

Tesis defendida por

Constanza Estefanía Martínez Olivares

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro

Director del Comité

Dr. Marcial Leonardo Lizárraga
Partida

Miembro del Comité

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra

Miembro del Comité

Dr. Fernando Díaz Herrera

Coordinador
del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Jesús Favela Vara

Director de la
Dirección de Estudios de Posgrado

Febrero 2014

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida
con Orientación en Biotecnología Marina

Purificación y evaluación citotóxica de un anticuerpo tipo vNAR neutralizante de TGF- β ,
aislado del tiburón *Heterodontus francisci*

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Maestro en Ciencias
Presenta:

Constanza Estefanía Martínez Olivares

Ensenada, Baja California, México
2014

Resumen de la tesis de Constanza Estefanía Martínez Olivares, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Purificación y evaluación citotóxica de un anticuerpo tipo vNAR neutralizante de TGF- β ,
aislado del tiburón *Heterodontus francisci*

Resumen aprobado por:

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro

En este trabajo se clonó y expresó en *Pichia pastoris* un anticuerpo vNAR neutralizante de la citocina TGF- β , obtenido de una biblioteca no inmune a partir del tiburón *Heterodontus francisci*. Se ha demostrado que los anticuerpos de dominio sencillo (vNAR) gracias a su pequeño tamaño tienen una profunda penetración en tejidos densos y son rápidamente eliminados del organismo. Estas características los convierten en potenciales agentes terapéuticos y de diagnóstico; sin embargo, la pureza de la proteína es un factor fundamental para su utilización. En el presente trabajo, se logró establecer una condición óptima de purificación para el anticuerpo vNAR anti-TGF- β , mediante el sistema níquel-ácido nitriloacético (Ni-NTA). Se demostró que el anticuerpo mantuvo su actividad, ya que fue capaz de reconocer a la isoforma TGF- β 2, y se demostró el reconocimiento de la citocina TGF- β en lágrimas humanas mediante un ensayo colorimétrico. Se realizó un ensayo de citotoxicidad en cultivo primario de hepatocitos de ratón, donde se demostró que el anticuerpo no afecta la supervivencia de estas células al ser empleado a una concentración de 1.5 $\mu\text{g/mL}$, lo que podría indicar que este anticuerpo no daña a las células de este órgano. Debido a que la desregulación de TGF- β tiene un efecto inmunosupresor en distintas enfermedades infecciosas, este anticuerpo podría ser considerado como un potencial agente terapéutico.

Palabras clave: **vNAR, purificación, TGF- β**

Abstract of the thesis presented by Constanza Estefanía Martínez Olivares as a partial requirement to obtain the Master in Science degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology.

Purification and cytotoxic evaluation of a vNAR type antibody that neutralize TGF- β , isolated from *Heterodontus francisci* shark

Abstract approved by:

Dr. Alexei Fedórovich Licea Navarro

Abstract

In this work we have cloned and expressed in *Pichia pastoris* one vNAR-neutralizing antibody of TGF- β cytokine, obtained from a non-immune library from a *Heterodontus francisci* shark. It has been shown that single domain antibodies (vNAR) thanks to its small size, have deep penetration into dense tissues and rapid clearance from the body. These characteristics make them potential therapeutic and diagnostic agents, nevertheless, purity of the protein is a key factor. In this work, we were able to establish the optimum condition for purification of the vNAR anti-TGF- β antibody by the nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) system. It was shown that the antibody maintained its activity, as it was able to recognize the isoform TGF- β 2, and recognition of the cytokine TGF- β in human tears, as demonstrated by a colorimetric assay. A cytotoxicity assay was performed on primary cultures of mouse hepatocytes, which showed that the antibody does not affect the survival of these cells, at a concentration of 1.5 μ g/mL, which could indicate that this antibody does not harm these organ cells. Since deregulation of TGF- β has an immunosuppressive effect on various infectious diseases, the antibody may be considered as a potential therapeutic agent.

Keywords: vNAR, purification, TGF- β

Dedicatoria

A mis padres, a Magali, a mi tía abuela.

Agradecimientos

Al Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por brindarme su apoyo y asesoría.

A la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra y al Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida, por su apoyo y sus aportación durante el desarrollo de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, por permitirme formar parte de esta institución y por el apoyo recibido.

Al Consejo del Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida, por el apoyo brindado.

Al personal administrativo de CICESE, por la atención y ayuda brindada.

A Edna Sánchez, por todo su apoyo, asesorías consejos y amistad.

A mis compañeros de laboratorio, por su apoyo y asesoría.

A Tanya, Pavel, Félix, Olivia, Vanessa, Itzel, Segio y Christian por su apoyo, asesoría y por su valiosa amistad.

A mis compañeros de maestría por su apoyo y por todos los momentos que compartimos.

Contenido

	Página
Resumen español.....	ii
Resumen inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tablas.....	ix
1. Introducción	1
1.1 Anticuerpos.....	1
1.2 Anticuerpos IgNAR.....	3
1.3 Anticuerpos de dominio sencillo	4
1.4 Sistema de expresión de anticuerpos recombinantes: <i>Pichia pastoris</i>	6
1.4.1 Vector de expresión pPICZα.....	8
1.4.2 Etiquetas en proteínas recombinantes.....	9
2. Antecedentes.....	10
2.1 Anticuerpos de dominio sencillo vNAR.....	10
2.2 Anticuerpos de dominio sencillo vNAR neutralizante de TGF-β.....	10
2.3 Purificación de proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad a metales.....	10
2.3.1 Purificación mediante el sistema níquel-ácido nitriloacético (Ni-NTA).....	11
2.4 Citocinas.....	13
2.5 Factor de crecimiento transformante beta (TGF-β).....	13
2.5.1 Participación del TGF-β en la respuesta inmunológica.....	14
2.5.2 Participación del TGF-β en diversas patologías.....	15
2.6 Neutralización de citocinas.....	16
2.6.1 Medicamentos y anticuerpos que regulan el factor de crecimiento transformante β (TGF-β).....	17
3. Justificación.....	18
4. Hipótesis.....	19
5. Objetivos.....	20
5.1 General.....	20
5.1 Específicos.....	20
6. Materiales y métodos.....	21
6.1 Clonación y transformación en <i>Escherichia coli</i>	21
6.2 Transformación en <i>Pichia pastoris</i> (SMD1168).....	25
6.3 Expresión del anticuerpo vNAR en <i>Pichia partoris</i>	26
6.4 Purificación del anticuerpo vNAR por cromatografía de afinidad a metales.....	26
6.4.1 Estandarización de las condiciones de purificación del anticuerpo vNAR.....	27
6.4.2 Purificación del anticuerpo vNAR con condiciones estandarizadas.....	28
6.5 Análisis de la expresión del anticuerpo vNAR.....	29
6.5.1 Preparación de muestras.....	29

Contenido

	Página
6.5.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	30
6.5.3 Inmunodetección del anticuerpo vNAR (Western blot).....	30
6.6 Diálisis.....	31
6.7 Concentrado del anticuerpo vNAr purificado.....	31
6.8 Cuantificación de proteína con ácido bicinconínico (BCA).....	31
6.9 Reconocimiento del anticuerpo vNAR por la citocina TGF- β	32
6.9.1 ELISA de reconocimiento del vNAR por la citocina TGF- β 2...	32
6.9.2 ELISA de reconocimiento del anticuerpo vNAR por TGF- β de lágrimas humanas.....	33
6.9.3 Inmunodetección de TGF- β en lágrimas humanas.....	34
6.10 Ensayo de citotoxicidad en cultivo primario de hepatocitos.....	34
7. Resultados.....	37
7.1 Clonación y transformación en <i>Escherichia coli</i>	37
7.2 Transformación en <i>Pichia pastori</i> (SMD1168).....	43
7.3 Expresión del anticuerpo vNAR en <i>Pichia partoris</i>	45
7.4 Purificación del anticuerpo vNAR por cromatografía de afinidad a metales.....	46
7.4.1 Estandarización de las condiciones de purificación del anticuerpo vNAR.....	47
7.4.2 Purificación del anticuerpo vNAR con condiciones estandarizadas.....	53
7.5 Concentrado del anticuerpo vNAr purificado.....	55
7.6 Cuantificación de proteína con ácido bicinconínico (BCA).....	55
7.7 Reconocimiento del anticuerpo vNAR por la citocina TGF- β	56
7.7.1 ELISA de reconocimiento del vNAR por la citocina TGF- β 2...	56
7.7.2 ELISA de reconocimiento del vNAR por TGF- β de lágrimas humanas.....	57
7.7.3 Inmunodetección de TGF- β en lágrimas humanas.....	58
7.8 Ensayo de citotoxicidad en cultivo primario de hepatocitos.....	59
8. Discusión.....	62
Conclusiones.....	68
Perspectivas.....	69
Referencias bibliográficas.....	70
Anexos.....	74

Lista de figuras

Figura	Página
1 Estructura en forma de Y de un anticuerpo convencional.....	2
2 Estructura de anticuerpo IgNAR.....	4
3 Ruta metabólica del metanol en levaduras metilotróficas.....	7
4 Vector de clonación y expresión pPICZαA de 3.6 kb.....	8
5 Interacción entre residuos de histidina y el ácido nitriolacético (Ni-NTA)..	12
6 Estructura química del imidazol e histidna.....	12
7 Citocina TGF-β1.....	14
8 Alineamiento de secuencias del gen <i>anti-TGF-β</i> original y optimizado...	37
9 Plásmidos anti-TG-β y pPICZαA purificados.....	38
10 PCR con gradiente de temperatura para evaluar oligonucleótidos TGFbOptF y TGFbOptR	39
11 Doble digestión del plásmido pPICZαA purificado.....	39
12 Doble digestión de productos de PCR y plásmido pPICZαA.....	40
13 Plásmido pPICZαA con inserto anti-TGF-β.....	41
14 Amplificación por PCR del inserto anti-TGF-β contenido en el plásmido pPICZαA.....	41
15 Alineamiento de secuencias de clonas en <i>E. coli</i> conteniendo el inserto anti-TGF-β.....	42
16 Alineamiento de secuencia del gen anti-TGF-β y clona Ecoli1.....	43
17 Plásmido pPICZαA linealizado conteniendo el inserto anti-TGF-β.....	44
18 Amplificación del fragmento anti-TGFβ – pPICZαA clonado en la cepa SMD1168 de <i>P. pastoris</i>	44
19 Alineamiento de secuencias de la proteína anti-TGF-β y las clonas positivas al inserto en la cepa SMD1168 de <i>P. pastoris</i>	45
20 Purificación con 15 mL de imidazol 20 mM.....	46
21 Purificación con 50 mL de imidazol 20 mM.....	48
22 Purificación con 100 mL de imidazol 20 mM y 80 mL de imidazol 10 mM.	49
23 Purificación con 30 mL de imidazol 20 mM y 30 mL de imidazol 35 mM...	50
24 Purificación con 15 mL de imidazol 20 mM y 10 mL de imidazol 50 mM...	51
25 Purificación con 15 mL de imidazol 20 mM y 10 mL de imidazol 100 mM.	52
26 Repurificación de eluciones con condiciones estandarizadas	53
27 Purificación con condiciones estandarizadas.....	54
28 Curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA).....	56
29 ELISA de reconocimiento del anticuerpo vNAR por la citocina TGF-β2...	57
30 ELISA de reconocimiento del anticuerpo vNAR por la citocina TGF-β2 de lágrimas humanas	58
31 Western blot de TGF-β en lágrimas humanas.....	59
32 Ensayo de citotoxicidad en cultivo primario de hepatocitos	61

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Oligonucleótidos empleados en la reacción de PCR.....	23
2	Condiciones del PCR con gradiente de temperatura.....	23
3	Condiciones empleadas para estandarizar la purificación del vNAR.....	47

1. Introducción

1.1 Anticuerpos

Los anticuerpos son proteínas producidas en vertebrados en respuesta a la exposición a estructuras extrañas conocidas como antígenos. Los anticuerpos son muy diversos y específicos en su capacidad para reconocer antígenos y son los principales mediadores de la inmunidad humoral frente a todo tipo de microbios. Los anticuerpos pueden existir en dos formas: 1) unidos a la membrana sobre la superficie de linfocitos B, donde actúan como receptores de antígenos, y 2) de forma soluble, donde se encuentran en el torrente sanguíneo, tejidos y mucosas, y cuya función es unirse a los antígenos, neutralizar toxinas y prevenir la entrada y propagación de patógenos (Abbas *et al.*, 2010).

Un anticuerpo convencional (Figura 1) tiene una estructura básica simétrica compuesta por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas, unidas por un enlace disulfuro. Tanto la cadena pesada (H) como la cadena ligera (L) constan de regiones variables (V) localizadas en el extremo amino-terminal, que participan en el reconocimiento del antígeno; y regiones constantes (C) localizadas en la extremo carboxilo-terminal, que modulan las funciones efectoras de los anticuerpos. En las cadenas pesadas la región V se compone de un dominio de inmunoglobulina (Ig) y la región C de tres o cuatro dominios de Ig. Cada cadena ligera está compuesta por un dominio de Ig en la región V y un dominio de Ig en la región C (Alberts *et al.*, 2004.).

La mayoría de las diferencias en las secuencias entre distintos anticuerpos se debe a tres segmentos en la región V de la cadena pesada y tres segmentos en la región V de la cadena ligera. Estos segmentos se conocen como segmentos hipervariables y corresponden a tres bucles que sobresalen y se conectan a las cadenas adyacentes de las láminas β que forman a los dominios V de las cadenas pesadas y ligeras. Las regiones hipervariables tienen una longitud de 10 aminoácidos y se mantienen en su posición debido a las secuencias que dan soporte al dominio Ig de la región V. En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables del dominio V_H y las tres regiones hipervariables del dominio V_L se encuentran juntas y forman el sitio de unión al

antígeno. Debido a que las secuencias hipervariables forman una superficie complementaria a la estructura tridimensional del antígeno al que se unen, también se conocen como regiones determinantes de la complementariedad (CDRs por sus siglas en inglés). Estas regiones reciben el nombre de CDR1, CDR2 o CDR3 del amino al carboxilo. Las regiones CDR3 tanto del dominio V_L como del dominio V_H son las más variables. Puesto que un anticuerpo contiene dos cadenas pesadas y dos ligeras, presenta dos puntos de unión al antígeno (Abbas *et al.*, 2010).

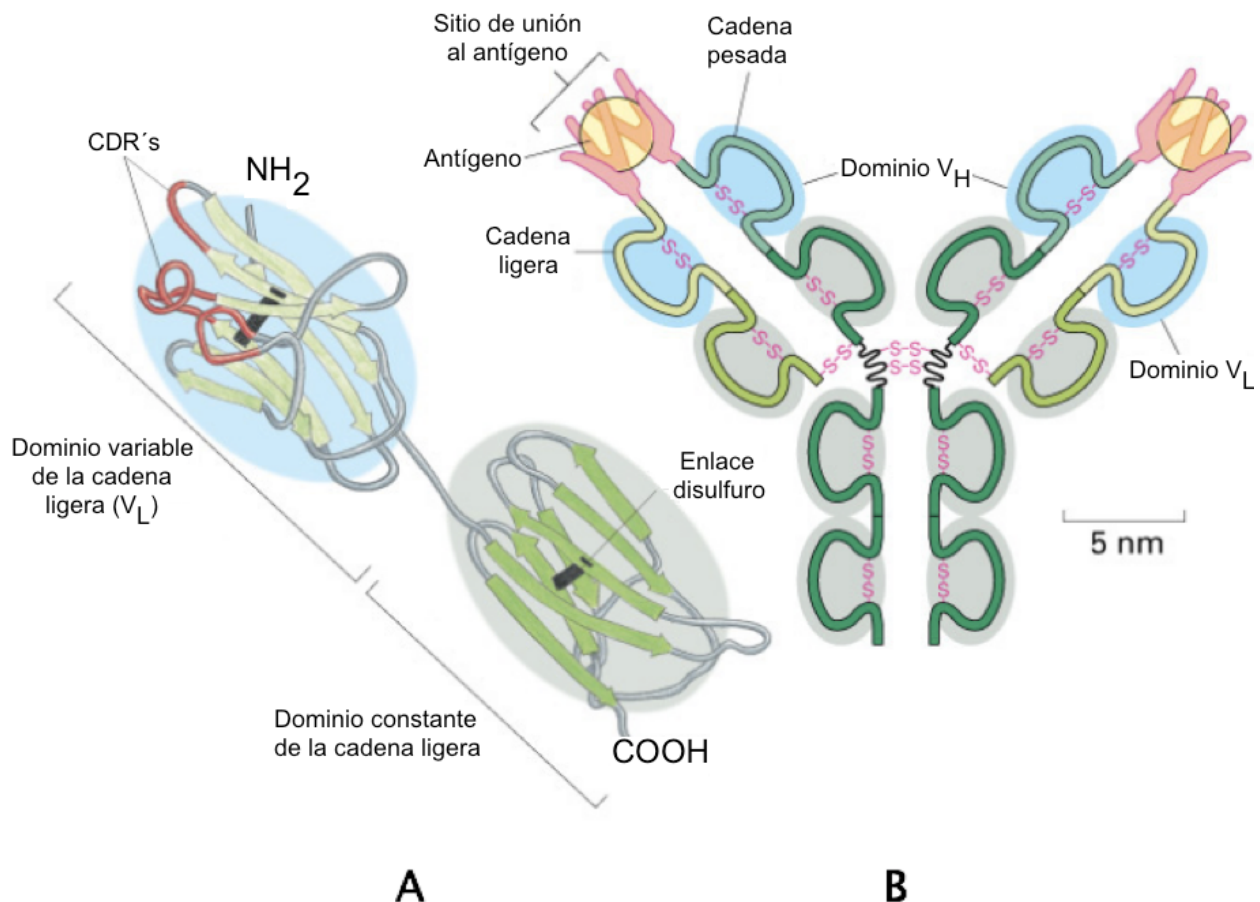


Figura 1. Estructura en forma de Y de un anticuerpo convencional. A) Dibujo de listón de una cadena ligera, formada por un dominio variable (V_L) y un dominio constante. En el extremo amino-terminal del dominio variable se encuentran las regiones determinante de complementariedad (CDR's). B) Esquema de una molécula de anticuerpo convencional, formada por cuatro cadenas polipéptidicas (dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas). El sitio de unión al antígeno está formado por un dominio variable de la cadena pesada (V_H) y un dominio variable de la cadena ligera (V_L). Modificado de Alberts *et al.*, 2004. 150.

1.2 Anticuerpos IgNAR

Los peces cartilaginosos (tiburones, rayas y quimeras) divergieron de un ancestro común hace aproximadamente 450 millones de años, junto con otros vertebrados mandibulados. Su historia evolutiva se refleja en la diversidad de sus anticuerpos (Streltsov *et al.*, 2004), que incluye anticuerpos IgM, IgW e IgNAR (Rumfelt *et al.*, 2004). Los anticuerpos IgM e IgW tienen la estructura de un anticuerpo convencional, basada en la interacción del dominio variable de la cadena pesada (V_H) y el dominio variable de la cadena ligera (V_L) para formar el sitio de unión al antígeno (Nuttall *et al.*, 2002).

Los anticuerpos IgNAR (New Antigen Receptor), fueron descubiertos en el tiburón nodriza *Ginglymostoma cirratum* (Greenberg *et al.*, 1995). Sin embargo, estudios posteriores corroboraron la presencia de este isotipo en el suero de otras especies de tiburón como *Orectolobus maculatus* (Streltsov *et al.*, 2004) y *Heterodontus francisci* (Juarez *et al.*, 2011).

El anticuerpo IgNAR (Figura 2), está formado por dos cadenas polipeptídicas homodiméricas unidas por enlaces disulfuro, cada una de las cadenas está compuesta por un dominio variable (vNAR) y cinco dominios constantes (cNAR), y carece de cadena ligera (Streltsov *et al.*, 2004). Cuenta con dos regiones determinantes de complementariedad (CDR) (Wesolowski *et al.*, 2009).

Los IgNAR, se pueden encontrar en forma transmembranal o soluble (Roux *et al.*, 1998). Se han identificado tres isotipos de IgNAR, que difieren en la configuración de los residuos de cisteína estructurales y en las etapas de aparición en el desarrollo del tiburón. Los IgNAR tipo III, que fueron los últimos en ser descubiertos, muestran una diversidad limitada en tamaño y en sus regiones CDR, han sido encontrados en etapas embrionarias de desarrollo, por lo que se cree que forman parte de la primera línea de defensa contra patógenos antes de la maduración de la respuesta inmune adaptativa. La concentración de IgNAR tipo I y II incrementa cuando el sistema inmune del tiburón es expuesto a antígenos exógenos, por lo que muestran una diversidad significativa (Streltsov *et al.*, 2005).

Debido a que los anticuerpos IgNAR cuentan con un dominio sencillo vNAR de ~15 kDa (Wesolowski *et al.*, 2009), tienen la mitad de superficie de unión al antígeno comparada

con la de los anticuerpos convencionales (Nuttall *et al.*, 2004). Por lo tanto, para compensar su tamaño reducido, codifican un CDR3 de mayor longitud (15 a 23 residuos de aminoácidos) que el de los anticuerpos convencionales (15 a 17 residuos). Estas regiones presentan un alto grado de variabilidad y le confieren a la molécula estabilidad estructural al formar enlaces disulfuro (Streltsov *et al.*, 2004).

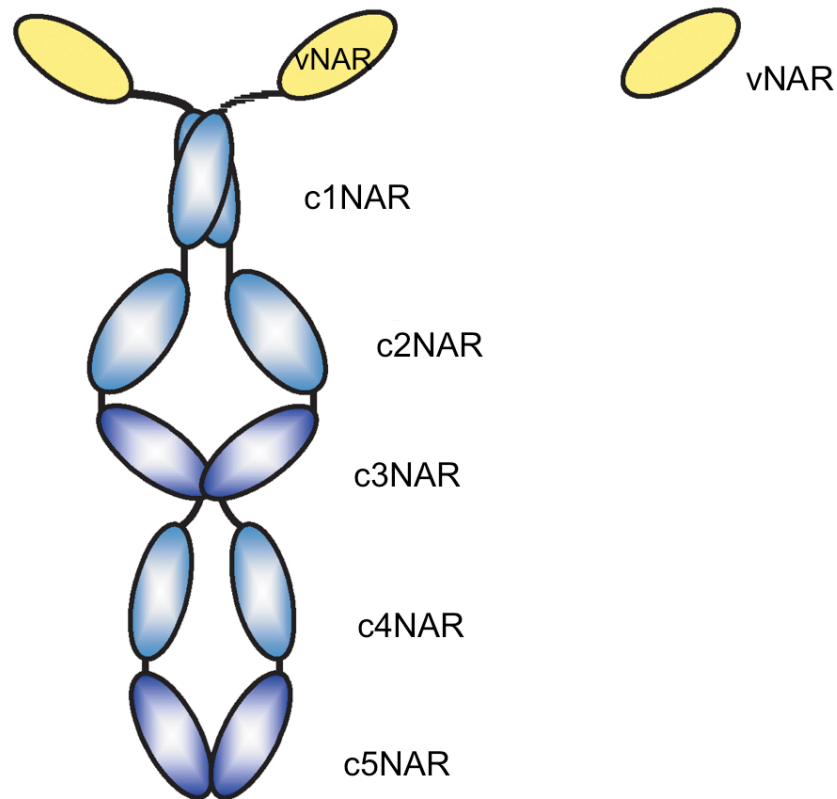


Figura 2. Estructura de anticuerpo IgNAR. Esquema de una molécula de anticuerpo IgNAR, formada por dos cadenas pesadas, cada una compuesta por cinco dominios constantes (c1NAR, c2NAR, c3NAR, c4NAR y c5NAR) y un dominio variable (vNAR). Modificado de Saerens *et al.*, 2008. 603.

1.3 Anticuerpos de dominio sencillo

Actualmente, los anticuerpos monoclonales y los anticuerpos derivados de proteínas recombinantes son una herramienta esencial para la investigación y para aplicaciones médicas. El uso terapéutico de los anticuerpos (especialmente de anticuerpos

monoclonales), ha recibido mucho atención por parte de la industria farmacéutica. Sin embargo, su compleja naturaleza, su gran tamaño e inmunogenicidad, han obstaculizado su uso como compuestos terapéuticos. Razón por la cual se ha tratado de reducir el tamaño de esos anticuerpos, y la atención se ha centrado hacia fragmentos de unión al antígeno más pequeños como Fab y $F(ab')_2$, o hacia el fragmento variable (Fv) de dominio sencillo formado por apareamiento de los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas. Estos dominios Fv se disocian fácilmente y requieren de alguna estabilización, como el uso de un péptido de unión flexible para formar el Fv en una sola cadena (scFv) (Saerens *et al.*, 2008).

Una alternativa natural de anticuerpos de dominio sencillo se encontró en los anticuerpos IgNAR de peces cartilaginosos (Saerens *et al.*, 2008). Los dominios sencillos (vNARs) son fácilmente producidos como proteínas recombinantes. Estos anticuerpos son generados por clonación del repertorio de dominio variable a partir de ADNc de sangre, nódulo linfático o bazo de animales inmunizados y se insertan en diversos vectores de expresión, y son seleccionados eficientemente mediante bibliotecas de fagos para seleccionar uniones antígeno-específicas. Se ha demostrado que estas uniones tienen una afinidad y especificidad similar en vNARs obtenidos de bibliotecas inmunes o sintéticas (Saerens *et al.*, 2008). Los anticuerpos generados a partir de bibliotecas no inmunes muestran baja afinidad a antígenos comparada con los anticuerpos de bibliotecas inmunes, por lo que la afinidad de estos anticuerpos puede mejorarse mediante mutagénesis dirigida al sitio CDR y por rondas de selección inmovilizando el antígeno bajo condiciones más rigurosas (Holt *et al.*, 2003).

Los anticuerpos de dominio sencillo vNAR, tienen múltiples ventajas sobre otro tipo de anticuerpos. En primer lugar, son derivados de fragmentos de anticuerpos, que pueden ser expresados eficientemente en bacterias y levaduras como proteínas activas, solubles y termoestables. Su tamaño pequeño y la naturaleza del dominio sencillo con forma casi globular proporcionan el acceso a hendiduras, surcos o epítomos de difícil acceso para anticuerpos de mayor tamaño. Además, presentan una alta y rápida permeabilidad que facilita el acceso a tejidos densos, así como resistencia a condiciones rigurosas y un comportamiento estrictamente monomérico que los hace apropiados para formar parte de estructuras más complejas. Estas características, convierten a los vNAR en una alternativa para la terapia inmune y para el desarrollo de

productos terapéuticos y de diagnóstico. Los blancos potenciales de estos anticuerpos incluyen proteínas de superficie celular, citocinas, proteínas de secreción e incluso proteínas intracelulares (Saerens *et al.*, 2008).

1.4 Sistema de expresión de anticuerpos recombinantes: *Pichia pastoris*

La tecnología de fusión de proteínas ha facilitado enormemente la producción eficiente de proteínas recombinantes. Las levaduras han sido una de las células hospedero más empleadas para la producción de proteínas heterólogas (Poutou *et al.*, 2005).

Con el descubrimiento de ciertas especies de levaduras metilotróficas, inmediatamente la atención se centró en ellas como fuentes potenciales para la expresión de genes foráneos (Cereghino y Cregg, 1999). En los últimos años *P. pastoris* ha alcanzado un uso más amplio gracias a los reportes de su éxito como sistema de expresión y a su venta comercial en forma de kit (Gellissen, 2000).

P. pastoris emplea metanol como fuente única de carbono y energía, debido a que codifica genes involucrados con la degradación del metanol. El metabolismo del metanol inicia al interior de los peroxisomas, cuando es oxidado en presencia de oxígeno por la enzima alcohol oxidasa (AOX, codificada por los genes AOX1 y AOX2), produciendo formaldehído y peróxido de hidrógeno. El peróxido es retenido en los peroxisomas y degradado a agua y oxígeno por la catalasa. Parte del formaldehído es oxidado a formato y CO₂, proceso que genera energía para la célula. Por otra parte, las enzimas DHAS (dihidroxiacetona) convierten el formaldehído restante a dihidroxiacetona (DHA) y gliceraldehído fosfato (GAP), que generan gliceraldehído-3-fosfato y xilosa-5-monofostato (Figura 3) (Poutou *et al.*, 2005).

P. pastoris es elegida para la producción de proteínas recombinantes principalmente debido a su habilidad de crecer en una alta densidad celular (Romanos, 1995) y a la alta productividad de la proteína de interés (Poutou *et al.*, 2005). Además, de ventajas adicionales que incluyen: 1) menores costos de los medios de cultivo comparados con células de mamíferos e insectos, 2) secreción de forma directa al medio de cultivo de la proteína clonada, facilitando la purificación, y 3) es considerado un microorganismo

seguro GRAS (Generally Recognised As Safe) que asegura su inocuidad para los humanos, es decir, que no produce endotoxinas (Poutou *et al.*, 2005).

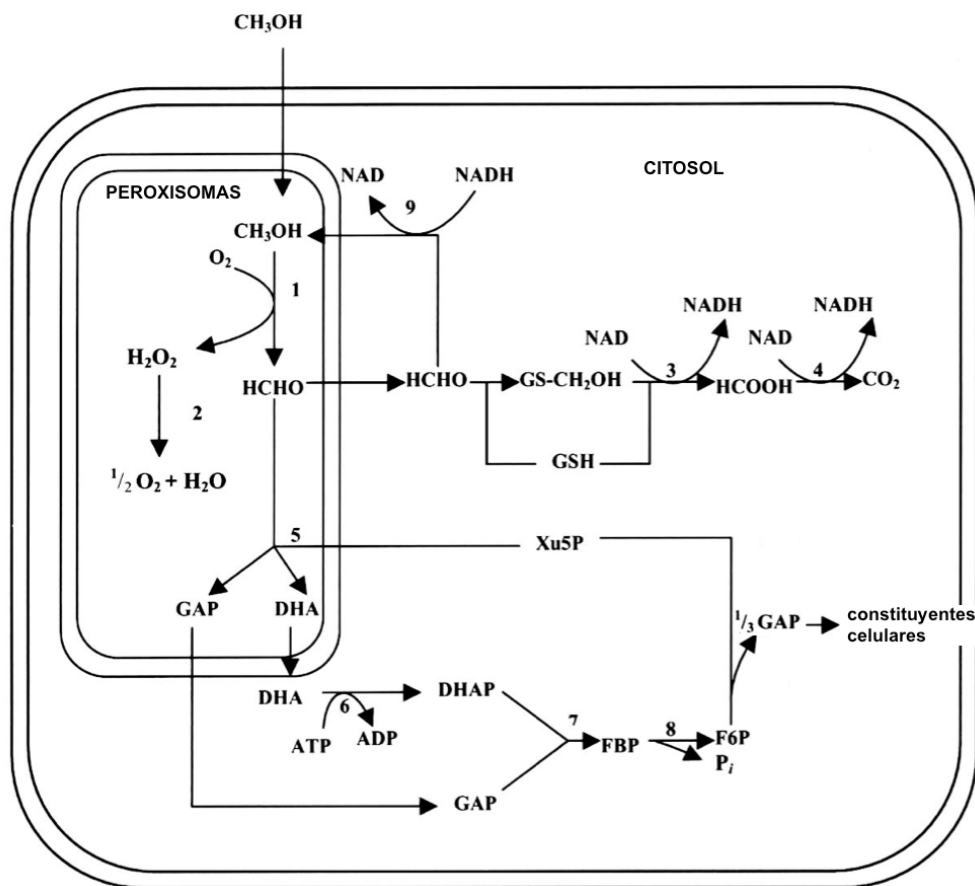


Figura 3. Ruta metabólica del metanol en levaduras metilotróficas. 1) Alcohol oxidasa, 2) catalasa, 3) formaldehído deshidrogenasa, 4) formato deshidrogenasa, 5) dihidroxiacetona sintetasa, 6) dihidroxiacetona cinasa, 7) fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, 8) fructosa-1,6-bisfosfatasa, 9) formaldehído reductasa. Modificado de Zhang *et al.*, 2000. 276.

P. pastoris es capaz de generar modificaciones postraduccionales muy similares a las modificaciones que ocurren en las células humanas. Además, en grandes fermentadores, crece en un medio que consiste en una fuente pura de carbono (glicerol o metanol), biotina, sales, trazas de elementos, agua y no secreta alta cantidad de proteínas endógenas; por consiguiente las proteínas foráneas secretadas por el cultivo son relativamente puras, lo que facilita su separación (Córdoba-Ruiz *et al.*, 2003).

1.4.1 Vector de expresión pPICZ α

La integración de un gen en *P. pastoris* requiere 3 pasos básicos: 1) la inserción del gen al vector de expresión, 2) introducción del vector de expresión al genoma de *P. pastoris*, y 3) examinación de cepas potenciales para la producción del gen (Cereghino y Cregg, 1999).

El vector de expresión pPICZ α , es muy utilizado para la expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris*. Este vector tiene un peso de 3.6 kb y permite la clonación en sentido N terminal $\rightarrow$ C terminal (Figura 4). Sus principales características son: 1) tiene un sitio de origen de replicación para *Escherichia coli*, 2) en la posición 5' tiene un promotor AOX1 para regular la expresión inducida por metanol del gen de interés, así como un terminador de la transcripción, 3) tiene la señal de secreción α para la secreción directa de la proteína recombinante, 4) un gen de resistencia a zeocina, y 5) en el carboxilo terminal tiene el epítipo c-Myc para inmunodetección, y una etiqueta de 6 histidinas usada en la purificación (EasySelect *Pichia* Expression Kit, 2010).

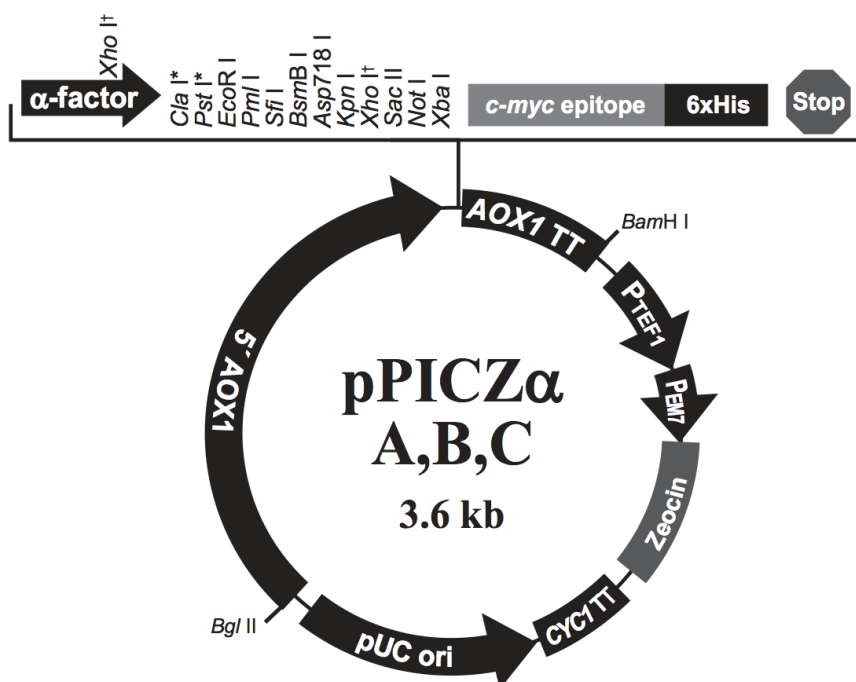


Figura 4. Vector de clonación y expresión pPICZ α A,B,C de 3.6 kb. Características generales del vector. EasySelect *Pichia* Expression Kit. Recuperado de: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/easyselect_man.pdf. 2010 . 21.

La integración del vector al genoma de *P. pastoris* se lleva a cabo por eventos de recombinación homóloga entre las secuencias comunes del vector y las del genoma del hospedero en el loci AOX1 (Cereghino y Cregg, 1999).

1.4.2 Etiquetas en proteínas recombinantes

El advenimiento de la ingeniería genética ha traído consigo la capacidad de expresar y manipular secuencia de ADN. Gracias a las técnicas de fusión de genes y mutagénesis sitio dirigida, prácticamente cualquier polipéptido puede ser producido de forma recombinante en bacterias, hongos u organismos eucariotas (Walls y Loughran, 2011).

La industria biotecnológica demanda procedimientos rápidos y eficientes para identificar a las proteínas recombinantes expresadas. Con el fin de generar una proteína con etiqueta, la secuencia de ADN que codifica la proteína de interés se une a la secuencia del vector de expresión, de manera tal que se genera una fusión en marco con la secuencia codificante de la etiqueta del polipéptido. La etiqueta puede ser colocada en el extremo amino o carboxilo, la posición se determina en función a la estrategia de clonación utilizada y a los propósitos requeridos (Walls y Loughran, 2011).

2. Antecedentes

2.1 Anticuerpos de dominio sencillo vNAR

Los anticuerpos de dominio sencillo vNAR han mostrado tener una favorable biodistribución, así como una profunda penetración en tejidos densos y rápida eliminación a través de riñones. Estas características los hacen atractivos para aplicaciones biotecnológicas y terapéuticas, por ejemplo para la neutralización de proteínas extracelulares solubles, incluyendo toxinas, citocinas y componentes de coagulación sanguínea (Wesolowski *et al.* 2009).

2.2 Anticuerpo de dominio sencillo vNAR neutralizante de TGF- β

En el Laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas de CICESE, Camacho-Villegas (2012) obtuvo un fragmento de anticuerpo de dominio sencillo del tiburón *H. francisci*, a partir de una biblioteca no inmune, con capacidad de reconocer y neutralizar *in vitro* la acción biológica de la citocina TGF- β humana. La expresión de este anticuerpo se realizó en *E. coli*, se demostró su capacidad para reconocer y neutralizar a las isoformas 1, 2 y 3 de la citocina humana TGF- β , y mostró tener 58% de toxicidad en un tratamiento a las 24 horas y del 90% a las 48 horas, en cultivo primario de hepatocitos de ratón.

2.3 Purificación de proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad a metales

La cromatografía de afinidad a metales inmovilizados es la técnica mas utilizada para purificar proteínas recombinantes. Es una herramienta selectiva para la separación de péptidos que se unen a metales, basada en la interacción de ciertos residuos de aminoácidos, accesibles en la superficie de la proteína, y los iones metálicos dentro del quelato inmovilizado (Walls y Loughran, 2011).

La afinidad diferencial de proteínas por los iones metálicos inmovilizados deriva de los enlaces coordinados formados entre los iones metálicos implicados y los grupos donadores de electrones presentes en algunos residuos de aminoácidos (His, Cys, Trp y Arg). Estos grupos donadores de electrones forman complejos con los iones de metales de transición (Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} o Ni^{2+}), que generalmente son inmovilizados en soportes poliméricos con grupos quelantes como ácido iminodiacético o ácido nitriloacético. La retención de la proteína es influenciada por: 1) la naturaleza del grupo quelante, 2) el ion metálico específico y 3) el medio (concentración de sales y pH). Cada grupo quelante tiene su propia selectividad y capacidad de absorción (Walls y Loughran, 2011).

2.3.1 Purificación mediante el sistema níquel-ácido nitriloacético (Ni-NTA)

Después de la introducción de la cromatografía de afinidad a metales, se dio un nuevo enfoque al desarrollo de nuevas matrices quelantes (Nejadmoghaddam *et al.*, 2011). El ácido nitriloacético (NTA), es utilizado como agente quelante tetradentado. El NTA se une a iones de níquel por cuatro sitios coordinados (Figura 5), dejando dos sitios libres para la interacción con residuos de histidina. El NTA se une a los iones metálicos de forma más estable que otros agentes quelantes, y retiene los iones bajo condiciones de lavado rigurosas (The QIAexpressionist, 2003).

El sistema de purificación níquel-ácido nitriloacético (Ni-NTA) está diseñado para la purificación de proteínas recombinantes marcadas con etiquetas de histidinas, debido a la alta afinidad y selectividad por los residuos de histidina (The QIAexpressionist, 2003).

Con este sistema las proteínas purificadas pueden encontrarse en forma nativa o desnaturalizada. Las proteínas que se unen a la resina se eluyen utilizando buffers con alta concentración de imidazol. El imidazol es un intermediario en la biosíntesis de la histidina (Figura 6), que durante el proceso de elución compite por la afinidad del níquel (The QIAexpressionist, 2003).

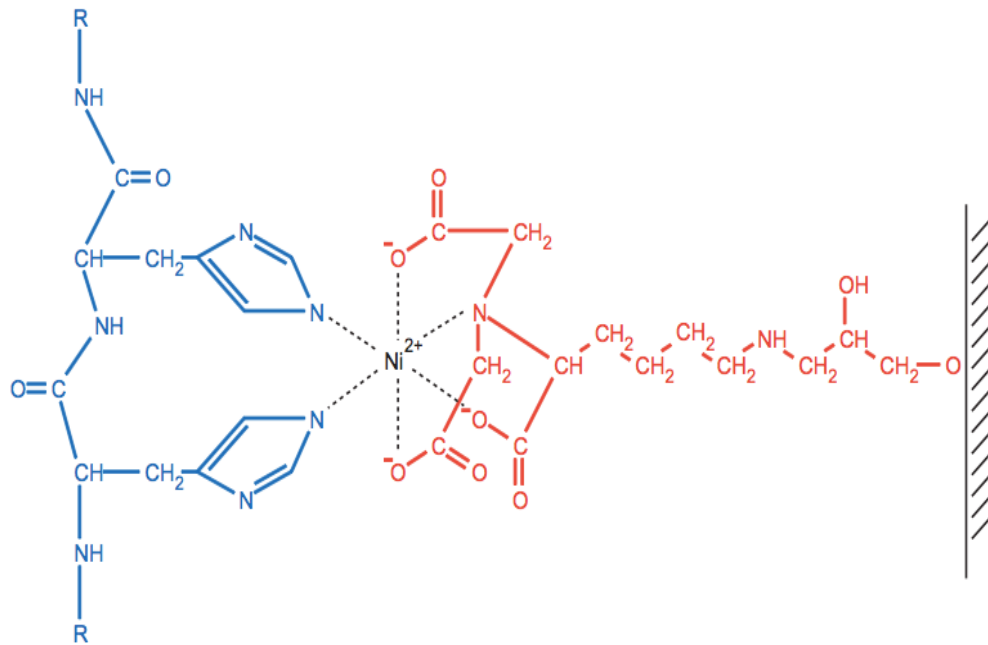


Figura 5. Interacción entre residuos de histidina y el ácido nitrilolacético (Ni-NTA). The QIAexpressionist. Recuperado de: http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN_QIAexpressionist_EN.pdf. 2003. 19.

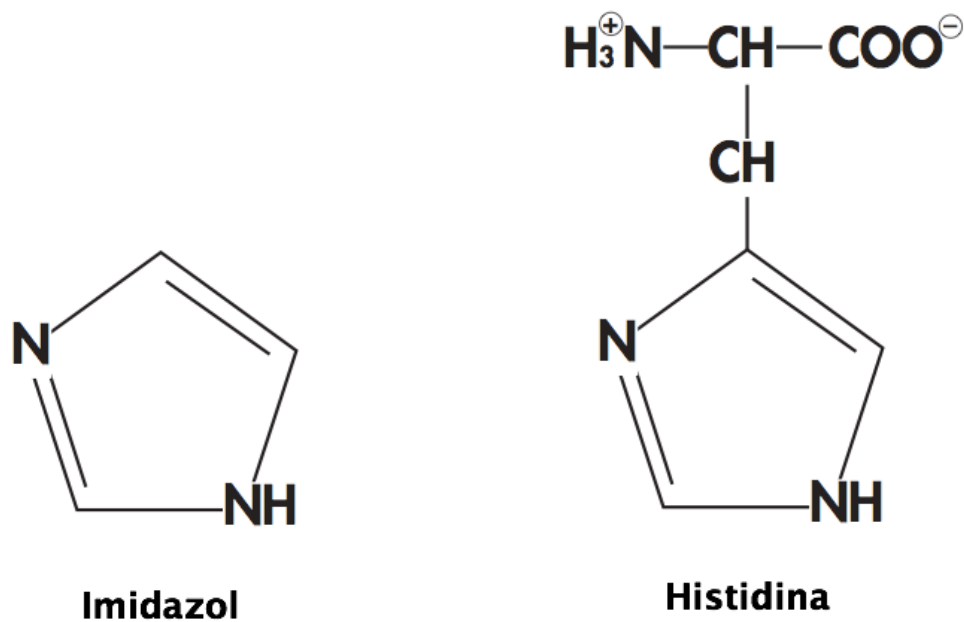


Figura 6. Estructura química del imidazol e histidina. The QIAexpressionist. Recuperado de: http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN_QIAexpressionist_EN.pdf. 2003. 66.

2.4 Citocinas

Las citocinas son proteínas secretadas por células de la inmunidad innata y adaptativa que controlan numerosas funciones fisiológicas. Se producen en respuesta a microorganismos y a otros antígenos (Abbas *et al.*, 2010).

En la fase de activación de la respuesta inmune adaptativa, las citocinas estimulan el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos, y en las fases efectoras de la inmunidad innata y adaptativa activan a diferentes células efectoras para que eliminen a microorganismos y a otros antígenos. Otra de sus funciones es estimular el desarrollo de células hematopoyéticas (Abbas *et al.*, 2010).

2.5. Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)

El TGF- β es una proteína homodimérica de 25 kDa, sintetizada y secretada por linfocitos T estimulados por el antígeno, fagocitos mononucleares activados por lipopolisacáridos (Abbas *et al.*, 2010), macrófagos, células dendríticas, células asesinas naturales (NK), células B, miocitos, condrocitos, astrocitos, células epiteliales, células de placenta, plaquetas y por algunas células tumorales (Letterio y Roberts, 1998).

Existen cinco isoformas de TGF- β , designadas como TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 y TGF- β 5. En mamíferos se han descrito las isoformas 1, 2 y 3. Las isoformas 4 y 5 han sido identificadas en aves y anfibios respectivamente. Existe una homología del 70% entre la secuencia de aminoácidos entre las isoformas TGF- β 1 y TGF- β 2, y del 79% entre las isoformas TGF- β 2 y TGF- β 3 (Benito-Almazán, 2012).

El TGF- β se sintetiza en forma de precursor inactivo. Se escinde proteolíticamente en el complejo de Golgi y forma un homodímero. Se secreta en forma latente asociado a otros polipéptidos, que deben ser eliminados extracelularmente mediante digestión enzimática antes de que la citocina se pueda unir a sus receptores y ejercer sus efectos biológicos. Las células del sistema inmunitario sintetizan principalmente TGF- β 1 (Figura 7) (Abbas *et al.*, 2010).

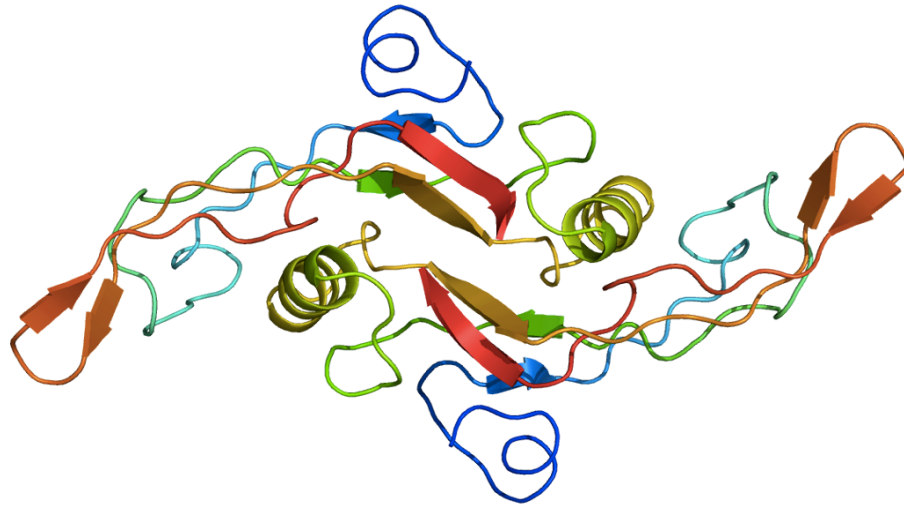


Figura 7. Citocina TGF- β 1. Representación esquemática de la estructura de la citocina TGF- β 1. Homodímero compuesto por hojas plegadas β unidas por enlaces disulfuro. Protein Data Bank. Recuperado de: <http://www.rcsb.org>. 2012.

2.5.1 Participación del TGF- β en la respuesta inmunológica

TGF- β es un potente supresor del sistema inmune, con actividad general sobre células NK, T, monocíticas, dendríticas y macrófagos. Puede afectar la iniciación y estimulación de respuestas inmunitarias primarias y secundarias, así como suprimir células efectoras anti-tumorales (Teicher, 2007).

El TGF- β inhibe la proliferación de linfocitos, principalmente T maduros que ya han sido activados, mientras que los T vírgenes o no activados son resistentes al efecto anti-mitogénico del TGF- β . El efecto del TGF- β depende del grado de diferenciación de los linfocitos. El TGF- β suprime la expresión de las moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en macrófagos, con lo cual interfiere en el proceso de presentación antigénica evitando la activación de linfocitos T. Como resultado de esta interferencia inhibe la secreción de interleucina 2, que es el factor inductor de la proliferación celular. El TGF- β también inhibe la producción de interleucina 1 (IL-1), citocina mitógena de linfocitos T y activadora de macrófagos, al suprimir la expresión de sus receptores específicos y al aumentar la liberación del receptor soluble antagonista de IL-1, que tiene la función de atrapar y evitar la unión de esta citocina con su receptor (Hernández-Pando, 2003).

El TGF- β desactiva los macrófagos al inhibir directamente la producción de radicales libres de oxígenos y óxido nítrico, o indirectamente al suprimir la producción de citocinas activadoras de macrófagos como TNF- α e INF- γ y sus receptores. Para la producción de óxido nítrico es necesario que el TNF- α y el INF- γ activen a la enzima óxido nítrico sintetasa inducible, y el TGF- β inhibe la transcripción y traducción del gen que codifica esta enzima. Por otro lado, el INF- γ activa a los macrófagos como parte de la respuesta Th-1, y uno de los efectos inmunosupresores más eficientes del TGF- β es inhibir la producción de INF- γ y de su receptor expresado en la membrana de macrófagos. El TGF- β es un eficiente promotor de citocinas Th-2, principalmente de IL-10 (Hernández-Pando, 2003).

2.5.2 Participación del TGF- β en diversas patologías

El TGF- β tiene un papel clave en el desarrollo de diferentes enfermedades (cirrosis, trastornos neuromusculares, tuberculosis, diversos tipos de cáncer, patologías oculares, artritis reumatoide, asma, lepra, entre otras). La expresión aberrante de TGF- β da como resultado cambios radicales en la estabilidad celular, lo que conduce a la alteración tanto del estado de diferenciación de las células como en las interacciones celulares. Esta desregulación asociada a patologías se da por pérdida, silenciamiento o mutaciones del gen TGF- β , así como de los factores involucrados en su señalización (Teicher, 2007).

La fibrosis hepática involucra múltiples eventos celulares y moleculares que inducen un excesivo depósito de proteínas de matriz extracelular que distorsionan la arquitectura del parénquima hepático, cuya etapa final es conocida como cirrosis. Durante condiciones patológicas TGF- β actúa como inhibidor de las enzimas involucrada en la degradación de la matriz extracelular (Senties-Gómez *et al.*, 2005).

El TGF- β juega un papel importante en trastornos neuromusculares, causa alteraciones que generan un ambiente desfavorable para la regeneración muscular y promueve el aumento de la formación del tejido fibrótico (Burks y Cohn, 2011).

En la fase progresiva de tuberculosis existen importantes anormalidades inmunológicas que permiten la supervivencia y proliferación bacteriana, tales como mayor actividad de

los linfocitos Th-2 (con menos actividad de los Th-1) y macrófagos desactivados que secretan citocinas supresoras de la inmunidad celular como el TGF- β ; estas alteraciones inmunológicas permiten que la enfermedad progrese generando extensa consolidación neumónica y muerte por insuficiencia respiratoria (Hernández-Pando *et al.*, 2004).

El TGF- β tiene un potente efecto al inhibir la proliferación celular. En carcinoma de mama, glioblastoma, melanoma y otros tipos de cáncer, la pérdida selectiva de la respuesta inhibitoria permiten la progresión tumoral (Padua *et al.*, 2008).

A nivel ocular el TGF- β se ha relacionado con varias patologías inflamatorias oculares, proliferativas y degenerativas, que incluyen cicatrices corneales y conjuntivales, la fibrosis en el endotelio corneal, la fibrosis post-cirugía de cataratas de la cápsula del cristalino, el exceso de cicatrización del tejido alrededor de los músculos extraoculares en la cirugía del estrabismo, la vitreorretinopatía proliferante y desarrollo del queratocono (Benito-Almazán, 2012).

En el Síndrome de Sjögren o Síndrome de Ojo Seco el TGF- β se sobreexpresa en el epitelio conjuntival (Zheng, X *et al.*, 2010) y glándulas salivales (Kizu *et al.*, 1996).

TGF- β se sobreexpresa en asma (Zuyderduyn *et al.*, 2004); hipertensión y lesión renal, asociadas a la hipertensión (Dahly *et al.*, 2002), artritis reumatoide y lepra (Hernández-Pando, 2003).

2.6 Neutralización de citocinas

En medicina clínica, las citocinas son importantes como sustancias terapéuticas y como antagonistas específicos en numerosas enfermedades inmunitarias e inflamatorias (Abbas *et al.*, 2010).

En años recientes, los anticuerpos convencionales neutralizantes de citocinas han revolucionado la terapia de artritis reumatoide, psoriasis y otras enfermedades inflamatorias crónicas. El gran éxito de estos anticuerpos ha llevado al desarrollo de anticuerpos de dominio sencillo de camélidos y tiburones neutralizantes de citocinas humanas (Wesolowski *et al.*, 2009).

2.6.1 Medicamentos y anticuerpos que regulan el factor de crecimiento transformante β (TGF- β)

Losartán (Cozaar) es un medicamento aprobado por la FDA (Food and Drug Administration). Losartán es un antagonista de receptores de angiotensina tipo II y antagonista de los receptores de TGF- β tipo I y II. Impide que la angiotensina II formada pueda interaccionar con su receptor endógeno. La angiotensina II es la principal hormona vaso-activa del sistema renina-angiotensina, juega un papel importante en la patofisiología de la hipertensión. Está indicado para el tratamiento de hipertensión arterial, insuficiencia cardíaca y enfermedad renal en pacientes con diabetes tipo 2 (Barrios-Alonso y Campuzano-Ruiz, 2003).

Fresolimumab (GC1008) es el primer anticuerpo monoclonal humano, capaz de neutralizar a las isoformas 1, 2 y 3 del TGF- β . Indicado para fibrosis pulmonar idiopática (Ruíz *et al.*, 2007) y en el tratamiento de esclerodermia fetal. Actualmente se encuentra en la fase 2 de ensayos clínicos (Clinical Trials, 2013).

Este tipo de agentes bloqueadores TGF- β administrados solos o en combinación con otros medicamentos pueden constituir un nuevo tipo de inmunoterapia, que podría revertir los efectos inmunosupresores de esta citocina en el huésped, así como disminuir la formación de matriz extracelular, la angiogénesis, la actividad osteolítica, incrementar la sensibilidad de las células malignas a terapias citotóxicas e inmunoterapias (Teicher, 2007), también contribuirían a reducir el tiempo de antibióticoterapia y/o permitiría un mejor control de enfermedades producidas por microorganismos resistentes a antibióticos (Toossi y Ellner, 1998).

3. Justificación

La participación de la citocina TGF- β en la respuesta inmunológica y su efecto inmunosupresor en distintas enfermedades infecciosas, la convierten en un importante blanco molecular. Los anticuerpos de dominio sencillo vNAR tienen un gran potencial en el área terapéutica y de diagnóstico, debido a que por su pequeño tamaño (12-16 kDa) presentan profunda penetración en tejidos densos y rápida eliminación del organismo. Estos dominios sencillos vNAR pueden ser expresados eficientemente en levaduras como proteínas activas y solubles. Sin embargo, para realización de estudios que garanticen su inocuidad y eficiencia, la pureza de la proteína es un punto clave.

Por lo tanto, en el presente trabajo, se propone estandarizar las condiciones de purificación para el fragmento de anticuerpo de dominio sencillo, obtenido del tiburón *H. francisci*, con capacidad de neutralizar la acción biológica de la citocina TGF- β , así como, demostrar su capacidad de reconocer a la citocina en lágrimas humanas y evaluar su citotoxicidad en hepatocitos.

4. Hipótesis

El sistema de expresión en *P. pastoris* permitirá la obtención del anticuerpo vNAR anti-TGF- β de forma activa y soluble, y al estandarizar la técnica de cromatografía de afinidad a metales será posible purificarlo, sin que su actividad se vea afectada.

5. Objetivos

5.1 General

Estandarizar las condiciones de purificación y evaluar la citotoxicidad de un anticuerpo de dominio sencillo (vNAR), aislado del tiburón *H. francisci*, neutralizante de la citocina TGF- β , con la finalidad de obtener un anticuerpo puro y biológicamente activo.

5.2 Específicos

- Expresar el anticuerpo vNAR neutralizante de la citocina TGF- β en la levadura *P. pastoris*.
- Estandarizar la condición óptima de purificación del anticuerpo vNAR neutralizante de la citocina TGF- β , mediante la técnica de cromatografía de afinidad a metales.
- Evaluar la capacidad de reconocimiento del anticuerpo vNAR por la citocina TGF- β humana empleando muestras de lágrimas humanas.
- Evaluar la citotoxicidad del anticuerpo vNAR neutralizante de la citocina TGF- β en cultivo primario de hepatocitos de ratón.

6. Materiales y métodos

Previamente, en el Laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Camacho-Villegas (2012) obtuvo un anticuerpo de dominio sencillo vNAR generado a partir de una biblioteca no inmune procedente de un tiburón *H. francisci*, con capacidad de reconocer y neutralizar *in vitro* a las isoformas 1, 2 y 3 de la citocina humana TGF- β . Este vNAR se denominó T-1 y fue expresado en *E. coli* con un rendimiento de 10 mg/L en bioreactor. En el presente trabajo, el anticuerpo vNAR anti-TGF- β se expresó en *P. pastoris*, se estandarizaron las condiciones de purificación, se determinó la capacidad de reconocimiento por la citocina en lágrimas humanas, y se evaluó la citotoxicidad en hepatocitos de ratón, a continuación se describen los métodos utilizados para cumplir estos objetivos.

6.1 Clonación y transformación en *Escherichia coli*

El gen codificante para el fragmento vNAR anti-TGF- β se obtuvo por síntesis química con codones optimizados para la levadura *P. pastoris* (GenScript, Piscataway), se introdujo en el vector pUC57 conteniendo sitios de restricción para las enzimas *XhoI* (CTCGAG), *XbaI* (TCTAGA) y *SacI* (GAGCTC). La longitud del gen sintético fue de 354 pares de bases.

Se transformaron por electroporación 50 μ L de células *E. coli* de la cepa DH5 α electrocompetentes con 150 ng de plásmido anti-TGF- β – pUC57 (GenScript), utilizando una celda de 2 mm (Molecular BioProducts™) y un electroporador MicroPulser™ (BioRad). Se dio un pulso eléctrico (2.5 kV) y las células se recuperaron en 3 mL de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 8.6 mM, KCl 2.5 mM, MgSO₄ 20 mM, glucosa 20 mM). El cultivo se incubó durante 1 hora a 37°C y 250 rpm. Se sembraron 10 μ L del cultivo en una placa con medio LB-LS agar (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%, agar 1.5%, pH 7.5) que contenía 100 μ g/mL de carbenicilina (Sigma-Aldrich), la placa se incubó 16 horas a 37°C.

Se seleccionó una colonia con resistencia a carbenicilina con la que se inocularon 10 mL de medio LB-LS conteniendo 100 µg/mL de carbenicilina y se incubó 16 horas a 37°C y 250 rpm. Al día siguiente, se extrajo el ADN plasmídico mediante lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001). El plásmido purificado fue evaluado en un gel de agarosa al 0.8% para determinar la integridad del ADN (80V, 500mA y 300W) y cuantificado por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm en un nodrop NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE).

Se transformaron por electroporación 50 µL de células *E. coli* de la cepa TOP10 electrocompetentes con 150 ng de plásmido pPICZαA (Invitrogen™), las células se recuperaron en 3 mL de medio SOC, este cultivo se incubó durante 1 hora a 37° C y 250 rpm. Se sembraron 10 µL en una placa con medio LB-LS agar suplementado con 25 µg/mL de zeocina (Promega). La placa se incubó a 37°C durante 16 horas. Se seleccionó una colonia con resistencia a zeocina con la que se inocularon 10 mL de medio LB-LS conteniendo 25 µg/mL de zeocina, este cultivo se incubó 16 horas a 37°C y 250 rpm. Al día siguiente se extrajo el ADN plasmídico mediante lisis alcalina, el plásmido purificado fue evaluado en un gel de agarosa al 0.8% para determinar la integridad del ADN y fue cuantificado mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm.

Se diseñaron y sintetizaron un par oligonucleótidos (Allele Biotech de México, Ensenada) para clonar el gen sintético *anti-TGF-β* después del sitio de corte Kex2 (secuencia para el procesamiento del factor α en el vector pPICZαA). Estos oligonucleótidos se denominaron TGFbOptF y TGFbOptR (Tabla 1). Al oligonucleótido sentido (TGFbOptF) se le añadió el sitio de restricción de la enzima *XhoI* (necesario para clonar la proteína de interés con el extremo amino terminal nativo), seguido de la secuencia para reconocer el sitio de corte Kex2 (secuencia para el procesamiento del factor α en el vector pPICZαA para la secreción de la proteína recombinante clonada). El oligonucleótido reverso (TGFbOptR), incluyó el sitio restricción de la enzima *XbaI* y se le añadieron un par de bases para que quedara en fase con el epítipo c-Myc.

Se realizó un PCR con gradiente de temperatura (50, 52, 54, 56, 58 y 60°C) utilizando el plásmido anti-TGF-β purificado y los oligonucleótidos TGFbOptF y TGFbOptR, para amplificar el fragmento de ~ 354 pb, siguiendo las condiciones mencionadas en la Tabla

2. Los productos de PCR se evaluaron en un gel de agarosa al 2%, las muestras que amplificaron un fragmento de ~ 354 pb se mezclaron (~ 150 µl) y se purificaron con el kit QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN®) siguiendo las recomendaciones del fabricante y se eluyeron en 50 µL de buffer EB (Tris-Cl 10 mM, pH 8.5).

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en la reacción de PCR.

Nombre	Sentido	Secuencia
TGFbOptF	5' → 3'	CCGCTCGAGAAAAGAGCATCCTTGGACCAGACCCCTAG
TGFbOptR	3' → 5'	GCTCTAGAGCGTTGACAGTAAGGACGGTTCCGGC
5'AOX1	5' → 3'	CCGCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGCTTCACTTGA CCAGAACTTTGAG
3'AOX1	3' → 5'	GCTCTAGAGATTTGGCTTTGGAGATGGTTTTCTCG

Tabla 2. Condiciones del PCR con gradiente de temperatura.

Numero de ciclos	Temperatura °C	Tiempo
1	95	2 minutos
30	95	1 minuto
	52 - 60	1 minuto
	72	1 minuto
1	72	5 minutos

El producto de PCR y el plásmido pPICZαA se digirieron con las enzimas *XhoI* y *XbaI* (Promega) a 37°C durante 15 horas. La reacción de digestión del plásmido pPICZαA se

cargó en un gel preparativo de agarosa al 1.2%. El fragmento correspondiente al vector digerido en ambos sitios de corte se extrajo del gel y se limpió utilizando el kit QIAquick® Gel Extraction Kit (QUIAGEN). La reacción de digestión del producto de PCR se purificó con el kit QIAquick® PCR Purification Kit y se eluyó en 25 µL de buffer EB. El producto de PCR y el plásmido pPICZαA digeridos y limpios, se evaluaron en un gel de agarosa al 1.5% y fueron cuantificados mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm.

El inserto anti-TGF-β (producto de PCR digerido y purificado) se ligó al plásmido pPICZαA digerido utilizando la enzima T4 DNA Ligasa (Promega), en una relación 3:1 inserto-vector. La reacción se incubó 12 horas a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de ligación la enzima se desactivó a 70°C por 10 minutos.

Empleando 2 µL de la reacción de ligación, se electroporaron 50 µL de células *E. coli* DH5α electrocompetentes. Las células se recuperaron en 3 mL de medio SOC. El cultivo se incubó durante 1 hora a 37°C y 250 rpm, se sembraron 1, 10 y 100 µL en placas con medio LB-LS agar suplementado con 25 µg/mL de zeocina, las placas se incubaron a 37°C hasta el crecimiento de las colonias aisladas.

Se seleccionaron 7 colonias al azar, con las que se inocularon 5 mL de medio LB-LS conteniendo 25 µg/mL de zeocina. Los cultivos se incubaron 16 horas a 37°C y 250 rpm. Al día siguiente, se extrajo el ADN plasmídico mediante lisis alcalina, el plásmido purificado fue evaluado en un gel de agarosa al 0.8% para determinar la integridad del ADN y cuantificado mediante espectrofotometría.

Se realizó un PCR de colonia utilizando el plásmido purificado de las 7 colonias y los oligonucleótidos 5'AOX1 y 3'AOX1 (Tabla 1). Las condiciones del PCR fueron las mismas que las mencionadas en la Tabla 2, utilizando una temperatura de alineamiento de 54°C. Los productos de PCR se evaluaron en un gel de agarosa al 2%. Al azar, se seleccionaron dos de las colonias positivas y se aislaron los plásmidos mediante lisis alcalina. Se obtuvo la secuencia para verificar que el inserto se mantenía en fase (SeqXcel®, San Diego). Los datos obtenidos se analizaron con el software MultAlin (Corpet).

6.2 Transformación en *Pichia pastoris* (SMD1168)

Se empleó la cepa SMD1168 para la transformación con el vector pPICZαA que contenía el anti-TGF-β. El plásmido pPICZαA - anti-TGF-β (20 µg/µL) se linealizó utilizando 10 U de enzima *SacI* (Promega), en un volumen de reacción de 60 µL, la reacción se llevó a cabo por 15 horas a 37°C. El vector se purificó con fenol-cloroformo, se precipitó con acetato de sodio 3 M, pH 5.2 (1/10 volumen) y 2 volúmenes de etanol al 100%, se incubó a -20° C durante 30 minutos, se realizó un lavado con etanol al 70% frío y se resuspendió en 15 µL de agua desionizada estéril. El plásmido se evaluó en un gel de agarosa al 0.8%, se cuantificó mediante espectrofotometría y se almacenó a -20°C hasta su empleo posterior.

Se prepararon células electrocompetentes SMD1168 de acuerdo a lo descrito en el manual EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Invitrogen). Se electroporaron 80 µL de células electrocompetentes con 10 µg del vector pPICZαA - anti-TGF-β linealizado en celdas de 0.2 cm. Se dio un pulso eléctrico (2.0 kV). Las células se recuperaron en 1 mL de sorbitol 1M, se incubaron 1 hora a 37°C, después se agregó 1 mL de medio YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%) y se incubaron por 2 horas a 30°C y 250 rpm. Se sembraron 150 y 250 µL en placas con medio YPDS (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%, sorbitol 1M) conteniendo 100 µg/mL de zeocina. Las placas se incubaron a 30°C durante 5 días, hasta que se observaron colonias aisladas. Se resembraron 20 colonias aisladas y se incubaron bajo las mismas condiciones.

Se seleccionaron 2 colonias aisladas. Se picaron con un palillo estéril y se colocaron en 10 µL de agua desionizada estéril, se adicionaron 5 µL de liticasa (5 U/µL) (Sigma-Aldrich), se incubaron 20 minutos a 30°C, 10 minutos a 37°C y posteriormente 20 minutos a -80°C. Se verificó la presencia del inserto por medio de un PCR (Tabla 3) utilizando los oligonucleótidos 5'AOX1 y 3'AOX1 (Tabla 1) y 4 µL de la colonia tratada con liticasa. Los productos de PCR se evaluaron en un gel de agarosa al 2%. Una vez verificada la presencia del inserto, el plásmido se purificó mediante lisis alcalina y se obtuvo la secuencia (SeqxCel®, San Diego). Los datos obtenidos se analizaron con el software MultAlin.

6.3 Expresión del anticuerpo vNAR en *Pichia pastoris*

Partiendo de una colonia aislada de *P. pastoris* SMD1168 transformada con el vector pPICZαA-anti-TGF-β, se inocularon 5 mL de medio YPD suplementado con 100 µg/mL de zeocina (pre-inóculo), se incubó 16 horas a 30° C y 250 rpm.

Se inocularon 2 matraces Fernbach de 2.8 L conteniendo 620 mL de medio BMGH (buffer de fosfatos 100 mM (pH 6.0), YNB 1.34%, biotina $4 \times 10^{-5}\%$, glicerol 1%, histidina $4 \times 10^{-3}\%$) con 2 mL de pre-inóculo, se incubaron a 30°C y 250 rpm, hasta que la densidad óptica a 600 nm fue de 4.

El cultivo se repartió en tubos Falcón de 50 mL, que se centrifugaron 5 minutos a 1,500 g y 4°C. El sobrenadante se descartó y el proceso se repitió hasta tener 100 mL de células en cada tubo. El precipitado se lavó con 50 mL de H₂O estéril. Las células se resuspendieron y se centrifugaron 5 minutos a 1,500 g y 4° C. El sobrenadante se descartó. El precipitado celular fue resuspendido en 20 mL de medio BMMH (buffer de fosfatos 100 mM (pH 6.0), YNB 1.34%, biotina $4 \times 10^{-5}\%$, metanol 0.5%, histidina $4 \times 10^{-3}\%$). Este volumen fue colocado en matraces bafleados estériles de 250 mL, a los cuales se les añadió 2% de metanol y se incubaron a 30°C y 250 rpm. Se añadió metanol a una concentración final de 2% a las 12, 24, 48, 60 y 72 horas de cultivo. Después de 12 horas de la última adición de metanol, el cultivo se colectó en tubos Falcón de 50 mL y fue centrifugado por 5 minutos a 1,500 g . El sobrenadante se colectó y se almacenó a -20°C.

6.4 Purificación del anticuerpo vNAR por cromatografía de afinidad a metales

El sobrenadante obtenido de 10 inducciones de la expresión del anticuerpo fue purificado mediante cromatografía de afinidad a metales, siguiendo las condiciones previamente estandarizadas en el Laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas del CICESE.

Se utilizó 1 mL de resina Ni-NTA agarosa (QIAGEN®), que se colocó en una columna de purificación de 10 mL (BioRad). La columna se equilibró con 20 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol (imidazol 20 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300

mM, pH 8).

Antes de purificar el sobrenadante, se le ajustó al sobrenadante el pH a 8 y se centrifugó 20 minutos a 10,150 $\times g$. Se pasó por gravedad a través de la columna (3 veces el volumen total). Se realizó un lavado con 15 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol. Se realizaron 5 eluciones de 500 μ L con buffer de elución (imidazol 250 mM, NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8). Al añadir el buffer de elución la columna se tapó y se dejó reposar 5 minutos entre elución, transcurrido el tiempo la columna se destapó y las eluciones se colectaron en tubos estériles de 1.5 mL. Se realizó un lavado final con 20 mL de buffer. Todas las eluciones 1, todas la eluciones 2, hasta la elución 5 se juntaron. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su análisis posterior.

6.4.1 Estandarización de las condiciones de purificación del anticuerpo vNAR

Se evaluaron 5 condiciones distintas para purificar el anticuerpo vNAR anti-TGF- β , en la que se emplearon distintas concentraciones de imidazol presente en el buffer de lavado y distintos volúmenes de lavado. Todas las purificaciones se realizaron con 1 mL de resina Ni-NTA agarosa colocada en una columna de purificación de 10 mL y utilizando 200 mL de sobrenadante.

Previo a la purificación, la resina se equilibró con 20 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol. A los sobrenadantes se les ajustó el pH a 8, se pasaron por gravedad a través de la columna (3 veces el volumen total). Al final de las eluciones se realizó un lavado con 15 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol.

La primera purificación consistió de un lavado con 50 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol. Se realizó un segundo lavado con 50 mL de buffer de lavado conteniendo 35 mM de imidazol (imidazol 35 mM, NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8). Se realizaron 5 eluciones de 500 μ L con buffer de elución, al añadir el buffer de elución la columna se tapó y se dejó reposar 5 minutos entre elución. Transcurrido este tiempo la columna se destapó y las eluciones se colectaron en tubos estériles de 1.5 mL.

La segunda purificación consistió de un lavado con 100 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol. Se realizó un segundo lavado con 80 mL de buffer de lavado conteniendo 10 mM de imidazol (imidazol 10 mM, NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8). Se realizaron 5 eluciones de 500 μL con buffer de elución, al añadir el buffer de elución la columna se tapó y se dejó reposar 5 minutos entre elución, transcurrido el tiempo la columna se destapó y las eluciones se colectaron en tubos estériles de 1.5 mL.

La tercera purificación consistió de un lavado con 30 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol. Se realizó un segundo lavado con 30 mL de buffer de lavado conteniendo 35 mM de imidazol. Se realizaron 5 eluciones de 500 μL con buffer de elución, al añadir el buffer de elución la columna se tapó y se dejó reposar 5 minutos entre elución. Transcurrido este tiempo la columna se destapó y las eluciones se colectaron en tubos estériles de 1.5 mL.

La cuarta purificación consistió de un lavado con 15 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol. Se realizó un segundo lavado con 10 mL de buffer de lavado conteniendo 50 mM de imidazol (imidazol 50 mM, NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8). Se realizaron 5 eluciones de 500 μL con buffer de elución, al añadir el buffer de elución la columna se tapó y se dejó reposar 5 minutos entre elución. Transcurrido este tiempo la columna se destapó y las eluciones se colectaron en tubos estériles de 1.5 mL.

La quinta purificación consistió de un lavado con 15 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol. Se realizó un segundo lavado con 10 mL de buffer de lavado conteniendo 100 mM de imidazol (imidazol 100 mM, NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8). Se realizaron 5 eluciones de 500 μL con buffer de elución, al añadir el buffer de elución la columna se tapó y se dejó reposar 5 minutos entre elución. Transcurrido este tiempo la columna se destapó y las eluciones se colectaron en tubos estériles de 1.5 mL.

6.4.2 Purificación del anticuerpo vNAR con condiciones estandarizadas

Las 5 eluciones de sobrenadantes previamente purificados (Sección 6.4) se juntaron,

se dializaron (Sección 6.6) y se les ajustó el pH a 8. La purificación se realizó utilizando 1 mL de resina Ni-NTA agarosa, la columna se equilibró con 20 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol. El volumen total se pasó 5 veces a través de la columna. Se hizo un lavado con 15 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol, seguido de un lavado de 10 mL con buffer de lavado conteniendo 50 mM de imidazol. Se realizaron 5 eluciones de 500 μ L con buffer de elución, al añadir el buffer de elución la columna se tapó y se dejó reposar 5 minutos entre elución. Transcurrido este tiempo la columna se destapó y las eluciones se colectaron en tubos estériles de 1.5 mL. Al final de las eluciones se realizó un lavado con 15 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol.

La elución 2 se dializó de acuerdo con lo descrito en la Sección 6.6, y se juntó con las eluciones mencionadas en la Sección 6.4. Estas eluciones se purificaron 8 veces más realizando 2 lavados, el primero con 20 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol y el segundo con 10 mL de buffer de lavado conteniendo 50 mM de imidazol. Se realizaron 5 eluciones de 500 μ L con buffer de elución, al añadir el buffer de elución la columna se tapó y se dejó reposar 5 minutos entre elución. Transcurrido este tiempo la columna se destapó y las eluciones se colectaron en tubos estériles de 1.5 mL. Al final de las eluciones se realizó un lavado con 15 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol.

Al sobrenadante de nuevas inducciones se les ajustó el pH a 8, el volumen se pasó 3 veces por la columna, la purificación se realizó bajo las condiciones anteriormente mencionadas. El sobrenadante purificado, se re-purificó 2 veces más con las mismas condiciones. Todas las eluciones 1, todas la eluciones 2, hasta la elución 5 se juntaron.

6.5 Análisis de la expresión del anticuerpo vNAR

6.5.1 Preparación de muestras

Se tomaron 2 muestras de 1 mL de los lavados en cada paso de la purificación, del sobrenadante sin purificar y del sobrenadante purificado. A cada 1 mL se le agregaron 175 μ L de ácido tricloroacético (TCA 100%) para precipitar las proteínas totales. Se incubó 16 horas a 4°C. Posteriormente, se centrifugó 25 minutos a 4°C y 13,000 rpm. El

sobrenadante se decantó y el precipitado se lavó con 1 mL de acetona fría. Se centrifugó nuevamente por 25 minutos a 4°C y 13,000 rpm. El precipitado se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 25 µL de buffer de carga SDS-PAGE 2X. Las muestras de lavado y sobrenadantes analizadas correspondieron a un volumen de 500 µL. Las muestras se desnaturalizaron a 95°C por 10 minutos. Se tomaron 15 µL de cada elución, se mezclaron con 15 µL de buffer de carga 2X (SDS 4%, glicerol 20%, Tris-HCl 125 mM (pH 6.8), azul de bromofenol 0.05%, 2-mercaptoetanol 10%). Las muestras se desnaturalizaron a 95°C por 10 minutos.

6.5.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12% siguiendo el protocolo propuesto por Sambrook y Russell (2001). Las condiciones de corrida fueron 50 mA con un voltaje constante de 150 Volts, hasta que el frente de azul de bromofenol alcanzó la base del gel. Los geles se tiñeron con solución de tinción (Coomassie brilliant blue R-250 0.1%, metanol 50%, ácido acético glacial 10%) toda la noche a temperatura ambiente y agitación constante. El gel se destiñó con solución de desteñido (etanol 40%, ácido acético 10%) hasta obtener el contraste deseado. Los geles se secaron en el desecador Gel Dryer (BioRad) a 80°C durante 1 hora. Se fotodocumentaron digitalmente.

6.5.3 Inmunodetección del anticuerpo vNAR (Western blot)

Los geles de poliacrilamida al 12% se transfirieron mediante electrotransferencia semi-seca con el sistema Semi-Dry Electrobloetter (CLP) a una membrana de nitrocelulosa Trans-Blot® Transfer medium 0.45 µm (BioRad). Se utilizó buffer de transferencia semi-seca (tris-base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, pH 8.3) para humedecer por 10 minutos 6 papeles filtro, el gel de poliacrilamida al 12% y la membrana de nitrocelulosa. La transferencia se realizó por 1 hora a 200 mA constantes y un voltaje de 20 Volts. La membrana se incubó 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante en solución de bloqueo (leche 5%–PBS 1X–Tween 0.05%). Se descartó la solución y se agregó el anticuerpo anti-c-Myc (Roche) diluido 1:1000 en leche descremada 3%–PBS 1X–Tween 0.05%. Se incubó 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.

Terminado el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X–Tween 0.05%. Para el revelado por quimioluminiscencia se utilizó el kit ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific™). Se siguieron las recomendaciones del fabricante y se utilizaron placas de fotografía BioMax Light Film for Chemiluminescent Imaging (Kodak). Para el revelado por colorimetría se utilizó el kit DAB Substrate (Thermo Scientific™), se siguieron las recomendaciones del fabricante. Las imágenes se fotodocumentaron digitalmente.

6.6. Diálisis

Las eluciones se dializaron contra PBS 1X (NaCl 131 mM, KCl 2.1 mM, Na₂HPO₄ 12 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM) en un casete de diálisis Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette G2, 7,000 MWCO (Thermo Scientific™) para volúmenes de 1.5 a 3 mL, o en una membrana tubular Snake Skin Dialysis Tubing, 3,500 MWCO (Thermo Scientific™) para volúmenes mayores a 3 mL. Las muestras se dializaron en una relación de volumen 1:300 (muestra:PBS 1X). Se colocaron en un agitador magnético por 2 horas a temperatura ambiente, después se realizó un recambio de PBS 1X, la membrana nuevamente se colocó en el agitador magnético por 2 horas a temperatura ambiente. Se realizó un último recambio de PBS 1X y se colocó en el agitador magnético toda la noche a 4°C. Al día siguiente, la muestra se colectó y almacenó a -20°C hasta su empleo posterior.

6.7 Concentrado del anticuerpo vNAR purificado

Las eluciones dializadas se concentraron utilizando filtros para centrífuga Amicon Ultra-15 de 3,000 MWCO (Millipore), se centrifugaron en un rotor de ángulo fijo a 4,500 xg durante 40 minutos (15 mL), el tiempo varió en función del volumen de la muestra.

6.8 Cuantificación de proteína con ácido bicinonínico (BCA)

La cuantificación de proteína se realizó con el kit Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™). Se empleó el protocolo para placa ELISA siguiendo las recomendaciones

del fabricante, la cuantificación se realizó a 562 nm en un espectrofotómetro para microplacas Multiskan (Thermo Scientific™). Se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) como referencia para graficar una curva estándar de comparación, se trazó una línea de tendencia y se calculó la ecuación de la recta utilizando el programa Excel (Microsoft, 2010). Los valores de absorbancia de las muestras analizadas se sustituyeron en la ecuación para determinar la concentración y se multiplicó por el factor de dilución empleado.

6.9 Reconocimiento del anticuerpo vNAR por la citocina TGF- β

6.9.1 ELISA de reconocimiento del vNAR por la citocina TGF- β 2

Se utilizó la isoforma 2 de la citocina TGF- β (PeproTech) para realizar un inmunoensayo ligado a enzima, con el fin de determinar si era reconocida por el anticuerpo vNAR anti-TGF- β expresado en *P. pastoris*.

Se colocaron por triplicado 190 ng/pozo de citocina TGF- β 2, en un volumen final de 50 μ L, en una placa ELISA de 96 pozos (Costar) que se incubó durante 24 horas a 4°C. Al día siguiente se descartó el contenido de la placa, los pozos se bloquearon con 150 μ L de BSA 3%–PBS 1X, y la placa se incubó por 2 horas a 37°C. La solución se descartó y se agregó a cada pozo 44 μ g de proteína vNAR anti-TGF- β purificada y dializada, en un volumen de 50 μ L. La placa se incubó durante 24 horas a 4°C. La solución se descartó, los pozos se lavaron tres veces con PBS 1X–Tween 0.05% y se agregaron 50 μ L del anticuerpo primario anti-vNAR (Genway) diluido 1:1000 en BSA 1%–PBS 1X, la placa se incubó por 2 horas a 37°C. La solución se descartó, los pozos se lavaron tres veces con PBS 1X–Tween 0.05%, se añadieron 50 μ L del anticuerpo secundario RYA-HRP (Genway) diluido 1:1000 en BSA 1%–PBS 1X, la placa se incubó por 2 horas a 37°C. La solución se descartó, los pozos se lavaron tres veces con PBS 1X–Tween 0.05%, se añadieron 50 μ L de solución de revelado TMB Liquid substrate system for ELISA (Sigma-Aldrich), a los 7 minutos la reacción se detuvo añadiendo 50 μ L de 2N ácido hidrociorhídrico. La placa se leyó en un espectrofotómetro para microplacas Multiskan a 450 nm. Se utilizó BSA al 1% como control negativo de reconocimiento.

6.9.2 ELISA de reconocimiento del anticuerpo vNAR por TGF- β de lágrimas humanas

Con la finalidad de determinar si el anticuerpo vNAR anti-TGF- β tiene la capacidad de reconocer a la citocina presente en muestras biológicas se realizó un Western blot con lágrimas humanas. Para lo cual, se colectaron 8 mL de lágrimas, donadas por 4 personas sin enfermedad ocular aparente, utilizando una pipeta pasteur de plástico estéril. Las lágrimas se concentraron utilizando filtros para centrifuga Amicon Ultra-15 de 3,000 MWCO. La proteína total de la lágrima se cuantificó de acuerdo con lo descrito en la Sección 6.8. Las lágrimas se acidificaron utilizando ácido clorhídrico 1 N hasta llevarlas a un pH de 3 y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, con el fin de activar a la citocina TGF- β . Terminado el tiempo de incubación se neutralizaron con NaOH 1 N.

Se colocaron por triplicado en una placa ELISA 4,500 μ g/pozo de proteínas totales presentes en las lágrimas concentradas y 77.44 μ g/pozo de proteínas totales presentes en las lágrimas sin concentrar, ambas en un volumen final de 50 μ L. La placa se incubó durante 24 horas a 4°C. Al día siguiente, se descartó el contenido de la placa. Los pozos se bloquearon con 150 μ L de BSA 3%–PBS 1X, y la placa se incubó por 2 horas a 37°C. La solución se descartó y se agregó a cada pozo 44 μ g de proteína vNAR anti-TGF- β purificada y dializada en un volumen final de 50 μ L. La placa se incubó durante 24 horas a 4°C. Después del tiempo de incubación, la solución se descartó y los pozos se lavaron tres veces con PBS 1X–Tween 0.05% y se agregaron 50 μ L del anticuerpo primario anti-vNAR (Genway) diluido 1:1000 en BSA 1%–PBS 1X. La placa se incubó por 2 horas a 37°C. Después del tiempo de incubación la solución se descartó y los pozos se lavaron tres veces con PBS 1X–Tween 0.05%, se añadieron 50 μ L del anticuerpo secundario RYA-HRP (Genway) diluido 1:1000 en BSA 1%–PBS 1X. La placa se incubó por 2 horas a 37°C. La solución se descartó, los pozos se lavaron tres veces con PBS 1X–Tween 0.05%, se añadieron 50 μ L de solución de revelado TMB Liquid substrate system for ELISA, a los 7 minutos la reacción se detuvo añadiendo 50 μ L de ácido hidroclorehídrico 2N. La placa se leyó en un lector de placas ELISA a 450 nm. Se utilizó BSA al 1% como control negativo de reconocimiento.

6.9.3 Inmunodetección de TGF- β en lágrimas humanas

Se emplearon lágrimas humanas concentradas, sin activar, para determinar si con un método colorimétrico era visible el reconocimiento por el anticuerpo vNAR anti-TGF- β de dominio sencillo de tiburón expresado en *P. pastoris*.

Se realizó un gel de poliacrilamida al 12%, en el que se cargaron 50 μ L de lágrima concentrada (4,500 μ g de proteína total) mezclada con 50 μ L de buffer de carga SDS-PAGE 2X. La muestra se desnaturalizó a 95°C por 10 minutos. Las condiciones de corrida fueron 50 mA con un voltaje constante de 150 Volts, hasta que el frente de azul de bromofenol alcanzó la base del gel. La electrotransferencia se realizó de acuerdo a los parámetros descritos en la Sección 6.5.3. La membrana se bloqueó 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante en solución de bloqueó (leche 5%–PBS 1X–Tween 0.05%). Se descartó la solución y la membrana se colocó toda la noche a 4°C en leche descremada 3%–PBS 1X–Tween 0.05% conteniendo 0.0875 μ g/mL de anticuerpo vNAR anti-TGF- β . La membrana se lavó con PBS 1X–Tween 0.05% y se colocó toda la noche a 4°C en leche descremada 3%–PBS 1X–Tween 0.05% conteniendo el anticuerpo anti-c-Myc (Roche) en dilución 1:1000. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X–Tween 0.05%, y se reveló por colorimetría utilizando el kit DAB Substrate. La imagen se fotodocumentó digitalmente.

6.10 Ensayo de citotoxicidad en cultivo primario de hepatocitos

Con la finalidad de probar la toxicidad del anticuerpo vNAR anti-TGF- β en hígado de ratones, órgano con función desintoxicante. Se sacrificaron por dislocación cervical (norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999) 2 ratones Balb-c machos de 20 gr. Se trabajó en una campana de bioseguridad clase II, tipo A2 (Labconco). Se realizó una incisión abdominal en forma de “V” y se localizó el hígado, se extrajeron y se colocaron en una placa de cultivo celular (Corning).

Para disgregar las células se agregaron 10 mL de solución de collagenasa tipo IA (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 5 U por gramo de ratón. La placa se mezcló con agitación manual durante 5 minutos, las células se maceraron ligeramente con el émbolo de una jeringa estéril y se incubaron 15 minutos a 37°C y 5% de CO₂ sin

agitación. El órgano se maceró nuevamente con el émbolo de una jeringa, se pasó a través de un colador estéril y el sobrenadante se colocó en un tubo Falcón de 50 mL. La placa de cultivo que contenía el órgano se enjuagó con solución Hank's sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). El sobrenadante contenido en el tubo se llevó a un volumen final de 30 mL, que se repartió en 2 tubos de 50 mL estériles.

Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 4,000 rpm y temperatura ambiente. Se generó un botón celular que correspondía a las células disgregadas, mientras que en el sobrenadante se encontraba el tejido conectivo. El sobrenadante se descartó. El paquete celular se lavó con 15 mL solución Hank's y se centrifugó durante 5 min a 4,000 rpm. El sobrenadante se descartó. El paquete celular se lavó nuevamente con 15 mL de solución Hank's, se centrifugó durante 5 minutos a 4,000 rpm. El sobrenadante se descartó. Al paquete celular de cada tubo se le agregaron 3 mL de medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con SFB al 10% y 1% de solución antibiótico-antimicótico. El contenido de cada tubo se repartió en 2 placas de cultivo celular conteniendo cada una 18 mL de medio RPMI, las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% de CO_2 .

Al día siguiente, el sobrenadante de cada placa se colectó en un tubo de 50 mL estéril. Las cajas se enjuagaron con 500 μL de medio HSS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} que se juntó con el sobrenadante. A cada placa se le agregaron 500 μL de tripsina-EDTA 1X (ATCC), las placas se incubaron 5 minutos a 37°C, se enjuagaron y se colectó el sobrenadante. Las placas se lavaron nuevamente con 1 mL de medio HBSS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} . Los dos tubos que contenían el sobrenadante se centrifugaron 5 minutos a 4,000 rpm. El sobrenadante se descartó manteniendo un volumen de aproximadamente 5 mL por tubo. El precipitado de uno de los tubos se resuspendió y se vertió al otro tubo, se centrifugó durante 5 minutos a 4,000 rpm y el sobrenadante se descartó.

El botón celular se resuspendió en 1 mL de medio RPMI. Se tomaron 10 μL del homogenizado celular que se colocaron en un tubo de 0.6 mL estéril, al que se le añadieron 10 μL de colorante TC10 azul tripano 0.4% (BioRad), se homogeneizó y se tomaron 10 μL que se colocaron en una cámara de Neubauer Bright Line Counting

Chamber (Hausser scientific). El conteo celular se realizó siguiendo el protocolo establecido por el fabricante en un microscopio óptico CKX41 (Olympus).

En una placa ELISA de 96 pozos de fondo plano (Costar) se colocaron 35,000 células por pozo y por duplicado, en un volumen final de 200 μ L con medio RPMI suplementado con 10% de SFB y solución de antibiótico-antimicótico 1%. La placa se incubó durante 20 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Se colocaron por duplicado concentraciones de 0.06, 0.125, 0.250, 0.500, 1 y 1.5 μ g/ μ L de anticuerpo vNAR anti-TGF- β . Se prepararon 2 placas, una se incubó durante 24 horas y otra por 48 horas, ambas placas se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Se utilizó como control positivo un triplicado de 35,000 células por pozo en medio RPMI sin tratamiento.

Pasado el tiempo del tratamiento, las placas se centrifugaron durante 5 minutos a 4,000 rpm, se retiraron de la placa 150 μ L de medio y se añadieron 150 μ L de medio RPMI nuevo. Se cuantificó la supervivencia celular usando 40 μ L por pozo de reactivo Cell Titer 96 (Promega). Las placas se incubaron por 2 horas a 37°C y 5% de CO₂ y se leyó la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro para microplacas Epoch (BioTek).

7. Resultados

7.1 Clonación y transformación en *Escherichia coli*

La secuencia del gen *anti-TGF- β* , que corresponde al fragmento de anticuerpo vNAR aislado del tiburón, se sintetizó químicamente con codones optimizados para *P. pastoris*. En la Figura 8, se muestra la secuencia del gen *anti-TGF- β* optimizada comparada con la secuencia original del gen. Se modificó aproximadamente el 66% de la secuencia genética original, en color rojo se muestran las bases que fueron modificadas en el gen optimizado.

anti TGF- β optimizado	1	GCATCCTTGGACCAGACCCCTAGAACAGCCACCAGAGAAACCGGAGAACTACTTAGTATT
anti TGF- β original	1	GCAAGCCTGGACCAAACACCAAGAACGGCAACGAGAGAGACAGGCGAATCCCTGAGCATT
anti TGF- β optimizado	61	AACTGCGTTTTGACCGACACCTCACACATTTTGTTGGTACAAGTGGTTCTGGAACAAT
anti TGF- β original	61	AACTGCGTCCTCACTGATACTAGCCATATTTTGTTTCGGCACAAAATGGTTCTGGAATAAT
anti TGF- β optimizado	121	CCAGGATCAACTGATTGGGAAAGTATTACAATCGGTGGAAGATACGTTGAGTCTGTCAAC
anti TGF- β original	121	CCGGGTTC AACAGATTGGGAAAGCATAACGATTGGCGGACGATATGTTGAATCAGTCAAC
anti TGF- β optimizado	181	AATCAGGCTAAGTCTTTTCCTTGCAGATTAAAGATCTTACCGTTGAAGACTCCGGTACT
anti TGF- β original	181	AACCAAGCAAAGTCATTTTCTCTGCAAATCAAGGACCTGACAGTTGAAGACAGTGGCACC
anti TGF- β optimizado	241	TACTATTGTAAGGCTCAAACTATCGGTAGAAGAAAAAGAGGACCTCTTGCCCTCTTTGGCA
anti TGF- β original	241	TATTACTGCAAAGCGCAAACCATAGGAAGACGCAAACGTGGTCCTTTGGCCTCCTTAGCT
anti TGF- β optimizado	301	GCAATGATGGGATCTTCAGACTATTATGGAGCCGGAACCGTCCTTACTGTCAAC
anti TGF- β original	301	GCGATGATGGGCTCCAGTGACTACTACGGAGCTGGCACCCTGCTGACTGTGAAC

Figura 8. Alineamiento de secuencias del gen *anti-TGF- β* original y optimizado. Secuencia del gen *anti-TGF- β* con codones optimizados para *P. pastoris* alineada con la secuencia del gen *anti-TGF- β* (vNAR nativo). En rojo se observan las bases modificadas en la secuencia optimizada.

El plásmido anti-TGF- β transformado en células *E. coli* DH5 α y el plásmido pPICZ α A transformado en células *E. coli* TOP10 fueron purificados mediante lisis alcalina y evaluados en un gel de agarosa al 0.8% para determinar la integridad del ADN. En la Figura 9, se muestra la imagen del plásmido anti-TGF- β purificado (9A) y del plásmido pPICZ α A purificado (9B). Se observan las tres bandas correspondientes al plásmido: superenrollado, enrollado y relajado (Kado y Liu, 1981). Se obtuvieron 3,855 ng/ μ L y 5,095 ng/ μ L respectivamente.

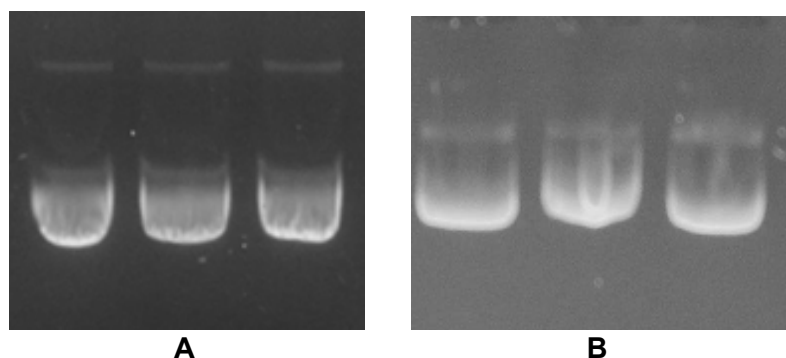


Figura 9. Plásmidos anti-TG- β y pPICZ α A purificados. Geles de agarosa al 0.8% para evaluar la integridad del ADN del: A) Plásmido anti-TGF- β purificado y B) Plásmido pPICZ α A purificado. Se observan las bandas del plásmido: superenrollado, enrollado y relajado.

Con el propósito de evaluar los oligonucleótidos TGFbOptF y TGFbOptR (Tabla 1) se realizó un PCR con gradiente de temperatura. En la Figura 10, se muestra la imagen del gel de agarosa al 2% en el que se evaluó la amplificación del fragmento anti-TGF- β de ~354 pb, se observa que el fragmento amplificó a las distintas temperaturas empleadas (carril 2-7). Se utilizó como marcador molecular una escalera de 100 pb (Axygen) (carril 1) y un control negativo de la reacción que no contenía el plásmido anti-TGF- β (carril 8).

En la Figura 11, se muestra la imagen del gel de agarosa al 1.2%, donde se evaluó la doble digestión del plásmido pPICZ α A purificado, utilizando las enzimas *Xho*I y *Xba*I. En el carril 1, se observa la digestión del plásmido pPICZ α A purificado, el carril 2 corresponde al plásmido pPICZ α A sin digerir, se utilizó como marcador molecular una

escalera de 1 Kb (Axygen) (carril 3). La banda 1 se cortó del gel y se limpió con el kit de extracción de gel QIAquick® Gel Extraction.

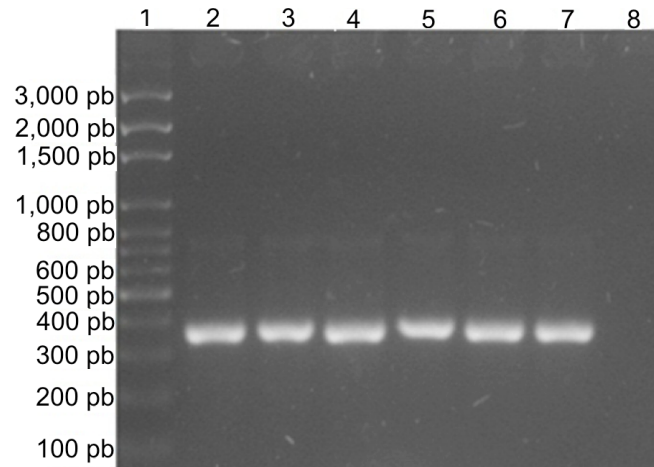


Figura 10. PCR con gradiente de temperatura para evaluar oligonucleótidos TGFbOptF y TGFbOptR. Gel de agarosa al 2%. En el carril 1, escalera de 100 pb; carril 2 al 7, fragmentos anti-TGF- β de ~354 pb que amplificaron a las temperaturas de 50, 52, 54, 56, 58 y 60°C respectivamente; carril 8, control negativo de la reacción.

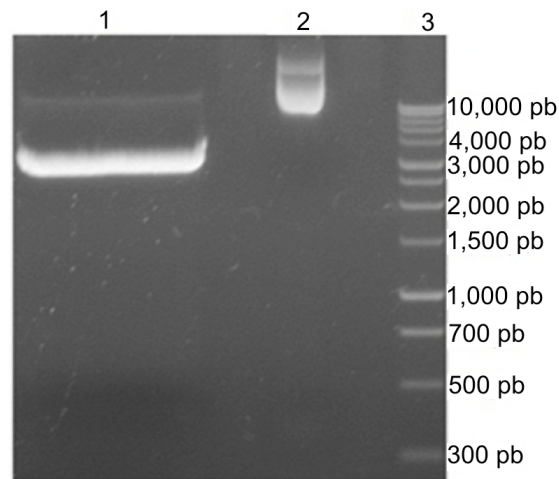


Figura 11. Doble digestión del plásmido pPICZ α A purificado. Gel de agarosa al 1.2%. En el carril 1, plásmido digerido con las enzimas *Xho*I y *Xba*I; carril 2, plásmido sin digerir; carril 3, escala 1 kb.

En la Figura 12, se muestra la imagen del gel de agarosa al 1.5%, donde se evaluó la

doble digestión de los productos de PCR y del plásmido pPICZαA. El carril 1 corresponde al producto de PCR sin digerir, en el carril 2 se observa el producto digerido con las enzimas *XhoI* y *XbaI*, se utilizó como marcador molecular una escalera de 1 kb (carril 3), en el carril 4 se observa el plásmido pPICZαA purificado, el carril 5 corresponde al plásmido pPICZαA digerido con las enzimas *XhoI* y *XbaI* y limpio (carril 5), se utilizó como control positivo plásmido pPICZαA sin digerir (carril 4). Se obtuvieron 97.5 ng/μL del producto de PCR digerido y purificado y 69.5 ng/μL del plásmido pPICZαA digerido y limpio.

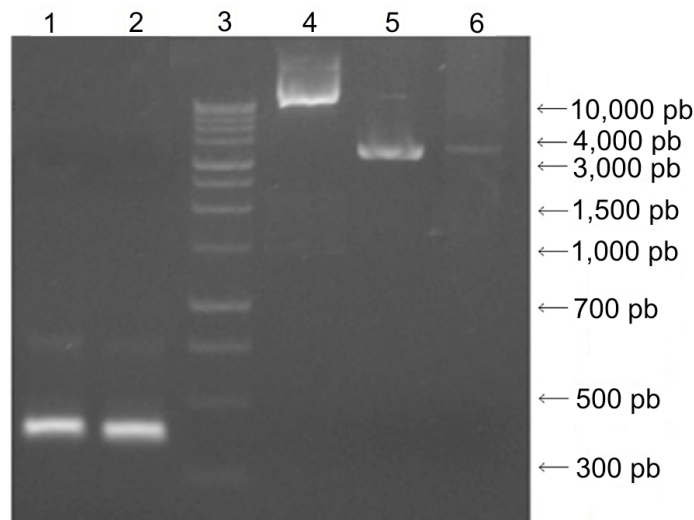


Figura 12. Doble digestión de productos de PCR y plásmido pPICZαA. Gel de agarosa al 1.5%. En el carril 1, producto de PCR; carril 2, producto de PCR digerido con las enzimas *XhoI* y *XbaI* y limpio; carril 3, escalera 1 kb; carril 4, plásmido pPICZαA purificado; carril 5, plásmido pPICZαA digerido con las enzimas *XhoI* y *XbaI* y purificado; carril 6, plásmido pPICZαA purificado utilizado como control positivo.

En la Figura 13 se muestra la imagen del gel de agarosa al 0.8% donde se evaluó el ADN plasmidico extraído de las 7 colonias de células *E. coli* DH5α, previamente electroporadas con el inserto anti-TGF-β – pPICZαA. El carril 1 corresponde al plásmido pPICZαA purificado; en los carriles 2-8 se observa el plásmido pPICZαA conteniendo el inserto anti-TGF-β. Se observan las tres bandas del plásmido: superenrollado, enrollado y relajado. Se obtuvieron las siguientes concentraciones de plásmido anti-TGF-β: 703; 5,632; 5,709; 1,491; 5,770; 5,506 y 5,763 ng/μL respectivamente.

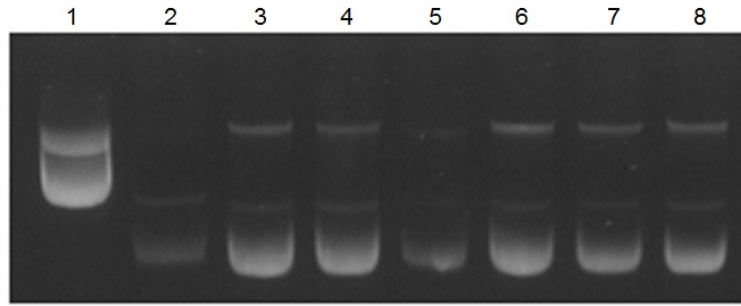


Figura 13. Plásmido pPICZαA con inserto anti-TGF-β. Gel de agarosa al 0.8%. En el carril 1, plásmido pPICZαA purificado; carril 2-8, plásmido pPICZαA con el inserto anti-TGF-β purificado. Se observan las tres bandas correspondientes al plásmido: superenrollado, enrollado y relajado.

Se realizó un PCR de colonia con el plásmido purificado de las 7 clonas seleccionadas. En la Figura 14, se muestra un gel de agarosa al 2% en el que se evaluaron los productos de PCR. En los carriles 2-8, se observa la amplificación de un fragmento de aproximadamente 850 pb, que corresponde a las clonas que contienen el inserto del gen *anti-TGF-β*. En el carril 9, se muestra la amplificación del plásmido pPICZαA sin el inserto. Se utilizó como marcador molecular una escalera de 100 pb (carril 1) y un control negativo de la reacción que no contenía el plásmido (carril 10).

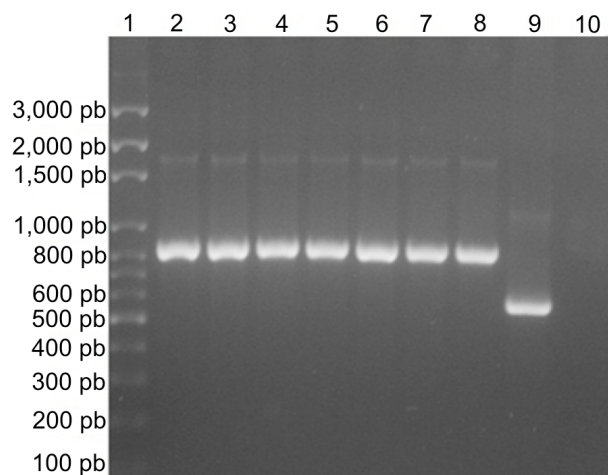


Figura 14. Amplificación por PCR del inserto anti-TGF-β contenido en el plásmido pPICZαA. Gel de agarosa al 2%. En el carril 1, escalera 100 pb; carril 2-8, amplificación del fragmento de ~850pb, correspondiente al inserto anti-TGF-β contenido en el plásmido pPICZαA; carril 9, plásmido pPICZαA purificado; carril 10, control negativo de la reacción.

Se seleccionaron la clona 1 y 6 (carril 2 y 7, Figura 14) para su secuenciación, se nombraron Ecoli1 y Ecoli6. Los resultados obtenidos se analizaron con el software MultAlin. En la Figura 15, se muestra la alineación de secuencias de las 2 clonas (línea 1 y 2 respectivamente). La línea 3 representa la secuencias consenso, es decir las bases en común entre las secuencias analizadas. En color rojo se presentan las bases con máximo consenso. Se observa que la base en posición 275 de la secuencia de la clona Ecoli1 corresponde a una citosina, y dicha base no fue identificada en la secuencia de la clona Ecoli6. Además, en la posición 740 de la secuencia de la clona Ecoli6 se encuentra una guanina, que no está presente en la clona Ecoli1.

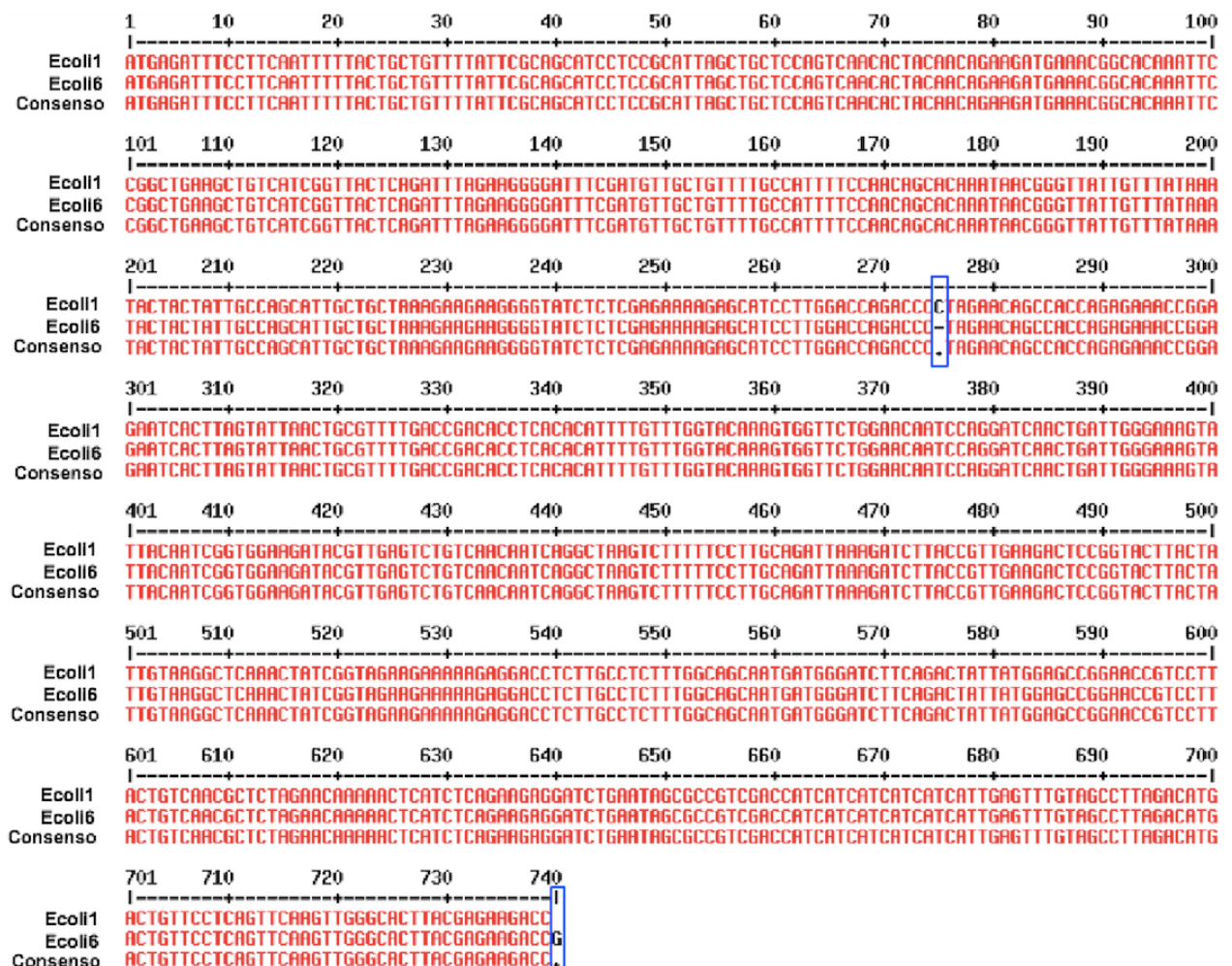


Figura 15. Alineamiento de secuencias de clonas en *E. coli* conteniendo el inserto anti-TGF- β . La primera línea corresponde a la secuencia de la clona Ecoli1, la segunda a la clona Ecoli6, y la línea tres corresponde a la secuencia consenso. En color rojo se indican las bases en común de las secuencias analizadas.

La clona Ecoli1 (línea 1, Figura 15) se alineó con la secuencia del gen *anti-TGF-β* utilizando el software MultAlin. En la Figura 16, se muestra el alineamiento de secuencias, la primera línea corresponde a la secuencia de la clona Ecoli1, la segunda línea a la secuencia del gen *anti-TGF-β* y la tercera línea a la secuencia consenso. En color rojo se muestran los aminoácidos con máximo consenso, se puede observar que la secuencia de clona Ecoli1 empata perfectamente con la secuencia del gen *anti-TGF-β*.

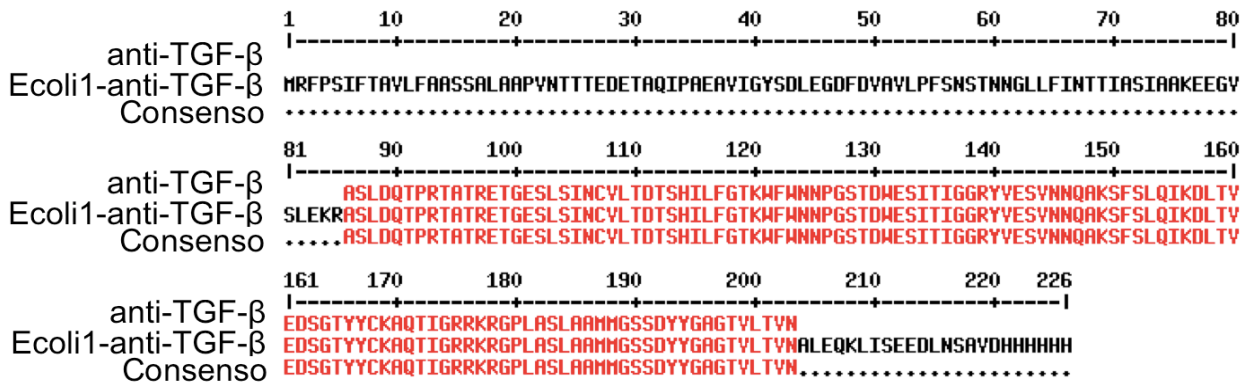


Figura 16. Alineamiento de secuencia del gen *anti-TGF-β* y clona Ecoli1. La primera línea corresponde a la secuencia del gen *anti-TGF-β*, la segunda línea a la secuencia de la clona Ecoli1 conteniendo el inserto *anti-TGF-β*, y la tercera línea a la secuencia consenso. En color rojo se indican los aminoácidos en común de las secuencias analizadas.

7.2 Transformación en *Pichia pastoris* (SMD1168)

El plásmido pPICZαA-*anti-TGF-β* se linealizó con la enzima *SacI*, se purificó y se evaluó en un gel de agarosa al 0.8%. En la Figura 17, se muestra la imagen del gel. En el carril 1 y 2 se observa el plásmido linealizado con una concentración de 325 y 638.5 ng/ μL respectivamente.

De la transformación de células SMD1168 con el plásmido pPICZαA - *anti-TGF-β* linealizado, se seleccionaron 2 colonias para realizar un PCR de colonia. En la Figura 18, se muestra la imagen del gel de agarosa al 2% en el que se evaluaron los productos de PCR. En el carril 2 y 3 se observa la amplificación de un fragmento con tamaño de

~850 pb, que corresponde al tamaño del gen sintético *anti-TGF- β* , clonado después del sitio de corte Kex2 del vector pPICZ α A. Se utilizó como marcador molecular una escalera de 100 pb (carril 1); como control positivo plásmido pPICZ α A conteniendo un inserto distinto (carril 5); y un control negativo de la reacción que no contenía plásmido (carril 4).

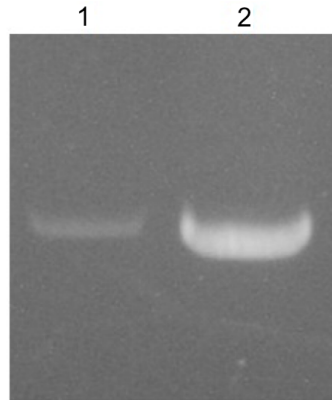


Figura 17. Plásmido pPICZ α A linealizado conteniendo el inserto anti-TGF- β . Gel de agarosa al 0.8%. El carril 1 y 2 corresponden al plásmido pPICZ α A-anti-TGF- β digerido con la enzima *SacI* y purificado.

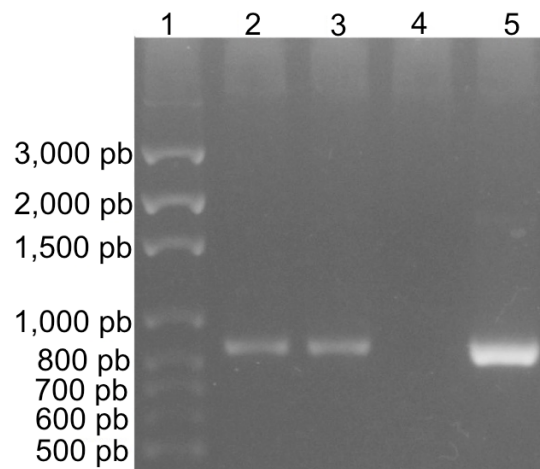


Figura 18. Amplificación del fragmento anti-TGF- β – pPICZ α A clonado en la cepa SMD1168 de *P. pastoris*. Gel de agarosa al 2%. En el carril 1, escalera de 100 pb; carril 2 y 3, amplificación del fragmento de ~850pb correspondiente al tamaño del inserto anti-TGF- β clonado después del sitio de corte Kex2 del vector pPICZ α A; carril 4, control negativo de la reacción; carril 5, plásmido pPICZ α A conteniendo un inserto distinto.

Ambas clonas se seleccionaron para su secuenciación. Se denominaron PTGB1 y PTGB2. Se realizó el alineamiento de secuencias con el software MultAlin. En la Figura 19, se muestra la secuencia de la clona PTGB1 (línea 1), la línea 2 representa a la clona PTGB2, la línea 3 muestra la secuencia de la clona Ecoli1, la línea 4 la secuencia de la proteína anti-TGF- β parental, y la línea 5 corresponde a la secuencias consenso. En color rojo se presentan las proteínas con máximo consenso. Se puede observar que la secuencia de la proteína vNAR anti-TGF- β en las clonas PTGB1 y PTGB2 está insertada en correcto marco de lectura, desde el inicio de la secuencia señal y que la secuencia de la proteína no tiene sustituciones de aminoácidos.



Figura 19. Alineamiento de secuencias de la proteína anti-TGF- β y las clonas positivas al inserto en la cepa SMD1168 de *P. pastoris*. Línea 1, secuencia de la clona PTGB1; línea 2, secuencia de la clona PTGB2; línea 3, secuencia de la clona Ecoli1; línea 4, secuencia de la proteína anti-TGF- β parental; línea 5, secuencias consenso. En color rojo se presentan las proteínas en común de las secuencias analizadas.

7.3 Expresión del anticuerpo vNAR en *Pichia pastoris*

Se realizaron un total de 23 inducciones, de las cuales se obtuvo un volumen total de 6.118 L de sobrenadante.

7.4 Purificación del anticuerpo vNAR por cromatografía de afinidad a metales

Diez de las inducciones realizadas que corresponden a un volumen de 2.160 L se purificaron realizando un lavado con 15 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol y 5 eluciones de 500 μ L. Las eluciones se evaluaron en un gel de poliacrilamida al 12% SDS-PAGE teñido y mostrado en la Figura 20A, el carril 1 corresponde al marcador molecular de 225 kDa. Los carriles 2 al 6, muestran las eluciones 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente. Se analizaron 15 μ L de cada una. En las eluciones 1, 2 y 3 se observa una banda predominante de aproximadamente 15 kDa correspondiente a la proteína vNAR anti-TGF- β desnaturalizada. Se observan bandas adicionales de 75, 50, 13 y 10 kDa. En la Figura 20B, se muestra un Western blot donde se analizaron 15 μ L de cada elución, la inmunodetección del anticuerpo vNAR se realizó con el anticuerpo anti-c-Myc. Los carriles 1 al 5, corresponden a las 5 eluciones. En las eluciones 1, 2, 3 y 4 se observa una banda mayoritaria de 15 kDa que corresponde al anticuerpo desnaturalizado. Se observan bandas adicionales con tamaños de 75, 35, 13 y 10 kDa.

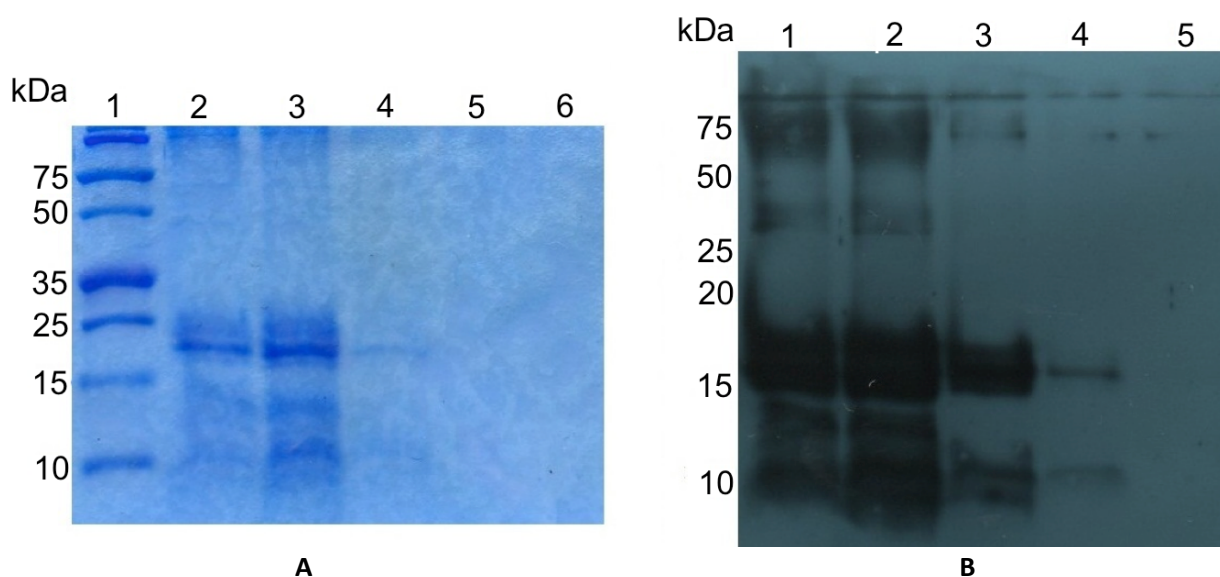


Figura 20. Purificación con 15 mL de imidazol 20 mM. A) Gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie. El carril 1, corresponde al marcador molecular de 225 kDa; los carriles 2 al 5, corresponden a las eluciones 1, 2, 3 4 y 5 respectivamente. B) Western blot, la inmunodetección se realizó con el anticuerpo anti c-Myc. Los carriles 1-5 corresponden a las eluciones 5 realizadas

7.4.1 Estandarización de las condiciones de purificación del anticuerpo vNAR

Se evaluaron 5 condiciones distintas para purificar el anticuerpo vNAR anti-TGF- β mediante cromatografía de afinidad a metales, en cada una de ella se purificaron 200 mL de sobrenadante, se analizaron 15 μ L de cada elución y lo correspondiente a 500 μ L de sobrenadante y lavados. En la tabla 3 se presentan las condiciones empleadas en cada condición evaluada.

Tabla 3. Condiciones empleadas para estandarizar la purificación del vNAR.

Numero de condición	Lavado 1	Lavado 2
1	50 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol	
2	100 mL de buffer de lavado conteniendo 100 mM de imidazol	80 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol
3	30 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol	30 mL de buffer de lavado conteniendo 35 mM de imidazol
4	15 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol	10 mL de buffer de lavado conteniendo 50 mM de imidazol
5	15 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol	10 mL de buffer de lavado conteniendo 100 mM de imidazol

En la Figura 21A, se muestra el gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomasie de la primera condición de purificación evaluada. El carril 1 corresponde al marcador molecular de 225 kDa; el carril 2, al sobrenadante sin purificar; los carriles 3-7, representan a las eluciones 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente; el carril 8, corresponde al lavado con 50 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol; el carril 9, al lavado con 20 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol; y el carril 10 corresponde al sobrenadante purificado. En las eluciones 1 y 2 se observa una banda de aproximadamente 15 kDa que corresponde a la proteína vNAR anti-TGF- β desnaturalizada. Se observan bandas de 75, 35 y 10 kDa. En la Figura 21B, se muestra

un Western blot donde se utilizó el anticuerpo anti-c-Myc para realizar la inmunodetección del anticuerpo vNAR. Los carriles 1-5, corresponde a las 5 eluciones; el carril 6, al primer lavado; y el carril 7, muestra el segundo lavado. En las eluciones 1 y 2, se observa una banda de aproximadamente 15 kDa mayoritaria, pero poco definida que corresponde al anticuerpo desnaturalizado. Se observan bandas adicionales poco definidas con tamaños de 75, 35 y 10 kDa.

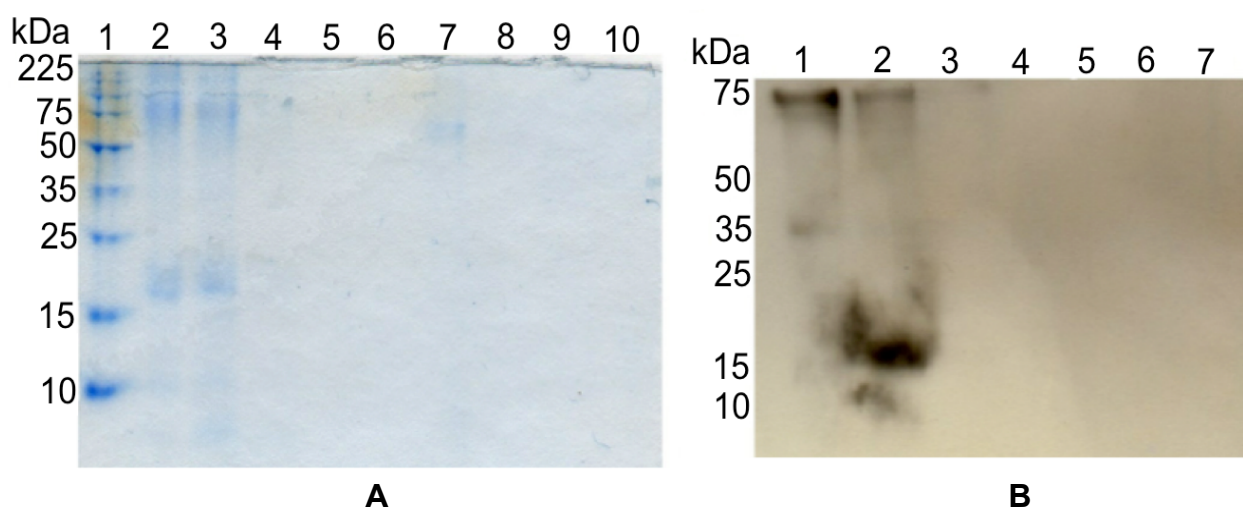


Figura 21. Purificación con 50 mL de imidazol 20 mM. A) Gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie. El carril 1, corresponde al marcador molecular de 225 kDa; el carril 2, al sobrenadante sin purificar; los carriles 3-7, representan las eluciones 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente; el carril 8, corresponde al lavado con 50 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol; el carril 9, al lavado con 20 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol; y el carril 10 corresponde al sobrenadante purificado. B) Western blot, la inmunodetección se realizó con el anticuerpo anti-c-Myc. Los carriles 1-5, corresponden a las 5 eluciones; el carril 6, al lavado con 50 mL de buffer de lavado conteniendo 20 de imidazol; el carril 7, al lavado con 20 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol.

En la Figura 22 se muestra el gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie de la segunda condición de purificación evaluada. El carril 1 corresponde al marcador molecular de 225 kDa; los carriles 2-6, representan las eluciones 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente; el carril 7, corresponde al primer lavado con 100 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol; el carril 8, al lavado con 80 mL de buffer de lavado conteniendo 10 mM de imidazol. En las eluciones 1 y 2 se observa un doble

bandeo de aproximadamente 15 kDa que correspondiente a la proteína vNAR anti-TGF- β desnaturalizada. Se observan bandas adicionales de 75, 35 y 10 kDa.

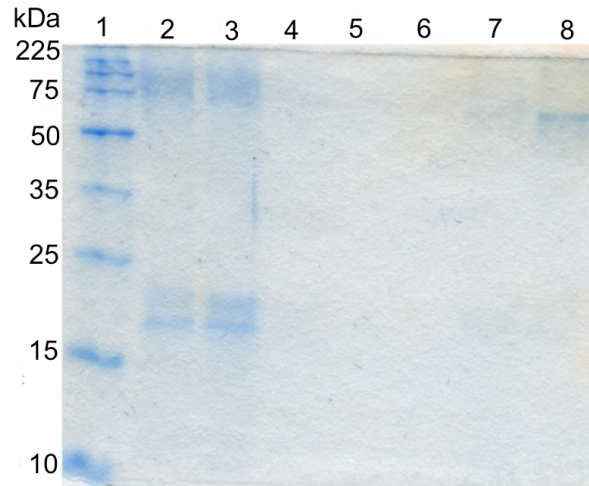


Figura 22. Purificación con 100 mL de imidazol 20 mM y 80 mL de imidazol 10 mM. Gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie. El carril 1 corresponde al marcador molecular de 225 kDa; los carriles 2-6, representan las eluciones 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente; el carril 7, corresponde al lavado con 100 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol; el carril 8, al lavado con 80 mL de buffer de lavado conteniendo 10 mM de imidazol.

En la Figura 23A, se muestra el gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie de la tercera condición de purificación evaluada. El carril 1 corresponde al marcador molecular de 225 kDa; el carril 2, al sobrenadante sin purificar; los carriles 3-7, representan las eluciones 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente; el carril 8, corresponde al lavado con 30 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol; el carril 9, al lavado con 30 mL de buffer de lavado conteniendo 35 mM; y el carril 10 corresponde al sobrenadante purificado. En las eluciones 1, 2 y 3 se observa una banda de aproximadamente 15 kDa que correspondiente a la proteína vNAR anti-TGF- β desnaturalizada. Se observan bandas adicionales de 75, 13 y 10 kDa. En la Figura 23B se muestra un Western blot en el que se utilizó el anticuerpo anti-c-Myc para realizar la inmunodetección del anticuerpo vNAR. Los carriles 1-5, corresponden a las 5 eluciones; el carril 6, a lavado con 30 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol; y el carril 7, al lavado con 30 mL de buffer de lavado conteniendo 35 mM de imidazol. En las

eluciones 1 y 2 se observa una banda mayoritaria de aproximadamente 15 kDa, pero poco definida, que corresponde al anticuerpo desnaturalizado. Se observan bandas adicionales de 75 y 35 kDa.

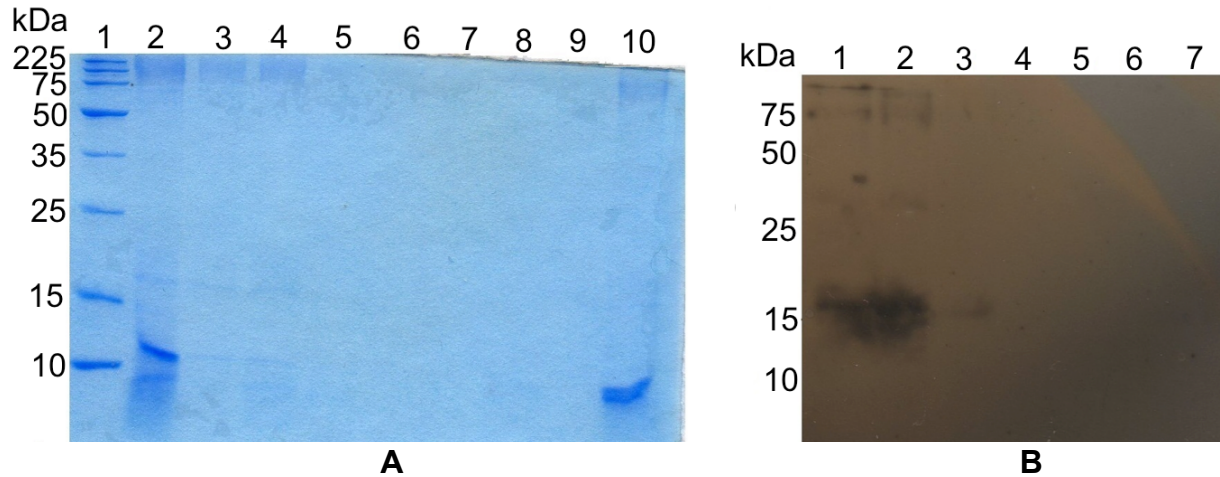


Figura 23. Purificación con 30 mL de imidazol 20 mM y 30 mL de imidazol 35 mM. A) Gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie El carril 1, corresponde al marcador molecular de 225 kDa; el carril 2, al sobrenadante sin purificar; los carriles 3-7, representan las eluciones 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente; el carril 8, corresponde al lavado con 30 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol; el carril 9, al lavado con 30 mL de buffer de lavado conteniendo 35 mM de imidazol; y el carril 10, corresponde al sobrenadante purificado. **B) Western blot,** la inmunodetección se realizó con el anticuerpo anti-c-Myc. Los carriles 1-5, corresponde a las 5 eluciones; el carril 6, al lavado con 30 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol; y el carril 7, al lavado con 30 mL de buffer de lavado conteniendo 35 mM de imidazol.

En la Figura 24A, se muestra el gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie de la cuarta condición de purificación evaluada. El carril 1 corresponde al marcador molecular de 225 kDa; el carril 2, al sobrenadante sin purificar; los carriles 3-7, representan las eluciones 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente; el carril 8, corresponde al lavado con 15 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol; el carril 9, al lavado con 10 mL de buffer de lavado conteniendo 50 mM; y el carril 10 corresponde al sobrenadante purificado. En las eluciones 1, 2 y 3 se observa una banda bien definida de aproximadamente 15 kDa correspondiente a la proteína vNAR anti-TGF- β desnaturaliza. Se observa una proteína de menos de 10 kDa. En la Figura 24B se muestra un Western blot en el que se utilizó el anticuerpo anti-c-Myc para realizar la

inmunodetección del anticuerpo vNAR. El carril 1, corresponde al sobrenadante sin purificar; en los carriles 2-6, se muestran las eluciones 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente; el carril 7, corresponde al lavado con 15 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol; el carril 8, al lavado con 10 mL de buffer de lavado conteniendo 50 mM; y el carril 9, corresponde al sobrenadante purificado. En las eluciones 1, 2 y 3 se observa una banda intensa y bien definida de aproximadamente 15 kDa, que corresponde a la proteína vNAR anti-TGF- β desnaturalizada, ésta misma banda se observa en el segundo lavado.

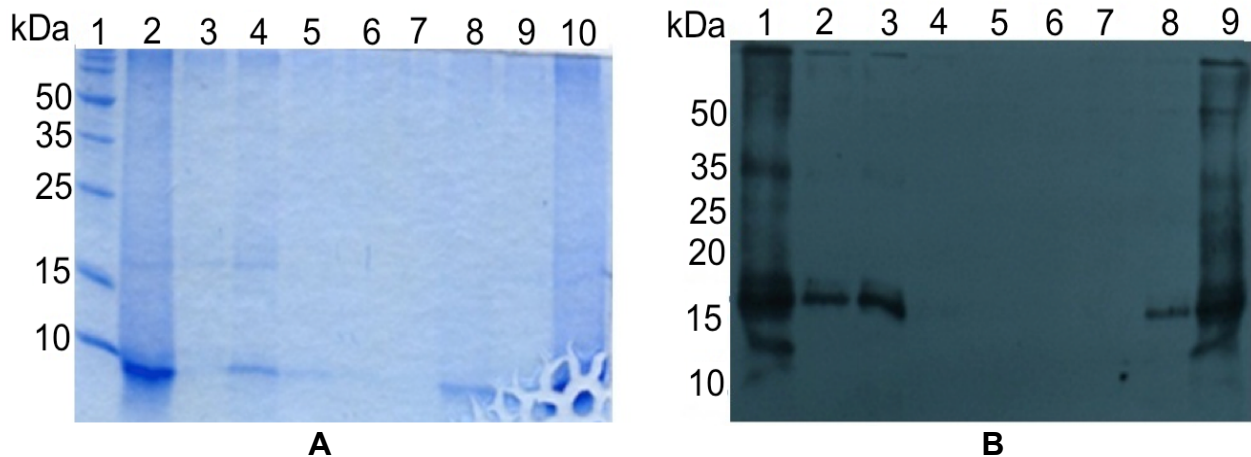


Figura 24. Purificación con 15 mL de imidazol 20 mM y 10 mL de imidazol 50 mM. A) Gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie. El carril 1, corresponde al marcador molecular de 225 kDa; el carril 2, al sobrenadante sin purificar; los carriles 3-7, representan las eluciones 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente; el carril 8, corresponde al lavado con 15 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol; el carril 9, al lavado con 10 mL de buffer de lavado conteniendo 50 mM de imidazol; y el carril 10, corresponde al sobrenadante purificado. B) Western blot, la inmunodetección se realizó con el anticuerpo anti-c-Myc. El carril 1, corresponde al sobrenadante sin purificar; en los carriles 2-6, se muestran las 5 eluciones; el carril 7, corresponde al lavado con 15 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol; el carril 8, al lavado con 10 mL de buffer de lavado conteniendo 50 mM de imidazol; el carril 9, corresponde al sobrenadante purificado.

En la Figura 25A, se muestra el gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie de la quinta condición de purificación evaluada. El carril 1 corresponde al marcador molecular de 225 kDa; el carril 2, al sobrenadante sin purificar; los carriles 3-7, representan las eluciones 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente; el carril 8, corresponde al

lavado con 15 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol; el carril 9, al lavado con 10 mL de buffer de lavado conteniendo 100 mM de imidazol; y el carril 10 corresponde al sobrenadante purificado. En las 5 eluciones se observa una banda por debajo de los 10 kDa, que también está presente en ambos lavados. En la Figura 25B, se muestra un Western blot en que se utilizó el anticuerpo anti-c-Myc para realizar la inmunodetección del anticuerpo vNAR. El carril 1, corresponde al sobrenadante sin purificar; los carriles 2-6, se muestran las eluciones 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente; el carril 7, corresponde al lavado con 15 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol; el carril 8, al lavado con 10 mL de buffer de lavado conteniendo 100 mM de imidazol; el carril 9, corresponde al sobrenadante purificado. En las eluciones 1, 2 y 3 se observa una banda tenue de aproximadamente 15 kDa que corresponde a la proteína vNAR anti-TGF- β desnaturalizada, esta banda está presente en los 2 lavados, mostrando mayor predominancia en el segundo lavado.

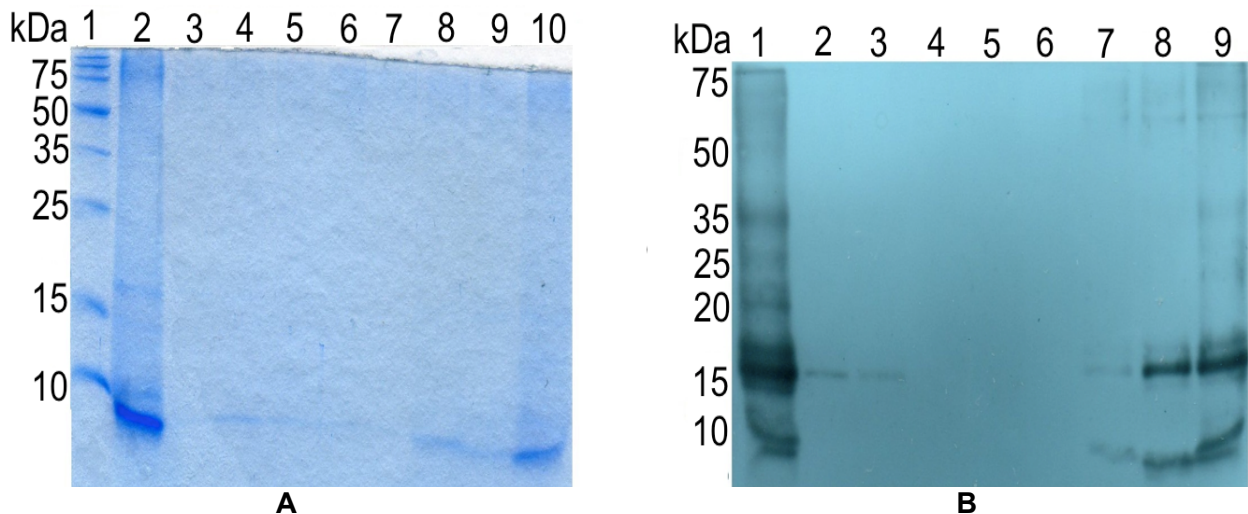


Figura 25. Purificación con 15 mL de imidazol 20 mM y 10 mL de imidazol 100 mM. A) Gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie. El carril 1, corresponde al marcador molecular de 225 kDa; el carril 2, al sobrenadante sin purificar; los carriles 3-7, representan las eluciones 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente; el carril 8, corresponde al lavado con 15 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol; el carril 9, al lavado con 10 mL de buffer de lavado conteniendo 100 mM de imidazol; y el carril 10, corresponde al sobrenadante purificado. B) Western blot, la inmunodetección se realizó con el anticuerpo anti-c-Myc. El carril 1, corresponde al sobrenadante sin purificar; en los carriles 2-6, se muestran las 5 eluciones; el carril 7, corresponde al lavado con 15 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol; el carril 8, al lavado con 10 mL de buffer de lavado conteniendo 100 mM de imidazol; el carril 9, corresponde al sobrenadante purificado.

7.4.2 Purificación del anticuerpo vNAR con condiciones estandarizadas

Las 5 eluciones mostradas en la Figura 20, se juntaron dando un volumen total de 20 mL, y se dializaron de acuerdo con lo descrito en la Sección 6.6. Se purificó realizando un lavado con 15 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol, seguidas de las 5 eluciones y un segundo lavado con 10 mL con buffer de lavado conteniendo 50 mM de imidazol. La eluciones se evaluaron en un gel de poliacrilamida al 12% SDS-PAGE. En la Figura 26A se muestra el gel teñido con azul de Coomassie, donde el carril 1, corresponde al marcador molecular de 225 kDa; los carriles 2-6, representan las eluciones 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente. En las eluciones 1, 2, 3 y 4 se observa una banda definida de aproximadamente 15 kDa que corresponde a la proteína vNAR anti-TGF- β desnaturalizada. Se observa una banda por debajo de 10 kDa. En la Figura 26B, se muestra un Western blot en que se utilizó el anticuerpo anti-c-Myc para realizar la inmunodetección del anticuerpo vNAR. Los carriles 1 al 5 corresponden a las eluciones 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente. En las eluciones 1, 2, 3 y 4 se observa una banda intensa y bien definida de aproximadamente 15 kDa que corresponde a la proteína vNAR anti-TGF- β denaturalizada. En la elución 2 se observan bandas de 75, 35 y una menor a 10 kDa.

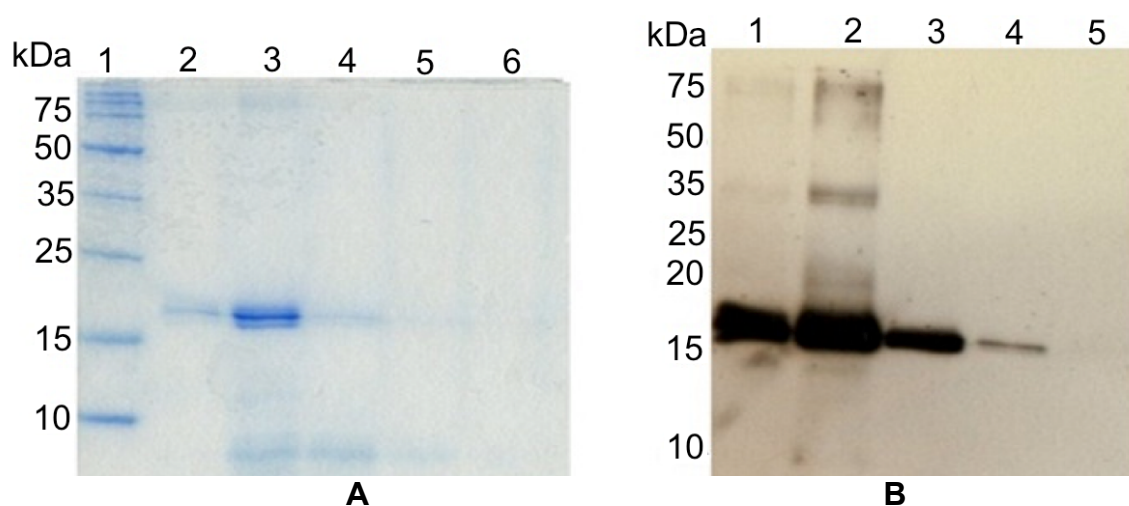


Figura 26. Repurificación de eluciones con condiciones estandarizadas. A) Gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie. El carril 1, corresponde al marcador molecular de 225 kDa; los carriles 2 al 6, representan las eluciones 1, 2, 3, 4, y 5 respectivamente. B) Western blot, la inmunodetección se realizó con el anticuerpo anti c-Myc. Los carriles 1-5 corresponden a las eluciones 5 realizadas.

La elución 2 de la Figura 26, se dializó de acuerdo con lo descrito en la Sección 6.6. Se juntó con las eluciones de la Sección 7.4. Se realizaron 8 purificaciones más bajo las mismas condiciones. Las eluciones se evaluaron en un gel de poliacrilamida al 12% SDS-PAGE. En la Figura 27A se muestra el gel teñido con azul de Coomassie, donde el carril 1, corresponde al marcador molecular de 225 kDa. Los carriles 2-6, representan las eluciones 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente. En las eluciones 1, 2, 3 se observa una banda definida de aproximadamente 15 kDa que corresponde a la proteína vNAR anti-TGF- β desnaturalizada. En la elución 2, se observa una banda muy tenue de 75 kDa. En la Figura 27B, se muestra un Western blot en que se utilizó el anticuerpo anti-c-Myc para realizar la inmunodetección del anticuerpo vNAR. Los carriles 1 al 5 corresponden a las eluciones 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente. En las eluciones 1, 2, 3 se observa una banda intensa y bien definida de aproximadamente 15 kDa que corresponde a la proteína vNAR anti-TGF- β desnaturalizada. En la elución 2 se observan dos banda muy tenues de 75 y 35 kDa.

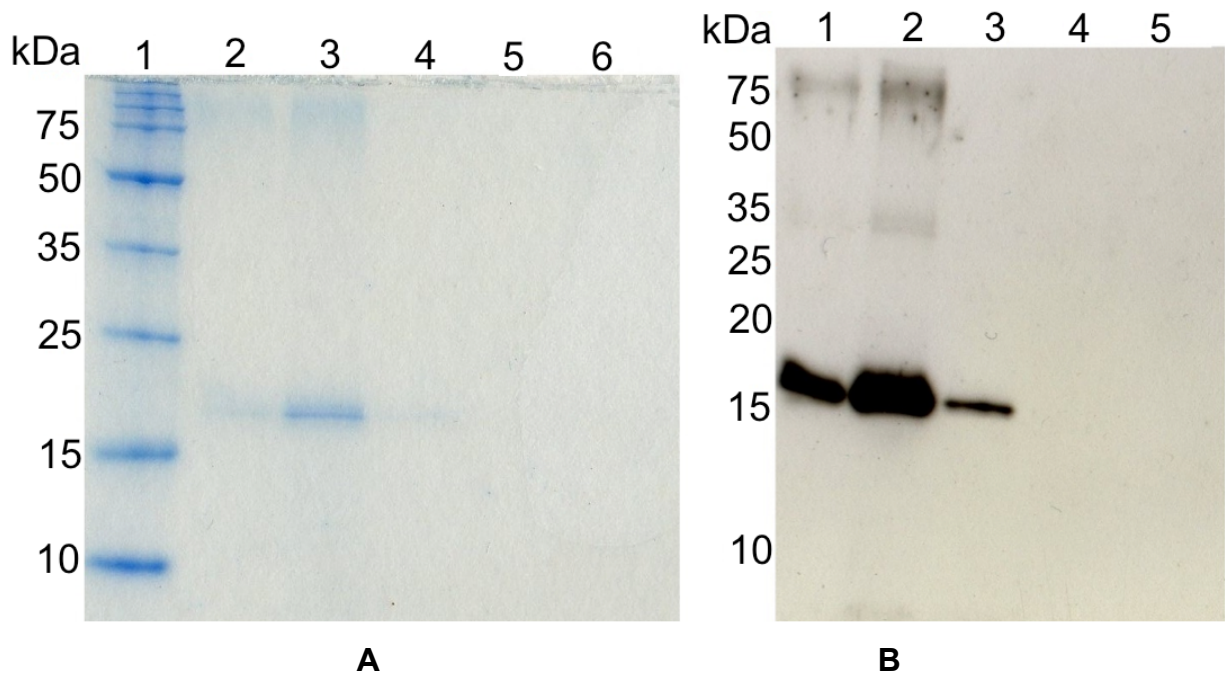


Figura 27. Purificación con condiciones estandarizadas. A) Gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie. El carril 1, corresponde al marcador molecular de 225 kDa; los carriles 2 al 5, corresponden a las eluciones 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente. B) Western blot, la inmunodetección se realizó con el anticuerpo anti c-Myc. Los carriles 1-5 corresponden a las eluciones 5 realizadas.

Las eluciones de cada purificación realizada se evaluaron en geles de acrilamida al 12% SDS-PAGE. Se seleccionaron aquellas eluciones que cumplieran con el patrón de purificación similar al mostrado en la Figura 27. Al final todas las eluciones que presentaba la banda definida de aproximadamente 15 kDa, correspondiente a la proteína vNAR anti-TGF- β desnaturalizada, se juntaron y se dializaron. Se obtuvieron 10 mL de proteína purificada y dializada.

El sobrenadante correspondiente a 8 inducciones, con un volumen total de 2.958 L se purificó por separado siguiendo el protocolo previamente estandarizado. El sobrenadante se purificó 3 veces más siguiendo estas condiciones con la finalidad de recuperar toda la proteína. Se juntaron todas las eluciones 1, todas las eluciones 2, y así sucesivamente hasta la elución 5, se evaluaron en un gel de poliacrilamida al 12% SDS-PAGE. Este mismo procedimiento se realizó para las repurificaciones del sobrenadante.

Se eligieron aquellas eluciones que cumplieron con el patrón mostrado en la elución 1 de la Figura 27, se juntaron y se dializaron. De estas 8 inducciones se obtuvo un volumen final de 20 mL de la proteína vNAR anti-TGF- β pura.

7.5 Concentrado del anticuerpo vNAR purificado

La proteína purificada y dializada se concentró mediante filtros para centrifuga, los 12 mL se redujeron a 0.956 mL, y los 20 mL a 0.930 mL.

7.6 Cuantificación de proteína con ácido bicinconínico (BCA)

Con los valores de absorbancia de los estándares de albúmina de suero bovino (BSA) se realizó una curva estándar, mostrada en la Figura 28. Utilizando el programa Excel se trazó una línea de tendencia (regresión lineal), a partir de la cual se calculó la ecuación de la recta ($y = 0.0102x + 0.0194$) y el coeficiente de determinación ($R^2 = 0.991$).

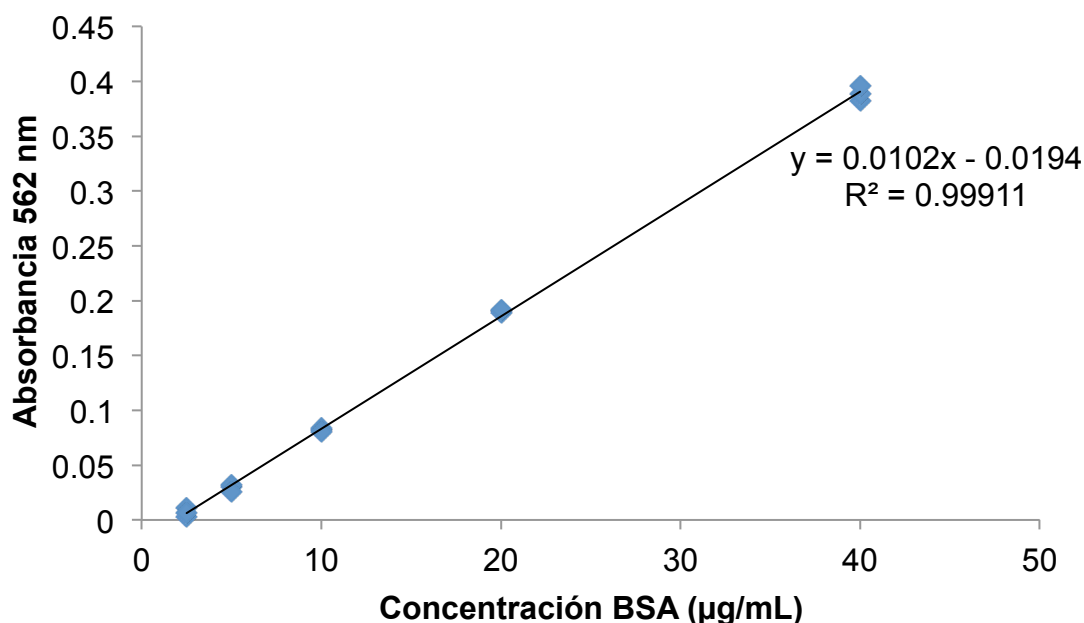


Figura 28. Curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA). La gráfica muestra las absorbancias de los estándares de BSA, se trazó una línea de tendencia (regresión lineal), a partir de la cual se calculó la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (R^2).

Los valores de absorbancia de las muestras analizadas se sustituyeron en la ecuación de la recta para determinar la concentración de cada muestra. Para una de las muestra se obtuvo una concentración de 30.072917 µg/mL, que se multiplicó por el factor de dilución empleado (100) y por el volumen total de la muestra (0.956 mL), obteniendo una cantidad de: 2,874.97 µg. Para las muestra obtenidas con la condición de purificación estandarizada en este trabajo, se obtuvo una concentración de 53.7634 µg/mL, que se multiplicó por el factor de dilución empleado (100) y por el volumen total de la muestra (0.930 mL), obteniendo una cantidad de: 4999.99 µg totales.

7.7. Reconocimiento del anticuerpo vNAR por la citocina TGF-β

7.7.1 ELISA de reconocimiento del vNAr por la citocina TGF-β2

En la Figura 29 se muestra la gráfica del resultado del ELISA de reconocimiento del anticuerpo vNAR anti-TGF-β por la isoforma 2 de la citocina TGF-β. Se graficó la media de los valores y la desviación estándar de los valores. Se usó como control negativo

BSA al 3% con la finalidad de determinar si el anticuerpo vNAR soluble se unía a la albúmina dado que esta se usa en el paso de bloqueo.

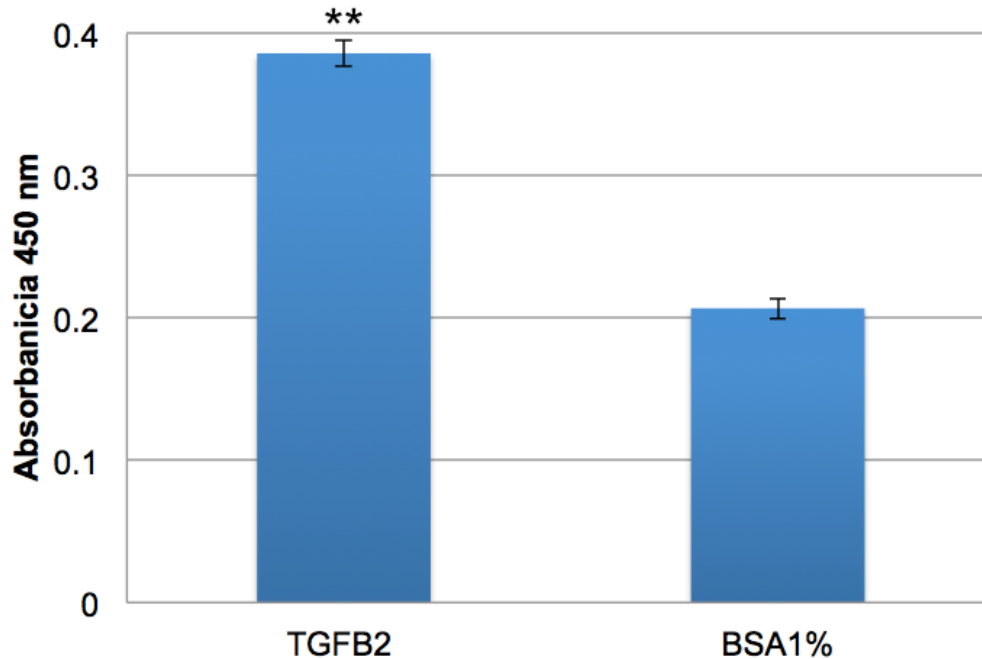


Figura 29. ELISA de reconocimiento de anticuerpo vNAR por la citocina TGF- β 2. Ensayo por triplicado, se graficó la media y la desviación estándar. El anticuerpo vNAR tiene la capacidad de reconocer a la citocina TGF- β 2 mostrando una $p < 0.05$.

Como se puede observar en la Figura 29, el anticuerpo reconoce al BSA, sin embargo, existe una diferencia estadísticamente significativa entre el reconocimiento del anticuerpo vNAR anti-TGF- β y el control negativo ($p < 0.05$). Esto demuestra que el anticuerpo tiene la capacidad de reconocer a la isoforma 2 de la citocina TGF- β .

7.7.2 ELISA de reconocimiento del vNAR por TGF- β de lágrimas humanas

En la Figura 30 se muestra la gráfica del resultado del ELISA de reconocimiento del anticuerpo vNAR anti-TGF- β por la citocina TGF- β presente en lágrimas humanas. Se graficó la media y la desviación estándar de los valores, a los que se les restó la media del blanco.

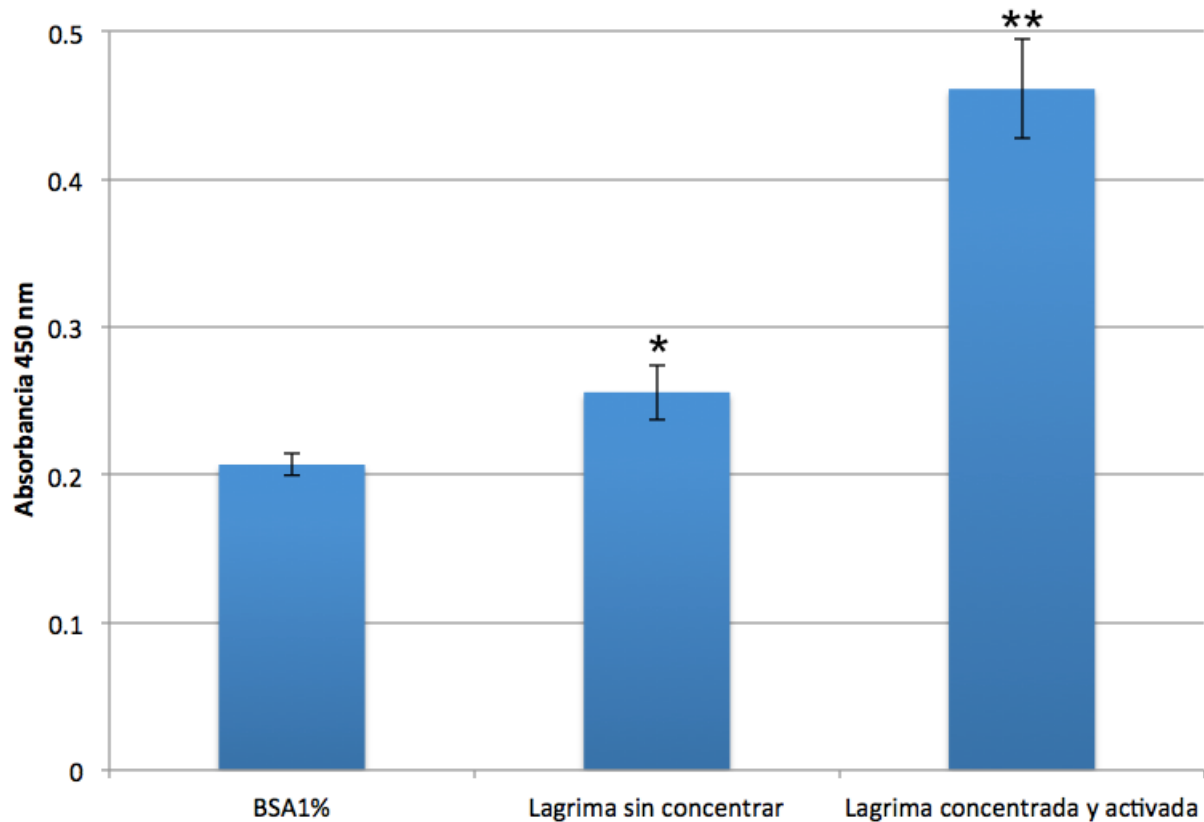


Figura 30. ELISA de reconocimiento de anticuerpo vNAR por la citocina TGF- β 2 de lágrimas humanas. Ensayo por triplicado, se graficó la media y la desviación estándar. El anticuerpo vNAR tiene la capacidad de reconocer a la citocina TGF- β en lágrimas concentradas y acidificadas ($p=0.003$) y de reconocer a la citocina TGF- β en lágrimas sin concentrar ($p=0.01$).

Como se puede observar en la Figura 30, existe una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.003$) entre el reconocimiento del anticuerpo vNAR anti-TGF- β por la citocina TGF- β en lágrimas humanas concentradas y acidificadas y el control negativo. Las lágrimas sin concentrar mostraron una diferencia estadísticamente menor ($p=0.01$) que las lágrimas concentradas y acidificadas.

7.7.3 Inmunodetección de TGF- β en lágrimas humanas

En la Figura 31 se muestra un Western blot en el que se utilizó el anticuerpo vNAR anti-TGF- β para detectar a la citocina TGF- β presente en lágrimas humanas concentradas, y

el anticuerpo anti-c-Myc como anticuerpo secundario para detectar al anticuerpo vNAR anti-TGF- β . El carril 1 corresponde al marcador molecular de 225 kDa, y el carril 2 a 50 μ L de lágrima concentrada (4,500 μ g de proteína total). Se observa que una banda a la altura de 15 kDa que corresponde a la citocina TGF- β . Este resultado demuestra que el anticuerpo tiene la capacidad de reconocer a la citocina TGF- β en lágrimas humanas concentradas.

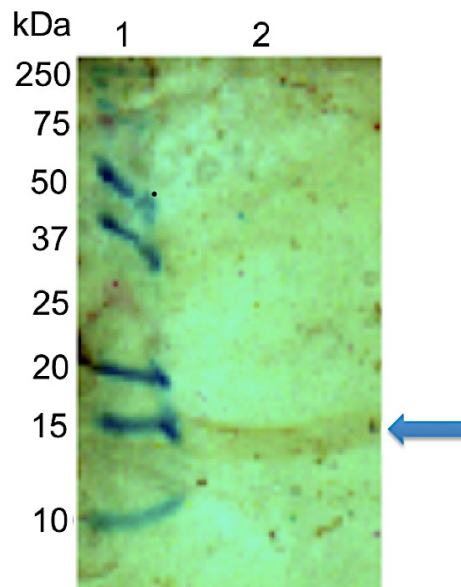


Figura 31. Western blot de TGF- β en lágrimas humanas. La inmunodetección se realizó con el anticuerpo VNAR anti-TGF- β en lágrimas humanas y usando el anticuerpo anti-c-Myc como anticuerpo secundario. El carril 1 corresponde al marcador molecular de 250 kDa, y el 2 a 50 μ L de lágrima concentrada (4,500 μ g de proteína total).

7.8. Ensayo de citotoxicidad en cultivo primario de hepatocitos

En la Figura 32A, se muestra el porcentaje de supervivencia a las 24 horas de los hepatocitos de ratón incubados con las diferentes concentraciones del anticuerpo vNAR anti-TGF- β . Los datos se normalizaron al 100% de supervivencia, considerando como el 100% a las células sin el anticuerpo. Se puede observar que el anticuerpo no tiene un efecto tóxico en las células evaluadas.

En la Figura 32B se muestra el porcentaje de supervivencia a las 48 horas de las células incubadas con las diferentes concentraciones del anticuerpo vNAR anti-TGF- β empleadas. Los datos se normalizaron al 100% de supervivencia, considerando como el 100% a las células sin el anticuerpo. Se puede observar que el anticuerpo no tiene un efecto tóxico en las células evaluadas.

Estos resultados preliminares indican que las concentraciones de anticuerpo vNAR anti-TGF- β empleadas en este trabajo no tienen efecto citotóxico en hepatocitos, lo que podría significar que este anticuerpo no daña las células de este órgano.

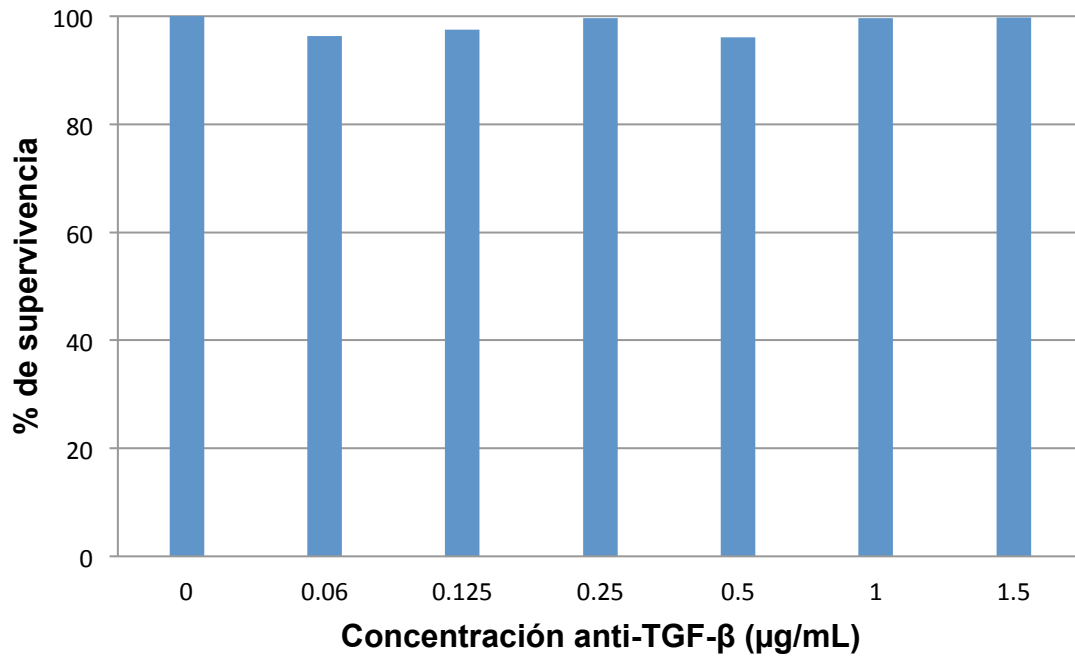
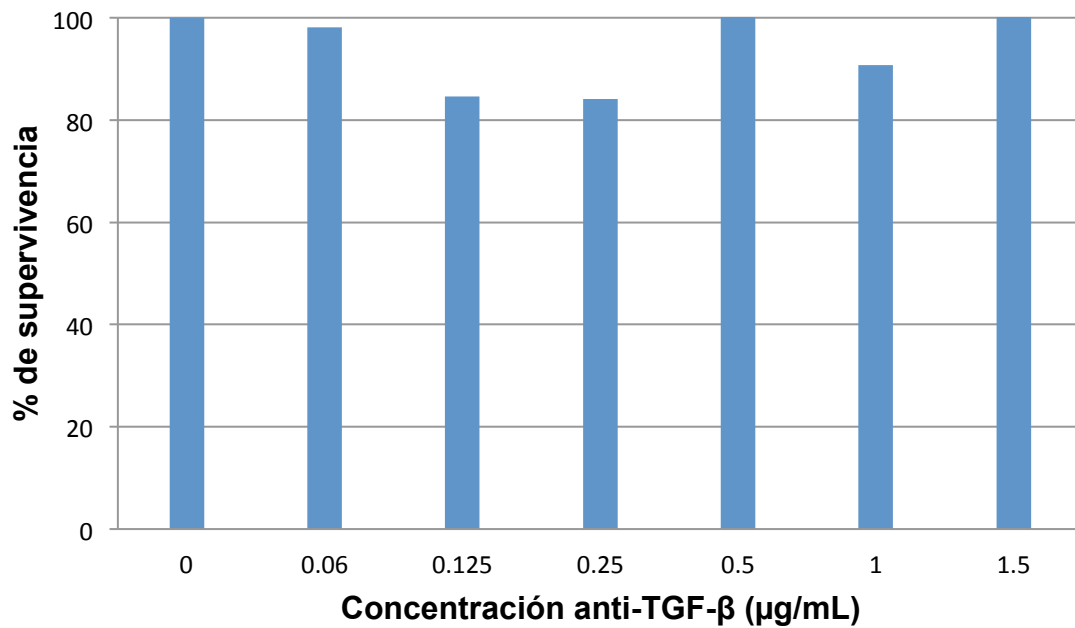
A**B**

Figura 32. Ensayo de citotoxicidad en cultivo primario de hepatocitos. A) Ensayo de supervivencia a las 24 hr. B) Ensayo de supervivencia a las 48 horas. Los datos se normalizaron con respecto a las células sin tratamiento. No existe efecto citotóxico del anticuerpo vNAR anti-TGF- β en hepatocitos.

8. Discusión

Se ha demostrado que es posible aislar anticuerpos de dominio sencillo de tiburones a partir de una biblioteca no inmune y que éstos tienen la capacidad de reconocer a su antígeno (Nuttall *et al.*, 2002). En un trabajo previo realizado por Camacho-Villegas (2012) en el Laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, se obtuvo un anticuerpo de dominio sencillo a partir de una biblioteca no inmune con capacidad de reconocer y neutralizar a la citocina anti-TGF- β , la expresión del anticuerpo se realizó en un sistema de expresión procariota utilizando *E. coli*.

Respecto a los sistemas de expresión de proteínas recombinantes se reporta un mayor rendimiento al emplear modelos de expresión de genes heterólogos en *P. pastoris*, que es una levadura que utiliza el metanol como fuente única de carbono (Poutou *et al.*, 2005). Este sistema presenta como ventaja adicional la secreción de la proteína clonada al medio de cultivo, lo que facilita la purificación de la misma, y que en términos prácticos representa un paso de pre-purificación; además de que es un organismo que no produce endotoxinas. Por estas razones se decidió utilizar a *P. pastoris* como sistema de expresión de la proteína vNAR anti-TGF- β .

Dado que el uso de codones entre la secuencia del gen *anti-TGF- β* aislado del tiburón *H. francisci* difiere del expresado por el hospedero (en este caso *P. pastoris*), fue necesario realizar la optimización del gen *anti-TGF- β* . En la Figura 8, se puede observar que la secuencia del gen nativo anti-TGF- β contenía un 42.26% en guanina y citosina (GC), así como repeticiones de codones raros que reducen la eficiencia de la traducción y que podrían separar la maquinaria de traducción. La disminución del alto contenido en GC en la secuencia optimizada permite aumentar el tiempo de vida media del ARNm, así como eliminar estructuras tipo “loop”, permitiendo una mejor unión del ribosoma, mayor estabilidad del ARNm y un aumento considerable en los niveles de expresión de la proteína recombinante (GenScript).

Con el PCR con gradiente de temperatura (Figura 10), se comprobó que los oligonucleótidos diseñados para amplificar la secuencia del gen *anti-TGF- β* ,

amplificaron el fragmento a las distintas temperaturas evaluadas, por lo que se decidió elegir la temperatura de 54°C como la temperatura óptima de amplificación.

Al evaluar el plásmido pPICZαA con el inserto anti-TGF-β (Figura 13), se observa diferencia en el tamaño con respecto al plásmido sin inserto, por lo que se realizó la amplificación por PCR del inserto anti-TGF-β. En la Figura 14, se observa que las 7 clonas amplificaron un fragmento de aproximadamente 850 pb, que corresponde al tamaño esperado con el inserto, y se observa una clara diferencia de tamaño con respecto al plásmido pPICZαA que no contiene dicho inserto.

Dado que las 7 clonas amplificaron un fragmento del tamaño esperado, se eligieron 2 clonas al azar para secuenciar y confirmar que las secuencias del gen se encontraran en fase con el locus AOX1, con la secuencia señal del factor de secreción α y con el extremo carboxilo-terminal. En la Figura 15 se observa que el alineamiento de secuencias de las 2 clonas presentan un máximo consenso en todas su bases; sin embargo, en la clona Ecoli6 la base en posición 275 no fue identificada y en la posición 740 presentaba una base adicional, razón por la cual se decidió elegir la clona Ecoli1.

Una vez que se confirmó la identidad del vector pPICZαA - anti-TGF-β se linealizó para favorecer su inserción génica en el locus AOX1. En la Figura 18 se observa que las 2 clonas de la cepa SMD1168 de *P. pastoris* transformadas con el vector pPICZαA - anti-TGF-β amplificaron un fragmento del tamaño esperado, por lo que se decidió enviarlas a secuenciar. En la Figura 19 se observa el alineamiento de las secuencias proteicas de las clonas positivas al inserto, tanto en *E. coli* como en *P. pastoris*, con la secuencia del gen *anti-TGF-β*, se observa claramente que las 2 secuencias de la transformación en *P. pastoris* empatan perfectamente, se decidió trabajar con la clona 1, denominada PTGB1.

Dado que el vector de expresión pPICZαA utilizado para expresar la proteína vNAR anti-TGF-β tiene como características principales la secreción al medio de la proteína recombinante y la adición de una etiqueta de 6 histidinas, el sistema de purificación Ni-NTA es el ideal para realizar la purificación, debido a la alta afinidad de su metal inmovilizado (níquel) por los residuos de histidina (The QIAexpressionist, 2003).

El Laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas contaba con un método estandarizado para purificar proteínas utilizando el sistema Ni-NTA, que consistía de un lavado con 15 mL de buffer de lavado conteniendo 20 mM de imidazol y 5 eluciones. Bajo estas condiciones se purificaron 2.160 L totales del sobrenadante obtenido. Al realizar el análisis de las eluciones (Figura 20), se observó una banda predominante de aproximadamente 15 kDa que corresponde a la proteína vNAR anti-TGF- β desnaturaliza. Sin embargo, también se observaron proteínas con tamaños de 75, 50, 35, 13 y 10 kDa que podrían corresponder a otras proteínas con residuos de histidina presentes en el medio de cultivo o a distintas conformaciones del anticuerpo.

El manual del fabricante de la resina establece que proteínas endógenas con residuos de histidina que interactúan con los grupos de Ni-NTA pueden ser eliminados empleando condiciones rigurosas de lavado que incluyen: incremento de la concentración de imidazol, volumen y número de lavados. (The QIAexpressionist, 2003)

Bajo este argumento, se decidió evaluar 5 condiciones de purificación (Tabla 3) con la finalidad de estandarizar un método para obtener una proteína con mayor pureza. Debido al gran potencial que presentan los anticuerpo de dominio sencillo vNAR en el área terapéutica y de diagnóstico, la pureza de la proteína es un punto clave a tomar en cuenta al momento de realizar ensayos que garanticen su inocuidad y eficiencia (Walls y Loughran, 2011).

De las 5 condiciones de purificación evaluadas, únicamente 2 de ellas mostraron un patrón bien definido de la banda de aproximadamente 15 kDa que correspondiente a la proteína anti TGF- β desnaturalizada (Figuras 24 y 25).

En la purificación realizada con 15 mL de buffer de lavado conteniendo imidazol 20 mM y con 10 mL de buffer de lavado conteniendo imidazol 50 mM, en el gel teñido con azul de Coomasie (Figura 24A) en las eluciones 1, 2 y 3 se observa una banda bien definida de aproximadamente 15 kDa que corresponde a la proteína vNAR anti-TGF- β desnaturalizada y en las eluciones 2 y 3 una banda por debajo de los 10 kDa que podría corresponder a una forma distinta del anticuerpo (Juarez *et al.*, 2011). Mientras que en el Western blot (Figura 24B) en las eluciones 1 y 2 se observa la banda correspondiente a la proteína desnaturalizada, y a pesar de que en éstas eluciones la banda por debajo de 10 kDa no se aprecia, si se observa en el sobrenadante sin

purificar y purificado, por lo que se consideró que corresponde a una conformación distinta del anticuerpo. En el segundo lavado se observa que parte de la proteína desnaturaliza se pierde.

En la purificación realizada con 15 mL de buffer de lavado conteniendo imidazol 20 mM y 10 mL de buffer de lavado conteniendo imidazol 100 mM, en el gel teñido con azul de Coomasie (Figura 25A) en las 5 eluciones se observa una banda por debajo de los 10 kDa que podría corresponder a una forma distinta del anticuerpo; mientras que en el Western blot (Figura 21B) en las eluciones 1 y 2 se observa una banda muy tenue correspondiente a la proteína vNAR anti-TGF- β desnaturalizada, y a pesar de que en estas eluciones la banda por debajo de 10 kDa no se aprecia, si se observa en el sobrenadante sin purificar y purificado y en los 2 lavados, por lo que se consideró que corresponde a una conformación distinta del anticuerpo. Se observa que en los dos lavados la mayor parte de la proteína desnaturaliza se pierde, debido a la alta concentración de imidazol utilizada.

Con base en el análisis de las 2 condiciones anteriormente mencionadas, se estableció como protocolo óptimo de purificación la condición que consiste de un lavado con 15 mL de buffer de lavado conteniendo imidazol 20 mM y un segundo lavado con 10 mL de buffer de lavado conteniendo imidazol 50 mM. Al realizar una comparación de ésta condición de purificación con la ya establecida en el Laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas (Figura 20) se observa que las bandas de 50, 35 y 13 kDa se eliminan, mientras que la banda de 75 kDa se reducen. Estos resultados indican que la utilización de este protocolo de purificación podría ser de gran utilidad en el Laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas para la purificación de otras proteínas vNAR.

Debido a que los volúmenes en los que se encontraba la proteína eran grandes, se decidió concentrar la proteína. Una vez concentrada, se calculó el rendimiento teórico resultando en 1.69 mg/L empleando *P. pastoris*.

Con la finalidad de determinar si el anticuerpo vNAR anti-TGF- β era capaz de reconocer a la citocina, se realizó un ELISA de reconocimiento (Figura 29) donde se observó que éste anticuerpo tiene la capacidad de reconocer a la isoforma 2 de la citocina TGF- β . Estos resultados coinciden con los reportados por Camacho-Villegas (2012), que indican que el anticuerpo vNAR anti-TGF- β expresado en *E. coli* tiene la capacidad de

reconocer a las 3 isoformas de TGF- β de mamífero. Debido a que las tres isoformas de esta citocina presentan una homología estructural y respecto a su función biológica del 60 al 80% (Bartram y Speer, 2004), se esperaría que el anticuerpo expresado en este proyecto tuviera la capacidad de reconocer a la isoforma 1 y 3.

Se ha demostrado que el epitelio de las glándulas lacrimales humanas produce TGF- β y que en lágrimas humanas existe TGF- β biológicamente activo, siendo la isoforma TGF- β 1 predominante (Gupta *et al.* 1996). Con base en estos reportes se decidió realizar un inmunoensayo ligado a enzima para determinar si el anticuerpo vNAR anti-TGF- β tenía la capacidad de reconocer a esta citocina en lágrimas.

Gupta y colaboradores reportan que las lágrimas sin concentrar no son detectadas en un ELISA, sin embargo al acidificarlas con ácido clorhídrico 1N para activar a las citocina TGF- β reportan una concentración de 38.51 ng/mL para la isoforma TGF- β 1 y de 2.32 ng/mL para la isoforma TGF- β 2. Debido a las concentraciones bajas que reportan, se decidió concentrar las lágrimas y acidificarlas con la finalidad de detectar a la citocina. En la Figura 30 se muestra el resultado del ELISA y se observa que existe diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo y a las lágrimas sin concentrar ni activar. Al comprar el reconocimiento del anticuerpo vNAR anti-TGF- β por lágrimas concentradas y acidificadas con el reconocimiento por la citocina TGF- β 2 (Figura 29), se observa que el reconocimiento en lágrimas es mayor (0.46) que el reconocimiento por la citocina TGF- β 2 (0.38).

Con los resultados del ELISA de reconocimiento en lágrimas humanas concentradas y activadas, se decidió realizar un Western blot con la finalidad de determinar si el reconocimiento era visible en un ensayo colorimétrico. En la Figura 31 se observa una banda de 15 kDa que corresponde a la citocina TGF- β presente en lágrimas humanas, con este resultado se demuestra que mediante un ensayo colorímetro es posible detecta a la citocina TGF- β en lágrimas.

Benito-Almazán (2012) menciona que el bloqueo del TGF- β revierte varios efectos en la funcionalidad de las células epiteliales de la superficie ocular, que pudieran ser considerados como perjudiciales y que se pueden relacionar con los daños observados en los casos de inflamación crónica y grave. La modulación de la expresión de este

factor podría ser, por tanto, una terapia potencial para determinadas patologías inflamatorias de la superficie ocular.

El ensayo de citotoxicidad en cultivo primario de hepatocitos extraídos de ratones Balb-c (Figura 32) demostró que la supervivencia de estas células no se ve afectada con las concentraciones de anticuerpo vNAR anti-TGF- β empleadas en un periodo máximo de 48 horas. Camacho-Villegas (2012) reporta un ensayo similar utilizando concentraciones menores de anticuerpo anti-TGF- β expresado en *E. coli*, que mostró una supervivencia del 58% en el tratamiento a las 24 horas y una supervivencia del 90% en el tratamiento a las 48 horas. Este efecto citotóxico se debió probablemente a la presencia de proteínas accesorias y a que el sistema de expresión produce endotoxinas.

Estos resultados indican que el anticuerpo vNAR anti-TGF- β no tiene un efecto citotóxico en hepatocitos, lo cual significaría que el anticuerpo vNAR anti-TGF- β no daña las células de éste órgano, que en un organismo vivo tendría la función de procesarlo para su eliminación.

Respecto a los anticuerpos que regulan al factor de crecimiento transformante β (TGF- β), únicamente existe uno llamado Fresolimumab (GC1008), que es un anticuerpo monoclonal humano con capacidad de neutralizar a las isoformas 1, 2 y 3 del TGF- β , y que actualmente se encuentra en la fase 2 de ensayos clínicos (Clinical Trials, 2013). Debido a las características y a la versatilidad de los anticuerpos de dominio sencillo de tiburón, el anticuerpo vNAR expresado en éste proyecto, tendría ventajas sobre el anticuerpo GC1008, que incluirían profunda penetración en tejidos densos, rápida eliminación del organismo y acceso a sitios de difícil acceso para el anticuerpo monoclonal humano. Por lo que, el anticuerpo vNAR anti-TGF- β podría utilizarse como agente terapéutico o de diagnóstico en enfermedades asociadas a desregulaciones de la citocina TGF- β .

Conclusiones

El gen anti-TGF- β optimizado, se clonó y expresó exitosamente en la levadura metilotrófica *P. pastoris*.

Se determinó la condición ideal de purificación, mediante cromatografía de afinidad a metales para el anticuerpo vNAR anti-TGF- β , eliminando las bandas inespecíficas correspondiente a 50, 35 y 13 kDa se eliminan; mientras que la banda de 75 kDa se reducen. La utilización de éste protocolo podría ser de gran utilidad para la purificación de otros anticuerpos vNAR.

Se obtuvo un rendimiento de 1.69 mg/L de proteína pura, menor que el registrado en otros trabajos, pero la proteína obtenida mostró mayor pureza. Además, mediante un inmunoensayo ligado a enzima se demostró que reconoce a la isoforma 2 de la citocina TGF- β .

Mediante un ensayo colorimétrico, se demostró que el anticuerpo vNAR anti-TGF- β expresado en *P. pastoris* reconoce a la citocina TGF- β en lágrimas humanas de pacientes sanos.

El ensayo de citotoxicidad en cultivo primario de hepatocitos de ratón, mostró que el anticuerpo vNAR anti-TGF- β expresado en *P. pastoris* no tiene efecto citotóxico (contrariamente con el reportado en *E. coli*), al ser empleado a una concentración de 1.5 μ g/mL durante un tratamiento de 48 horas. Sugiriendo que el anticuerpo vNAR anti-TGF- β podría utilizarse como agente terapéutico o de diagnóstico en enfermedades asociadas a desregulaciones de la citocina TGF- β .

Perspectivas

Optimizar las condiciones de expresión de los anticuerpos vNAR, con la finalidad de obtener una mayor producción de proteína.

Evaluar la capacidad de reconocimiento del anticuerpo vNAR, expresado en *P. pastoris*, por las isoformas 1 y 3 de la citocina TGF- β .

Determinar el nivel de detección del anticuerpo vNAR anti TGF- β expresado en *P. pastoris*.

Determinar los parámetros farmacocinéticos y la toxicidad del anticuerpo vNAR anti TGF- β expresado en *P. pastoris*.

Referencias bibliográficas

- Abbas, A. K., Lichtman A. H., y Pober J. S. (2010). Inmunología celular y molecular. 6^{ta} edición. Saunders Elsevier.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2004). Essential Cell Biology. 2^{da} edición. Gerald Science.
- Barrios-Alonso, V., Campuzano-Ruíz, R. (2003). Utilidad de los antagonistas de los receptores de angiotensina II en la insuficiencia cardíaca. Revista Clínica Española, 203 (1), 28-32.
- Bartram, U., Speer, C. P. (2004). The Role of Transforming Growth Factor in Lung Development and Disease. CHEST Journal, 125, 754-765.
- Benito-Almazán, M. J. (2012). Papel del Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β) y Eficiencia de Moléculas Inhibitorias en la Respuesta Inflamatoria de la Superficie Ocular. (Tesis de Doctorado, Universidad de Valladolid). Recuperada de: <http://uvadoc.uva.es/bitstream/10324/1902/1/TESIS242-130110.pdf>.
- Burks, T. N., Cohn, R. (2011). Role of TGF- β signaling in inherited and acquired myopathies. Skeletal Muscle, 1, 1-19.
- Camacho-Villegas, T. A. (2012). Anticuerpos de dominio sencillo y quimericos de tiburón neutralizantes de citocinas humanas. (Tesis de Doctorado) Universidad Autónoma de Baja California.
- Cereghino, J. L., Cregg, J. M. (1999). Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. Current Opinion in Biotechnology, 10 (5), 422-427.
- Clinical Trials (213). Recuperado de: <http://clinicaltrials.gov/>.
- Córdoba-Ruiz, H., Algecira-Encizo, N., Poutou-Piñales, R., y Barrera-Avellaneda, L. A. (2003). *Pichia pastoris*, una alternativa para la producción de glicoproteínas humanas de uso terapéutico. Estrategias de fermentación. Revista Colombiana de Biotecnología, 2(5), 73-84.
- Corpet, F. (1988). MultAlin: Multiple sequence alignment. Recuperado de: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>.
- Dahly, A. J., Hoagland, K. M., Flasch, A. K., Jha, S., Ledbetter, S. R., & Roman, R. J. (2002). Antihypertensive effects of chronic anti-TGF- β antibody therapy in Dahl S rats. American Journal of Physiology, 283, R757-R767.
- EasySelect *Pichia* Expression Kit: For Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZ α in *Pichia pastoris*. User Manual (2010). Recuperado de: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/easyselect_man.pdf.
- Gellissen, G. (2000). Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. Applied Microbiology and Biotechnology, 54, 741-750.

Greenberg, A. S., Avila, D. H., Hughes, M., Hughes, A., McKinney, E. C., & Flajnik, M. F. (1995). A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature*, 374, 168-173.

Gupta, A., Monroy, D., Ji, Z., Yoshino, K., Huang, A., & Pflugfelder, S. C. (1996). Transforming growth factor beta-1 and beta-2 in human tear fluid. *Current Eye Research*, 15 (6), 605-614.

Hernández-Pando, R. (2003). Participación del factor de transformación tumoral- β en la regulación de la inflamación y la respuesta inmunológica. *Gaceta Médica de México*, 139 (2), 135-138.

Hernández-Pando, R., Orozco, E. H., Aguilar, L. D., López-Casillas, F., y Rook, G. (2004). Inmunopatología de la tuberculosis pulmonar experimental. En: O. Flores-Herrera, H. Riveros-Rosas, A. Sosa-Peinado, E. Vázquez-Contreras (Eds). *Mensaje Bioquímico*, Vol. XXVIII. (pp.129-153). México, UNAM.

Holt, L. J., Herring, C., Jespers, L. S., Woolven, P. & Tomlinson, M. I. (2003). Domain antibodies: proteins for therapy. *Trends in Biotechnology*, 21 (11), 484-490.

Juarez, 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.

Kado, C. I., Liu, S. T. (1981). Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. *Journal of Bacteriology*. 15 (3), 1365-1373.

Kizu, J., Sakurai, H., Katagiri, S., Shinozaki, N., Ono, M., Tsubota, K., & Saito, I. (1996). Immunohistological analysis of tumour growth factor β 1 expression in normal and inflamed salivary glands. *Journal of Clinical Pathology*, 49, 728-732.

Letterio, J. J., Roberts, A. B. (1998). Regulation of Immune Responses by TGF- β . *Annual Review of Immunology*, 16, 137-161.

NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (1999). Recuperado de: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>.

Nejadmoghaddam, M. R., Chamankhah, M., Zarei, S., & Zarnani, A. H. (2011). Profiling and quantitative evaluation of three Nickel-Coated magnetic matrices for purification of recombinant proteins: helpful hints for the optimized nanomagnetisable matrix preparation. *Journal of Nanobiotechnology*, 9 (31), 1-11.

Nuttall, S. D., Humberstone, K. S., Krishnan, U. V., Carmichael, J. A., Doughty, L., Hattarki, M., Coley A. M., Casey, J. L., Anders R. F., Foley M., Irving R. A., & Hudson P. (2004). Selection and Affinity Maturation of IgNAR Variable Domains Targeting *Plasmodium falciparum* AMA1. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 55, 187-197.

Nuttall, S. D., Krishnan, U. V., Doughty, L., Nathanielsz, A., Ally, N., Pike, R. N., Hudson, P. J., Kortt, A. A., & Irving, R. A. (2002). A naturally occurring NAR variable domain

binds the Kgp protease from *Porphyromonas gingivalis*. Federation of European Biochemical Societies Letters, 516, 80-86.

Padua, D., Zhang, X. H. F., Wang, Q., Nadal, C., Gerald, W. L., Gomis, R. R., & Massagué, R. (2008). TGF β Primes Breast Tumors for Lung Metastasis Seeding through Angiopoietin-like 4. *Cell*, 133, 66-77.

Poutou, R. A., Quevedo, B. E., Córdoba, H. A., Sáenz, H. y Barrera, L. A. (2005). Influencia de la fuente de carbono sobre la expresión de proteínas AOX1-reguladas en *Pichia pastoris*. *Nova*, 3 (3), 75-87.

Protein Data Bank (2012). Recuperado de: <http://www.rcsb.org>.

Romanos, M. (1995). Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Current Opinion in Biotechnology*, 6, 527-533.

Roux, K. H., Greenberg, A. S., Greene, L., Strelets, L., Avila, D., McKinney, E. C., & Flajnik, M. F. (1998). Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR): Molecular convergence of NAR and unusual mammalian immunoglobulins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 11804-11809.

Ruiz, G., Moreno, M., López, M., y Vega, M. (2007). Anticuerpos monoclonales terapéuticos: Informe de vigilancia tecnológica. Recuperado de: http://www.gen-es.org/assets_db/publications/documents/pub_77_d.pdf.

Rumfelt, L. L., Diaz, M., Lohr, R. L., Mochon, E., & Flajnik, M. F. (2004). Unprecedented Multiplicity of Ig Transmembrane and Secretory mRNA Forms in the Cartilaginous Fish. *The Journal of Immunology*, 173, 1129-1139.

Saerens, D., Ghassabeh, G.H., & Muyldermans, S. (2008). Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology*, 8, 600-608.

Sambrook, J., Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3^{ra} edición. Cold Spring Harbor Laboratory.

Sentíes-Gómez, M. D., Gálvez-Gastélum, F. J., Meza-García, E., y Armendáriz-Borunda, J. (2005). *Gaceta Médica de México*, 141 (4), 315-322.

Stein, C. A. (1993). Suramin: A Novel Antineoplastic Agent with Multiple Potential Mechanisms of Action. *Cancer Research*, 53, 2239-2248.

Streltsov, V. A., Carmichael, J. A., & Nuttall, S. D. (2005). Structure of a shark IgNAR antibody variable domain and modeling of an early-developmental isotype. *Protein Science*, 14, 2901-2909.

Streltsov, V. A., Varghese J. N., Carmichael J. M., Irving R. A., Hudson P. J., & Nuttall S. D. (2004). Structural evidence for evolution of shark Ig new antigen receptor variable domain antibodies from a cell-surface receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101 (34), 12444-12449.

Teicher, B. A. (2007). Transforming Growth Factor- β and the Immune Response to Malignant Disease. *Clinical Cancer Research*, 13(21), 6247-6251.

The QIAexpressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins (2003). Recuperado de: http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN_QIAexpressionist_EN.pdf.

Toossi, Z., Ellner, J. J. (1998). The Role of TGF β in the Pathogenesis of Human Tuberculosis. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 87 (2), 107-114.

Walls, D., Loughran, S. T. (2011). *Protein Chromatography: Methods and Protocols*. Human Press.

Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juarez, K., Urrutia, M., Cauerhff, A., Danquah, A., Rissiek, B., Scheuplein, F., Schwarz, N., Adriouch, S., Boyer, O., Seman, M., Licea, A., Serreze, D. V., Goldbaum, F. A., Haag, F. & Koch-Nolte, F. (2009). Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Medical Microbiology and Immunology*, 198, 157–174.

Zhang, W., Inan, M., & Meagher, M. M. (2000). Fermentation Strategies for Recombinant Protein Expression in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 5, 275-287.

Zheng, X., De-Paiva, C. S., Rao, K., Li, D. Q., Farley, W. J., Stern, M., & Pflugfelder, S. C. (2010). Evaluation of the Transforming Growth Factor β Activity in Normal and Dry Eye Human Tears by CCL-185 Cell Bioassay. *Cornea*, 29 (9), 1048-1054.

Zuyderduyn, S., Hiemstra, P. S., & Rabe, K. F. (2004). TGF- β differentially regulates TH2 cytokine- induced eotaxin and eotaxin-3 release by human airway smooth muscle cells, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114 (4), 791-798.

Anexos

Protocolo de purificación

1. Previo a la purificación, la resina (1 mL de resina Ni-NTA agarosa) se equilibra con 20 mL de buffer de lavado 20 mM de imidazol.
2. Se ajusta el pH (8) al sobrenadante.
3. El sobrenadante se pasa por gravedad a través de la columna (2 veces el volumen total).
4. Se realiza un primer lavado de 15 mL con buffer de lavado 20 mM de imidazol.
5. Se realiza un segundo lavado de 10 mL con buffer de lavado 50 mM de imidazol.
6. Se realizan 5 eluciones de 500 μ L con buffer de elución. Al añadir el buffer de elución, la columna se tapa y se deja reposar 5 minutos entre elución. Transcurrido el tiempo, la columna se destapa y las eluciones se colectan en tubos estériles de 1.5 mL.
7. Finalmente la columna se lava con 20 mL de buffer de lavado 20 mM de imidazol.

Buffer de lavado 20 mM de imidazol

(20 mM Imidazol, 50 mM Fosfato monosódido, 300 mM NaCl, pH 8)

	1L	500ml	250ml	PM
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	6.9 g	3.45 g	1.73 g	137.99
NaCl	17.45 g	8.77 g	4.39 g	58.44
Imidazol	1.36 g	0.68 g	0.34 g	60.08

Buffer de lavado 50 mM de imidazol

(50 mM Imidazol, 50 mM Fosfato monosódido, 300 mM NaCl, pH 8)

	1L	500ml	250ml	PM
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	6.9 g	3.45 g	1.73 g	137.99
NaCl	17.45 g	8.77 g	4.39 g	58.44
Imidazol	3.4 g	1.7 g	0.85 g	60.08

Buffer de elución

(250 mM Imidazol, 50 mM Fosfato monosódico, 300 mM NaCl, pH 8)

	1L	500ml	250ml	PM
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	6.9 g	3.45 g	1.73 g	137.99
NaCl	17.45 g	8.77 g	4.39 g	58.44
Imidazol	17 g	8.5 g	4.25 g	60.08
