



---

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

**EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO  
scFv 6009F CON EL VECTOR pHIL-S1  
EN *Pichia pastoris* GS115 Y KM71**

**PRESENTA:**

**BIÓL. FERNANDO GUZMÁN FLORES**

**PARA OBTENER EL GRADO:  
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

**DIRECTORA**

**DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**OCTUBRE 2019**

## ÍNDICE

Resumen .....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Diversidad de los escorpiones en México.....	4
2.2 Morfología del escorpión.....	6
2.3 Composición y métodos de acción del veneno.....	8
2.4 Escorpionismo.....	9
2.5 Síntomas y signos.....	10
3. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	13
3.1 Antivenenos .....	13
3.2 Anticuerpos recombinante.....	14
3.3 Sistema de expresión de proteínas heterólogas en <i>P. pastoris</i> .....	17
3.4 Producción de anticuerpos scFv en <i>P. pastoris</i> .....	20
4. JUSTIFICACIÓN.....	22
5. HIPÓTESIS.....	22
6. OBJETIVO GENERAL .....	22
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
8. METODOLOGÍA.....	23
8.1 Sistemas biológicos.....	23
8.2 Plásmidos.....	23
8.3 Medios de cultivo.....	24
8.4 Propagación del gen de interés en la cepa de <i>E. coli</i> Top10F.....	24
8.5 Ligación del vector .....	25
8.6 Transformación de <i>P. pastoris</i> y selección de clones recombinantes .....	26
8.7 Análisis de PCR de transformantes de <i>P. pastoris</i> .....	27
8.8 Expresión del anticuerpo scFv 6009F en <i>P. pastoris</i> .....	27
8.9 SDS-PAGE y análisis de Western Blot.....	28
8.10 Purificar por columnas de Níquel.....	28
8.12 Reconocimiento del scFv6009F frente a la toxina Cn2 y los venenos de <i>C. noxius</i> y <i>C. lipimodus</i> .....	29
9. RESULTADOS .....	30
9.1 Obtención del gen scFv 6009F a partir del plásmido pSyn1 .....	30

9.1.1 Purificación del plásmido.....	30
9.1.2 Amplificación del gen scFv 6009F .....	31
9.1.3 Reconocimiento de los oligonucleótidos diseñados en el gen scFv 6009F .....	32
9.2 Integración del plásmido pHIL-S1 en <i>E. coli</i> Top10F .....	32
9.3 Ligación del plásmido pHIL-S1 con el gen scFv 6009F .....	33
9.3.1 Transformación del pHIL-S1/6009F en <i>E. coli</i> Top10F .....	34
9.4 Liberación del gen scFv 6009F del plásmido pHIL-S1/scFv 6009F.....	36
9.5 Transformación del pHIL-S1/6009F en las cepas de <i>P. pastoris</i> KM71 y GS115....	38
9.6 Expresión del scFv 6009F en <i>P. pastoris</i> GS115 y KM71.....	38
9.7 Reconocimiento del scFv 6009F por Western Blot .....	40
9.8 Cuantificación de proteínas. ....	41
9.9 Reconociendo del scFv 6009F contra la toxina Cn2 y el veneno de <i>Centruroides noxius</i> y <i>Centruroides limpidus</i> .....	42
10. DISCUSIÓN.....	43
12. CONCLUSIONES .....	45
13. BIBLIOGRAFÍA.....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Distribución de los géneros de escorpión alrededor del mundo.....	5
Figura 2. Especies de Centruroides más representativas de México.....	5
Figura 3. Diversidad de escorpiones.....	6
Figura 4. Morfología general de los escorpiones.....	7
Figura 5. Áreas hiperendémicas de escorpionismo en el mundo.....	10
Figura 6. Proceso de obtención de los fragmentos de anticuerpos (Fab') <sub>2</sub> .....	14
Figura 7. Proceso de digestión de anticuerpos IgG.....	16
Figura 8. Plásmido pHIL-S1 para la integración en P. pastoris.....	23
Figura 9. Extracción del fragmento scFv 6009F del plásmido pSyn1.....	25
Figura 10. Purificación en Gel de agarosa al 0.8% por electroforesis de la del plásmido pSyn1.....	30
Figura 11. Amplificación por PCR del gen scFv 6009F.....	31
Figura 12. Reconocimiento de los oligos en el fragmento scFv e integración de los sitios de las enzimas de restricción EcoRI y BamHI.....	32
Figura 13. Purificación de plásmido de pHIL-S1 en gel de agarosa al 0.8%.....	33
Figura 14. Gel de electroforesis de la Amplificación del gen AOX1 más el inserto scFv 6009F.....	34
Figura 15. Electroforesis de la Purificación del plásmido pHIL-S1/6009F.....	35
Figura 16. Liberación del gen scFv 6009 de las construcciones.....	36
Figura 17. Mapa lineal de la secuencia de la proteína integrada en el plásmido de pHIL-S1.....	37
Figura 18. Mapa lineal de la secuencia del gen integrada en el plásmido de pHIL-S1.....	37
Figura 19. Marco de lectura del gen scFv6009F.....	37
Figura 20. Gel de poliacrilamida SDS- PAGE de las horas de expresión del scFv-6009F en KM71.....	39
Figura 21. Gel de poliacrilamida SDS- PAGE de las horas de expresión del scFv-6009F en GS115.....	39
Figura 22. Western Blot del scFv 6009F expresado en la cepa KM71.....	40
Figura 23. Western Blot del scFv expresado en la cepa GS115.....	41
Figura 24. Reconocimiento de la toxina Cn2 y los venenos de Centruroides noxius y Centruroides limpidus contra scFv 6009F.....	42

## ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1 Cepas de <i>P. pastoris</i> .....	17
Tabla 2. Características de vectores comerciales.....	18
Tabla 3. Señales de secreción para proteínas heterólogas.....	19
Tabla 4. Características del plásmido pHIL-S1.....	23
Tabla 5. Medios para el crecimiento y expresión de <i>Pichia pastoris</i> . ....	24
Tabla 6. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de PCR.....	25
Tabla 7. Componentes de una reacción de ligación .....	26
Tabla 8. Oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen alcohol oxidasa. ....	27
Tabla 9. Muestras KM71 en los carriles.....	39
Tabla 10. Muestras de GS115 en los carriles. ....	39
Tabla 11. Muestras de KM71 en los carriles Western Blot. ....	40
Tabla 12. Muestras de GS115 en los carriles del Western Blot. ....	41
Tabla 13. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	41

## Resumen

Las moléculas de anticuerpos diseñados y sus fragmentos se explotan cada vez más como herramientas científicas y clínicas, existen diferentes tipos de fragmentos de anticuerpos que se pueden obtener mediante proteólisis, tal es el caso de los scFv que poseen ventajas sobre las inmunoglobulinas completas por su fácil difusión en el organismo, la neutralización específica en el sitio blanco y su rápida eliminación, por lo que se han creado fragmentos anticuerpos recombinantes contra venenos de animales considerados como una alternativa para producir nuevos antivenenos para el tratamiento de picaduras de escorpión, ya que el escorpionismo se considera un problema de salud pública, reportando a nivel mundial 1.5 millones de casos por año, por lo que se espera que el fragmento de anticuerpos de cadena sencilla "scFv 6009F" que reconoce 6 toxinas de escorpiones del género Buthidae destacando la toxina Cn2 de *Centruroides noxius* es considerado como el más peligroso para México. El objetivo de este trabajo es la expresión heteróloga del scFv 6009F en la levadura *Pichia pastoris* empleando el plásmido pHIL-S1 para evaluar el rendimiento de producción sin perder la capacidad neutralizante hacia la toxina Cn2 y el veneno del escorpión *Centruroides noxius*. Se utilizaron las cepas de *E. coli* TOP10F para la transformación, clonación y propagación de pSyn1 y pHIL-S1 y las cepas de *Pichia pastoris* GS115 (HIS4, Mut<sup>+</sup>) y KM71 (HIS4, Mut<sup>s</sup>). Se utilizó como control *E. coli* TG1/pSym scFv6009F y se obtuvieron las construcciones en *Pichia pastoris* GS115/pHIL-S1 scFv 6009F y KM71/pHIL-S1 scFv 6009F. Se expresó el fragmento de anticuerpo scFv 6009F, cultivando todas las cepas. Las construcciones en *P. pastoris* se cultivaron en medio BMMY a 28°C, hasta alcanzar una  $Abs_{\lambda,595} = 2.0$  nm. Se indujo la producción del scFv 6009F con metanol al 0.5% cada 24 h por 4 días, tomando muestras de 1 ml cada 6 h, éstas muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE y Western blot, se confirmó la presencia de bandas de 28 kDa correspondientes al scFv 6009F, que además coincide con el PM del scFv 6009F obtenido en *E. coli* TG1 lo que sugiere que los scFv 6009F obtenidos en *P. pastoris* con este plásmido no están glicosidados. Se purificó por cromatografía en columnas de níquel y se cuantificaron las muestras para de la cepa GS115 *P. pastoris* pHIL-S1/6009F se obtuvieron 90 mg/L y para

cepa KM71 pHIL-S1/6009F un total de 81 mg/L, es decir *P. pastoris* GS115 produce un 10 % más de proteína que *P. pastoris* KM71. Por último, se evaluó el reconocimiento del scFv 6009F producido en *P. pastoris* GS115 contra la toxina Cn2 de *Centruroides noxius* y en veneno completo de *Centruroides lipimodus* mediante la técnica de ELISA, usando en anti His<sup>+</sup> y el Anti Myc para revelar. Este anticuerpo presento un mejor reconocimiento con el anti Myc que con el anti His<sup>+</sup>, lo que puede deberse a la forma en como está disponible dicho epítotope en el anticuerpo scFv 6009F. Finalmente, este anticuerpo fue capaz de reconocer a la toxina Cn2 y el veneno completo de *Centruroides noxius* y *Centruroides limpidus* en una relación molar 1:10. Hace falta evaluar el fragmento scFv 6009F expresado en *P. pastoris* KM71.

## 1. INTRODUCCIÓN

El escorpionismo o alacranismo se considera un problema de salud pública, y las incidencias por picadura de escorpión deben de ser atendidas inmediatamente, debido a que las consecuencias pueden llegar a causar la muerte. A nivel mundial se reportan 1.5 millones/año de las cuales se estiman 3,250 muertes, siendo más vulnerables los niños y adultos mayores (Chiappaux, 2012). México es uno de los países con mayor incidencia de picaduras por alacrán, registrando anualmente 300,000 casos, la Organización Mundial de la Salud estima que cada año suceden aproximadamente entre 700 y 1400 muertes especialmente en niños y ansianos (Villa-Manzano *et al.*, 2015). Dado que estos arácnidos se han adaptado a diferentes ecosistemas durante su evolución, en el mundo se han reportado 1,259 especies de escorpiones. La fauna de escorpiones en México es la más grande, con 281 especies, dentro de toda esta diversidad encontramos a las especies más tóxicas del género *Centruroides* de la familia *Buthidae* que son responsables de la mayoría de los casos de morbilidad y mortalidad (Chippaux y Goyffon, 2008, Santibáñez-López *et al.*, 2015). Uno de los medicamentos más eficaces para neutralizar los efectos tóxicos de las picaduras de escorpión es el Alacramyn, un anti-veneno faboterápico desarrollado por investigadores de la UNAM y comercializado en México y toda América Latina por el Instituto Bioclon, se estima que ha reducido la

mortalidad asociada a picadura de escorpión en un 90 por ciento. Este Medicamento comenzó a ser distribuido en Estados Unidos bajo el nombre comercial “Anascorp,” gracias a su aprobación por la FDA, la agencia sanitaria que regula alimentos y fármacos los Estados Unidos (Melville, 2011). Anascorp tiene una ventaja que otros anticuerpos no tienen: neutraliza el veneno del escorpión en tan solo 2 horas, dejando atrás a otros anti-venenos que hacen el mismo trabajo entre 48 y 72 horas. Al Dr. Alejandro Alagón le tomo más de 12 años el desarrollo de este proyecto y 10 años más de investigación, protocolos y pruebas para su ingreso al mercado norteamericano.

La expresión de proteínas recombinantes se ha vuelto cada vez más popular en los últimos tiempos y el uso *P. pastoris* como sistema de expresión debido a su fácil de manipulación y crecimiento, por lo tanto, proporciona el potencial para producir proteínas recombinantes solubles, plegadas correctamente que han sufrido todas las modificaciones postraduccionales requeridas para la funcionalidad. Además, el ADN extraño linealizado se puede insertar con alta eficiencia mediante procedimientos de recombinación homóloga para generar líneas celulares estables, mientras que los vectores de expresión se pueden preparar fácilmente que permiten múltiples copias de la proteína objetivo, proteínas multiméricas con diferentes estructuras de subunidades. Un beneficio adicional de *P. pastoris* son los promotores fuertes que están disponibles para impulsar la expresión de un gen o genes extraños de interés, lo que permite la producción de grandes cantidades de las proteínas objetivo con relativa facilidad técnica y a un costo menor que la mayoría de los otros sistemas eucariotas (Daly y Hearn, 2005).

*P. pastoris*, a diferencia de los sistemas de expresión bacterianos, tiene la capacidad de realizar muchas de las modificaciones postraduccionales que generalmente se realizan en eucariotas superiores, por ejemplo, plegamiento correcto de las proteínas, formación de enlaces disulfuro, glicosilación O y N además del procesamiento de secuencias de señal. Las proteínas glicosiladas producidas de *P. pastoris* tienen el potencial de desencadenar respuestas inmunes inapropiadas si se usan como productos farmacéuticos. *P.*



*pastoris*, como otras levaduras y hongos, agrega O- oligosacáridos a los grupos hidroxilo de serina y treonina de proteínas secretadas. Estos están compuestos solo por residuos de manosa, mientras que los eucariotas superiores, como los mamíferos, tienen una composición de azúcar más variada en estos oligosacáridos. Es posible que *P. pastoris* glucosilará proteínas heterólogas, incluso cuando esas proteínas no estén glucosiladas normalmente por el huésped nativo, e incluso cuando la proteína está glicosilada en el huésped nativo, *Pichia* puede no glucosilarla en los mismos residuos de serina y treonina por otro lado la glicosilación ligada a N, existe evidencia de una secuencia de reconocimiento de consenso única para el inicio de la glicosilación, Asn-Xaa-Ser / Thr, pero no siempre es suficiente (Macauley-Patrick et al., 2005)

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Diversidad de los escorpiones en México.**

Los escorpiones son uno de los arácnidos venenosos más antiguos existentes, se originaron hace aproximadamente 430 millones de años, El orden escorpión es un grupo distintivos de arácnidos que se han mantenido sin cambios debido a que su morfología les ha permitido colonizar diferentes ecosistemas, la mayor diversidad de los escorpiones se encontrado principalmente en las áreas tropicales y subtropicales y desciende hacia el ecuador y los polos, el orden de los escorpiones comprende casi 2231 especies en 208 géneros y 20 familias en el mundo (Chippaux y Goyffon, 2008). México, es uno de los países con mayor diversidad de especies de escorpiones donde se han descrito 8 familias, 32 géneros y 281 especies hasta el 2015. Sin embargo, este porcentaje podría aumentar debido a que faltan áreas por investigar y estudios exhaustivos. Las 8 familias están comprendidas por la familia Buthidae, Caraboctonidae, Chactidae, Diplocentridae, Euscorpidae, Superstitioniidae, Typhlochactidae y Vaejovidae, en la figura 1 se muestra la distribución de los géneros de escorpiones en mundo (Santos *et al.*, 2016).

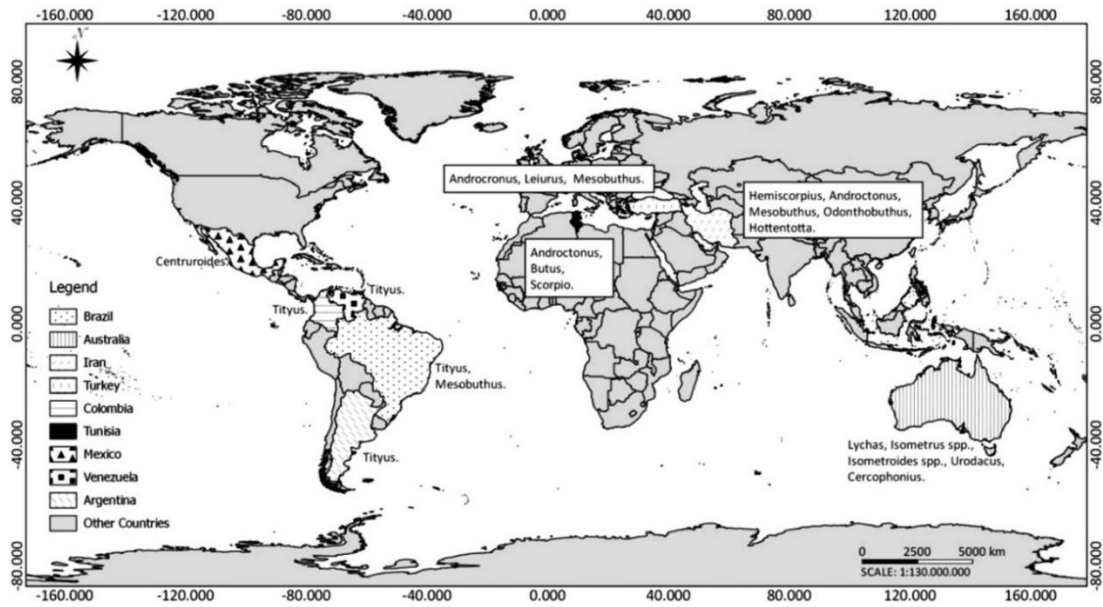


Figura 1. Distribución de los géneros de escorpión alrededor del mundo.

Dentro de la familia Buthidae y el género *Centruroides*, encontramos las especies más peligrosas para México, comprendido por 30 especies de los cuales solo 8 son de importancia clínica, *Centruroides noxius*, *C. limpidus*, *C. tecomanus*, *C. suffusus*, *C. infamatus*, *C. elegans*, *C. balsasensis* y *C. meisei*. (Figura 2), *Centruroides noxius* es considerado el escorpión más toxico de México localizado en el estado de sonora (Riaño-Umbarila *et al.*, 2017)



Figura 2. Especies de *Centruroides* más representativas de México (Riaño-Umbarila *et al.*, 2017).

## 2.2 Morfología del escorpión.

Los escorpiones son arácnidos terrestres que presentan hábitos nocturnos no sociales, se estima que los escorpiones aparecieron durante la era silúrica, por lo que con el paso del tiempo estos arácnidos han adquirido grandes adaptaciones de acuerdo al ecosistema en el que se desarrollan (Gómez *et al.*, 2007), los escorpiones son artrópodos que se han convertido en modelos de estudio debido a su gran importancia médica, geográficamente la distribución del escorpión varían desde regiones tropicales, templadas, desiertos, sabanas, bosques tropicales, montañas de gran altitud y la zona intermareal, dentro de las características morfológicas generales de los escorpiones es que son artrópodos habitualmente de buen tamaño (varían entre los 8.5 mm a los 23 cm). El color suele ser de amarillo o pardo, hasta negro, salvo excepciones, como algunas especies cavernícolas y humícolas como se observa en la figura 3.



Figura 3. Diversidad de escorpiones.

Los escorpiones se encuentran principalmente divididos en dos partes el, prosoma y el opistosoma, este último compuesto por el mesosoma y metasoma. Dentro del prosoma se localizan los pedipalpos o pinzas que les funcionan para capturar sus

presas y poder alimentarse, utilizados también para defensa contra sus depredadores. Los escorpiones poseen seis pares de apéndices los cuáles se dividen en: quelíceros, pedipalpos y cuatro pares de patas locomotoras. Los quelíceros, de tamaño habitualmente modesto, están formados por tres artejos, terminados en una pinza que tiene la función de sujetar y desgarrar a las presas. El opistosoma está compuesto por un mesosoma de siete segmentos y un metasoma de cinco. El mesosoma presenta estructuras importantes, ventralmente presenta en su primer segmento la abertura genital, que está cubierta por un opérculo genital formado por dos placas situadas entre el esternón y la placa basal pectinal (segundo segmento), En los segmentos III–VI aparecen los estigmas respiratorios o espiráculos, los cuales representan las aberturas al exterior de los pulmones en forma de libro y funcionan como "escotillas", que el escorpión abre y cierra a voluntad. El metasoma o cola es otro de los rasgos característicos de los escorpiones, este está compuesto por cinco segmentos prismáticos o cilíndricos que termina en el telson, el cual contiene una glándula venenosa y el aguijón inoculador (Figura 4) (Turel y Melic, 2015).

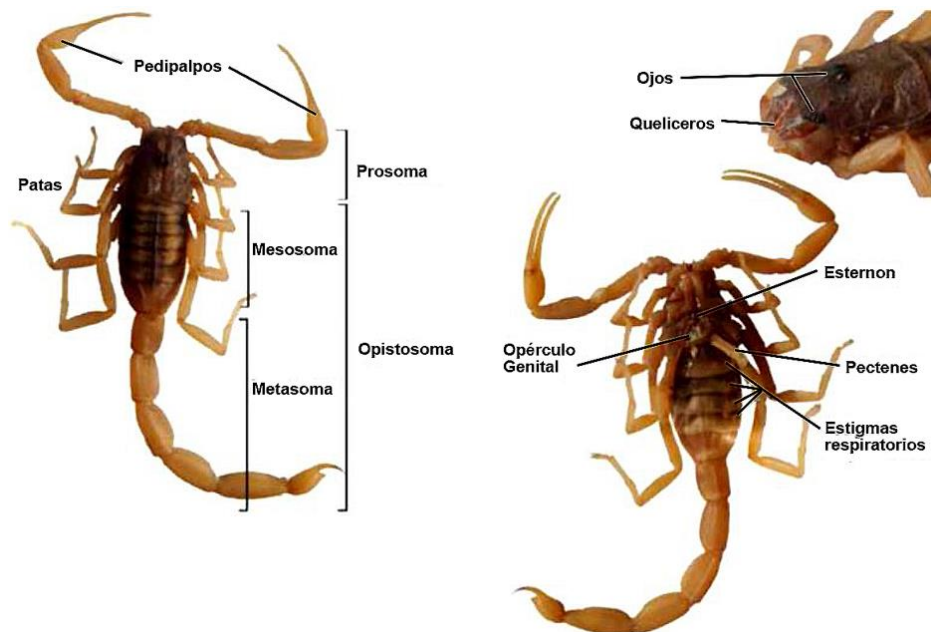


Figura 4. Morfología general de los escorpiones.

### **2.3 Composición y métodos de acción del veneno**

Los escorpiones han sobrevivido durante 400 millones de años, lo que les ha permitido conservar gran parte de su morfología, durante este largo tiempo evolutivo, han desarrollado venenos cada vez más eficientes para sus necesidades de defensa y alimentación (Zhijian *et al.*, 2006).

Los escorpiones poseen un aparato venenoso muy bien especializado para la producción de mezclas complejas de sustancias que se encuentran dentro del veneno. Siendo el escorpión la especie venenosa más antigua, se ha estudiado extensamente por las características de su veneno. El veneno de los escorpiones es un conjunto de biomoléculas, que puede alterar o dañar la actividad fisiológica del huésped envenenado, el veneno de estos arácnidos generalmente consta de varias neurotoxinas proteicas de bajo peso molecular, mucopolisacáridos, oligopéptidos, nucleótidos, aminoácidos, además de enzimas como hialuronidasas, fosfolipasas, lisozimas y otros péptidos con actividad antimicrobiana o funciones inmunomoduladoras (Ma *et al.*, 2012). Las neurotoxinas en los venenos poseen una bioactividad muy específica y muy potente destinada a atacar e inmovilizar a sus presas o para defensa contra depredadores (Matthew *et al.*, 2002).

Las toxinas se clasifican de acuerdo a cuatro criterios distintos: el canal iónico involucrado (en particular los del sodio, potasio, cloro y calcio); el receptor específico al que se une la toxina dentro del canal iónico; la estructura tridimensional de la toxina; y el tipo de respuesta inducida (activación o inactivación del receptor) (Chippaux, 2010).

Diversas toxinas se encuentran presentes en el veneno de una sola especie de escorpión, con la finalidad para asegurar que el veneno sea capaz de producir potentes acciones sinérgicas cuando se descarga en una víctima. La bioactividad de las neurotoxinas muestra un alto grado de especificidad para cada hospedero, que presentan selectividad para dirigirse preferentemente solo a insectos, otras solo crustáceos y para mamíferos (Al-Asmari *et al.* 2016).

Las neurotoxinas de escorpión se dirigen a los canales de sodio regulados por voltaje ( $\text{Na}^+$ ) y los canales de potasio dependientes de voltaje ( $\text{K}^+$ ), de manera que las neurotoxinas de escorpión actúan principalmente sobre células excitables como nervios y músculos (Matthew *et al.*, 2002).

Un primer grupo de toxinas, las cuales incluyen moléculas tipo  $\alpha$  y  $\beta$ , alteran las compuertas del canal de sodio abriéndolo permanentemente. De esta manera, se internaliza sodio a la célula lo que provoca que el potencial de membrana despolarice las células en un periodo de tiempo más largo o de manera sostenida. Simultáneamente, otro grupo de toxinas bloquea físicamente el canal de potasio impidiendo la salida de estos iones. La consecuencia de la acción sinérgica de estos dos grupos de toxinas ocasiona que la célula excitable no pueda regresar a su estado de reposo (Borges *et al.*, 2011).

#### **2.4 Escorpionismo.**

El escorpionismo es un problema clínico a nivel mundial, esto ha sido complicado porque la epidemiología por el envenenamiento aún sigue siendo un problema para cada región y la localización de cada especie. El escorpionismo es relevante en al menos 7 áreas limitadas del mundo. La incidencia y la gravedad del envenenamiento son mayores en el norte del Sahara; las regiones sur y este de África; el medio Oriente; India del Sur; México; Brasil; y el área de la cuenca amazónica Guyanas, Venezuela y el norte de Brasil (Celis *et al.*, 2007).

La incidencia de envenenamientos es alta, más de 1,500,000 picaduras de escorpión ocurren anualmente en el mundo, mientras que el número de muertes puede llegar hasta los 3,250 casos, la epidemiología varía de acuerdo en al área geográfica en la que se dé la incidencia, sin embargo, aunque la incidencia de picaduras de escorpión es mayor en los adultos, la gravedad del envenenamiento es significativamente más en los niños, en quienes la tasa de letalidad es hasta diez veces mayor (Chippaux y Goyffon, 2008; Chippaux, 2012; de Roodt *et al.*, 2015). En la figura 5 se muestran las áreas hiperendémicas de escorpionismo al rededor del mundo, las líneas interrumpidas en azul indican la distribución global aproximada

del orden escorpiones. Las zonas en verde indican las áreas con incidencias superiores a los 50 casos por cada 100,000 habitantes (Borges *et al.*, 2001).

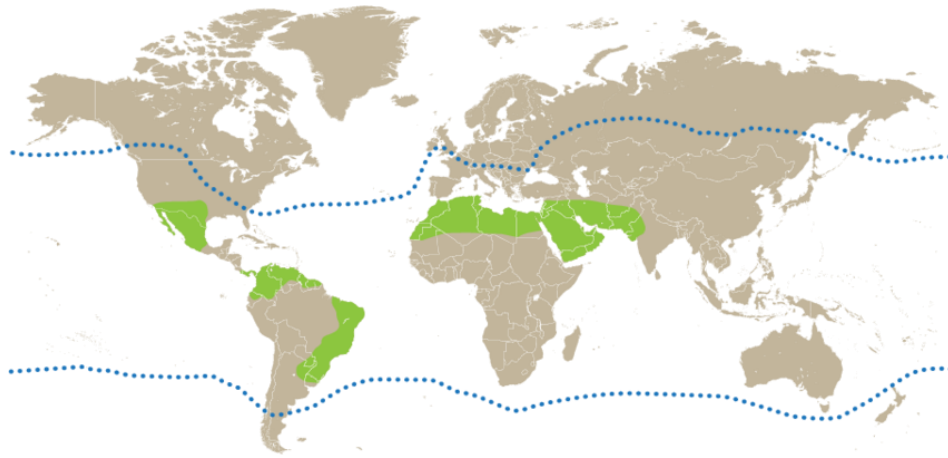


Figura 5. Áreas hiperendémicas de escorpionismo en el mundo

En México se estima alrededor de 300,000 casos de envenenamientos al año por picaduras de escorpiones, como consecuencia algunos de estos casos conducen a la pérdida de vidas humanas, afortunadamente estas pérdidas han disminuido por el manejo adecuado de los antivenenos. Los estados más afectados por escorpiones Guanajuato, Guerrero, Morelos, Jalisco y Michoacán donde el contacto con estos artrópodos es más frecuente (Riaño-Umbarilia *et al.*, 2017).

En el envenenamiento influyen varios factores, principalmente el tipo de escorpión y la víctima afectada, si hablamos del tipo de escorpión podemos mencionar la especie, el tamaño, la especie de alacrán, cantidad de toxinas y el número de picaduras, ahora bien, si nos referimos a la víctima se debe considerar el sitio de la picadura, la edad, el peso y el estado de salud en que se encuentre la persona afectada (Santos *et al.*, 2017).

## 2.5 Síntomas y signos

Las manifestaciones clínicas del envenenamiento del escorpión están predominantemente mediadas por los sistemas simpático y parasimpático y dependen de las especies de escorpión. Los efectos sistémicos del envenenamiento del escorpión incluyen la liberación masiva de neurotransmisores



(neurotóxicas excitatorias del veneno del escorpión). Se sabe que las neurotóxicas presentes en los venenos de escorpión permiten que los canales iónicos en las terminales nerviosas presinápticas se abran y, por lo tanto, inician la tormenta autónoma.

Los ancianos y niños menores de 7 años constituyen un grupo de riesgo porque el sistema inmunitario en ambos se encuentra debilitado. Las altas tasas de morbilidad y letalidad en los niños generalmente se han asociado con la vulnerabilidad del sistema inmune, otros aspectos que pueden influir en los signos y síntomas del envenenamiento por escorpión incluyen la relación entre la dosis de veneno y el peso corporal del paciente, provocan reacciones peligrosas que incluyen líquido en los pulmones, problemas respiratorios, para tragar, exceso de saliva, visión borrosa, dificultad para hablar, movimientos anormales de los ojos y espasmos musculares (Santos *et al.*, 2016).

No todas las especies de escorpiones son dañinas para el humano, pero dentro de los síntomas más generalizados puede manifestarse: dolor en el área del piquete o área de inoculación del veneno, dependiendo de la especie del escorpión si este no es venenoso se observa hinchazón y enrojecimiento del área afectada, además de pérdida de sensibilidad. Si el escorpión es considerado peligroso, además de los síntomas locales, se pueden presentar síntomas generalizados, como irritabilidad, dolor en el cuerpo, sensación de cuerpo extraño en la garganta, escurrimiento nasal o lagrimeo, fiebre, cambios en la frecuencia del latido cardíaco, dificultad para respirar, náuseas, vómitos, diarrea y, en los casos muy graves, convulsiones, edema pulmonar o paro cardíaco (Possani, 2005).

Se pueden distinguir la severidad creciente en las víctimas en tres etapas: 1) Leve, cuando los pacientes solo presentan signos locales, como edema, eritema, sudoración, entumecimiento y contracciones nerviosas, 2) Moderado, cuando los pacientes también presentan vómitos, dolor abdominal, taquipnea, taquicardia o bradicardia, hipertensión leve, sudoración generalizada, agitación, hipersalivación (sialorrea), disfagia, fiebre, priapismo y/o hiperglucemia, 3) Grave, cuando los pacientes presentan complicaciones cardiovasculares, como insuficiencia



miocárdica o miocardiopatía dilatada, insuficiencia cardíaca congestiva, shock, arritmia o hipertensión grave; complicaciones pulmonares, como edema pulmonar o síndrome de dificultad respiratoria del adulto; complicaciones gastrointestinales, como pancreatitis aguda o hemorragia por úlcera péptica; complicaciones metabólicas, como hiperglucemia, hipocalcemia, hipercalcemia, o desequilibrio ácido-base; y síntomas neurológicos, como encefalopatía hipertensiva, estupor, coma o convulsiones, así como alteración de la hemostasia y falla orgánica múltiple (Khattabi *et al.*, 2011, Santos *et al.*, 2016).

La atención médica intensiva sigue siendo dominio exclusivo de una minoría de especialistas. Las estrategias terapéuticas se basan en tratamientos sintomáticos de apoyo, como analgésicos, antiinflamatorios, antihistamínicos y antipiréticos según la edad del paciente (Abrouh *et al.*, 1999, Osnaya-Romero *et al.*, 2001). Los anti-venenos deben usarse solo cuando se observan síntomas moderados o severos. El uso de los antivenenos demanda que sean de alta calidad, eficacia y seguridad del anti-veneno para el paciente, para que la aplicación del anti-veneno sea óptima la administración debe ser a tiempo para lograr neutralizar el veneno lo antes posible. Los antivenenos más nuevos, están compuestos de fragmentos altamente purificados de inmunoglobulinas (IgG), lo que los hace más seguros sin alterar su eficacia y facilitar su manejo, Aunque los anti-venenos son muy eficientes, sigue siendo de origen equino y puede generar una respuesta inmune a ciertos pacientes. (Chippaux, 2012).

### 3. ANTECEDENTES DIRECTOS

#### 3.1 Antivenenos

El perfeccionamiento de los métodos de protección contra el envenenamiento ha dado como consecuencia el desarrollo de terapias séricas basadas en anticuerpos, utilizado ampliamente para el tratamiento de enfermedades infecciosas como la difteria. Posteriormente Albert Calmette produjo antisueros capaces de contrarrestar el envenenamiento por mordeduras de cobra demostrando así la ventaja de la terapia sérica en el tratamiento contra el envenenamiento por animales venenosos (Alvarenga *et al.*, 2014). En la actualidad la sueroterapia es el tratamiento más utilizado para proteger a las poblaciones contra el envenenamiento por animales marinos, serpientes, arañas y escorpiones (Ahmad *et al.*, 2012), en cada país se utilizan sueros provenientes de diferentes animales inmunizados. Una forma de obtener anticuerpos contra el veneno o la toxina de alacrán es inyectar estas toxinas a ratas, conejos o caballos y purificarlos del suero de la sangre.

En México, desde 1953, los anticuerpos de suero de caballo producidos contra los venenos de escorpión se usaron para la neutralización de toxinas y veneno contra las especies de *Centruroides* (Gazarian *et al.*, 2005).

La primera generación de antivenenos se basó en la inmunización de caballos inyectando fracciones del veneno provenientes de escorpiones, sin embargo, además de poseer los anticuerpos del caballo también se encontraban otras inmunoglobulinas, del mismo suero lo cual producía reacciones alérgicas. Por lo que surgió la segunda generación de anti-venenos, que consistía en la separación de otras inmunoglobulinas para obtener solo inmunoglobulinas tipo G y eliminar otras proteínas, pero a pesar de esto las consecuencias de hipersensibilidad seguían manifestándose en muy pocos pacientes. Se consideró que el problema se encontraba en la inmunoglobulina misma, por lo que se decidió eliminar la fracción cristalizable (FC) del anticuerpo con pepsina. Dando paso así a la tercera generación de anticuerpos conocida como faboterápicos constituidos por una

mezcla de fragmentos de anticuerpos  $F(ab')_2$ , como se muestra en la figura 6 (Becerril *et al.*, 2014).

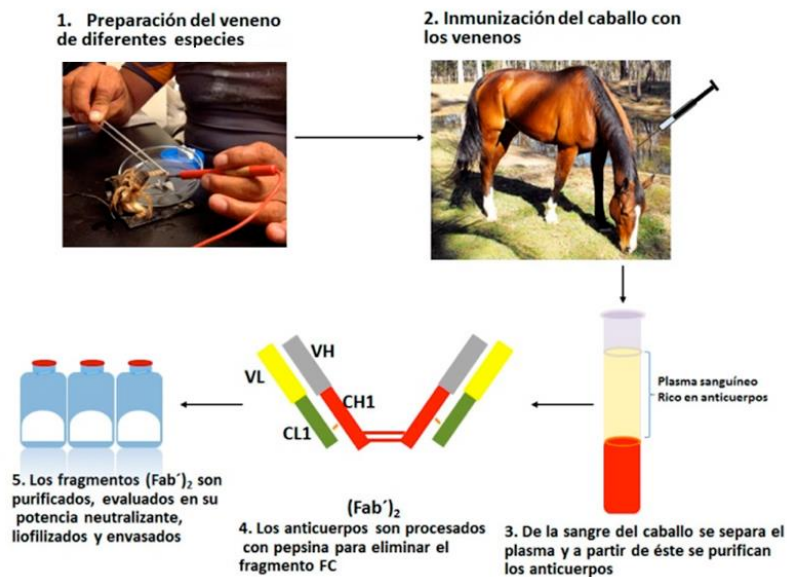


Figura 6. Proceso de obtención de los fragmentos de anticuerpos  $(Fab')_2$  (Becerril *et al.*, 2014).

Actualmente, este tratamiento contra la picadura de escorpión en México consiste en la aplicación de un antígeno polivalente  $F(ab)$  o  $F(ab')_2$  que son fragmentos de anticuerpos obtenidos por proteólisis con pepsina o papaína (Alvarenga *et al.*, 2012), producidos a partir de la hiperinmunización de caballos con fracciones de venenos de especies peligrosas de escorpiones (Espino-Solis *et al.*, 2009).

La mayoría de los antivenenos se liofilizan antes de su envío desde las instalaciones del fabricante. Para garantizar un rendimiento óptimo, deben mantenerse refrigerados y usarse inmediatamente (Arya, 2000).

### 3.2 Anticuerpos recombinante.

En los últimos años, los científicos han aprendido a manipular el ADN para producir proteínas con diversas aplicaciones, como anticuerpos. Dado que muchos anticuerpos son de gran valor comercial, numerosos estudios se han centrado en encontrar formas de producirlos de manera eficiente, soluble y funcional. Hay dos clases principales de anticuerpos recombinantes, el primero se basa en la molécula

de inmunoglobulina intacta diseñada para reducir la inmunogenicidad del veneno o la toxina. Usando como sistema de expresión a *E. coli*, la FDA desde 1980 han aprobado diversas proteínas recombinantes como terapias, y en la actualidad se siguen produciendo más proteínas en diferentes sistemas de expresión que proporcionan ventajas como modificaciones postraduccionales más parecidas a las humanas, estos anticuerpos terapéuticos recombinantes son indiscutiblemente esenciales para el tratamiento de enfermedades. La primera proteína terapéutica recombinante aprobada por la FDA fue la insulina, desarrollada por Genentech y aprobado en 1982 bajo el nombre comercial Humulin (Well y Robinson, 2016).

En segundo lugar, ésta la expresión heteróloga de fragmentos de inmunoglobulinas, en esta área se han desarrollado moléculas quiméricas, que consisten en las regiones variables murinas y las regiones constantes humanas también como anticuerpos humanizados, en los que solo la región determinante complementaria CDR4 son de origen de roedor. Estos incluyen fragmentos que son accesibles a través de la proteólisis, tales como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, así como otros fragmentos, tales como moléculas basadas en Fv que incluyen sFv (Fv monocatenario), el dsFv (Fv estabilizado con disulfuro), scFv el fragmento variable monocatenario o fragmento variable de cadena sencilla, diacuerpo (scFv dímero), son tres de los formatos de anticuerpos más ampliamente utilizados (Figura 7). Un scFv está constituido por los dominios variables de una cadena ligera y una cadena pesada unidas por un enlazador peptídico, habitualmente de 15 aminoácidos (aa) de longitud (Jiang *et al.*, 2011). Este fragmento tiene actividad funcional similar a la de un anticuerpo completo. Debido a que su tamaño es pequeño de 30 kDa, un scFv tendría una mayor difusión en cualquier organismo, en comparación con un IgG o un F(ab')<sub>2</sub>, siendo esto una ventaja importante en los casos agudos de envenenamiento por escorpiones. También pueden prepararse anticuerpos bioespecíficos y bivalentes, tales como los diacuerpos (Verma *et al.*, 1998).

Los fragmentos de anticuerpos pequeños poseen ventajas sobre las inmunoglobulinas completas para los tratamientos terapéuticos, como la buena penetración. Además, pueden producirse mediante bibliotecas de presentación en

fagos filamentosos (presentación en fagos), para posteriormente utilizarlos como anticuerpos recombinantes específicos para diferentes toxinas (Espino-Solís *et al.*, 2009). Estos fragmentos pueden dotarse de nuevas propiedades por fusión con otras moléculas, tales como proteínas de unión a metales, citosinas, toxinas o fármacos.

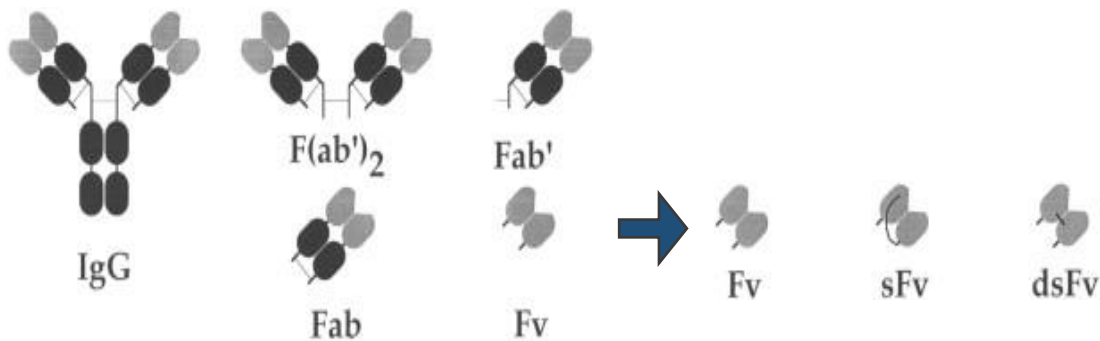


Figura 7. Proceso de digestión de anticuerpos IgG.

Los fragmentos de anticuerpos conservan los sitios de unión a los antígenos convirtiéndose en moléculas efectivas. A partir de linfocitos B de sangre periférica humana se identificaron anticuerpos dirigidos a la toxina Cn2 y se generó una librería de  $1.2 \times 10^8$  miembros. Solo 2 scFv 3F y C1 mostraron una constante de afinidad de  $10^{-7}$  M hacia la toxina Cn2. Del fragmento scFv 3F se obtuvo el fragmento scFv 6009F, con 446 veces más afinidad por la toxina parental Cn2. No obstante su baja expresión en *E. coli* es de 1.1 mg/L, se logró establecer que puede reconocer y neutralizar a las toxinas Cn2 y Cn3 de *C. noxius*, la Css2 y Css4 de *C. suffusus suffusus* y las CII1 y CII2 de *C. limpidus limpidus*, se requieren mayores cantidades para realizar experimentos de tiempo de reconocimiento en vivo, vida media en infantes y adultos, cristalografía, etc. (Riaño-Umbarila *et al.*, 2005, 2010, 2013).

El fragmento scFv 6009F, es una alternativa prometedora para usarse en un futuro quizá en una mezcla como parte de un nuevo anti-veneno contra las picaduras de escorpiones *Centruroides* (Espino-Solís *et al.*, 2009, Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2016).

Por lo tanto, la expresión heteróloga en *P. pastoris* es un área de investigación importante buscando mejorar los rendimientos de expresión del fragmento scFv 6009F, su solubilidad al medio y su actividad biológica.

### 3.3 Sistema de expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris*.

*P. pastoris*, se convirtió en un microorganismo GRAS por sus siglas en inglés (Generalmente considerados como seguros), ha sido uno de los sistemas de expresión de proteínas heterólogas con resultados más efectivos.

Una de las ventajas de *P. pastoris* es que no acumula etanol tóxico, no secreta una gran cantidad de proteínas endógenas como *Saccharomyces cerevisiae* (Yongkang y Huang, 2018). Existen varias cepas de *P. pastoris* con diferentes características que son derivados de la cepa salvaje Y-11430 de Northern Regional Research Laboratories, (NRRL).

En la tabla 1, se muestra una lista de cepas de *P. pastoris* disponibles para la expresión con diferentes genotipos (Higgins *et al.*, 1998).

Tabla 1 Cepas de *P. pastoris*

	<b>Genotipos</b>	<b>Fenotipo</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>
<b>Y-11430</b>	SILVESTRE	SILVESTRE	Consumo de metanol alto
<b>X-33</b>	SILVESTRE	SILVESTRE	Consumo de metanol alto
<b>GS115</b>	his4	Mut+ His-	consumo de metanol alto, auxótrofa a histidina
<b>KM71</b>	his4, arg4,aox1:ARG4	MutS His-	consumo de metanol bajo, auxótrofa a histidina
<b>MC100-3</b>	his4, arg4,aox1:SARG4, aox2 PHIS4	Mut- His-	Incapaz de consumir el metanol, auxótrofa a histidina
<b>SMD1168</b>	Pep4, his4	Mut+ His- Deficiente en proteasas	Consumo de metanol alto, auxotrofia a histidina, no produce proteinasa A
<b>SMD1165</b>	prb1, his4	Mut+ His- deficiente en proteasas	Consumo de metanol alto, auxotrofia a histidina, no produce proteinasa B
<b>SMD1163</b>	pep4, prb1,his4	Mut+ His- deficiente en proteasas	Consumo metanol alto, auxotrofa a histidina, no produce proteinasa A, proteinasa B ,ni Carboxipeptidasa Y

Así como existe una amplia variedad de cepas que son utilizadas para la expresión heteróloga, existen también un gran número de vectores que son compatibles con diferentes cepas y con otras no. Todos los vectores de expresión de *P. pastoris* contienen un origen de replicación para el mantenimiento del plásmido en *E. coli* y marcadores funcionales en uno o ambos organismos. Actualmente existen varios vectores comerciales disponibles con diferentes características y en la tabla 2 se pueden observar la diversidad de vectores y sus cualidades (Logez *et al.*, 2012).

En nuestro grupo de investigación se cuentan con diferentes plásmidos pPICZ $\alpha$  A y pPICZ A compatibles con la cepa silvestre de *P. pastoris* X-33, GS115 y KM71, además también poseemos los plásmidos pPIC9, pPIC3.5 y pHIL-S1 que son compatible con las cepas GS115 y KM71 por su complementariedad en el gen histidinol deshidrogenasa, para su seleccionar colonias transformadas por auxotrofia por histidina.

Tabla 2. Características de vectores comerciales.

Nombre	Marcador de selección	Fenotipo de transformantes	Promotor	Secuencia de secreción	Etiquetas agregadas
pAO815	HIS4	His <sup>+</sup>	P <sub>AOX1</sub>	Ninguna	Ninguna
pPIC3.5	HIS4	His <sup>+</sup> , G418 <sup>R</sup>	P <sub>AOX1</sub>	Ninguna	Ninguna
pPIC9	HIS4	His <sup>+</sup> , G418 <sup>R</sup>	P <sub>AOX1</sub>	Factor $\alpha$	Ninguna
pPICZ A, B, C	Ble	Zeo <sup>R</sup>	P <sub>AOX1</sub>	Ninguna	c-Myc / his6
pPICZ $\alpha$ A, B, C	Ble	Zeo <sup>R</sup>	P <sub>AOX1</sub>	Factor $\alpha$	c-Myc / his6
pPIC6 A, B, C	Bsd	Bla <sup>R</sup>	P <sub>AOX1</sub>	Ninguna	c-Myc / his6
pHIL-D2	HIS4	His <sup>+</sup>	P <sub>AOX1</sub>	Ninguna	Ninguna
pHIL-S1	HIS4	His <sup>+</sup>	P <sub>AOX1</sub>	PHO1	Ninguna
pFLD	Ble	Zeo <sup>R</sup>	P <sub>FLD1</sub>	Ninguna	Epítotope V5 / his6
pFLD $\alpha$	Ble	Zeo <sup>R</sup>	P <sub>FLD1</sub>	Factor $\alpha$	Epítotope V5 / his6
pGAPZ A, B, C	Ble	Zeo <sup>R</sup>	P <sub>GAP</sub>	Ninguna	c-Myc / his6
pGAPZ $\alpha$ A, B, C	Ble	Zeo <sup>R</sup>	P <sub>GAP</sub>	Factor $\alpha$	c-Myc / his6
pPink-HC	ADE2	Ade <sup>+</sup>	P <sub>AOX1</sub>	Ninguna	Ninguna
pPink-LC	ADE2	Ade <sup>+</sup>	P <sub>AOX1</sub>	Ninguna	Ninguna
pPink $\alpha$ -HC	ADE2	Ade <sup>+</sup>	P <sub>AOX1</sub>	Factor $\alpha$	Ninguna

Las ventajas de *P. pastoris* en comparación con otros sistemas de expresión, se debe a que puede actuar tanto como un microorganismo, así como una célula eucariota, posee: a) Vías especializadas para el plegamiento de proteínas, b) Los productos de expresión pueden ser secretados a los medios de cultivo mediante una secuencia señal, c) Las proteínas recombinantes que son secretadas afuera de la

célula tiene varias ventajas sobre las que proteínas que se expresan intracelularmente. Mediante la secreción se producen proteínas solubles y pueden inducirse por periodos de tiempo más largos ya que la proteína no se acumula en un sitio limitado que es el citoplasma, donde esto puede tener un efecto tóxico para el huésped. La secreción puede aumentar el rendimiento de nuestra proteína recombinante, además no se requiere de un proceso de lisis celular, las proteínas secretadas pueden recuperarse directamente del medio de cultivo y esto simplifica el proceso de purificación (Logez *et al.*, 2012).

En la tabla 3, se muestran algunas señales de secreción que se utilizan de proteínas recombinantes. La levadura *P. pastoris* es ampliamente utilizada para la fermentación a escala industrial debido a sus altos rendimientos en medios de crecimientos simples a diferencia de los sistemas de expresión de mamíferos. Varios anticuerpos completos y fragmentos se han expresado usando *P.pastoris* como sistema de expresión (Verma *et al.*, 1998).

Tabla 3. Señales de secreción para proteínas heterólogas.

Nombre	Secuencia diseñada de proteína	Estructura de secuencia
<b>Factor <math>\alpha</math></b>	Factor de apareamiento de <i>S. cerevisiae</i> $\alpha$	85 residuos, 3 sitios de N-glicosilación Sitios de procesamiento Kex2 / Ste13
<b>PHO1</b>	Fosfatasa ácida de <i>P. pastoris</i>	15 residuos, 6 sitios de N-glicosilación
<b>SUC2</b>	<i>P. pastoris</i> invertasa	19 residuos
<b>PHA-E</b>	Fitoheماغلوتينina de <i>Phaseolus vulgaris</i>	21 residuos
<b>KILM1</b>	Toxina asesina tipo I	44 residuos
<b>pGKL</b>	Proteína asesina de 128 kDa	29 residuos, Sitio de procesamiento Kex2
<b>CLY</b>	Péptido señal de lisozima de pollo	18 residuos
<b>CLY-L8</b>	Péptido señal rico en leucina diseñado	16 residuos

En *P. pastoris* pueden expresarse proteínas heterólogas tanto intracelularmente o extracelularmente debido a que algunos vectores poseen secuencias señal para liberar las proteínas. *P. pastoris* tienen la capacidad de secretar gramos por litro de proteínas extrañas en un medio pobre, económico y químicamente definido. La expresión de proteínas en *P. pastoris* se basa en el uso del promotor AOX1 del gen alcohol oxidasa (AOX1). Los genes bajo el control del promotor AOX1 se transcriben rápidamente tras la adición de metanol (Eldina *et al.*, 1997).



### 3.4 Producción de anticuerpos scFv en *P. pastoris*

Los estudios hasta la fecha sobre la expresión de fragmentos de Fv de cadena simple (scFv) en *P. pastoris* han sido limitados, pero se han interpretado para ofrecer un sistema de expresión genérico superior al de *E. coli*.

Eldin *et al.* (1997), informaron la expresión extracelular en *P. pastoris* utilizando pPIC9 y pHIL-S1 como vectores del fragmento sFV anti-DMI específico para desipramina (DMI), que es un fármaco antidepresivo tricíclico, esto es de interés clínico porque la toxicidad antidepresiva tricíclica es la principal causa de muerte por sobredosis intencional de drogas en los Estados Unidos, y de un segundo fragmento sFv anti-CD7 es específico para CD7, una glicoproteína transmembranal expresada a altas densidades en casi todas las leucemias linfoblásticas agudas de células T humanas, donde extracelularmente obtuvieron rendimientos que varían de 100 a 250 mg/L purificados con por afinidad usando una columna de DMI-Sefarosa.

Yoshimasu *et al.* (2002), ilustran la expresión de una pepsina A porcina recombinante soluble usando como huésped la cepa KM71 de *P. pastoris* y el plásmido pHIL-S1 como sistema de expresión, esta pepsina A recombinante mostró propiedades estructurales y bioquímicas similares a las de la proteína nativa la enzima recombinante se purificó 138 veces por intercambio aniónico y cromatografía en columna de afinidad obteniendo como producción alrededor de 30 mg/L.

Freyre *et al.* (2000), dan a conocer sobre el desarrollo de una cepa recombinante de la levadura metilotrófica *P. pastoris* que expresa un anticuerpo scFv antígeno carcinoembrionario (anti-CEA) extracelularmente como una proteína biológicamente activa, mediante la modificación del plásmido pPACIB.9 y el péptido señal de sacarosa invertida de *S. cerevisiae* obtenido un rendimiento de 1.2 g de scFv por litro de medio de cultivo después de 41 h de inducción.

Emberson *et al.* en el 2005 reportaron el uso de la levadura metilotrófica *P. pastoris* cepa KM71H y el plásmido pPICZ $\alpha$  con la secuencia señal del factor de apareamiento  $\alpha$  completo e incompleto para producir un fragmento variable de

cadena simple (scFv) anti-CD33, con la intención de conjugarse a un radioisótopo CD33 que es una glicoproteína de la superficie de células leucémicas obteniendo como resultado 48 mg/L (CS) y 11 mg/L (INCS).

CD14 es una proteína que media las respuestas biológicas inducidas por lipopolisacáridos (LPS) tales como la activación de un factor transcripcional, factor nuclear. Existe como una forma soluble (sCD14) en el suero que controla las respuestas de LPS de células epiteliales y endoteliales, así como una forma unida a la membrana (mCD14) en monocitos y macrófagos. Para obtener sCD14 en gran cantidad para su caracterización estructural y funcional, expresamos la forma completa de sCD14 recombinante humano (rsCD14) en una levadura metilotrófica, *P. pastoris* con la cepa GS115 y el plásmido pHIL-S1. La proteína recombinante se expresó en el sobrenadante del cultivo y se purificó mediante precipitación con sulfato de amonio, seguido de tres etapas de cromatografías de intercambio iónico. Consiguiendo 1.6 mg de la proteína en alta pureza a partir de 2 L del sobrenadante (Nomura *et. al.*, 2003).

Las proteínas recombinantes expresadas en *P. pastoris* a veces presentan problemas de purificación en columnas de Níquel. Se ha reportado que la falta de pureza de la muestra puede ser uno de los motivos por lo que la etiqueta de His+ no funcione durante la purificación por columna de Ni+, los contaminantes pueden ser de la propia cepa de *P. pastoris* entre ellos la alcohol deshidrogenasa mitocondrial isozima III (mADH), endonucleasa de reparación por escisión de nucleótidos y las proteínas hipotéticas TPHA\_0L01390 (*Tetrapisispora phaffii*) y TDEL\_0B02190 (*Torulaspora delbrueckii*,) que son proteínas homólogas derivadas. Para eliminar este problema se ha diseñado una nueva cepa de expresión de *P. pastoris* GS115 con el plásmido pGEX-4T-mADH que elimina dichos contaminantes predominante mADH, mediante la interrupción del gen. logrando disminuir un 55% las proteínas contaminantes sin afectar el crecimiento celular (Chen *et al.*, 2014). y el segundo, una posible razón sería el recorte de la etiqueta His C-terminal por proteasas en el sobrenadante.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

El fragmento scFv 6009F es capaz de neutralizar el veneno del escorpión *Centruroides noxius* ofreciendo ventajas al ser menos inmunogénicos que las inmunoglobulinas completas debido a su tamaño y origen humano. Sin embargo, su expresión en *E. coli* alcanza valores de 1.1 mg/L, aunque ha permitido realizar muchos estudios importantes de reconocimiento con tres venenos y al menos seis toxinas, sigue siendo baja. Por lo que ahora se busca un sistema de expresión que produzca mejores rendimientos y un anticuerpo soluble y biológicamente activo. *P. pastoris* es un sistema de expresión que ofrece ventajas en la producción de proteínas heterólogas como altos rendimientos, plegadas, solubles, biológicamente activas y secretadas en el medio. Por lo que en este trabajo se pretende utilizar el plásmido pHIL-S1 junto con las cepas compatibles de *P. pastoris* GS115 Y KM71 para obtener un mayor rendimiento comparado con el obtenido en *E. coli* y otras cepas en combinación de otros plásmidos para fines comparativos.

#### **5. HIPÓTESIS**

La expresión extracelular del fragmento scFv 6009F usando el plásmido pHIL-S1 en *P. pastoris* GS115 y KM71 permitirá obtener el anticuerpo soluble y biológicamente activo.

#### **6. OBJETIVO GENERAL**

Emplear las cepas *P. pastoris* GS115 y KM71 con el plásmido pHIL-S1, para la expresión del fragmento scFv 6009F extracelularmente, soluble y activo.

#### **7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Obtener extracelularmente el fragmento scFv 6009F en *P. pastoris* en las cepas GS115 y KM71 con el vector pHIL-S1.
- Comparar la producción del scFv 6009F en ambas cepas.
- Evaluar el reconocimiento del scFv 6009F frente a la toxina Cn2 y el veneno de *C. noxius*.

## 8. METODOLOGÍA

### 8.1 Sistemas biológicos

Los sistemas biológicos que se utilizaron para la realización de este proyecto fueron la cepa de *E. coli* Top10F, esta cepa proporciona una eficacia de transformación de  $1 \times 10^9$  CFU/ $\mu$ g de ADN plasmídico y son ideales para la clonación y propagación de plásmidos de alta eficacia, *E. coli* TG1 como control para la expresión de scFv 6009F y las cepas de *P. pastoris* GS115 (HIS4, Mut<sup>+</sup>) y KM71 (HIS4, Mut<sup>s</sup>) que utilizan el metanol como fuente de carbón y el fenotipo HIS4 les permite realizar recombinación homóloga con vectores compatibles y seleccionar las transformantes por auxotrofia de histidina.

### 8.2 Plásmidos

Se utilizó el vector pSyn1 construido por Riaño-Umbarila *et al.*, en el 2005 que contiene el fragmento de interés scFv 6009F. También se utilizó el plásmido pHIL-S1 de Invitrogen (Tabla 4 y Figura 8), contiene una señal de secreción (S) PHO1 para la obtención de la proteína soluble y activa al medio extracelular, es compatible con las cepas GS115 y KM71 de *P. pastoris*.

Tabla 4. Características del plásmido pHIL-S1.

GEN	CARACTERÍSTICAS
5' AOX1	Promotor AOX
(S) PHO1	Señal de secreción
MCS:	Sitio de clonación múltiple
(TT)	Transcrito de terminación
HIS4	Gen histidinol deshidrogenasa
PBR322	Origen para replicación en <i>E.coli</i>
f1 ori	Origen de replicación en fagos
Ampicilina	Gen de resistencia a ampicilina

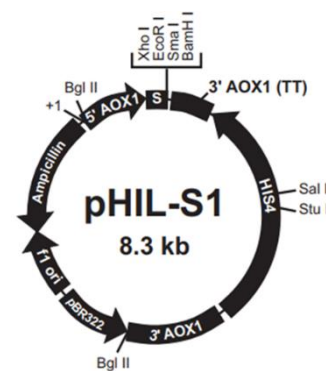


Figura 8. Plásmido pHIL-S1 para la integración en *P. pastoris*

### 8.3 Medios de cultivo

A continuación, se presenta una tabla de medios de cultivo que se utilizan para el crecimiento y expresión de proteínas en *P. pastoris*. En este trabajo se utilizaron los medios Luria-Bertani (LB) para expresar la construcción en *E. coli* TG1, BMGY y BMMY para la expresión en *P. pastoris* KM71 y GS115

Tabla 5. Medios para el crecimiento y expresión de *Pichia pastoris*.

Medio	Descripción	Aplicación
YPD o YEPD	Caldo rico y complejo	Crecimiento general y almacenamiento
MDH o MD	Medio mínimo que contiene glucosa y / o histidina	Determinación de Fenotipo Mut
BMGH o BMG	Medio mínimo tamponado que contiene glicerol y / o histidina	Expresión secretada: se usa para controlar el pH del medio y generar biomasa
BMMH o BMM	Medio mínimo tamponado que contiene metanol y / o histidina	Expresión secretada: se usa para controlar el pH del medio e induce la expresión de la proteína deseada
BMGY	Medio complejo tamponado que contiene glicerol	Expresión secretada: se usa para controlar el pH del medio y disminuir la actividad de la proteasa y generar biomasa.
BMMY	Medio complejo tamponado que contiene metanol	Expresión secretada: se usa para controlar el pH del medio, Disminuir la actividad de la proteasa e inducir la expresión.

### 8.4 Propagación del gen de interés en la cepa de *E. coli* Top10F

El gen de interés scFv 6009F se encuentra en el plásmido pSyn1 el cual se replicó en la cepa Top10F de *E. coli*. Esta cepa se reactivó en medio Luria-Bertani, y se cultivó en el mismo medio con ampicilina (100 µg/ml) y tetraciclina (10 µg/ml) por 24 h, y se seleccionaron las colonias con el vector pSyn1 y posteriormente se hizo la purificación del plásmido pSyn1, utilizando el kit Gene JET Plasmad Miniprep, una vez purificado el plásmido se comprobó realizando un gel de agarosa al 0.8 % y mediante un marcador de peso molecular GeneRuler de 1kb se corroboró el tamaño del plásmido correspondiente al peso molecular. Posteriormente se realizó una amplificación de PCR del gen scFv 6009F con oligonucleótidos previamente diseñados con adición de sitios de restricción para las enzimas *EcoRI* (5' G A A T T C 3') y *BamHI* (5' G G A T C C 3') (Tabla 6) que se unen específicamente en el fragmento del anticuerpo scFv 6009F con las siguientes condiciones de PCR: un

ciclo a 94°C durante 5 min, 30 ciclos a 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min y 72°C durante 1 min, con un ciclo de extensión final a 72°C por 10 min.

Tabla 6. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de PCR.

Oligonucleótidos específicos para la región scFv 6009F	
3971 FW	3'- GTA <b>GAA TTC</b> GAG GTG CAG CTG GTG G-5'
2856 RV:	5'- TTG <b>CGG ATC CTT</b> ATT AAT GGT GAT GAT GGT G-3'

Una vez obtenido la amplificación del scFv 6009F PCR se comprobó el peso molecular mediante la realización de un gel de agarosa al 0.8%, (Figura 9).

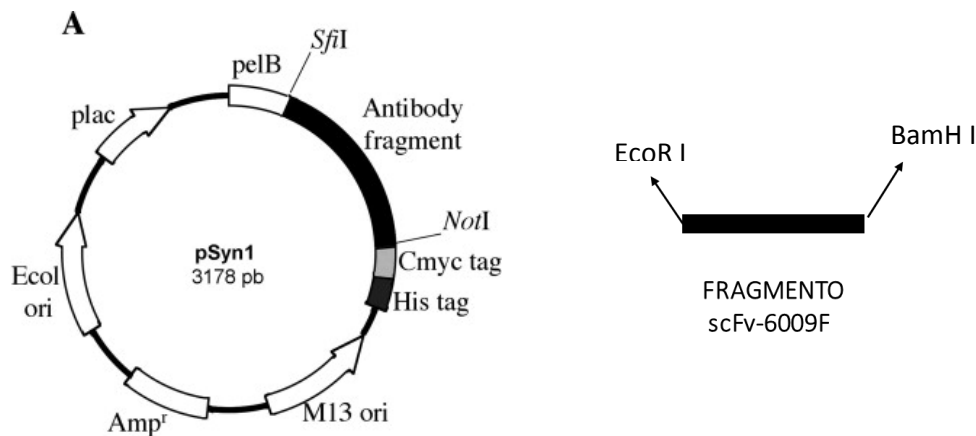


Figura 9. Extracción del fragmento scFv 6009F del plásmido pSyn1

### 8.5 Ligación del vector

Después de obtener el fragmento scFv 6009F ya amplificado con los sitios de restricción de las enzimas, se realizó la reacción de ligación con la enzima T4 ligase ADN (Thermo Scientific) en el vector pHIL-S1 y por medio de un gel de electroforesis de agarosa 0.8% se confirmó mediante el peso molecular, para esto se preparó una mezcla de reacción que se muestra en tabla 7, cabe destacar que se probaron varias proporcione DNA: Vector hasta determinar la óptima. La mezcla de reacción se incubó a 16°C durante 16 h, una vez obtenida la ligación se transformaron células quimiocompetentes de *E. coli* TOP10F para preservación y clonación del vector transformado, se seleccionaron en medio LB con Ampicilina (100 µg/ml) de las

cuales se tomaron colonias al azar y mediante secuenciación empleando los oligonucleótidos específicos de *P. pastoris* y los diseñados para el scFv 6009F se rectificó la construcción del plásmido.

Tabla 7. Componentes de una reacción de ligación

Componente	Proporción
ADN del vector Lineal	20-100 ng
Inserto de DNA	Relación molar de 1:1 a 5:1 sobre el vector.
Buffer 10x T4 DNA Ligasa	2 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas	Ajustar el volumen para 20 $\mu$ L
Volumen total	20 $\mu$ L

### 8.6 Transformación de *P. pastoris* y selección de clones recombinantes

Se linealizó el vector pHIL-S1/6009F con Sal I, esta enzima corta en el gen HIS4 favoreciendo la recombinación homóloga con el gen histidinol deshidrogenasa (his4) endógeno, no funcional de las células KM71 y GS115 de *P. pastoris*. Por lo tanto, la transformación complementaria la mutación de las células de *P. pastoris* que les impide la síntesis de histidina, y al integrar el plásmido pHIL-S1 esté complementa el gen, obteniendo así transformantes (His+) por auxotrofia capaces de crecer en medios con ausencia de histidina durante 3-4 días a 30° C.

Las células electrocompetentes de *P. pastoris* se prepararon antes de la transformación creciéndolas en medio YPD agar a una temperatura de 30° C durante 4 días hasta la aparición de colonia puras, subsiguientemente se cultivaron las colonias puras de *P. pastoris* en 50 ml medio liquido YPD en un tubo falcón y se incubara en agitación a 30°C durante 2 días después se inocularan 25 ml del cultivo en falcón a un matraz de 2 litros con 500 ml de medio YPD nuevo y se dejó crecer por 24 h en agitación a 30° C hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) de 600 nm.

Para la transformación se centrifugaron las células de *P. pastoris* 1500 rpm durante 5 minutos, se resuspendió el pellet con 50 ml de agua estéril y nuevamente se volvió a centrifugar en las misma condiciones y resuspendió nuevamente el pellet en ahora en 25 ml de agua estéril, se centrifugaron y resuspendió con 5 ml de sorbitol 1 M, centrifugar una vez más y por último se resuspendió el pellet con 250  $\mu$ l de

sorbitol 1 M, se almacenaron las células electrocompetentes para su posterior uso realizando alícuotas de 80 µl y almacenarlos a –80° C.

Para la transformación en *P. pastoris* se transfirieron 80 µl de células competentes a una cubeta de electroporación de 0.2 cm, se agregó el plásmido linealizado de pHIL-S1/6009F y se mezcló con una pipeta, se incubó en hielo durante 5 minutos y posteriormente se realizó la electroporación en un Bio-Rad\_GenePulser con las siguientes condiciones Tensión de carga (V): 2500; Capacitancia (µF): 25; Resistencia (Ω): 200. Inmediatamente se agregó 1 ml de sorbitol 1 M a la cubeta.

Se transfirió el contenido de la cubeta a un tubo estéril de 1.5 ml. Se dejó el tubo incubando a 30°C sin agitar durante tres horas. Posteriormente las células transformadas se cultivaron en medio MD donde se seleccionaron las colonias mediante auxotrofia de histidina a 30°C, aislando las transformantes con el gen completo del histidinol deshidrogenasa.

### 8.7 Análisis de PCR de transformantes de *P. pastoris*

Se realizaron extracciones de ADN genómico a partir de colonias puras para confirmar la integración del vector en el genoma. Mediante PCR con oligonucleótidos específicos AOX1 del kit de *P. pastoris* (Tabla 8), observando la presencia de la banda correspondiente a el fragmento de interés de aproximadamente 760 pb, como controles negativos se usaron el ADN genómico de *P. pastoris* sin transformar y el vector pHIL-S1.

Tabla 8. Oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen alcohol oxidasa.

	Oligonucleótidos del gen alcohol oxidasa (AOX1)
5' AOX1	5' GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3'
3' AOX1	5' GCAAATGGCATTCTGACATCC 3'

### 8.8 Expresión del anticuerpo scFv 6009F en *P. pastoris*

Para la expresión del fragmento scFv 6009F se seleccionaron las colonias de *P. pastoris* puras, se inocularon en 50 ml de medio BMGY en un matraz de 250 ml, incubando a 26°C con 170 rpm de agitación, hasta alcanzar una D.O. (600 nm) de



2-6 nm entre 16-18 h. Se transfirió el cultivo de 50 ml a un tubo Falcón del igual volumen y se centrifugó a 7,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y se recolectó el pellet. Se lavó el pellet, en 20 ml de BMMY para eliminar cualquier medio BMGY restante, ya que el glicerol del medio BMGY puede inhibir la expresión. Se centrifugo de nuevo a 7,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se decantó el sobrenadante para obtener solo la biomasa celular. El pellet se ajustó a una D.O. (600 nm) de 2.0 nm en 50 ml de medio BMMY en un matraz bafleado de 250 ml para iniciar la expresión, se incubo a 26°C durante 96 h. Se le agregó metanol puro a una concentración final de 0.5% para inducir la expresión durante 4 días. Se tomaron alícuotas de 1 ml al inicio de la expresión y cada 24 h, depositándolas en tubos de Eppendorf de 1.5 ml centrifugándolas a 7,000 rpm durante tres minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue transferido a otro tubo de Eppendorf de 1.5 ml, se almaceno a -80°C para posteriormente ser analizados mediante geles SDS-PAGE y Western Blot.

### **8.9 SDS-PAGE y análisis de Western Blot**

Las muestras de sobrenadante del cultivo se analizaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% de acuerdo para separar proteínas pequeñas (1-1,000 kDa). La electroforesis se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 80-120 Volts, durante 2.5 h. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie a temperatura ambiente y agitación constante, se uso una solución de desteñido que contiene 40% etanol, 10% ácido acético para revelar las bandas. Posteriormente se realizó la inmunodetección de la proteína recombinante implementando la técnica de Western Blot mediante la detección de la etiqueta Anti-His.

### **8.10 Purificar por columnas de Níquel**

La muestra recuperada se clarificará centrifugando 20 min, 10,000 rpm. El sobrenadante se recuperó y se transfirió a una columna de 10 ml, que contiene 3 ml de resina Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarosa (QUIAGEN). El sobrenadante final concentrado y dializado obtenido de la expresión del scFv 6009F en ambas cepas de *P. pastoris*

se pasó a través de la columna, para posteriormente lavarse con 20 ml de buffer PBS (NaCl 8.06 gr KCl 0.22gr Na HPO<sub>4</sub> 1.15g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). En un segundo lavado se agregó a la columna 10 ml de buffer de elución (Imidazol 25 mM) posteriormente un tercer lavado usando el buffer de elución (Imidazol 300 mM) donde la proteína eluye en fracciones de 500 µL, cada fracción se almacena en tubos eppendorf de 1.5 ml. Las proteínas obtenidas del proceso de purificación se evaluaron en un gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie y por Western Blot utilizando el anticuerpo Anti-His.

### **8.11 Cuantificación de proteína total**

La cuantificación proteína se llevó a cabo mediante el método Bradford utilizando como estándar de referencia la Albúmina de Suero Bovino, preparando distintos estándares con las siguientes concentraciones: 800, 400, 200, 100, 50 y 25 µg/ml.

El ensayo se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos, en cada pocillo se depositaron 10 µl de estándar más 200 µl del reactivo Bradford, se incubó por 5 min y se midió a una longitud de onda de 595 nm. Las muestras obtenidas de las expresiones de las cepas GS115 y KM71 se procesaron de la misma manera, posteriormente se realizó el cálculo para conocer la concentración proteínica de cada muestra de cada cepa.

### **8.12 Reconocimiento del scFv6009F frente a la toxina Cn2 y los venenos de**

#### ***C. noxius* y *C. lipimodus***

Para el reconocimiento del anticuerpo se utilizaron placas de ELISA las cuales se recubrieron durante la noche con 0.3 µg de Cn2 (100 µL/ pozo) en un tampón de bicarbonato a 50 Mm pH 9.4 a 4° C. Las placas se lavaron tres veces con NaCl / Pi y Tween al 0.1%, después se bloquearán con BSA al 0.5% en NaCl / Pi durante 2 horas a 37°C. Se añadirá el fragmento scFv 6009F en una proporción 1:10 a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a 37°C.

## 9. RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de la construcción del plásmido pHIL-S1 con la integración del fragmento scFv 6009F y su transformación en la cepa *E. coli* Top10F para su preservación y mantenimiento.

### 9.1 Obtención del gen scFv 6009F a partir del plásmido pSyn1

#### 9.1.1 Purificación del plásmido

Se reactivó la cepa de *E. coli* Top10F que contiene el plásmido pSyn1 con el gen del anticuerpo scFv 6009F mantenida en glicerol, se inoculó en medio líquido y agar LB. A partir de este cultivo se purifico el plásmido pSyn1 utilizando el protocolo del kit Gene JET Plasmad Miniprep (thermo scientific). Las reacciones de purificación de plásmido se corrieron en un gel de agarosa al 0.8% en una cámara de electroforesis por 40 min a 100 volts, el gel fue teñido con bromuro de etidio para su visualización con luz ultravioleta. En la figura 10, se observa en el carril 1 el marcador de peso molecular de 1 Kb, en los carriles 2, 3, 4, 5 y 6 una banda de 3,178 pb que corresponde al peso molecular del plásmido pSyn1 con el gen scFv 6009F.

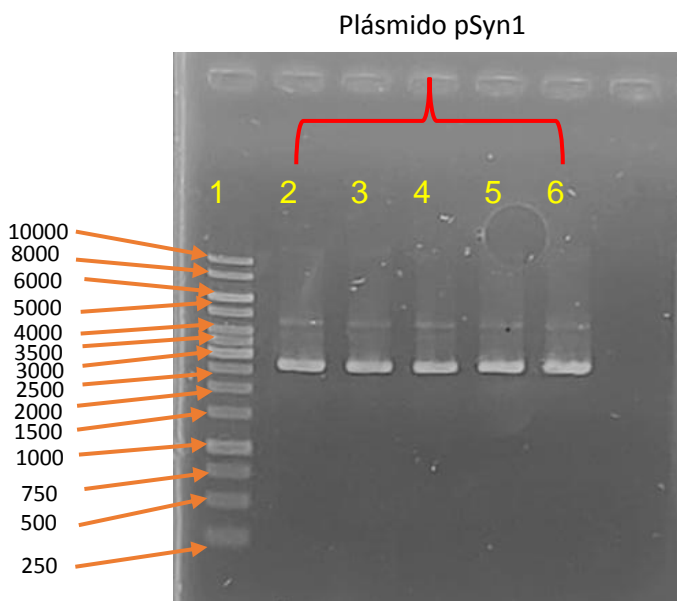


Figura 10. Purificación en Gel de agarosa al 0.8% por electroforesis de la del plásmido pSyn1.

### 9.1.2 Amplificación del gen scFv 6009F

Se utilizó el plásmido purificado como templado en la técnica de PCR junto con los oligonucleótidos 3971 Farword y 2856 Revers para amplificar el gen scFv 6009F. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 0.8% en una cámara de electroforesis por 40 min a 100 volts, el marcador de peso molecular en el carril 1 de 1 Kb, en los carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7 se obtuvo una banda de 823 pares de bases correspondiente al peso molecular del gen scFv 6009F más los sitios de restricción de las enzimas *EcoRI* y *BamHI* (Figura 11).

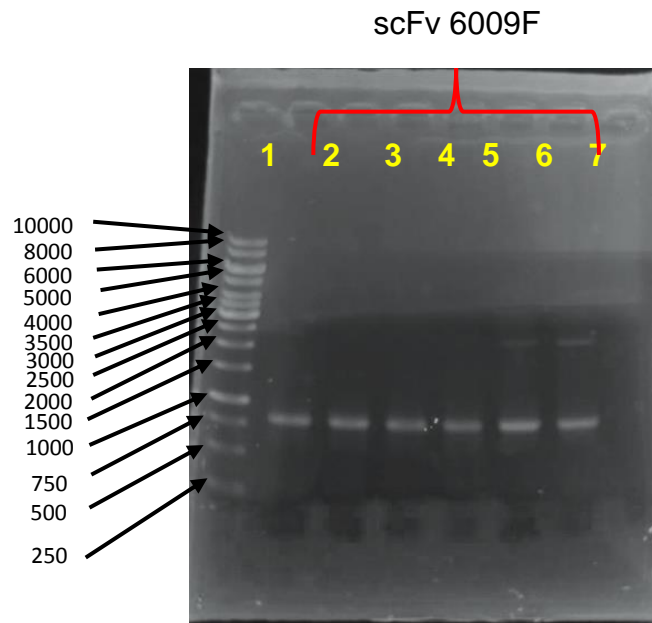


Figura 11. Amplificación por PCR del gen scFv 6009F

### 9.1.3 Reconocimiento de los oligonucleótidos diseñados en el gen scFv 6009F

Mediante la utilización del programa SnapGene se confirmó el apareamiento de los oligonucleótidos diseñado con el gen scFv 6009F. La secuencia del plásmido pSyn1 junto con los oligonucleótidos se introdujeron a un PCR virtual. El resultado arrojo la secuencia completa del gen scFv 6009F amplificada con los sitios de restricción de las enzimas de *EcoRI* y *BamHI* que fueron adicionados en los extremos a cada uno de los oligonucleótidos del gen (Figura 12). Estos sitios se añadieron para poder integrar el gen al plásmido pHIL-S1 y así poder ser expresado en la levadura *P. pastoris* en las cepas GS115 y KM71.



Figura 12. Reconocimiento de los oligonucleótidos en el fragmento scFv 6009F

### 9.2 Integración del plásmido pHIL-S1 en *E. coli* Top10F

El plásmido pHIL-S1 para la expresión en *P. pastoris* fue transformado en células competentes de *E. coli* Top10F para su mantenimiento y clonación, esto se confirmó mediante el crecimiento de colonias de *E. coli* en medio LB agar suplementado con los antibióticos Ampicilina y Tetraciclina, debido a que la cepa de *E. coli* Top10F posee un gen de resistencia a tetraciclina y el plásmido pHIL-S1 a Ampicilina y al presentarse colonias en el medio se confirma la integración del plásmido en la cepa bacteriana. Posteriormente las colonias se crecieron en medio LB líquido para

realizar una purificación de plásmido con el kit Gene JET Plasmad Miniprep (Thermo Scientific) y se verificó mediante la técnica de electroforesis. En la figura 13, se muestra el gel de agarosa al 0.8 %, en el carril 1 el marcador de peso molecular y en los carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7 las bandas de 8,300 pb que corresponden respectivamente al peso molecular del plásmido pHIL-S1.

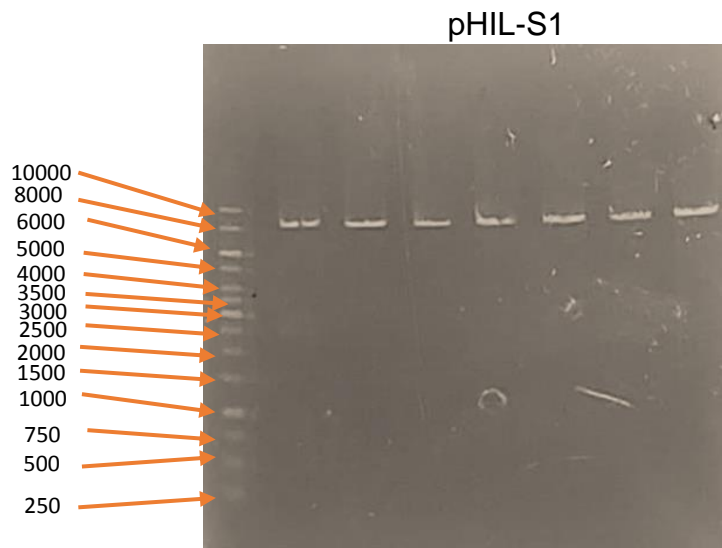


Figura 13. Purificación de plásmido de pHIL-S1 en gel de agarosa al 0.8%.

### 9.3 Ligación del plásmido pHIL-S1 con el gen scFv 6009F

Una vez purificados el gen scFv 6009F y el plásmido pHIL-S1, se sometieron a una doble digestión con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*, en el caso del inserto fue para retirar cualquier base nucleotídica de más y en el plásmido para poder linealizarlo y posteriormente poder integrar el gen scFv 6009F. La reacción para linealizar el plásmido y tratar el gen scFv 6009F se dejó por 2 horas a 37°C, pasando este tiempo se inactivaron las enzimas *EcoRI* y *BamHI* a 65°C. Se cuantificaron los productos mediante un Nanodrop y una vez determinadas las concentraciones de plásmido linealizado y gen scFv 6009 F se calculó la masa del inserto y del plásmido requerido para realizar las reacciones de ligación, mediante el programa NEBioCalculator, como resultado se obtuvieron las relaciones 3:1, 5:1 y 7:1. Siendo la proporción óptima 5:1.

### 9.3.1 Transformación del pHIL-S1/6009F en *E. coli* Top10F

Posteriormente después de realizar las reacciones de la ligación se transformó el nuevo plásmido pHIL-S1/6009F en células quimiocompetentes de *E. coli* Top10F y se sembraron en cajas de medio LB agar suplementadas con antibióticos (Ampicilina y Tetraciclina). Las colonias obtenidas se resembraron en medio LB liquido con los dos antibióticos ya antes mencionados dejándose crecer por 16 horas, consecutivamente cada colonia obtenida se resembró en medio LB agar y se dejó crecer durante un día, posteriormente se procedió a realizar un PCR de colonia con los oligonucleótidos AOX1 Forward y Reverse que amplifican el promotor alcohol oxidasa de la construcción del plásmido pHIL-S1/6009F. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 0.8% en una cámara de electroforesis por 40 min a 100 volts y se obtuvieron cuatro colonias positivas de 20 colonias obtenidas de la transformación de *E. coli* Top10F, lo que sugiere que quizá en las otras 16 colonias obtenidas posiblemente el plásmido se religó sin el inserto. Los resultados se muestran en la figura 14, en un gel de agarosa al 0.8 %, en el carril 1 el marcador de peso molecular de 1 Kb, en los carriles 2, 3, 4 y 5 la banda de 1,085 pb correspondientes al promotor AOX1 con el inserto del gen scFv 6009F de 823 pb y en el carril 6 y 7 el promotor AOX de 262 pb sin el inserto.

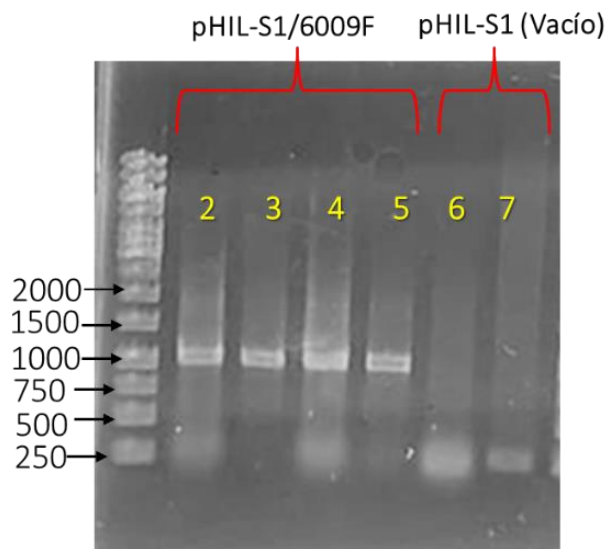


Figura 14. Gel de electroforesis de la Amplificación del gen AOX1 más el inserto scFv 6009F.

Las colonias positivas fueron confirmadas por el incremento en el peso molecular del plásmido pHIL-S1, su peso sin el gen es de 8,300 pb y con el gen scFv 6009F aumenta a 9,123 pb, es decir la suma  $8,300 \text{ pb} + 823 \text{ pb} = 9,123 \text{ pb}$ . Resultado que se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, en el carril 1 el marcador de peso molecular 1 Kb, en los carriles 2, 3, 4 y 5 el aumento del peso molecular de 9,123, esto comparado con el control negativo el plásmido pHIL-S1 sin el inserto del gen en los carriles 6 y 7 (Figura 15).

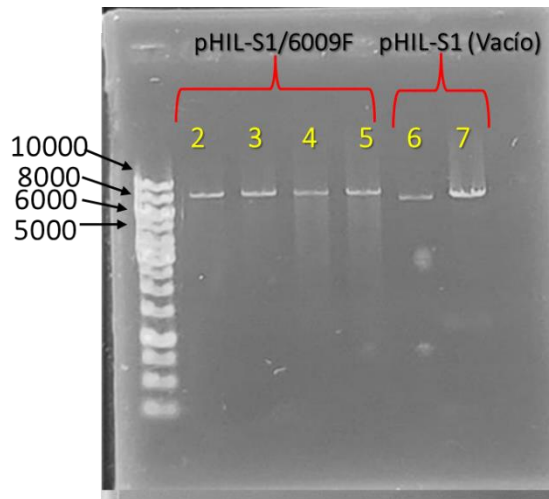


Figura 15. Electroforesis de la Purificación del plásmido pHIL-S1/6009F.



#### 9.4 Liberación del gen scFv 6009F del plásmido pHIL-S1/scFv 6009F

Para observar la liberación del fragmento de scFv 6009F del plásmido pHIL-S1 se realizó una doble digestión con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* a las cuatro clonas de *E. coli* Top10F obtenidas. El resultado de la doble digestión se visualizó en un gel de agarosa al 0.8% con luz ultravioleta. Se observó en el carril 1 el peso molecular del marcador 1 Kb, en los carriles 2, 3, 4 y 5 en la parte superior del gel una banda más intensa que corresponde al plásmido pHIL-S1 de 8,300 pb, en la parte inferior de dichos carriles se puede observar el gen scFv 6009F con un peso molecular de 823 pb (figura 16).

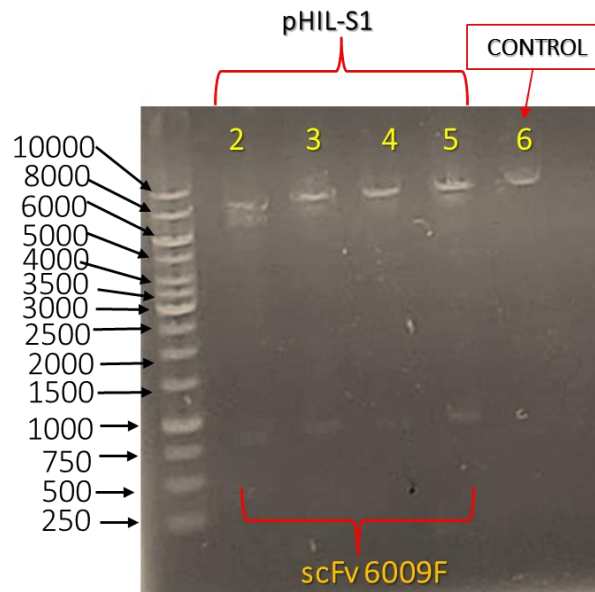


Figura 16. Liberación del gen scFv 6009 de las construcciones.

Los resultados sugirieron que las 4 clonas poseen las construcciones correctas, sin embargo, esto se confirmó mediante secuenciación. Para análisis se purificó y cuantificó el plásmido de la construcción pHIL-S1/6009F de las cuatro colonias. Los resultados obtenidos de la secuenciación se confirmaron mediante un BLAST de secuencias, obteniendo solo una construcción con el gen scFv 6009 F completo, sin mutaciones o alteraciones en la secuencia de la proteína, obteniendo un 100% de identidad con el scFv 6009F depositada en la base de datos de NCBI. Al analizar los resultados mediante el programa de SnapGene se verificó la integración del

inserto al vector con las etiquetas del epítopo C-Myc y los residuos de histidina para como se muestra en la figura 17.

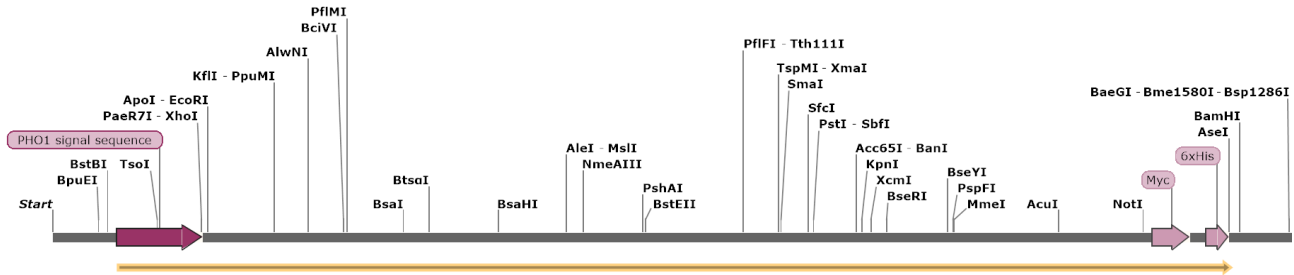


Figura 18. Mapa lineal de la secuencia del gen integrada en el plásmido de pHIL-S1.

Del mismo modo se ratificó el marco de lectura de la proteína, que inicia con la secuencia señal de la fosfatasa acida (POH1) y continua con la secuencia del gen scFv 6009F sin cambios, terminando con la etiqueta C-Myc, la etiqueta de histidinas y el codón de paro TTA de manera correcta.

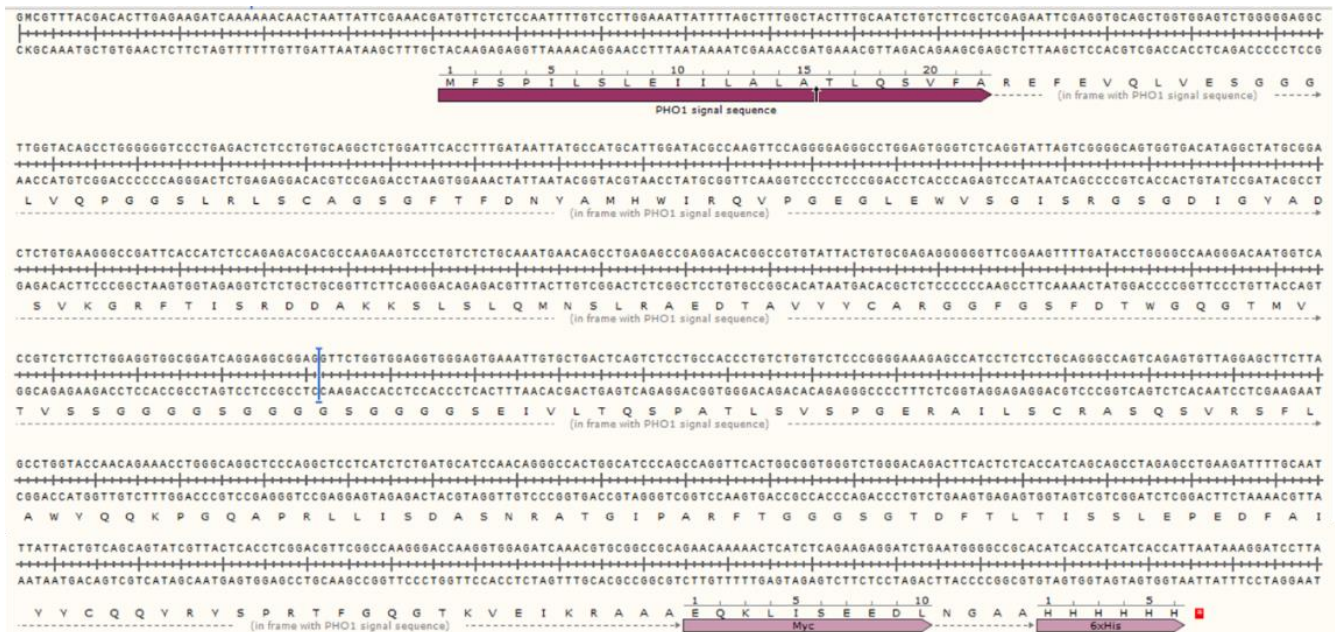


Figura 19. Marco de lectura del gen scFv6009F.

## 9.5 Transformación del pHIL-S1/6009F en las cepas de *P. pastoris* KM71 y GS115

El plásmido de la construcción pHIL-S1/6009F se confirmó por secuenciación y se mantuvo en *E. coli* Top 10 F, el plásmido se obtuvo mediante el kit de purificación y posteriormente fue linealizado con la enzima Salt 1 para la transformación de células electrocompetentes de las cepas de *P. pastoris* de KM71 y GS115. Las células transformadas fueron sembradas en un medio mínimo (MD) para la selección por auxotrofia de histidina, obtenidas las colonias se les realizó una extracción de DNA genómico y se realizó un PCR con los oligonucleótidos del promotor AOX1 del plásmidos pHIL-S1/6009F para confirmar cepas transformadas en *P. pastoris* y las amplificaciones se corrieron en un gel de agarosa a 0.8%, de los cuales solo se obtuvo una colonia confirmada para la cepa de KM71 y cinco de la cepa GS115 como se observan en la figura 19.

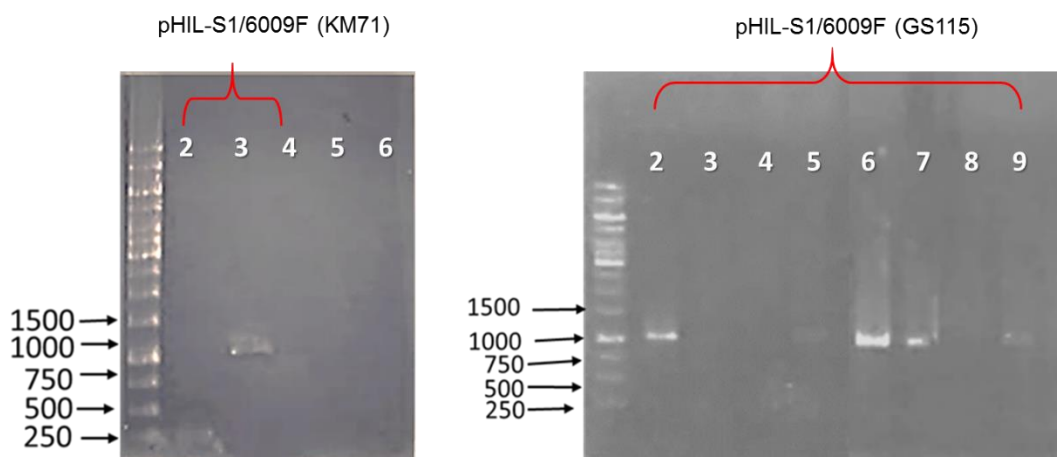


Figura 19. Electroforesis del gen AOX1 del plásmido pHIL-S1/6009F en las cepas KM71 y GS115.

## 9.6 Expresión del scFv 6009F en *P. pastoris* GS115 y KM71

Las colonias confirmadas por PCR de *P. pastoris* KM71 y GS115 se emplearon para la expresión del anticuerpo scFv 6009F. Se realizó un preinoculó de una clona para cada cepa en medio BMGY para crecimiento de las células y mantener la expresión reprimida, posteriormente la biomasa obtenía fue transferida al medio BMMY para la expresión del anticuerpo scFv 6009F, la inducción se realizó con 1% de metanol. Se tomaron muestras de 1 ml cada 24 h finalizando a las 96 h, éstas fueron

analizadas por geles de SDS-PAGE. Los resultados que se muestran en la figura 20 pertenece a la expresión en *P. pastoris* KM71 de la proteína scFv 6009F, observándose una banda en los carriles 4, 5, 6, y 7 con PM de 28 kDa correspondiente a nuestra proteína de interés y en el carril 8 una muestra purificada por columna de Ni<sup>2+</sup>-NTA proveniente de la misma expresión. En la figura 21 se muestra la expresión con la cepa de *P. pastoris* GS115 con dos bandas muy cercanas al PM de 28 kDa en los carriles 4, 5 y 6, En el carril 7 se muestra la purificación por columna de Ni<sup>2+</sup>-NTA de la expresión en GS115.

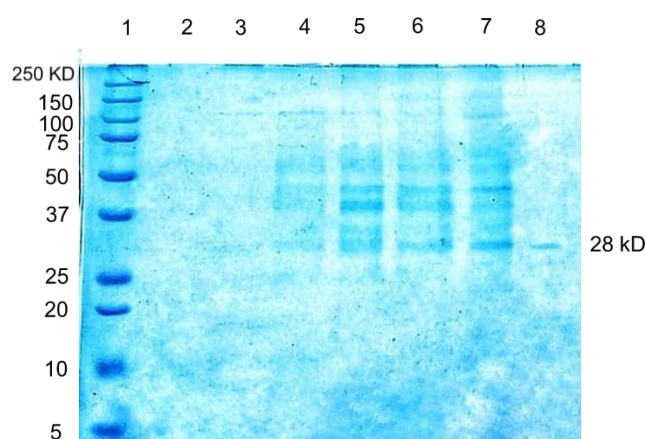


Tabla 9. Muestras KM71 en los carriles.

Carril	Muestra
1	Marcador molecular
2	0 h
3	24 h
4	48 h
5	72 h
6	96 h
7	Diálisis
8	Purificación por níquel

Figura 20. Gel de poliacrilamida SDS- PAGE de las horas de expresión del scFv-6009F en KM71.

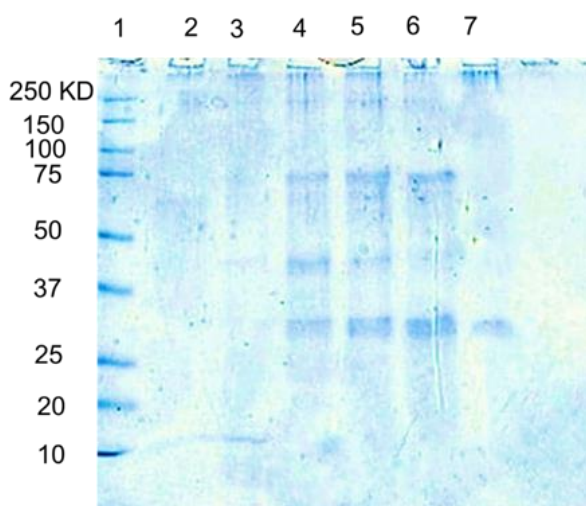


Tabla 10. Muestras de GS115 en los carriles.

Carril	Muestra
1	Marcador molecular
2	0 h
3	24 h
4	48 h
5	72 h
6	96 h
7	Purificación por Níquel

Figura 21 Gel de poliacrilamida SDS- PAGE de las horas de expresión del scFv-6009F en GS115.

### 9.7 Reconocimiento del scFv 6009F por Western Blot

Para el reconocimiento por Western Blot de las proteínas expresadas en ambas cepas de *P. pastoris* KM71 y GS115 se utilizó el anticuerpo Monoclonal Anti-poly Histidinae, el cual reconoce la etiqueta de 6 histidinas adicionada en el extremo del scFv 6009F. Se realizó un gel de SDS-PAGE y posteriormente fueron transferidas las proteínas a una membrana de nitrocelulosa donde se hizo el reconociendo con el Monoclonal Anti-polyHistidine. Se obtuvieron resultados positivos, de color azul intenso en el reconocimiento del scFv-6009F en ambas cepas de *P. pastoris* KM71 y GS115 como se muestran en la figura 22 y 23. Y algo importante de mencionar es que la cola de His esta accesible para reaccionar con el anti His

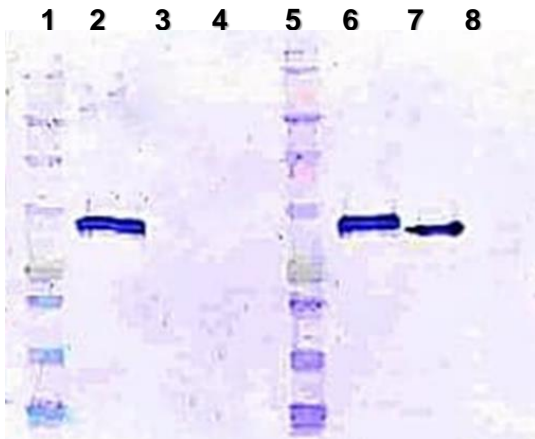


Tabla 11. Muestras de KM71 en los carriles Western Blot.

Carril	Muestra
1	Marcador molecular
2	pPIC9/6009F (Control)
5	Marcador molecular
8	pPIC9/6009F (Control)
9	<b>pHIL-S1/6009F Cepa KM71</b>

Figura 22. Western Blot del scFv 6009F expresado en la cepa KM71.



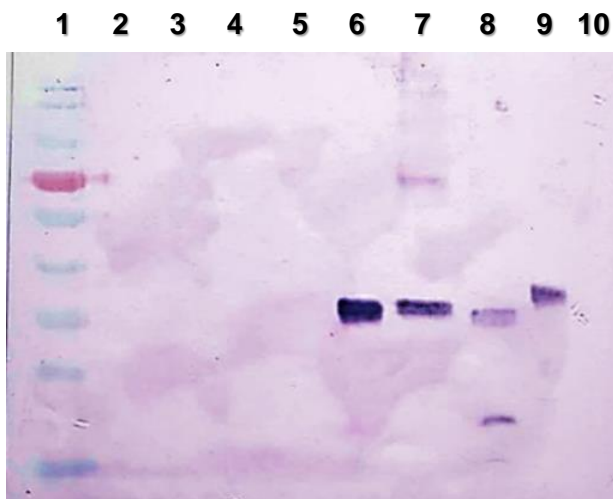


Tabla 12. Muestras de GS115 en los carriles del Western Blot.

Carril	Muestra
1	Marcador molecular
2	pPIC3.5/6009F sobrenadante GS115(Control)
3	pPIC3.5/6009F sobrenadante KM71(Control)
4	pPIC3.5/6009F pellet GS115 (Control)
5	pPIC3.5/6009F pellet KM71 (Control)
6	pPIC9/6009F Exclusión molecular GS115 (Control)
7	pPIC9/6009F GS115(Control)
8	<b>pHIL-S1/6009F Ceba GS115</b>
9	pPICZα/6009F GS115 (Control)
10	pPICZα/6009F X-33 (Control)

Figura 23. Western Blot del scFv expresado en la cepa GS115.

### 9.8 Cuantificación de proteínas.

La concentración proteica fue determinada utilizando el método de Bradford. Se utilizó el protocolo para placas de 96 de pozos, ya que requiere poca cantidad de muestra (10  $\mu$ L). Se prepararon estándares de albúmina sérica bovina. Una vez agregado el reactivo de Bradford, se colocó la placa en un shaker por alrededor de 30 segundos para mezclar el contenido de los pozos. Las muestras se dejaron incubar a temperatura ambiente 5 min. Transcurrido el tiempo de incubación se leyó la absorbancia de los pozos en un lector de microplaca a 595 nm. Se graficó la absorbancia para determinar la concentración proteica. La concentración proteica de la muestra problema se determinó comparando su valor contra la curva estándar.

Tabla 13. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

GS115	Absorbancia	Proteína	KM71	Absorbancia	Proteína
Sobrenadante	0.463	429 mg/L	Sobrenadante	0.373	299 mg/L
Concentrado	0.675	782 mg/L	Concentrado	0.620	652 mg/L
Concentrado/Dializado	0.587	634 mg/L	Concentrado/Dializado	0.540	557 mg/L
Purificación por Ni <sup>2+</sup> -NTA	0.333	212 mg/L	Purificación por Ni <sup>2+</sup> -NTA	0.322	194 mg/L

### 9.9 Reconociendo del scFv 6009F contra la toxina Cn2 y el veneno de *Centruroides noxius* y *Centruroides limpidus*

Mediante la técnica de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) se determinó la interacción del fragmento scFv 6009F en entre la Toxina Cn2 y los venenos completos de *Centruroides noxius* y *Centruroides limpidus* en una relación molar 1:10 fragmento/toxinas donde se demostró que el fragmento scFv 6009F producido en el plásmido en pPIC9 es el que presentó reconocimiento en el ensayo en comparación a los otros plásmidos y la producción en *E. coli* TG1. Como se observa en la figura 24, el anticuerpo con mayor reconocimiento es el expresado en *P. pastoris* pPIC9, seguido por pPICZαA, pHIL-S1 y *E. coli* TG1. Al momento solo se ha realizado un experimento de dicroísmo circular con la expresión en *P. pastoris* KM71/pPIC9, para ver su plegamiento, y tiene 8.02% de  $\alpha$  hélice y 22.14% de hoja  $\beta$ . Las proteínas expresadas en los plásmidos pPICZαA y pHIL-S1 al tener menor reconocimiento pueden estar plegadas de diferente forma, por lo que será importante hacer experimentos de dicroísmo circular con estas proteínas. Un plegamiento anormal evitaría una correcta interacción contra la toxina.

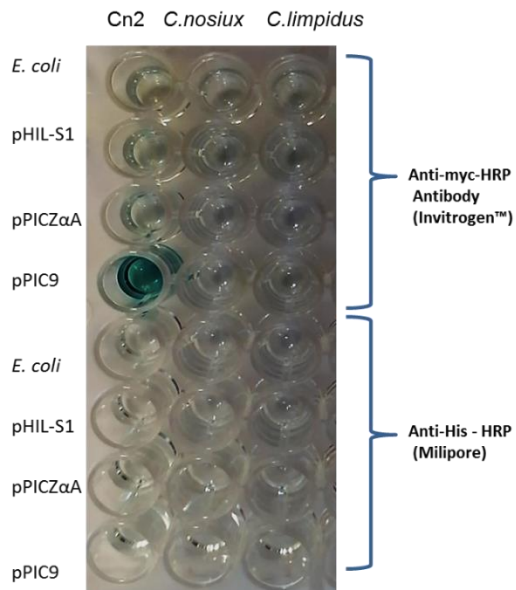


Figura 24. Reconocimiento de la toxina Cn2 y los venenos de *Centruroides noxius* y *Centruroides limpidus* contra scFv 6009F

## 10. DISCUSIÓN

En este trabajo se logró expresar el fragmento de anticuerpo scFv 6009F, mediante la utilización de las cepas *P. pastoris* KM71 y GS115 el plásmido pHIL-S1 es un sistema eucariótico y ofrece ventajas en las modificaciones postraduccionales como glicosilación, la formación de enlaces disulfuro y el procesamiento proteolítico, una maquinaria de plegamiento más especializado, crecimientos celulares altos en medios mínimos y una purificación simple de las proteínas expresadas secretadas. Se obtuvo un mayor rendimiento mucho mayor del anticuerpo scFv 6009F en ambas construcciones de *P. pastoris* GS115/ pHIL-S1 212 mg/L y *P. pastoris* KM71/ pHIL-S1 194 mg/L con respecto al 1.1 mg/L obtenido en *E. coli* reportado en el 2011 por Riaño-Umbarila.

El código genético de *P. pastoris* puede influir en el nivel de transcripción, la eficiencia de traducción, la vía secretora, la calidad de la proteína, la estabilidad del plásmido y el número de copias del plásmido es importante encontrar la combinación óptima de cepa y vector para expresar la proteína analizando dichos puntos en diferentes artículos sobre el tema (Ahmad *et al.*, 2014). Cabe mencionar que en nuestro grupo de trabajo se están utilizando diferentes cepas y plásmidos con la finalidad de elegir la mejor combinación para la producción del scFv-6009F de forma soluble y activa. Otro factor que determina la expresión y estabilidad de la proteína es la glicosilación. La glicosilación es una de las modificaciones post-traduccionales más comunes realizadas por *P. pastoris* no obstante el scFv 6009F no posee sitios de N glicosilación, pero sí de O glicosilación Serina y treonina. Es posible que *P. pastoris* O-glicosiló el scFv 6009F de forma aleatoria, causando posiblemente respuestas inmunes inapropiadas al paciente que use este anticuerpo si estas proteínas llegarán a ser utilizadas farmacéuticamente (Nett, *et al.*, 2013 y Idiris *et al.*, 2010). Otras complicaciones que pueden observarse en la producción de proteínas recombinantes secretadas por *P. pastoris* es que pueden degradarse por proteasas extracelulares, proteasas unidas a la célula y/o por proteasas intracelulares de células lisadas. Sin embargo, las proteasas extracelulares de *P. pastoris* no están bien documentadas según se reporta, secreta solo niveles bajos de proteínas endógenas (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). *P. pastoris* GS115 y KM71



en este caso y a las condiciones de expresión 28°C a 250 rpm en medio BMMY no produce proteasas que degraden al scFv 6009F.

Algo que se puede resaltar en este trabajo es que el plásmido pHIL-S1 permite expresar la proteína extracelularmente y de forma soluble en ambas cepas de *P. pastoris* GS115 y KM71. pHIL-S1 al igual que el plásmido pPic9 funciona bien para la expresión del scFv con la cepa *P. pastoris* GS115 como se muestra en la figura 23 (Adame, 2019). El plásmido pPICZαA usado como control en este trabajo solo ha expresado la proteína de forma soluble cuando se transforma en la cepa GS115 (Amezcuá, 2019). El plásmido pPic3.5 transformado en las cepas GS115 y Km71 en cambio expresa la proteína, pero no puede ser reconocida con el anticuerpo de histidinas (López, 2019), parece ser que existe la remoción de la cola de Histidinas por proteasas, al igual que sucede al usar el plásmido pPICZαA en la cepa X-33, que no posee delección de proteasas (García, 2019). Finalmente, los resultados obtenidos hasta el momento muestran que el fragmento scFv 6009F fue purificado por columna de níquel y reconocida por el anticuerpo Monoclonal Anti-polyHistidine en ambas cepas de *P. pastoris*. Hace falta realizar el reconocimiento de la toxina Cn2 de la cepa de KM71 y dicrósmos del scFv 6009F producido en ambas cepas KM71 y GS115.

## 12. CONCLUSIONES

Se obtuvieron dos construcciones para *P. pastoris* GS115/pHIL-S1 scFv 6009F se obtuvieron 90 mg/L y para *P. pastoris* KM71/pHIL-S1 scFv 6009F para ser expresadas y comparadas con la expresión en *E. coli* TG1 y con otras construcciones en el grupo de trabajo.

La expresión en *P. pastoris* GS115/ scFv 6009F produjo un total de 212 mg/L de proteína activa y soluble, es decir produce un 10 % más de proteína expresada en *P. pastoris* KM71/ scFv 6009F 198 mg/L. Los cambios se atribuyen a las diferencias en cepas una es de alto consumo de etanol y la otra de bajo.

Se evaluó el reconocimiento del scFv 6009F producido en *P. pastoris* GS115 contra la toxina Cn2 de *Centruroides noxius*, el veneno completo de *Centruroides noxius* y *Centruroides limpidus* mediante la técnica de ELISA, usando en Anti-His<sup>+</sup> y el Anti-myc para revelar, en una relación 1:10, tenido el mismo reconocimiento del scFv 6009F producido en pHIL-S1 y *E. coli* TG1 contra la toxina Cn2 . Hace falta evaluar el fragmento scFv 6009F expresado en *P. pastoris* KM71.

### 13. BIBLIOGRAFÍA.

Abroug, F., ElAtrous, S., Nouria, S., Haguiga, H., Touzi, N., & Bouchoucha, S. (1999). Serotherapy in scorpion envenomation: a randomised controlled trial. *The Lancet*, 354(9182), 906-909.

Ahmad, Z. A., Yeap, S. K., Ali, A. M., Ho, W. Y., Alitheen, N. B. M., & Hamid, M. (2012). scFv antibody: principles and clinical application. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012.

Al-Asmari, A. K., Kunnathodi, F., Al Saadon, K., & Idris, M. M. (2016). Elemental analysis of scorpion venoms. *Journal of Venom Research*, 7, 16.

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.

Arya, S. C. (2000). Antivenom therapy for scorpion bites. *Toxicon*, 38(12), 1627-1628.

Becerril Luján, B., Riaño, L., & Possani, L. (2014). Bancos de anticuerpos recombinantes de origen humano: una fuente ideal de antivenenos modernos contra la picadura de alacrán.

Borges, A., Miranda, R., & de Patiño, H. A. (2011). Los escorpiones y el escorpionismo en Panamá: volumen I. *Universidad de Panamá*.

Chen, Y., Li, Y., Liu, P., Sun, Q., & Liu, Z. (2014). Optimized expression in *Pichia pastoris* eliminates common protein contaminants from subsequent His-tag purification. *Biotechnology Letters*, 36(4), 711-718.

Chippaux, J. P. (2012). Emerging options for the management of scorpion stings. *Drug Design, Development and Therapy*, 6, 165.

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

Chippaux, J. P., Stock, R. P., & Massougbojji, A. (2010). Methodology of clinical studies dealing with the treatment of envenomation. *Toxicon*, 55(7), 1195-1212.

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: An Interdisciplinary Journal*, 18(2), 119-138.

de Roodt, A. R. (2015). Veneno de escorpiones (alacranes) y envenenamiento. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 49(1), 55-71.

Eldin, P., Pauza, M. E., Hieda, Y., Lin, G., Murtaugh, M. P., Pentel, P. R., & Pennell, C. A. (1997). High-level secretion of two antibody single chain Fv fragments by *Pichia pastoris*. *Journal of immunological methods*, 201(1), 67-75.

Emberson, L. M., Trivett, A. J., Blower, P. J., & Nicholls, P. J. (2005). Expression of an anti-CD33 single-chain antibody by *Pichia pastoris*. *Journal of Immunological Methods*, 305(2), 135-151.

Espino-Solis, G. P., Riaño-Umbarila, L., Becerril, B., & Possani, L. D. (2009). Antidotes against venomous animals: state of the art and perspectives. *Journal of Proteomics*, 72(2), 183-199.

Freyre, F. M., Vázquez, J. E., Ayala, M., Canaán-Haden, L., Bell, H., Rodríguez, I., & Gavilondo, J. V. (2000). Very high expression of an anti-carcinoembryonic antigen single chain Fv antibody fragment in the yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 76(2-3), 157-163.

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.

Gómez, J. P., & Otero, R. (2007). Ecoepidemiología de los escorpiones de importancia médica en Colombia. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 25(1), 50-60.

- Gwee, M. C., Nirthanan, S., Khoo, H. E., Gopalakrishnakone, P., Kini, R. M., & Cheah, L. S. (2002). Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 29(9), 795-801.
- Higgins, D. R., & Cregg, J. M. (1998). Introduction to *Pichia pastoris*. In *Pichia protocols* (pp. 1-15). Humana Press.
- Idiris, A., Tohda, H., Kumagai, H., & Takegawa, K. (2010). Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(2), 403-417.
- Jiang, Y., Li, F., Zha, D., Potgieter, T. I., Mitchell, T., Moore, R. & McKelvey, T. W. (2011). Purification process development of a recombinant monoclonal antibody expressed in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 76(1), 7-14.
- Khattabi, A., Soulaymani-Bencheikh, R., Achour, S., & Salmi, L. R. (2011). Classification of clinical consequences of scorpion stings: consensus development. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(7), 364-369.
- Liu, Y., & Huang, H. (2018). Expression of single-domain antibody in different systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(2), 539-551.
- Logez, C., Alkhalifioui, F., Byrne, B., & Wagner, R. (2012). Preparation of *Pichia pastoris* expression plasmids. In *Recombinant Protein Production in Yeast* (pp. 25-40). Humana Press.
- Ma, Y., He, Y., Zhao, R., Wu, Y., Li, W., & Cao, Z. (2012). Extreme diversity of scorpion venom peptides and proteins revealed by transcriptomic analysis: implication for proteome evolution of scorpion venom arsenal. *Journal of proteomics*, 75(5), 1563-1576.
- 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

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.

Melville N. A. (2011). FDA Approves First-Ever Antivenom for Scorpion Stings - Medscape - Aug 04, 2011.

Nett, J. H., Cook, W. J., Chen, M. T., Davidson, R. C., Bobrowicz, P., Kett, W., ... & Choi, B. K. (2013). Characterization of the *Pichia pastoris* protein-O-mannosyltransferase gene family. *PLoS One*, 8(7), e68325.

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.

Osnaya-Romero, N., de Jesús Medina-Hernández, T., Flores-Hernández, SS, y León-Rojas, G. (2001). Síntomas clínicos observados en niños envenenados por picaduras de escorpión, en el hospital infantil del Estado de Morelos, México. *Toxicon*, 39(6), 781-785.

Possani Postay, L. D. (2007). El estudio de los componentes del veneno de alacranes en el contexto de la biología molecular, la farmacología y la medicina. *Biotechnología*, 14, 177-87.

Riaño-Umbarila, L., Juárez-González, V. R., Olamendi-Portugal, T., Ortíz-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., Ledezma-Candanoza, L. M., Serrano-Posada, H., Fernández-Taboada, G., Olamendi-Portugal, T., Rojas-Trejo, S. & Becerril, B. (2016).

Riaño-Umbarila, L., Olamendi-Portugal, T., Morelos-Juárez, C., Gurrola, G. B., Possani, L. D., & Becerril, B. (2013). A novel human recombinant antibody fragment capable of neutralizing Mexican scorpion toxins. *Toxicon*, 76, 370-376.

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.

Santibañez-López, C. E., Francke, O. F., Ureta, C., & Possani, L. D. (2016). Scorpions from Mexico: From species diversity to venom complexity. *Toxins*, 8(1), 2.

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.

Teruel, R., & Melic, A. (2015). Orden Scorpiones. *Revista IDE@-SEA*, 18, 1-17.

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.

Villa-Manzano, A. I., Vázquez-Solís, M. G., Zamora-López, X. X., Arias-Corona, F., Palomera-Ávila, F. M., Pulido-Galaviz, C., & Pacifuentes-Orozco, A. (2016). Alacranismo severo causante de parálisis flácida aguda. Reporte de caso. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 54(2), 265-268.

Wells, E., & Robinson, A. S. (2017). Cellular engineering for therapeutic protein production: product quality, host modification, and process improvement. *Biotechnology Journal*, 12(1), 1600105.

Yoshimasu, M. A., Ahn, J. K., Tanaka, T., & Yada, R. Y. (2002). Soluble expression and purification of porcine pepsinogen from *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 25(2), 229-236.

Zhijian, C., Feng, L., Yingliang, W., Xin, M., & Wenxin, L. (2006). Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. *Toxicon*, 47(3), 348-355.





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)  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo  
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís  
Dra. Hilda Vázquez López  
Dra. Verónica Obregón Barbosa

Tesis: EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO scFv 6009F CON EL VECTOR  
pHIL-S1 EN *Pichia pastoris* GS115 Y KM71

Alumno que la presenta a revisión: **FERNANDO GUZMAN FLORES**

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)  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo  
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís  
Dra. Hilda Vázquez López  
Dra. Verónica Obregón Barbosa

Tesis: EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO scFv 6009F CON EL VECTOR  
pHIL-S1 EN *Pichia pastoris* GS115 Y KM71

Alumno que la presenta a revisión: FERNANDO GUZMAN FLORES

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. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO



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)  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo  
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís  
Dra. Hilda Vázquez López  
Dra. Verónica Obregón Barbosa

Tesis: EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO scFv 6009F CON EL VECTOR  
pHIL-S1 EN *Pichia pastoris* GS115 Y KM71

Alumno que la presenta a revisión: FERNANDO GUZMAN FLORES

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)  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo  
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís  
Dra. Hilda Vázquez López  
Dra. Verónica Obregón Barbosa

Tesis: EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO scFv 6009F CON EL VECTOR  
pHIL-S1 EN *Pichia pastoris* GS115 Y KM71

Alumno que la presenta a revisión: **FERNANDO GUZMAN FLORES**

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. VERONICA OBREGON BARBOZA



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)  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo  
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís  
Dra. Hilda Vázquez López  
Dra. Verónica Obregón Barbosa

Tesis: EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO scFv 6009F CON EL VECTOR  
pHIL-S1 EN *Pichia pastoris* GS115 Y KM71

Alumno que la presenta a revisión: **FERNANDO GUZMAN FLORES**

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. HILDA VAZQUEZ LOPEZ