollander, M. W., Bensch, F., Glaudemans, A. W. J. M., Oude Munnink, T. H., Enting, R. H., den Dunnen, W. F. A., Heesters, M. A. A. M., Kruijt, F. A. E., Lub-de Hooge, M. N., Cees de Groot, J., Pearlberg, J., Gietema, J. A., de Vries, E. G. E. and Walenkamp, A. M. E. 2015. TGF- β Antibody Uptake in Recurrent High-Grade Glioma Imaged with ^{89}Zr -Fresolimumab PET. *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine, Society of Nuclear Medicine*, 56(9), pp. 1310–1314. doi:10.2967/jnumed.115.154401
- Desmouliere, A., Geinoz, A., Gabbiani, F. and Gabbiani, G. 1993. Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *Journal of Cell Biology*, The Rockefeller University Press, 122(1), pp. 103–111. doi:10.1083/jcb.122.1.103

- Dunn, L., Prosser, H. C. G., Tan, J. T. M., Vanags, L. Z., Ng, M. K. C. and Bursill, C. A. 2013. Murine model of wound healing. *Journal of Visualized Experiments*, *Journal of Visualized Experiments*, 2013(75), pp. 1–6. doi:10.3791/50265
- Edwards, J. R., Nyman, J. S., Lwin, S. T., Moore, M. M., Esparza, J., O'Quinn, E. C., Hart, A. J., Biswas, S., Patil, C. A., Lonning, S., Mahadevan-Jansen, A. and Mundy, G. R. 2010. Inhibition of TGF- β signaling by 1D11 antibody treatment increases bone mass and quality in vivo. *Journal of Bone and Mineral Research*, Wiley-Blackwell, 25(11), pp. 2419–2426. doi:10.1002/jbmr.139
- Eming, S. A., Martin, P. and Tomic-Canic, M. 2014. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine*. American Association for the Advancement of Science, Vol. 6. Issue 265. pp. 265sr6-265sr6 . doi:10.1126/scitranslmed.3009337
- Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen, M.-Y., Pieper, U. and Sali, A. 2006. Comparative protein structure modeling using Modeller. *Current Protocols in Bioinformatics*, NIH Public Access, Chapter 5, p. Unit-5.6. doi:10.1002/0471250953.bi0506s15
- Famm, K., Hansen, L., Christ, D. and Winter, G. 2008. Thermodynamically Stable Aggregation-Resistant Antibody Domains through Directed Evolution. *Journal of Molecular Biology*, Academic Press, 376(4), pp. 926–931. doi:10.1016/j.jmb.2007.10.075
- Feng, W., Hu, Y., An, N., Feng, Z., Liu, J., Mou, J., Hu, T., Guan, H., Zhang, D. and Mao, Y. 2020. Alginate Oligosaccharide Alleviates Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension via Anti-Oxidant and Anti-Inflammation Pathways in Rats. *International Heart Journal*, International Heart Journal Association, 61(1), pp. 160–168. doi:10.1536/ihj.19-096
- Finnsen, K. W., Arany, P. R. and Philip, A. 2013. Transforming Growth Factor Beta Signaling in Cutaneous Wound Healing: Lessons Learned from Animal Studies. *Advances in Wound Care*, Mary Ann Liebert, Inc., 2(5), pp. 225–237. doi:10.1089/wound.2012.0419
- Formenti, S. C., Lee, P., Adams, S., Goldberg, J. D., Li, X., Xie, M. W., Ratican, J. A., Felix, C., Hwang, L., Faull, K. F., Sayre, J. W., Hurvitz, S., Glaspy, J. A., Comin-Anduix, B., Demaria, S., Schaeue, D. and McBride, W. H. 2018. Focal Irradiation and Systemic TGF β Blockade in Metastatic Breast Cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, NIH Public Access, 24(11), pp. 2493–2504. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-3322
- Gonzalez-Sapienza, G., Rossotti, M. A. and Tabares-da Rosa, S. 2017. Single-domain antibodies as versatile affinity reagents for analytical and diagnostic applications. *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., Vol. 8. Issue AUG. pp. 977–977 . doi:10.3389/fimmu.2017.00977
- Grada, A., Mervis, J. and Falanga, V. 2018. Research Techniques Made Simple: Animal Models of Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology*. Elsevier B.V., Vol. 138. Issue 10. pp. 2095-2105.e1 . doi:10.1016/j.jid.2018.08.005

- Greenberg, A. S., Avila, D., Hughes, M., Hughes, A., McKinney, E. C. and Flajnik, M. F. 1995. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature*, 374(6518), pp. 168–173. doi:10.1038/374168a0
- Grütter, C., Wilkinson, T., Turner, R., Podichetty, S., Finch, D., McCourt, M., Loning, S., Jermutus, L. and Grütter, M. G. 2008. A cytokine-neutralizing antibody as a structural mimetic of 2 receptor interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, National Academy of Sciences, 105(51), pp. 20251–20256. doi:10.1073/pnas.0807200106
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hammers, C., Songa, E. B., Bendahman, N. and Hammers, R. 1993. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. doi:10.1038/363446a0
- Heldin, C.-H. and Moustakas, A. 2016. Signaling Receptors for TGF- β Family Members. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 8(8), p. a022053. doi:10.1101/cshperspect.a022053
- Hinck, A., Luzhen, S. and Christian, Z. 2015. Tgfb Type Ii-type Iii Receptor Fusions (Patent No. 201314387901). The Board of Regents of the University of Texas System.
- Hussain, H., Mya, K. Y. and He, C. 2008. Self-assembly of brush-like poly[poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate] synthesized via aqueous atom transfer radical polymerization. *Langmuir*, American Chemical Society, 24(23), pp. 13279–13286. doi:10.1021/la802734e
- Ishida, W., Mori, Y., Lakos, G., Sun, L., Shan, F., Bowes, S., Josiah, S., Lee, W. C., Singh, J., Ling, L. E. and Varga, J. 2006. Intracellular TGF- β receptor blockade abrogates smad-dependent fibroblast activation in vitro and in vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, Elsevier, 126(8), pp. 1733–1744. doi:10.1038/sj.jid.5700303
- Jones, J. A., Novo, N., Flagler, K., Pagnucco, C. D., Carew, S., Cheong, C., Kong, X. Z., Burke, N. A. D. and Stöver, H. D. H. 2005. Thermoresponsive copolymers of methacrylic acid and poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, 43(23), pp. 6095–6104. doi:10.1002/pola.21099
- Juhl, P., Bondesen, S., Hawkins, C. L., Karsdal, M. A., Bay-Jensen, A. C., Davies, M. J. and Siebuhr, A. S. 2020. Dermal fibroblasts have different extracellular matrix profiles induced by TGF- β , PDGF and IL-6 in a model for skin fibrosis. *Scientific Reports*, Nature Research, 10(1), pp. 1–10. doi:10.1038/s41598-020-74179-6
- Kajdaniuk, D., Marek, B., Borgiel-Marek, H. and Kos-Kudła, B. 2013. Transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) in physiology and pathology. *Endokrynologia Polska*, 64(5), pp. 384–396. doi:10.5603/EP.2013.0022
- Katz, L. H., Li, Y., Chen, J.-S., Muñoz, N. M., Majumdar, A., Chen, J. and Mishra, L. 2013. Targeting

TGF- β signaling in cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 17(7), pp. 743–760. doi:10.1517/14728222.2013.782287

Kovalenko, O. V, Olland, A., Piché-Nicholas, N., Godbole, A., King, D., Svenson, K., Calabro, V., Müller, M. R., Barelle, C. J., Somers, W., Gill, D. S., Mosyak, L. and Tchistiakova, L. 2013. Atypical antigen recognition mode of a shark immunoglobulin new antigen receptor (IgNAR) variable domain characterized by humanization and structural analysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(24), pp. 17408–17419. doi:10.1074/jbc.M112.435289

Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., Beglov, D. and Vajda, S. 2017. The ClusPro web server for protein–protein docking. *Nature Protocols*, Nature Publishing Group, 12(2), pp. 255–278. doi:10.1038/nprot.2016.169

Kubiczkova, L., Sedlarikova, L., Hajek, R. and Sevcikova, S. 2012. TGF- β - an excellent servant but a bad master. *Journal of Translational Medicine*, BioMed Central, 10, p. 183. doi:10.1186/1479-5876-10-183

Kunkel, T. A. 1985. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(2), pp. 488–492.

Lacouture, M. E., Morris, J. C., Lawrence, D. P., Tan, A. R., Olencki, T. E., Shapiro, G. I., Dezube, B. J., Berzofsky, J. A., Hsu, F. J. and Guitart, J. 2015. Cutaneous keratoacanthomas/squamous cell carcinomas associated with neutralization of transforming growth factor β by the monoclonal antibody fresolimumab (GC1008). *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, NIH Public Access, 64(4), pp. 437–446. doi:10.1007/s00262-015-1653-0

Lee, K. Y. and Mooney, D. J. 2012. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*. Elsevier Ltd, Vol. 37. Issue 1. pp. 106–126 . doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003

Lee, W. R., Park, J. H., Kim, K. H., Kim, S. J., Park, D. H., Chae, M. H., Suh, S. H., Jeong, S. W. and Park, K. K. 2009. The biological effects of topical alginate treatment in an animal model of skin wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 17(4), pp. 505–510. doi:10.1111/j.1524-475X.2009.00496.x

Leow, H. C., Fischer, K., Leow, Y. C., Braet, K., Cheng, Q. and McCarthy, J. 2019. Cytoplasmic and periplasmic expression of recombinant shark VNAR antibody in *Escherichia coli*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, Taylor and Francis Inc., 49(4), pp. 315–327. doi:10.1080/10826068.2019.1566145

Ling, H., Roux, E., Hempel, D., Tao, J., Smith, M., Lonning, S., Zuk, A., Arbeeny, C. and Ledbetter, S. 2013. Transforming Growth Factor β Neutralization Ameliorates Pre-Existing Hepatic Fibrosis and Reduces Cholangiocarcinoma in Thioacetamide-Treated Rats. *PLoS ONE*, PLoS One, 8(1). doi:10.1371/journal.pone.0054499

- Liu, J. L., Zabetakis, D., Brown, J. C., Anderson, G. P. and Goldman, E. R. 2014. Thermal stability and refolding capability of shark derived single domain antibodies. *Molecular Immunology*, Elsevier Ltd, 59(2), pp. 194–199. doi:10.1016/j.molimm.2014.02.014
- Lodish H, Berkas A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, S. M. 2008. *Molecular Cell Biology- Lodish. Biología celular y Molecular*. pp. 924–930 . doi:558
- Lu, L., Saulis, A. S., Liu, W. R., Roy, N. K., Chao, J. D., Ledbetter, S. and Mustoe, T. A. 2005. The Temporal Effects of Anti-TGF- β 1, 2, and 3 Monoclonal Antibody on Wound Healing and Hypertrophic Scar Formation. *Journal of the American College of Surgeons*, 201(3), pp. 391–397. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2005.03.032
- Mandapalli, P. K., Labala, S., Jose, A., Bhatnagar, S., Janupally, R., Sriram, D. and Venuganti, V. V. K. 2017. Layer-by-Layer Thin Films for Co-Delivery of TGF- β siRNA and Epidermal Growth Factor to Improve Excisional Wound Healing. *AAPS PharmSciTech*, AAPS PharmSciTech, 18(3), pp. 809–820. doi:10.1208/s12249-016-0571-6
- Mascarenhas, J., Li, T., Sandy, L., Newsom, C., Petersen, B., Godbold, J. and Hoffman, R. 2014. Anti-transforming growth factor- β therapy in patients with myelofibrosis. *Leukemia & Lymphoma*, Taylor & Francis, 55(2), pp. 450–452. doi:10.3109/10428194.2013.805329
- Meulemans, E. V., Slobbe, R., Wasterval, P., Ramaekers, F. C. S. and Van Eys, G. J. J. M. 1994. Selection of phage-displayed antibodies specific for a cytoskeletal antigen by competitive elution with a monoclonal antibody. *Journal of Molecular Biology*, Academic Press, 244(4), pp. 353–360. doi:10.1006/jmbi.1994.1735
- Millán-Gómez, D., Dueñas, S., Muñoz, P. L. A., Camacho-Villegas, T., Elosua, C., Cabanillas-Bernal, O., Escalante, T., Perona, A., Abia, D., Drescher, F., Fournier, P. G. J., Ramos, M. A., Mares, R. E., Paniagua-Solis, J., Mata-Gonzalez, T., Gonzalez-Canudas, J., Hoffman, R. M., Licea-Navarro, A. and Sánchez-Campos, N. 2018. In silico-designed mutations increase variable new-antigen receptor single-domain antibodies for VEGF165 neutralization. *Oncotarget, Impact Journals, LLC*, 9(46), p. 28016. doi:10.18632/ONCOTARGET.25549
- Morris, J. C., Tan, A. R., Olencki, T. E., Shapiro, G. I., Dezube, B. J., Reiss, M., Hsu, F. J., Berzofsky, J. A. and Lawrence, D. P. 2014. Phase I Study of GC1008 (Fresolimumab): A Human Anti-Transforming Growth Factor-Beta (TGF β) Monoclonal Antibody in Patients with Advanced Malignant Melanoma or Renal Cell Carcinoma. *PLoS ONE*, 9(3), p. e90353. doi:10.1371/journal.pone.0090353
- Moulin, A., Mathieu, M., Lawrence, C., Bigelow, R., Levine, M., Hamel, C., Marquette, J.-P., Le Parc, J., Loux, C., Ferrari, P., Capdevila, C., Dumas, J., Dumas, B., Rak, A., Bird, J., Qiu, H., Pan, C. Q., Edmunds, T. and Wei, R. R. 2014. Structures of a pan-specific antagonist antibody complexed to different isoforms of TGF β reveal structural plasticity of antibody-antigen interactions. *Protein Science : A Publication of the Protein Society, Wiley-Blackwell*, 23(12), pp. 1698–1707. doi:10.1002/pro.2548

- Murphy-Ullrich, J. E. and Poczatek, M. 2000. Activation of latent TGF- β by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, Pergamon, 11(1–2), pp. 59–69. doi:10.1016/S1359-6101(99)00029-5
- Naghshineh, N., Tahvildari, K. and Nozari, M. 2019. Preparation of Chitosan, Sodium Alginate, Gelatin and Collagen Biodegradable Sponge Composites and their Application in Wound Healing and Curcumin Delivery. *Journal of Polymers and the Environment*, Springer US, 27(12), pp. 2819–2830. doi:10.1007/s10924-019-01559-z
- Nielsen, K. 1995. Stability of Freeze Dried Horseradish Peroxidase Conjugated Mono-Clonal Antibodies Used in Diagnostic Serology. *Journal of Immunoassay, J Immunoassay*, 16(2), pp. 183–197. doi:10.1080/15321819508013557
- Nuttall, S. D., Krishnan, U. V., Doughty, L., Pearson, K., Ryan, M. T., Hoogenraad, N. J., Hattarki, M., Carmichael, J. A., Irving, R. A. and Hudson, P. J. 2003. Isolation and characterization of an IgNAR variable domain specific for the human mitochondrial translocase receptor Tom70. *European Journal of Biochemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, 270(17), pp. 3543–3554. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03737.x
- O’Kennedy, R. 2017. Antibodies – Nature’s analytical masterpieces. *Methods*, Academic Press, 116, pp. 1–3. doi:10.1016/J.YMETH.2017.03.010
- Obberghen-Schillin, E. Van, Roche, N. S., Flanders, K. C., Sporn, M. B. and Roberts, A. B. 1988. Transforming growth factor beta 1 positively regulates its own expression in normal and transformed cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 263, pp. 7741–7746.
- Organista-Juárez, D., Carretero-Ortega, J., Vicente-Fermín, O., Vázquez-Victorio, G., Sosa-Garrocho, M., Vázquez-Prado, J., Macías-Silva, M. and Reyes-Cruz, G. 2013. Calcium-sensing receptor inhibits TGF- β -signaling by decreasing Smad2 phosphorylation. *IUBMB Life*, John Wiley & Sons, Ltd, 65(12), pp. 1035–1042. doi:10.1002/iub.1232
- Papageorgiou, L., Cuong, N. T. and Vlachakis, D. 2016. Antibodies as stratagems against cancer. *Molecular BioSystems*, The Royal Society of Chemistry, 12(7), pp. 2047–2055. doi:10.1039/C5MB00699F
- Penn, J. W., Grobbelaar, A. O. and Rolfe, K. J. 2012. The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review. *International Journal of Burns and Trauma*, 2(1), pp. 18–28.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, Oxford University Press, 29(9), p. e45.
- Pickup, M., Novitskiy, S. and Moses, H. L. 2013. The roles of TGF β in the tumour microenvironment. *Nature Reviews. Cancer*, Nature Publishing Group, 13(11), pp. 788–799. doi:10.1038/nrc3603

- QIAGEN ©. 2003. The QIAexpressionist™ A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins (5th ed., Vol. 79. Issue June).
- Radaev, S., Zou, Z., Huang, T., Lafer, E. M., Hinck, A. P. and Sun, P. D. 2010. Ternary complex of transforming growth factor-beta1 reveals isoform-specific ligand recognition and receptor recruitment in the superfamily. *The Journal of Biological Chemistry, American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 285(19), pp. 14806–14814. doi:10.1074/jbc.M109.079921
- Ramirez, H., Patel, S. B. and Pastar, I. 2014. The Role of TGFβ Signaling in Wound Epithelialization. *Advances in Wound Care*, 3(7), pp. 482–491. doi:10.1089/wound.2013.0466
- Rhea, L. and Dunnwald, M. 2020. Murine excisional wound healing model and histological morphometric wound analysis. *Journal of Visualized Experiments, Journal of Visualized Experiments*, 2020(162), pp. 1–18. doi:10.3791/61616
- Rice, L. M., Padilla, C. M., McLaughlin, S. R., Mathes, A., Ziemek, J., Goummih, S., Nakerakanti, S., York, M., Farina, G., Whitfield, M. L., Spiera, R. F., Christmann, R. B., Gordon, J. K., Weinberg, J., Simms, R. W. and Lafyatis, R. 2015. Fresolimumab treatment decreases biomarkers and improves clinical symptoms in systemic sclerosis patients. *The Journal of Clinical Investigation, American Society for Clinical Investigation*, 125(7), pp. 2795–2807. doi:10.1172/JCI77958
- Rubio-Elizalde, I., Bernáldez-Sarabia, J., Moreno-Ulloa, A., Vilanova, C., Juárez, P., Licea-Navarro, A. and Castro-Ceseña, A. B. 2019. Scaffolds based on alginate-PEG methyl ether methacrylate-Moringa oleifera-Aloe vera for wound healing applications. *Carbohydrate Polymers, Elsevier*, 206(3918), pp. 455–467. doi:10.1016/j.carbpol.2018.11.027
- Sakai, S., Sato, K., Tabata, Y. and Kishi, K. 2016. Local release of pioglitazone (a peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist) accelerates proliferation and remodeling phases of wound healing. *Wound Repair and Regeneration, Blackwell Publishing Inc.*, 24(1), pp. 57–64. doi:10.1111/wrr.12376
- Santana, A. A. and Kieckbusch, T. G. 2013. Physical evaluation of biodegradable films of calcium alginate plasticized with polyols. *Brazilian Journal of Chemical Engineering, Associação Brasileira de Engenharia Química*, 30(4), pp. 835–845. doi:10.1590/S0104-66322013000400015
- Schägger, H. and von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), pp. 368–379.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M. and Ragg, T. 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology, BioMed Central*, 7, p. 3. doi:10.1186/1471-2199-7-3

- Sedan, Y., Marcu, O., Lyskov, S. and Schueler-Furman, O. 2016. Peptiderive server: derive peptide inhibitors from protein–protein interactions. *Nucleic Acids Research*, Narnia, 44(W1), pp. W536–W541. doi:10.1093/nar/gkw385
- Shah, M., Foreman, D. M. and Ferguson, M. W. 1995. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring - PubMed. *Journal of Cell Science*, 108(3), pp. 985–1002.
- Simon, N., Sperber, C., Voigtländer, C., Born, J., Gilbert, D. F., Seyferth, S., Lee, G., Kappes, B. and Friedrich, O. 2020. Improved stability of polyclonal antibodies: A case study with lyophilization-conserved antibodies raised against epitopes from the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Elsevier B.V., 142, p. 105086. doi:10.1016/j.ejps.2019.105086
- Singer, A. J., Huang, S. S., Huang, J. S., McClain, S. A., Romanov, A., Rooney, J. and Zimmerman, T. 2009. A Novel TGF-Beta Antagonist Speeds Reepithelialization and Reduces Scarring of Partial Thickness Porcine Burns. *Journal of Burn Care & Research*, 30(2), pp. 329–334. doi:10.1097/BCR.0b013e31819a6369
- Stagnaro, P., Schizzi, I., Utzeri, R., Marsano, E. and Castellano, M. 2018. Alginate-polymethacrylate hybrid hydrogels for potential osteochondral tissue regeneration. *Carbohydrate Polymers*, Elsevier Ltd, 185, pp. 56–62. doi:10.1016/j.carbpol.2018.01.012
- Stevenson, J. P., Kindler, H. L., Papasavvas, E., Sun, J., Jacobs-Small, M., Hull, J., Schwed, D., Ranganathan, A., Newick, K., Heitjan, D. F., Langer, C. J., McPherson, J. M., Montaner, L. J. and Albelda, S. M. 2013. Immunological effects of the TGFβ-blocking antibody GC1008 in malignant pleural mesothelioma patients. *Oncoimmunology*, Taylor & Francis, 2(8), p. e26218. doi:10.4161/onci.26218
- Streltsov, V. A., Varghese, J. N., Carmichael, J. A., Irving, R. A., Hudson, P. J. and Nuttall, S. D. 2004. Structural evidence for evolution of shark Ig new antigen receptor variable domain antibodies from a cell-surface receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(34), pp. 12444–12449. doi:10.1073/pnas.0403509101
- Takagawa, S., Lakos, G., Mori, Y., Yamamoto, T., Nishioka, K. and Varga, J. 2003. Sustained activation of fibroblast transforming growth factor-β/Smad signaling in a murine model of scleroderma. *Journal of Investigative Dermatology*, Blackwell Publishing Inc., 121(1), pp. 41–50. doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12308.x
- Tian, M., Neil, J. R. and Schiemann, W. P. 2011. Transforming growth factor-β and the hallmarks of cancer. *Cellular Signalling*, 23(6), pp. 951–962. doi:10.1016/j.cellsig.2010.10.015
- Villarreal, M. M., Kim, S. K., Barron, L., Kodali, R., Baardsnes, J., Hinck, C. S., Krzysiak, T. C., Henen, M. A., Pakhomova, O., Mendoza, V., O'Connor-McCourt, M. D., Lafer, E. M., López-Casillas, F. and Hinck, A. P. 2016. Binding Properties of the Transforming Growth Factor-β Coreceptor

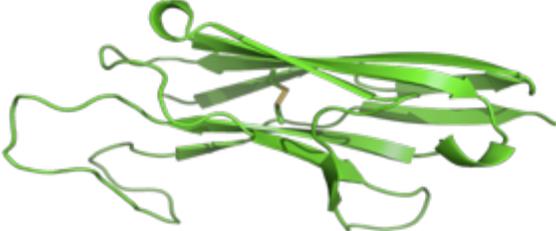
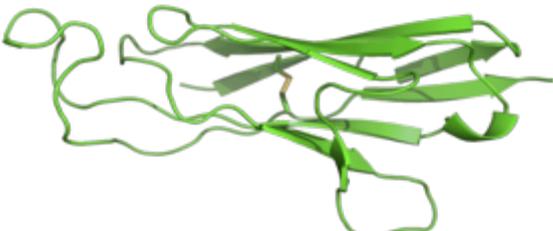
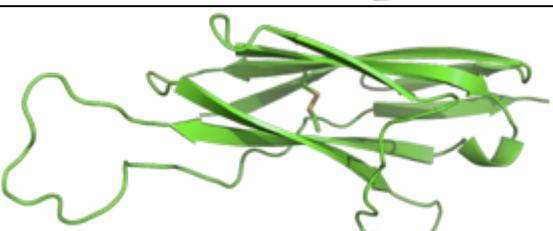
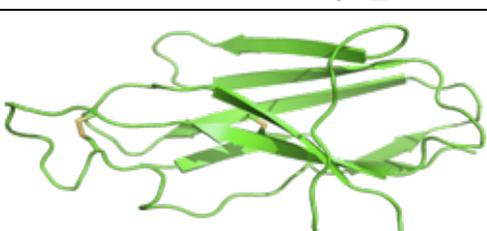
Betaglycan: Proposed Mechanism for Potentiation of Receptor Complex Assembly and Signaling. *Biochemistry*, American Chemical Society, 55(49), pp. 6880–6896. doi:10.1021/acs.biochem.6b00566

- Vincenti, F., Fervenza, F. C., Campbell, K. N., Diaz, M., Gesualdo, L., Nelson, P., Praga, M., Radhakrishnan, J., Sellin, L., Singh, A., Thornley-Brown, D., Veronese, F. V., Accomando, B., Engstrand, S., Ledbetter, S., Lin, J., Neylan, J., Tumlin, J. and Focal Segmental Glomerulosclerosis Study Group, F. S. G. S. 2017. A Phase 2, Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Study of Fresolimumab in Patients With Steroid-Resistant Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Kidney International Reports*, Elsevier, 2(5), pp. 800–810. doi:10.1016/j.ekir.2017.03.011
- Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juarez, K., Urrutia, M., Cauerhff, A., Danquah, W., Rissiek, B., Scheuplein, F., Schwarz, N., Adriouch, S., Boyer, O., Seman, M., Licea, A., Serreze, D. V., Goldbaum, F. A., Haag, F. and Koch-Nolte, F. 2009. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Medical Microbiology and Immunology*, 198(3), pp. 157–174. doi:10.1007/s00430-009-0116-7
- Xia, Z., Ding, L., Zheng, J., Xu, Y., Jin, W., Sheng, X. and Wu, J. 2020. Alginate suppresses liver fibrosis through the inhibition of nuclear factor- κ B signaling. *Drug Design, Development and Therapy*, Dove Medical Press Ltd., 14, pp. 1295–1305. doi:10.2147/DDDT.S233665
- Xie, F., Sun, G., Stiller, J. W. and Zhang, B. 2011. RefFinder. EST Database of Cotton. Consultado August 5, 2018, from <http://150.216.56.64/referencegene.php>
- Yang, L., Chan, T., Demare, J., Iwashina, T., Ghahary, A., Scott, P. G. and Tredget, E. E. 2001. Healing of burn wounds in transgenic mice overexpressing transforming growth factor-beta 1 in the epidermis. *The American Journal of Pathology*, 159(6), pp. 2147–2157. doi:10.1016/S0002-9440(10)63066-0
- Yeom, C. K. and Lee, K. H. 1998. Characterization of sodium alginate membrane crosslinked with glutaraldehyde in pervaporation separation. *Journal of Applied Polymer Science*, John Wiley and Sons Inc., 67(2), pp. 209–219. doi:10.1002/(SICI)1097-4628(19980110)67:2<209::AID-APP3>3.0.CO;2-Y
- Zarschler, K., Wittecy, S., Kapplusch, F., Foerster, C. and Stephan, H. 2013. High-yield production of functional soluble single-domain antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, BioMed Central, 12(1), p. 97. doi:10.1186/1475-2859-12-97
- Zielonka, S. 2015. The shark strikes twice: Generation of Mono- and Bispecific High-Affinity vNAR Antibody Domains via Step-Wise Affinity Maturation. *Technische Universität Darmstadt*, pp. 130 .
- Zomer, H. D. and Trentin, A. G. 2018. Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. *Journal of Dermatological Science*. Elsevier Ireland Ltd, Vol. 90. Issue

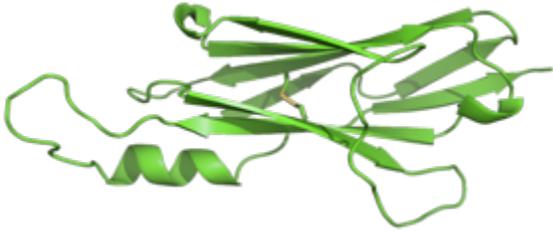
1. pp. 3–12 . doi:10.1016/j.jdermsci.2017.12.009

Anexos

Tabla 5 Resultados del gráfico de Ramachandran de las estructuras tridimensionales de los anticuerpos vNAR, generadas por modelado por homología y refinados por dinámica molecular.

<p style="text-align: center;">TGF-4</p> <p>RRF: 91 86.7% RRAP: 9 8.6% RRGP: 5 4.8% RRP: 0 0.0%</p>	
<p style="text-align: center;">TGF-7</p> <p>RRF: 95 90.5% RRAP: 9 8.6% RRGP: 1 1.0% RRP: 0 0.0%</p>	
<p style="text-align: center;">TGF-10</p> <p>RRF: 95 91.3% RRAP: 9 8.7% RRGP: 0 0.0% RRP: 0 0.0%</p>	
<p style="text-align: center;">TGF-21</p> <p>RRF: 96 92.3% RRAP: 7 6.7% RRGP: 0 0.0% RRP: 1 1.0%</p>	
<p style="text-align: center;">TGF-22</p> <p>RRF: 96 91.4% RRAP: 6 5.7% RRGP: 2 1.9% RRP: 1 1.0%</p>	
<p style="text-align: center;">TGF-5.b</p> <p>RRF: 87 87.0% RRAP: 11 11.0% RRGP: 1 1.0% RRP: 1 1.0%</p>	

T-1		
RRF:	99	96.1%
RRAP:	4	3.9%
RRGP:	0	0.0%
RRP:	0	0.0%



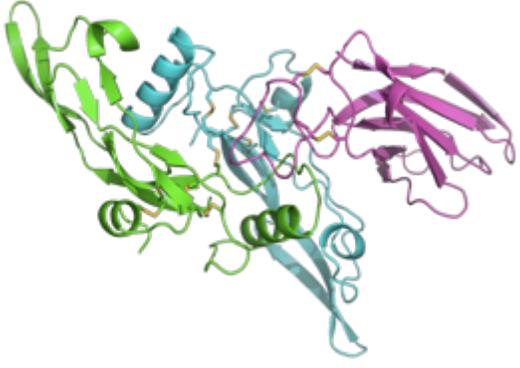
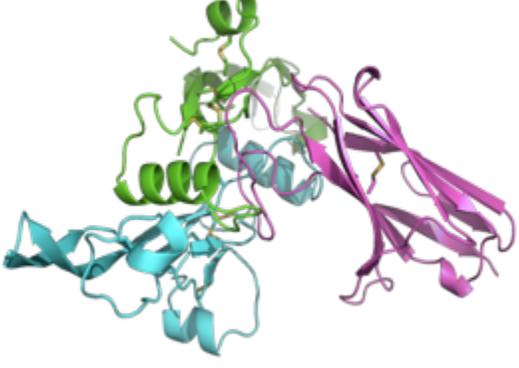
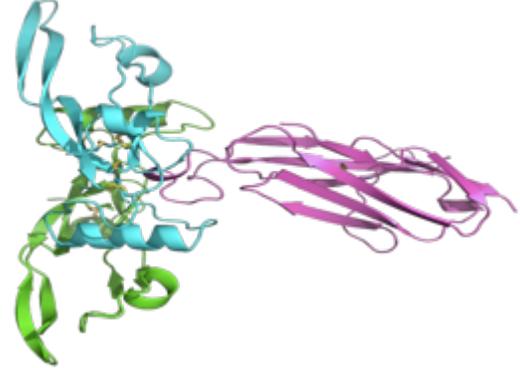
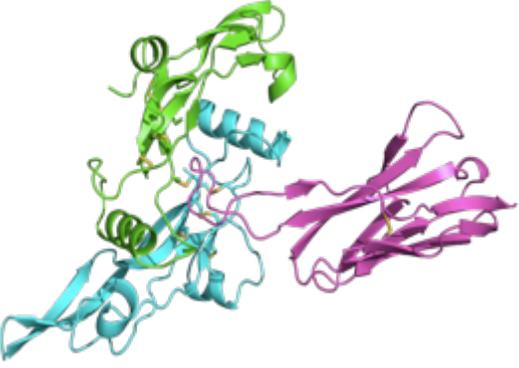
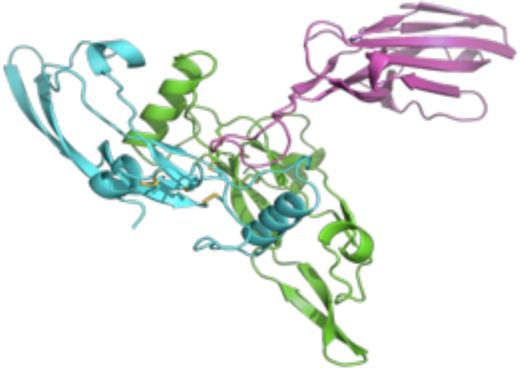
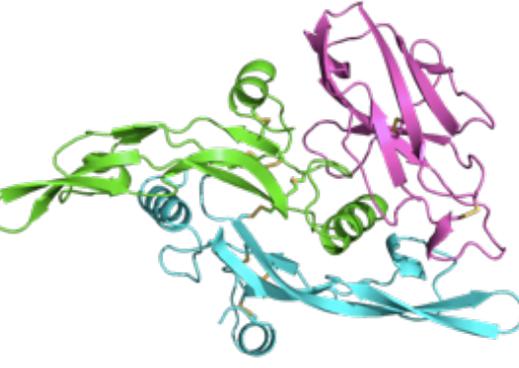
RRF = Residuos en las regiones más favorecidas [A, B, L]

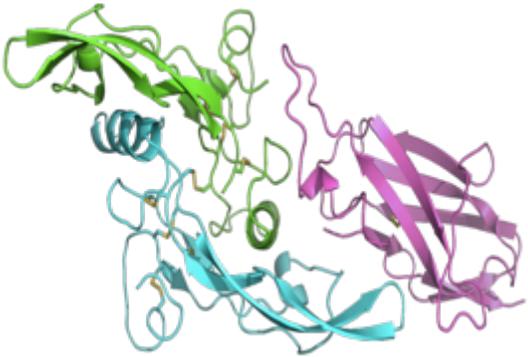
RRAP = Residuos en regiones adicionales permitidas [a, b, l, p]

RRGP = Residuos en regiones generosamente permitidas [~ a, ~ b, ~ l, ~ p]

RRP = Residuos en regiones prohibidas

Tabla 6 Resultados del acoplamiento molecular entre cada uno de los vNAR seleccionados y hTGF- β 1.

 <p style="text-align: center;">TGF-4</p>			 <p style="text-align: center;">TGF-7</p>		
TGF- β _A -15.22 REU	TGF- β _A -20.10 REU	Total -35.32 REU	TGF- β _A -19.27 REU	TGF- β _A -13.71 REU	Total -32.98 REU
 <p style="text-align: center;">TGF-10</p>			 <p style="text-align: center;">TGF-21</p>		
TGF- β _A -12.01 REU	TGF- β _A -15.23 REU	Total -27.24 REU	TGF- β _A -22.33 REU	TGF- β _A -15.93 REU	Total -38.26 REU
 <p style="text-align: center;">TGF-22</p>			 <p style="text-align: center;">TGF-5.b</p>		
TGF- β _A -17.79 REU	TGF- β _A -16.61 REU	Total -34.4 REU	TGF- β _A -21.22 REU	TGF- β _A -8.75 REU	Total -29.97 REU

 <p>T-1</p>					
TGF- β _A -15.60 REU	TGF- β _A -12.04 REU	Total -27.20 REU			