

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

CICESE@ 2023. Todos los derechos reservados

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



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida con orientación en
Biomedicina y Bionanotecnología**

**Desarrollo de un anticuerpo tipo vNAR fluorescente para uso
en microscopía de fluorescencia**

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

Presenta:

Adolfo Romero Favela

Ensenada, Baja California, México
2023

Tesis defendida por
Adolfo Romero Favela

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

Director de tesis

Dra. Ernestina Castro Longoria

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez

Dr. Eugenio Rafael Méndez Méndez



Dra. Ana Denise Re Araujo

Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Pedro Negrete Regagnon

Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Adolfo Romero Favela** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología

Desarrollo de un anticuerpo tipo vNAR fluorescente para uso en microscopía de fluorescencia

Resumen aprobado por:

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Director de tesis

En esta tesis se presenta un estudio para probar el uso de un vNAR de *Heterodontus francisci*, funcionalizado con un fluorocromo en aplicaciones de microscopía de fluorescencia para proteínas del microtúbulo. La microscopía de fluorescencia es una técnica esencial en la investigación biológica. Una de sus limitaciones es la poca variedad de moléculas disponibles para implementarla. Entre las estrategias exploradas se encuentra el uso de anticuerpos (IgG) fluorescentes, lo que permite tener una gran especificidad de detección de proteínas o moléculas. Con el fin de ampliar el repertorio de moléculas disponibles para hacer la técnica de microscopía de fluorescencia, se propuso utilizar un vNAR, que es un fragmento de un anticuerpo de tiburón (IgNAR), de tamaño 10 veces menor que el anticuerpo convencional, pero que conserva la especificidad por los antígenos. Con este planteamiento se espera que al utilizar un vNAR permita estudiar proteínas como las del microtúbulo o proteínas ≤ 50 kDa de igual manera que la IgG normal. Para lograrlo, se realizó el aislamiento de un vNAR (anti- α y β -tubulina) y se funcionalizó con un fluorocromo. La metodología comenzó con una bioselección mediante despliegue en fagos a partir de bibliotecas sintéticas. El protocolo optimizado para la obtención del vNAR comenzó con la inducción de las proteínas con IPTG en un cultivo de bacterias *E. coli* BL21, posteriormente un proceso de extracción de proteínas por choque osmótico o con ultrasonido, seguido de una ronda de purificación del lisado y repurificación de las fracciones por HisTrap FF. La detección del vNAR se realizó con electroforesis SDS-PAGE, Western Blot, ELISA y anticuerpos anti HA-HRP. Los vNARs obtenidos se conjugaron con el fluorocromo 660 C de la línea CF NHS. Posteriormente, se realizó microscopía de fluorescencia en fibroblastos humanos y se tomaron micrografías de las células con los microtúbulos marcados, además, se analizó la imagen con el programa FIJI. Finalmente, se logró aislar el vNAR ATH14, conjugarlo con el fluorocromo y hacer ensayos de microscopía de fluorescencia con un vNAR, sin embargo, no fue posible observar microtúbulos muy definidos.

Palabras clave: microscopía de fluorescencia, vNAR, IgG, tubulina

Abstract of the thesis presented by **Adolfo Romero Favela** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Biomedicine and Biotechnology

Development of a fluorescent vNAR-type antibody for use in fluorescence microscopy

Abstract approved by:

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Thesis Director

In this thesis, a study is presented to test the use of a vNAR from *Heterodontus francisci*, functionalized with a fluorochrome in fluorescence microscopy applications for microtubule proteins. Fluorescence microscopy is an essential technique in biological research. One of its limitations is the few varieties of molecules available to implement it. One of the strategies is the use of fluorescent antibodies (IgG), which allows a high specificity detection of proteins or molecules. In order to expand the repertoire of molecules available for the fluorescence microscopy technique, it was proposed to use a vNAR, which is a fragment of a shark antibody (IgNAR), 10 times smaller in size than the conventional antibody, but which retains specificity for antigens. With this approach, it is expected that when using a vNAR it will allow the study of proteins such as those of the microtubule or proteins ≤ 50 kDa in the same way as normal IgG. To achieve this, a vNAR (anti- α and β -tubulin) was isolated and functionalized with a fluorochrome. The methodology started with a phage display bioselection from synthetic libraries. The optimized protocol for obtaining the vNAR began with the addition of the inducer IPTG to a culture of *E. coli* BL21 bacteria, then the protein extraction process was made by osmotic shock or ultrasound, followed by a round of purification of the lysate and repurification of the vNAR's fractions by HisTrap FF chromatography. The vNAR detection was performed with SDS-PAGE electrophoresis, Western Blot, ELISA and anti-HA-HRP antibodies. The vNARs obtained were conjugated with the fluorochrome 660 C of the CF™ NHS line. Then, fluorescence microscopy was performed on human fibroblasts and micrographs of the cells with the labeled microtubules were taken, in addition, the image was analyzed with the FIJI program. In conclusion, it was possible to isolate the vNAR ATH14, conjugate it with the fluorochrome and perform fluorescence microscopy assays with a vNAR. However, it was not possible to observe well defined microtubules.

Keywords: Fluorescence microscopy, vNAR, IgG, tubulin

Dedicatoria

A mí mismo.

Para no olvidar que puedo con esto y mucho más.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California por el préstamo de sus instalaciones y permitir desarrollarme profesionalmente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo económico durante dos años, mismo que me permitió obtener el grado académico.

Al Dr. Alexei Licea por aceptarme como su estudiante y mostrar interés en el desarrollo de un buen proyecto.

A Galilea, mi hermosa novia por estar siempre a mi lado y ser el pilar emocional en este proceso llamado vida. Además, por ayudarme a revisar mi tesis con mucha paciencia.

A mi familia por la educación y el cariño que me dieron en casa.

A Ale, Daniela, Geo, Isai, Octavio y a todos mis amigos que estuvieron a mi lado el tiempo de la maestría.

Al Dr. Jahaziel y la MC. Monserrat por ser una fuente de consulta y apoyo en el desarrollo de mis experimentos.

Al Dr. Diego Delgado de la Unidad de Microscopía Avanzada del CICESE (UMAC) por su conocimiento y apoyo en la parte de microscopía de fluorescencia. Así mismo, a la Dra. Asunción Lago y al Dr. Pierrick Fournier por brindarme material cuando lo necesité.

Al Mexican Bioimaging Workshops por aceptarme en su taller y permitirme ser miembro de su comunidad.

Al proyecto externo COVID por financiar mis últimos meses de la maestría.

A Patricia Peralta por siempre recibirnos con una sonrisa y estar pendiente de mí y mis compañeros con su pregunta característica: ¿cómo vamos, chicos?

Por último, a mi comité, el Dr. Eugenio, Dra. Rosa y Dra. Ernestina por su aporte educativo en mi formación.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	v
Agradecimientos.....	vi
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas	xi
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	3
1.1.1 Microscopía	3
1.1.2 Microscopía de fluorescencia.....	3
1.1.3 Fragmentos vNAR y su potencial para el reconocimiento de moléculas.....	4
1.1.4 Fragmentos vNAR en el reconocimiento en microtúbulos	5
1.1.5 Microtúbulos y tubulinas	5
1.1.6 Limitantes de la microscopía de fluorescencia con anticuerpos IgG	6
1.1.7 Otras moléculas utilizadas en microscopía de fluorescencia.....	6
1.2 Justificación	7
1.3 Hipótesis.....	7
1.4 Objetivos	7
1.4.1 Objetivo general.....	7
1.4.2 Objetivos específicos.....	8
Capítulo 2. Metodología.....	9
2.1 Preparación de células	9
2.1.1 Células ER2738 y TG1	9
2.1.2 Células BL21	10
2.2 Preparación de fago helper M13K07	10
2.3 Bioselección a partir de biblioteca sintética	11
2.3.1 Reamplificación de bibliotecas no inmunes.....	11
2.3.2 Bioselección de fagos que reconocen α -tubulina (Biopanning).....	12
2.3.3 Búsqueda de clonas con inserto vNAR por PCR de colonia.....	13

2.3.4	Secuenciación.....	13
2.3.5	Extracción y purificación del plásmido por lisis alcalina	14
2.4	Expresión y evaluación vNAR recombinante.....	14
2.4.1	Expresión vNAR recombinante a pequeña escala.....	14
2.4.2	Extracción de vNAR recombinante por ultrasonido.....	15
2.4.3	Extracción periplásmica de vNAR recombinante por choque osmótico.....	16
2.4.4	Evaluación de la expresión del vNAR	16
2.4.5	ELISA de expresión de vNAR 14R3 y 8R4.....	17
2.4.6	ELISA de reconocimiento de α -tubulina y β -tubulina	17
2.4.7	Expresión a gran escala de vNAR recombinante.....	18
2.4.8	Purificación de vNAR por cromatografía de afinidad a metales (IMAC).....	18
2.5	Microscopía de fluorescencia.....	18
2.5.1	Preparación de vNAR fluorescentes.....	18
2.5.2	Microscopía de fluorescencia <i>in vitro</i>	20
Capítulo 3. Resultados		21
3.1	Preparación de células	21
3.2	Fago helper.....	21
3.3	Biopanning α -tubulina.....	21
3.3.1	PCR de colonia para α -tubulina.....	23
3.3.2	Secuenciación de clonas positivas para vNAR anti α -tubulina.....	24
3.3.3	Extracción de plásmidos vNAR anti α -tubulina	25
3.4	Expresión a pequeña escala de vNAR clona 14R3 (ATH14) y 8R4 (ATH08) anti α -tubulina.....	26
3.4.1	Evaluación de expresión a pequeña escala de vNAR ATH14 y ATH08 anti α -tubulina	26
3.5	Expresión a gran escala de vNAR ATH14 anti α -tubulina.....	28
3.6	Purificación de vNAR ATH14 anti α -tubulina	28
3.7	Conjugación de vNAR ATH14 con CF660C SE.....	34
3.8	Microscopía de fluorescencia con vNAR ATH14-CF660C.....	35
Capítulo 4. Discusión.....		38
Capítulo 5. Conclusiones		41
Literatura citada		42
Anexos		46

Lista de figuras

Figura	Página
1. Reacción de conjugación de proteínas y fluorocromos vía amino terminal.....	3
2. Gráfico de títulos de salida por ronda de biopanning de α -tubulina.....	22
3. Detección de plásmidos de colonias de la ronda 3 y 4 del biopanning de α -tubulina corrida en gel de electroforesis 2 %. Las flechas rojas indican las colonias cuyo plásmido se determinó que era funcional para expresar los vNAR ATH08 y ATH14 (arriba y abajo respectivamente).....	23
4. Secuencias de vNAR 14R3 (ATH14) y 8R4 (ATH08) provenientes del biopanning de α -tubulina, ambas clonas pertenecen a la biblioteca sintética VS0 (T1) al no tener cisteínas canónicas en el CDR3. El cuadro rojo señala la región del CDR3 de los vNARs.	24
5. Evaluación de integridad de ADN plasmídico recuperado de las colonias 14R3 y 8R4 provenientes del biopanning de α -tubulina en gel de agarosa 2 %, el fragmento esperado se encuentra aproximadamente en 3 kpb.	25
6. Electroforesis de SDS-PAGE y tinción Coomasie de las diferentes condiciones evaluadas de ATH08. Control positivo proteína CV043 semipurificada.	26
7. Western Blot de las diferentes condiciones a evaluar de ATH08. Control positivo proteína CV043 semipurificada.....	26
8. Western Blot de las diferentes condiciones evaluadas de ATH14. Control positivo proteína CV043 semipurificada.....	27
9. Electroforesis de SDS-PAGE y tinción Coomasie de las diferentes condiciones evaluadas de ATH14. Control positivo proteína CV043 semipurificada.	27
10. ELISA de expresión (izquierda) y ELISA de reconocimiento de α - y β - tubulina (derecha), las mejores condiciones de las pruebas de Coomassie y WB (1mM IPTG, 37 °C y cosecha a 24 h para 14R3 y 0.5 mM IPTG, 37 °C y 6 h para 8R4) se evaluaron por ELISA de expresión y reconocimiento con la proteína total ajustada a 8 mg/mL. ns P > 0.05, * P ≤ 0.05, ** P ≤ 0.01 ***, P ≤ 0.001, **** P ≤ 0.0001.	28

11. Cromatograma del gradiente de elución para la estandarización de purificación de ATH14 a pequeña escala. Línea roja, el porcentaje de imidazol empleado (100 % B= 500 mM); Línea azul, lectura de absorbancia a 280 nm.....29
12. ELISA de expresión del gradiente de elución para la purificación de ATH14.....29
13. Cromatograma del gradiente de elución para la purificación a gran escala de ATH14. Línea roja, el porcentaje de imidazol empleado (100 % B= 500 mM); Línea azul, lectura de absorbancia a 280 nm; Flecha roja, pico aislado que muestra la detección de proteínas en la elución de 150 mM...30
14. Electroforesis de SDS-PAGE y tinción Coomassie de las eluciones con imidazol en la purificación a gran escala de ATH14.....31
15. Western Blot de las eluciones con imidazol en la purificación a gran escala de ATH14.31
16. Cromatograma del gradiente de elución para la repurificación a gran escala de ATH14. Línea roja, el porcentaje de imidazol empleado (100 % B= 500 mM); Línea azul, lectura de absorbancia a 280 nm; Flechas rojas, picos aislados que muestra la detección de proteínas en las eluciones de 150 y 500 mM.31
17. Western Blot de las eluciones con imidazol en la repurificación a gran escala de ATH14. Las flechas rojas indican que la detección de proteínas puras en el la membrana corresponden al vNAR.....33
18. Electroforesis de SDS-PAGE y tinción Coomassie de las eluciones con imidazol en la repurificación a gran escala de ATH14. Flecha roja, muestra la detección de proteínas puras en el gel teñido...33
19. Micrografía de células CCD-1112Sk (Fibroblastos humanos) fijadas en distintas concentraciones de metanol-acetona y teñidas con ATH14-CF660C (1.4 µg/mL), escala de 10 µm.....35
20. Micrografía de células CCD-1112Sk fijadas en distintas concentraciones de metanol-acetona y teñidas con ATH14-CF660C (1.4 µg/mL), amplificación de 600x y posterior amplificación digital (AD) escala de 10 µm.35
21. Micrografía de células CCD-1112Sk teñidas con ATH14-CF660C (1.4 µg/mL) y DAPI (1mg/mL), amplificación de 600x y posterior amplificación digital (AD) escala de 10 µm.36

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Ajuste de concentraciones de las bibliotecas utilizadas para el biopanning de α -tubulina.	11
2. Tratamientos probados para determinar las mejores condiciones de expresión de vNAR 14R3 y 8R4.	15
3. Resultados de títulos de entrada y de salida por ronda de biopanning de α -tubulina.	22
4. Número de colonias seleccionadas para evaluación de PCR de colonia.....	23
5. Resultados de amplificación de PCR de colonia evaluada por electroforesis 2 %.	24
6. Resultados de conjugación de vNAR-Fluorocromo.....	34
7. Datos generales de la composición de la secuencia de aminoácidos de ATH14 y ATH08.....	46

Capítulo 1. Introducción

La microscopía de fluorescencia es una herramienta fundamental en el campo de la biología celular, sus principales aplicaciones se centran en exploración, investigación y diagnóstico. Por sí misma, la microscopía permite la identificación de organelos, estructuras y compartimientos celulares a nivel microscópico (1×10^{-6} m). La microscopía de fluorescencia consigue la identificación selectiva de moléculas fluorescentes (fluorocromos) al utilizar longitudes de onda de luz que existen solamente para los fluorocromos. Para lograr una mayor especificidad de identificación se utiliza la microscopía de fluorescencia por inmunofluorescencia, la cual se basa en el uso de anticuerpos específicos acoplados a compuestos fluorescentes. De esta manera, se aprovecha la especificidad de los anticuerpos para detectar antígenos en las muestras, y discriminar así, todas las moléculas sin inmunomarcaje (Lichtman y Conchello, 2005).

Los anticuerpos (Ac, también llamadas inmunoglobulinas) son glucoproteínas solubles producidas por los linfocitos B del sistema inmune presente en los organismos vertebrados. Su estructura está formada por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, que constituyen un tamaño aproximado de 10 a 15 nm y una masa molecular cercana a 150 kDa (Tonegawa, 1983). La función fisiológica de los anticuerpos es detectar y neutralizar compuestos específicos, por lo que, el anticuerpo se une a un blanco molecular (antígeno). Esta característica de unión permite que se pueda utilizar como molécula selectiva de marcaje, sin embargo, el anticuerpo al no presentar autofluorescencia no puede ser detectado por el microscopio de fluorescencia, por lo que, para construir el anticuerpo funcional de microscopía de fluorescencia se adhieren los fluorocromos al anticuerpo en el extremo carboxilo terminal (-COOH terminal) de las cadenas pesadas (extremo opuesto al dominio de unión de antígeno) (Giepmans et al., 2006; Schauen et al., 2013). Los Ac, al ser proteínas de gran peso molecular y fluorescente (al estar conjugada con un fluorocromo) son ideales para marcar moléculas de igual o mayor peso molecular (Coons et al., 1941). Sin embargo, en blancos de menor peso, la densidad y eficiencia de marcaje se ven afectados principalmente por impedimento espacial (estérico) (Tompson et al., 2010).

De manera similar, las inmunoglobulinas con nuevo receptor de antígeno (IgNAR) son anticuerpos únicos encontrados en los peces cartilaginosos, como en el tiburón cornudo *Heterodontus francisci*. El dominio variable del IgNAR (vNAR) es un fragmento de dominio sencillo (se clasifica dentro de los nanocuerpos), de peso molecular reducido ≈ 12 kDa y tamaño aproximado de 2 nm. Esta molécula presenta una reducción de tamaño de al menos 10 veces respecto al anticuerpo (isotipo IgG) completo y conserva la región de unión al antígeno sin perder la estabilidad (Zielonka et al., 2015). A pesar de su tamaño pequeño, el vNAR

presenta un lazo largo y extendido de entre 10 a 35 aminoácidos en la región determinante de la complementariedad (CDR) 3 (Roux et al., 1998), lo cual le permite acceder a epítomos (región del antígeno que es reconocida) que un anticuerpo común no pueden alcanzar. Además, esta misma reducción de tamaño le confiere la capacidad de unirse a más epítomos sin afectar la unión de un vNAR continuo, de tal manera que supera los problemas de densidad de marcaje y baja unión por impedimento estérico que presentan los anticuerpos IgG. Así mismo, se ha reportado que los CDRs de los nanocuerpos pueden llegar incluso a reconocer epítomos conformacionales y también en forma lineal que generalmente no ocurre con los anticuerpos completos (De Genst et al., 2006).

En microscopía de fluorescencia, la caracterización de los marcadores moleculares constitutivos (marcadores que se encuentran en todas las células) como las proteínas del citoesqueleto han sido ampliamente estudiados con el uso de anticuerpos convencionales (Semenova y Rodionov, 2007). Presente en todas las células, el citoesqueleto está formado por tres estructuras distintas: los microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios (Alberts et al., 2010). En los ensayos de microscopía de fluorescencia se estudia y se utiliza como control a los microtúbulos, los cuales son estructuras tubulares conformadas por dímeros de proteínas globulares de α - y β -tubulina. Debido a que en los microtúbulos ya se conocen los patrones de organización y la distribución a través de los distintos tipos de células y estadios celulares, recientemente se utilizó el microtúbulo y se emplearon nanocuerpos para desarrollar técnicas avanzadas que permiten romper límites en microscopía de fluorescencia, tal cual es el límite de resolución de Abbe (Ries et al., 2012; Torres-García et al., 2022).

Por lo tanto, utilizar un vNAR fluorescente para estudiar moléculas pequeñas (≤ 50 kDa), constitutivas, altamente estudiadas y que además estén formadas de subunidades continuas como los microtúbulos, podría sugerir que los anticuerpos normales (IgG) no son los únicos anticuerpos que pueden ser utilizados en la técnica de microscopía de fluorescencia. Lo cual permitiría expandir el número de moléculas disponibles para realizar ensayos específicos y potencialmente innovadores. Además, las características únicas del vNAR podrían incluso lograr que los ensayos sean más eficientes al reducir los tiempos y presentar una mayor densidad de marcaje.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Microscopía

La técnica de microscopía fue desarrollada en el siglo XVI con el invento del microscopio simple, el interés de la época era observar estructuras de tamaño reducido que hasta ese momento habían sido imposibles de caracterizar, incluso con el uso lupas de aumento. Posterior a la invención del primer microscopio, se buscó ampliar la resolución y calidad de imagen, lo cual lo obtendría Leeuwenhoek (1632-1723), bajo el mismo principio, pero, añadiendo una fuente de luz blanca, con esta modificación se logró mejorar la calidad y contraste de las imágenes (van Zuylen, 1981). Hasta la fecha, se han realizado avances en el campo de la óptica, por lo cual existen distintos tipos de microscopios especializados para detectar e identificar organismos unicelulares a gran detalle (Microscopio de transmisión, de barrido, confocal, electrónico, de rayos X, etc.) (Lanfranconi, 2001). Además, algunos microscopios y técnicas de fluorescencia de superresolución permiten identificar proteínas o moléculas pequeñas (50 kDa) con una alta sensibilidad y especificidad (Lichtman, Conchello, 2005).

1.1.2 Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia es una técnica del campo de la óptica utilizada en áreas de investigación como diagnóstico de enfermedades, caracterización de estadios celulares, identificación de contaminantes, desarrollo de medicamentos, entre otros (Demeule et al., 2007; Strahl y Hamoen, 2010). El método se basa en el uso de un microscopio de epifluorescencia que excita moléculas fluorescentes a cierta longitud de onda y detecta la respuesta en una longitud distinta (Stokes, 1852).

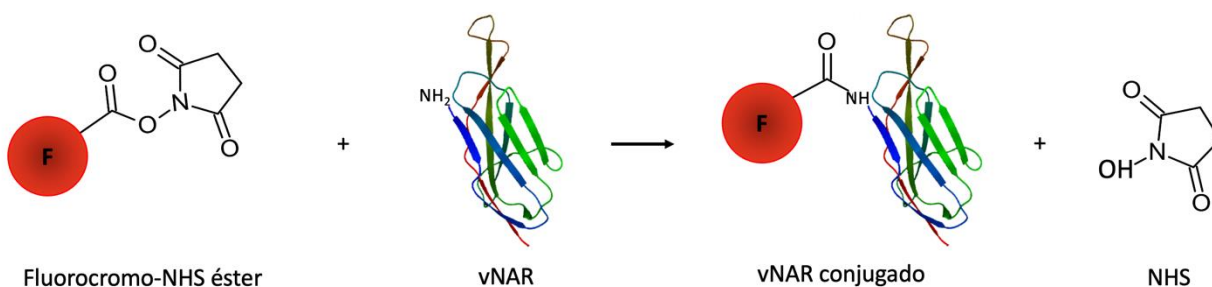


Figura 1 Reacción de conjugación de proteínas y fluorocromos vía amino terminal.

Un aspecto importante en la microscopía de fluorescencia es la resolución de los puntos fluorescentes, en el microscopio de epifluorescencia convencional, la resolución está limitada, principalmente por propiedades físicas de la luz, la intensidad de la luminiscencia del fluorocromo y a la distancia entre ellos (Huang et al., 2009). Aún con esta limitante, la investigación se ha orientado a la búsqueda de moléculas y técnicas que en un futuro puedan superar estos límites (Betzig et al 2006). Recientemente se probó que al utilizar nanocuerpos fluorescentes (VhH acoplados a GFP) y post-procesamiento digital, la resolución de imagen ronda los 30 nm, lo que permitió observar a mayor detalle estructuras más pequeñas (≤ 50 kDa). Por otra parte, al igual que los nanocuerpos, un vNAR unido a un fluorocromo tiene menor tamaño lo cual potencialmente podría ser utilizado de la misma manera que los nanocuerpos, y aún mejor, que los anticuerpos normales al tener el CDR3 extendido (Ries et al., 2012; Lo Mikhaylova et al., 2015).

1.1.3 Fragmentos vNAR y su potencial para el reconocimiento de moléculas

Los peces marinos cartilagosos, como los tiburones, producen anticuerpos distintos a los convencionales. Estos anticuerpos denominados IgNAR, están formados solo por un dímero de cadena pesada, a diferencia de las IgG de mamíferos que también presentan cadenas ligeras (Steven, et al., 2017). Además, los IgNAR cuentan con 5 regiones constantes y una región variable (dominio de vNAR) en cada cadena. La región variable de los IgNAR, a diferencia de los VhH (nanocuerpos de camélidos), presenta solo 2 regiones determinantes de complementariedad (CDR 1 y CDR 3), que son aquellos sitios donde específicamente se lleva a cabo la interacción del anticuerpo con su epítipo (Peralta, 2010).

Para obtener un fragmento tipo vNAR existen dos estrategias principales: (1) la inmunización y posterior recuperación de los IgNAR, y (2) la construcción de bibliotecas ADNc por medio de ingeniería genética. El uso de bibliotecas de ADNc presenta ventajas como la identificación de nuevos vNAR de forma selectiva al utilizar la técnica de despliegue en fagos y producir el vNAR como proteína recombinante. Cabanillas-Bernal y colaboradores (2019), construyeron (por medio de mutagénesis) tres bibliotecas sintéticas con variación en el número de cisteínas en el CDR3, VS0 (0 cys), VS1 (1 cys) y VS2 (2 cys). El número y posición de cisteínas no canónicas en el CDR3 permite clasificar los IgNAR en 5 clases: I, II, III, IIIb, IV y V. VS0, VS1 y VS2 corresponden a bibliotecas de tipo IV II y V. Los vNARs resultantes pesan entre 10 y 15 kDa, consecuencia de su número de aminoácidos. Al igual que las IgG, la estabilidad y afinidad se mantienen, además, debido a su tamaño pequeño pueden difundirse a través de tejidos e internalizarse a la célula más fácilmente (Juárez et al., 2011), lo que permite utilizarlo en casi cualquier compartimento celular. Actualmente, el uso de fragmentos tipo vNAR se ha centrado principalmente en neutralizar moléculas y

desarrollar pruebas de diagnóstico, sin embargo, no se han realizado investigaciones para emplearlo como molécula para realizar microscopía de fluorescencia.

1.1.4 Fragmentos vNAR en el reconocimiento en microtúbulos

Un modelo multiepítopo, para probar los vNARs podrían ser los microtúbulos, que son estructuras cilíndricas compuestas por subunidades diméricas repetidas de proteínas α - y β -tubulinas (Alberts et al., 2010; Cassimeris et al., 1988). Así mismo, se ha logrado observar su dinámica de formación *ex vivo* con la técnica de microscopía de fluorescencia de molécula única (Gell et al., 2010). Adicionalmente, el uso de anticuerpos fluorescentes para detectar proteínas otorga alta especificidad para discriminar entre proteínas normales y proteínas modificadas o aberrantes (ej. alfa tubulina tirosinada) (Warn et al., 1987). Ries y colaboradores (2012) utilizaron un nanocuerpo de camello para detectar proteínas del microtúbulo, como resultado, propusieron que es posible hacer microscopía de fluorescencia al utilizar nanocuerpos unidos a la proteína GFP, además, al emplearlo con técnicas como TIRF (Total internal reflection fluorescence microscopy) y con post-procesamiento digital se logra una súper resolución de microscopía de fluorescencia. Hasta la fecha, la mayoría de los trabajos similares para proponer nuevas moléculas, se han centrado exclusivamente en el uso solamente de nanocuerpos de camello (Schneider et al., 2021).

1.1.5 Microtúbulos y tubulinas

Las proteínas del microtúbulo (tubulinas) se expresan de manera constitutiva en el citoplasma de las células (Nogales et al., 1998) y se encuentran en un estado constante de inestabilidad dinámica, donde aproximadamente el 50 % de los dímeros de tubulinas están dispuestos en forma de microtúbulos y el resto de forma libre. En algunos tejidos y células, las tubulinas representan el 25 % de las proteínas totales y éstas se presentan en arreglos distintos dependiendo el tipo de célula (Howes et al., 2017). En los fibroblastos se disponen de forma radial, desde el centrosoma y polimerizándose hacia la membrana plasmática (Zvorykina et al., 2018). Por otro lado, en el espermatozoide, los microtúbulos están altamente organizados en axonemas, esto debido a que el espermatozoide requiere una alta estabilidad y motilidad en el flagelo (Linck et al., 2016). Así mismo, la distribución espacial en las neuronas forma una estructura alargada, que sobresale de la célula y que permite darle estabilidad y funciona como vía de transporte de moléculas a los axones. Como tal, los microtúbulos se catalogan como proteínas que dan estabilidad a la estructura celular. Así como también, ofrecen vías de distribución de otras proteínas y organelos en las células. En este contexto, los microtúbulos son estructuras fundamentales y, por ende, se encuentran en todas las células.

1.1.6 Limitantes de la microscopía de fluorescencia con anticuerpos IgG

Anteriormente se han utilizado moléculas pequeñas como nanocuerpos para mejorar la calidad de imágenes, y obtener mejores resultados en la técnica de microscopía de fluorescencia (Ries et al., 2012). Aún con la limitante física del límite de resolución (límite de Abbe), algunas técnicas como STED (Stimulated emission depletion), RESOLFT's (Reversible saturable optically linear fluorescence transition), SSIM (Saturated structured-illumination microscopy), NSOM (Near-field scanning optical microscopy), etc., están siendo desarrolladas para sobrepasar el límite de difracción de tal manera que se consigue aumentar la resolución hasta ≈ 30 nm (Betzig et al., 1991). Aun así, estas técnicas solo han sido probadas y están optimizadas para las moléculas convencionales (anticuerpos del tipo IgG de 15 nm de tamaño) y no con moléculas pequeñas (v NAR ≈ 2 nm), esto debido, principalmente, a su limitada producción y divulgación en la investigación. Sin embargo, las nuevas técnicas continúan con un artefacto presente en todas las muestras, el error de unión (o linking error). Este error se centra en que las moléculas marcadas y los fluorocromos en los anticuerpos, están separados por una distancia de ≈ 15 nm. Por lo tanto, en un futuro, y empleando las nuevas técnicas de microscopía, las moléculas más pequeñas tendrán una distancia menor y, por ende, se minimizará el error.

1.1.7 Otras moléculas utilizadas en microscopía de fluorescencia

Además de los anticuerpos IgG y los nanocuerpos VHH, existen otras moléculas que pueden ser empleadas para realizar microscopía de fluorescencia (Beghein y Gettemans, 2017): (1) plásmidos con secuencias de proteínas quiméricas que están acopladas a proteínas que actúan como fluoróforos, un ejemplo son las proteínas acopladas a la proteína verde fluorescente. Estos plásmidos suelen ser utilizados para insertar proteínas fluorescentes y así poder realizar aplicaciones *in vivo*. (2) el marcaje basado en fármacos, por ejemplo sir tubulin, esta molécula surge del acoplamiento de un fluorocromo a un fármaco que se intercala al microtúbulo, muy similar a lo que hace el yoduro de propidio al intercalarse en el ADN. Los fluorocromos basados en fármacos tienen su principal papel en la microscopía de super resolución ya que presenta una gran densidad de marcaje al ser muy pequeño, sin embargo, estos fármacos no se pueden diseñar fácilmente.

Sin embargo, los v NAR al ser pequeños pueden unirse en gran densidad como sir tubulin (el impedimento estérico se disminuye en comparación a los anticuerpos normales), así mismo, pueden ser diseñados prácticamente contra cualquier antígeno, con un proceso sencillo y libre de la manipulación de animales. Además, por sus características, se esperaría que los tratamientos y los tiempos de permeabilización y

difusión sean más eficientes, lo cual disminuye la probabilidad de que el antígeno pueda ser modificado y quede irreconocible para el anticuerpo.

1.2 Justificación

La microscopía de fluorescencia es una técnica utilizada para identificar y caracterizar moléculas y estructuras dentro y fuera de las células, sin embargo, existe poca variedad de moléculas disponibles para realizar la técnica. La falta de desarrollo se debe principalmente a que los anticuerpos convencionales (IgG) son baratos, fáciles de conseguir y utilizar, por lo que opacan la generación de nuevas moléculas y limitan el mejoramiento de la técnica de microscopía. Por lo tanto, se propone estudiar los vNARs (fragmentos de anticuerpo de tiburón *Heterodontus francisci*), ya que son al menos 10 veces más pequeños en comparación a las IgG, y presentan características deseables en microscopía, como termoestabilidad, rápida difusión y penetración en tejidos y células, además de mantener el reconocimiento a diferentes pH y contar con un CDR3 extendido para acceder mejor a ciertos epítomos. El resultado permitiría proponer una nueva molécula que se una al repertorio de moléculas antígeno-específicas para utilizarse en microscopía de fluorescencia. Así mismo, se contribuiría con una nueva aplicación para los vNARs en investigación, además de las aplicaciones ya conocidas en terapias y diagnóstico.

1.3 Hipótesis

Un vNAR funcionalizado permitirá realizar microscopía de fluorescencia más eficiente que los ensayos con anticuerpos convencionales al reducir el tiempo de permeabilización y difusión.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar la eficacia de un vNAR conjugado con un fluorocromo para la inmunodetección de α -y β - tubulina para microscopía de fluorescencia.

1.4.2 Objetivos específicos

- Aislar y caracterizar fragmentos de vNAR de *Heterodontus francisci* dirigidos a la identificación de α - y β -tubulina.
- Evaluar la funcionalidad del vNAR conjugado con el fluorocromo éster NHS CF™.
- Establecer las condiciones óptimas de inmunomarcaje para células de fibroblastos humanos.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Preparación de células

2.1.1 Células ER2738 y TG1

La preparación de las células se realizó siguiendo el protocolo de Barbas y colaboradores (2001) y Chai y colaboradores (2020), con algunas modificaciones. Se comenzó el protocolo con el crecimiento de las células ER2738 y TG1 en una placa de LB (Luria Bertani) + tetraciclina y LB respectivamente. A partir de una colonia aislada se colocaron preinóculos en medio SB (Super Broth) hasta alcanzar una $OD_{600} = 2.2$. Posteriormente se transfirieron las células a matraces de 1 L con 300 mL del mismo medio adicionado con 6 mL de glucosa (20 %) y 3 mL de $MgCl_2$ (1M). Al alcanzar la $OD_{600} = 0.6$ se procedió a transferir los cultivos a 6 tubos de 50 mL para una incubación en hielo durante 30 min. Al término de la incubación se les realizó una centrifugación a 4 °C, 3000 g durante 20 min., donde se reservó el sedimento resultante y el sobrenadante fue descartado. El sedimento se lavó siete veces con glicerol frío al 10 %, entre cada lavado se realizó una centrifugación a las mismas condiciones, en el último lavado se realizó una centrifugación a 4 °C, 2500 g durante 15 min. Por último, los sedimentos se juntaron en un solo tubo y se resuspendieron en un volumen de 1.5 mL, del cual se realizaron alícuotas en volúmenes de 50 y 7 μ L para preservar a -80 °C.

Posteriormente, se evaluaron los títulos de competencia de las células a través de una prueba de electroporación con el plásmido PET22B (1 μ g/mL). Se colocó 1 μ L de plásmido en 50 μ L de células, posteriormente se incubaron durante 1 min. en hielo, al finalizar se transfirieron las células a una cubeta de electroporación (0.2 cm) y se electroporaron en un electroporador (BioRad) en el programa EC2 ($V = 2.5$ kV). Se realizaron 3 lavados de la cubeta con 1 mL de medio SOC (adicionado con glucosa 20 %), los 3 mL de los lavados se recolectaron y se sembraron las células transformadas con volúmenes de 50 μ L directos, 100 y 10 μ L de una dilución de los 3 mL iniciales en 7 mL de medio SB, todo se realizó en placas de LB + carbenicilina. Las placas se incubaron por toda la noche a 37 °C.

El título de competencia se calculó de acuerdo con la fórmula 1 (Barbas et al., 2001).

$$Competencia = \frac{\# \text{ de colonias}}{\text{Volumen de plaqueo } (\mu\text{L})} * \frac{1 \times 10^4 \mu\text{L}}{10 \text{ pg}} * \frac{1 \times 10^6 \text{ pg}}{1 \mu\text{g}} \quad (1)$$

2.1.2 Células BL21

Se preparó un preinóculo de células BL21 en 10 mL de medio LB a partir de una colonia previamente aislada en placa agar LB. El cultivo se incubó durante toda la noche con agitación constante a 5 g y 37 °C. Posteriormente se inocularon 300 mL de medio SB suplementado (6 mL de glucosa 20 % w/v; 1.5 mL de MgCl₂ 2M; 289.5 mL de SB) con 3 mL del preinóculo y se incubó a las mismas condiciones hasta alcanzar una lectura de 0.3 a una longitud de onda de 600 nm (OD₆₀₀ = 0.3). Al finalizar la incubación, se dividió el contenido en tubos de 50 mL estériles, y se realizó una incubación en frío (hielo) durante al menos 15 min y máximo 45 min.

Transcurrido el tiempo, se centrifugó el cultivo a 3000 g por 20 min a 4 °C. Posteriormente el sobrenadante se descartó y se resuspendió el sedimento en 12 mL de CaCl₂ (100 mM) para realizarle tres lavados a las mismas condiciones, este proceso de centrifugación y lavados se repitió por tres veces. Cuando el sedimento quedó limpio (con apariencia blanca y sin residuos de medio LB) se centrifugó una última vez a 3000 g por 10 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el sedimento restante se resuspendió en 2 mL de 85 % CaCl₂ (100 mM) y 15 % de glicerol (100 %). Al finalizar, se realizaron alícuotas de 50 µL y se almacenaron a -80 °C para su posterior uso (Sprotocols, 2014). La medición del título de transformantes se hizo mediante la metodología de choque térmico y se utilizó la fórmula descrita en el apartado 2.1.1.

2.2 Preparación de fago helper M13K07

Siguiendo el protocolo de Barbas y colaboradores (2001) se inocularon 3 alícuotas de 50 µL de ER2738 con 1 µL de fago helper M13K07 disuelto en medio SB y kanamicina (70 µg/mL) en diluciones 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸, se dejaron incubar por 15 min a temperatura ambiente (25 °C), luego se mezclaron con 3 mL de top agar LB para ser vertidos en placa Petri de agar LB y ser incubados toda la noche a 37 °C. El día siguiente se incubó un preinóculo de 10 µL de ER2738 en 10 mL de SB (37 °C, 5 g, durante 1 h), transcurrido el tiempo se transfirieron al preinóculo dos placas líticas formadas de la placa Petri del día anterior, y se incubó 2 h a las mismas condiciones. El preinóculo infectado se transfirió a un matraz de 1 L con 250 mL de SB y kanamicina (70 µg/mL). Se incubó durante toda la noche a las mismas condiciones. Al término de la incubación, se centrifugó el contenido en tubos de 50 mL a 2500 g durante 15 min. Posteriormente se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos y se incubó en baño maría a 70 °C por 20 min, paso siguiente se centrifugó el sobrenadante a las mismas condiciones de la primera centrifugación. Finalmente, el sobrenadante se almacenó a 4 °C para su uso posterior.

Para la determinación del título del fago helper recién preparado se utilizaron diluciones 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} en medio SB, se infectaron 2 mL de ER2738 con cada una de las diluciones (incubación 37 °C, 5 g, 1 h), al finalizar la incubación se mezclaron con 3 mL de top agar, se vertieron en placa de LB y se incubaron toda la noche a 37 °C. Se contaron las placas formadas y se calculó el título de acuerdo con la siguiente relación: 50 placas formadas en la caja Petri de 10^{-8} , corresponden a 5×10^{12} unidades formadoras de colonia por mililitro (ufp/mL).

2.3 Bioselección a partir de biblioteca sintética

El fragmento vNAR anti α -tubulina se obtuvo al utilizar las bibliotecas sintéticas previamente generadas en el laboratorio de inmunología molecular y toxinas del departamento de innovación biomédica del CICESE.

2.3.1 Reamplificación de bibliotecas no inmunes

Para reamplificar las bibliotecas se utilizó la técnica de despliegue en fagos (Barbas et al., 2001), método que consiste en infectar cepas electrocompetentes de *E. coli*. Para la reamplificación se utilizaron las bibliotecas disponibles: VS0, VS1 y VS2 (donde 0, 1 y 2, corresponden al número de cisteínas no canónicas conservadas de la secuencia original).

Tabla 1: Ajuste de concentraciones de las bibliotecas utilizadas para el biopanning de α -tubulina.

Biblioteca	Concentración inicial	Vol añadido (μ L)	Concentracion final
VS0	1.20E+09	110	1.32E+11
VS1	4.00E+09	35	1.40E+11
VS2	3.40E+11	0.5	1.70E+11

Se utilizaron las bacterias de *E. coli* de la cepa ER2738, las cuales tuvieron un título de 2.6×10^8 ufc/mL. Se inocularon 50 mL de medio con 50 μ L ER2738 y se incubó a 37 °C y 10 g durante aproximadamente 2 h hasta alcanzar una $OD_{600}=1$. Posteriormente se realizó la infección con las bibliotecas (tabla 1), y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min para después agregar 10 μ L de carbenicilina (100 mg/mL), se procedió a incubar de nuevo, a 37 °C, 10 g por 1 h. En este punto se cuantificó el título de amplificación de las bibliotecas, para esto, se preparó una dilución de 10^{-4} del cultivo infectado, en medio SB, para plaqurear

1 y 10 μL de las células infectadas en placas de LB + carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Al transcurrir el tiempo del cultivo se aplicaron 15 μL de una segunda dosis de antibiótico, carbenicilina (100 mg/mL), se incubó a las mismas condiciones de la incubación anterior. Al terminar el periodo de incubación se agregaron 8 mL de fago helper (título de 6×10^{11} ufp/mL), una tercera aplicación de carbenicilina (75 μL 100 mg/mL) y 142 mL de medio SB para obtener un volumen final de 200 mL y se incubó a 37 °C, 10 g por 2 h. Para finalizar, se hizo una cuarta aplicación de antibiótico, esta vez con 280 μL de kanamicina (50 mg/mL) y se dejó incubar a 37 °C, 10 g durante toda la noche.

2.3.2 Bioselección de fagos que reconocen α -tubulina (Biopanning)

Posterior al despliegue en fagos, se realizó una bioselección de las clonas que contuvieran el vNAR de interés. El método consistió en inmovilizar el antígeno α -tubulina en una placa de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) con el objetivo de que solo el fago con el vNAR específico se uniera.

Para recuperar los fagos de la amplificación (metodología 2.3.1) se dividió el cultivo en tubos de 50 mL para ser centrifugados a 14000 g, 4 °C, 15 min, posterior a esto, se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos, los cuales se sedimentaron 30 min en frío (hielo) con 10 mL de PEG 8000 (20 %) + 2.5 M de NaCl, posteriormente se centrifugaron a las mismas condiciones. El sobrenadante se descartó y se lavaron los sedimentos resultantes con 2 mL en total de BSA 1 %. Los 2 mL finales se dividieron en 2 microtubos (1 mL cada uno) y fueron centrifugados a 4 °C y máxima velocidad, 14000 g durante 5 min. El sobrenadante resultante se filtró con un filtro de 0.2 μm y se reservó a 4 °C.

Al tener la biblioteca y los fagos filtrados, se procedió a iniciar las rondas de bioselección, para esto se inmovilizaron en una placa de ELISA, dos pozos con 250 ng de α -tubulina cada uno durante 1 h a 37 °C, al terminar la inmovilización se boqueó la placa con 150 μL de BSA 3 %, posteriormente se incubaron 50 μL de los fagos de la reamplificación inicial (y 50 μL de los fagos de las siguientes amplificaciones, ej., ronda 2 utilizar fagos filtrados de ronda 1, ronda 3 utilizar de la ronda 2, etc.) durante 2 h a 37 °C. Transcurrido el tiempo, se realizaron 4 rondas de lavado con TBST (Tris Buffer Saline with Tween 0.5 %) de la siguiente manera: 5 lavados para la ronda 1; 10 para la ronda 2; 15 para la ronda 3 y 20 para la ronda 4. Al terminar los lavados, se agregaron 50 μL de tripsina (10 mg/mL en TBS) y se incubaron por 30 min a 37 °C. Posteriormente se lavaron y transfirieron los fagos a un cultivo de ER2738 para incubarlos durante 15 min y propiciar la infección. Finalmente, se agregaron 6 mL de medio SB y 1.6 μL de carbenicilina (100 mg/mL) y se incubó 1 hora a las mismas condiciones. El título de entrada y salida de las clonas de fago infectivas se realizó mediante conteo de colonias en placas LB + carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Para determinar el título de salida se realizó una dilución 1:100, mientras que para el título de entrada se realizó una dilución 1 en 100 millones.

$$INPUT = \frac{\# \text{ de colonias} * Vol. cultivo (\mu L)}{Vol. plaqueado (\mu L)} * F. D \quad (2)$$

$$OUTPUT = \frac{\# \text{ de colonias} * Vol. cultivo (\mu L)}{Vol. plaqueado (\mu L)} * F. D \quad (3)$$

Donde FD corresponde al factor de dilución empleado.

2.3.3 Búsqueda de clonas con inserto vNAR por PCR de colonia

A partir de la ronda 3 y 4, se seleccionaron aleatoriamente 30 y 50 colonias respectivamente para la búsqueda del fragmento de interés, para esto, se realizó una amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de punto final para cada colonia. El volumen final de reacción fue de 20 μ L y las concentraciones finales: colorless GoTaq Flexi buffer, $MgCl_2$ (3 nM), dNTPs (0.2 nM), una fracción de la colonia (2 μ L de agua de colonia), 0.5 U de TaqPol y oligonucleótidos OmpSeq (F' 5'-AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA G-3') y Gback (R' 5'-GCC CCC TTA TTA GCG TTT GCC ATC-3') en 0.4 μ M. Por último, se completó el volumen de reacción con agua libre de nucleasas. Las condiciones y ciclos de amplificación se realizaron de la siguiente manera: un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C durante 2 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 30 s, posteriormente un ciclo final de extensión a 72 °C por 5 min. Para visualizar los amplicones, se utilizó electroforesis en gel de agarosa al 2 % y GelRED (Cabanillas-Bernal et al., 2019).

2.3.4 Secuenciación

A través de la electroforesis en geles de agarosa se detectaron los amplicones que contuvieran nuestro fragmento de interés, las amplificaciones resultantes se enviaron a secuenciar a SeqXcell con el oligonuclótido Gback, con el fin de establecer fielmente la secuencia de nucleótidos de los posibles vNAR obtenidos de biopanning.

2.3.5 Extracción y purificación del plásmido por lisis alcalina

Posterior a la identificación por PCR y secuenciación, se lisaron las bacterias y se extrajeron los plásmidos. La extracción comenzó al realizar un cultivo de 6 mL en medio SB con carbenicilina (100 µg/mL), al término del cultivo, se siguió la metodología de lisis alcalina por el método de Russell y Sambrook (2001). El medio se centrifugó a 10000 *g* por 5 min a 4 °C para separar las fases de interés en un sedimento, el cual se resuspendió en medio GTE (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM pH 8.0) y RNAsa (4 mg/mL). Posteriormente se agitó en vortex y se agregaron al tubo 150 µL de dodecilsulfato sódico (SDS) 1 % y NaOH 0.2 N, en este paso se agitó suavemente por inversión. Una vez agitado se incubó en hielo por 5 min. Pasado el tiempo de incubación, se agregaron 200 µL de CH₃CO₂K (5 M, pH 4.8) se agregaron para después agitar suavemente por inversión e incubar en hielo por 10 min. Finalizada la reacción, se centrifugó a las mismas condiciones por 15 min. y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, se añadieron 800 µL de etanol 100 % y posteriormente se agitó en vortex, después se incubó a -80 °C por 30 min. El resultado de la reacción se centrifugó a las mismas condiciones de la centrifugación anterior, el sedimento se resuspendió en 1 mL de etanol al 75 %, finalmente se realizó una última ronda de centrifugación a 14000 *g*, 5 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el tubo se dejó abierto para evaporar el alcohol por completo. Finalmente, el sedimento se resuspendió en 150 µL de agua milliQ libre de nucleasas. El ADN resultante purificado se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % y se cuantificó por medio de espectrofotometría a 260 nm de longitud de onda.

2.4 Expresión y evaluación vNAR recombinante

2.4.1 Expresión vNAR recombinante a pequeña escala

Para expresar la proteína recombinante se utilizó *E. coli* (cepa BL21) y se transformaron con los plásmidos 14R3 y 8R4 con concentraciones finales de 0.1 o 0.2 µg/mL. La extracción de las proteínas recombinantes se basó en el protocolo de The QIAexpressionist (QIAGEN, 2003), con algunas modificaciones.

La transformación por choque térmico se realizó en una alícuota de 50 µL de BL21 quimiocompetentes con 10 ng de plásmido purificado (que contiene el vNAR). Para lograr la transformación se colocaron las células en hielo por 5 min y transcurrido el tiempo se colocaron en termoblock a 42 °C durante 1 minuto, posteriormente se regresaron al hielo durante 5 min. extra. Al finalizar se añadió 1 mL de medio SOC y se incubó el cultivo a 37 °C durante 30 min con agitación de 7 *g*, y 30 min sin agitación. Del cultivo resultante

se sembraron 50, 10 y 1 μL en placas de LB + carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubaron toda la noche a 37 $^{\circ}\text{C}$. El número de transformantes se estimó con el uso de la fórmula 1. Mientras que el conteo de las colonias en la placa y la transformación con el plásmido se corroboraron por medio de PCR de colonia con los plásmidos OmpSeq y Gback. Con las clonas positivas se realizaron preinóculos de 10 mL en medio SB con carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 g, durante 14-16 h. Posteriormente se realizó un nuevo cultivo con 495 mL de medio SB y carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), al cual se le agregó el preinóculo en proporción de 1:100 (5 mL). El cultivo se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$, 10 g, durante el tiempo necesario para alcanzar una OD_{600} de 0.6.

Para establecer la mejor condición de expresión de proteína se realizaron diferentes ensayos en los que se probaron 4 concentraciones de inductor IPTG y 2 temperaturas distintas, información resumida en la tabla 2.

Tabla 2: Tratamientos probados para determinar las mejores condiciones de expresión de vNAR 14R3 y 8R4.

Volumen de cultivo	IPTG Concentración final	Temperatura	Agitación
100 mL	1 mM	37 $^{\circ}\text{C}$	7 g
	0.5 mM		
	0.1 mM		
	0 M	30 $^{\circ}\text{C}$	
	1 mM		
	0.5 mM		
	0.1 mM		
	0 M		

A partir de la inducción, a las 3, 6, 12 y 24 h se tomó muestra de 10 mL (en tubos estériles de 50 mL) y se cosecharon las células al centrifugar a 4500 g, 4 $^{\circ}\text{C}$ por 20 min. El sedimento y el sobrenadante se almacenaron por separado a -20 $^{\circ}\text{C}$.

2.4.2 Extracción de vNAR recombinante por ultrasonido

Para la recuperación del vNAR se lisaron las células con ultrasonido. La metodología comenzó con la sedimentación de las bacterias con centrifugación a 4500 g, 4 $^{\circ}\text{C}$ por 20 min, el sedimento posteriormente se resuspendió en 2.5 mL de buffer NPI 20 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 20 mM; NaCl 500 mM; Imidazol 20 mM, pH= 7.4) por cada gramo de sedimento. Posteriormente se empleó ultrasonido a la resuspensión durante 6 min en

ciclos de 30 s encendido, 15 s apagado y 70 % amplitud. El lisado se centrifugó a 14000 *g* por 30 min a 4 °C. El sobrenadante se recolectó en tubos limpios y se centrifugó a las mismas condiciones por 20 min, el sobrenadante de la segunda centrifugación se filtró y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

2.4.3 Extracción periplásmica de vNAR recombinante por choque osmótico

Similar a la metodología del apartado 2.4.2, se evaluó la recuperación del vNAR por extracción periplásmica con buffers de lisis. El sedimento de bacterias se resuspendió en buffer hipertónico (Tris-HCl 30 mM, sacarosa 20 % pH 8.0) en una relación de 5 mL por gramo de sedimento u 8 mL para un sedimento cosechado de 100 mL de cultivo. Posteriormente se adicionó EDTA en una concentración final de 1 mM y se dejó incubar en posición horizontal sobre hielo por 10 min con agitación de 40 rpm en agitador orbital. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 8000 *g*, 20 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y se reservó a 4 °C. Por otra parte, el sedimento se resuspendió en buffer hipotónico (MgSO₄ 5 mM) en la misma proporción del buffer hipertónico y se dejó incubar en hielo con agitación a las mismas condiciones. Posteriormente se centrifugó de la misma manera y el sobrenadante también fue almacenado a 4 °C hasta su uso.

Al recuperar los dos sobrenadantes, se realizó un ELISA de expresión (metodología 2.4.5) para cada sobrenadante (por separado) para determinar por medio de Anova 1 vía en GraphPad Prism 9 si existían diferencias significativas entre los sobrenadantes y posteriormente, purificar.

2.4.4 Evaluación de la expresión del vNAR

Para evaluar los lisados celulares se cuantificó la proteína total recuperada y se ajustó a la concentración de 8 mg/mL. Una vez ajustada se realizó electroforesis SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) a 75 volts y 15 min, posteriormente 150 volts y 45 min, en geles de 4 y 12 %, con 400 µg de proteínas de cada lisado celular. Al finalizar la electroforesis, se realizó la tinción del gel con azul de coomassie R250 para ver la pureza de lisado. El gel se cubrió con la solución de coomassie 0.1 % (en 50 % Metanol, 40 % agua bidestilada y 10 % Ácido Acético) durante 16 h a 25 °C con agitación constante. Posteriormente se eliminó el exceso de azul coomassie y se destiñó el gel con la solución desteñidora de 45 % metanol, 40% agua bidestilada y 15% Ácido Acético. Además, se evaluó un Western Blot (WB) (transferencia de 1 h a 20 V y 200 mA) en membrana de nitrocelulosa Trans-Blot para detectar específicamente los vNAR (Schägger y Von Jagow., 1987). Para la inmunodetección del vNAR se utilizó un anticuerpo anti-HA-HRP High Affinity (Roche) diluido 1:3000 (anticuerpo conjugado con peróxidasa que

reconoce la etiqueta de HA (hemaglutinina) presente en el vNAR) en leche al 1 % y se reveló con DAB. Al finalizar la metodología las fotografías fueron tomadas en un Fotodocumentador Gel Doc XR+ System (Bio Rad).

2.4.5 ELISA de expresión de vNAR 14R3 y 8R4

Paralelo a las pruebas de coomassie y WB, se realizó la técnica semicuantitativa de ELISA de expresión, para ello se inmovilizaron 400 µg de proteína del lisado en placas de ELISA durante 12 h a 4 °C. Posteriormente se bloquearon los espacios restantes con 150 µL de leche al 3 % en PBS durante 1 hora a 37 °C, al transcurrir el tiempo se lavó la placa 3 veces con PBST 0.5 % (PBS-Tween 20 al 0.5 %) y se añadió el anticuerpo anti-HA-HRP High Affinity (Roche) diluido 1:3000 (50 µL). Nuevamente, se incubó la placa durante 1 hora a 37 °C y nuevamente se realizaron cinco lavados a cada pozo con 200 µL de PBST 0.5 %.

Para el revelado de la prueba se utilizaron 50 µL de sustrato para peroxidasa TMB-Blotting Solution (Thermo Scientific) y se incubó la placa durante 15 min a 37 °C. La reacción se detuvo con 50 µL de ácido clorhídrico al 10 % (HCl 10 %). El ensayo fue realizado por triplicado y se utilizó leche al 3 % en PBS como blanco. La placa se leyó a 450 nm en un espectrofotómetro Epoch (BioTek) para placas de ELISA.

2.4.6 ELISA de reconocimiento de α -tubulina y β -tubulina

Después de obtener los fragmentos vNAR separados, se probó el reconocimiento de α -tubulina y β -tubulina por medio de la prueba de ELISA. La técnica consistió en inmovilizar 250 ng de cada proteína (por separado) en placas de ELISA durante 12 h a 4 °C, como blanco se utilizó BSA al 3 %. Posterior a la inmovilización se bloquearon los espacios restantes con 150 µL de leche al 3 % en PBS durante 1 hora a 37 °C, al transcurrir el tiempo se lavó la placa 3 veces con PBST 0.5 %. Cuando la inmovilización y el bloqueo terminaron se agregaron los fragmentos de vNAR (400 µg de proteína total) y se incubó durante 1 h a 37 °C.

Para el revelado de la prueba se utilizó 50 µL de anticuerpo anti-HA-HRP High Affinity (Roche) diluido 1:3000, y se incubó el anticuerpo durante 1 hora a 37 °C. Siguiendo a esto se realizaron cinco lavados a cada pozo con 200 µL de PBST 0.5 % después, se añadieron 50 µL de sustrato para peroxidasa TMB-ELISA 1-Step™ Turbo (Thermo Scientific) y se incubó la placa por última vez durante 15 min a 37 °C, la reacción se detuvo con 10 % de HCl para lograr un cambio en la coloración de la reacción de azul a amarillo. El ensayo fue realizado por triplicado y la placa se leyó a 450 nm en un espectrofotómetro Epoch (BioTek) para placas de ELISA.

2.4.7 Expresión a gran escala de vNAR recombinante

Se utilizó la cepa BL21 de *E. coli* para producir preinóculos. Se cultivó una cepa aislada de bacterias previamente transformadas con el plásmido de vNAR en 20 mL de medio SB con carbenicilina (100 µg/mL) a 37 °C durante 24 h, posteriormente se transfirió el preinóculo a un matraz de 3 L con el mismo medio en un volumen de 980 mL y carbenicilina (100 µg/mL). El medio inoculado se incubó a 37 °C hasta observar una OD₆₀₀ entre 0.6 - 0.8. Para inducir la expresión de proteínas se añadió Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a 1 mM de concentración final, y se incubó el medio por 24 h a 37 °C. Finalmente, el cultivo se fraccionó en volúmenes de 50 mL y se centrifugó a 4000 g durante 15 min, el sobrenadante se guardó a -20 °C y las proteínas se extrajeron de acuerdo con la metodología presentada en el apartado 2.4.1.

2.4.8 Purificación de vNAR por cromatografía de afinidad a metales (IMAC)

El sobrenadante reservado de la sección 2.4.5 se sometió a separación por cromatografía de afinidad. La columna utilizada fue una columna de resina HisTrap HP affinity, afín a la secuencia de histidinas presente en los fragmentos vNAR recombinantes. La cromatografía se realizó de acuerdo con las especificaciones de fábrica de la propia columna con algunas modificaciones, el cargado de la muestra fue realizado de forma manual por gravedad y para la separación se empleó FPLC (Fast protein liquid chromatography). Para contrastar que efectivamente las proteínas se separaron se evaluaron las fracciones mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y Western Blot.

2.5 Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia con el vNAR ATH14 (anti-tubulina) fluorescente se probó en un microscopio confocal (Olympus FV1000) en un modelo de células de fibroblastos humanos CCD-1112Sk de ATCC CRL-2429.

2.5.1 Preparación de vNAR fluorescentes

La preparación de los fragmentos vNAR se basó en el protocolo del proveedor (Sigma-Aldrich, 2011) y en el de Nanda y Lorsch (2014) con algunas modificaciones. El protocolo se divide en dos pasos: etiquetado y cálculo de la eficiencia.

Se dializaron 415 μg de vNAR puro en la solución de etiquetado, misma que consiste en PBS con 0.1 M de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) a $\text{pH}=7$. Posteriormente se añadió 20 μL del reactivo marcador CF™ 660 C (SCJ4600050) en concentración inicial de 10 mM, lo cual es lo recomendado por el proveedor para etiquetar 2 mg de vNAR. La solución se agitó suavemente en la oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente. El marcador no conjugado se eliminó mediante purificación por cromatografía de exclusión molecular en columna Sephadex G-25 con un límite de peso molecular de 5000 Da y buffer de elusión PBS.

Previo al cálculo de la eficiencia de etiquetado, se calculó el coeficiente de extinción molar y másica al 1% (ϵ_{molar} y $\epsilon_{1\%}$, respectivamente) del vNAR ATH14 de forma teórica, con las fórmulas 4 y 5 (adaptadas de la ley de Lambert Beer y de Hill y von Hippel, 1989). Fórmula 4 consiste en multiplicar los coeficientes de extinción molar de los aminoácidos cisteína (Cys), Tirosina (Tyr) y triptófano (Trp) en unidades de $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Y la fórmula 5 se obtiene del resultado de multiplicar ϵ_{molar} por 10 y dividirlo entre el peso molecular de la proteína.

$$\epsilon_{\text{molar}} = n_{\text{Cys}} (120) + n_{\text{Tyr}} (1280) + n_{\text{Trp}} (5690) \quad (4)$$

$$(\epsilon_{1\%}) = \frac{\epsilon_{\text{molar}} * 10}{PM \text{ de la proteína}} \quad (5)$$

Para resolver el cálculo y control de la eficiencia de etiquetado, se midió la absorbancia de las proteínas y de CF™ 660C SE (a 280 y 662 nm) lo que permitió calcular la concentración de proteína etiquetada y el grado de etiquetado (DOL) mediante la fórmula 6 y 7 respectivamente.

$$[\text{Proteína etiquetada}] = \frac{A_{280 \text{ nm}} - (A_{667 \text{ nm}} * CF)}{\epsilon_{\text{molar vNAR}}} * FD \quad (6)$$

Donde A_{280} y A_{667} corresponden a la lectura de absorbancia a 280 nm y 667 nm respectivamente; CF corresponde al factor de corrección (que para CF660C SE es de 0.08); FD corresponde al factor de dilución tras purificar la proteína.

$$DOL = \frac{A_{667\text{ nm}} * PM * FD}{\epsilon_{CF660C} * [vNAR]} \quad (7)$$

Donde PM corresponde al peso molecular (en Da); ϵ corresponde al coeficiente de extinción molar de CF600C SE (valor estándar 200000).

Alternativamente, se evaluó la eficiencia de etiquetado con la fórmula 8, obtenida del manual de etiquetado de Lumiprobe.

$$\frac{Dye}{vNAR} = \frac{A_{667\text{ nm}} * \epsilon_{vNAR}}{(A_{280\text{ nm}} - A_{667\text{ nm}} * CF) \epsilon_{CF660C}} \quad (8)$$

Donde ϵ_{vNAR} corresponde al coeficiente de extinción del vNAR en $M^{-1}cm^{-1}$.

2.5.2 Microscopía de fluorescencia *in vitro*

Los fibroblastos fueron expandidos en placas de cultivo (D100) con medio IMDM (suplementado con 10 % de suero fetal bovino de Biowest S1620-500 y 1 % antibiótico/antimicótico Gibco 15240062) hasta una confluencia de 80 %. Posteriormente se aspiró el medio de cultivo y se lavó la placa 3 veces con PBS, al finalizar el lavado se empleó 1 mL de tripsina (0.105 mM, Thermofisher 25200056) para recuperar las células adheridas a la monocapa. Finalmente se inactivó la tripsina con la adición de medio 4 mL de IMDM y se contaron las células para su posterior uso. Los fibroblastos se fijaron a un portaobjetos, en una proporción de 24000 células por portaobjetos, con soluciones de solventes orgánicos (-20 °C) de metanol 90 % y acetona 10 %, y metanol 50 % y acetona 50 % durante 5 (máx 40) min. Pasado el tiempo se detuvo la fijación al realizar dos lavados con buffer PBS. Al no necesitar permeabilización, las células fijadas con metanol-acetona se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente con buffer de bloqueo (1 % leche en PBS). Posterior al bloqueo se añadió el vNAR ATH14 conjugado con CF™ 660 C NHS (CF 1.4 µg/mL) en leche al 1 % en PBS, posteriormente se dejó reposar durante 60 min a temperatura ambiente o 4 °C durante toda la noche. Al finalizar, se tiñó el núcleo con DAPI (CF 1 µg/mL) y se incubó en la oscuridad durante 10 min, por último, se lavó el portaobjetos 3 veces con buffer PBS por 5 min con agitación leve y se observó al microscopio en campo claro y con fluorescencia a una longitud de onda de 662 y 358 nm con los objetivos de 60x (PlanApo N/A. N. 1.42) y 40x (UPlanFL N/A. N. 1.30). Las imágenes obtenidas del microscopio fueron analizadas con el programa FIJI (Fiji Is Just ImageJ).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Preparación de células

Las células ER2738 y TG1, cepas de *E. coli*, se sometieron a un protocolo de crecimiento y electrocompetencia para posteriormente ser utilizadas en la preparación del fago helper y en el biopanning.

En 3 ocasiones distintas se prepararon células TG1, dichas células mostraron títulos de eficiencia desde 2.17×10^6 hasta 1.24×10^8 ufc/mL, por otra parte, un total de 2 ocasiones se prepararon ER2738, con resultados de electrocompetencia de 1.38×10^7 (14/10/21) y 2.26×10^8 ufc/mL (20/10/21), siendo estas últimas las seleccionadas para el biopanning por su mayor título de eficiencia de infección. Por otra parte, las células BL21 quimiocompetentes alcanzaron títulos de eficiencia de transformación de 2.75×10^6 ufc/mL, rango de eficiencia suficiente para realizar las expresiones.

3.2 Fago helper

El fago helper M13K07 se replicó en células ER2738 (cepa realizada el día 14/10/21) y se midió el título de acuerdo con lo propuesto por Barbas y colaboradores (2001). 50 placas formadas en la caja Petri de la dilución 10^{-8} correspondieron a 5×10^{12} ufp/mL. Un total de 7 placas fueron contadas lo que supone un título de 7×10^{11} ufp/mL. El fago helper resultó en un título lo suficientemente bueno para realizar un biopanning por lo que no fue necesario repetir.

3.3 Biopanning α -tubulina

Previo al biopanning de α -tubulina con ER2738, se probó en cuatro ocasiones la reamplificación de las bibliotecas de vNAR con las células TG1 recién preparadas, para esto, se utilizaron distintas concentraciones de bibliotecas, desde 6×10^{10} hasta 1.7×10^{11} ufc/mL y no fue posible infectar a las células, por lo que se descartaron y se prosiguió a trabajar con las ER2738.

Mediante un screening de biopanning a partir de las bibliotecas sintéticas de concentración 10^{11} , se logró reducir la cantidad de fagos, de tal manera que se filtraron solo aquellos afines a la secuencia del antígeno α -tubulina. Después de la segunda ronda hubo un decremento considerable en la cantidad de fagos disponibles para infectar las células ER2738 (aun cuando el título de entrada era suficientemente elevado, superior a 10^{12} ufc/mL), esto debido a que se aumentaron los lavados de los fagos no afines. Sin embargo, en las rondas subsiguientes se obtuvieron títulos de salida que rondaban las 10^6 colonias infectadas por las bibliotecas, dicho comportamiento descendente-ascendente es el esperado, lo que supone grandes posibilidades de encontrar un vNAR completo y afín al antígeno, pues al aumentar los lavados ya no disminuyeron los títulos (tabla 3 y figura 2).

Tabla 3: Resultados de títulos de entrada y de salida por ronda de biopanning de α -tubulina.

Etapa	Input	Output
	Títulos (ufc/mL)	
Reamplificación	4.42E+11	3.78E+10
Ronda 1	1.05E+13	2.52E+06
Ronda 2	Incontable	4.27E+05
Ronda 3	3.95E+12	7.25E+05
Ronda 4	Incontable	2.10E+06

Títulos de salida de panning α -tub humana

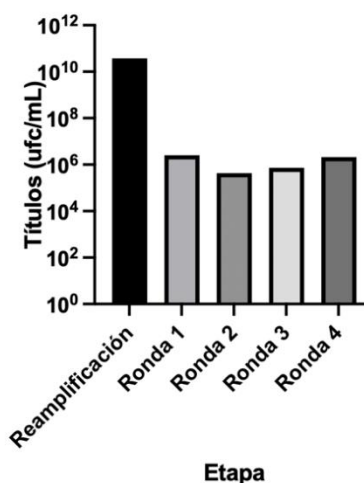


Figura 2: Gráfico de títulos de salida por ronda de biopanning de α -tubulina.

3.3.1 PCR de colonia para α -tubulina

Al finalizar las rondas del biopanning se obtuvieron 400 colonias candidatas para realizar PCR de colonia. Del total, se seleccionaron al azar 30 colonias de la ronda 3 y 50 colonias de la ronda 4 (tabla 4).

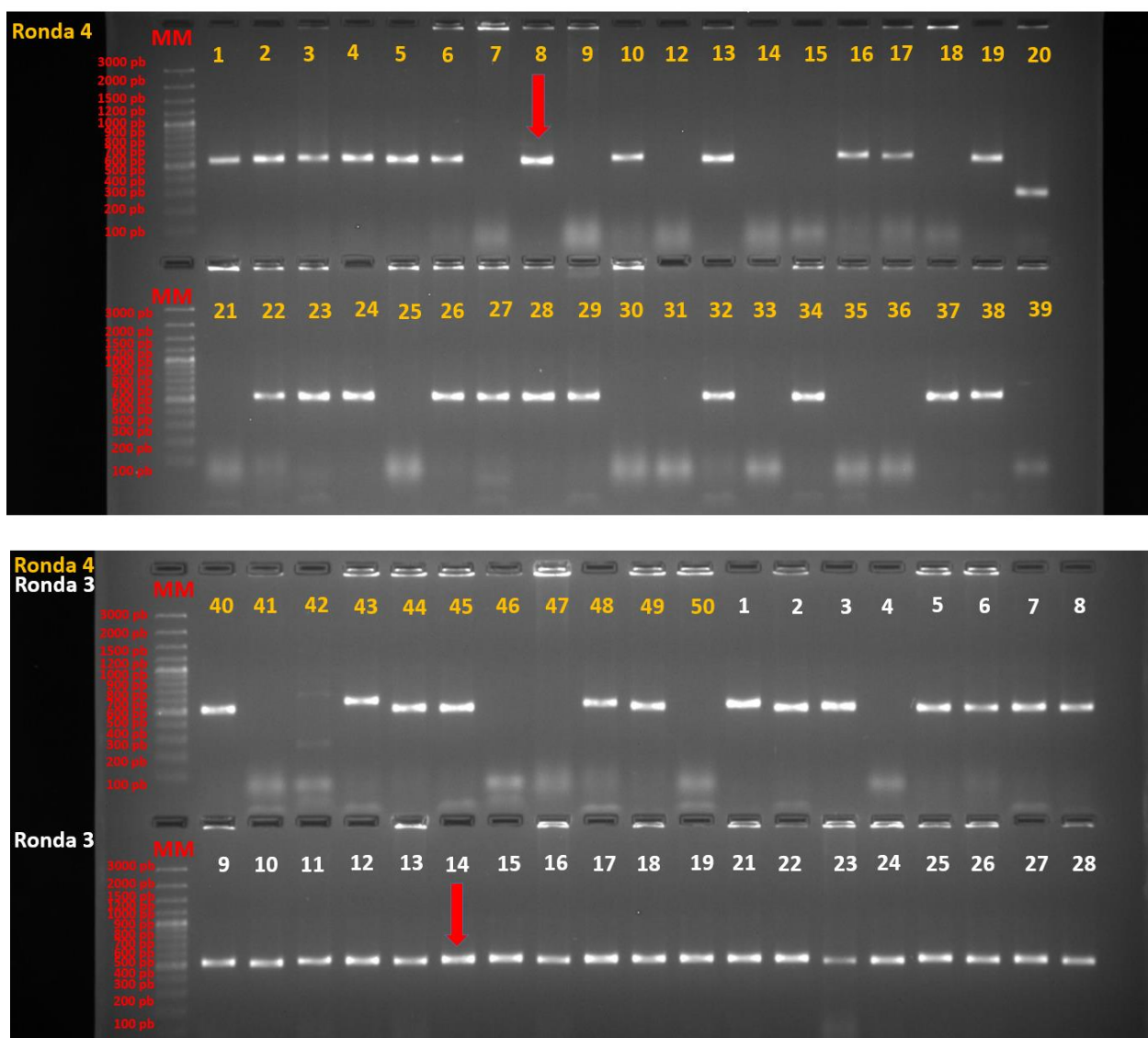


Figura 3: Detección de plásmidos de colonias de la ronda 3 y 4 del biopanning de α -tubulina corrida en gel de electroforesis 2 %. Las flechas rojas indican las colonias cuyo plásmido se determinó que era funcional para expresar los vNAR ATH08 y ATH14 (arriba y abajo respectivamente).

Tabla 4: Número de colonias seleccionadas para evaluación de PCR de colonia.

Etapa	Colonias totales	Colonias seleccionadas
Ronda 3	110	30
Ronda 4	290	50
Total	400	80

Como se muestra en la figura 3, se obtuvieron solamente 2 amplicones de la ronda 4 que rondaban un tamaño entre 600 y 700 pb. Sin embargo, aproximadamente el 94 % restante de las muestras tuvieron un fragmento más pequeño (≈ 600 pb) proveniente del plásmido (tabla 5), ya que los primers OmpSeq y Gback son específicos para pComb3X, plásmido en el cual se encontraban las secuencias de los propios vNAR. Marcado con flechar rojas se muestran los candidatos 8 de la Ronda 4 (ATH08) y 14 de la Ronda 3 (ATH14) que posteriormente se dilucidó que eran los únicos vNAR funcionales.

Tabla 5: Resultados de amplificación de PCR de colonia evaluada por electroforesis 2 %.

Ronda 4		Ronda 3	
50 colonias totales	32 amplificaron	30 colonias totales	28 amplificaron
200 a 300 pb	1 amplicon	200 a 300 pb	0 amplicones
500 a 600 pb	28 amplicones	500 a 600 pb	28 amplicones
600 a 700 pb	2 amplicones	600 a 700 pb	0 amplicones

3.3.2 Secuenciación de clonas positivas para vNAR anti α -tubulina

De las 60 clonas enviadas a secuenciar, solamente 2 fueron distintas y viables para la expresión del vNAR anti α -tubulina (plásmidos que no tuvieran la secuencia original de las bibliotecas o que presentasen codones de parada en el CDR3), la 14R3 (ATH14) y la 8R4 (ATH08). Ambas clonas pertenecen a la biblioteca VS0 pues no presentan las cisteínas no canónicas en el CDR3 y es con la que comparten mayor identidad.

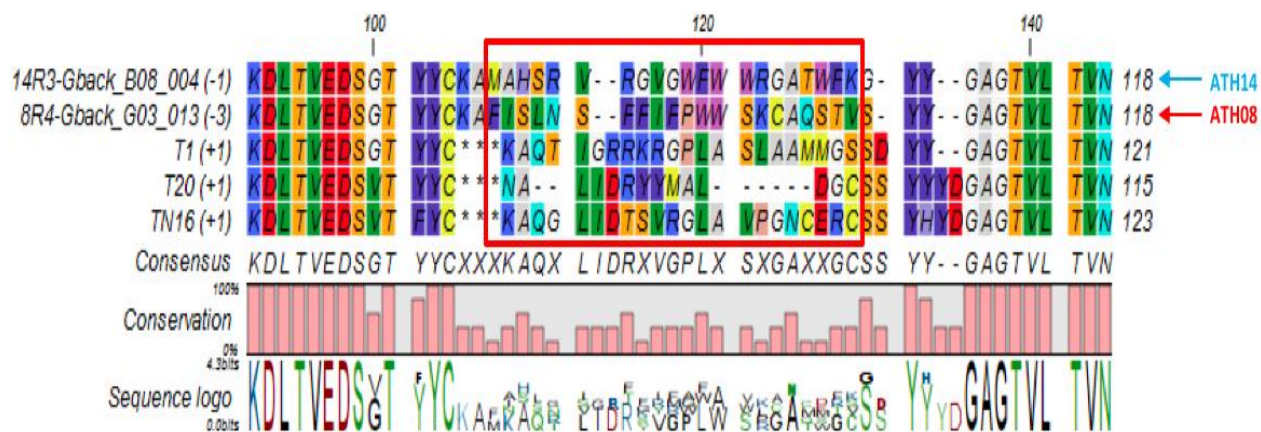


Figura 4: Secuencias de vNAR 14R3 (ATH14) y 8R4 (ATH08) provenientes del biopanning de α -tubulina, ambas clonas pertenecen a la biblioteca sintética VS0 (T1) al no tener cisteínas canónicas en el CDR3. El cuadro rojo señala la región del CDR3 de los vNARs.

Al eliminar las etiquetas de histidina y anti-HA, el vNAR ATH14 tendría 124 aminoácidos con un peso de 13.766 kDa y un radio hidrodinámico aproximado a 2.09 nm. Por otra parte, el vNAR ATH08 estaría compuesto por 124 aminoácidos con un peso de 13.683 kDa y un radio hidrodinámico esperado de 2.08 nm. La secuencia completa e información de los aminoácidos de los vNAR se muestra en los anexos A y B.

3.3.3 Extracción de plásmidos vNAR anti α -tubulina

Los plásmidos obtenidos de la extracción de ambas clonas, se cuantificaron en nanodrop LITE (ThermoFisher Scientific), y se encontraron concentraciones de 2444 y 2560.9 ng/ μ L para ATH14 y ATH08 respectivamente. Al finalizar la extracción, la integridad de los plásmidos pudo observarse por medio de electroforesis, la cual se muestra en la figura 5. En ambas extracciones se puede apreciar bandas de ADN de tamaño aproximado a 3 kpb, lo que corresponde con el tamaño esperado del plásmido pComb3X donde se encuentra la secuencia de los vNAR. Se considera que el ADN plasmídico se encuentra íntegro al no encontrar ADN de menor tamaño que pudiese indicar que el plásmido no este completo.

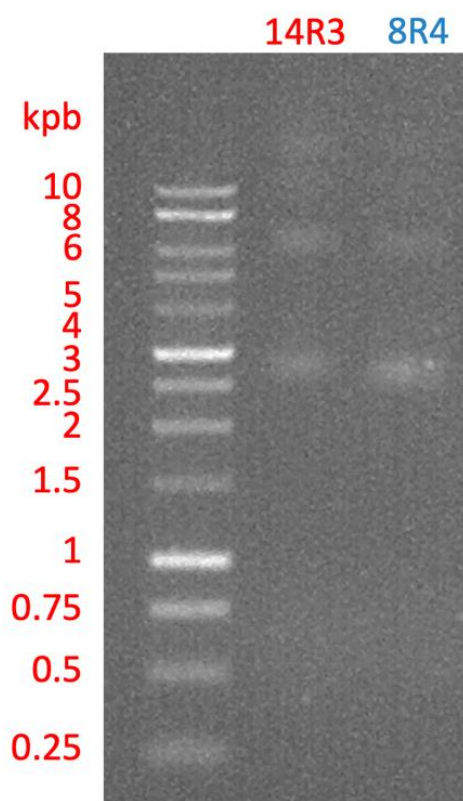


Figura 5: Evaluación de integridad de ADN plasmídico recuperado de las colonias 14R3 y 8R4 provenientes del biopanning de α -tubulina en gel de agarosa 2 %, el fragmento esperado se encuentra aproximadamente en 3 kpb.

3.4 Expresión a pequeña escala de vNAR clona 14R3 (ATH14) y 8R4 (ATH08) anti α -tubulina

3.4.1 Evaluación de expresión a pequeña escala de vNAR ATH14 y ATH08 anti α -tubulina

Posteriormente a la extracción de las proteínas de BL21 se cuantificó la proteína total y se ajustó la concentración de todas las condiciones a un estándar de 8 mg/mL para comparar la diferencia de expresión entre tratamientos. Por medio de la tinción Coomassie (figuras 6 y 8) no es posible distinguir cual de todas las bandas corresponde a los vNARs, sin embargo, las bandas se observan homogéneas entre tratamientos por lo que durante la inmunodetección si se esperaba apreciar diferencias (figura 7 y 9).

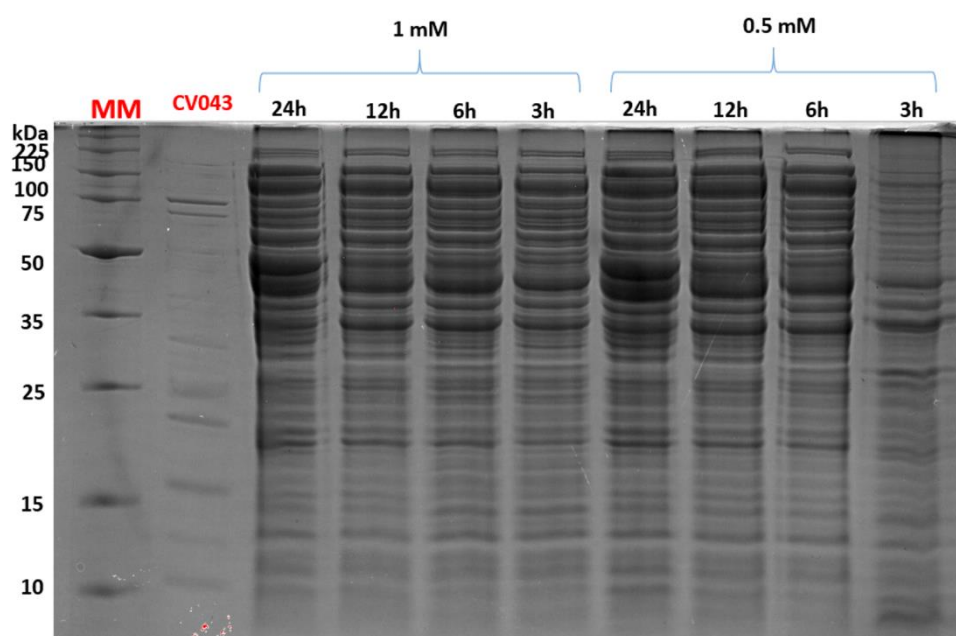


Figura 6: Electroforesis de SDS-PAGE y tinción Coomassie de las diferentes condiciones evaluadas de ATH08. Control positivo proteína CV043 semipurificada.

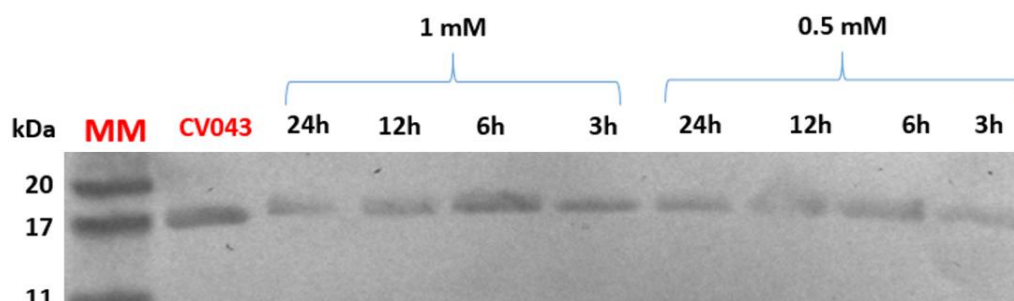


Figura 7: Western Blot de las diferentes condiciones a evaluar de ATH08. Control positivo proteína CV043 semipurificada.

Del total de condiciones evaluadas por WB, todos los tiempos de las concentraciones 1 y 0.5 mM de inductor IPTG e incubación a 37 °C presentaron suficiente proteína para ser detectada en la clona ATH08 (figura 7). Por su parte, solamente el carril de 1 mM de inductor IPTG e incubación de 24 h a 37 °C presentó suficiente proteína para ser detectada en la clona ATH14 (figura 9).

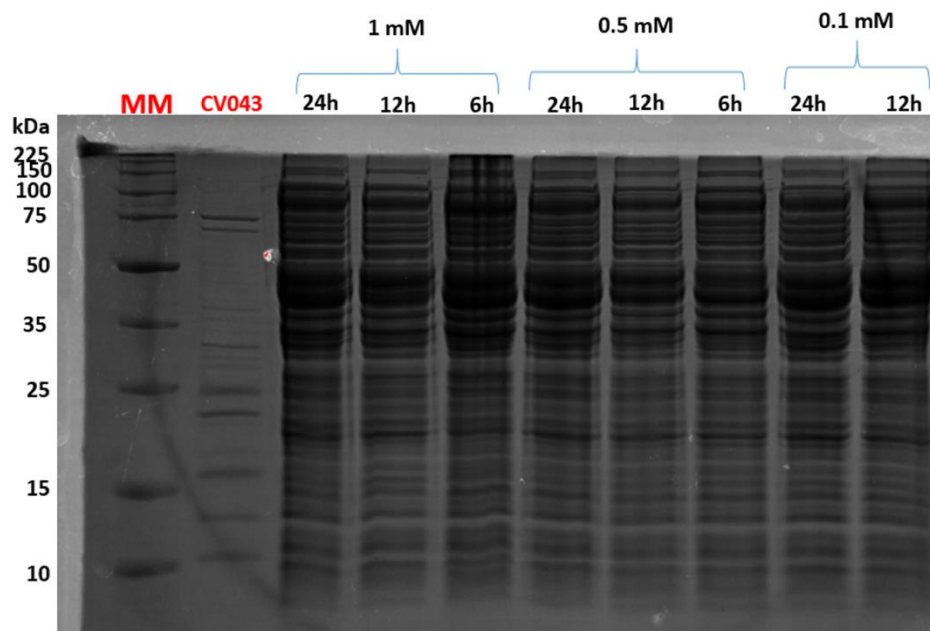


Figura 9: Electroforesis de SDS-PAGE y tinción Coomassie de las diferentes condiciones evaluadas de ATH14. Control positivo proteína CV043 semipurificada.

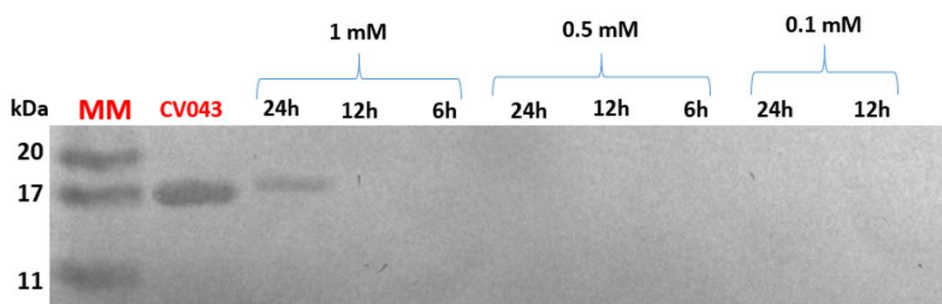


Figura 8: Western Blot de las diferentes condiciones evaluadas de ATH14. Control positivo proteína CV043 semipurificada.

Posterior a los gels y WB se realizaron pruebas de ELISA de expresión y de reconocimiento (figura 10), para observar semicuantitativamente cuanta cantidad de proteína vNAR estaba presente y también la

capacidad que tienen los vNAR de reconocer el antígeno al cual se están enfrentando (proteínas del microtúbulo α - y β -tubulina).

La clona con mayores niveles de expresión fue la clona 14R3 (ATH14), misma que tiene también un mayor nivel de reconocimiento por las proteínas de los microtúbulos, si bien no existen diferencias significativas entre los resultados de las pruebas ELISA se decidió que se utilizaría la clona que mayor reconocimiento presentara.

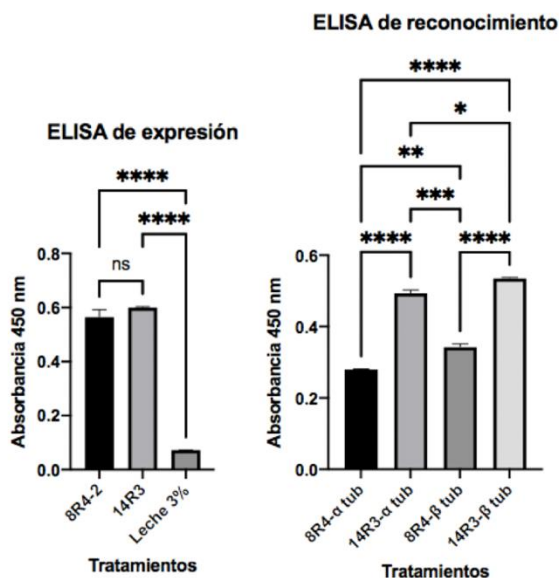


Figura 10: ELISA de expresión (izquierda) y ELISA de reconocimiento de α - y β - tubulina (derecha), las mejores condiciones de las pruebas de Coomassie y WB (1mM IPTG, 37 °C y cosecha a 24 h para 14R3 y 0.5 mM IPTG, 37 °C y 6 h para 8R4) se evaluaron por ELISA de expresión y reconocimiento con la proteína total ajustada a 8 mg/mL. ns $P > 0.05$, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ ***, $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$.

3.5 Expresión a gran escala de vNAR ATH14 anti α -tubulina

Al determinar las mejores condiciones de expresión y reconocimiento se decidió proseguir con la clona ATH14 para expresar a gran escala y producir grandes volúmenes de vNAR. Al escalar el cultivo se pudo obtener un rendimiento de 901.63 mg de proteína total extraída por cada litro de cultivo.

3.6 Purificación de vNAR ATH14 anti α -tubulina

Para purificar las proteínas a pequeña escala (10 mL de lisado de células con vNAR ATH14) se estableció un gradiente elución con imidazol (de 40 a 500 mM), la cual es una molécula análoga y precursora del aminoácido histidina. El gradiente mostrado en la figura 11 sirvió como base para las purificaciones posteriores (figura 13 y 16).

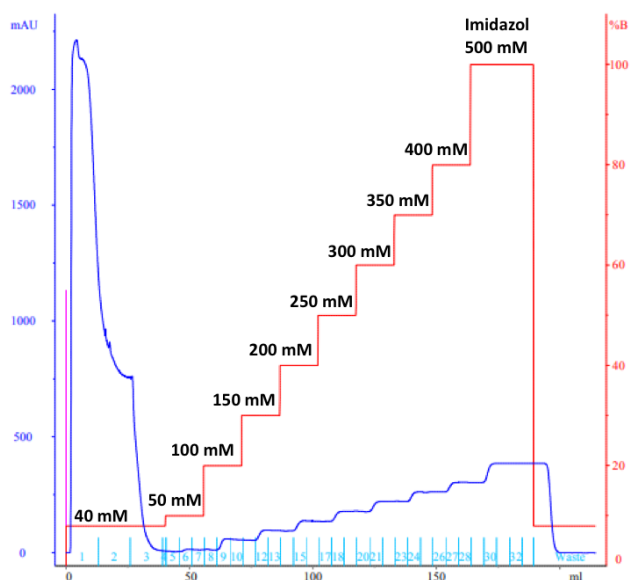
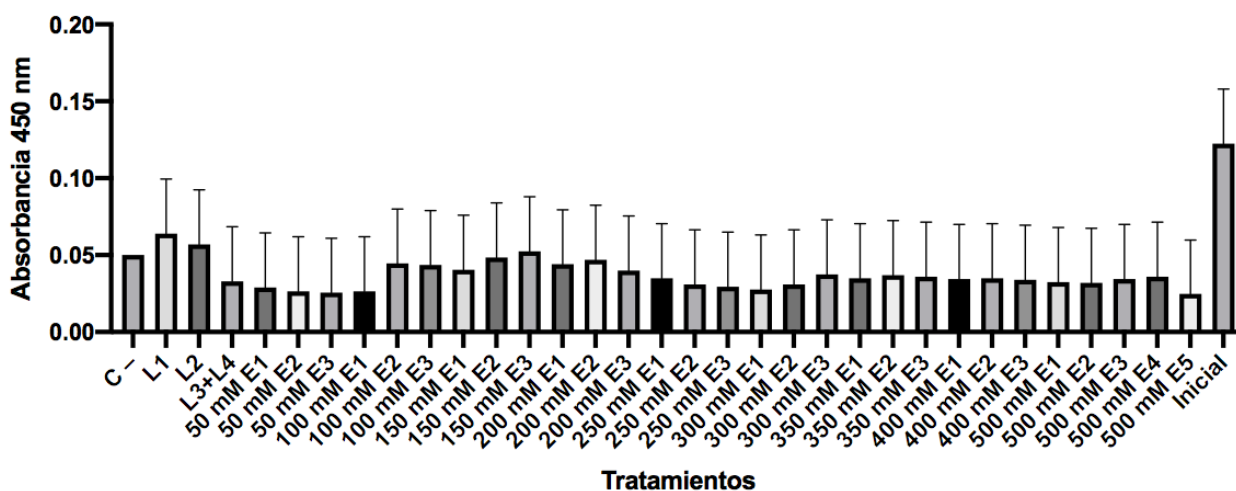


Figura 11: Cromatograma del gradiente de elución para la estandarización de purificación de ATH14 a pequeña escala. Línea roja, el porcentaje de imidazol empleado (100 % B= 500 mM); Línea azul, lectura de absorbancia a 280 nm.

Figura 12: ELISA de expresión del gradiente de elución para la purificación de ATH14.

Purificación gradiente His-Trap ATH14



Ninguno de los tratamientos representó diferencias significativas (figura 12), sin embargo, la mayor lectura estuvo presente en las eluciones de 150 mM de imidazol, por lo cual estableció esa concentración como la concentración estándar para las purificaciones subsecuentes a gran escala (3L de cultivo).

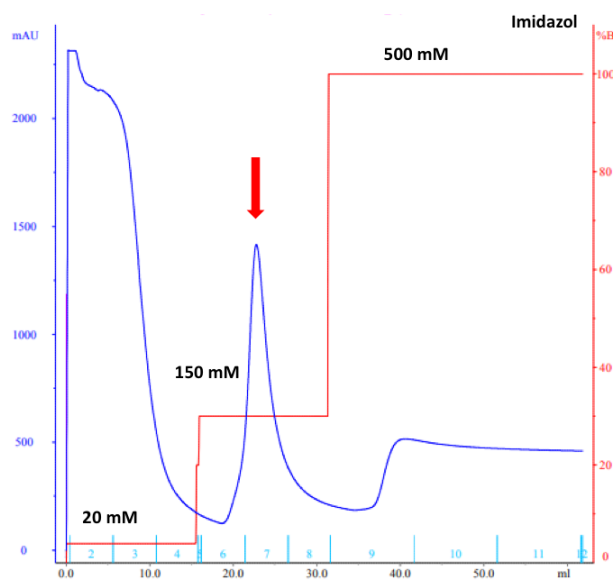


Figura 13: Cromatograma del gradiente de elución para la purificación a gran escala de ATH14. Línea roja, el porcentaje de imidazol empleado (100 % B= 500 mM); Línea azul, lectura de absorbancia a 280 nm; Flecha roja, pico aislado que muestra la detección de proteínas en la elución de 150 mM.

Se sospechó que el pico de proteínas detectado en la fracción dos de la elución a 150 mM podría ser la proteína del vNAR ATH14, por lo que en las pruebas subsecuentes (figuras 14 y 15) se analizó la pureza de las fracciones por coomassie y se detectó específicamente la presencia del vNAR con ayuda de Western Blot y el anticuerpo primario anti-HA-HRP.

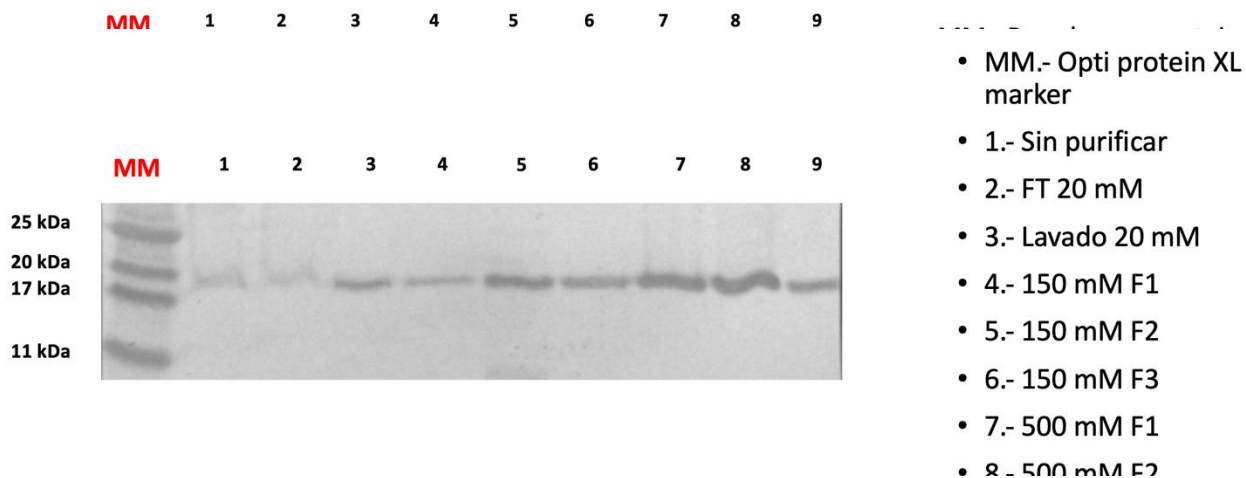
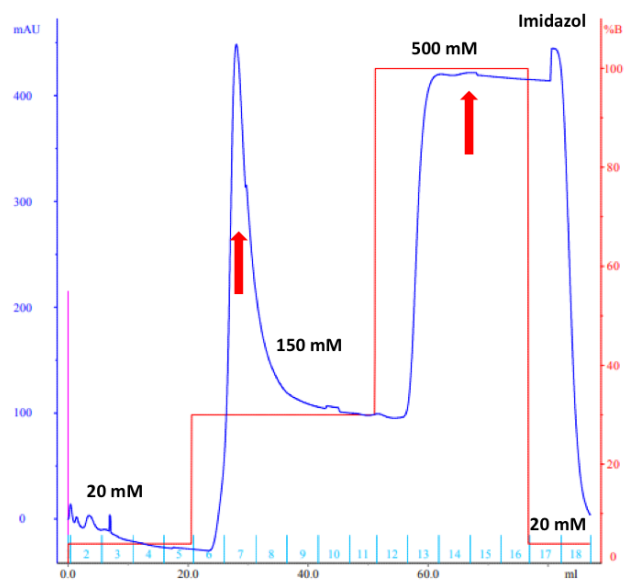


Figura 14: Electroforesis de SDS-PAGE y tinción Coomassie de las eluciones con imidazol en la purificación a gran escala de ATH14.

Figura 15: Western Blot de las eluciones con imidazol en la purificación a gran escala de ATH14.

Se determinó que ninguna de las fracciones estaba 100 % pura (figura 14), sin embargo, si se eliminaron proteínas inespecíficas en los lavados y, además, la proteína fue detectada en todas las fracciones, por lo que se procedió a realizar una repurificación de las eluciones de 150 mM y 500 mM por el mismo método de HisTrap.

Figura 16: Cromatograma del gradiente de elución para la repurificación a gran escala de ATH14. Línea roja, el porcentaje de imidazol empleado (100 % B= 500 mM); Línea azul, lectura de absorbancia a 280 nm; Flechas rojas, picos aislados que muestra la detección de proteínas en las eluciones de 150 y 500 mM.



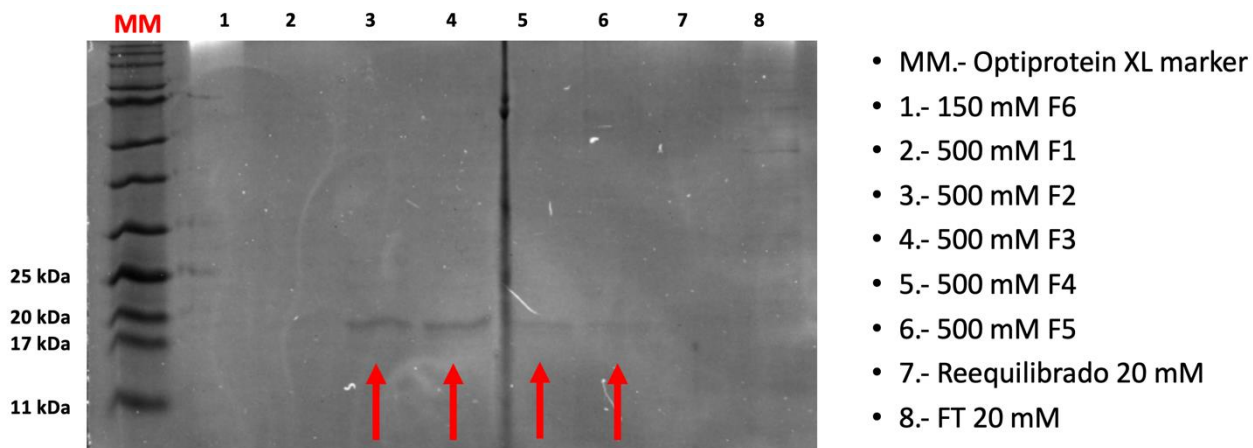


Figura 18 Electroforesis de SDS-PAGE y tinción Coomassie de las eluciones con imidazol en la repurificación a gran escala de ATH14. Flecha roja, muestra la detección de proteínas puras en el gel teñido.

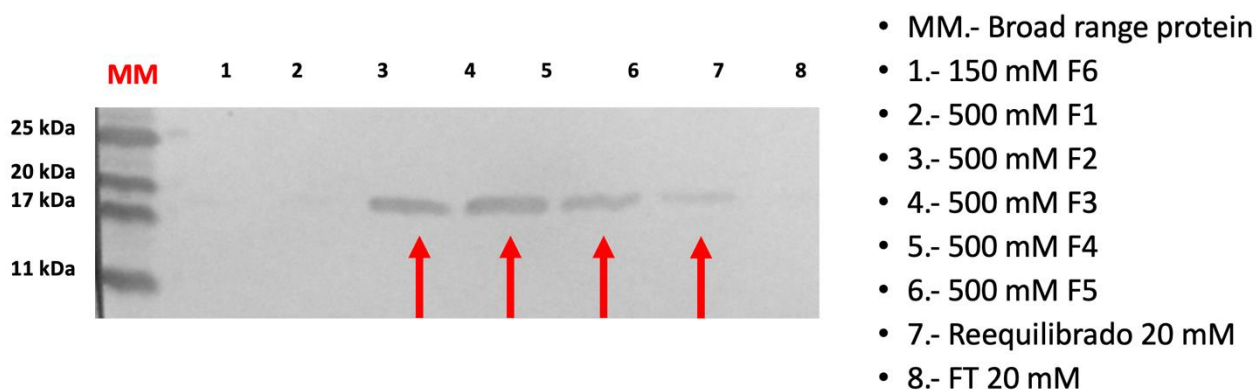


Figura 17: Western Blot de las eluciones con imidazol en la repurificación a gran escala de ATH14. Las flechas rojas indican que la detección de proteínas puras en el la membrana corresponden al vNAR.

Con el método de purificación y posterior repurificación (figuras 13 y 16) a las mismas condiciones de elución de 150 y 500 mM de imidazol, se logró estandarizar la purificación de ATH14. Como se observa en la figura 17, las fracciones F2-F5 (de 500 mM) fueron consideradas como proteínas vNAR lo suficientemente puras para realizar la conjugación. A las fracciones dializadas se les determinó la concentración de la proteína al medir la absorbancia a 280 nm; el promedio de las lecturas dio como resultado una concentración de 0.1796 mg/mL de vNAR. Del total de fracciones se recuperaron 19 mL de proteínas por lo que se obtuvo una cantidad de 3.4124 mg de vNAR y como esto fue recuperado de 1 L de cultivo, el rendimiento de producción y purificación se estableció como 3.4124 mg de vNAR/L de cultivo.

3.7 Conjugación de vNAR ATH14 con CF660C SE.

Posterior a la conjugación del vNAR ATH14 con el fluorocromo CF660C SE, se realizó una purificación del producto conjugado mediante exclusión molecular. El producto de la reacción se recuperó en 4 fracciones distintas denominadas E1-E4 (cada elución recuperada con un volumen de 3 mL). Los resultados de las mediciones a 280 nm (detección de aminoácidos aromáticos de la proteína) y a 667 nm (detección del fluorocromo) se muestran resumidos en la tabla 6.

La relación fluorocromo/vNAR resultó en 1 molécula fluorescente por cada molécula de vNAR, probablemente la conjugación se logró realizar con éxito en el amino terminal de la proteína.

Tabla 6: Resultados de conjugación de vNAR-Fluorocromo.

Resultados de lecturas y datos para cálculo de conjugación ATH14-CF660C SE				
	ATH14 E1	ATH14 E2	ATH14 E3	ATH14 E4
A280	0.615	0.189	0.108	0.412
[vNAR total] (µg/mL)	211	188	58.6	152
Amax (667)	1.966	0.709	0.552	0.016
CF	0.08	0.08	0.08	0.08
ε molar 1 % vNAR	2.9	2.9	2.9	2.9
FD	1.4	1.4	1.4	1.4
MW (Da)	17780	17780	17780	17780
ε molar dye CF660C	200000	200000	200000	200000
ε vNAR	50310	50310	50310	50310
Resultados con fórmula de manual CF660C SE				
Conjugado	0.221	0.064	0.031	0.198
% de conjugado	22.09 %	6.3 %	3.06 %	19.84 %
Relación CF660C/vNAR	1.107	1.385	2.244	0.010
Resultados con fórmula de manual Lumiprobe				
Relación CF660C/vNAR	1.080	1.352	2.190	0.009

3.8 Microscopía de fluorescencia con vNAR ATH14-CF660C

Las fijaciones fueron realizadas con el uso de solventes en mezcla de metanol-acetona, estos agentes fijadores no requieren del paso posterior de permeabilización, sin embargo, puede llegar a afectar el epítipo en los antígenos por lo que se evaluaron dos combinaciones, proporción 50-50 y 90-10 (figura 19).

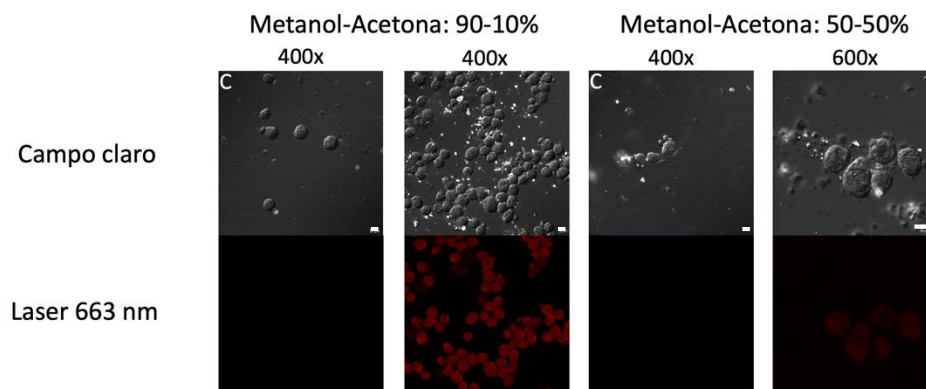


Figura 19: Micrografía de células CCD-1112Sk (Fibroblastos humanos) fijadas en distintas concentraciones de metanol-acetona y teñidas con ATH14-CF660C (1.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), escala de 10 μm .

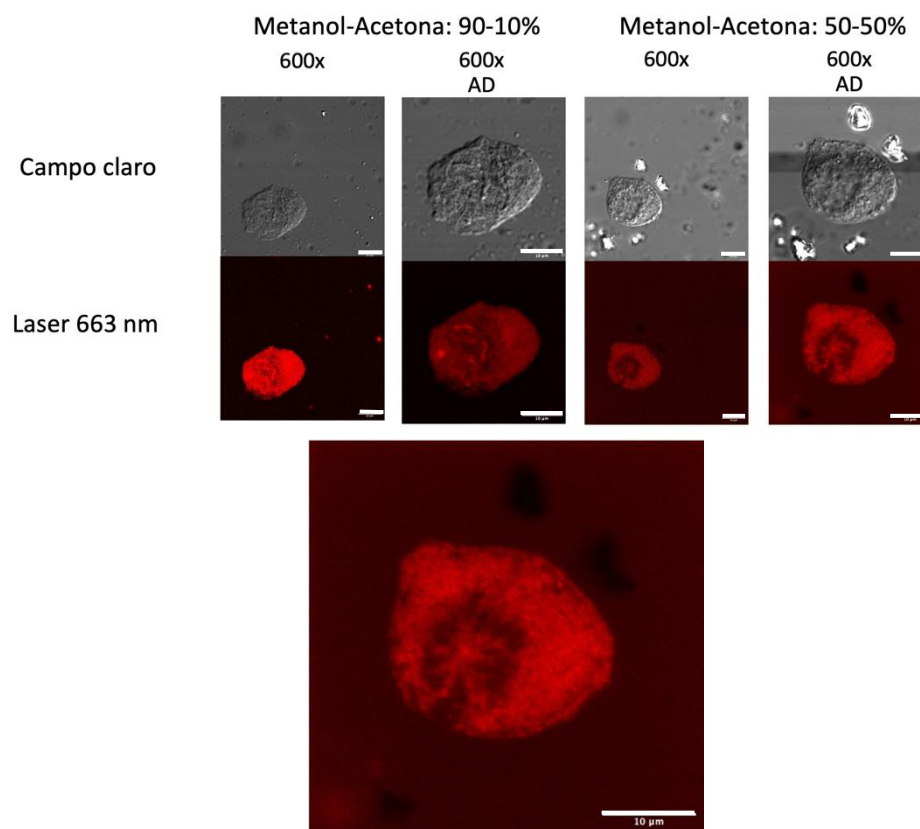


Figura 20: Micrografía de células CCD-1112Sk fijadas en distintas concentraciones de metanol-acetona y teñidas con ATH14-CF660C (1.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), amplificación de 600x y posterior amplificación digital (AD) escala de 10 μm .

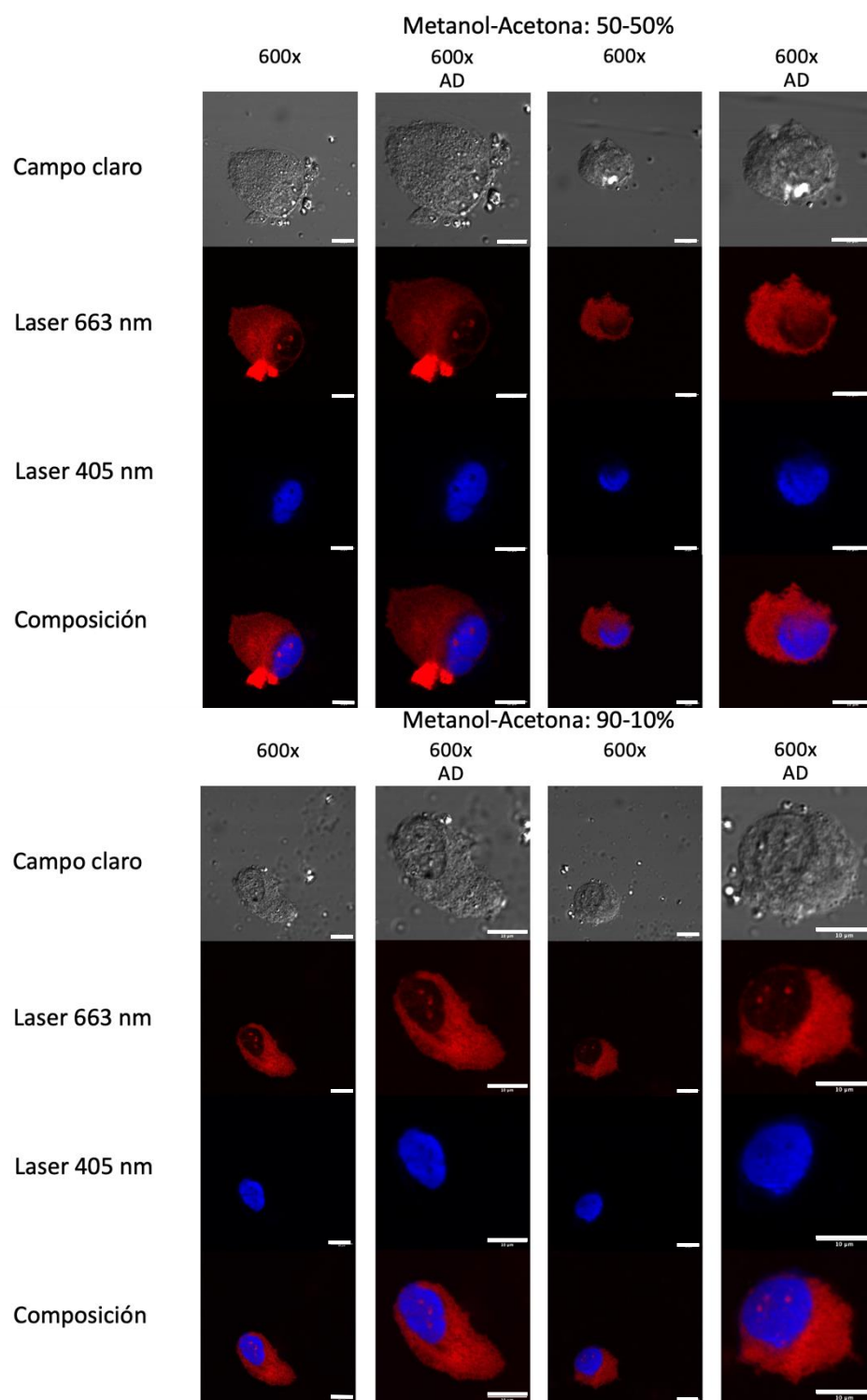


Figura 21: Micrografía de células CCD-1112Sk teñidas con ATH14-CF660C (1.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y DAPI (1mg/mL), amplificación de 600x y posterior amplificación digital (AD) escala de 10 μm .

En ambos casos (figura 19), no se encontró autofluorescencia en el control negativo (ausencia del vNAR conjugado). Al tener certeza que la fluorescencia (color rojo) que se apreciaba correspondía solamente al vNAR conjugado se tomaron más micrografías, con el objetivo con mayor amplificación (60x). Además, se procedió a hacer amplificación digital para observar las estructuras microtubulares y su patrón de distribución.

En la micrografía de 50-50 % 600x AD (Figura 20), se puede apreciar un inmunomarcaje que presenta la distribución radial característica de los microtúbulos presentes en los fibroblastos. Sin embargo, al no poder observar las estructuras definidas en la fijación de 90-10, se repitió el experimento para comprobar que solo se teñían las proteínas en el citoplasma (debido a que no debe existir presencia de microtúbulos en el núcleo), esto descartaría marcaje inespecífico.

Los resultados de las micrografías (figura 21) comprobaron que existe poca o nula fluorescencia dentro del núcleo. Además, en el láser 633 fue posible apreciar un par de puntos fluorescentes en el núcleo de las células (todas las micrografías de la figura 21 a excepción de las dos micrografías de la derecha en la fijación de metanol-acetona: 50-50 %), lo que probablemente se trate del vestigio de los centrosomas donde aún queden tubulinas polimerizadas.

Capítulo 4. Discusión

La importancia de este proyecto recae en la explotación de nuevas moléculas para ser implementadas en microscopía de fluorescencia y ofrecer alternativas a las problemáticas actuales o que en un futuro puedan existir. En esta tesis se desarrolló por primera vez un trabajo que utiliza un vNAR fluorescente como herramienta molecular que puede emplearse en sustitución a los anticuerpos IgG monoclonales fluorescentes para realizar la técnica de microscopía de fluorescencia. Los nanocuerpos fluorescentes que han sido reportados en la literatura corresponden principalmente a nanocuerpos de camélidos y fragmentos de dominio sencillo de anticuerpos (sdAB), sin embargo, no se encontró en la literatura mención o referencia a los anticuerpos tipo vNAR (Beghein y Gettemans, 2017; De Beer y Giepmans, 2020).

El aislamiento de anticuerpos tipo vNAR por medio de bibliotecas sintéticas y la técnica de despliegue en fagos es un método alternativo a la producción de anticuerpos vía hibridoma. De esta manera, en este trabajo se utilizaron 3 bibliotecas distintas con 0, 1 y 2 cisteínas no canónicas (VS0, VS1 y VS2 respectivamente) para seleccionar vNARs específicos para el reconocimiento de α -tubulina. Aunque se partió de una combinación con concentraciones idénticas de las 3 bibliotecas (títulos de 10^{11}), solamente fue posible aislar 2 vNAR (ATH14 y ATH08) que reconocen a α - y β -tubulina (posiblemente reconocen una región presente en ambas tubulinas) pertenecientes a la biblioteca VS0 (figura 4). Estos resultados son similares a lo reportado por Cabanillas-Bernal en 2019 donde se realizaron biopannings contra diferentes antígenos y solamente fue posible obtener un vNAR funcional de las bibliotecas VS0 y VS1, pero no de VS2. Por otra parte, Valdovino-Navarro y colaboradores (2022) lograron seleccionar, mediante despliegue en fagos, 3 vNAR potencialmente funcionales sin cisteínas no canónicas que reconocen la proteína Spike de SARS-CoV-2.

Sin embargo, para el desarrollo de proteínas recombinantes, como es el caso de los vNARs, una de las principales limitantes suele ser la determinación de estrategias de producción, purificación y detección (Lozano y Ceccarelli, 2014). En nuestro grupo de trabajo, los plásmidos que codifican a los vNARs fueron diseñados con un promotor de inducción y con etiquetas de histidinas y HA, mismas que facilitan la obtención de proteínas en gran cantidad y puras, como pudo ser observado en los resultados de las secciones 3.4.1 y 3.6. No obstante, cada vNAR suele comportarse de manera distinta, por lo que es necesario estandarizar protocolos específicos para su producción y purificación. Es por dicha razón que se optó por evaluar los dos vNARs obtenidos del biopanning y decidir cuál era la mejor opción para proceder con los experimentos subsecuentes. En el caso de ATH14, este vNAR solo se pudo producir con la adición

de 1 mM de inductor de expresión IPTG, no obstante, los niveles de expresión fueron mayores que en las mejores condiciones de expresión del vNAR ATH08. Así mismo, el proceso de purificación de ATH14 resulta en un vNAR puro en tan solo dos rondas de purificación por cromatografía en columna HISTRAP. Además, el rendimiento de vNAR purificado es superior a 1 mg de proteína/L de cultivo, mientras que para ATH08 no se supera los 50 µg/L en la purificación. Esta última cantidad de proteína no es suficiente para realizar la posterior conjugación con el fluorocromo CF600C SE (Sigma-Aldrich, 2011).

En las estrategias de conjugación nanocuerpos-fluorocromos se han empleado tres métodos principales: (1) la construcción de plásmidos (Moutel et al., 2016), (2) la ligación enzimática (Taki et al., 2004) y (3) la conjugación química (Platonava et al., 2015). La elección del método se basa en la necesidad de los protocolos y en las características de la molécula a marcar (Beghein y Gettemans, 2017). La estrategia empleada en este trabajo fue la de ligación química con moléculas como el N-hydroxysuccinimide ester (NHS). La principal característica del NHS es que tiene la capacidad de formar enlaces con los grupos amino libres, además, es posible aumentar la selectividad por el amino terminal cuando la reacción se lleva a cabo en pH 7 (Molecular Probes, 2013). Estas características permiten marcar solamente una molécula fluorescente por cada vNAR (como se muestra en los resultados de la sección 3.7). Adicionalmente, la reacción es rápida, sencilla de realizar y no implica la construcción de vectores o la adición de enzimas, lo que no influye en su posterior purificación y recuperación.

El uso de solventes orgánicos como el metanol y acetona ha sido empleado para realizar fijaciones de células y tejidos ya que suele ser un método directo, rápido y no suele generar autofluorescencia. Además, no necesita permeabilización posterior para marcar compuestos intracelulares. Sin embargo, una desventaja de usar solventes es su capacidad de desnaturalizar los antígenos y destruir epítomos. Si bien existen otros métodos no desnaturalizantes, como la fijación química con aldehídos (formaldehído, paraformaldehído y glutaraldehído), estos si desarrollan autofluorescencia y requieren permeabilización de la membrana plasmática para realizar marcaje intracelular (Hibbs, 2004). En este trabajo se optó por utilizar el método de solvente orgánico porque si el vNAR continuaba reconociendo α - y β -tubulina, en condiciones donde posiblemente la conformación de los epítomos se viera afectada, supondría que es apto también para realizar pruebas con los otros métodos que no comprometen la estructura de los antígenos. Además, estos reactivos son más sencillos de conseguir y suelen ser de uso cotidiano en la mayoría de los laboratorios.

Sin embargo, debido al método de fijación utilizado, es posible que la fluorescencia observada en los fibroblastos teñidos con el vNAR ATH14-CF660C, no haya permitido identificar protofilamentos de

microtúbulos. Este patrón observado es debido a que la fluorescencia se encuentra desordenada y distribuida en todo citoplasma. Aun así, los resultados son positivos ya que no se inmunodetectaron tubulinas dentro del núcleo (figura 21). Estos resultados son similares a los obtenidos por González-Granillo y colaboradores en 2012 y por Celik y colaboradores en 2013 donde se observó el mismo efecto en los microtúbulos de células CHO (células de ovario de hámster chino) y cardiomiocitos de ratas Wistar, respectivamente. La acción mecánica y enzimática de desprender las células de la monocapa del cultivo provoca un cambio en la morfología de la célula. Es decir, la célula pasa de estar adherida en estado fusiforme a una forma esférica cuando se encuentra en suspensión. Este proceso tiene efecto directo en el reordenamiento de los microtúbulos por medio de desplazamiento físico, ruptura y despolimerización de los microtúbulos dentro del citoplasma de las células. Para obtener mejores resultados en el inmunomarcaje de las células con el vNAR fluorescente, se recomienda como perspectiva hacer el cultivo y crecimiento de las células directamente en el portaobjetos a teñir. De esta manera se lograría ver el patrón de distribución de los microtúbulos en su estado basal, sin alteraciones como las antes mencionadas.

Capítulo 5. Conclusiones

En este trabajo se logró el aislamiento de 2 anticuerpos tipo vNAR que reconocen las proteínas α - y β -tubulina humanas a partir de un biopanning contra α -tubulina humana, a partir de 3 bibliotecas sintéticas distintas. De los dos vNAR aislados, el vNAR ATH14 presentó diferencias significativas en el reconocimiento en comparación con ATH08. Sin embargo, ATH14 no presentó mayores niveles de expresión, por lo que es el mejor candidato al obtener mayores cantidades de proteína en un menor volumen de cultivo.

En la relación fluorocromo/vNAR existe una molécula fluorescente por cada molécula proteica. Por lo tanto, se logró realizar una conjugación selectiva entre el grupo amino terminal del vNAR ATH14 y el fluorocromo CF660C SE, mediante una reacción realizada a pH neutro.

A pesar de no haber establecido las condiciones óptimas de inmunomarcaje para células de fibroblastos humanos, fue posible realizar la técnica de microscopía de fluorescencia con el uso de solventes (metanol-acetona) en distintas proporciones (50-50 % y 90-10 %). Además, el inmunomarcaje observado solo se aprecia en el citoplasma celular (región donde se encuentran los microtúbulos en la mayoría de los estadios celulares). De manera que, aunque no haya sido utilizado un anticuerpo control, es posible afirmar que el inmunomarcaje se realizó con éxito.

Para futuras investigaciones y reforzar los resultados obtenidos en este trabajo se sugiere realizar más experimentos con otros métodos de fijación y utilizar un anticuerpo comercial que sea empleado como control. Además, como perspectiva, es posible realizar pruebas de colocalización de la fluorescencia para determinar si el vNAR fluorescente puede ser incluso una mejor alternativa para realizar los ensayos de microscopía de fluorescencia al aumentar la eficiencia de marcaje, disminuir los tiempos de incubación y reducir el uso de agentes permeabilizantes.

Literatura citada

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2008. *Molecular biology of the cell*. 5^a e. Garland Science, New York.
- Barbas, C., Burton, D., Scott, J., Silverman, G. (2001). *Phage Display: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Beghein, E., Gettemans, J. (2017). Nanobody technology: a versatile toolkit for microscopic imaging, protein–protein interaction analysis, and protein function exploration. *Frontiers in immunology*, 8(771), 1-14. [doi: 10.3389/fimmu.2017.00771](https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00771)
- Betzig, E., Trautman, J. K., Harris, T. D., Weiner, J. S., Kostelak, R. L.(1991). Breaking the diffraction barrier: optical microscopy on a nanometric scale. *Science*, 251(5000), 1468-1470. [doi: 10.1126/science.251.5000.1468](https://doi.org/10.1126/science.251.5000.1468)
- Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., Hess, H. F. (2006). Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793), 1642-1645. [doi: 10.1126/science.1127344](https://doi.org/10.1126/science.1127344)
- Cabanillas-Bernal, O., Dueñas, S., Ayala-Avila, M., Rucavado, A., Escalante, T., Licea-Navarro, A. F. (2019). Synthetic libraries of shark vNAR domains with different cysteine numbers within the CDR3. *PLoS one*, 14(6), 1-24. [doi: 10.1371/journal.pone.0213394](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213394)
- Cassimeris, L., Inoue, S., Salmon, E. D. (1988). Microtubule dynamics in the chromosomal spindle fiber: Analysis by fluorescence and high-resolution polarization microscopy. *Cell motility and the cytoskeleton*, 10(1-2), 185-196. [doi: 10.1002/cm.970100123](https://doi.org/10.1002/cm.970100123)
- Celik, E., Abdulreda, M. H., Maignel, D., Li, J., Moy, V. T. (2013). Rearrangement of microtubule network under biochemical and mechanical stimulations. *Methods*, 60(2), 195-201. [doi: 10.1016/j.ymeth.2013.02.014](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.02.014)
- Chai, D., Wang, G., Fang, L., Li, H., Liu, S., Zhu, H., Zheng, J. (2020). The optimization system for preparation of TG1 competent cells and electrotransformation. *MicrobiologyOpen*, 9(7), 1-7. [doi: 10.1002/mbo3.1043](https://doi.org/10.1002/mbo3.1043)
- Coons, A. H., Creech, H. J., Jones, R. N. (1941). Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 47(2), 200-202. [doi: 10.3181/00379727-47-13084P](https://doi.org/10.3181/00379727-47-13084P)
- De Beer, M. A., Giepmans, B. N. (2020). Nanobody-based probes for subcellular protein identification and visualization. *Frontiers in cellular neuroscience*, 14(573278), 1-16. [doi: 10.3389/fncel.2020.573278](https://doi.org/10.3389/fncel.2020.573278)
- De Genst, E., Silence, K., Decanniere, K., Conrath, K., Loris, R., Kinne, J., Muyldermans, S., Wyns, L. (2006). Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(12), 4586-4591. [doi: 10.1073/pnas.0505379103](https://doi.org/10.1073/pnas.0505379103)

- Demeule, B., Gurny, R., Arvinte, T. (2007). Detection and characterization of protein aggregates by fluorescence microscopy. *International journal of pharmaceutics*, 329(1-2), 37-45. [doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.08.024](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.08.024)
- Gell, C., Bormuth, V., Brouhard, G. J., Cohen, D. N., Diez, S., Friel, C. T., Helenius, J., Nitzsche, B., Petzold, H., Ribbe, J., Schäffer, E., Stear, J. H., Trushko, A., Varga, V., Wildund, P. O., Zanic, M., Howard, J. (2010). Microtubule dynamics reconstituted in vitro and imaged by single-molecule fluorescence microscopy. *Methods in cell biology*, 95, 221-245. [doi: 10.1016/S0091-679X\(10\)95013-9](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(10)95013-9)
- Giepmans, B. N., Adams, S. R., Ellisman, M. H., Tsien, R. Y. (2006). The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science*, 312(5771), 217-224. [doi: 10.1126/science.1124618](https://doi.org/10.1126/science.1124618)
- Gill, S. C., & Von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical biochemistry*, 182(2), 319-326. [doi: 10.1016/0003-2697\(89\)90602-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90602-7)
- González-Granillo, M., Grichine, A., Guzun, R., Usson, Y., Tepp, K., Chekulayev, V., Shevchuk, I., Karu-Varikmaa, M., Kuznetsov, A. V., Grimm, M., Saks, V., Kaambre, T. (2012). Studies of the role of tubulin beta II isotype in regulation of mitochondrial respiration in intracellular energetic units in cardiac cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52(2), 437-447. [doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.07.027](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.07.027)
- Hibbs, A. R., (2004). *Confocal Microscopy for Biologists*. Springer, New York
- Howes, S. C., Geyer, E. A., LaFrance, B., Zhang, R., Kellogg, E. H., Westermann, S., Rice, L. M., Nogales, E. (2017). Structural differences between yeast and mammalian microtubules revealed by cryo-EM. *Journal of Cell Biology*, 216(9), 2669-2677. [doi: 10.1083/jcb.201612195](https://doi.org/10.1083/jcb.201612195)
- Huang, B., Bates, M., Zhuang, X. (2009). Super-resolution fluorescence microscopy. *Annual review of biochemistry*, 78, 993-1016. [doi: 10.1146/annurev.biochem.77.061906.092014](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061906.092014)
- Juárez, K., Dubberke, G., Lugo, P., Koch-Nolte, F., Buck, F., Haag, F., Licea, A. (2011). Monoclonal antibodies for the identification and purification of vNAR domains and IgNAR immunoglobulins from the horn shark *Heterodontus francisci*. *Hybridoma*, 30(4), 323-329. [doi: 10.1089/hyb.2011.0010](https://doi.org/10.1089/hyb.2011.0010)
- Lanfranconi, M. (2001). Historia de la Microscopía. Introducción a la Biología. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, 49-57.
- Lichtman, J. W., Conchello, J. A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nature methods*, 2(12), 910-919. [doi: 10.1038/nmeth817](https://doi.org/10.1038/nmeth817)
- Linck, R. W., Chemes, H., Albertini, D. F. (2016). The axoneme: the propulsive engine of spermatozoa and cilia and associated ciliopathies leading to infertility. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 33(2), 141-156. [doi: 10.1007/s10815-016-0652-1](https://doi.org/10.1007/s10815-016-0652-1)
- Lozano, D. L., Ceccarelli, E. a., (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(172), 1-17. [doi: 10.3389/fmicb.2014.00172](https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172)
- Lo Mikhaylova, M., Cloin, B., Finan, K., Van Den Berg, R., Teeuw, J., Kijanka, M. M., Sokolowski, M., Katrukha, E. A., Maidorn, M., Opazo, F., Moutel, S., Vantard, M., Perez, F., van Bergen en Henegouwen, P. M. P., Hoogenraad, C. C., Ewers, H., Kapitein, L. C. (2015). Resolving bundled microtubules using anti-tubulin nanobodies. *Nature communications*, 6(1), 1-7. [doi: 10.1038/ncomms8933](https://doi.org/10.1038/ncomms8933)

- Molecular Probes, (2013). Amine-Reactive Probes. Life Technologies Corporation., 11.
- Moutel, S., Bery, N., Bernard, V., Keller, L., Lemesre, E., De Marco, A., Ligat, L., Rain, C. J., Favre, G., Olichon, A., Perez, F. (2016). NaLi-H1: A universal synthetic library of humanized nanobodies providing highly functional antibodies and intrabodies. *eLife*, 5(16228), 1-31. [doi: 10.7554/eLife.16228](https://doi.org/10.7554/eLife.16228)
- Nanda, J. S., Lorsch, J. R. (2014). Labeling a protein with fluorophores using NHS ester derivitization. *Methods Enzymol*, 536, 87-94. [doi: 10.1016/B978-0-12-420070-8.00008-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420070-8.00008-8)
- Nogales, E., Wolf, S. G., Downing, K. H. (1998). Structure of the ab tubulin dimer by electron crystallography (Correction). *Nature*, 393(6681), 191. [doi: 10.1038/34465](https://doi.org/10.1038/34465)
- Peralta, C. E. V. (2010). Obtención de fragmentos vNAR de anticuerpos del tiburón *Heterodontus francisci* con afinidad por IL-18 humana. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 89.
- Platonova, E., Winterflood, C. M., Junemann, A., Albrecht, D., Faix, J., Ewers, H. (2015). Single-molecule microscopy of molecules tagged with GFP or RFP derivatives in mammalian cells using nanobody binders. *Methods*, 88, 89-97. [doi: 10.1016/j.ymeth.2015.06.018](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.06.018)
- QIAexpressionist. (2003). A handbook for high-level expression and purification of 6xhis-tagged proteins. Qiagen. 5.^a ed. Chatsworth.
- Ries, J., Kaplan, C., Platonova, E., Eghlidi, H., Ewers, H. (2012). A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies. *Nature methods*, 9(6), 582-584. [doi: 10.1038/nmeth.1991](https://doi.org/10.1038/nmeth.1991)
- Russell, D. W., Sambrook, J. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor. 3.^a ed. New York.
- Schauen, M., Opazo, F., Rizzoli, S. (2013). New Labeling Tools Can Help to Realize the Full Potential of Super-Resolution Microscopy. Consultado el 25 de mayo de 2021, de <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/new-labeling-tools-can-help-to-realize-the-full-potential-of-super-resolution-microscopy/>
- Schägger, H., Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry*, 166(2), 368-379. [doi: 10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)
- Schneider, F., Sych, T., Eggeling, C., Sezgin, E. (2021). Influence of nanobody binding on fluorescence emission, mobility, and organization of GFP-tagged proteins. *iScience*, 24(1), 1-13. [doi: 10.1016/j.isci.2020.101891](https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101891)
- Semenova, I., Rodionov, V. (2007). Fluorescence Microscopy of Microtubules in Cultured Cells. *Methods in Molecular Medicine*, 137, 93-102. [doi: 10.1007/978-1-59745-442-1_6](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-442-1_6)
- Sigma-Aldrich, (2011). Technical Bulletin: CF660C, Succinimidyl Ester. Sigma-Aldrich., 3
- Sprotocols. (2014). Preparation of Competent Cells. Consultado el día 20 de diciembre de 2020, de [doi: 10.5281/zenodo.13548](https://doi.org/10.5281/zenodo.13548)

- Steven, J., Müller, M. R., Carvalho, M. F., Ubah, O. C., Kovaleva, M., Donohoe, G., Barelle, C. J. (2017). In vitro maturation of a humanized shark VNAR domain to improve its biophysical properties to facilitate clinical development. *Frontiers in Immunology*, 8(1361), 1-15. [doi: 10.3389/fimmu.2017.01361](https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01361)
- Strahl, H., Hamoen, L. W. (2010). Membrane potential is important for bacterial cell division. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(27), 12281-12286. [doi: 10.1073/pnas.1005485107](https://doi.org/10.1073/pnas.1005485107)
- Thompson, M. A., Biteen, J.S., Lord, S.J., Conley, N.R., Moerner, W.E. (2010). Molecules and methods for super-resolution imaging. *Methods Enzymol.* 475, 27-59. [doi: 10.1016/S0076-6879\(10\)75002-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)75002-3)
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 302(5909), 575-581. [doi: 10.1038/302575a0](https://doi.org/10.1038/302575a0)
- Torres-García, E., Pinto-Cámara, R., Linares, A., Martínez, D., Abonza, V., Brito-Alarcón, E., Calcines-Cruz, C., Valdés-Galindo, G., Torres, D., Jabłoński, M., Torres-Martínez, H. H., Martínez, J. L., Hernández, H. O., Ocelotl-Oviedo, J. P., Garcés, Y., Barchi, M., D'Antuono, R., Bošković, A., Dubrovsky, J. D., Darszon, A., Buffone, M. G., Rodríguez Morales, R., Rendon-Mancha, J. M., Wood, C. D., Hernández-García, A., Krapf, D., Crevenna, A. H., Guerrero, A. (2022). Extending resolution within a single imaging frame. *Nature Communications*. [doi: 10.1038/s41467-022-34693-9](https://doi.org/10.1038/s41467-022-34693-9)
- Taki, M., Shiota, M., Taira, k., (2004). Transglutaminase-mediated N- and C-terminal fluorescein labeling of a protein can support the native activity of the modified protein. *Protein Engineering, Design and Selection*. 17(2), 119-126. [doi: 10.1093/protein/gzh015](https://doi.org/10.1093/protein/gzh015)
- Valdovino-Navarro, B. J., Dueñas, S., Flores-Acosta, G. I., Gasperin-Bulbarela, J., Bernaldez-Sarabia, J., Cabanillas-Bernal, O., Cervantes-Luevano, K. E., Licea-Navarro, A. F. (2022). Neutralizing Ability of a Single Domain VNAR Antibody: In Vitro Neutralization of SARS-CoV-2 Variants of Concern. *International Journal of Molecular Sciences*. [doi: 10.3390/ijms232012267](https://doi.org/10.3390/ijms232012267)
- van Zuylen, J. (1981). The microscopes of Antoni van Leeuwenhoek. *Journal of microscopy*, 121(3), 309-328. [doi: 10.1111/j.1365-2818.1981.tb01227.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1981.tb01227.x)
- Warn, R. M., Flegg, L., Warn, A. (1987). An investigation of microtubule organization and functions in living *Drosophila* embryos by injection of a fluorescently labeled antibody against tyrosinated alpha-tubulin. *The Journal of Cell Biology*, 105(4), 1721-1730. [doi: 10.1083/jcb.105.4.1721](https://doi.org/10.1083/jcb.105.4.1721)
- Zvorykina, Y., Tvorogova, A., Gladkikh, A., van Vorobjev, I. (2018). Non-centrosomal MTs play a crucial role in organization of MT array in interphase fibroblasts. *AIMS genetics*, 5(02), 141-160. [doi: 10.3934/genet.2018.2.141](https://doi.org/10.3934/genet.2018.2.141)
- Zielonka, S., Empting, M., Grzeschik, J., Könnig, D., Barelle, C. J., Kolmar, H. (2015). Structural insights and biomedical potential of IgNAR scaffolds from sharks. *mAbs*. [doi: 10.4161/19420862.2015.989032](https://doi.org/10.4161/19420862.2015.989032)

Anexos

Anexo A: Tabla de composición de aminoácidos de ATH14 y AT08

Para realizar el cálculo de coeficiente de extinción del vNAR fue necesario conocer el peso molecular de la proteína completa, además, el tipo y número de aminoácidos que contenía su secuencia. Los datos se encuentran resumidos en la tabla 7.

Tabla 7: Datos generales de la composición de la secuencia de aminoácidos de ATH14 y ATH08

ATH14		ATH08	
Longitud	162 aa	Longitud	158 aa
Peso molecular (PM)	17.78 kDa	Peso molecular (PM)	17.23 kDa
Punto isoeléctrico	8.57	Punto isoeléctrico	6.37
Índice alifático	64,506	Índice alifático	71,076
Aminoácido	Conteo	Aminoácido	Conteo
Alanina (Ala)	18	Alanina (Ala)	17
Cisteína (Cys)	2	Cisteína (Cys)	3
Ácido aspártico (Asp)	7	Ácido aspártico (Asp)	7
Ácido glutámico (Glu)	5	Ácido glutámico (Glu)	5
Fenilalanina (Phe)	6	Fenilalanina (Phe)	8
Glicina (Gly)	18	Glicina (Gly)	13
Histidina (His)	9	Histidina (His)	7
Isoleucina (Ile)	5	Isoleucina (Ile)	7
Lisina (Lys)	7	Lisina (Lys)	6
Leucina (Leu)	9	Leucina (Leu)	10
Metionina (Met)	1	Metionina (Met)	0
Asparagina (Asn)	5	Asparagina (Asn)	6
Prolina (Pro)	4	Prolina (Pro)	5
Glutamina (Gln)	7	Glutamina (Gln)	7
Arginina (Arg)	6	Arginina (Arg)	3
Serina (Ser)	11	Serina (Ser)	16
Treonina (Thr)	16	Treonina (Thr)	15
Valina (Val)	11	Valina (Val)	10
Triptófano (W)	7	Triptófano (W)	5
Tirosina (Y)	8	Tirosina (Y)	8

Anexo B: Secuencia de aminoácidos completas de ATH14 y AT08

ATH14:

LKTGHAIAVAQAGFATVAQAAASLDQTPRTATRETGESLSLKCVLTDTSILFGTKWFWNNPGSTDWESITIGGRYVES
VNNQAKSFLQIKDLTVEDSGTYECKAMAHSRVRGVGFWWRGATWFKGYYGAGTVLTVNGGQAGQHSHHHHHG
AYPYDVPDYA

ATH08:

AIAVALAGFATVAQAAASLDQTPRTATRETGESLSLKCVLTDTSILFGTKWFWNNPGSTDWESITIGGRYVESVNNQA
KSFLQIKDLTVEDSGTYECKAFISLNSFFIFPWWKCAQSTVSYYGAGTVLTVNGGQAGQHSHHHHHGAYPYDVPDYAS

Ambas secuencias contienen las etiquetas de seis histidinas y HA, necesarias para el proceso de detección y purificación por cromatografía de afinidad a metales y por inmunoafinidad con el anticuerpo anti HA.

