



Universidad Nacional Autónoma de
México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala



Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de
Ensenada



CICESE

Biología

Proyecto de Tesis de licenciatura

Utilización de anticuerpos del tiburón *Heterodontus francisci*
para detección de linfoma mediante inmunofluorescencia

Director: Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

Alumna: Gabriela Constanza Martínez Ortiz



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A mi mamá, Pelu, gracias por siempre estar ahí para mí, por quererme, por lo increíble que eres y todo lo que me haces reír, por permitirme volar hasta donde he querido y preocuparte porque siempre cumpla mis sueños y sea feliz. Eres la mejor mamá que existe.

A mi papá, por apoyarme en todo momento y procurar mi bienestar, por quererme y darme todo lo que necesito. Tú eres el mejor papá. Gracias a ustedes soy quien soy.

A mis hermanas Susy y Dany, porque aunque a veces nos exasperamos, al final siempre me hacen reír; ser hija única no sería tan divertido, las quiero mucho hermis; y a Guido, por hacernos tan felices.

A Betsa, por siempre asegurarse de que estuviera bien, de que no pasara hambre y de que mi recámara no estuviera tan tirada, sobre todo al final de cada semestre. Puede que no seas mi madrina Betsa, pero yo siempre te he sentido como si lo fueras.

A Alberto, por siempre apoyarme cuando me sentí caer, cuando pensé que no terminaría y cuando tuve momentos de debilidad. Gracias por siempre estar ahí para mí. Algo bueno debo de haber hecho, para que la vida te pusiera en mi camino. Ich liebe dich fety.

A mis amigos, Cesar (aunque dices que sólo somos amigos universitarios, yo sé que no es verdad), Michael (gracias por soportar siempre mis locuras cuando no dormía), Janette (por apoyarme cuando hablaba todo el tiempo de Coldplay y acompañarme a buscarlos), Mariana (por siempre hacerme reír con tus ocurrencias), Potter (por amar a Guido descontroladamente), Isis (por ser pequeña y suave). Si disfruté y amé la universidad, fue gracias a que los conocí y a que me brindaron su amistad incondicional. Los quiero un montón y sé que todos vamos a ser muy exitosos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme dado la oportunidad de vivir los 4 mejores años de mi vida....hasta ahora.

Al Dr. Alexei F. Licea Navarro, por haberme respondido ese correo que le envié solicitando hacer mi tesis con él, por haberme aceptado y haberme brindado su apoyo. Usted ha sido parte importante en la búsqueda de mis sueños.

A la Dra. Edna Sánchez Castrejón, por haberme apoyado en la elaboración de mi trabajo, por su enseñanza y por soportar todas mis preguntas. Te considero una buena amiga y parte importante de mi estancia en Ensenada. Gracias por todo Edna.

A mis amigos de intercambio. Haberlos conocido cambió mi vida completamente. Siempre los llevo en mi mente y en mi corazón. Estén donde estén, sé que siempre les irá bien. Hicieron de ese intercambio la mejor experiencia que he tenido en mi vida.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, por la oportunidad otorgada.

A mis compañeros de laboratorio en CICESE: Félix, Tanya, Pavel, Karla, Irasema, Johanna, Samanta, Ángeles, Carmen, Mimi, Ricardo, Jairo, Jennifer, por haber hecho mucho más amena mi estancia allá.

Al Dr. Sergio Vaca Pacheco, por todo el apoyo brindado para la conclusión de este escrito y de mi proceso de titulación, así como a la Dra. Martha Ofelia Salcedo Álvarez y al Dr. José Eduardo Campos Contreras por el apoyo proporcionado y sus observaciones respecto a mi trabajo.

A mi familia en general, en especial a mis tías Pita, Rosalba y Popi, por siempre imprimirle alegría a mi vida. A todos mis primos y a Rosalba, porque nuestros años buceando juntas, siempre serán los mejores.

A todo el resto de mis amigos de la UNAM y del Sucre, entre ellos Magda, por todos estos años de amistad y apoyo, te quiero mucho amiga, y los quiero mucho a todos.

A todos los que a lo largo de mi vida han creído en mí.

A ti, por estar leyendo mi trabajo.

“Abrir las puertas, quitar los cerrojos,
abandonar las murallas que te protegieron,
vivir la vida y aceptar el reto”.

Mario Benedetti

Resumen

Es el cáncer una de las enfermedades de mayor prevalencia y mortandad. En el tejido linfoide destaca el linfoma, cuyos casos están aumentando cada vez más. El diagnóstico temprano es crucial para el tratamiento oportuno y significativo en el pronóstico. Se ha propuesto el empleo de anticuerpos para diagnóstico y tratamiento no sólo de linfoma, sino de los diferentes tipos de cáncer en general. Se ha destacado el empleo de anticuerpos de tiburón de tipo IgNAR, principalmente los dominios variables, conocidos como vNAR, por presentar estabilidad térmica, un tamaño pequeño y una buena capacidad de unión a diversos antígenos. Por lo anterior, en este trabajo se emplearon fragmentos de tipo vNAR del tiburón *Heterodontus francisci*, de una biblioteca elaborada con anterioridad, para establecer una técnica de detección de linfoma mediante inmunofluorescencia. Se llevó a cabo la adecuada extracción del plásmido y su secuenciación. Se demostró la presencia del vNAR mediante ensayos de Western Blot y tinción de Coomassie y se cuantificó la concentración de proteína que fue de 83.11 µg/ml. Los ensayos de inmunofluorescencia se llevaron a cabo en la línea celular JY, resultando éstos negativos.

Palabras clave: IgNAR, vNAR, células JY, linfoma

Contenido

| | | |
|-------------|--|-----------|
| I. | Introducción..... | 1 |
| | I.1 El Cáncer..... | 1 |
| | I.2 Linfoma..... | 2 |
| | I.3 Técnicas de detección de linfoma..... | 3 |
| | I.4 Generalidades de Inmunoglobulinas..... | 5 |
| | I.5 Sistema Inmune de elasmobranquios..... | 6 |
| | I.6 Anticuerpos de tipo IgNAR..... | 8 |
| II. | Justificación..... | 9 |
| III. | Objetivos | |
| | III.1 Objetivo general..... | 10 |
| | III.4 Objetivos particulares..... | 10 |
| IV. | Metodología..... | 11 |
| | IV.1 Extracción del plásmido..... | 12 |
| | IV.2 Elaboración de células electrocompetentes..... | 13 |
| | IV.3 Transformación..... | 14 |
| | IV.4 Inducción de expresión de vNAR..... | 15 |
| | IV.5 Extracción periplásmica y purificación..... | 15 |
| | IV.6 Identificación de la proteína expresada mediante Western Blot y Tinción de Coomassie | 17 |
| | IV.7 Cuantificación de la proteína vNAR..... | 18 |
| | IV.8 Concentración de muestras de vNAR..... | 19 |
| | IV.9 Mantenimiento de células JY..... | 19 |
| | IV.10 Ensayo de inmunofluorescencia..... | 19 |

| | | |
|--------------|--|----|
| V. | Resultados | 20 |
| | V.1 Secuenciación de vNAR..... | 20 |
| | V.2 Eficiencia de Transformación..... | 21 |
| | V.3 Identificación de la proteína expresada mediante Western Blot y Tinción de Coomassie..... | 22 |
| | V.4 Cuantificación de la proteína vNAR..... | 24 |
| | V.5 Concentración de vNAR..... | 25 |
| | V.6 Mantenimiento de células JY..... | 26 |
| | V.7 Ensayo de inmunofluorescencia..... | 27 |
| VI. | Discusión de resultados | 28 |
| VII. | Conclusiones | 30 |
| VIII. | Perspectivas | 30 |
| IX. | Referencias | 31 |
| X. | Anexos | 36 |
| | X.1 Buffer de lisis | |
| | X.2 Buffer de lavado | |
| | X.3 Buffer de elución | |
| | X4. Medio SB | |

I. Introducción

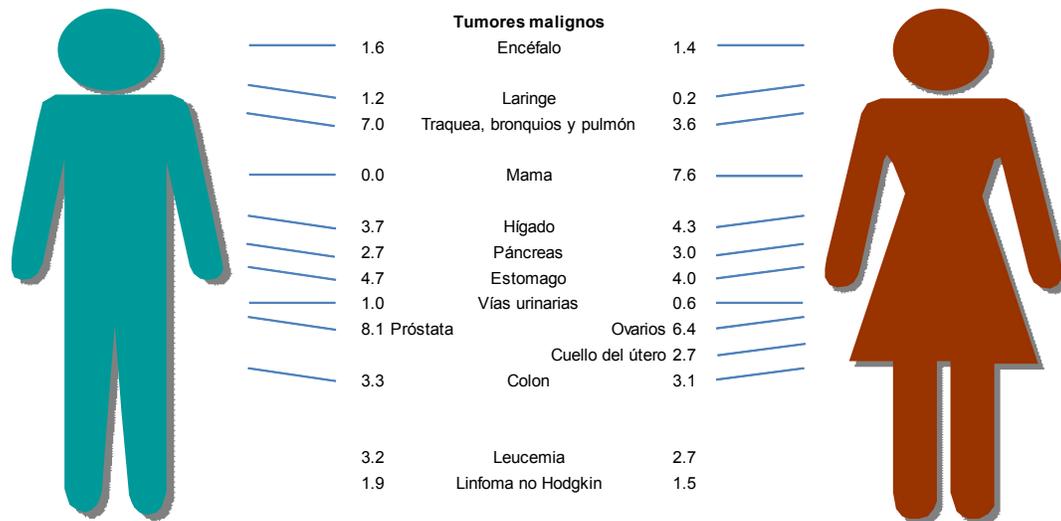
I.1. El Cáncer

Cáncer es un término que engloba a un grupo de enfermedades cuya característica principal es la presencia de células que pierden la capacidad de controlar su crecimiento y división, pudiendo resultar en la formación de un tumor. Estas células pueden extenderse hacia diferentes zonas del cuerpo y otros órganos en un proceso que se conoce como metástasis. De los casos de cáncer, el 92% tiene su origen en tejido epitelial y el 8% restante se refiere al resto de los tejidos. Hay distintos tipos de cáncer: carcinomas, sarcomas y leucemias. Los carcinomas se originan en los epitelios, los sarcomas en las estructuras de sostén, tales como los vasos sanguíneos y el tejido fibroso. Las leucemias y los linfomas tienen su origen en las células hematopoyéticas de la médula ósea (Santos y Rodríguez Villanueva, 1986). Esta enfermedad es uno de los mayores problemas de salud pública en el mundo y una de las principales causas de mortalidad tanto en la infancia como en la adultez (Abbas *et al.*, 2002).

De acuerdo a la Sociedad Americana de Cáncer, en 2008 se reportaron, a nivel mundial, cerca de 1.4 millones de casos de dicha enfermedad y 550,000 muertes causadas por la misma. En sólo cinco años, a partir de 2002, se reportaron 10.9 millones de casos y 6.7 millones de muertes, por lo que se prevé que estos números sigan aumentando, hasta llegar a más de 15 millones de casos y 12 millones de muertes para 2020 (Stefanek *et al.*, 2009).

En nuestro país, el cáncer constituye la segunda causa de mortalidad después de las enfermedades cardiovasculares, con una tasa cercana a 51.6 por 100,000 habitantes (Lazcano-Ponce y Hernández-Ávila, 1997). De acuerdo a estadísticas de INEGI, en 2009 se reportaron 72,627 defunciones por esta enfermedad, 35,536 de las cuales correspondieron a hombres y el resto a mujeres (INEGI, 2011). En la figura 1 se pueden observar los principales tipos de cáncer que han provocado la muerte de ciudadanos mexicanos.

Porcentaje de defunciones por tumores malignos para cada sexo
2008



Fuente: INEGI. Estadísticas Vitales. Defunciones 2008. Base de datos.

Figura 1: Principales tipos de cáncer que han causado la defunción de los afectados en México. Distribución según sexo (INEGI, 2008).

I.2. Linfoma

El término linfoma se refiere a un conjunto de neoplasias malignas que se originan en el sistema inmunitario, en el tejido linfoide (Sobrevilla Calvo, 2002). De acuerdo a la *Fundación para la Investigación de Linfoma*, es el tipo de cáncer de la sangre más común que existe y se desarrolla cuando los linfocitos comienzan a reproducirse de manera anormal. La enfermedad puede presentarse en dos tipos de linfocitos, los linfocitos T y B, que al transportarse por el torrente sanguíneo, pueden llegar a afectar al bazo y la médula espinal, entre otros órganos, acumulándose para la formación de tumores. Se conocen cerca de 35 tipos diferentes de linfoma, que se clasifican en 2 grupos principales, Linfoma de Hodgkin y el Linfoma de No-Hodgkin.

El primero, fue descrito en 1832 por Thomas Hodgkin; se le considera una neoplasia maligna curable, a pesar de que cerca del 30% de los pacientes que se han reportado con dicha enfermedad no han presentado cura. Es común en gente joven de entre 8 y 20 años y alrededor de los 50 años. Se caracteriza por la

presencia de un tipo de células conocidas como de Reed-Sternberg, por los dos médicos que las describieron por vez primera. Se consideran un tipo anormal, de mayor tamaño, de linfocitos B. Una de las posibles causas de esta enfermedad es un agente infeccioso, como el virus de Epstein-Barr (VEB) (Gutiérrez Romero, 2002). Este virus es un miembro del grupo de los virus del herpes, y es el causante de la mononucleosis infecciosa. Se le ha asociado también diversas enfermedades como el linfoma de Burkitt, Cáncer nasofaríngeo y linfomas malignos en células T y B. Tiene una gran incidencia en África, en donde se ha comprobado que pacientes con SIDA, cuyo sistema inmune se encuentra suprimido, tienen una alta probabilidad de desarrollar linfomas; *in vitro* el VEB puede transformar células B normales a líneas celulares linfoblastoides (Cai *et al.*, 2011).

En el caso de los denominados linfoma de No-Hodgkin, corresponde a un grupo de más de 30 neoplasias en las que la célula origen es un linfocito; se localizan fuera de la médula ósea. En este grupo de enfermedades, entre un 40 y 50% de los pacientes afectados, fallecen, por falta de tratamiento o por progresión de la enfermedad. Son los tumores no epiteliales más comunes en cabeza y cuello (Sánchez Guerrero, 1998, García Vidrios, 2002).

Entre 1973 y 2002 la incidencia de linfoma aumentó en un 63% a nivel mundial y en años posteriores el número de casos ha aumentado de manera acelerada. En los Estados Unidos, actualmente el linfoma de no-Hodgkin es la quinta enfermedad más comúnmente diagnosticada como maligna (Clarke *et al.* 2006, Ekström-Smedby *et al.*, 2006).

I.3 Técnicas de detección de linfoma

En este tiempo, debido a los avances científicos y tecnológicos, existen diversas técnicas que permiten hacer más eficaz la detección de linfoma. Destacan la de PCR en tiempo real, caracterizada por una alta sensibilidad y un amplio rango dinámico. La cantidad de material biológico requerido para un análisis de este tipo es mucho menor de la que se requiere en otros tipos de técnicas; por esta razón

es considerada como el método más sensible para determinar una cantidad de DNA en una muestra biológica compleja. Mediante la PCR en tiempo real ha sido posible identificar nuevos subgrupos de linfoma con distintos perfiles de expresión génica, permitiendo establecer un mejor diagnóstico y tratamiento (Ståhlberg *et al.*, 2005).

La tomografía por emisión de positrones, consiste en una toma de imagen de cuerpo entero; permite la caracterización funcional de tejidos hipermetabólicos y ha sido empleada para detectar manifestaciones extraganglionares y ganglios linfáticos en pacientes con linfoma maligno. Esta técnica, utiliza 2-(flúor-18)fluoro-2-desoxi-D-glucosa (FDG), un análogo de la glucosa emisor de positrones cuya acumulación se ve incrementada en pruebas con tumores malignos en comparación con el tejido normal. Otros métodos más convencionales como la tomografía computarizada, las imágenes de resonancia magnética, se utilizan para detectar anomalías en la médula ósea y las ecografías y pueden proveer también información morfológica sobre manifestaciones de linfoma (Buchmann *et al.*, 2001).

En nuestro país, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), propone la realización de biopsias en procesos de diagnóstico de (IMSS, 2010). Sin embargo, éstas pueden ser interpretadas erróneamente, dando como resultado falla en el diagnóstico. La hibridación *in situ* fluorescente (FISH, por sus siglas en inglés), es otro método que permite detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos, por lo que es útil para la búsqueda de translocaciones características de diferentes tipos de linfoma y para la cuantificación de células alteradas (Tojo Castro, 2009).

Una de las técnicas terapéuticas más empleadas, no sólo en el linfoma, sino en general en los diferentes tipos de cáncer, es el uso de anticuerpos monoclonales para diagnóstico y tratamiento. Cabe destacar el uso de los fragmentos variables de cadena sencilla, debido a que al ser de menor tamaño que el anticuerpo total, su manipulación es más fácil y su producción más económica (Weisser y Hall, 2009).

I.4 Generalidades de Inmunoglobulinas

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ab, Ig) son los elementos fundamentales en una respuesta inmunitaria humoral. Son glicoproteínas, con un tamaño de alrededor de 150 kDa, que se localizan en la sangre y otros fluidos y se emplean para identificar y neutralizar patógenos extraños, tales como bacterias y virus (Cuesta *et al.*, 2010).

Se conocen 5 clases de inmunoglobulinas en los vertebrados: Alpha (IgA), Delta (IgD), Epsilon (IgE), Gamma (IgG) y Mu (IgM). En la sangre humana, las más abundantes son las IgG's, con cerca de 85% de prevalencia en el suero, por lo que son también las más empleadas en aplicaciones terapéuticas. Consisten en un heterotetrámero, formado por dos diferentes tipos de cadenas polipeptídicas, dos pesadas (H), por ser aproximadamente dos veces más grandes que las cadenas ligeras (L); dichas cadenas se encuentran unidas por enlaces disulfuro y suelen ser iguales en todas las Ig's. Sin embargo, diferentes Ig's suelen presentar una variabilidad perceptible en el dominio N-terminal, mientras que el resto de las secuencias permanecen relativamente constantes, razón por la cual dicho dominio se conoce como región variable (V) y los otros dominios como región constante (C). Cada cadena L presenta un dominio VL y uno CL; en el caso de las cadenas H, existe una región VH y tres dominios CH (CH1, CH2 y CH3, respectivamente). Los dominios V determinan la afinidad y diversidad de unión al antígeno, mientras que los dominios C son responsables de dar estructura a la proteína y de funciones efectoras.

En cada dominio VH y VL se localizan tres zonas hipervariables, en las que la variabilidad de la secuencia se concentra en "loops" o bucles, que son responsables del reconocimiento del antígeno y son llamadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés). El resto de los dominios V se constituye por áreas relativamente constantes, llamadas Fr (por el vocablo en inglés Framework). Existen 4 Fr's en cada Ig, actúan como

apoyo para los bucles y permiten dar estructura a la proteína (Parslow *et al.*, 2001, Weisser y Hall, 2009). La figura 2 corresponde a la configuración de una Ig.

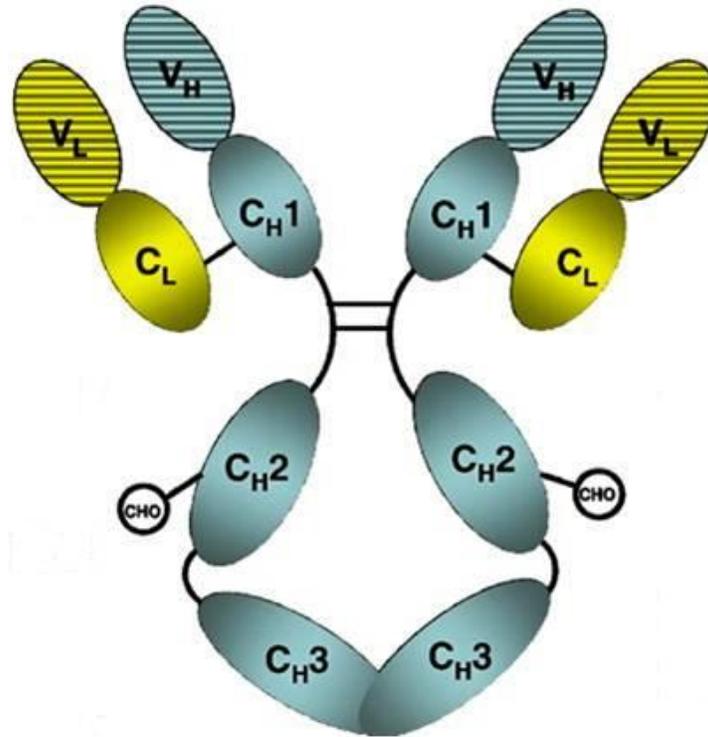


Figura 2: Estructura básica de una Ig. Las cadenas H se observan en un tono azulado y las L en amarillo (Weisser y Hall, 2009).

Los anticuerpos se comenzaron a usar en cuestiones terapéuticas, por ser moléculas naturales presentes en vertebrados mandibulados para proteger al organismo de infecciones, células malignas y moléculas tóxicas (Saerens *et al.*, 2008).

I.5 Sistema inmune de elasmobranquios

Los peces cartilaginosos, se dividen en dos grupos, los holocéfalos, mejor conocidos como quimeras, y los elasmobranquios, que se refieren a tiburones y rayas; comprenden cerca de 700 especies. Divergieron de un ancestro común con otros peces mandibulados hace aproximadamente 500 millones de años y son los organismos más antiguos que poseen componentes del sistema adaptativo

inmune de vertebrados, como inmunoglobulinas (Ig's), receptores de células T (TCR's) y el complejo mayor de histocompatibilidad (Stanfield *et al.*, 2004).

Las Ig's de los tiburones se descubrieron hace aproximadamente 40 años, y aunque eran consideradas como sumamente primitivas, diversos estudios han confirmado las ventajas de su empleo en medicina. Se han detectado tres tipos de isotipos de cadenas pesadas (H) de inmunoglobulinas: IgM, que es equivalente a la de otros organismos superiores como mamíferos, aves y anfibios, IgW e IgNAR (figura 2); los tres tipos se han encontrado de manera secretoria y transmembranal y sus genes se agrupan en "cluster" y no en traslocones como en los mamíferos. Esta configuración, permite plasticidad que no se puede lograr con la organización en traslocón (Dooley y Flajnik, 2006 y Flajnik, 2002).

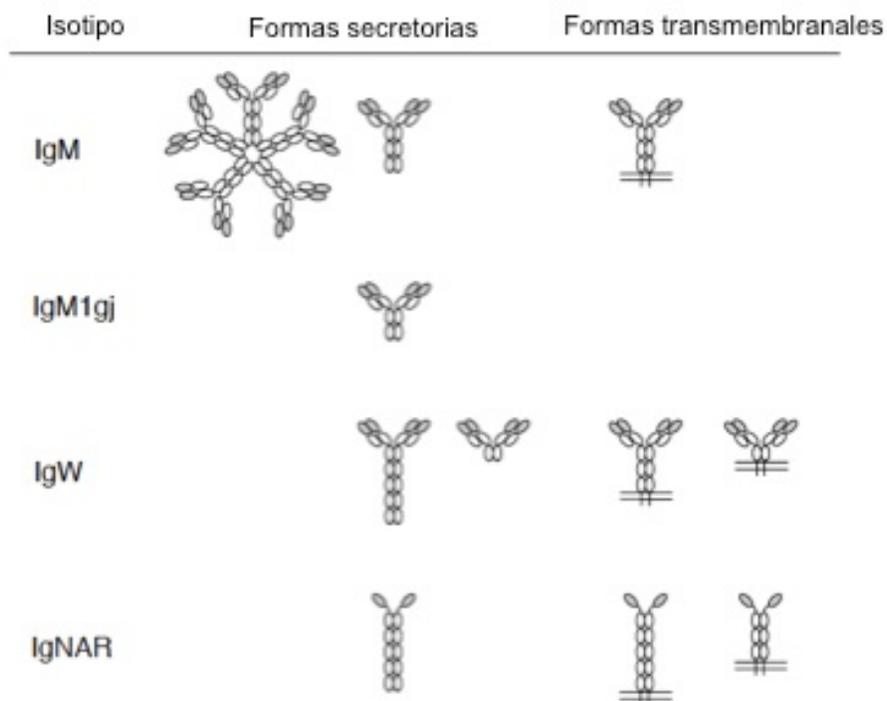


Figura 3: Isoformas de Ig's transmembranales y secretoria de elasmobranquios. Los dominios constantes aparecen en blanco y los variables en gris (Dooley y Flajnik, 2006).

I.6 Anticuerpos de tipo IgNAR

El anticuerpo exclusivo de elasmobranquios conocido como IgNAR (por las siglas de nuevo receptor de antígeno en inglés) fue descubierto en 1995 y consiste en un homodímero de dos cadenas pesadas, que no se asocia con las cadenas ligeras (L), a diferencia de los anticuerpos convencionales de humanos y ratones. Su tamaño es de aproximadamente 180 kDa (Dooley *et al.*, 2003, Dooley y Flajnik, 2006).

Cada cadena pesada tiene 1 dominio variable (V) y 5 dominios constantes (C), como se observa en la figura 3. Se ha comprobado que las regiones V son dominios sencillos, que se unen a los dominios C a través de regiones flexibles en forma de bisagra. A estos dominios sencillos se les conoce como vNAR y tienen la capacidad de unirse a antígenos de manera independiente, razón por la cual son candidatos a ser las unidades de reconocimiento inmune basadas en anticuerpos más pequeñas (Nuttall *et al.*, 2004, Stanfield *et al.*, 2007).

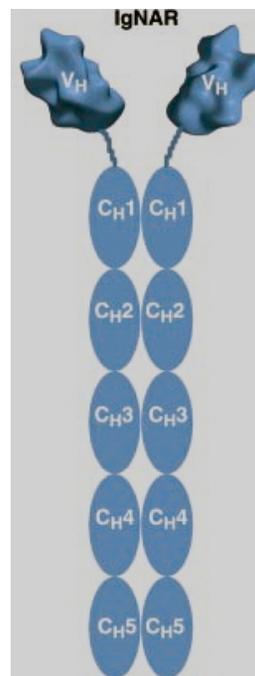


Figura 4: Esquema del anticuerpo IgNAR, formado por dos cadenas pesadas con una región variable (V_H) y 5 regiones constantes (C_H) cada una (Stanfield *et al.*, 2004).

Debido a que los dominios vNAR, poseen sólo la mitad de la superficie de unión a antígenos de los anticuerpos de mamíferos, presentan un largo CDR3, de alrededor de 17 residuos de longitud; su tamaño es de entre 13 y 15 kDa. Su tamaño reducido y los CDR3 extendidos, son los que le confieren una buena penetración de tejido in vivo y una alta efectividad para acceder a sitios antigénicos, imposibles para otros tipos de anticuerpos. Presentan también una alta solubilidad y estabilidad térmica (*Op. Cit*, 2004, Wesolowski *et al.*, 2009).

Dooley *et al.* (2003) desarrollaron una biblioteca, basada en el dominio variable de IgNAR del tiburón nodriza (*Ginglymostoma cirratum*) inmunizado con lisozima de clara de huevo de gallina (HEL), demostrando que dichos dominios son capaces de expresarse funcionalmente en *E.coli*, son sumamente estables al conservar más del 20% de su funcionalidad después de incubarse 3 horas a 100° C y presentan una afinidad de rango nanomolar.

Adelman *et al.* (2003), aislaron y caracterizaron, por cromatografía de afinidad, un amplio repertorio de anticuerpos naturales para dos especies de tiburones, el tiburón gris (*Carcharhinus plumbeus*) y tiburón tigre (*Galeocerdo curvier*), así como de preparaciones de IgG e IgM monoclonales en humanos, con el fin de compararlos entre sí. Reportaron que todas las muestras presentaron inmunoglobulinas, anticuerpos naturales para Receptores de Linfocitos T (TCRs) humanos, antígenos retrovirales y el antígeno de senescencia celular humano, lo que indica una capacidad conjunta para reconocer una gran variedad de antígenos, a pesar de tratarse de organismos con una evolución de respuesta inmune distinta.

II. Justificación

Debido a la alta incidencia y el rápido aumento, en los últimos años, de casos de personas afectadas con algún tipo de linfoma, es importante el desarrollo de un método de detección rápida de dicha enfermedad, que permita facilitar el diagnóstico y procedimiento del tratamiento de la misma. Por esta razón, en el

presente trabajo se propone el empleo de fragmentos de anticuerpos de tipo vNAR, del tiburón *Heterodontus francisci*, acoplados con un anticuerpo Anti-HA asociado con Isotiocianato de fluoresceína (FITC), capaz de emitir fluorescencia, para de esta manera detectar la presencia de células de linfoma por medio de inmunofluorescencia.

III. Objetivos

III.1 Objetivo General

Establecer una técnica de detección de linfoma por inmunofluorescencia a partir del empleo de fragmentos tipo vNAR de anticuerpos IgNAR del tiburón *Heterodontus francisci*

III.2 Objetivos Particulares

1. Expresar y caracterizar el fragmento vNAR que reconoce las células de linfoma humano JY.
2. Implementar el cultivo de las células JY para su identificación por fluorescencia.
3. Realizar ensayos de la técnica de microscopía en estudios de inmunofluorescencia empleando fragmentos vNAR recombinantes.

IV. Metodología

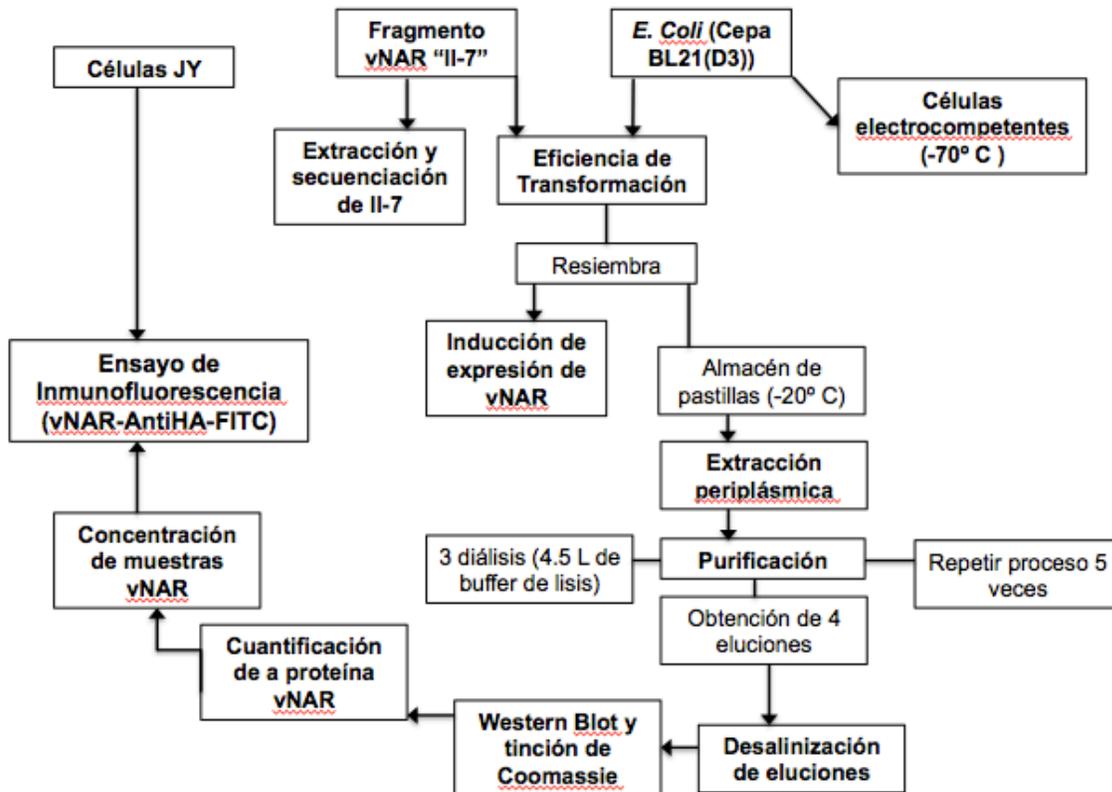


Figura 5: Diagrama metodológico.

Se trabajó con un plásmido que había sido empleado previamente en el laboratorio de Inmunología molecular y biotoxinas de CICESE (Quezada Iñiguez, 2008), del que se llevó a cabo la extracción y secuenciación, con el fin de comprobar que la secuencia resultante coincidiera con la previamente reportada en el laboratorio. A este plásmido se le llamó "II-7".

Se trabajó la cepa BL21(D3), de *E. coli*, de la que se prepararon células electrocompetentes que se almacenaron a -70°C . Para dicha cepa se llevó a cabo la transformación con el plásmido para calcular, después de 24 horas, la eficiencia de transformación y poder proceder con la inducción de la expresión de vNAR.

IV.1 Extracción del plásmido

Se colocó la cepa que contenía el plásmido en 4 tubos con 3 ml de medio LB cada uno y se dejó en incubación toda la noche a 37° C a 250 revoluciones por minuto (rpm).

Posteriormente se centrifugó el paquete celular a 13,000 rpm por 3 minutos, colocando los cultivos en tubos de 2 ml. El sobrenadante se descartó y los tubos se centrifugaron una vez más, para asegurar que las pastillas quedaran lo más secas posibles. El sobrenadante restante se retiró empleando una micropipeta de 200 µl y se colocaron los tubos en hielo.

Una vez colocadas en hielo, las pastillas se resuspendieron en 100 µl de Amortiguador GTE (Glucosa/Tris/EDTA) y se añadieron 1.2 µl de RNAsa con el fin de que quedara a una concentración de 0.2 mg/ml.

Las células se resuspendieron empleando un Vortex y una vez resuspendidos se les agregaron 200 µl de 0.4 N NaOH/ 2% SDS. Una vez realizado esto se dejaron reposar 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente 5 minutos en hielo. Al término de los 10 minutos se agregaron a cada tubo 150 µl de Acetato de Potasio 3 M, pH 5.8; se mezclaron los tubos por inversión y se colocaron en hielo por 10 minutos. Los tubos se centrifugaron por 15 minutos a 13,000 rpm y se recuperó el sobrenadante en tubos nuevos. Se recuperaron alrededor de 450 µl en cada tubo nuevo, a los que se les adicionaron 900 µl de Etanol al 100%.

Los tubos se almacenaron en el congelador por 90 minutos, y posteriormente se centrifugaron por 15 minutos a 13,000 rpm. El sobrenadante se descartó y se adicionó 1 ml de Etanol al 70% a cada tubo; éstos se centrifugaron nuevamente por 15 minutos a 13,000 rpm.

Los sobrenadantes se descartaron y las pastillas se pusieron a secar para resuspenderlas en 50 µl de agua destilada e introducirlos en la incubadora a 37° C.

Uno de los tubos fue enviado a la compañía SeqXcel®, en San Diego, EUA, con el fin de que fuera analizado y secuenciado, para comparar ésta última con la reportada por Quezada Iñiguez (2008) y comprobar que se estaba trabajando con el mismo plásmido.

IV.2 Elaboración de células electrocompetentes

Se inocularon 3 ml de medio SB (Anexos) con la cepa BL21(D3), de *Escherichia coli*, misma que ya se encontraba en el laboratorio y se dejaron incubando toda la noche a 37° C a 250 rpm.

Al día siguiente se inocularon 500 ml de medio SB estéril con los 3 ml previamente cultivados y se colocaron nuevamente a 37° C a 250 rpm. La Densidad Óptica (D.O) se monitoreó cada hora hasta que llegó a 0.8. Para esto se empleó 1 ml del cultivo para cada lectura. Una vez que se alcanzó la D.O. deseada se colocaron 250 ml de los 500 ml en 5 tubos cónicos de 50 ml previamente enfriados en hielo por 15 minutos. Los 250 ml restantes se almacenaron en el cuarto frío. Los tubos se centrifugaron a 3000 g, por 15 minutos a 4° C. Al término de la centrifugación se desechó el sobrenadante y se colocaron los 250 ml restantes en los tubos. Éstos se centrifugaron de nuevo con los mismos lineamientos.

Al término de los 15 minutos se eliminó nuevamente el sobrenadante y se colocaron en los tubos 10 ml de glicerol al 10%; la pastilla se resuspendió empleando un Vortex y los tubos se llenaron a su capacidad total con el glicerol, para centrifugarlos a 3000 g por 10 minutos a 4° C. El sobrenadante se eliminó y una vez más se colocaron 10 ml de glicerol a cada tubo para resuspender las pastillas. De esta manera, lo que se tenía en los 5 tubos, se colocó por partes iguales en sólo 3 tubos. Dichos tubos se centrifugaron de nuevo a 3000 g por 10 minutos a 4° C. Los 2 tubos que ya no se emplearon, se almacenaron en hielo, para lavarlos con glicerol y poder recuperar todas las células que pudieran haber permanecido en ellos. Al término de la centrifugación se resuspendieron las pastillas y se colocó todo en un solo tubo, el cual se centrifugó una vez más con los mismos valores empleados con el resto de los tubos. Una vez concluida la

centrifugación, se retiró por última vez el sobrenadante, pero se dejó una cantidad equivalente a 500 ml en el tubo, con lo que se resuspendió la pastilla en el Vórtex. Con esto se realizaron alícuotas de 50 µl en tubos de 0.6 ml y se almacenaron a -70° C.

IV.3 Transformación

Para determinar la eficiencia de Transformación, se llevó a cabo primero una Electroporación. Se colocaron una celda de electroporación, el plásmido //7, y uno de los tubos con de la cepa BL21(D3) electrocompetente, en hielo. Cuando se hubieron derretido, se colocaron en la celda de electroporación los 50 µl de la alícuota de la cepa y 1 µl del plásmido. La celda se mantuvo en hielo por 3 minutos y al término se le dio un pulso eléctrico en el electroporador.

El contenido de la celda se recuperó con una micropipeta de 1000 µl, empleando 3 ml de medio SOC, y se colocó en un tubo cónico de 15 ml, el cual se puso en incubación a 37° C a 250 rpm por 90 minutos.

Pasada la 1 ½ h se prepararon los cultivos en 3 cajas Petri de la siguiente manera: en una caja se colocaron 99 µl de medio SOC y 1 µl de BL21(D3) con //7, previamente electroporado. Las otras dos cajas se prepararon con 90 µl de medio SOC y 10 µl de BL21(D3) y //7. Los 3 cultivos se incubaron toda la noche a 37° C.

Al día siguiente se llevó a cabo la determinación de la “Eficiencia de transformación” empleando la fórmula siguiente:

$$\text{(Número de colonias / Volumen plaqueado)} * \text{(Volumen de cultivo / 10 pg)} * (1 * 10^6 \text{ pg / 1 } \mu\text{mg})$$

Una vez obtenidos los datos de “Eficiencia de Transformación” se hizo una resiembra, tomando con un palillo 15 colonias aisladas de cualquiera de las cajas; esto se resembró en una caja nueva que había sido previamente cuadrículada y se dejó 12 horas en incubación a 37 °C y posteriormente 12 horas a temperatura ambiente. Las cajas con las que se realizó la resiembra se almacenaron a 4° C.

IV.4 Inducción de expresión de vNAR

De la caja de la resiembra de las bacterias transformadas se tomó una asada para realizar un cultivo en 5 ml de medio SOC y 5 µl de Carbenicilina, con una concentración de 100 mg/ml; esto se incubó toda la noche a 37°C a 250 rpm.

Al día siguiente se preparó un matraz con 500 ml de medio SB y 500 µl de Carbenicilina, con concentración de 100 mg/ml, al que se le agregaron los 5 ml del cultivo realizado, previamente resuspendido en el Vortex; esto se incubó a 37° C a 250 rpm, monitoreando cada hora la D.O. hasta que llegó a un valor de DO₆₀₀ de 0.6, tras lo cual se indujo el cultivo con 1 mL de IPTG 0.5 M y se incubó nuevamente a 37°C a 250 rpm por 5 horas. Se distribuyeron 250 ml del medio en 5 tubos cónicos y se centrifugaron a 4000 g por 15 minutos. Al término se descartó el sobrenadante y se colocaron los 250 ml restantes en los mismos tubos para centrifugarlos una vez más; el sobrenadante se descartó y los tubos fueron almacenados con las pastillas a -20° C, para proceder con el proceso de extracción periplásmica.

IV.5 Extracción periplásmica y purificación

Se utilizó el método del manual *The Qiaexpressionist* de Qiagen (2003).

Las pastillas, obtenidas del ensayo de inducción, se descongelaron completamente y se resuspendieron en 80 ml de una solución con Tris-HCl 300 mM, sacarosa al 20% y pH 8 que se colocaron en un vaso de precipitado en hielo al que se le agregaron 160µl de EDTA 500 mM gota a gota, para alcanzar una concentración de 1mM, a la vez que se incubaban las células en hielo durante 10 minutos con agitación suave.

Esta solución se dividió en 2 tubos cónicos de 50 ml que se centrifugaron a 8000 x g por 20 minutos a 4° C; el sobrenadante se recuperó en 2 tubos cónicos de 50 ml que se etiquetaron como “Extracto 1, BL21(D3)” y las pastillas se resuspendieron en 80 ml de Sulfato de Magnesio 5 mM, se agitaron durante 10 minutos en hielo y

se centrifugaron, en las mismas condiciones de la centrifugación anterior. Al término se eliminó el pellet y se conservó el sobrenadante, por encontrarse ahí las proteínas periplásmicas y se etiquetó como “Extracto 2, BL21(D3), Diálisis”.

Para la purificación se llevaron a cabo 3 diálisis de los 80 ml de sobrenadante, con una membrana de 2 kDa, en 4.5 l de Buffer de lisis o cargado (Anexos) durante 2 horas a temperatura ambiente las dos primeras, y durante toda la noche a 4° C la tercera, en agitación suave. Antes de llevar a cabo las diálisis se recuperó 1 ml de la muestra, con el fin de comparar la muestra antes y después de la diálisis, y se centrifugó en la microcentrífuga a 13,000 rpm por 10 minutos; posteriormente se almacenó a -20° C.

La purificación se llevó a cabo por gravedad, empleando una columna con 1 mL de resina Ni-NT. La columna se lavó primero con PBS 1X y posteriormente con Buffer o Amortiguador de lavado (anexos) y una vez que ambas soluciones habían pasado por la columna, se agregó la muestra dializada la noche anterior, se pasó por la columna 5 veces, en el cuarto frío. Cuando por quinta vez la muestra estaba por terminar de pasar por la columna, ésta se sacó del cuarto frío y la purificación se concluyó a temperatura ambiente. Se recuperó una alícuota de 500 µl para compararla posteriormente con el resto de las muestras y lo demás se almacenó en dos tubos cónicos de 50 ml. A la columna se le adicionaron 8 ml de amortiguador de lavado, que también se almacenaron en un tubo cónico de 15 ml y la proteína se eluyó 4 veces con 500 µl de amortiguador de elución (anexos).

A las eluciones obtenidas de la purificación se les retiró el imidazol, empleado en las diálisis, mediante otra purificación en la que se utilizaron columnas PD-10 desalting columns (GE Healthcare, código de producto 17-0851-01). Por ésta se pasaron, la muestra de las eluciones, 3.5 ml de PBS 1X, y 2 ml más de PBS 1X, en este orden, que se almacenaron en tubos cónicos de 15 ml; la segunda muestra, es la que contenía la proteína vNAR, ya desalinizada. De esta manera se pudo proceder con la cuantificación de la proteína.

IV.6 Identificación de la proteína expresada mediante Western Blot y Tinción de Coomassie

Se llevó a cabo una electroforesis en un gel de tricina al 14%, en el que la disposición de las muestras en los carriles fue la siguiente: 8 µl de la escalera (Novex Sharp pre-stained protein Standards (P/N 57318), (Invitrogen, número de catálogo LC5800), en el caso del Western Blot y Broad Range protein molecular markers (Promega, número de catálogo V8491) para la tinción de Coomassie), 40 µl del “Extracto 1”, 40 µl del “Extracto 2” sin diálisis, 40 µl del “Extracto 2” con diálisis, 30 µl de la muestra de amortiguador de lavado, previamente precipitada con TCA, 40 µl de cada una de las 4 eluciones obtenidas y 30 µl de lo que se recuperó después de pasar por la columna de purificación, previamente precipitado con TCA.

La precipitación con TCA, se llevó a cabo colocando 1000 µl de la muestra con 150 µl de TCA, en el caso del Amortiguador de Lavado, y 600 µl de muestra con 400 µl de Agua destilada y 150 µl de TCA, en el caso de lo recuperado de la columna de purificación. Las soluciones se dejaron en incubación a 4° C, toda la noche y posteriormente se centrifugaron a 13,000 rpm por 20 minutos a 4° C. El sobrenadante se eliminó y se agregó a los tubos 1 ml de acetona para centrifugarlos nuevamente bajo las mismas condiciones. Se descartó el sobrenadante y a los tubos se les adicionaron 30 µl de Amortiguador de Carga 2X. El resto de los tubos que no se precipitaron con TCA se prepararon con 20 µl de Amortiguador de Carga 2X y 20 µl de muestra. Las condiciones de corrida fueron 50 mA a 150 volts, por 180 minutos con un amperaje constante.

Las proteínas aisladas en el gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en una cámara de transferencia por una hora a 20 volts y 200 mA constantes. Se lavó la membrana con agua destilada y se bloqueó con leche al 5% y PBS-tween 0.05% por dos horas a temperatura ambiente en agitación. Pasadas las dos horas se agregó 15 µl del anticuerpo Anti-HA peroxidasa (Roche Molecular) diluido 1:1500 en leche al 1% y se mantuvo por dos horas. Al término se lavó la

membrana dos veces por 10 minutos y una por 5 minutos en PBS-tween 0.05%. Se prepararon 2 ml de la solución de revelado 1:1 (Pierce, número de Catálogo 32209), que permite la identificación de la peroxidasa. La membrana se colocó sobre un acetato, y sobre ésta se vertió la solución de revelado que se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto. Se colocó otro acetato por encima de la membrana que se presionó para eliminar el exceso de solución de revelado. La membrana se puso dentro de un cassette y se expuso a una película reveladora durante 10 minutos.

Para la tinción de Coomassie, se preparó un gel y se llevó a cabo la electroforesis con las mismas características y bajo las mismas condiciones que para el Western Blot, tras la cual se colocó el gel en solución de tinción y se dejó toda la noche a temperatura ambiente con agitación suave. Posteriormente se realizaron 3 lavados con solución de destinción para retirar el exceso de Azul de Coomassie del gel.

El gel se colocó en un desecador (Biorad, Modelo 583) por 2 horas a 28" Hg, con el fin de secarlo y almacenarlo.

IV.7 Cuantificación de la proteína vNAR

Se empleó el método del ácido bicinconínico (BCA), utilizando el Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce, 23235), en un rango de trabajo de 2.5 a 40 µl/ml, para lo cual se preparó una serie de estándares con una fuente de Albúmina de Suero Bovino (BSA), tomada directamente del kit. En una microplaca se colocaron 150 µl de cada estándar y 150 µl de la Solución de Trabajo, por triplicado.

De las eluciones se adicionaron 230 µl de muestra y 230 µl de Solución de trabajo, divididas en 3 pozos.

La placa se agitó por 30 segundos, se cubrió y se incubó por 2 horas a 37° C; se enfrió a temperatura ambiente y se midió la absorbancia de cada uno de los pozos en el Nanodrop, con lo cual se generó una curva estándar.

IV.8 Concentración de muestras de vNAR

Para concentrar la proteína vNAR, se emplearon los tubos concentradores Amicon Ultra (Millipore, número de catálogo UFC901008). En ellos se colocó la primera muestra que se recuperó de la columna de desalinización y se centrifugó a 4000 x g en un rotor de columpio, por 20 minutos a 15° C. Al término se colocaron en los mismo tubos los 3.5 ml de PBS 1X, obtenidos también de la columna de desalinización y se centrifugaron de nuevo, empleando los mismos parámetros. Se realizó una tercera centrifugación, en condiciones iguales, para los 2 ml de PBS 1X.

El soluto que permaneció en la unidad de filtro, y que era el que contenía la muestra de vNAR concentrada, se recuperó con una micropipeta y el volumen se almacenó en tubos de microcentrífuga a 4° C.

IV.9 Mantenimiento de células JY

Las pruebas de inmunofluorescencia se llevaron a cabo en las células JY, correspondientes a una línea de células B precursoras de la leucemia linfoblástica.

De dichas células se realizaron alícuotas de 1 ml, con una solución de suero fetal bovino (SFB) y DMSO al 5%, y se almacenaron a -70° C. Para su cultivo se mantuvieron en cajas Petri con 9 ml de medio RPMI suplementado con 10% de suero bovino, a 37° C con CO₂ al 5% más el ml de la alícuota con las células.

IV.10 Ensayo de Inmunofluorescencia

Para el ensayo final se colocaron los 10 ml de una de las cajas Petri de células JY en un tubo cónico de 15 ml que se mezcló por inversión y se centrifugó a 750 x g por 5 minutos. El sobrenadante se eliminó y se agregaron 5 ml de PBS 1X al tubo que se centrifugó de nuevo, se retiró una vez más el sobrenadante y la pastilla se resuspendió por pipeteo en 3 ml de PBS 1X. Se tomaron 95 µl de dicha muestra y se le adicionaron 5 µl de Azul de tripano, para realizar la cuantificación en la cámara de Neubauer. El resto se almacenó para su uso posterior en el ensayo.

En un tubo de microcentrífuga se colocó vNAR a una concentración de 80 µg/ml con 2 µl del anticuerpo Anti-HA-FITC; éste se incubó por 1 hora a 37° C; se realizó lo mismo pero empleando PBS 1X, sustituyendo al vNAR.

En una placa de 24 pozos se adicionaron las células JY, en una concentración de 500,000 células por pozo, empleando 3 tratamientos: sólo células JY (control), células JY con el complejo vNAR-antiHA-FITC y células JY con PBS 1X-antiHA-FITC. Todo se hizo por triplicado. La placa se puso a 37° C por 30 minutos y al término se revisaron las muestras en el microscopio invertido con fluorescencia.

V. Resultados

V.1 Secuenciación de vNAR

Debido a que se empleó una clona que había sido previamente desarrollada en el laboratorio (Quezada Iñiguez, 2008), lo primero que se realizó fue la extracción del plásmido y su secuenciación, con el fin de probar que se estaba trabajando con la misma clona.

En la figura 5 se puede observar la secuencia reportada anteriormente por Quezada Iñiguez alineada a la secuencia reportada en este trabajo. Ambas coincidieron, por lo que se determinó que el plásmido era el mismo y se podía trabajar con él.

| | | |
|-------|------|---|
| MII-7 | II-7 | M A Q R V E Q T P R M A T R E T G E S L T I N C V L V D A S |
| II-7 | | M A Q R V E Q T P R M A T R E T G E S L T I N C V L V D A S |
| MII-7 | II-7 | C G L S G T S W F R N N P G S T D W E R I T I G G R Y V E S |
| II-7 | | C G L S G T S W F R N N P G S T D W E R I T I G G R Y V E S |
| MII-7 | II-7 | V N K G A K S F S L Q I K D L T V E D S V T Y Y C K A Q T T |
| II-7 | | V N K G A K S F S L Q I K D L T V E D S V T Y Y C K A Q T T |
| MII-7 | II-7 | P D R Y P C K G - - - A A M G Y Y D G A G T V L T V N G Q |
| II-7 | | P D R Y P C K G A A M G Y Y D G A G T V L T V N G Q |
| MII-7 | II-7 | A G Q H H H H H H G A Y P Y D V P D Y A S |
| II-7 | | A G Q H H H H H H G A Y P Y D V P D Y A S |

Figura 6: Alineamiento de la secuencia de la clona II-7 reportada por Quezada Iñiguez (2008), con el nombre de MII-7, y de la secuencia reportada en el presente trabajo, nombrada sólo II-7.

V.2 Eficiencia de Transformación

Una vez que se tuvo la certeza de que se trabajaba con la misma clona, se procedió a calcular la *Eficiencia de Transformación*, con la cepa BL21(D3) de *Escherichia coli*, después de una electroporación con II-7.

Cálculo de las Unidades Formadores de Colonias (UFC) en la cepa BL21(D3) asociada a II-7

| Volumen empleado | Número de colonias | Colonias/ μg |
|--|--------------------|---|
| 1 μl BL21(D3)-II7/ 99 μl SOC | 4 | $1.2 \cdot 10^9$ colonias/ μg |
| 10 μl BL21(D3)-II7/90 μl SOC | 75 | $2.25 \cdot 10^9$ colonias/ μg |

V.3 Western Blot y Tinción de Coomassie

A partir de la elaboración de 2 pruebas de Western Blot (figuras 7 y 8) y 2 de Tinción de Coomassie (figuras 9 y 10), se comprobó la existencia de la proteína vNAR en la muestra, con la presencia de las bandas de alrededor de 17 kDa.

Las eluciones, obtenidas de la purificación de la muestra, que presentaron las bandas más notorias en todas las pruebas, fueron la Elución 2 (E2) y la Elución 3 (E3), por lo cual fueron las dos eluciones con las que se trabajó posteriormente.

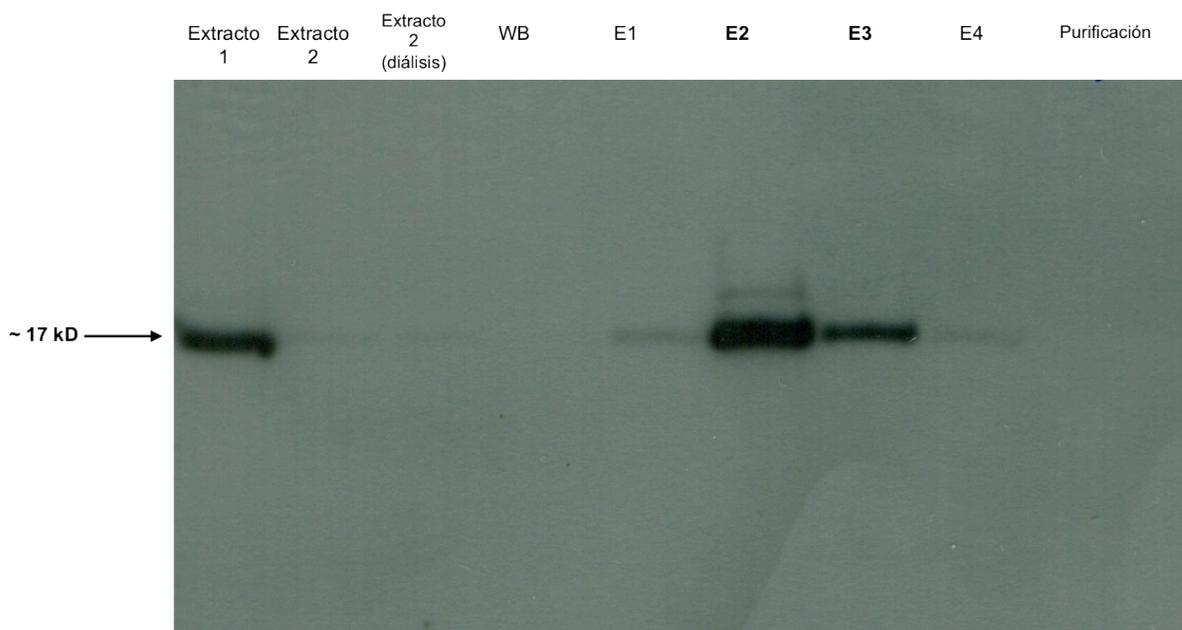


Figura 6: Western Blot de las muestras obtenidas a partir de la Extracción (Extracto 1 y Extracto 2 y Extracto 2 con Diálisis) y la Purificación (Buffer de Lavado (WB), Elución 1, 2, 3 y 4 respectivamente (E1, E2, E3, E4) y lo pasado por la columna de purificación

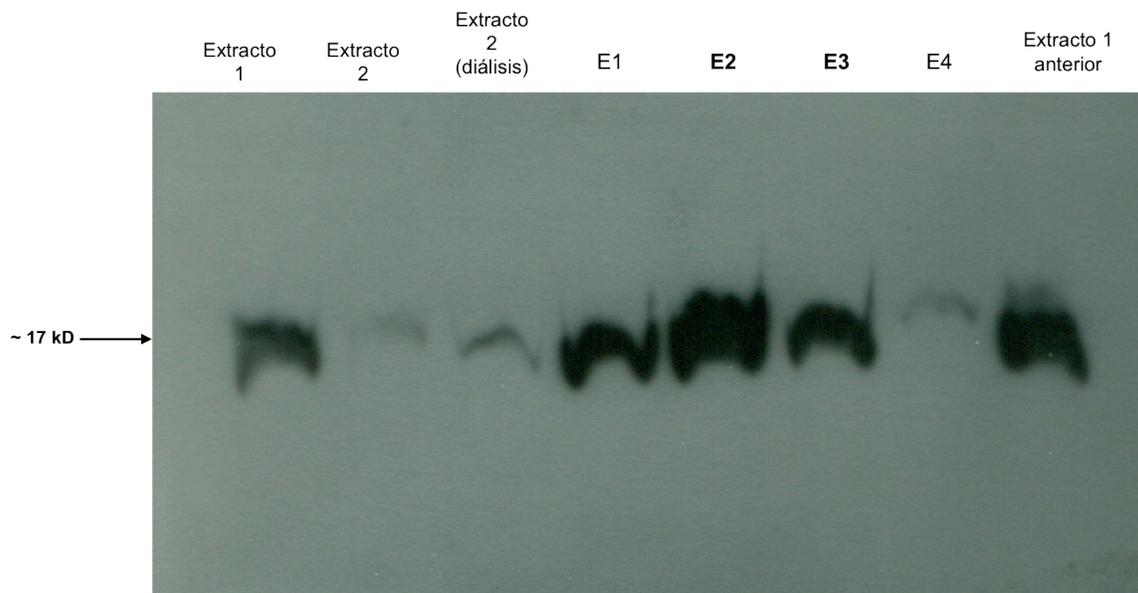


Figura 7: Western Blot, de las muestras obtenidas durante la segunda extracción que se llevó a cabo (Extracto 1, 2 y Extracto 2 con diálisis) y su respectiva Purificación (Eluciones 1, 2, 3 y 4 (E1, E2, E3, E4). Se agregó además el Extracto 1 de la extracción anterior, para comprobar que la banda apareciera al mismo nivel.



Figura 8: Tinción de Coomassie de las muestras obtenidas a partir de la Extracción (Extracto 1 y Extracto 2 y Extracto 2 con Diálisis) y la Purificación (Buffer de Lavado (WB), Elución 1, 2, 3 y 4 respectivamente (E1, E2, E3, E4) y lo pasado por la columna de purificación

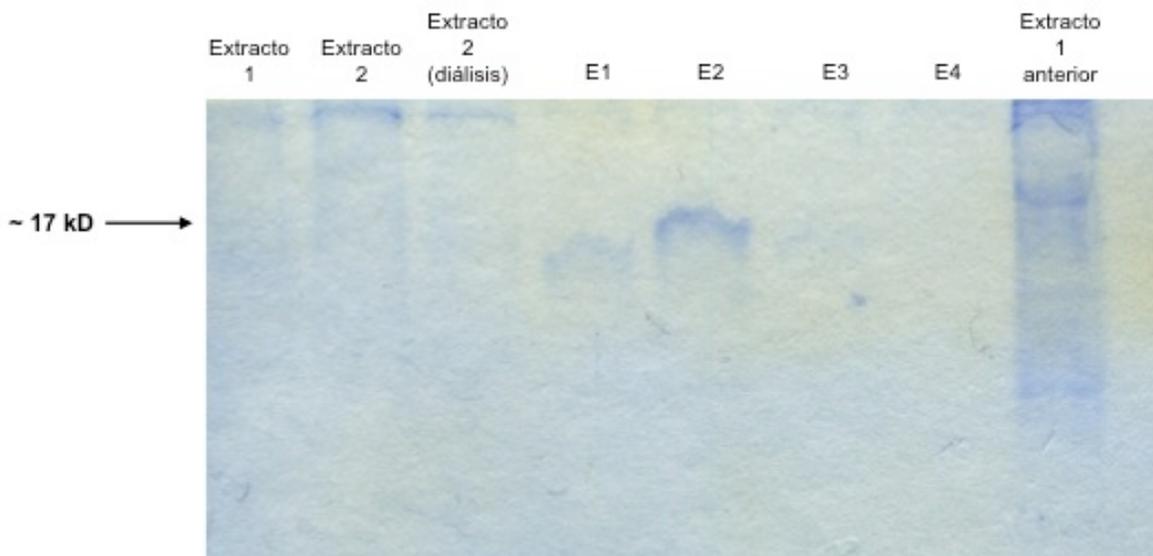


Figura 9: Tinción de Coomassie de las muestras obtenidas durante la segunda extracción que se llevó a cabo (Extracto 1, 2 y Extracto 2 con diálisis) y su respectiva Purificación (Eluciones 1, 2, 3 y 4 (E1, E2, E3, E4). Se agregó además el Extracto 1 de la extracción anterior, para comprobar que la banda apareciera al mismo nivel.

V.4 Cuantificación de la proteína vNAR

Como se puede observar en la figura 11, la cuantificación de proteínas corroboró que la concentración de vNAR era baja en la elución 2 y 3, principalmente en la E3, que tuvo un valor de absorbancia de 0.003, midiéndolo en el Nanodrop con una longitud de onda de 562 nm. La E2, por otro lado, tuvo una absorbancia de 0.0143.

A partir de la ecuación de “y” del gráfico, se despejó “x” para calcular la concentración para ambas eluciones.

Para la E3, la concentración fue tan baja, que el valor fue negativo, razón por la cual no fue incluida en la gráfica. En el caso de E2, el valor de concentración de la muestra fue de 15.17 $\mu\text{g/ml}$, y dado que se tenían 3 ml de muestra, se tenía una cantidad final de 45.53 μg de proteína purificada.

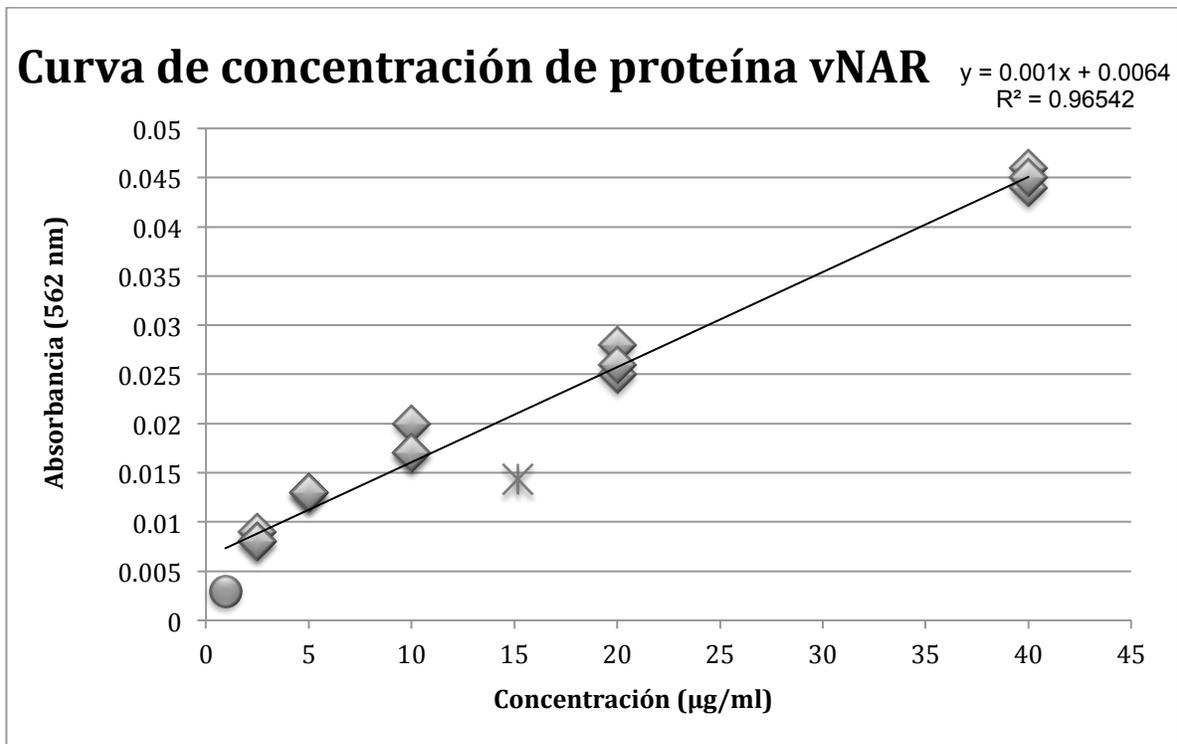


Figura 10: Curva estándar para determinación de la concentración de la proteína vNAR en E2, representada por el asterisco y E3, que corresponde al círculo.

V.5 Concentración de vNAR

Al haber concentrado las muestras se llevó a cabo una nueva cuantificación de vNAR, para la cual se desarrolló una nueva curva con las concentraciones estándares (figura 12).

E2 tuvo un valor de absorbancia de .087 al ser cuantificado en el Nanodrop a 562 nm. Se despejó una vez más el valor de "x" de la ecuación del gráfico y se obtuvo un valor de concentración de 83.11 µg/ml, teniendo un total de 500 µl de muestra. Con esta muestra fue con la que se llevaron a cabo los ensayos de Inmunofluorescencia.

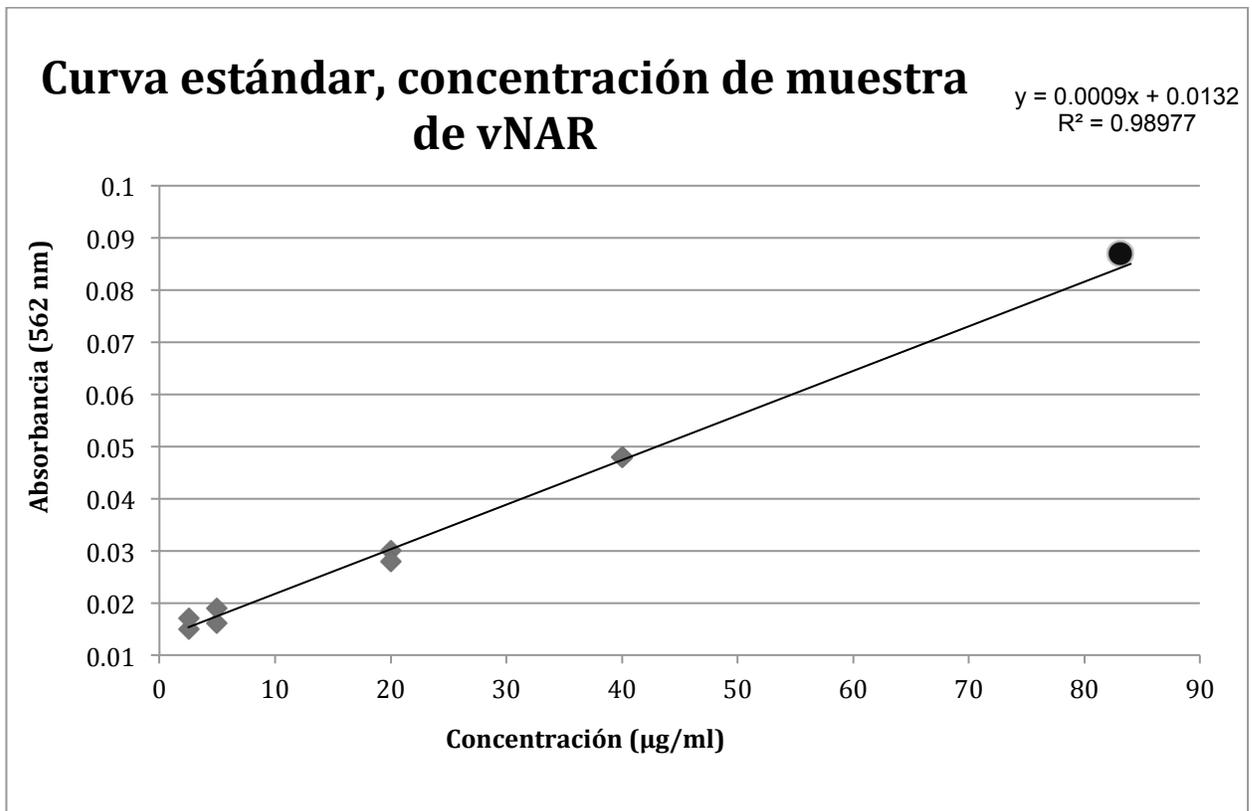
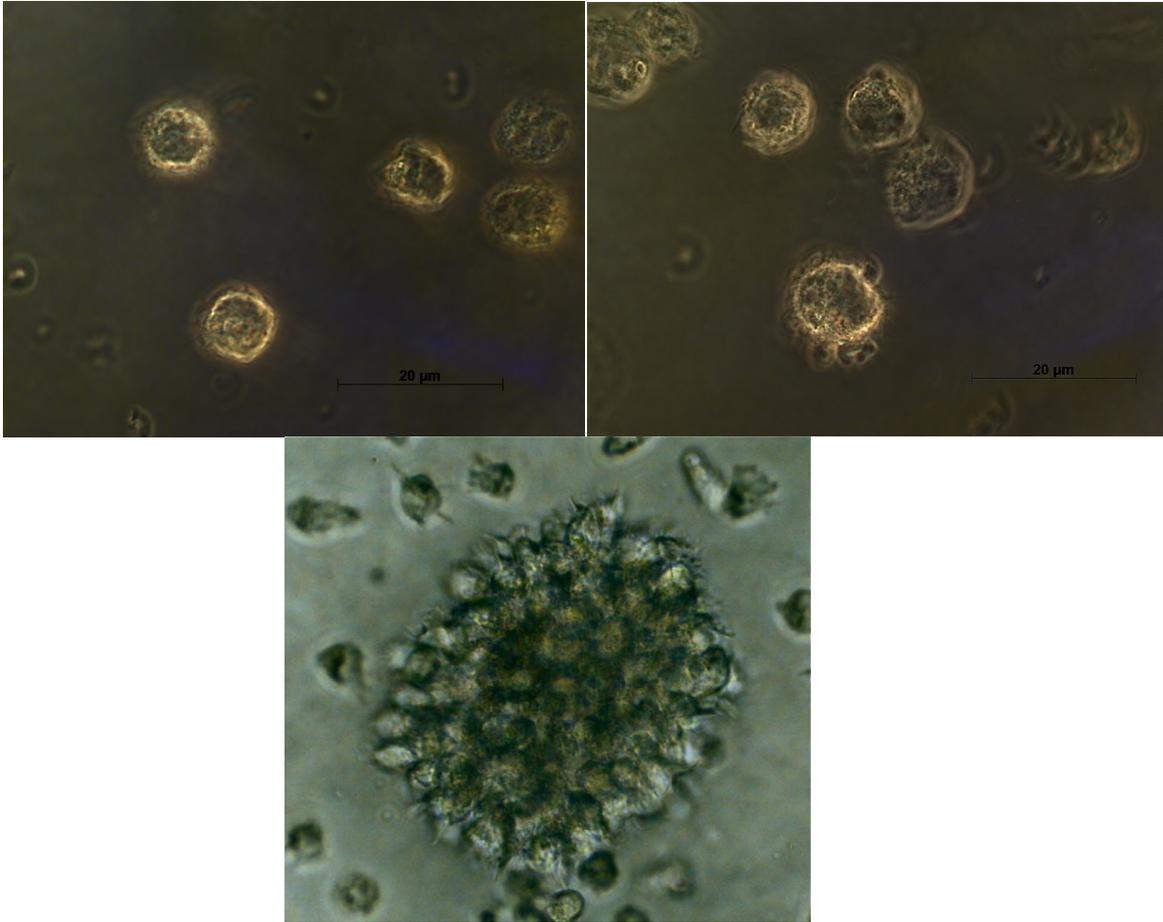


Figura 11: Curva estándar para la cuantificación de vNAR, después de haber concentrado la muestra. El punto negro corresponde al valor de concentración de la muestra E2. La línea de tendencia se extrapola hasta el valor de E2.

V.6 Mantenimiento de Células JY

A partir del cultivo inicial de células JY se realizó una serie de resiembras con el fin de obtener varias alícuotas para almacenarlas para su uso posterior.

Las alícuotas constantemente se reactivaban y observaban al microscopio (figuras 13, 14 y 15), con el fin de comprobar que las células se mantuvieran en buen estado para el ensayo de inmunofluorescencia.



Figuras 12,13 y 14: Fotografías en Microscopio óptico a 40X de las células JY, en el caso de las figuras 13 y 14. La 15 fue tomada a 10X.

V.7 Ensayo de Inmunofluorescencia

Al analizar mediante microscopía de fluorescencia, las muestras de los complejos vNAR-antiHA-FITC, PBS1X-antiHA-FITC y el control se esperaba que sólo el primer tratamiento presentara fluorescencia, por efecto del anticuerpo.

Sin embargo, ninguno de los tres tratamientos lo hizo.

VI. Discusión de resultados

Debido a que en el presente trabajo se empleó una clona de vNAR que había sido desarrollada con anterioridad por Quezada Iñiguez (2008), la secuenciación de la misma era importante para poder comprobar que éstas coincidían, y poder suponer que el experimento sería exitoso. Al calcular la eficiencia de transformación, se observó que ésta era de $1.2 \cdot 10^9$ colonias/ μg , en el caso de la caja con 1 μl de la cepa BL21(D3) con la clona de vNAR que se trabajaba, llamada II-7; por otro lado, en la caja con 10 μl de BL21(D3)-II7 se obtuvo una eficiencia de transformación de $2.25 \cdot 10^9$ colonias/ μg . Barbas *et al.* (2001), indican que la eficiencia debe encontrarse sobre $1 \cdot 10^9$ colonias/ μg de plásmido.

Para comprobar la existencia de la proteína vNAR se llevaron a cabo dos ensayos de Western blot, en los que se pudo apreciar que aparecía una banda en el rango aproximado de 17 kDa; a estos fragmentos de IgNAR se les ha atribuido un tamaño entre 12 y 15 kDa (Dooley *et al.*, 2003, Nuttall *et al.*, 2004), y en el caso de Quezada Iñiguez (2008), el tamaño esperado se localizaba entre los 15 y 20 kDa, razón por la cual las bandas obtenidas se atribuyeron a la presencia de la proteína. Las tinciones de Coomassie se elaboraron para reforzar lo que se había obtenido en el Western Blot exclusivamente.

A pesar de que las bandas observadas en los geles parecían demostrar que se tenía altamente concentrada la proteína, al momento de llevar a cabo la cuantificación de la misma se observó que ésta era de sólo 15.17 $\mu\text{g}/\text{ml}$, valor sumamente bajo si se compara con el trabajo en el que se elaboró la clona, en el que la concentración de proteína calculada fue de 520 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Por tal razón la proteína se concentró, para hacer los ensayos de inmunofluorescencia. Los ensayos se llevaron a cabo en la línea celular JY, correspondiente a una línea celular B-VEB linfoblastoide, que crece en grupos (Szöllosi *et al.*, 1996, Altomonte *et al.*, 1993).

Al llevar a cabo los ensayos de inmunofluorescencia, se esperaba que los tratamientos a los que se les agregaría a las células JY, el complejo de vNAR,

acoplado al antiHA con el fluoróforo FITC, se esperaba que hubiera fluorescencia en las células por efecto del anticuerpo y que esta fluorescencia fuera perceptible al microscopio de fluorescencia. Sin embargo, esto no ocurrió, y ninguna de las tres repeticiones que se realizaron fueron positivas.

Lo anterior se puede atribuir a omisiones metodológicas relacionadas con la técnica para detección de inmunofluorescencia empleada, dentro de las cuales se podría mencionar el hecho de no haber trabajado a temperaturas de alrededor de los 4° C, ya que en la bibliografía se llega a mencionar que llevar a cabo los ensayos en frío puede otorgarle más posibilidades de ser exitoso, o bien con las concentraciones de anticuerpos que se utilizaron, es decir, que las condiciones de inmunofluorescencia debieron haber sido diferentes. Petty (2007), indica que una de las ventajas de las herramientas de fluorescencia es la alta sensibilidad que presentan, refiriéndose a la microscopía de fluorescencia y la citometría de flujo (FACS, por separador celular con activación de fluoresceína, en inglés), por lo que no se puede decir que los ensayos fueron negativos debido a la poca sensibilidad de la técnica empleada.

Godfrey *et al.* (2005), por otro lado, indica que a pesar de que la citometría de flujo y la microscopía de fluorescencia proporcionan diferentes datos relacionados a poblaciones celulares, estos datos suelen ser complementarios. En base a esto, habría sido relevante llevar a cabo un ensayo de FACS, para poder comparar lo obtenido en microscopio, ya que la microscopía de fluorescencia puede presentar subestimaciones y sobrestimaciones respecto a FACS, y al tener resultados de ambas técnicas habría existido un mejor rango de comparación y análisis de los datos (Picchio *et al.*, 1995).

Se considera que una de las causas que llevaron a que el experimento no resultara como se esperaba es el anticuerpo comercial que se empleó, el antiHA-FITC. Para su uso óptimo y continuo, lo recomendado es almacenarlo entre 2 y 8° C por no más de un mes, mientras que si no se emplea periódicamente lo ideal es mantenerlo a -20° C por no más de un año. Alguna falla en su almacenamiento,

pudo haber tenido como consecuencia la degradación del fluoróforo. Sería importante por consiguiente, desarrollar una nueva metodología, en la que se incluya el empleo de las técnicas de microscopía de fluorescencia y de otra técnica que pudiera ser complementaria, como FACS, y el empleo de un anticuerpo antiHA-FITC de reciente adquisición, para de esta manera poder descartar esos puntos.

VII. Conclusiones

- Se comprobó que la clona de vNAR con la que se trabajó era la adecuada para los ensayos que se llevaron a cabo.
- Se obtuvieron resultados modestos al llevar a cabo los ensayos de inmunofluorescencia.
- Los resultados modestos se atribuyen a omisiones en la metodología, la degradación del fluoróforo empleado o la falta de una técnica complementaria a la microscopía de fluorescencia.

VIII. Perspectivas

- Se propone el empleo del anticuerpo comercial asociado al fluoróforo (antiHA-FITC) de reciente adquisición, y se considera de relevancia el elaborar una metodología nueva, con el fin de poder comparar la técnica de microscopía de fluorescencia con alguna otra técnica que funcione como complemento, tal como la citometría de flujo (FACS).
- Se sugiere el utilizar, además de bacterias, algún otro sistema de expresión de proteínas como células de insectos, levaduras, como *Pichia pastoris*, e inclusive hongos filamentosos, ya que estos organismos han demostrado ser buenos métodos de obtención de altas concentraciones de proteínas recombinantes.

IX. Referencias

Abbas, A., Lichtman, A. y Pober, J. (2002). Inmunología celular y molecular. 4^o edición. McGraw Hill-Interamericana. España. 577 pp.

Adelman, M., Schluter, S. y Marchalonis, J. (2004). The natural antibody repertoire of sharks and humans recognizes the potential universe of antigens. *The protein journal*. 23(2): 103-118.

Altomonte, M., Pucillo, C., Damante, G. y Maio, M. (1993). Cross-linking of HLA class II antigens modulates the release of tumor necrosis factor- α by the EBV-B Lymphoblastoid cell line JY. *The Journal of Immunology*. 151(10):5115-5122.

Barbas, C., Burton, D., Scott, J. y Silverman, G. (2001). Phage display, a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press. EUA. 736 pp.

Buchmann, I., Reinhardt, M., Elsner, K., Bunjes, D., Althoefer, C., Finke, J., Moser, E., Glatting, G., Kotzerke, J., Guhlmann, C., Schirrmeister, H. y Reske, S. (2001). 2-(Fluorine-18)Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose Positron Emission Tomography in the Detection and Staging of Malignant Lymphoma. *Cancer*. 91(5): 889-899.

Cai, Q., Guo, Y., Xiao, B., Banerjee, S., Saha, A., Lu, J., Glisovic, T. y Robertson, E. (2011). Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3C Stabilizes Gemin3 to Block p53-mediated Apoptosis. *PLoS Pathog* 7(12):1-12.

Clarke, C., Undurraga, D., Harasty, P., Glaser, S., Morton, L. y Holly, E. (2006). Changes in Cancer registry coding for Lymphoma subtypes: reliability over time and relevance for surveillance and study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 15(4): 630-638.

Cuesta, A., Sainz-Pastor, N., Bonet, J., Oliva, B. y Álvarez-Vallina, L. (2010). Multivalent antibodies: when design surpasses evolution. *Trends in Biotechnology* 28(7):355-362

Dooley, H., Flajnik, M. y Porter, A. (2003). Selection and characterization of naturally occurring single-domain (IgNAR) antibody fragments from immunized sharks by phage display. *Molecular Immunology*. 40: 25-33

Dooley, H. y Flajnik, M.F. (2006). Antibody repertoire development in cartilaginous fish. *Developmental and Comparative Immunology*. 30:43–56.

Ekström-Smedby, K., Baecklund, E. y Askling, J. (2006). Malignant Lymphomas in autoimmunity and inflammation: reviews of risks, risk factors and lymphoma characteristics. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 15(11):2069-2077.

Flajnik, M. (2002). Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents. *Nature Reviews Immunology*. 2:688-698.

García Vidrios, V. (2002). Actualidades en linfomas y mielomas, Introducción. En: Actualidades en linfomas y mielomas. *Gac Méd Méx*. 138(1):106-107.

Godfrey, W., Hill, D., Kilgore, J., Buller, G., Bradford, J., Gray, D., Clements, I., Oakleaf, K., Salisbury, J., Ignatius, M. y Janes, M. (2005). Complementarity of Flow Cytometry and Fluorescence Microscopy. *Microsc Microanal*. 1(2):246-247

Gutiérrez Romero, M. (2002). Enfermedad de Hodgkin. En: Actualidades en linfomas y mielomas. *Gac Méd Méx*. 138(1):107-109.

Instituto Mexicano del Seguro Social. (2010). Detección oportuna y diagnóstico del linfoma no Hodgkin en edad pediátrica. México. 68 pp.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2011). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer, datos nacionales. México. 7 pp. En: http://www.ceprec.org/INEGI_2011.pdf

Lazcano Ponce, E., Hernández Ávila, M. (1997). Cáncer: frecuencia, factores de riesgo y medidas de prevención. *Salud pública Méx*. 39(4):251-252.

Nuttall, S., Humberstone, K., Krishnan, U., Carmichael, J., Doughty, L., Hattarki, M., Coley, A., Casey, J., Anders, R. y Foley, M. (2004). Selection and affinity maturation of IgNAR Variable domains targeting *Plasmodium falciparum* AMA. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 55:187-197

Parslow, T., Stites, D., Terr, A. y Imboden, J. (2001). *Inmunología básica y clínica*. 10° edición. Manual Moderno. México. 917 pp.

Petty, H. (2007). Fluorescence microscopy: established and emerging methods, experimental strategies, and applications in immunology. *Microscopy Research And Technique*. 70:687-709

Picchio, G., Pardo, L., Boggiano, C., Felippo, M. y de Elizalde-de Bracco, M. (1995). Discordancia entre los valores de CD4 obtenidos por citometría de flujo o por microscopía en pacientes hemofílicos infectados con HIV. *Medicina*. 55(1):90-91

Quezada Iñiguez, R.M. (2008). Obtención de anticuerpos de dominio sencillo tipo vNAR del tiburón *Heterodontus francisci* con capacidad de unión al complejo HLA-B7/péptidos de la telomerasa. Tesis de maestría. CICESE. 93 pp.

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

Sánchez Guerrero, J. A. (1998). Linfoma No-Hogdtkin en cabeza y cuello, estudio clínico patológico en el Hospital de Especialidades C.M.N. M.A.C. Puebla, Pue. Tesis de Postgrado. UNAM. 22 pp.

Santos, E. Y Rodríguez Villanueva, J. (1986). *El Cáncer*. Prensa Científica. España. 190 pp.

Sobrevilla Calvo, P. (2002). Estado actual del tratamiento del linfoma maligno. En: Actualidades en linfomas y mielomas. Gac Méd Méx. 138(1):112-113-

Ståhlberg, A., Zoric, N., Åman, P. y Kubista, M. (2005). Quantitative real-time PCR for cancer detection: the lymphoma case. Expert Rev. Mol. Diagn. 5(2): 1-10.

Stanfield, R., Dooley, H., Flajnik, M. y Wilson, I. (2004). Crystal Structure of a Shark Single-Domain Antibody V Region in Complex with Lysozyme. Science. 305:1770-1773.

Stanfield, R., Dooley, H., Verdino, P., Flajnik, M. y Wilson, I. (2007). Maturation of Shark Single-domain (IgNAR) Antibodies: evidence for Induced-fit Binding. J. Mol. Biol. 367:358–372

Stefanek, M., Andrykowski, M., Lerman, C., Manne, S. y Glanz, K. (2009). Behavioral Oncology and the war on Cancer: partnering with Biomedicine. Cancer Res. 69(18):7151-7156.

Szöllosi, J., Hoiep, V., Bene, L., Angelisová, P. y Damjanovich, S. (1996). Supramolecular Complexes of MHC Class I, MHC Class II, CD20, and Tetraspan Molecules (CD53, CD81, and CD82) at the Surface of a B Cell line JY. The Journal of Immunology. 157:2939-2946.

Tojo Catro, M. (2009). Valor de la técnica FISH para la detección de translocaciones en Linfomas No Hodgkin, linfoma folicular, linfoma de células del manto y infoma B de células grandes. Tesis de Doctorado . Universidad de Santiago de Compostela. 167 pp.

Weisser, N. y Hall, C. (2009). Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. Biotechnology Advances 27: 502–520.

Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juárez, K., Urrutia, M., Cauerh, A., Danquah, W., Rissiek, B., Scheuplein, F., Schwarz, N., Adriouch S., Boyer, O., Seman, M., Licea, A., Serreze, D., Goldbaum, F., Haag, F. y Koch-

Nolte, F. (2009). Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol.* 198:157–174.

X. Anexos

X.1 Buffer de Lisis (1 L)

- 50 mM NaH₂PO₄ : 6.90 g
- 300 mM NaCl : 17.54 g
- 10 mM imidazole: 0.68 g

Ajustar pH a 8 con NaOH.

X.2 Buffer de lavado (1 L)

- 50 mM NaH₂PO₄: 6.90 g
- 300 mM NaCl: 17.54 g
- 20 mM imidazole: 1.36 g

Ajustar pH a 8 con NaOH.

X.3 Buffer de elución (1 L)

- 50 mM NaH₂PO₄: 6.90 g
- 300 mM NaCl: 17.54 g
- 250 mM imidazole: 17 g

Ajustar pH a 8 con NaOH.

X.4 Medio SB (1 L)

- Triptona: 32 g
- Extracto de levadura: 20 g
- NaCl: 5 g

Ajustar pH a 7 con NaOH 1N; aforar a 1 L.