



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO scFv 6009F
EN Pichia pastoris X-33 UTILIZANDO LOS PLÁSMIDOS pPICZA α Y
pPICZA**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

BIOL. NALLELI GARCIA BELAUZARAN

DIRECTOR

DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL



CUERNAVACA, MORELOS

Diciembre, 2018

Agradecimientos:

A la Doctora **Elba Cristina Villegas Villarreal** por haberme permitido estar en su grupo y darme la confianza para desarrollar este proyecto, y además por su tiempo para la revisión de este trabajo

¡¡¡¡¡Muchas gracias!!!!

A mis sinodales:

Irene Perea Arango

Alexis Joavany Rodriguez Solis

Anabel Ortiz Caltempa

Gerardo Diaz Godinez

Nuevamente a mi tutora la Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal, por sus enseñanzas que influyeron en mi formación profesional.

A la Dra Hilda Vazquez Lopez por su apoyo y enseñanzas.

A mis compañeros de laboratorio Monica, Fernando, Daniela, Johana y Jose por su grato compañerismo y amistad.

CONTENIDO

1.- Introducción.....	A
1.1.- Alacranismo	B
1.2.- Alacranes.....	C
1.3.- Composición y mecanismo de acción del veneno.	D
1.4.- Toxinas del veneno de alacrán.....	E
1.5.- Toxina Cn2.....	E
1.6.-Antivenenos	F
1.7.-Sueroterapia y Anticuerpos.	F
1.8.- Fragmento scFv 6009 F.	J
1.9.- Sistemas de expresión para proteínas recombinantes.	L
1.10.- <i>Pichia pastoris</i>	M
1.11.- Clasificación de <i>Pichia pastoris</i>	N
1.12.-Vectores de expresión empleados en <i>P. pastoris</i>	P
2.- Justificación.....	S
3.- Hipótesis.	S
4.- Objetivo general.....	T
4.1.- Objetivos particulares.....	T
5.- Metodología.	U
5.1.-Plásmidos	U
5.2.- Organismos.....	W
5.2.1.- Cepa de <i>Escherichia. coli</i> Top 10.....	W
5.2.2.-Cepa de levadura <i>Pichia pastoris</i> X-33.	W
Esta cepa tiene genotipo de tipo silvestre y es compatible con vectores que tienen resistencia a zeocina como los plásmidos <i>pPICZ A</i> y <i>pPICZAα</i>	W
5.2.3.- Medios de cultivo.....	W
5.2.4.-KITS.....	X
5.3.- Mantenimiento y propagación del plásmido <i>pSyn1</i>, <i>pPICZA</i> y <i>pPICZAα</i> en la cepa bacteriana <i>top10F</i>.....	X
5.4.- Amplificación del fragmento 6009F.	Y
5.5.- Doble digestión de los plásmidos <i>pPICZA</i> y <i>pPICZA α</i> y del gen <i>scFv 6009F</i>	Z
Una vez obtenida la purificación de los plásmidos <i>pPICZA</i> y <i>pPICZAα</i> se realizara a cada uno, una doble digestión, así como a las amplificaciones del fragmento <i>scFv 6009F</i> , para lo cual todas las muestras serán puestas en tratamiento de doble digestión por separado	

cada una de 20µl de volumen final. Para estas reacciones se utilizaron las enzimas EcoRI y NotI como se observa en la Tabla 12.	Z
5.6.- Ligación del gen scFv 6009F con los plásmidos pPICZA y pPICZA α	AA
5.7.- PCR de colonia de las transformantes	AA
5.9.- Crecimiento de la cepa <i>Pichia pastoris</i> X-33.	BB
5.10.- Transformación por electroporación de <i>P. pastoris</i> X-33.	CC
5.11.- Expresión del fragmento 6009F en la cepa de <i>P. pastoris</i>	CC
5.12.-Purificación del anticuerpo scFv 6009F.....	DD
5.13.- Verificación del reconocimiento de la toxina Cn2 frente al scFv6009F.	DD
6.-Resultados	EE
.....	EE
6.2.- Purificación de los plásmidos pSyn1, pPICZA y pPICZAα.....	EE
6.3.- Amplificación del fragmento scFv 6009F con oligos para inserción en pPICZA para <i>P. pastoris</i> X-33.....	FF
6.4.- Amplificación del fragmento scFv 6009F para inserción en el plásmido pPICZAα para <i>P. pastoris</i> X33.....	GG
6.5.- Ligación del plásmido pPICZA+ inserto 6009F y pPICZA α + 6009F.....	HH
6.7.- PCR de colonia de las transformantes	HH
6.8.- Purificación de plásmido con las construcciones pPICZA y pPICZA α	JJ
6.9.- Doble digestión de las clonas con la construcción pPICZA/scFv 6009F y pPICZA α 7scFv 6009F.	JJ
6.10.- Alineamiento de secuencias con la construcción pPICZA+6009F.	LL
8.-Conclusiones	VV
9.- Anexos	WW
9.1.-Secuencia del fragmento 6009F.....	WW
9.2.- Preparación de células quimiocompetentes.	XX
8.-Bibliografía.....	YY
Cronograma de actividades	¡Error! Marcador no definido.

Índice de tablas.

Tabla 1.- Ejemplos de scFv con función de antiveneno.	J
Tabla 2.- Clasificación de las cepas de <i>P. pastoris</i> con respecto a su fenotipo.	O
Tabla 3.- Proteínas heterologas expresadas en cepas de <i>P. pastoris</i> y sus rendimientos.	O
Tabla 4.- Plásmidos que expresan proteínas de manera intracelular o extracelular en <i>P. pastoris</i>	Q
Tabla 5.- Combinaciones entre cepas de <i>P. pastoris</i> con los plásmidos compatibles para la expresión intracelular o extracelular que se trabajan en nuestro grupo de investigación.	R
Tabla 6.- Características del plásmido pSyn1	U
Tabla 7.- Características del plásmido pPICZA y pPICZA α	V
Tabla 8.- Secuencia de los oligos 1 y 2 utilizados para amplificación scFv 6009F.	Y
Tabla 9.- Condiciones de PCR.....	Y
Tabla 10.- Secuencia de los oligos 3 y 4 utilizados para amplificación scFv 6009F.	Z
Tabla 11.-Condiciones de PCR.....	Z
Tabla 12.- Condiciones para doble digestión	Z
Tabla 13.- Oligos utilizados para PCR de colonia.	AA
Tabla 14.- Condiciones para PCR de colonia.....	BB
Tabla 15.- Condiciones de doble digestión para construcción.....	BB
Tabla 16.- concentraciones de las construcciones de los plásmidos pPICZA y pPICZA α	KK

Índice de Figuras.

Figura 1.- Esquema de un Inmunoglobulina IgG (Lujan <i>et al.</i> , 2014).....	G
Figura 2.- Diferentes fragmentos obtenidos de una inmunoglobulina (Laustsen <i>et al.</i> , 2018)....	I
Figura 3.- Esquema del plásmido pSyn1.....	U
Figura 4.- Esquema del plásmido pPICZ.....	V
Figura 95.- Purificación del plásmido pPICZA.....	FF
Figura 106- Purificación del plásmido pPICZA α	FF
Figura 7.- Colonias obtenidas a diferentes proporciones de inserto:vector en la ligación: a) 5:1, b) 7:1 y c) el control	HH
Figura 8 .- PCR de colonia de las colonias con la construcción pPICZA+6009F.....	II
Figura 9.- PCR de colonia de las colonias con la construcción pPICZA α +6009F.....	II
Figura 10.- Purificación de plásmido con la construcción pPICZA+6009F.....	JJ
Figura 11.-Doble digestión de pPICZA+6009F.....	KK
Figura 12.- Doble digestión de pPICZA α +6009F.....	KK
Figura 13.- Resultado del Blast para la secuencia de la clona 1	LL
Figura 14.- Resultado del Blast para la secuencia de la clona 2	¡Error! Marcador no definido.

RESUMEN

El desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas ha incrementado a lo largo de los últimos años, tal es el caso de la generación de anticuerpos más eficaces gracias a las nuevas tecnologías. Existen diversos formatos de anticuerpos, tal es el caso de los fragmentos de cadena sencilla, que gracias a su tamaño pequeño presenta ventajas importantes tales como: una mejor distribución, menor inmunogenicidad y facilidad de eliminación. En 2005 a partir de una librería de fagos surge una variante de fragmento de cadena sencilla scFv llamada 6009F, proveniente de sangre periférica humana, este anticuerpo es capaz de reconocer el veneno de *Centruroides noxius* y la toxina Cn2; por lo que es de gran importancia su producción, por lo que en este trabajo se ha empleado la utilización de un sistema de expresión de proteínas heterólogas como es la levadura de *Pichia pastoris*, ya que este modelo de expresión proporciona ciertas ventajas en comparación con otros sistemas tales como la capacidad de ser inducida por metanol y de esta forma favorecer a la generación de proteínas heterólogas, fácil mantenimiento, al ser un organismo eucarionte tiene la maquinaria celular para realizar modificaciones postraduccionales tales como la glicosilación.

En este trabajo se utilizó la cepa de *P. pastoris* X-33 inducible por metanol la cual se transformó con los plásmidos pPICZA (expresión intracelular) y PICZA α (expresión extracelular); la expresión se llevó a cabo en reactor de 1L y en matraces de 500mL. Los resultados arrojaron que utilizando el plásmido PICZA α no fue posible purificar la proteína scFv6009F mediante una columna de afinidad a níquel, ya que en los geles SDS-PAGE no se observó su presencia en ninguna de las concentraciones de imidazol utilizadas para su elución durante su purificación en columnas de Níquel, ni tampoco se pudo identificar en Western Blot utilizando el anticuerpo anti-His.

Mientras que los experimentos con el plásmido pPicZA de expresión intracelular están en proceso

1.- Introducción

1.1.- Alacranismo

La picadura de “Alacrán” del árabe al'aqráb o “Escorpión” del latín scorpio, -ōnis, (Alacrán y escorpión son dos formas de llamar al mismo animal), es muy dolorosa. Al contacto accidental entre un alacrán (picadura) y una persona se le llama “Alacranismo”, convirtiéndose en una rama de salud pública mundial (Celis *et al.*, 2007, Possani, 2005).

Los síntomas de picadura de alacrán resultan diferentes en cada persona y varía dependiendo de la cantidad de veneno que inyecte, además es difícil saber cuánto veneno inyecta al paciente ya que ésta en función de, sí, la glándula venenosa, ésta llena o vacía dependiendo de sus hábitos de alimentación (Possani, 2005). El envenenamiento por mordedura de alacrán se considera una enfermedad de salud a nivel mundial y que afecta a más de 1.2 millones de personas al año, lo que provoca más de 3250 muertes, sobre todo en los países tropicales y subtropicales donde las picaduras por alacrán afectan a grandes núcleos de la población, tanto en el medio rural y urbano (Chippaux *et al.*, 2008).

México es uno de los países con mayor número de personas intoxicadas por alacranes a escala mundial, la Secretaría de Salud del gobierno federal informó que la intoxicación por picadura de alacrán ocupó el lugar No. 15 entre los padecimientos. La picadura de alacrán es considerada una urgencia médica debido al efecto dañino que representa en la víctima por lo que se clasifica en México como efectos tóxicos por sustancias producidas por la ponzoña de acuerdo al código internacional de enfermedades se conoce como “10ª Rev (CIE-10ª Rev)”. Y se subclasifica como intoxicación por veneno de escorpión T63.2 X22 (Palomera *et al.*, 2016). Por regla general, cuanto más grandes son las tenazas del alacrán, más débil es su veneno. En los casos más graves el veneno es más tóxico por su contenido de neurotoxinas en *C. noxius* es la toxina Cn2, que pueden causar un disparo excesivo de axones neuronales y células excitables, reflejándose diversos síntomas que se clasifican según su gravedad en 4 grados (Palomera *et al.*, 2016).

Grado 1. Corresponde a dolores locales intensos en el sitio de la picadura y edemas locales, sensación de pelos en la garganta, intolerancia a la luz, comezón en la faringe y nariz, generalmente, no se necesita tratamiento médico. Sin embargo, si los síntomas se intensifican se necesitaría recibir tratamiento en un hospital por vía intravenosa como analgésicos, sedantes e hidratación

Grado 2. Participación sistémica de tipo autonómico y neuromuscular causado por la producción excesiva de acetilcolina, dificultad para caminar, visión borrosa, fatiga, inflamación, adormecimiento en el sitio de la picadura.

Grado 3. Extremidades frías, taquicardia, hipotensión o hipertensión con edema pulmonar.

Grado 4. Taquicardia, hipotensión, extremidades calientes, colapso cardiovascular, falla respiratoria, cianosis, disnea y muerte (Bawaskar y Bawaskar, 2012).

El costo para el tratamiento de la picadura varía, ya que no siempre se recurre a un tratamiento médico con antiveneno. En algunas poblaciones sobre todo en zonas rurales los tratamientos son de dudosa efectividad no sustentadas en la fisiopatología, y de esta manera en muchas ocasiones es la razón por la cual el costo se agudiza y pone en peligro la vida del paciente, esto sucede debido primeramente a la poca disponibilidad del antiveneno y su costo elevado; en México el antiveneno “Alacramyn” tiene un costo aproximado de \$750 pesos, es difícil de encontrar y en la mayoría de las ocasiones los pacientes no tiene la disponibilidad económica para adquirirlo (Jaramillo *et al.*, 2007).

1.2.- Alacranes

La distribución de los alacranes es amplia, de las 1.500 especies conocidas en el mundo sólo 25 especies distribuidas en 18 familias son peligrosas. Los países que reportan accidentes por picadura de alacrán son principalmente Australia, Estados Unidos, Tanzania, México, Brasil, Panamá, Colombia, Venezuela, Sudáfrica, Argelia, Pakistán, India y Túnez. (Celis *et al.*, 2007). Una de las familias de alacranes más peligrosas para los humanos es la *Buthidae*, es también la más extensa y existe en México, incluye 80 géneros y a las especies más tóxicas del género *Centruroides*, responsable de los cuadros de intoxicación de mayor morbilidad y mortalidad, en

todo el mundo. (Chippaux & Goyffon 2008). Los alacranes que pueden producir picaduras mortales son: el alacrán: cola gorda árabe o *Androctonus crassicauda*, amarillo brasileño o *Tityus serrulatus*, corteza de Arizona o *Centruroides sculpturatus*, acosador de muerte o *Leiurus quinquestriatus*, emperador o *Pandinus imperator*, y rojo indio o *Hottentotta tamulus* (Celis et al., 2007).

En México existen aproximadamente 250 especies de alacranes, 37 pertenecientes al género *Centruroides* de la familia Buthidae. Las especies de importancia médica en México son: *Centruroides noxius*, *C. limpidus*, *C. tecomanus*, *C. suffusus*, *C. infamatus*, *C. elegans*, *C. sculpturatus*, *C. balsasensis* y *C. meisei* (Palomera et al., 2016). Se considera que *Centruroides noxius* es la especie más letal por las toxinas en su veneno y el impacto en la salud poblacional donde estos organismos habitan. Los estados en México que tiene mayor presencia de alacranes venenosos son principalmente Michoacán, Oaxaca, Durango, Estado de México, Jalisco, Nayarit, Guerrero y Morelos. Los estados más afectados por picaduras de escorpión son Jalisco y Morelos (Jaramillo et al., 2007).

1.3.- Composición y mecanismo de acción del veneno.

El veneno de escorpiones es una mezcla de proteínas como neurotoxinas, nucleótidos, aminoácidos, oligopeptidos, cardiotoxinas, nefrotoxinas, toxinas hemolíticas, fosfodiesterasa, fosfolipasa A, hialuronidasa A, acetilcolinesterasa, glicosaminoglucanos, Histamina, serotonina y angiotensina. Los péptidos tóxicos de cadena corta bloquean los canales de potasio de las membranas celulares, mientras que los péptidos de cadena larga interactúan con los canales de sodio provocando el ingreso desmedido de sodio a la célula y la imposibilidad de salida de potasio, alterando el potencial de membrana y la función celular liberando acetilcolina, este neurotransmisor afecta principalmente el sistema nervioso central y musculo esquelético (Escalona y Possani, 2011). La gravedad de los envenenamientos causados por picaduras de escorpión en México y en todo el mundo está asociada con la presencia de neurotoxinas la importancia médica de estas se basa en dos elementos clave, abundancia y toxicidad reflejados por su afectación en canales de sodio presentes en los sistemas nerviosos central y periférico. El efecto letal de las

toxinas se relaciona con su alta concentración en el veneno que afecta algunas funciones vitales como la movilidad del corazón y el sistema respiratorio, que conduce a la muerte (Rodríguez *et al.*, 2016).

1.4.- Toxinas del veneno de alacrán.

A la fecha se han analizado bioquímica y molecularmente los venenos de 30 especies de alacranes, en las últimas décadas se han logrado purificar varios péptidos (Gazarian *et al.*, 2005). Se conoce solo el 0.02% de los péptidos presentes en el veneno, de éstos 121 péptidos son específicos en canales de sodio, 74 en canales de potasio y 5 en canales de cloro (Possani *et al.*, 2000). Los péptidos de cadena corta de 22-47 aminoácidos, normalmente son bloqueadores específicos de canales de potasio, mientras que los péptidos de 60-76 residuos de aminoácidos son moduladores específicos de activación de los canales de sodio; estos se subdividen en α -ScTx y β -ScTX. Las α toxinas se unen al sitio 3 y las β -toxinas se unen al sitio 4 produciendo un cambio de potencial volviéndolo más negativo (Gazarian *et al.*, 2005). Las β -toxinas de escorpión inducen un cambio en el voltaje para la activación del canal de sodio y su mecanismo de acción implica la interacción con el extremo extracelular del segmento IIS4 en el canal activado a través de la unión al asa S3-S4; el segmento IIS4 se mueve hacia afuera durante la despolarización causando un cambio en la dependencia de voltaje de la activación volviéndolo negativo (Catterall *et al.*, 2007).

1.5.- Toxina Cn2

Centruroides noxius es considerado uno de los escorpiones más peligrosos por la letalidad de su veneno que tiene una LD50 =0.31 mg/Kg y en gran medida se debe a la presencia de una toxina llamada Cn2, la cual representa el 6.8 % del veneno total de estos organismos. La toxina Cn2 estructuralmente está conformada por una lamina β antiparalela de triple cadena, una α -hélice y cuatro enlaces disulfuro que le proporcionan estabilidad a su estructura; contiene 7 residuos de tirosina, 2 de triptófano y 1 de fenilalanina, que representan una importante cantidad de residuos aromáticos que definen la parte hidrofóbica en su hoja beta, opuesta a su alfa hélice (Rodríguez *et al.*, 2016). Las β - toxinas se unen al asa formada entre los segmentos

S3-S4 causando una despolarización en la membrana de las células y provocando una entrada continua y desmedida de iones sodio, que provocan una sobre estimulación neuronal reflejándose en síntomas musculares y neuronales principalmente, bloqueando la entrada de los iones potasio, en las células excitables del organismo víctima y provocando sintomatología de leve a severa (Riaño *et al.*, 2011).

1.6.-Antivenenos

El uso de un antídoto para la picadura de un escorpión que reduce e inactiva significativamente el nivel circulación del veneno en su organismo sigue siendo la única alternativa para salvar la vida de personas picadas por alacranes peligrosos. La aplicación del antiveneno en algunas circunstancias es controvertido debido a su eficacia, efectos secundarios, costo y el acceso a atención médica. El antídoto es más eficaz si se administra antes de que se presenten los síntomas, sin embargo, no se realiza de manera cotidiana una vacunación contra picaduras de alacranes especialmente en niños y ancianos; por lo que los niños picados por alacranes se atienden después de la picadura; si los síntomas son severos y se cuenta con el antídoto se aplica inmediatamente al paciente, pero en salas de urgencias rurales distantes, donde el acceso a centros médicos y unidades de cuidados intensivos es limitado, no siempre se cuenta con la aplicación del antídoto o su disponibilidad (Espino *et al.*, 2009)

1.7.-Sueroterapia y Anticuerpos.

Los anticuerpos son también llamados inmunoglobulinas IgG reconocen a moléculas extrañas o antígenos. Las IgG son las más abundantes en la sangre, tiene un peso aproximado de 160 kDa. Se conocen 5 diferentes: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Todas ellas tienen en común que su unidad básica ésta formada por dos pares de cadenas peptídicas $F(ab')_2$ (**Figura 1**).

Figura 1.- Esquema de un Inmunoglobulina IgG (Lujan *et al.*, 2014).

Desde los años 50 a través de la inmunización principalmente en caballos con toxinas o venenos de alacranes, se ha logrado que los linfocitos B de estos organismos produzcan anticuerpos (IgG) en la sangre, esta es utilizada para separar por centrifugación el suero y precipitado; el suero contiene diversas inmunoglobulinas que funcionan como un antiveneno (Jiménez *et al.*, 2017).

Debido a que a menudo estas IgG procedían de la inmunización de ratones, conejos y caballos, resultaban ser menos específicos como tratamiento para los humanos, ya que presentaban inmunogenicidad; por lo que los sueros fueron purificados para obtener inmunoglobulinas puras de interés, para disminuir las reacciones alérgicas resultantes, de tal manera que así se obtuvieron los anticuerpos de segunda generación (Riaño *et al.*, 2017).

Estudios posteriores permitieron el desarrollo de anticuerpos monoclonales que resultan de la fusión de una célula B secretora anticuerpo específica con una célula de anticuerpo no secretor, es decir que cada célula proviene de una misma célula madre por lo tanto será capaz de producir siempre el mismo anticuerpo y pueda unirse a su antígeno específico, de esta manera se asegura que en el caso de que el anticuerpo tenga la función de actuar como antiveneno, el 100% de las células producidas serán capaz de neutralizar al veneno, más tarde y gracias a las innovaciones tecnológicas se pudieron desarrollar anticuerpos monoclonales humanizados donde se injertan residuos determinantes de la complementariedad murina CDR's en estructuras de origen humano, consiguiendo moléculas cuyas secuencias son similares a los anticuerpo humanos (Alvarenga *et al.*, 2014).

Algunos años después se logra el desarrollo de los anticuerpos de tercera generación que resultan de la obtención de los fragmentos $F(ab')_2$ al separarse del fragmento F_c (Fragmento cristalizante) mediante pepsina (**Figura 2**). El fragmento Fab contiene la región VH+ CH1 y CL y es de 50 KDa, (Joosten *et al.*, 2003), la regiones variable de estos fragmentos reconocen los antígenos y se utilizarían para la terapia denominada "Faboterapia" (Alvarenga *et al.*, 2014).

En 1994 El Dr. Alagón colaboró con el Instituto Bioclon para la producción de un faboterapico antialacrán conocido como “Alacramyn” que se utilizan en la industria farmacéutica mexicana, Cruz Roja y por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Con la implementación de este anti-veneno se ha evitado un considerable número de muertes al año en México. Este antiveneno fue aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos en 2011, y se comercializa bajo el nombre de Anascorp. El faboterapico más conocido comercialmente es el llamado “Alacramyn”, es eficiente y permite disminuir significativamente la letalidad del veneno a 0.03% (Gazarian *et al.*,2005).

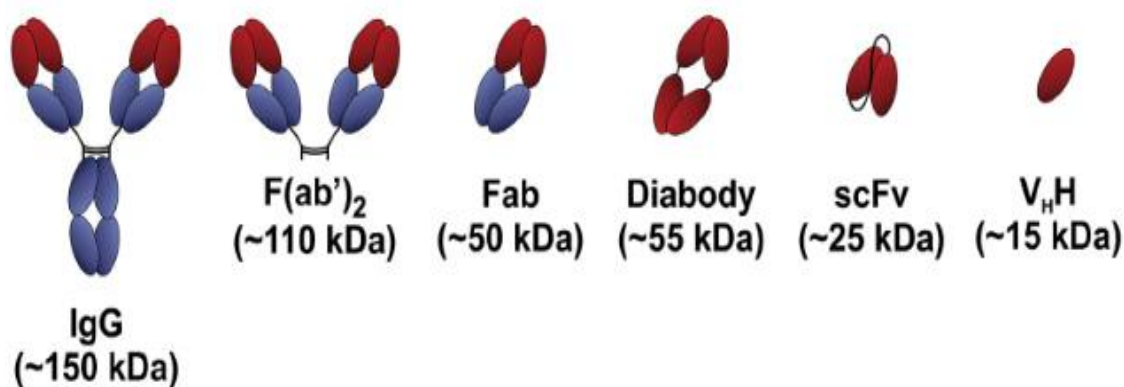


Figura 2.- Diferentes fragmentos obtenidos de una inmunoglobulina (Laustsen *et al.*, 2018).

Gracias a las herramientas moleculares y biotecnológicas se desarrollan los fragmentos ScFv que son pequeñas proteínas recombinantes de cadena simple, que debido a sus diversas variantes pueden tener función de antivenenos. Se componen de los dominios variables de cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo, unidos por un péptido hidrófilo y flexible que tiene de 10 a 25 residuos de aminoácidos de longitud entre ellos cuatro glicinas y una serina repetidas de dos o tres veces. Los scFv son considerados una herramienta poderosa en inmunoterapia y para la investigación científica, El sitio de unión del anticuerpo se mantiene intacto dentro del scFv y no hay pérdida de especificidad, debido a su tamaño logran una rápida difusión tienen la propiedad farmacocinética de ser eliminados rápidamente de la sangre y tienen menor tiempo de retención en tejidos no diana y al ser de origen humano resultan

ser menos inmunogenicos. También pueden fusionarse con otras moléculas como fármacos para administrar estos agentes específicamente hacia las células diana que se requiere. Se han expresado más de 400 moléculas scFv dirigidas a diferentes proteínas humanas con fines diversos tales como: a) Desarrollar diagnóstico de enfermedades, b) Tratamiento biomédico antivenenos, análisis de inmunotransferencia y citometria, entre otros (Malpiedi *et al.*, 2013).

Las herramientas que permiten la obtención de estos anticuerpos son la ingeniería de proteínas recombinantes, el despliegue en fagos, la evolución dirigida que permiten la obtención de bibliotecas combinatorias para poder seleccionar los anticuerpos con la especificidad que se desee (Alvarenga *et al.*, 2014).

Actualmente se han realizado varios reportes expresión heteróloga de fragmentos de cadena sencilla que funcionan como antivenenos contra diferentes organismos (Tabla 1)

Tabla 1.- Ejemplos de scFv con función de antiveneno.

FRAGMENTO	VENENO	REFERENCIA
ScFvBaP1	<i>Bothrops asper</i>	Castro <i>et al.</i> , 2014
Afrimumabs	<i>Africanized bees</i>	Pessenda <i>et al.</i> , 2016
Scfv: DAS1, DAS5, DAS14, y DAL1	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	Lee <i>et al.</i> , 2016
ScFv P2B7	<i>Bothrops sp</i>	Roncolato <i>et al.</i> , 2013
ScFv 15e	<i>Tityus serrulatus</i>	Amaro <i>et al.</i> , 2011
ScFv 2A(serumab)	<i>Tityus serrulatus</i>	Pucca <i>et al.</i> , 2012
ScFv 3F	<i>Centruroides suffusus suffusus</i>	Riaño <i>et al.</i> , 2011
ScFv 4C1	<i>Androctonus australis</i>	Mousli <i>et al.</i> , 1999

1.8.- Fragmento scFv 6009 F.

El fragmento de cadena sencilla 6009F es capaz de reconocer y neutralizar a la toxina Cn2 y al veneno completo presente en el veneno del alacrán *Centruroides*

noxius, su característica principal es que es un fragmento humano, lo que teóricamente disminuye la inmunogenicidad y ofrece mayor compatibilidad (Riaño *et al.*, 2005).

El fragmento scFv 6009F se obtuvo a partir de RNA purificado de linfocitos B proveniente de la sangre periférica de humanos, se tomaron las regiones variables y se amplificaron por PCR, posteriormente todo el pool de las regiones variables se combinaron obteniendo 72 variantes y se realizaron varias rondas de biopaneos, dando como resultado dos variantes capaces de reconocer la toxina Cn2, que fueron las variantes 3F y C1. El scFv 3F fue sometido a tres ciclos de evolución dirigida para proporcionar a los scFv de una mejor estabilidad y capacidad de reconocimiento de su objetivo. Así se obtuvo el fragmento 6009F del parental 3F. El scFv 6009F reconoce el epítipo de la toxina Cn2 en experimentos de reto toxina-anticuerpo de manera exógena para después ser inyectado en ratones (Riaño *et al.*, 2005).

El fragmento scFv 6009F tiene un efecto neutralizante contra el veneno del alacrán *Centruroides noxius* y puede neutralizar a la toxina Cn2 presente en el veneno. Las dosis letales de Cn2 en ratones fue $LD_{50} = 0.25 \mu\text{g}/20\text{g}$ del peso de ratón y del veneno total una $LD_{50}=2.5\mu\text{g}/20\text{g}$ del peso de ratón. Los ensayos probaron que el anticuerpo logra una sobrevivencia del 100% de los ratones utilizando una proporción 1:10 del anticuerpo. Este scFv 6009F reconoce 6 toxinas de tres venenos Cn2 y Cn3 de *Centruroides noxius*, Css2, y Css4 de *Centruroides suffusus*, y CII1 y CII2 *Centruroides limpidus* (Riaño *et al.*, 2005).

Muchos laboratorios siguen estudiando el antídoto ideal, sobre todo en países donde la picadura de alacrán tiene una alta incidencia alta, como México, Panamá, Marruecos y los países del Magreb, y otras zonas de Sudamérica y Asia, Panamá (Joosten *et al.*, 2003) y los avances biotecnológicos están impulsando a la búsqueda de nuevas alternativas de desarrollo de anticuerpos cada vez más pequeños y genéticamente modificados, permitiendo tener una amplia variedad de fragmentos de anticuerpos, incluyendo los fragmentos Fab, Fab's, los fragmentos de cadena sencilla scFv, que pueden nanobodies y diabodies; estas moléculas se pueden

producir en diferentes células hospedadoras como células de mamíferos, de insectos, levaduras y bacterias (Alvarenga *et al.*, 2014).

1.9.- Sistemas de expresión para proteínas recombinantes.

La funcionalidad de una proteína depende mucho del sistema de expresión que se utilice para su producción, es decir células animales insectos, plantas bacteria u hongos. Por lo que dicho sistema de expresión debe proporcionar ventajas para ser considerado una buena opción para la producción de proteínas heterólogas. Entre algunas características importantes se encuentran, su fácil manipulación, su rápido crecimiento en un medio de cultivo mínimo que sea de bajo costo, y poder manipular los parámetros de crecimiento como temperatura, pH, medio de cultivo (Silva *et al.*, 2009).

Diversos organismos se han utilizado como herramientas de sistema de expresión de proteínas heterologas; tal es el caso de *E.coli*, *Saccharomyces cerevicie* y *Pichia pastoris* entre otros. Si se comparan los diferentes organismos como sistemas de expresión, *Pichia pastoris* proporciona diversas ventajas como; es un organismo de fácil manipulación, su costo es muy bajo, de fácil mantenimiento, aumenta su escala de crecimiento fácilmente, su transformación se puede llevar a cabo fácilmente por electroporacion, sus requisitos de crecimiento son baratos, puede crecer en un rango de pH de 3-7 y no es un organismo tan sensible a contaminación, y el nivel de expresión es bastante elevado comparado con otros sistemas de expresión como *E.coli* o *S. cerevisiae*; su crecimiento a alta densidad proporciona un medio para producir grandes cantidades de anticuerpo de manera económica y eficaz. Las levaduras se han utilizado desde los años 80's, desde ese entonces se han expresado alrededor de 300 proteínas heterologas varias de ellas se han expresado en *Pichia pastoris* y han tenido popularidad debido a las características de sus factores como: la alcohol oxidasa (AOX I), que es uno de los promotores más regulados; y también por su capacidad para integrar plásmidos de expresión en su densidad, así como su disponibilidad siendo accesible a través de un kit de Invitrogen EE.UU. (Silva *et al.*, 2009).

1.10.- *Pichia pastoris*.

Las características generales de *Pichia pastoris* desde el punto de vista taxonómico la ubican en reino de Hongos, phylum Ascomycota, subfilo Saccharomycotina, clase Saccharomycetes, orden Saccharomycetales, familia Saccharomycetaceae, género *Pichia* y especie *pastoris*, habitan primordialmente en exudados de árboles, plantas, insectos en el suelo, como contaminantes de alimentos y pueden contribuir a la fermentación de vino, queso y salmuera (Silva *et al.*, 2009).

Esta levadura tiene la capacidad de utilizar metanol como fuente de carbono y energía, esta característica fue descubierta por Koichi Ogata hace más de 30 años. Debido a que el metanol podría ser sintetizado a partir de gas natural metano resulta relativamente barato, por lo que se comenzaron a explorar métodos para el cultivo de *P. pastoris* como herramienta para generar biomasa en proporciones de ser comercializada, en ese entonces este organismo era utilizado para la generación de alimento animal. El éxito que tuvo la levadura para la generación de biomasa fue de gran interés. En 1970 la compañía Phillips Petroleum Company desarrollo nuevos métodos para el cultivo continuo a altas densidades celulares, sin embargo en esa década el precio del metanol subió por lo que este organismo dejó de ser considerado con fines de uso industrial al no poder ser competitivo frente a otros organismos como *E. coli* (Fischer *et al.*, 1999).

Posteriormente gracias a los avances de genética molecular se logró la identificación y el aislamiento del gen AOX1 y su promotor, este gen es el encargado de que este organismo pueda ser inducido por metanol como fuente de carbono, por la presencia de importantes enzimas, como la enzima alcohol oxidasa, catalasa y la dihidroxiacetona sintasa. Las reacciones del metabolismo del metanol se lleva a cabo en los peroxisomas, que son organelos fundamentales para el crecimiento de la levadura; la enzima alcohol oxidasa (AOX) cataliza la primera reacción convirtiendo al metanol en formaldehído y peróxido de hidrógeno, la AOX es capturada por el peroxisoma junto con la catalasa, esta última degrada el peróxido de hidrógeno a oxígeno y agua. Posteriormente parte del formaldehído producido en la primera reacción se libera del peroxisoma para después oxidarse a dióxido de carbono

gracias a la enzima deshidrogenasas presentes en el citoplasma, estas reacciones proporcionan la fuente de energía suficiente para el crecimiento celular en el metanol (Silva *et al.*, 2009); favoreciendo el control para la producción de moléculas foráneas tales como las proteínas heterólogas (Cregg *et al.*, 2000). Esta levadura ofrece ciertas ventajas que permiten considerarla como herramienta primordial para la obtención de proteínas heterologas, ya que tiene la capacidad de crecer en un medio mínimo y al ser un organismo eucarionte puede realizar modificaciones postraduccionales como el plegamiento de proteínas, la formación de puentes disulfuro y la glicosilación (Cos *et al.*, 2006). Además se ha comparado a *Pichia pastoris* con la levadura de *S. cerevisiae* con respecto a la producción de proteínas heterólogas y se ha reportado que *Pichia pastoris* ofrece mejores rendimientos de proteínas secretadas, esto se atribuye a que sus glicános son más cortos y por tanto menos inmunogénicos (Tran *et al.*, 2017)

Actualmente la producción de proteínas de interés comercial farmacéutico y alimentario se han logrado gracias a la levadura *P. pastoris* como sistema de expresión, debido a que su crecimiento es fácilmente escalable, un ejemplo importante es el fármaco Kalbitor, fármaco inhibidor de la calicreína, Insungen fármaco para el tratamiento de la diabetes, Shanvac para el tratamiento de hepatitis, Shanferon para tratamiento de cáncer, entre otros productos aprobados por la FDA (Ahmad *et al.*, 2014); también se han expresado con éxito anticuerpos monocatenarios como el scFv anti-fluoresceína y el factor inhibidor de la leucemia humana anti-recombinante (Li *et al.*, 2007).

1.11.- Clasificación de *Pichia pastoris*.

Su clasificación se da con respecto a la capacidad que tiene de metabolizar metanol Mut; entonces las cepas Mut⁺ pueden crecer en metanol en cantidad igual al de la cepa silvestre ya que portan los genes AOX1 y AOX2, las cepas Mut^S poseen un lento crecimiento en presencia de metanol con respecto al crecimiento de la cepa silvestre debido a que solo posee el gen AOX2 funcional, y por ultimo las cepas Mut⁻ estas, no pueden utilizar el metanol como fuente de carbono ya que poseen los genes AOX1 y AOX2 inactivados (Serrano *et al.*, 2016) **(Tabla 2)**

Tabla 2.- Clasificación de las cepas de *P. pastoris* con respecto a su fenotipo.

Cepa	Genotipo	Fenotipo	Características
Y-11430	Silvestre	silvestre	Consumo metanol alto.
X-33	Silvestre	silvestre	Consumo metanol alto.
GS115	His 4	Mut ⁺ , His ⁻	Consumo metanol alto, auxotrofia a Histidina.
KM71	His4, arg4,AOX1	Mut ^s , His ⁻	Consumo metanol bajo, auxotrofia a Histidina.
MC100-3	His4, arg4,AOX1	Mut ⁻ , His ⁻	Incapaz de consumir metanol, auxotrofia a Histidina.
SMD1168	pep4, His 4	Mut ⁺ , His ⁻ deficiente en proteasas	Consumo metanol alto, auxotrofia a Histidina, no produce proteinasa B.
SMD1163	pep4, prb1, His 4	Mut ⁺ , His ⁻ deficiente en proteasas	Consumo metanol alto, auxotrofia a Histidina, no produce proteinasa A, proteinasa B ni carboxipeptidasa Y.

Se han reportado diversos rendimientos de las proteínas heterologas expresadas en *P. pastoris* (**Tabla 3**), esta levadura cuenta con una etiqueta de 6 Histidinas (HIS-6) que le permite una purificación rápida del sobrenadante del cultivo, varios fragmentos de anticuerpos monocatenarios scFv se han expresado mostrando un alto rendimiento en *Pichia pastoris* (Fischer *et al.*, 1999).

Tabla 3.- Proteínas heterologas expresadas en cepas de *P. pastoris* y sus rendimientos.

Cepa	Plásmido	Proteína expresada	Rendimiento	Referencia
X-33	pPICZc	EGFR	8-10mg/L	Omidfar <i>et al.</i> , 2016
X-33	pPICZαA	Aahl	17 mg/L	Ezzine <i>et al.</i> , 2012
GS115	pPIC9	MUCI	10-15mg/L	Rahbarizadeh <i>et al.</i> ,2006

GS115	pPICZαA	TNFα	5 mg/L	Ji <i>et al.</i> , 2015
Glycoswitch-MAn5	pPpT4αS	Albumina, globulina	2.4-26.8mg/L	De Meyer <i>et al.</i> , 2015
1 TM	pPink-HC	BoNT/E	16mg/L	Baghban <i>et al.</i> ,2016

1.12.-Vectores de expresión empleados en *P. pastoris*.

La maquinaria celular de *P. pastoris* permite expresar proteínas heterólogas en los vectores que se integran al genoma lo que ayuda a mejorar la estabilidad genética de los elementos recombinantes (Macauley *et al.*, 2005). Los vectores de expresión desarrollados para *P. pastoris* para expresar de manera intracelular o extracelular las proteínas heterólogas son comercializados por la Corporación Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) y se describen en la **Tabla 4**. Estos se componen básicamente de un promotor, un sitio de clonaje múltiple (SCM) con uno o más sitios de restricción para la inserción del gen heterólogo, un terminador transcripcional, un marcador de selección que puede ser usado en *E. coli* (DH5α o TOP 10) y *P. pastoris* o en ambos, poseen un marcador de selección que puede ser usado en ambos microorganismos y opcionalmente una secuencia que codifica para un péptido señal (FAT-α o PHO5) entre el promotor y el SCM que garantiza la secreción (Cereghino *et al.*, 2002).

Los vectores para la expresión de proteína intracelular pHIL-D2, pPIC 3.5 y extracelular pHIL-S1, pPIC Z α, pPIC 9, pPIC6α que contienen 3 'AOX1 poseen secuencias que se pueden integrar fácilmente en el genoma de *P. pastoris* en un solo evento de cruce en cualquiera de los Loci AOX1 o HIS4 o por un reemplazo de genes en AOX1. Estos eventos representan del 10 al 50% de las colonias transformantes de His⁺ y parecen ocurrir con una frecuencia más alta cuando se usa electroporación para introducir vectores ADN (Cregg *et al.*, 2000).

Tabla 4.- Plásmidos que expresan proteínas de manera intracelular o extracelular en *P. pastoris*.

Plásmido	Marcador de selección	Características
Intracelulares		
pHIL-D2	<i>His4</i>	Resistencia ampicilina, AOX1, sitio <i>NotI</i> .
pPIC 3.5K	<i>His4</i> y <i>kan^r</i>	Múltiple sitio de clonación.
pAO8015	<i>His4</i>	<i>Bam</i> HI y <i>Bgl</i> II Sitios que flanquean el cassette de expresión para la generación del vector de expresión multicopia.
pPIC 6	<i>bsd^r</i>	Resistencia a blasticidina utilizada para la selección directa de cepas multicopia.
pPIC Z	<i>Ble^r</i>	Sitio de clonación múltiple; etiquetas de His6 y c-myc; Selección de zeocina para cepas multicopia
pPIC 3.5	<i>His4</i> and <i>kan^r</i>	Resistencia a ampicilina, AOX1, HIS4.
Extracelulares		
pPIC Z α	<i>ble^r</i>	AOX1. fusionado a la secuencia señal α -MF; sitio de clonación múltiple His6 y c-myc; Selección de zeocina para cepas multicopia
pHIL-S1	<i>His4</i>	AOX1p fusionado a la señal de secreción de PHO1; Sitio XhoI, EcoRI y BamHI para la inserción de genes extraños, resistencia a ampicilina.
pPIC 9	<i>His4</i> and <i>kan^r</i>	AOX1p fusionado a la secuencia señal de α -MF; Sitios EcoRI, NotI, SnaBI y AvrII para la inserción de genes extraños; Selección G418 para cepas multicopia.
pPIC6 α	<i>bsd^r</i>	AOX1, fusionado a la secuencia señal α -MF; sitio de clonación múltiple His6 y c-myc; resistencia a blasticidina para selección de cepas multicopia.
pGAPZ α	<i>ble^r</i>	GAPp fusionado a la secuencia de señal de α -MF sitio de clonación múltiple etiquetas de epítomos His6 y c-myc; Selección de zeocina para cepas multicopia.

Más específicamente los vectores de expresión pPICZA y pPICZA α son frecuentemente utilizados para la expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris*, algunas de sus principales características son: el promotor fuerte AOX1 de

la enzima alcohol oxidasa que es inducible con metanol, sitio de clonación múltiple, la etiqueta c-Myc útil para la inmunodetección, una etiqueta de polihistidinas útil para la purificación, un sitio de terminación de la transcripción del gen AOX1, y la resistencia al antibiótico zeocina. La integración del vector en *P. pastoris* se lleva a cabo por recombinación homóloga, entre las secuencias comunes del vector previamente linearizado y del genoma de la levadura. Las diferencias entre ambos vectores se encuentran en la forma de secreción de las proteínas heterólogas siendo para el primero intracelular y el segundo extracelular (Cregg *et al.*, 2000). En nuestro grupo de Investigación se está trabajando con las cepas *P. pastoris* GS115, KM-71 y X33 y con los vectores de expresión pHIL2, pHILD2, pPIC3.5, pPicZa y pPicZa α , con diferentes combinaciones entre cepas de *P. pastoris* con los plásmidos compatibles para la expresión intracelular o extracelular (**Tabla 5**). En este trabajo se expresará el gen scFv 6009F en *P. pastori* X33/pPicZa y *P. pastori* X33/ pPicZa α .

Tabla 5.- Combinaciones entre cepas de *P. pastoris* con los plásmidos compatibles para la expresión intracelular o extracelular que se trabajan en nuestro grupo de investigación.

Construcción Intracelular	Construcción Extracelular
<i>P. pastori</i> GS115/ pPIC3.5	<i>P. pastori</i> GS115/ pPicZa α
<i>P. pastori</i> GS115/ pHILD2	
<i>P. pastori</i> GS115/ pHILD	
<i>P. pastori</i> GS115/ pPicZaB	
<i>P. pastori</i> KM-71/ pPic3.5	<i>P. pastori</i> KM-71/ pPicZa α
<i>P. pastori</i> KM-71/ pHILD2	
<i>P. pastori</i> KM-71/ pHIL2	
<i>P. pastori</i> X33/ pPicZa	<i>P. pastori</i> X33/ pPicZa α
	<i>P. pastori</i> X33/ pPicZa α

2.- Justificación

El fragmento scFv 6009F tiene la capacidad de reconocer y neutralizar el veneno del alacrán *Centruroides noxius* y las toxinas Cn2 y Cn3, además de presentar efecto cruzado para las toxinas C_{ss}1, C_{ss}4 de *Centruroides suffusus* y CII1 y CII2 de *Centruroides limpidus*, por lo que pudiera ser parte de un anticuerpo terapéutico potencial contra la picadura de alacrán. Sin embargo hace falta realizar estudios farmacocinéticos y de rescate en humanos antes de poder ser utilizado. Por lo cual es necesario expresarlo heterológamente en cantidades superiores a 1.1 mg/L rendimiento obtenido en *E. coli*, y obtenerlo de manera soluble y biológicamente activo, por lo que la levadura *Pichia pastoris* puede ser un modelo apropiado para cumplir con este propósito, ya que proporciona algunas ventajas en comparación con *E. coli* tales como: presentar un crecimiento en biomasa elevado, rendimientos hasta de 26 mg/L, la proteína a expresar puede ser secretada al medio y obtenerse de manera soluble y biológicamente activa debido a la maquinaria celular que le permite la realización de procesos de maduración y expresión característicos de células eucariotas.

3.- Hipótesis.

Es posible que la expresión del anticuerpo scFv 6009F usando dos diferentes plásmidos que expresan la proteína intracelularmente pPICZA y extracelularmente pPICZA α en la cepa de *Pichia pastoris* X-33 permita comparar con que plásmido se obtiene mayor rendimiento y compararlos con los reportados en *E. coli* ; además de poder evaluar si estos anticuerpos son capaces de reconocer la toxina Cn2.

4.- Objetivo general

Expresar el fragmento 6009F utilizando la cepa de levadura *Pichia pastoris* X-33 con dos diferentes vectores para expresar heterológamente proteínas intracelulares pPICZA y extracelulares pPICZA α y comparar los rendimientos obtenidos entre los dos diferentes plásmidos.

4.1.- Objetivos particulares

- Expresión del fragmento 6009F en la cepa de levadura *P. pastoris* X33.
- Obtención de clonas de *Pichia pastoris* capaces de producir el fragmento 6009F.
- Evaluar el rendimiento obtenido de la expresión del fragmento 6009F en *Pichia pastoris* con respecto a los dos diferentes vectores de expresión.
- Verificar el reconocimiento de neutralización del anticuerpo scFv 6009F frente a la toxina Cn2.

5.- Metodología.

5.1.-Plásmidos

Se utilizó el plásmido pSyn1 (**Figura 3**); donado por el Dr. Baltazar Becerril del Instituto de Biotecnología UNAM. Este plásmido contiene el fragmento de interés scFv 6009F. Además de poseer características que le permiten su fácil replicación y purificación (**Tabla 6**); así como también se utilizaron los plásmidos pPICZA α que permite la expresión de proteínas heterologas extracelularmente, y el plásmido pPICZA que permite la expresión de proteínas intracelularmente ambos compatibles con la cepa de *Pichia pastoris* x-33 **Figura 4**; sus características principales se describen en la **Tabla 6**

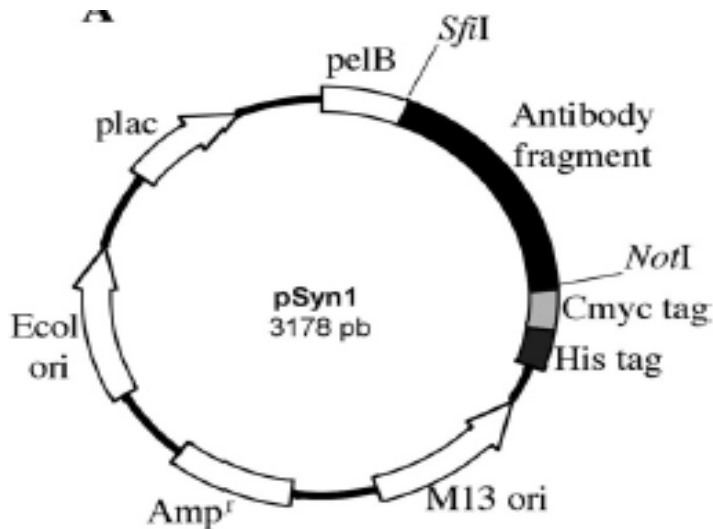


Figura 3.- Esquema del plásmido pSyn1.

Tabla 6.- Características del plásmido pSyn1

ELEMENTO	FUNCION
PelB	Secuencia señal de secreción periplasmática, pectato-liasa B de <i>Erwinia cavolovora</i>
Ecol ori	Origen de replicación
pLac	Promotor lac
M13 ori	Origen de replicación del fago filamentoso M13
His tag	Proporciona una cola de Histidinas que permite la purificación de

	la proteína mediante el uso de una columna Ni-NTA
C-myc	Derivado de la proteína c-Myc, es una etiqueta de epitopo para la detección de la expresión recombinante.

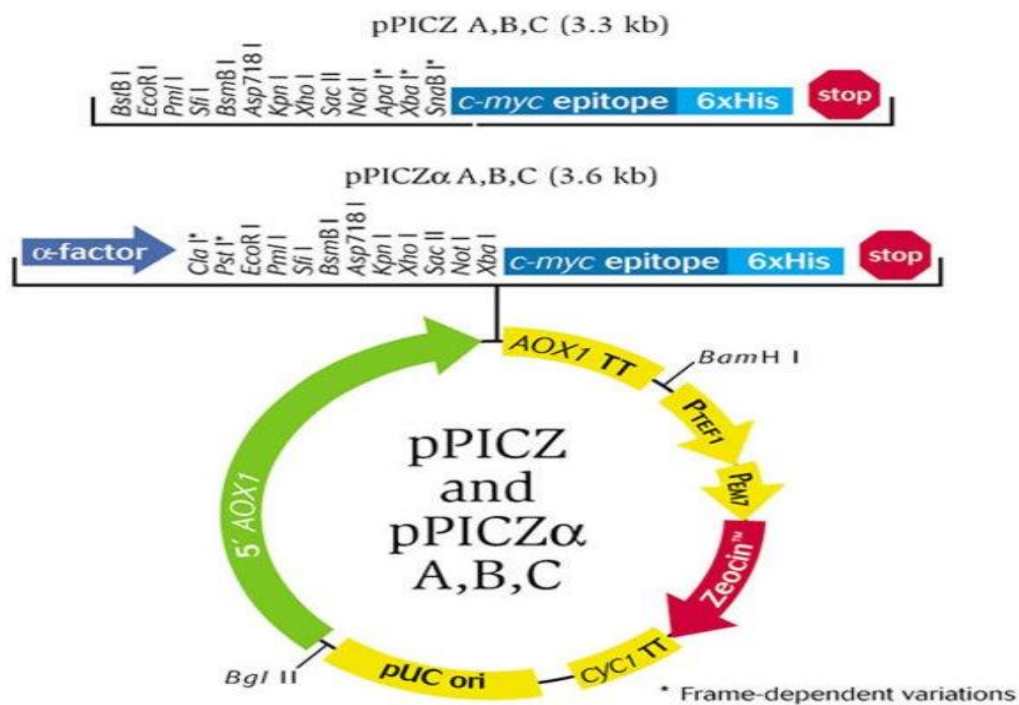


Figura 4.- Esquema del plásmido pPICZ

Tabla 7.- Características del plásmido pPICZA y pPICZα.

ELEMENTO	FUNCION
5´AOX1	Promotor que permite la inducción por metanol.
pUC ori	Origen de replicación y mantenimiento en plásmido de E. coli.
Gen de resistencia a zeocina (sh ble)	Sitio que le confiere resistencia a Zeocina para selección.
C-myc	Etiqueta para la expresión recombinante
His-6	Etiqueta de Histidinas que permite la purificación de la proteína por columna de Ni-NTA

MCS	Sitio múltiple de clonación
α -factor *	Señal de secreción extracelular.

5.2.- Organismos

5.2.1.- Cepa de *Escherichia coli* Top 10

Esta cepa es ideal para la propagación y clonación de plásmidos, además de poseer una resistencia al antibiótico tetraciclina para su selección

5.2.2.-Cepa de levadura *Pichia pastoris* X-33.

Esta cepa tiene genotipo de tipo silvestre y es compatible con vectores que tienen resistencia a zeocina como los plásmidos pPICZA y pPICZA α .

5.2.3.- Medios de cultivo

- **Luria bertani**

1% Extracto de levadura

2% Peptona de caseína

2% Cloruro de sodio

2% Agar*

- **YPD Yeast Extract Peptone Dextrose Medium (1 litro)**

1% Extracto de levadura

2% Peptona de caseína

2% Dextrosa

2% Agar*

100 μ g/ml Zeocina™

- **BMGY and BMMY Buffered Glycerol-complex Medium
Buffered Methanol-complex Medium (1 liter)**

1% extracto de levadura

1% extracto de levadura

2% peptona de caseína
100 mM fosfato de potasio pH 6.0
1.34% YNB
4 × 10⁻⁵% biotín
1% glycerol or 0.5% methanol

5.2.4.-KITS

Kit de purificación de plásmido “Thermo Scientific Gene Jet plasmid” para la obtención del plásmido purificado.

5.3.- Mantenimiento y propagación del plásmido pSyn1, pPICZA y pPICZA α en la cepa bacteriana top10F.

Se procedió a hacer la propagación del plásmido pSyn1, pPICZA y pPICZA α previamente transformados en células quimio competentes (**ver anexo**) de la cepa bacteriana de *Escherichia coli* Top10F, que tiene función de servir para la clonación y el mantenimiento de plásmido. Una vez obtenidas las colonias transformadas en *E. coli* Top10F, se tomó una asada de cada colonia con el plásmido y se inocularon de manera independiente cada una en tubos con medio de cultivo LB. Para la cepa *E. coli* Top 10F con el plásmido pSyn1 el medio LB utilizado se añadieron los antibióticos tetraciclina (10 µg/mL) y ampicilina (100 mg /mL). Para la cepa *E. coli* Top 10 con los plásmidos pPICZA y pPICZA α de manera independiente se añadieron los antibióticos 25 µg/mL zeocina y 10µg/mL tetraciclina. Los tubos inoculados de *E. coli* Top 10F se incubaron 12 h a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación se utilizó el Kit de purificación de plásmido Thermo Scientific Gene Jet plasmid kit para la obtención del plásmido purificado. Posteriormente, los tubos anteriores se centrifugaron durante 2 minutos. Para después purificar el plásmido pSyn1 por medio de un Kit de purificación de plásmidos Thermo Scientific.

5.4.- Amplificación del fragmento 6009F.

A partir del plásmido purificado se realizó la amplificación del fragmento de interés 6009F mediante PCR, con el uso de los oligos previamente diseñados para cada plásmido. La direccionalidad y el diseño de oligos se verificaron con el programa computacional SNAPGene.

Una vez obtenida la purificación del plásmido pSyn1/scFv 6009F, se realizó un PCR con los oligonucleótidos específicos diseñados para amplificar el gen scFv 6009F para inserción en plásmido pPICZA α , 1 Forward 5' y 2 Reverse 3' (**Tabla 8**). Se estandarizaron las condiciones para la amplificación del producto de PCR y se llevaron a cabo tres reacciones de PCR de 50 μ l de volumen total cada una (**Tabla 9**). Posteriormente se corrió un gel de agarosa al 0.8%.

Tabla 8.- Secuencia de los oligos 1 y 2 utilizados para amplificación scFv 6009F.

1	Forward 5'	TAA GAA TTC ACC ATG GCC GAG GTG
2	Reverse 3'	TGC GGC CGC ACG TTT GA

Tabla 9.- Condiciones de PCR

Ciclos	Temperatura	Duración
1	95°C	2:30 min
39	95°C	40 seg
ciclos	66°C	40 seg
	72°C	1min
1	72°C	10 min

Para el caso de la amplificación del gen scFv 6009F para clonación en el plásmido plásmido pPICZA se utilizaron los oligos 1 Forward 5' que contiene una región Kozac para el inicio de la traducción y el oligo 2 reverso 3' (**Tabla 10**), de igual forma se estandarizaron las condiciones para la amplificación del producto de PCR y se llevaron a cabo tres reacciones de PCR de 50 μ l de volumen total cada una (**Tabla 11**). Posteriormente se corrió un gel de agarosa al 0.8%.

Tabla 10.- Secuencia de los oligos 3 y 4 utilizados para amplificación scFv 6009F.

3	Forward 5'	GTA GAA TTC GAG GTG CAG CTG GTG G
4	Reverse 3'	TGC GGC CGC ACG TTT GA

Tabla 11.-Condiciones de PCR

ciclos	temperatura	Duración
1	95°C	2:30 min
39	95°C	40 seg
ciclos	68°C	40 seg
	72°C	1 min
1	72°C	10 min

5.5.- Doble digestión de los plásmidos pPICZA y pPICZA α y del gen scFv 6009F.

Una vez obtenida la purificación de los plásmidos pPICZA y pPICZA α se realizó a cada uno, una doble digestión, así como a las amplificaciones del fragmento scFv 6009F, para lo cual todas las muestras serán puestas en tratamiento de doble digestión por separado cada una de 20 μ l de volumen final. Para estas reacciones se utilizaron las enzimas EcoRI y NotI como se observa en la **Tabla 12**.

Tabla 12.- Condiciones para doble digestión

Buffer O	2 μ l
EcoRI	0.5 μ l
Not1	0.5 μ l
DNA	10 μ l
H ₂ O	7 μ l
Volumen final por reacción 20 μ l	

Las reacciones se dejaron en incubación durante dos horas a 37°C, posteriormente se inactivaron las enzimas a 20 minutos a 65°C.

5.6.- Ligación del gen scFv 6009F con los plásmidos pPICZA y pPICZA α

Se cuantifico la concentración de cada muestra de los plásmidos y de los insertos digeridos previamente. Una vez obtenidas las concentraciones se utilizó la página <https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation> para estimar la concentración de vector y de inserto a utilizar para la ligación con respecto a las concentraciones obtenidas. Se utilizó la enzima T4 ligasa. Las muestras se dejaron incubar a 16°C durante 16 h, una vez transcurrido el tiempo de incubación se inactivo la enzima a 65°C por 10 minutos.

Se utilizaron células de la cepa bacteriana Top10F quimio competentes preparadas previamente para ser transformadas con los productos de la ligación realizada previamente, posteriormente se tomaron 50 μ l cada una de las muestras y se plaquearon por separado en cajas Petri que contenían medio de cultivo LB con los antibióticos de zeocina 25 μ g/mL y tetraciclina 10 μ g/mL para su selección, las cajas se dejaron incubar overnight a 37°C.

5.7.- PCR de colonia de las transformantes

Se picaron 20 colonias al azar de las transformantes obtenidas previamente de la ligación pPICZA+6009F y pPICZA α +6009F, la mitad de cada colonia se utilizó para el PCR de colonia y la otra mitad se plaqueo en caja Petri con medio de cultivo LB agar con antibióticos zeocina y tetraciclina. Para las reacciones de PCR se utilizaron los oligos que se muestran en la **Tabla 13**; y se utilizaron las condiciones de PCR como se observa en la **Tabla 14**.

Tabla 13.- Oligos utilizados para PCR de colonia.

Forward AOX5'	GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC
Reverse AOX3'	GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC

Tabla 14.- Condiciones para PCR de colonia.

Ciclos	temperatura	Duración
1 	95°C	5 min
1	95°C	2:00 min
39	95°C	40 seg
ciclos	68°C	40 seg
	72°C	1 min
	72°C	10 min

5.8.- Doble digestión o liberación del fragmento

A las clonas positivas se les realizo una doble digestión con la finalidad de observar la liberación del fragmento del gen scFv 6009F y así comprobar la correcta transformación.. Se realizaron cuatro reacciones de doble digestión y las condiciones utilizadas que se observan en la **Tabla 15**, los resultados se corroboraron por medio de geles de agarosa al 0.8 % para observar las bandas de interés.

Tabla 15.- Condiciones de doble digestión para construcción.

Componente	Volumen
Buffer O	2µl
EcoRI	0.5 µl
Not1	0.5 µl
H ₂ O nucleasa free	7 µl
DNA.	10 µl

5.9.- Crecimiento de la cepa *Pichia pastoris* X-33.

A partir de la cepa *P. pastoris* X-33 mantenida en glicerol, se puso en crecimiento en cajas Petri con medio YPD compuesto de extracto de levadura, peptona, dextrosa y agar; se dejaron crecer a una temperatura de 28-30°C durante aproximadamente 5 días hasta poder observar colonias aisladas.

5.10.- Transformación por electroporación de *P. pastoris* X-33.

En matraces de 500 mL se agregaron 250 mL de medio YPD fresco y estéril y se inocularon con 250 mL del cultivo crecido previamente, se dejó en crecimiento toda la noche a una temperatura de 28-30°C en agitación constante 250-300 rpm; una vez que el cultivo alcanzó una DO_{600} 0.2-0.3 se inició la transformación para lo cual el cultivo se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos; el pellet obtenido se resuspendió en 250 mL de agua estéril; una vez resuspendido se volvió a centrifugar y el pellet obtenido se resuspendió en sorbitol 1M para un volumen final de 1.5 mL las células obtenidas se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Se mezclaron 80 µL de la mezcla anterior con 5-10 µg de pPICZA linealizado en una celda para electroporación, esta celda se incubó en hielo durante 5 minutos y posteriormente se utilizó un electroporador donde las células fueron pulsadas utilizando los parámetros Tensión de carga (V): 1500; Capacitancia (µF): 25; Resistencia (Ω): 200 e inmediatamente se agregó 1 mL de sorbitol 1M frío y las células se transfirieron a un tubo eppendorf para la recuperación celular, este tubo se incubó a 30° C sin agitar durante 1-2 horas.

Posteriormente la mezcla anterior se distribuyó de 50-200 µL en placas de agar con ayuda de perlas de vidrio, las cajas Petri contenían medio de cultivo YPD con antibiótico Zeocina 100 µg / mL, estas placas se incubaron durante 3-5 días a una temperatura de 28-30°C hasta obtener colonias aisladas. Pasado este tiempo y una vez obtenidas las colonias transformadas se eligieron 10-20 colonias para su purificación y crecimiento para mantenimiento esto se hará nuevamente utilizando medio de cultivo YPD con zeocina en cajas Petri.

5.11.- Expresión del fragmento 6009F en la cepa de *P. pastoris*.

Se seleccionaron colonias puras de *Pichia pastoris*, cada una se inoculará en 50 mL de BMGY en un matraz estéril de 250 mL se incubaron a 26 y 28 °C en agitación constante (250-300) rpm durante aproximadamente 16-8 horas hasta que el cultivo alcanzó una DO_{600} = 2-6, posteriormente se realizó una centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en medio BMMY para inducir la expresión (100-200 mL), el cultivo resuspendido se

transfirió a un matraz de 250 mL, se incubó a una temperatura de 28-30°C; se agregó metanol a una concentración final de 0.5% cada 24 horas para mantener la inducción durante por lo menos los primeros 3 días de crecimiento. Se tomaron muestras de 1 mL antes y después de agregar metanol, estas muestras sirvieron como referencia para observar el periodo de tiempo óptimo de la expresión del fragmento de interés después de la inducción por metanol.

5.12.-Purificación del anticuerpo scFv 6009F.

El cultivo para el caso del plásmido pPICZA de expresión intracelular será sometido al rompimiento celular por medio de un buffer de ruptura celular (para el caso del plásmido pPICZA α este paso se omitió debido a que el plásmido es de expresión extracelular), una vez obtenido este cultivo se sometió a una diálisis mediante una membrana de nitrocelulosa y se mantuvo en un buffer PBS durante toda la noche a una temperatura de 4°C, el buffer PBS se cambió constantemente para mejorar la purificación.

Una vez transcurrido el tiempo de diálisis la muestra fue sometida a la purificación por columna de afinidad Ni⁺²-NTA, pasando la muestra de forma lenta, posteriormente una vez que toda la muestra atravesó la columna de afinidad se utilizaron diferentes concentraciones de imidazol (25mM, 250mM) para la obtención de la proteína.

Los sedimentos celulares se analizaron por medio de SDS- PAGE y western blot donde se utilizó un anticuerpo anti- His.

También se utilizara el método de Bradford para la cuantificación de la proteína total y purificada.

5.13.- Verificación del reconocimiento de la toxina Cn2 frente al scFv6009F.

Se incubara en placas de ELISA poliestireno de alta unión, esas placas serán recubiertas durante toda la noche con 0.3 μ g de la toxina Cn2 en un tampón de bicarbonato 50 mM pH 9,4 a 4°C, las placas serán lavadas tres veces con NaCl / Pi y 0.1% (v / v) Tween, y se agregara 0,5% (p / v) de bloqueador BSA en NaCl / Pi durante 2 horas a 37°C. Posteriormente se agregara el anticuerpo 6009F purificado

anteriormente a cada posillo de la placa y se incubara durante 1 hora a 37°C, una vez transcurrido el tiempo de incubación se lavaran las placas y el anticuerpo será detectado para su verificación por el anticuerpo anti c-myc. Las placas se leerán a 492 nm en un lector de ELISA, las clonas que se unirán a Cn2 con valores de absorbancia > 2 se consideraran positivos y serán enviados para su secuenciación.

6.-Resultados

6.1.-Mantenimiento y purificación del plásmido pSyn 1, pPICZA y pPICZA α

Después de la transformación de las células quimio competentes Top10F con cada uno de los plásmidos se pudo observar el crecimiento adecuado de las colonias.

Figuras 5.

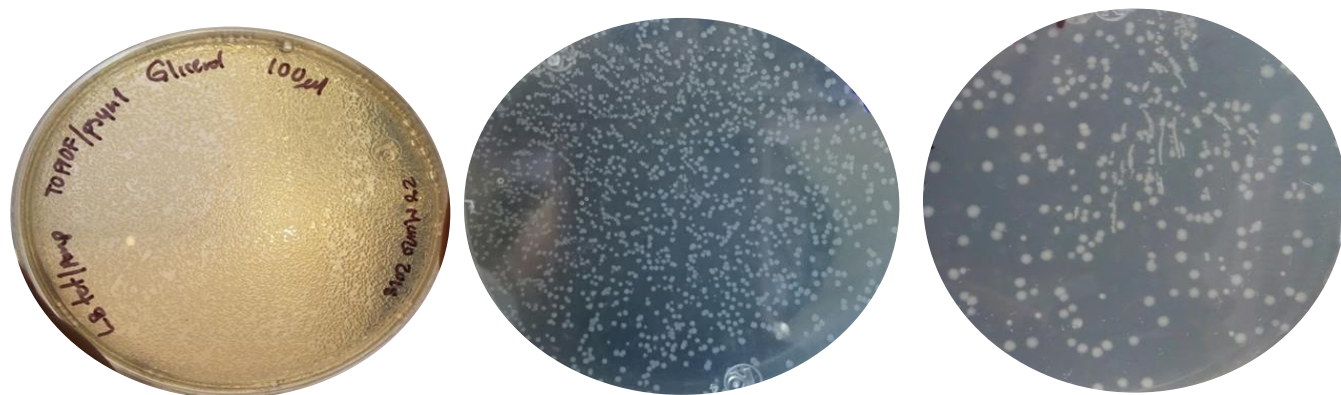


Figura 5. Cultivo de *E. coli* TOP 10F en LB agar con el de plásmido A) pSyn1, B) plasmido pPICZA y C) pPICZA α

6.2.- Purificación de los plásmidos pSyn1, pPICZA y pPICZA α

La purificación de pSyn1/scFv 6009F se muestra en la **Figura 6**, el control de los pesos moleculares fue el marcador de 1KB que se muestra en el carril 5. En los carriles 2, 3 y 4 se puede observar: a) La banda correspondiente al plásmido pSyn1 de un P.M. de 3750 pb, b) Las bandas de arriba de un P.M. de 3750 que son el DNA

súper enrollado y por debajo de éste P.M. las bandas corresponden al DNA en su forma relajada. En la **Figura 7**, Se observa en el carril 1 el marcador de peso molecular de 1KB, y en los carriles 2 y 3 la banda de 3300 pb que corresponde al P.M. del plásmido pPICZA. En la **Figura 8** En el carril 1 se observa el marcador molecular de 1 KB, y en los carriles 2, 3 y 4 la banda de 3600pb que corresponde al P.M. del plásmido pPICZA α .

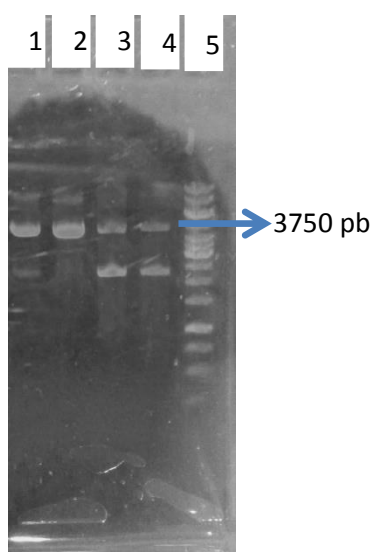


Figura 6. Purificación del plásmido pSyn1.

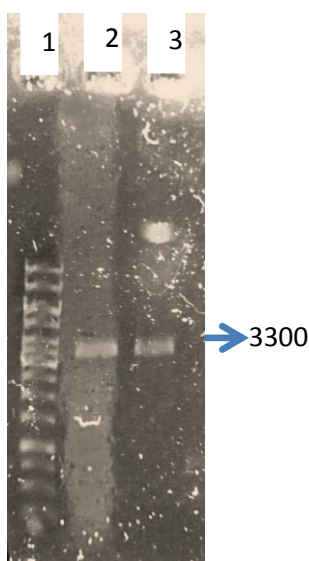


Figura 7. Purificación del plásmido pPICZA

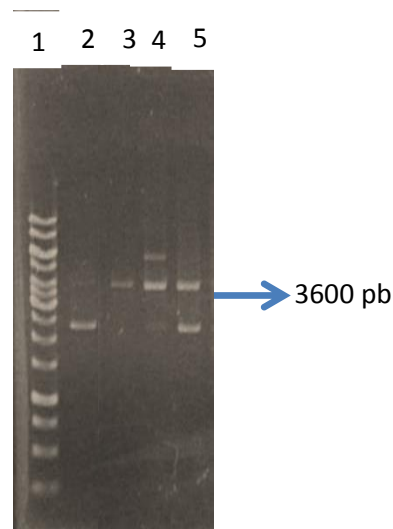


Figura 8. Purificación del plásmido pPICZA α

6.3.- Amplificación del gen scFv 6009F con oligos para inserción en pPICZA para *P. pastoris* X-33.

Una vez amplificado el gen scFv 6009 F del plásmido pSyn mediante PCR, con los oligos que contienen los sitios de restricción para las enzimas EcorI y Not I, además del sitio Kozak, se corrió un gel de agarosa al 0.8% para observar el producto de amplificación una banda de 747 pb correspondiente al gen scFv 6009F. En la **Figura 9** se puede observar en el carril 1 el marcador de 1 KB y en los carriles 2, 3, y 4 la banda esperada de 747 pb.

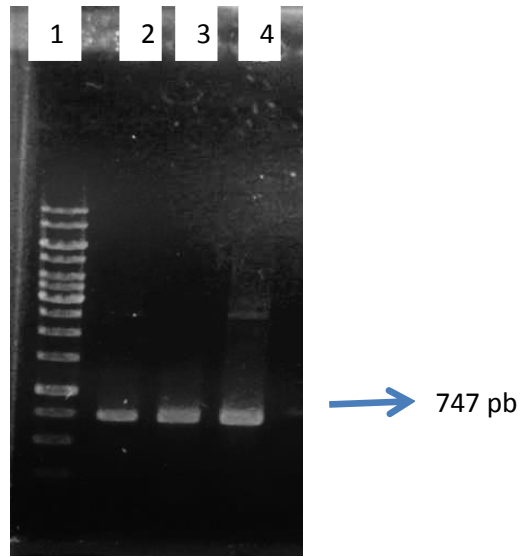


Figura 9.- Gel de agarosa al 0.8 % que muestra la amplificación del gen scFv 6009F.

6.4.- Amplificación del fragmento scFv 6009F para clonarlo en el plásmido pPICZA α para *P. pastoris* X33

De igual forma una vez amplificado el fragmento de interés scFv 6009F mediante PCR con los oligos forward que no contiene el sitio Kozak a diferencia del experimento anterior pero si el mismo oligo Reverse. Se corrió un gel de agarosa al 0.8% y se observó una banda de 738 pb que corresponde a la amplificación del fragmento scFv 6009F. En **Figura 12**, se puede observar en el carril 1 el marcador de 1 KB y en los carriles 2, 3, 4 y 5 la banda esperada de 738 pb.

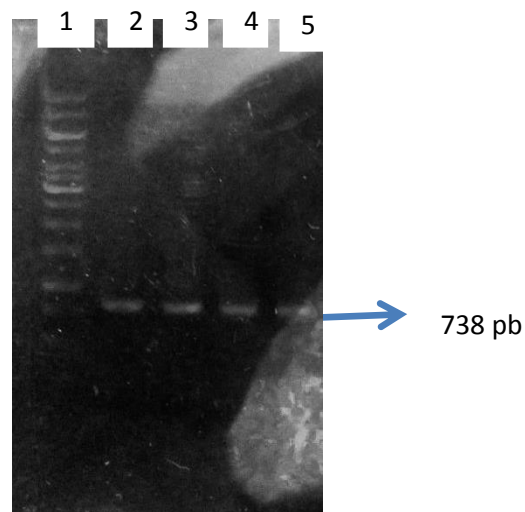


Figura 10.- Gel de agarosa mostrando la amplificación del gen scFv 6009F.

6.5.- Ligación del plásmido pPICZA+ inserto 6009F y pPICZA α + 6009F

Se muestra el crecimiento de las colonias de *E. coli* TOP 10 F transformadas con el plásmido pPICZA y pPICZA α que contiene el gen scFv 6009F. Dicha transformación se realizó a dos diferentes concentraciones Inserto: Plásmido: **A.** 5:1. **B.** 7:1 y **C.** 1:1 Control cepa sin transformar.

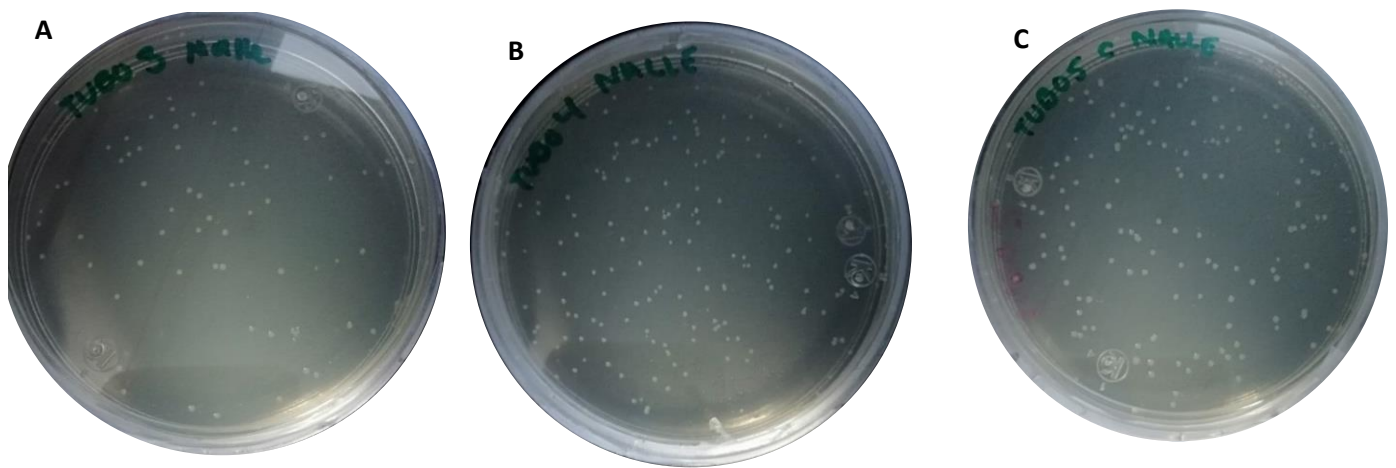


Figura 11.- Colonias de *E. coli* TOP 10F obtenidas a diferentes proporciones inserto: vector: a) 5:1, b) 7:1 y c) el control

Una vez obtenidas las colonias transformadas, se les realizó un PCR de colonia empleando los oligos AOX5' y AOX3' para amplificar el gen scFv 6009F. Se corrió un gel de agarosa 0.8%, en el carril 1 el marcador de 1 KB como control, en los carriles 2, 3 y 8 se observa una banda de aproximadamente 1100 pb correspondiente a la amplificación del promotor AOX y el gen scFv 6009F, mientras que en los carriles 4, 5, 6 y 7 se observan bandas de 385 pb que corresponden a la amplificación sin el scFv 6009F **Figura 13**. Esto quiere decir que las clonas positivas corresponden a las muestras de los carriles 2, 3 y 8 mismas que se enviaron a secuenciar.

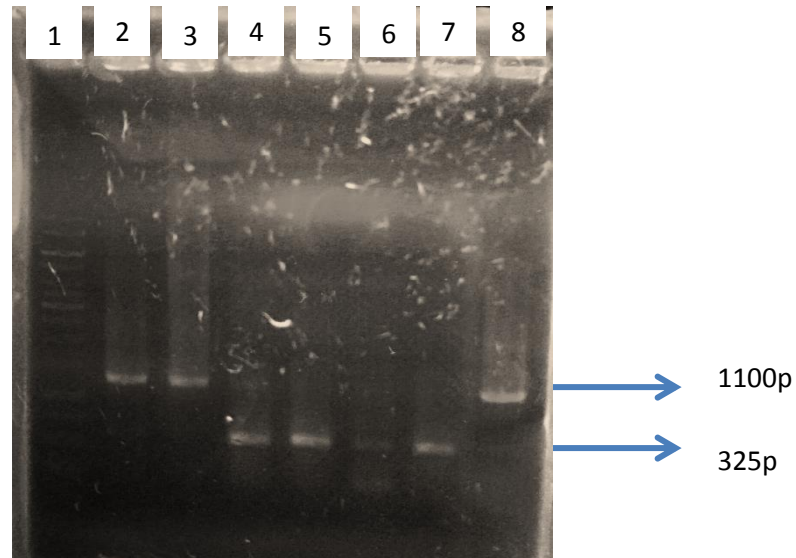


Figura 12, Gel que muestra el producto de PCR de colonia con la construcción pPICZA+6009F

Se realizó la misma metodología para el caso de la ligación pPICZA α +6009F donde se observan bandas positivas de 1100 pb en los carriles 4 y 5 mientras que en los carriles 2, 3, 6, 7 y 8 las bandas tienen un peso de 588 pb que correspondientes al plásmido vacío por tanto son clonas negativas (Figura 13).

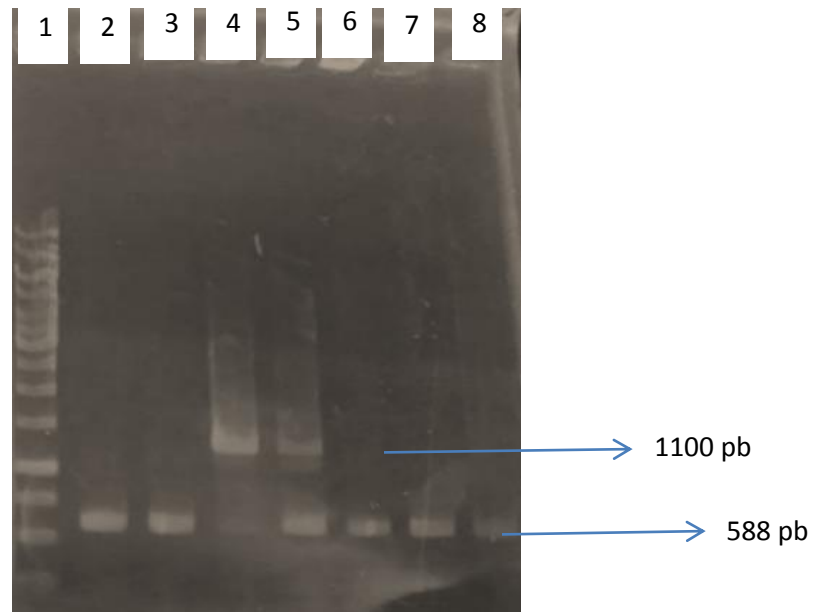


Figura 13.- PCR de colonia de las colonias con la construcción pPICZA α +6009F

6.7.- Purificación de los plásmidos con las construcciones pPICZA y pPICZA α

Las colonias positivas de cada una de las construcciones se cultivaron en agar LB, una vez crecidas se tomó una asada de células que se pasaron a tubos de 5 mL con medio LB, se resembró cada colonia por separado y se dejaron incubar toda la noche a 37°C. Empleando el kit de purificación de plásmido Thermo Scientific geneJet plasmid miniprep kit se purificó el plásmido y se corrió un gel de agarosa al 0.8%. En el gel se pudo observar el marcador de 1 KB en el carril uno, en los carriles 2, 3, 4 una banda de peso molecular de 4038pb que corresponde al peso de la construcción del plásmido pPICZA /scFv6009F, en el carril 5 se observa el vector pPICZA vacío como control negativo (**Figura14**).

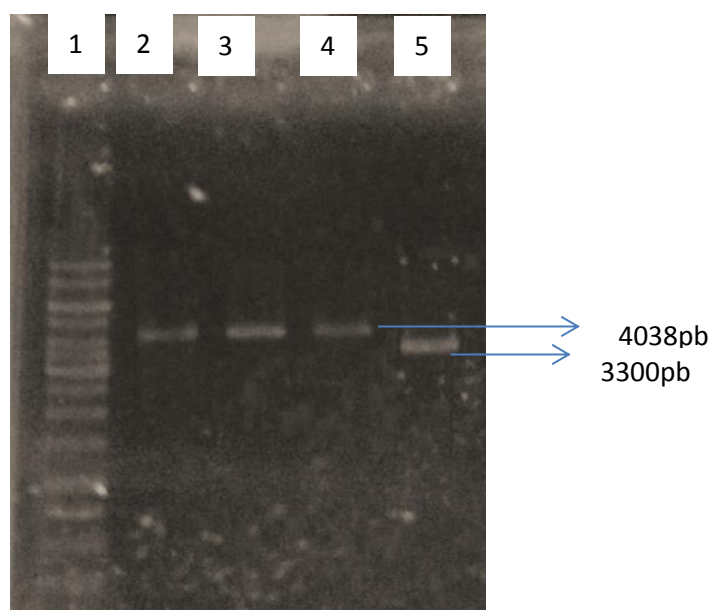


Figura 5.- Purificación de plásmido con la construcción pPICZA+6009F

6.8.- Doble digestion de las clonas con la construcción pPICZA/scFv 6009F y pPICZA α /scFv 6009F.

A las clonas positivas se les realizó una doble digestión con la finalidad de comprobar que tuvieran el plásmido con el gen scFv 6009 F, es decir, la construcción correcta. En la **Figura 15** se puede observar en el carril 1 el control positivo de PM 1 KB, en los carriles 2, 3 y 4 dos bandas, una de 3300 pb que corresponde al plásmido

pPICZA y otra banda de menor tamaño es decir de 747 pb que correspondiente al peso del fragmento scFv 6009 F. En la **Figura 16** se observa el control en el carril 1 de 1 KB, en los carriles 2, 3, 4 y 5 una banda de 3600 pb que correspondiente al plásmido pPICZA α y otra banda inferior correspondiente al fragmento scFv 6009 F. Lo que indica que las clonas de *E. coli* TOP 10F seleccionadas contienen el plásmido con la construcción deseada y son positivas.

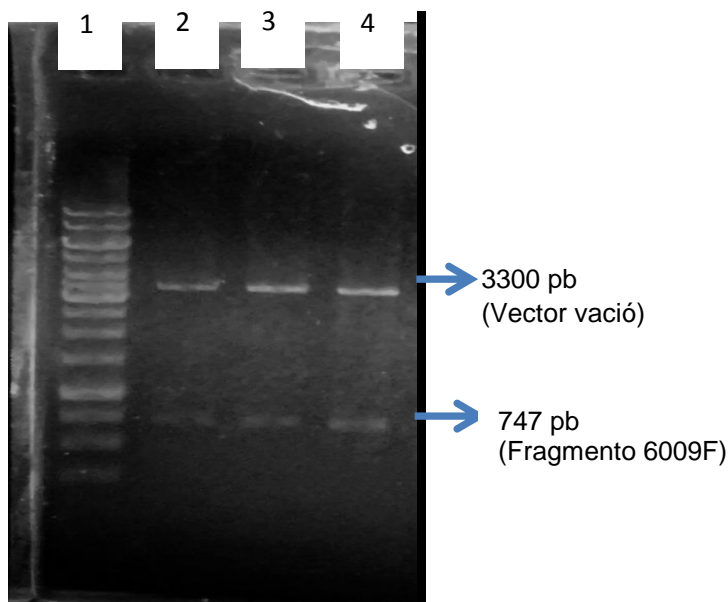


Figura 6.-Doble digestión de pPICZA+6009F

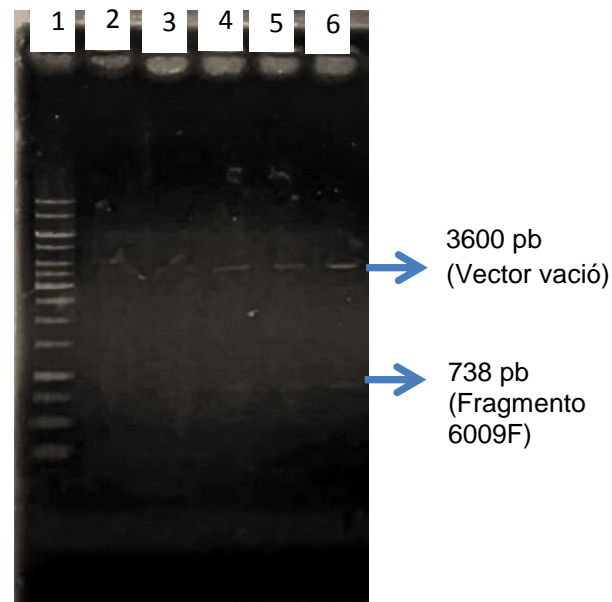


Figura 16.- Doble digestión de pPICZA α +6009F

Una vez confirmadas ambas construcciones, se procedió a purificar los plásmidos correspondientes empleando el kit de purificación GeneJet. En seguida se cuantificaron las muestras obtenidas mediante nanodrop, se mandaron a secuenciar 4 clonas en total, dos clonas con la construcción del plásmido pPICZA y dos con la construcción pPIZA α a la unidad de secuenciamiento de IBT-UNAM,

Tabla 16.- concentraciones de las construcciones de los plásmidos pPICZA y pPICZA α

Clona	Concentración	Volumen final
1 pPICZA	70.3 ng/ μ l	7.11 μ l
2 pPICZA α	50.6 ng/ μ l	9.88 μ l

6.9.- Alineamiento de las secuencias obtenidas con la construcción pPICZA+6009F y pPICZA α +6009F.

Una vez obtenidas las secuencias se procedió a realizar alineamientos mediante la realización de Blast utilizando la herramienta de datos del NCBI. Se obtuvo que la clona 1 presento un 100% de identidad con la secuencia del fragmento de interés scFv 6009F, mientras que las otras dos clonas positivas presentaron cambios en la mitad de la secuencia de aminoácidos donde cambio una alanina por una timina y una arginina por una glicina, y tres cambios de aminoácidos más al final de la secuencia donde cambio isoleucina por aspartato, lisina por glutamina y arginina por timina. Estos cambios podrían afectar para el reconocimiento de la toxina Cn2 o bien para el correcto plegamiento de la proteína, por lo cual solo se transformó *P. pastoris* X-33 utilizando el plásmido pPICZA+6009F con la secuencia correcta que no presento ningún cambio en la secuencia y que tiene 100% de homología con el gen scFv 6009F depositado en el Genbank. Del mismo modo ocurrió con el plasmido pPICZA α +6009F, de las clonas obtenidas solo una presento el 100% de identidad con respecto el gen scFv 6009F depositado en el Genbank. En la Figura 13 se puede observar el resultado que arrojo el alineamiento que se realizó con las secuencias de las clonas positivas que no presentaron ningún cambio.

single chain Fv antibody 6009F, partial [synthetic construct]

Sequence ID: [AAX11169.1](#) Length: 240 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 240 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
484 bits(1246)	7e-172	Compositional matrix adjust.	240/240(100%)	240/240(100%)	0/240(0%)
Query 3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFDNYAMHWIRQVPGEGLWVSGISRGSIGY			62	
Sbjct 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFDNYAMHWIRQVPGEGLWVSGISRGSIGY			60	
Query 63	ADSVKGRFTISRDDAKKSLQLQMNSLRAEDTAVYYCARGGFGSFDTWGGQTMVTVSSGGG			122	
Sbjct 61	ADSVKGRFTISRDDAKKSLQLQMNSLRAEDTAVYYCARGGFGSFDTWGGQTMVTVSSGGG			120	
Query 123	GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSVSPGERAILSCRASQSVRSFLAWYQQKPGQAPRLLI			182	
Sbjct 121	GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSVSPGERAILSCRASQSVRSFLAWYQQKPGQAPRLLI			180	
Query 183	SDASNRTGIPARFTGGGSGTDFTLTISSLEPEDFAIYYCQYRYSPTFGQGTKVEIKR			242	
Sbjct 181	SDASNRTGIPARFTGGGSGTDFTLTISSLEPEDFAIYYCQYRYSPTFGQGTKVEIKR			240	

Figura 7.- Resultado del Blast realizado con las secuencias de ambos plásmidos pPICZA+6009F y pPICZA α +6009F

6.10.- Transformación de la cepa a *Pichia pastoris* X-33.

Una vez obtenidas las clonas positivas se crecieron en medio LB suplementado con antibiótico zeocina, posteriormente se purificaron ambos plásmidos con las dos diferentes construcciones mediante el kit GeneJet. Una vez purificado el plásmido se cuantifico y se realizó una linealización utilizando la enzima *Sac1* para llevar a cabo la integración del plásmido al genoma de *P. pastoris*. Para la transformación se utilizaron células electrocompetentes de la cepa X-33 como se indica en el **Anexo 2**. Posteriormente se tomaron 15 colonias al azar y se realizó PCR de colonia para corroborar la integración del plásmido al genoma de *P. pastoris*. El gel de agarosa de la **Figura 18** muestra el marcador de PM 1 KB en el carril 1, en el 2 una colonia negativa, y en los carriles 3, 4, 5 y 6 colonias positivas con una banda de 1100pb que corresponden al gen scFv 6009F con AOX3' y 5' del plásmido pPICZA α . En la **Figura 19** se observó el marcador de P.M. de 1KB en el carril 1, en el dos un control negativo de tal forma que no observamos ninguna banda, en el carril 3 un control positivo una clona con la integración del fragmento 6009F confirmada, en los carriles 3 y 4 colonias vacías, y en los carriles 5, 6 y 7 clonas positivas con las bandas esperadas correspondientes al peso del fragmento de 1100 pb.

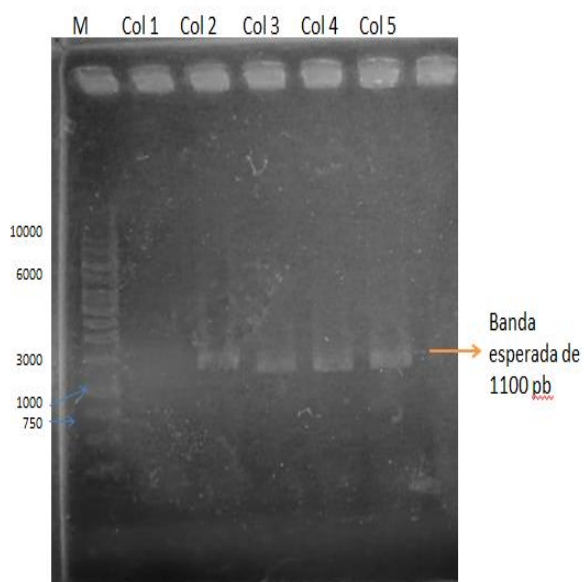


Figura 88.-Clonas positivas de cepa X-33+pPICZA α

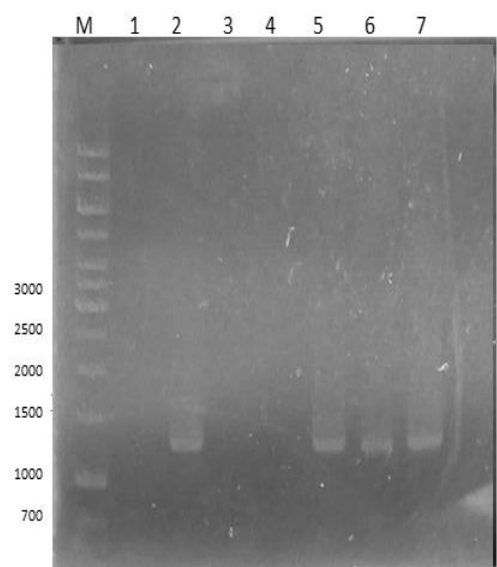


Figura 99.- Clonas positivas de cepa X-33+pPICZA

6.11.-Expresion de la cepa de levadura X-33+ 6009F en reactor.

Una vez obtenidas las clonas con cada uno de los plásmidos integrados al genoma de levadura X-33 se procedió a realizar la expresión del anticuerpo scFv 6009F. En medio base con glicerol en un reactor de 1000mL. Usando un inóculo de 100mL previamente cultivado en matraz con antibiótico zeocina, se incubo a 28°C con agitación a 180 rpm. El cultivo se indujo con 1% de metanol cada 24 horas. Los sobrenadantes del cultivo a diferentes tiempos se pueden observar en la **Figura 20**. En los tiempos 72 y 96 horas se observa la producción de proteína scFv 6009F con una banda correspondiente a 28kD.

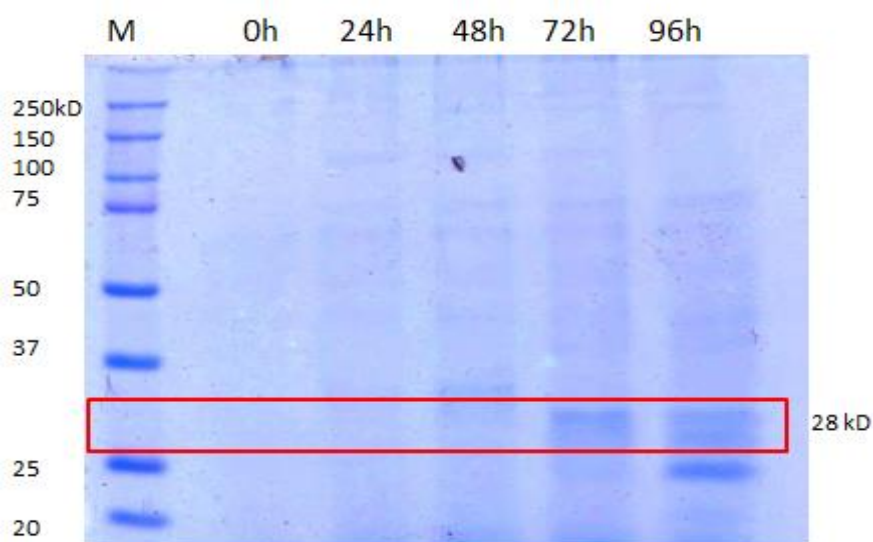


Figura 10.- GEL SDS PAGE que muestra la expresión en reactor de la clona con el plásmido pPICZA α

6.12.- Expresion de la cepa de levadura X-33+pPICZA α scFv 6009F en matraz.

Para expresion en matraz se utilizaron matraces de 500 ml con 50 ml de medio base con YNB y glicerol, usando la construcción en *P. pastoris* X-33 pPICZA α + scFv 6009F, se partió de una asada de un inóculo de agar YPD. El crecimiento se indujo con 1% de metanol cada 24 horas hasta 96 horas incubado a 28, 30 y 26°C a 180 rpm. Se tomaron muestras cada 24 horas. Las muestras se procesaron centrifugando y dializando en buffer PBS a 4° C usando una membrana de nitrocelulosa con lavados constantes. La muestra se purifico mediante una columna de afinidad a niquel Ni²⁺ -NTA dando tiempo a su retención en la columna, se utilizaron dos

diferentes concentraciones de Imidazol 25mM y 250 mM para desprender la proteína de la columna.

En el gel de SDS-PAGE de la **Figura 21**, se puede observar el marcador de peso molecular en el primer carril, posteriormente se observan las muestras de las diferentes horas de incubación 24, 48, 72 y 96 horas en los tres últimos carriles se puede observar la banda de 28 KDa que corresponde al scFv 6009F de tal manera que podemos observar que la expresión de la proteína de interés comienza a las 48 horas de inducción.

Las muestras de 48, 72 y 96 horas se dializaron y se pasaron por columna de afinidad a níquel y se procedió a la recuperación de la proteína con eluciones de imidazol como se menciona en materiales y métodos, sin embargo no se observó ninguna banda en las eluciones de imidazol, de tal manera se deduce que la proteína no se pega a la columna. Se corrieron geles de SDS-PAGE al 12% con las muestras de las eluciones con imidazol y no se observó ninguna banda (geles no mostrados).

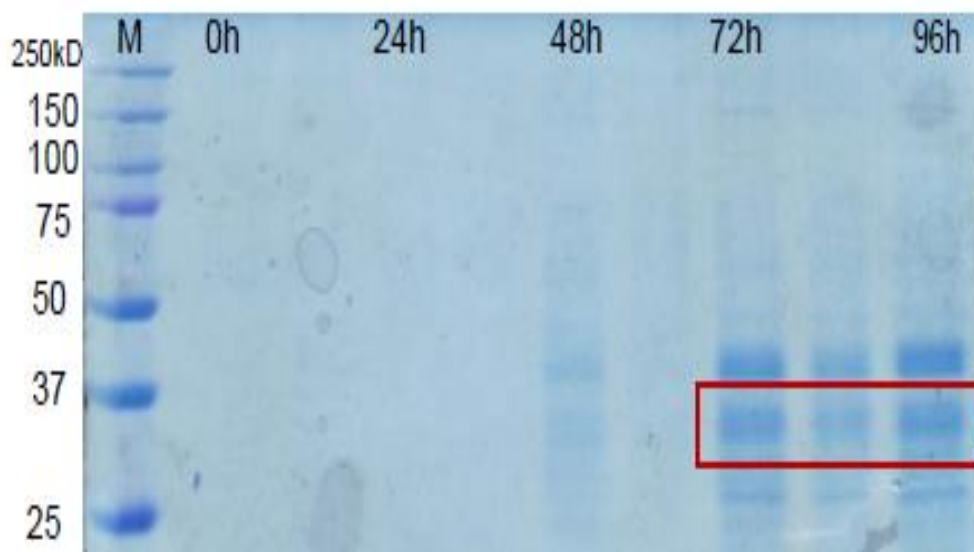


Figura 21 .- Expresión en matraz de la clona con el plásmido pPICZAα incubada a 28 °C

En el caso de la expresión incubada a los 26 °C en la Figura 22 se puede observar las muestras de las diferentes horas de incubación donde el primer carril

corresponde al marcador de peso, el carril 2 es la muestra de la hora 0 es decir aun sin induccion por metanol, en los carriles 2 y 3 pertenecen a las muestras obtenidas a las 24 horas de induccion, los carriles 4 y 5 corresponden a la muestra de las 48 h, en los carriles 6 y 7 corresponden a las muestras de la hora 72, y los carriles 8 y 9 corresponden a las muestras de la hora 96.

Podemos observar (**Fig 22**) que se obtuvieron bandas correspondientes al peso de nuestra proteina de interes (28KD) a partir de las muestras de 24, sin embargo en los carriles 2 y 3 que pertenecen a las muestras de las 24 horas de incubacion se puede observar que la banda de interes se encuentra ubicada un poco mas arriba que las muestras observadas en las horas posteriores, esta banda nos podria indicar una probable glicosilacion en la proteina a las 24 horas de induccion. estas muestras fueron dializadas y purificadas como se indica en los materiales y metodos.

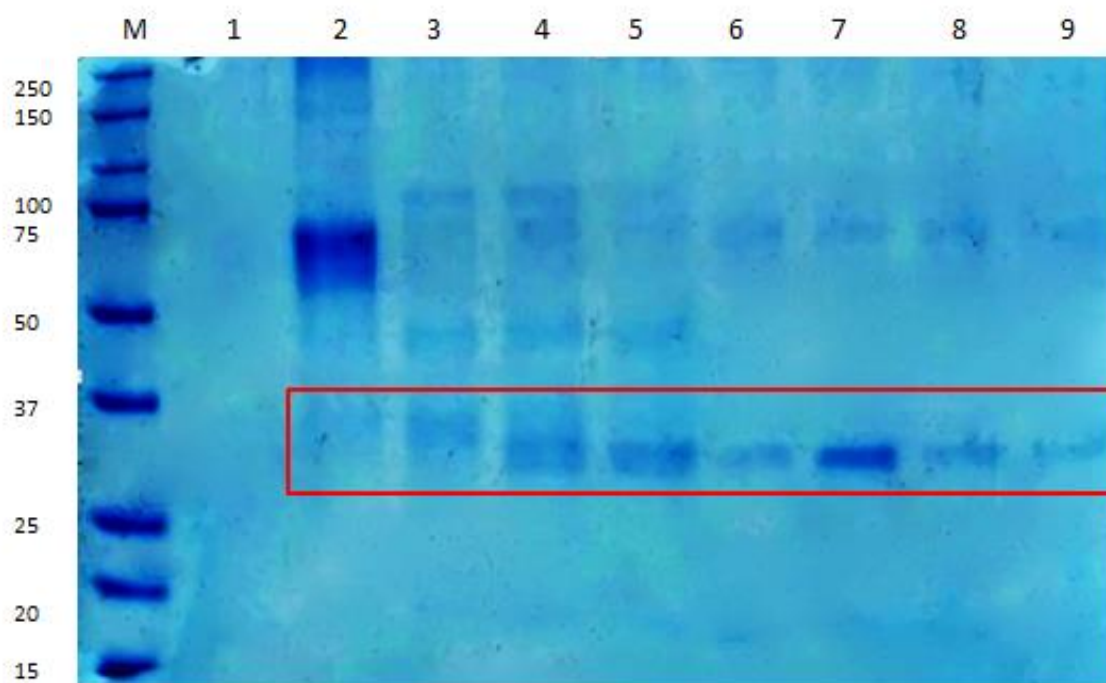


Figura 22 1 Expresión en matraz de la clona con el plásmido pPICZA α incubada a 26 °C

En la **Figura 25** podemos observar la expresión del fragmento scFv 6009F en la cepa x-33 con el plásmido de expresión intracelular pPICZA donde el carril 1

corresponde al marcador de peso molecular, carril 2 muestra antes de inducción, carril 3 y 4 muestra de la expresión a las 24 horas, carril 5 expresión 48 horas, carril 6 y 7 expresión 72 horas y carril 8 expresión 96 horas. Donde se observa la banda de interés a partir de las 24 horas. Estas muestras se pasaron por la columna de afinidad a níquel y la posterior recuperación con imidazol sin embargo no se observó la recuperación de la proteína en los geles de SDS-PAGE (geles no mostrados)

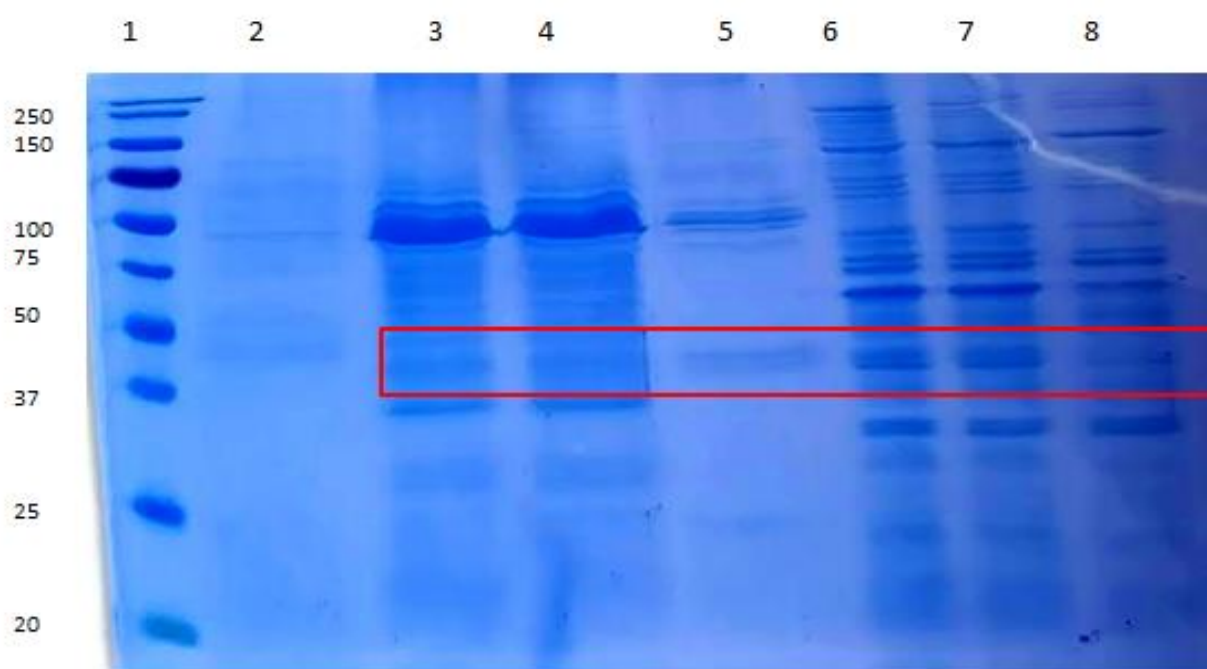


Figura 25 1 Muestras lisadas de la expresión de la cepa x-33 con el plásmido pPICZA

Una vez que se pasaron las muestras por la columna de afinidad a níquel pudimos observar la obtención de la proteína purificada de las muestras obtenidas a las 24 horas (**Fig. 23**). Mientras que para las muestras de 48, 72 y 96 horas no se pegaron a la columna de afinidad (gel no mostrado) por lo que se pudiera pensar que la diferencia entre el peso de la banda obtenida a las 24 horas comparada con las demás se debe a que probablemente a las 24 horas la proteína se encuentra en el sobrenadante con la cola de histidinas de tal manera que por eso podemos purificarla en ese momento de la expresión, mientras que conforme el tiempo de inducción pasa

se pierde la cola de histidinas probablemente a que durante el proceso de la expresión se active alguna proteasa que la corta.

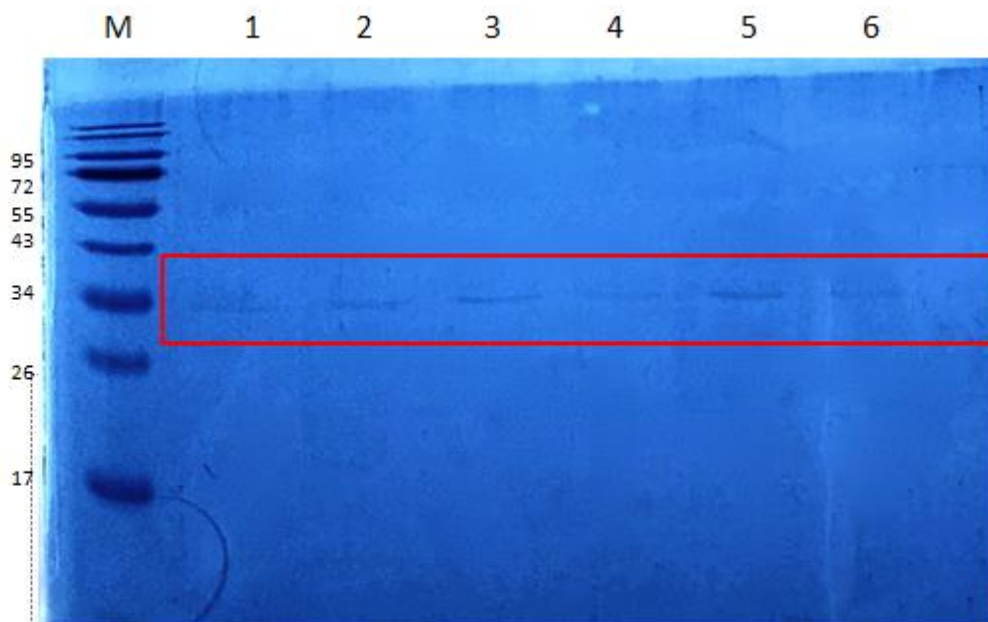


Figura 23 1 Eluciones de Imidazol 250 mM de las muestras de 24 horas de inducción.

6.13.- Western blot

Los resultados de un Western Blot revelando la proteína con la cola de 6 His+ con un anticuerpo Anti-His se muestran en la **figura 24** donde se observa:

1. Marcador de peso molecular
2. *P. pastoris* X-33 a las 0 horas (sin inducción)
3. Expresión a las 24 horas X-33 (sobrenadante)
4. Expresión a las 48 horas X-33 (sobrenadante)
5. Expresión a las 72 horas X-33 (sobrenadante)
6. Control proteína purificada de GS115
7. Purificación de la proteína obtenida de la expresión a las 24 horas.
8. Expresión a las 96 horas X-33



Figura 24 1 Western blot con diferentes muestras de clonas con el gen scFv6009F

El fragmento scFv 6009F pudo ser reconocido por el anticuerpo anti histidinas por Western blot, lo que podría indicar por un lado, que a las 24 horas en la cepa de X-33 con el plásmido de expresión extracelular pPICA α expresa el fragmento 6009F con la cola de histidinas, sin embargo después de las 24 horas de expresión existe probablemente degradación por proteasas de la cola de histidinas ya que la proteína scFv 6009F si se ve en geles de SDS PAGE ligeramente por debajo del peso esperado.

Por otro lado, algo que se aprecia en el Western blot es que la proteína scFv 6009F expresada en *P. pastoris* GS115 con plásmidos para su expresión extracelular y utilizada como control si está siendo reconocida por el anticuerpo anti-His, pero con una ligera variación en P.M., de tal manera que pudiera estar glicosilada y la proteína expresada en X-33 se reconoce en el mismo peso que el control de tal forma que también pudiera estar glicosilada, por lo que el peso molecular deberá ser determinado por masas.

7.-Discussion

En este trabajo se presenta la cepa de levadura X-33 como herramienta para la expresión de la proteína heteróloga scFv 6009F que es capaz de reconocer al veneno completo y a la toxina Cn2 del alacrán *Centruroides noxius*.

Se lograron obtener dos construcciones para ser utilizadas con la cepa X-33, la primera con el plásmido pPICZA/6009F de expresión intracelular y la segunda con el plásmido pPICZA α /6009F de expresión extracelular, de tal modo que se utilizaron dichos plásmidos para transformar la cepa de levadura X-33 y de esta manera integrar el gen de interés al genoma de levadura para poder llevar a cabo la expresión de la proteína de interés scFv 6009F.

La cepa de levadura transformada con el plásmido pPICZA α es capaz de expresar la proteína de interés en matraz y en reactor, ya que en geles de SDS-PAGE utilizando las muestras obtenidas de las diferentes horas de expresión se puede observar la banda correspondiente al peso del fragmento scFv6009F (28KDa). Por otro lado una vez que se realiza la purificación de la proteína de las muestras obtenidas de la expresión incubada a 28°C utilizando una columna de afinidad a níquel se observa que en las muestras correspondientes a los lavados de PBS se presenta la banda correspondiente al peso del fragmento scFv 6009F, lo que nos indica que la proteína no se está pegando a la columna de afinidad a níquel. lo que pudiera indicar la pérdida de la cola de histidinas durante la expresión y específicamente a esta temperatura; al realizar el Western blot para la identificación de la proteína utilizando el anticuerpo anti-His no se logró reconocer la proteína, ni en la expresión en matraz, ni en reactor pero sí en los controles positivos. Estos resultados sugieren que pueda estar cortando la cola de histidinas debido a las proteasas localizadas en la vía secretora de la levadura, impidiendo la purificación por afinidad a níquel; por otro lado Zhang et al, en 2007 reporta que en levadura de *P. pastoris* las proteínas normalmente se pliegan y ensamblan en retículo endoplásmico, pero cuando se trata de proteínas heterólogas a veces se retienen en el citoplasma o en el retículo endoplásmico, causando una agregación de proteínas que desfavorece al plegamiento óptimo, de tal manera que la proteína heteróloga pudiera estar

degradando dentro del mecanismo secretor de la célula o bien se envíe mal plegada al citoplasma.

También se han reportado diversos factores que impiden o favorecen la expresión correcta de las proteínas o bien contribuyendo a que la cola de histidinas se pierda durante la expresión heteróloga en levadura *P. pastoris*, algunos factores reportados son: la optimización de la temperatura, la inducción producida por metanol, el pH, aireación del cultivo celular; por lo que resulta complejo estandarizar los parámetros adecuados para el resultado de las proteínas expresadas heterológicamente en levadura, además de que cada cepa de *P. pastoris* requiere de distintas condiciones para la expresión de proteínas, como reporta Ezzine *et al.*, 2012, donde obtiene la producción de proteína heteróloga disminuyendo la temperatura hasta los 17°C.

En este trabajo una vez disminuida la temperatura a los 26°C se pudo obtener la purificación de la proteína de interés 6009F, de tal manera que para esta cepa C-33 con el plasmio de expresión extracelular pPICA α favoreció para la expresión de la proteína.

En este momento se está expresando el anticuerpo para obtener una mayor producción y generar un anticuerpo específico para scFv 6009F en conejo, de tal manera que no se requiera el anticuerpo de Histidinas o el Cmyc para detectarla en el Western blot.

8.-Conclusiones y perspectivas.

Se obtuvieron las dos construcciones en los plásmidos pPICZA y pPICZA α cada uno con el gen scFv 6009F.

Se obtuvieron las secuencias con homología de 100% de identidad con respecto al fragmento de interés 6009F para poder integrarse al genoma de *P. pastoris*.

Se llevó a cabo la expresión en matraz a dos diferentes temperaturas de incubación 26 y 28 °C y en reactor 28°C de la cepa X-33/6009F.

Se obtuvo la purificación de la proteína con el plásmido de expresión extracelular incubada a una temperatura de 26 °C.

Se encuentra en proceso la generación de un anticuerpo específico para scFv 6009F en conejo, de tal manera que no se requiera el anticuerpo de Histidinas o el Cmyc para detectarla en el Western blot.

9.- Anexos

9.1.-Secuencia del fragmento 6009F

AGGGGGAGGAAAAGAGATCGAATCTTCTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAG
GTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGGCTCTGGATTACCTTTGATAATTATGCCATGCATTGGAT
ACGCCAAGTTCCAGGGGAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTCGGGGCA
GTGGTGACATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAG
ACGACGCCAAGAAGTCCCTGTCTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGGTTCGGAAGTTTTGATACCTGGGG
CCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCTGGAGGTGGCGGATCAGGAGGCGGAG
GTTCTGGTGGAGGTGGGAGTGAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCTGCCACCCTGT
CTGTGTCTCCCGGGGAAAGAGCCATCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTA
GGAGCTTCTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGGCAGGCTCCCAGGCTCCTCA
TCTCTGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCGGT
GGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTT
GCAATTTATTACTGTCAGCAGTATCGTTACTCACCTCGGACGTTCGGCCAAGGG
ACCAAGGTGGAGATCAAACGTGCGGCCGCAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAG
GATCTGAATGGGGCCGCACATCACCATCATCACCATTAATAAGAATTCACTGGCC
GTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGC
CTTGACAGCACATCCCCCCTTTGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCCGC
ACCGGATCGCCCTTTCCCAACAGTTTGCGCCAGCCCTGAAATGGGCGAAATGG
GCCGCCCTGAATGGCGGGTATTTTTTCTCCCTTAACGGCAATCCTGGGTGGCGG
GTATTTCCACACCCCGCATAACGGTCAAAAGGCAAACCATTAAGGTTAACCGGC
GCGCGCCCCTGTGTTTTTACCGGGGGCGC.

9.2.- Preparación de células quimio competentes.

Se crece un cultivo de células toda la noche a 37°C en LB sin antibiótico. Posteriormente se inoculan tubos con 10mL medio de cultivo LB nuevo y se agrega 1mL de cultivo anterior y se deja crecer a una temperatura de 37 °C hasta obtener una D.O. de 0.8.

Se centrifugan las células a 1400 rpm durante dos a tres minutos. Se resuspende el botón celular en $\text{Cl}_2\text{Ca}+2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 M con un décimo de volumen de cultivo, vortexear hasta resuspender e incubar durante 2 horas en hielo.

Después centrifugar durante dos minutos a 1400rpm y resuspende el botón celular en $\text{Cl}_2\text{Ca}+2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 M nuevamente con un décimo del volumen del cultivo.

Se agrega 88µl de DMSO esteril por cada mililitro de células y se hacen alícuotas de 100 µl por vial en tubos eppendorf de 1.5mL.

8.-Bibliografía

Alvarenga, L. M., Zahid, M., Tommaso, A. D., Juste, M. O., Aubrey, N., Billiald, P., & Muzard, J. (2014). Engineering venom's toxin-neutralizing antibody fragments and its therapeutic potential. *Toxins*, 6(8), 2541-2567.

Amaro, I., Riaño-Umbarila, L., Becerril, B., & Possani, L. D. (2011). Isolation and characterization of a human antibody fragment specific for Ts1 toxin from *Tityus serrulatus* scorpion. *Immunology letters*, 139(1-2), 73-79.

Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(12), 5301-5317.

Bermúdez, V. M. G., Zúñiga, R. M., & Aldama, P. C. (1999). Epidemiología y cuadro clínico del alacranismo. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, 8(5), 135-138.

Bermúdez, V. M. G., Zúñiga, R. M., & Aldama, P. C. (1999). Tratamiento del alacranismo y costos. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, 8(4), 113-117.

Bawaskar, H. S., & Bawaskar, P. H. (2012). Scorpion sting: update. *J Assoc Physicians India*, 60(1), 46-55.

Castro, J. M. A., Oliveira, T. S., Silveira, C. R. F., Caporrino, M. C., Rodriguez, D., Moura-da-Silva, A. M., ... & Faquim-Mauro, E. L. (2014). A neutralizing recombinant single chain antibody, scFv, against BaP1, A PI hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*, 87, 81-91.

Catterall, W. A., Cestèle, S., Yarov-Yarovoy, V., Frank, H. Y., Konoki, K., & Scheuer, T. (2007). Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, 49(2), 124-141

Celis, A., Gaxiola-Robles, R., Sevilla-Godínez, E., Valerio, M. D. J. O., & Armas, J. (2007). Tendencia de la mortalidad por picaduras de alacrán en México, 1979-2003. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 21(6), 373-380.

Cereghino, G. P. L., Cereghino, J. L., Ilgen, C., & Cregg, J. M. (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current opinion in biotechnology*, 13(4), 329-332.

Chippaux, J. P., & Goyffon, M. (2008). Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta tropica*, 107(2), 71-79.

Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J., & Higgins, D. R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular biotechnology*, 16(1), 23-52.

Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J. L., & Valero, F. (2006). Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microbial cell factories*, 5(1), 17

Daly, R., & Hearn, M. T. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of molecular recognition*, 18(2), 119-138.

Domingos Possani, L. (2005). El alacrán y su piquete.

Escalona, M. P., & Possani, L. D. (2013). Scorpion beta-toxins and voltage-gated sodium channels: interactions and effects. *Front Biosci*, 18, 572-587.

Fischer, R., Drossard, J., Emans, N., Commandeur, U., & Hellwig, S. (1999). Towards molecular farming in the future: *Pichia pastoris*-based production of single-chain antibody fragments. *Biotechnology and applied biochemistry*, 30(2), 117-120.

Gazarian, K. G., Gazarian, T., Hernández, R., & Possani, L. D. (2005). Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti-venom vaccines. *Vaccine*, 23(26), 3357-3368.

González-Santillán, E. (2004). Diversidad, taxonomía y hábitat de alacranes. *Instituto de Biología, UNAM. México, DF*, 25-35.

Hellwig, S., Emde, F., Raven, N. P., Henke, M., van der Logt, P., & Fischer, R. (2001). Analysis of single-chain antibody production in *Pichia pastoris* using on-line methanol control in fed-batch and mixed-feed fermentations. *Biotechnology and bioengineering*, 74(4), 344-352.

Hernández-Plata, E. (2012). Papel de los canales de sodio activados por voltaje en la capacidad metastásica de las células cancerosas. *Revista de Investigación Clínica*, 64(6), 567-575.

Jaramillo-Serna, R., & Ávila-Reyes, R. (2007). Dra. Rocío Isabel Camacho-Ramírez, Enf. M. Hilda Sánchez-Zapata1, Biólogo. *Archivos de Investigación Pediátrica de México*, 10(1), 22.

Jimenez-Vargas, J. M., Quintero-Hernández, V., Gonzalez-Morales, L., Ortiz, E., & Possani, L. D. (2017). Design and expression of recombinant toxins from Mexican scorpions of the genus *Centruroides* for production of antivenoms. *Toxicon*, 128, 5-14

Juarez-Gonzalez, V. R., Riano-Umbarila, L., Quintero-Hernandez, V., Olamendi-Portugal, T., Ortiz-Leon, M., Ortiz, E., ... & Becerril, B. (2005). Directed evolution, phage display and combination of evolved mutants: a strategy to recover the neutralization properties of the scFv version of BCF2 a neutralizing monoclonal

antibody specific to scorpion toxin Cn2. *Journal of molecular biology*, 346(5), 1287-1297.

Joosten, V., Lokman, C., van Den Hondel, C. A., & Punt, P. J. (2003). The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi. *Microbial cell factories*.

Laustsen, A. H., Gutiérrez, J. M., Knudsen, C., Johansen, K. H., Bermúdez-Méndez, E., Cerni, F. A., ... & Pus, U. (2018). Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development. *Toxicon*, 146, 151-175.

Lee, C. H., Lee, Y. C., Liang, M. H., Leu, S. J., Lin, L. T., Chiang, J. R., & Yang, Y. Y. (2016). Antibodies against Venom of the Snake *Deinagkistrodon acutus*. *Applied and environmental microbiology*, 82(1), 71-80.

Li, P., Anumanthan, A., Gao, X. G., Ilangoan, K., Suzara, V. V., Düzgüneş, N., & Renugopalakrishnan, V. (2007). Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 105-124.

Luján, B. B., UMBARILA, L. R., & POSTAY, L. D. P. (2014). Bancos de anticuerpos recombinantes de origen humano: una fuente ideal de antivenenos modernos contra la picadura de alacrán.

Mala, J., Puthong, S., Maekawa, H., Kaneko, Y., Palaga, T., Komolpis, K., & Sooksai, S. (2018). Expression and characterization of functional single-chain variable fragment against norfloxacin in *Pichia pastoris* GS115. *International Food Research Journal*, 25(4).

Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22(4), 249-270.

Malpiedi, L. P., Díaz, C. A., Nerli, B. B., & Pessoa Jr, A. (2013). Single-chain antibody fragments: Purification methodologies. *Process Biochemistry*, 48(8), 1242-1251.

Mousli, M., Devaux, C., Rochat, H., Goyffon, M., & Billiald, P. (1999). A recombinant single-chain antibody fragment that neutralizes toxin II from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*. *FEBS letters*, 442(2-3), 183-188.

Pessenda, G., Silva, L. C., Campos, L. B., Pacello, E. M., Pucca, M. B., Martinez, E. Z., & Barbosa, J. E. (2016). Human scFv antibodies (Afrbumabs) against Africanized bee venom: Advances in melittin recognition. *Toxicon*, 112, 59-67.

O'callaghan, J., O'brien, M., McClean, K., & Dobson, A. D. W. (2002). Optimisation of the expression of a *Trametes versicolor* laccase gene in *Pichia pastoris*. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(2), 55-59.

Possani, L. D., Merino, E., Corona, M., Bolivar, F., & Becerril, B. (2000). Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie*, 82(9-10), 861-868.

Palomera-Ávila, F. M., Pulido-Galaviz, C., & Pacifuentes-Orozcoc, A. (2016). Alacranismo severo causante de parálisis flácida aguda. Reporte de caso. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 54(2), 265-8

Pintar, A., Possani, L. D., & Delepierre, M. (1999). Solution structure of toxin 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann, a β -scorpion neurotoxin acting on sodium channels1. *Journal of molecular biology*, 287(2), 359-367.

Pucca, M. B., Zoccal, K. F., Roncolato, E. C., Bertolini, T. B., Campos, L. B., Cologna, C. T., ... & Barbosa, J. E. (2012). Serrumab: A human monoclonal antibody that counters the biochemical and immunological effects of *Tityus serrulatus* venom. *Journal of immunotoxicology*, 9(2), 173-183

Riaño-Umbarila, L., Contreras-Ferrat, G., Olamendi-Portugal, T., Morelos-Juárez, C., Corzo, G., Possani, L. D., & Becerril, B. (2011). Exploiting cross-reactivity to neutralize two different scorpion venoms with one single chain antibody fragment. *Journal of Biological Chemistry*, 286(8), 6143-6151.

Riaño-Umbarila, L., Ledezma-Candanoza, L. M., Serrano-Posada, H., Fernández-Taboada, G., Olamendi-Portugal, T., Rojas-Trejo, S. & Becerril, B. (2016). Optimal neutralization of *centruroides noxius* venom is understood through a structural complex between two antibody fragments and the cn2 toxin. *Journal of Biological Chemistry*, 291(4), 1619-1630.

Riaño-Umbarila, L., Juárez-González, V. R., Olamendi-Portugal, T., Ortiz-León, M., Possani, L. D., & Becerril, B. (2005). A strategy for the generation of specific human antibodies by directed evolution and phage display. *The FEBS journal*, 272(10), 2591-2601.

Riaño-Umbarila, L., Rodríguez-Rodríguez, E. R., Santibañez-López, C. E., Güereca, L., Uribe-Romero, S. J., Gómez-Ramírez, I. V. & Becerril, B. (2017). Updating knowledge on new medically important scorpion species in Mexico. *Toxicon*, 138, 130-137.

Rodríguez-Rodríguez, E. R., Olamendi-Portugal, T., Serrano-Posada, H., Arredondo-López, J. N., Gómez-Ramírez, I., Fernández-Taboada, G., & Becerril, B. (2016).

Broadening the neutralizing capacity of a family of antibody fragments against different toxins from Mexican scorpions. *Toxicon*, 119, 52-63.

Roncolato, E. C., Pucca, M. B., Funayama, J. C., Bertolini, T. B., Campos, L. B., & Barbosa, J. E. (2013). Human antibody fragments specific for Bothrops jararacussu venom reduce the toxicity of other Bothrops sp. venoms. *Journal of immunotoxicology*, 10(2), 160-168.

Roque, A. C. A., Lowe, C. R., & Taipa, M. Â. (2004). Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification. *Biotechnology progress*, 20(3), 639-654.

Saavedra, J. P., & Francke, O. F. (2014). Clave para la identificación de especies de alacranes del género Centruroides Marx 1890 (Scorpiones: Buthidae) en el Centro Occidente de México. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 15(1), 52-62.

Santos, M. S., Silva, C. G., Neto, B. S., Júnior, C. R. G., Lopes, V. H., Júnior, A. G. T., & Lima, M. A. (2016). Clinical and epidemiological aspects of scorpionism in the world: a systematic review. *Wilderness & environmental medicine*, 27(4), 504-518.

Serrano-Rivero, Y., Marrero-Domínguez, K., & Fando-Calzada, R. (2016). Pichia pastoris: una plataforma para la producción de proteínas heterólogas. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 47(2).

Silva, V. C., Peres, M. F., & Gattás, E. A. (2009). Application of methylotrophic yeast Pichia pastoris in the field of food industry—a review. *J. Food Agric. Environ*, 7, 268-273

Serrano-Rivero, Y., Marrero-Domínguez, K., & Fando-Calzada, R. (2016). Pichia pastoris: una plataforma para la producción de proteínas heterólogas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 47(2), 67-77.

Sørensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. *Journal of biotechnology*, 115(2), 113-128.

Tran, A. M., Nguyen, T. T., Nguyen, C. T., Huynh-Thi, X. M., Nguyen, C. T., Trinh, M. T., ... & Tran-Van, H. (2017). Pichia pastoris versus Saccharomyces cerevisiae: a case study on the recombinant production of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *BMC research notes*, 10(1), 148.

Verma, R., Boleti, E., & George, A. J. T. (1998). Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *Journal of immunological methods*, 216(1-2), 165-181.

Sørensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology*, 115(2), 113-128.

Verma, R., Boleti, E., & George, A. J. T. (1998). Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *Journal of immunological methods*, 216(1-2), 165-181.

Weidner, M., Taupp, M., & Hallam, S. J. (2010). Expression of recombinant proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (36).

Zavala, T., Díaz, J. G., Sánchez, J. T., Castillo, L., Ruiz, D., & Calderón, L. (2004). Picaduras por alacranes y arañas ponzoñasas de México. *Rev Fac Med UNAM*, 47(1), 6-12.



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a _____

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Gerardo Díaz Godínez

Tesis: COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO scFv
6009F EN *Pichia pastoris* X-33 UTILIZANDO LOS PLÁSMIDOS pPICZA α
Y pPICZA

Alumno que la presenta a revisión: **NALLELI GARCIA BELAUZARAN**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE


DRA. IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a _____

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Gerardo Díaz Godínez

Tesis: COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO scFv
6009F EN *Pichia pastoris* X-33 UTILIZANDO LOS PLÁSMIDOS pPICZA α
Y pPICZA

Alumno que la presenta a revisión: **NALLELI GARCIA BELAUZARAN**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE


DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a _____

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Gerardo Díaz Godínez

Tesis: COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO scFv
6009F EN *Pichia pastoris* X-33 UTILIZANDO LOS PLÁSMIDOS pPICZA α
Y pPICZA

Alumno que la presenta a revisión: **NALLELI GARCIA BELAUZARAN**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. ANABEL ORTIZ CALTEMPA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a _____

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Gerardo Díaz Godínez

Tesis: COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO scFv
6009F EN *Pichia pastoris* X-33 UTILIZANDO LOS PLÁSMIDOS pPICZA α
Y pPICZA

Alumno que la presenta a revisión: **NALLELI GARCIA BELAUZARAN**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. ALEXIS JOAVANY RODRIGUEZ SOLIS



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a _____

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Gerardo Díaz Godínez

Tesis: COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO scFv
6009F EN *Pichia pastoris* X-33 UTILIZANDO LOS PLÁSMIDOS pPICZA α
Y pPICZA

Alumno que la presenta a revisión: **NALLELI GARCIA BELAUZARAN**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. GERARDO DIAZ GODINEZ