



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**Detección de la hemaglutinina del virus de la influenza A/H1N1/2009 con
anticuerpos de cadena sencilla (scFv's) en un formato de ELISA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

OMAR RICHARD ALIAGA PALOMARES

TUTOR PRINCIPAL

CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTORAL

IVÁN SÁNCHEZ BETANCOURT

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTÉCNIA, UNAM

LAURA COBOS MARÍN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTÉCNIA, UNAM

Ciudad Universitaria. CD.MX. Agosto 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mi hija Valeria por inspirarme a seguir adelante y por sorprenderme cada domingo con una nueva ocurrencia.

A mis padres: Mauricio y Felicita por regalarme la vida y todo lo que soy.

A todos aquellos que siguen sus sueños sin importar las adversidades.

AGRADECIMIENTOS

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

Al Posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, FMVZ, UNAM.

Al Departamento de Inmunología del Instituto Nacional de Investigaciones Biomédicas, UNAM, por permitirme realizar el proyecto de tesis en sus instalaciones.

A la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón, por todas sus enseñanzas, paciencia y apoyo.

Al Dr. Iván Sánchez Betancourt, por sus enseñanzas y consejos.

A la Dra. Laura Cobos Marín, por sus buenas observaciones.

A la Dra. Mayra Silva Miranda, por su apoyo y consejos.

A mis compañeros de laboratorio: José Alberto, Paola, Minerva, Gabriela y Eduardo, por su compañía, consejos y apoyo.

A la Mtra. Cristina Parada Colín, por el trabajo que realizó durante este proyecto en la purificación de las proteínas recombinantes.

A Rafael, por su amistad e importante labor en el laboratorio.

A mis tías Rosa y Modesta, por su apoyo incondicional.

A Carmen, por ayudarme con las correcciones finales.

A Eréndira, por sus consejos y motivación.

A Miriam, por motivarme a seguir adelante.

RESUMEN

Las enfermedades infecciosas son un riesgo importante para la salud y la supervivencia tanto de los humanos como de los animales. Es por esto que el desarrollo de métodos de diagnóstico que identifiquen al agente infeccioso de forma rápida y específica es importante para implementar un oportuno tratamiento. Una de las técnicas más comunes usadas para la detección de los componentes antigénicos de los microorganismos es el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), en el cual se pueden utilizar anticuerpos monoclonales específicos contra los determinantes antigénicos de los patógenos. Tradicionalmente, estos anticuerpos se han producido en animales de experimentación. Sin embargo, en la actualidad existen tecnologías como las bibliotecas de anticuerpos desplegadas en fagos, que permiten la selección de las regiones variables de los anticuerpos y su producción en bacterias evitando el uso de animales. Estos anticuerpos de cadena sencilla son llamados scFv (del inglés single chain Fragment variable) en los cuales la porción variable de la cadena ligera y pesada que contienen las regiones de unión al antígeno, están ligadas mediante un péptido flexible.

En el presente trabajo, se evaluó el uso de anticuerpos scFvs previamente generados en contra de la hemaglutinina del virus de influenza A/H1N1/2009, como una alternativa para su uso en un ensayo de ELISA. Se seleccionaron 6 scFvs, cada uno de los cuales fueron modificados por la adición de un sitio aceptor de biotina y/o de un péptido con afinidad a una superficie de poliestireno. Con estas modificaciones, se evaluó la expresión de los 12 anticuerpos en *Escherichia coli*, donde únicamente 3 de las clonas mostraron un nivel de expresión de los scFv aceptable, la clona sp1H3-PS que contenía el péptido con afinidad a poliestireno, y las clonas sp1H3-B y el sp2H3-B que expresaron los scFvs con el péptido aceptor de biotina. Los anticuerpos fueron purificados por cromatografía de afinidad a níquel, pero ninguno de ellos pudo ser obtenido en forma soluble. Sin embargo, se logró la re-naturalización del scFv sp1H3-PS, la cual se llevó a cabo directamente en la placa de poliestireno. De esta forma, se diseñó un ELISA sándwich indirecto, donde el scFv unido específicamente a la placa de poliestireno se utilizó como anticuerpo de captura del antígeno (la hemaglutinina HA1 22009), la cual fue a su vez reconocida por el suero hiperinmune generada contra esta en conejo, el cual se utilizó como anticuerpo de detección. Bajo estas condiciones del ensayo, se demostró que el scFv sp1H3-PS mantuvo la afinidad por el antígeno para el cual fue seleccionado, al pasar de su forma unida al fago a la forma soluble. Los resultados del presente trabajo demuestran el uso potencial de los scFvs modificados con el péptido de afinidad a poliestireno en ensayos inmunoenzimáticos.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	8
1. Los microorganismos como agentes etiológicos de enfermedades	8
2. Diagnóstico de enfermedades infecciosas	8
3. Los anticuerpos	9
4. Fragmentos variables de cadena sencilla (scFv)	10
5. <i>Escherichia coli</i> como sistema de expresión	11
5.1. Cuerpos de inclusión	12
5.2. Purificación por el método His-Tag	12
6. Uso diagnóstico y terapéutico de los scFvs	12
7. Influenza	15
7.1. Influenza A/H1N1	16
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS	18
MATERIAL Y MÉTODOS	19
1. Anticuerpos scFv	20
2. Cinética de crecimiento de la cepa <i>E coli</i> rosetta DE3	20
3. Análisis de la expresión de los scFvs por SDS PAGE y Western Blot	20
4. Expresión y purificación de los scFvs seleccionados	21
5. Purificación de las proteínas por afinidad a níquel	22
6. Plegado de los scFvs por diálisis	22

7. Plegado de los scFvs biotinilados con protocolo de goteo	22
8. Plegado de los scFvs-PS <i>in situ</i>	22
9. Propuesta de un sistema de detección de la hemaglutinina HA1 22009 en un ELISA sándwich indirecto usando el suero hiperinmune anti hemaglutinina HA2209 generado en conejo, como anticuerpo de detección	23
10. Titulación del suero hiperinmune anti-HA1 22009	23
11. Detección de la hemaglutinina HA1 22009 usando un scFv con péptido de afinidad a poliestireno como anticuerpo de captura y el suero anti-hemaglutinina HA2209 como Ac de detección.	24
RESULTADOS	25
1. Cinética de crecimiento de las cepas de <i>E. coli</i> rosetta DE3	25
2. Expresión de los scFv-PS y scFv-B	27
3. Identificación de la expresión de los scFvs seleccionados en los extractos proteicos celulares	28
4. Purificación de los scFvs	28
5. Plegado de los scFvs	30
6. Titulación de suero hiperinmune anti- Hemaglutinina HA1 22009 (conejo)	30
7. ELISA para la detección de Hemaglutinina HA1 22009 usando scFv con péptido de afinidad a poliestiteno, suero anti-Hemaglutinina HA1 22009 y proteína A.	31
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIÓN	34
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Descripción gráfica de un anticuerpo.	9
Figura 2: Descripción gráfica de la formación de un scFv.	10
Figura 3: Mecanismo por el cual los scFvs pueden atravesar la barrera hematocefálica.	13
Figura 4: Esquema de las dos opciones de plegado de los scFv con péptido de afinidad al poliestireno.	14
Figura 5: propuesta de ELISA usando scFv-PS y scFv-B para la detección del antígeno HA1-22009 recombinante del virus de influenza A.	17
Figura 6: Diseño de ELISA alternativo usando suero hiperinmune anti-Hemaglutinina HA1 22009 en reemplazo de los scFv-B como anticuerpo secundario.	23
Figura 7: Cinética de crecimiento de las seis clonas de <i>E. coli</i> que expresaron los scFvs-PS; A) BM1C4-PS, B) BM1H3-PS, C) BM1C7-PS, D) SP2H3-PS, E) SP2F9-PS, F) SP1H3-PS.	25
Figura 8: Cinética de crecimiento de las seis clonas de <i>E. coli</i> que expresaron los scFvs-B; A) BM1C4-B, B) BM1H3-B, C) BM1C7-B, D) SP2H3-B, E) SP2F9-B, F) SP1H3-B.	26
Figura 9: Expresión de los scFvs en <i>E. coli</i>	27
Figura 10: Identificación de los ScFv en las fracciones celulares.	28
Figura 11 Purificación por cromatografía de afinidad a níquel de los scFv sp1H3-B y sp1H3-PS:	29
Figura 12: Titulación del suero anti-Hemaglutinina HA1 22009	30
Figura 13: Reconocimiento de la HA1 en un ensayo de ELISA sándwich indirecto --	31

Introducción

1.-Los microorganismos como agentes etiológicos de enfermedades

Al comienzo del siglo XX una de las causas de muerte más frecuentes eran las enfermedades infecciosas. En la actualidad, el control de las mismas se ha logrado gracias al conocimiento integrado de los procesos infecciosos, a la mejora en las prácticas sanitarias y al descubrimiento y uso de los agentes antimicrobianos (Madigan *et al.*, 2009). Cabe también destacar, la importancia del diagnóstico temprano en el control de estas enfermedades, ya que permite la rápida instauración del tratamiento y con esto una significativa reducción de la mortalidad y morbilidad, aportando ventajas económicas en la resolución del problema infeccioso (Ausina y Moreno, 2006).

Sin embargo, aunque vivimos en un mundo donde muchos microorganismos patógenos están controlados, estos pueden ser todavía un riesgo importante para la supervivencia tanto de los humanos como de los animales (Madigan *et al.*, 2009; Figueroa *et al.*, 1987).

El diagnóstico y el tratamiento inicial son por lo general más urgentes en las enfermedades infecciosas que en cualquier otro tipo de proceso patológico, ya que tanto la mortalidad como la morbilidad se pueden reducir en forma significativa si se inicia en etapa temprana el tratamiento adecuado. Por lo cual es importante desarrollar métodos de diagnóstico que identifiquen al agente infeccioso de manera rápida y específica (Ramos, 2012).

2.-Diagnóstico de enfermedades infecciosas

El diagnóstico de las enfermedades infecciosas puede ser realizado directamente por detección del agente causal, con métodos como: microscopia-tinciones o por detección de antígenos (Ags) del microorganismo o de anticuerpos (Acs) del paciente, generados contra el patógeno. También se pueden identificar por detección de toxinas o mediante el cultivo del agente y su caracterización por pruebas moleculares o bioquímicas (Ramos, 2012).

En el caso de la detección los Ags y/o Acs se puede usar una técnica llamada ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (**ELISA** por sus siglas en inglés). Existen varios sistemas de ELISA para detectar Ags y/o Acs, que tienen en común el recubrimiento de una fase sólida la (placa de ELISA) con el Ag o Ac, los cuales son incubados con reactantes secundarios o terciarios acoplados covalentemente con una enzima que permitirá la detección del reconocimiento entre las moléculas. Las no reconocidas por el Ag o Ac serán removidas por lavados y la detección de la unión se visualiza mediante la adición de un sustrato cromogénico cuyo color se

detecta visualmente o con ayuda de un lector de placas para ELISA (Arce, 2007; Stefura *et al.*, 2019).

3.-Los anticuerpos

Los Acs son los componentes principales de un inmunoensayo cuando se usan para la detección de un Ag blanco. Estas moléculas, muestran una elevada selectividad en la unión Ag-Ac a nivel molecular, por lo cual se aprovechan para generar pruebas sensibles en la detección de analitos usados en aplicaciones diagnósticas. El entendimiento de las características de los Acs y los métodos usados en su producción, purificación y modificación son importantes para su uso como herramienta de reconocimiento molecular (Hnasko, 2015).

Los Acs son glicoproteínas producidas por células plasmáticas que funcionan como receptores solubles de Ags. Su estructura consiste de 4 cadenas polipeptídicas; dos cadenas ligeras (L) de un peso molecular aproximado de 25 000 Da y dos cadenas pesadas (H) de un peso cercano a 50 000 Da. Una cadena L está unida a una cadena H mediante puentes disulfuro formando un heterodímero de 75 000 Da (L-H) y dos heterodímeros L-H se unen entre sí para formar la estructura básica del Ac constituida de cuatro cadenas; L-H-H-L. Los primeros 110 aminoácidos de las cadenas L y H son en extremo variables entre las distintas moléculas de anticuerpos y, por lo tanto, a esta región se le conoce como región variable (V) de la cadena pesada (VH) o de la cadena ligera (VL). Por su parte, la porción posterior de cada cadena pesada y ligera están formados por varios fragmentos de igual tamaño que la región variable y es muy conservada, razón por la cual se le denomina región constante (C) de la cadena pesada (CH) y región constante de la cadena ligera (CL) (Gutiérrez, 2010; Murray, 2007; Day y Schultz, 2014).

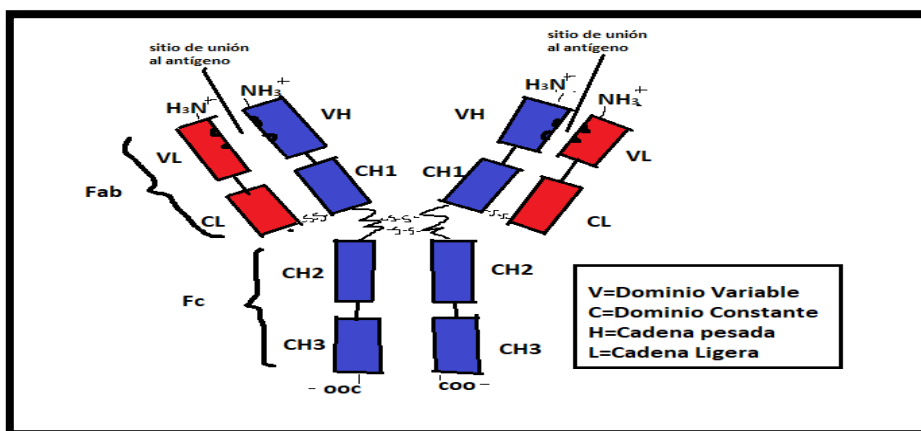


Figura 1.-La unidad básica de una inmunoglobulina consiste de dos cadenas pesadas idénticas (azul) y 2 cadenas ligeras (rojo). Las cadenas pesadas están unidas por puentes disulfuro. Los sitios de reconocimiento antigénico de las cadenas pesadas y ligeras se encuentran en la región Fab. (Ilustración hecha por el autor de la tesis).

Cuando se requieren Acs para los inmunoensayos se piensa como primera opción en los anticuerpos monoclonales (mAb), tecnología que fue desarrollada por Kohler y Milstein (1975). La tecnología, consiste en la producción de Acs homogéneos por una célula híbrida, producto de la fusión de un clon de linfocitos B descendiente de una sola y única célula madre con una célula plasmática tumoral. Este procedimiento requiere de la inmunización de animales (generalmente ratones), lo cual toma varios meses y aunado a esto, la producción de los Acs es un procedimiento laborioso que requiere de equipo especializado. Por otra parte, los pequeños mamíferos murinos no siempre proporcionan anticuerpos con alta afinidad hacia los antígenos específicos, necesarios para el desarrollo de ensayos más sensibles (Ahmad *et al.*, 2012; Kaku *et al.*, 2012).

4.-Fragmentos variables de cadena sencilla (scFv)

Las limitaciones en las técnicas tradicionales han conducido a varias investigaciones encaminadas a buscar alternativas; una de ellas ha sido la construcción de bibliotecas de Acs presentadas en fagos (Phage display), que permiten la selección y producción de los mismos. Las bibliotecas más utilizadas son la de los fragmentos de regiones variables (scFvs), que se construyen mediante combinación previa de los genes que codifican las regiones variables de los Acs en los linfocitos B y su posterior inserción en el fago (Ahmad *et al.*, 2012; Kaku *et al.*, 2012).

Un scFv consiste en una pequeña región funcional de un Ac, que corresponde al lugar donde se une al Ag; en la cual la porción variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada son ligadas con un péptido flexible de entre 15 a 20 aminoácidos. Los scFvs conservan la especificidad de unión al Ag del Ac natural de origen (ver Fig. 2) (Monnier *et al.*, 2013; Farajnia *et al.*, 2014).

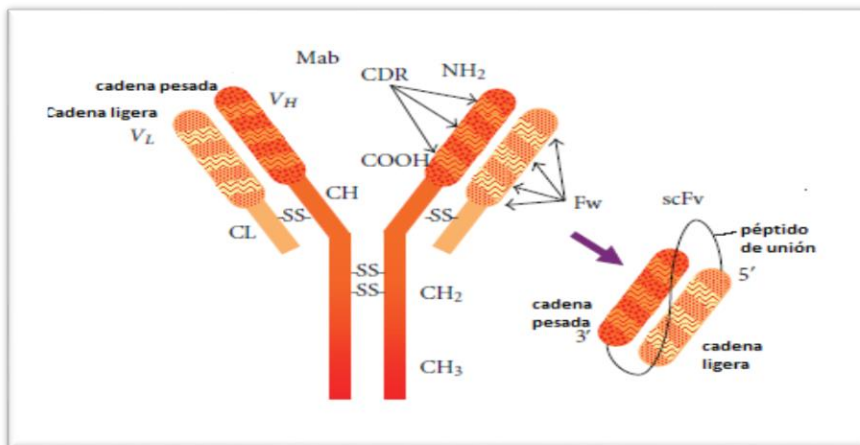


Figura 2.-Descripción gráfica de la estructura de un scFv (Ahmad *et al.*, 2012).

Algunas ventajas de los scFvs con respecto a las inmunoglobulinas (Ig) completas o a los fragmentos de unión al Ag (Fab, del inglés Fragment antigen binding) se deben a que debido a su menor tamaño por la pérdida de la porción Fc, mejoran la penetración en los tejidos, disminuyen el tiempo de vida en sangre y eliminan las indeseables respuestas inmunológicas mediadas por la región Fc. Estas propiedades son especialmente importantes para mejorar la farmacocinética y alcance de los medicamentos; Trenevsca *et al.* (2017), describen las ventajas del uso de los scFvs dirigidos contra Ags intracelulares, ya que utilizando los mismos mecanismos de internalización que los Acs completos, estos son resistentes a las condiciones reductivas del citosol, mismas que favorecen la ruptura de los enlaces disulfuro de una Ig completa, permitiendo el reconocimiento del Ag al interior de la célula (ver Figura 3). Además, estos Acs pueden ser producidos en variados sistemas: como plantas, levaduras y sistemas microbiológicos de expresión, en particular *Escherichia coli* (Monnier *et al.*, 2013; Farajnia *et al.*, 2014; Trenevska *et al.*, 2017).

5.-*Escherichia coli* como sistema de expresión.

Los scFvs pueden ser expresados en sistemas procariotas o eucariotas, Sin embargo *E. coli*, es uno de los organismos más utilizados en los sistemas procariotas para la expresión de proteínas recombinantes. La elección de *E. coli*, para estos fines, es debido principalmente al amplio conocimiento de su ingeniería genética y a la probada facilidad para optimizar la expresión de proteínas recombinantes. Una limitante de la expresión de los scFvs en esta bacteria, es la agregación de los mismos, condición que se conoce como cuerpos de inclusión (CI) y que limita su re-naturalización (Sina *et al.*, 2015).

Para la expresión de los scFvs, también se han utilizado otros sistema de expresión, un ejemplo son los scFvs dirigidos contra la proteína de señalización ErbB-2 que pertenece a la familia del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico y que tiene relevancia en el tratamiento del cáncer de mama. Este anticuerpo ha sido expresado en *E. coli*, en plantas transgénicas de tabaco, en levaduras y en un sistema libre de células. Específicamente, el sistema de expresión para el scFv contra ErbB-2 idóneo fue el de la planta de tabaco debido a su alto rendimiento y bajo costo de producción. Es importante mencionar que el sistema de expresión en *E. coli* juega un papel muy importante en las primeras etapas de obtención y caracterización de estos anticuerpos que pueden posteriormente ser modificados genéticamente (se les pueden fusionar otras moléculas que le confieren características específicas). En este caso, los sistemas de expresión eucariotes son muy útiles (Galeffi *et al.*, 2006).

5.1.-Cuerpos de inclusión

La formación de CI depende en gran medida de la propia proteína; la distribución de la carga, las cisteínas y las regiones hidrófobas suelen tener un importante impacto en la agregación de proteínas. Aunado a esto, los sistemas promotores fuertes, las tasas de temperatura de incubación y el ambiente oxidativo faltante del citoplasma bacteriano también favorecen la formación de CI. Sin embargo, la formación del CI ofrece una de producción eficiente de proteína recombinante, a costos de producción con varias ventajas: I) más del 30% de la proteína celular global se puede expresar como CI, II) la proteína está protegida de la degradación proteolítica, III) los CI pueden separarse fácilmente de los desechos celulares debido a su diferencia en densidad, y IV) los CI contienen hasta el 95% de la proteína recombinante y solo pequeñas cantidades de contaminantes (Eggenreich *et al.*, 2016).

5.2.-Purificación de las proteínas por cromatografía de afinidad por el método His-tag

En la purificación de proteínas recombinantes, pueden emplearse diversos procedimientos; algunos se basan en las propiedades fisicoquímicas de la proteína, por ejemplo: la carga, el tamaño y la hidrofobicidad. Estos procedimientos a menudo requieren mucho tiempo y son muy laboriosos.

Ante estas dificultades, se han desarrollado alternativas simples y rápidas para la purificación, las cuales hacen uso de una propiedad particular de una secuencia de aminoácidos; la cual se fusiona a la proteína recombinante como etiqueta de afinidad. Una de las secuencias usadas es la etiqueta de histidinas, las cuales interaccionan con níquel y el uso de quelatos metálicos permite la elusión y purificación de la proteína.

En contraste, con la mayoría de los procedimientos, la ventaja del uso de las etiquetas de histidina es que se pueden emplear también en condiciones de desnaturalización (Franken *et al.*, 2000).

6.-Uso diagnóstico y terapéutico de los scFvs

En el campo de la investigación los scFvs han tenido resultados positivos, por ejemplo, en modelos terapéuticos contra Cáncer, Alzheimer, Huntington y VIH. También, se han usado en técnicas diagnósticas como ELISA e imagenología en donde a los scFvs se le adicionan moléculas radiactivas (Monnier *et al.*, 2013; Farajnia *et al.*, 2014).

El uso de anticuerpos en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas es limitado, debido a la dificultad de estos para atravesar la barrera hematoencefalica

y alcanzar antígenos en el cerebro, por lo cual se deben usar dosis muy elevadas para alcanzar un efecto terapéutico mínimo. Monnier *et al.* (2013), describen una alternativa y es el uso de los scFvs ligados a una proteína de transporte, que utilice el tránsito mediado por receptores endógenos de la barrera hematoencefalica y con esto aumentar la cantidad la concentración en el cerebro (ver Fig. 3) (Monnier *et al.*, 2013).

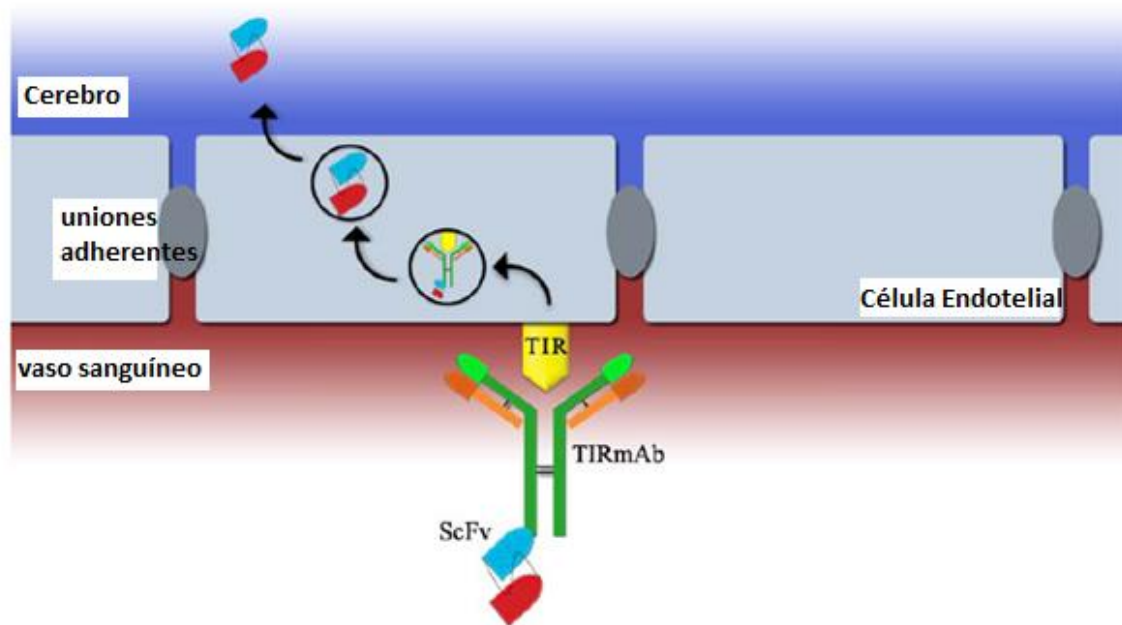


Figura 3: Mecanismo por el cual los scFvs pueden atravesar la barrera hematoencefalica. Los scFvs ligados a anticuerpos específicos generados contra receptores de la barrera hematoencefalica, como los receptores de transferrina (TIR) pueden alcanzar el cerebro y coayudar a tratamientos contra enfermedades tales como Alzheimer y Huntington (Monnier *et al.*, 2013).

Los Acs scFvs se han usado para identificar Ags, así mismo mediante la adhesión de diversos componentes pueden ser dirigirlos hacia múltiples sitios blanco donde pueden ejercer su función diagnóstica o terapéutica. Della *et al.* (2015), produjeron scFvs con especificidad contra CD22, un antígeno tumoral marcador de leucemias, ligándolos a la exotoxina A para dirigirlos específicamente a receptores de membrana de células cancerígenas. Midiendo la inhibición en la producción de una proteína marcadora del metabolismo de las células tumorales, comparando el efecto del scFv ligado a la exotoxina, la exotoxina sola y el scFv. Los resultados mostraron que se detuvo el crecimiento y multiplicación de las células tumorales de forma específica por la interacción del Ac ligado a la inmunotoxina (Della *et al.*, 2015).

Gilgunn *et al.* (2016), usaron un inmunosensor electroquímico, el cual se basaba en el uso de nanopartículas de platino electrostáticas conjugadas con los scFvs, con especificidad hacia el Ag prostático, complementándose con mAbs con la misma especificidad fijados a discos de oro. Los resultados mostraron una mayor sensibilidad en la detección del Ag con los scFvs comparado con un ELISA convencional, en este formato se detectó la variación de miliamperes producto de la unión Ag-Ac, demostrando que con estos Acs se puede optimizar el diagnóstico de cáncer prostático (Gilgunn *et al.*, 2016).

La implementación del uso de los scFvs en un formato de ELISA conlleva la dificultad de la adsorción correcta de los anticuerpos a las placas, Kumada *et al.* (2009), propusieron la adición de un péptido con afinidad a poliestireno (PS), en la región C-terminal del Ac, a fin de dirigir adsorción de los scFvs a la placa de PS preservando su afinidad. De esta forma se buscó mantener expuesta la región de reconocimiento del Ag en los scFvs. Se evaluaron dos formas de pegado de los Acs modificados a la placa; En la primera el plegado del Ac se llevó a cabo por diálisis y posteriormente se pegó directamente a la placa, en la segunda el plegado del Ac se hizo directamente en la placa (Fig. 4) (Kumada *et al.*, 2010).

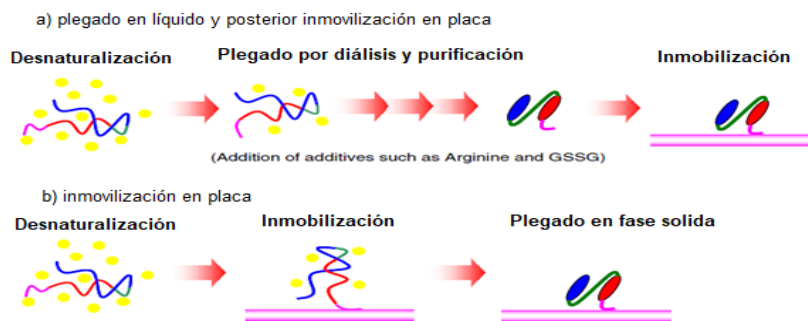


Figura 4.-Esquema de las dos opciones de plegado de los scFvs con péptido de afinidad a poliestireno, a) plegado en líquido y posterior inmovilización en placa, b) inmovilización en placa con el péptido de afinidad a poliestireno y posterior plegado mediante lavados (Kumada *et al.*, 2010).

Kumada *et al.* (2009) compararon la eficiencia de reconocimiento de los scFvs dirigidos contra la proteína CRP, con la de los mAbs dirigidos contra esta misma proteína. En su ensayo pegaron a las placas de PS los scFvs con el péptido de afinidad a PS y/o los mAbs en concentraciones de 1, 0.5, 0.25 y 0.12 μg por pozo. Los resultados mostraron que a concentraciones de 1000 ng/mL del Ag y 0.12 μg de scFvs se alcanzaron 2 U. A., en contraste con la misma concentración de Ag y 0.25 μg de mAbs, en donde solo se obtuvo 1 U. A. En este trabajo se concluyó que la mayor eficiencia de los scFvs-PS puede ser atribuida al posicionamiento del Ac proporcionado por el péptido agregado, con lo cual la gran mayoría de sitios de unión al Ag quedan expuestos.

En un formato de ELISA sándwich indirecto, además del scFv de captura, es necesaria la contraparte para la visualización del reconocimiento del Ag, para esto se han formulado técnicas que permiten biotinilar diferentes moléculas que incluyen los Acs *in vivo*, mediante la incorporación de una secuencia peptídica aceptora de biotina que es reconocida por la enzima BirA de la bacteria *E coli*, la cual une la biotina a la lisina presente en la secuencia y así una vez marcados es posible usar los scFv como Acs secundarios (Yang *et al.*, 2004; Graslünd *et al.*, 2017).

En el presente trabajo, se utilizaron 6 scFvs con afinidad por el Ag recombinante HA1 del virus de influenza A/H1N1/2009 que fueron previamente seleccionados en nuestro laboratorio (Vallecillo *et al.*, datos no publicados,) a partir de una biblioteca de fagos. Los scFvs fueron modificados independientemente por la adición de uno u otro, el péptido de unión a PS o el péptido aceptor de biotina.

7.- INFLUENZA

La altamente contagiosa enfermedad respiratoria aguda, hoy conocida como influenza, parece que ha afectado a los humanos desde tiempos muy antiguos. La súbita aparición de enfermedades respiratorias que persisten por pocas semanas e igualmente desaparecen, son características suficientes para poder identificar un número de epidemias mayores en el pasado. Una de estas epidemias fue reportada por Hipócrates, el padre de la medicina, en el año 412 a.C. Así mismo, numerosos episodios similares también fueron descritos en la Edad Media (Ayora, 1999).

La influenza es una enfermedad respiratoria infecciosa, contagiosa y aguda que se distribuye mundialmente durante todo el año, con preferencia en los meses de invierno, de acuerdo a la estacionalidad de cada continente presenta un cuadro clínico con fiebre, cefalea, mialgia, escurrimiento nasal, postración, dolor de garganta y tos (Secretaría de Salud, 2014). Esta enfermedad puede llevar a un cuadro de neumonía y falla respiratoria aguda, frecuentemente complicándose con una co-infección bacteriana (Peteranderl *et al.*, 2016). Dentro de los grupos de riesgo se encuentran principalmente niños menores de 5 años de edad, ancianos, diabéticos, personas con enfermedades cardiovasculares, personas con VIH e inmunodeprimidos en general. La OMS reporta que se presentan mil millones de casos de gripe estacional a nivel mundial cada año (Secretaría de salud, 2014). Esta enfermedad es causada por un virus ARN (ocho segmentos) perteneciente a la familia orthomyxoviridae y existen tres tipos de virus de influenza A, B y C. Los subtipos están definidos por proteínas de superficie: hemaglutinina y neuraminidasa (Secretaría de Salud, 2014; Nelson y Holmes, 2007).

La severidad de la enfermedad puede variar dependiendo de diversos factores (edad, condición inmunológica, enfermedades previas) y aunque en la mayoría de

las personas produce una enfermedad leve, en otras puede convertirse en una afección seria que incluso puede causar la muerte. Los registros hospitalarios muestran cómo la influenza puede ocasionar un aumento en la incidencia de neumonías y enfermedades respiratorias bajas, resultando en un mayor número de hospitalizaciones y muertes (Secretaría de Salud, 2014).

7.1.- Influenza A/H1N1

El virus A (H1N1) causa una enfermedad respiratoria aguda y altamente contagiosa, que ocurre en los cerdos y que es causada por uno de los varios virus de Influenza tipo A que circulan en estos animales. El virus se transmite entre los cerdos a través de aerosoles por contacto directo o indirecto y existen cerdos que son portadores del virus y son asintomáticos. Los virus de influenza porcina son comúnmente del subtipo H1N1, aunque también circulan otros (H1N2, H3N1, H3N2) (Goodell *et al.*, 2013; Madec, 2009).

En abril de 2009 fue identificado en Texas, California y en una pequeña localidad de La Gloria, Veracruz, una nueva variante del virus influenza A, dicho virus que tenía la capacidad de transmitirse de cerdo a humano y de humano a humano, se denominó SOIV (en inglés swine origen influenza virus). El virus inició su transmisión en la población humana desde México a Estados Unidos; en corto tiempo se diseminó por todo el hemisferio a múltiples países. Para el 6 de julio de 2009, la OMS dejó de reportar el número de casos confirmados de más de 120 países que para ese momento ya alcanzaba 94.512 casos, con 429 muertes (Vargas, 2010). Los estudios genéticos del nuevo agente infeccioso determinaron que fue originado por mecanismos de recombinación genética, los virus que se recombinaron fueron: virus de influenza de origen porcino norteamericano, porcino euroasiático, virus aviar y virus humanos. Para el 2010, la OMS reportó la muerte de 8768 personas debido a esta enfermedad (Vargas, 2010; Dawood *et al.*, 2009).

El cuadro clínico que presenta esta variedad de influenza se manifiesta con: aumento de secreción nasal, tos y dolor de garganta, fiebre alta (mayor a 38°C), malestar general, pérdida del apetito, dolor en los músculos y en las articulaciones, vómitos y diarrea. En casos de mala evolución se presenta desorientación y pérdida de la conciencia (Vargas, 2010). En cuanto al diagnóstico confirmatorio de esta enfermedad, hay varios tipos de pruebas de diagnóstico de influenza disponibles en entornos clínicos con sensibilidades y especificidades variables, incluidos ensayos de detección de antígenos y ensayos moleculares (detección de ácido nucleico) utilizando muestras de vías respiratorias. Entre ellas tenemos como las más efectivas y confiables el cultivo viral y el RT-PCR (Ahn *et al.*, 2019; Chow *et al.*, 2019; Vargas, 2010). La signología inespecífica y la falta de métodos de diagnósticos más rápidos y de menor complejidad propicia la búsqueda de nuevas opciones. En el presente trabajo se analizaron 6 anticuerpos scFvs previamente generados en

contra de la HA1 del virus de influenza A/H1N1/2009, como una alternativa para su uso en el inmunoensayo, los cuales habían sido previamente obtenidos en nuestro laboratorio (ver anexo 1). Cada uno de los 6 anticuerpos fue modificado con la adición de un péptido que sirve como aceptor de biotina *in vivo* GLNDIFEAQKIEWHE (scFv-B) y los mismos 6 scFvs independientemente fueron también modificados con un péptido que tiene una alta afinidad por superficies de PS RIIIRRIRR (scFv-PS). En la Fig 5, se presenta el diseño original de ELISA sándwich indirecto para la detección de la HA-1 recombinante, en el cual se planteaba usar el scFv-PS como Ac de captura y el scFv-B como Ac de detección.

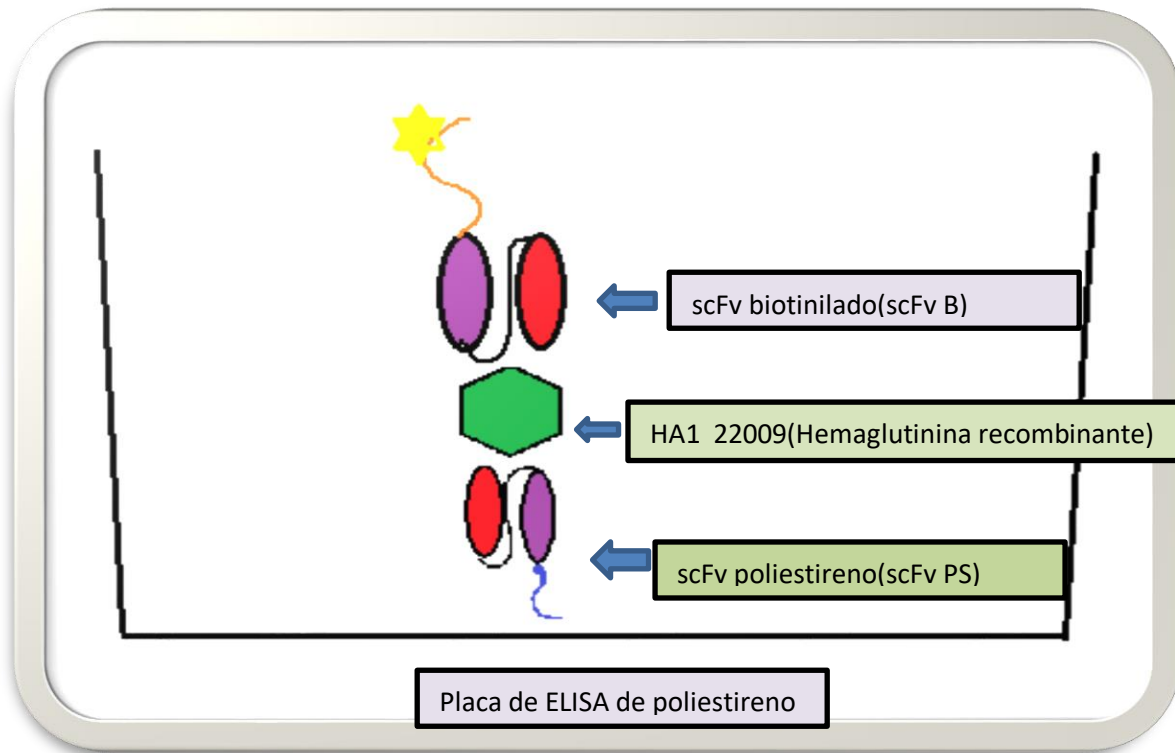


Figura 5: Propuesta de ELISA sándwich indirecto usando scFv-PS y scFV-B para la detección del antígeno HA1-22009 recombinante del virus de influenza A.

JUSTIFICACIÓN

Ante la necesidad de generar métodos de detección de antígenos con mayor sensibilidad y especificidad, se plantea que el uso de scFvs modificados, con lo que se espera lograr el desarrollo de un ensayo de inmunodetección más eficiente.

HIPÓTESIS

El uso de anticuerpos scFvs anti Hemaglutinina HA1-22009 modificados con péptido de unión a poliestireno y con péptido aceptor de biotina permitirá el reconocimiento de la proteína del virus de influenza A/H1N1/2009.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

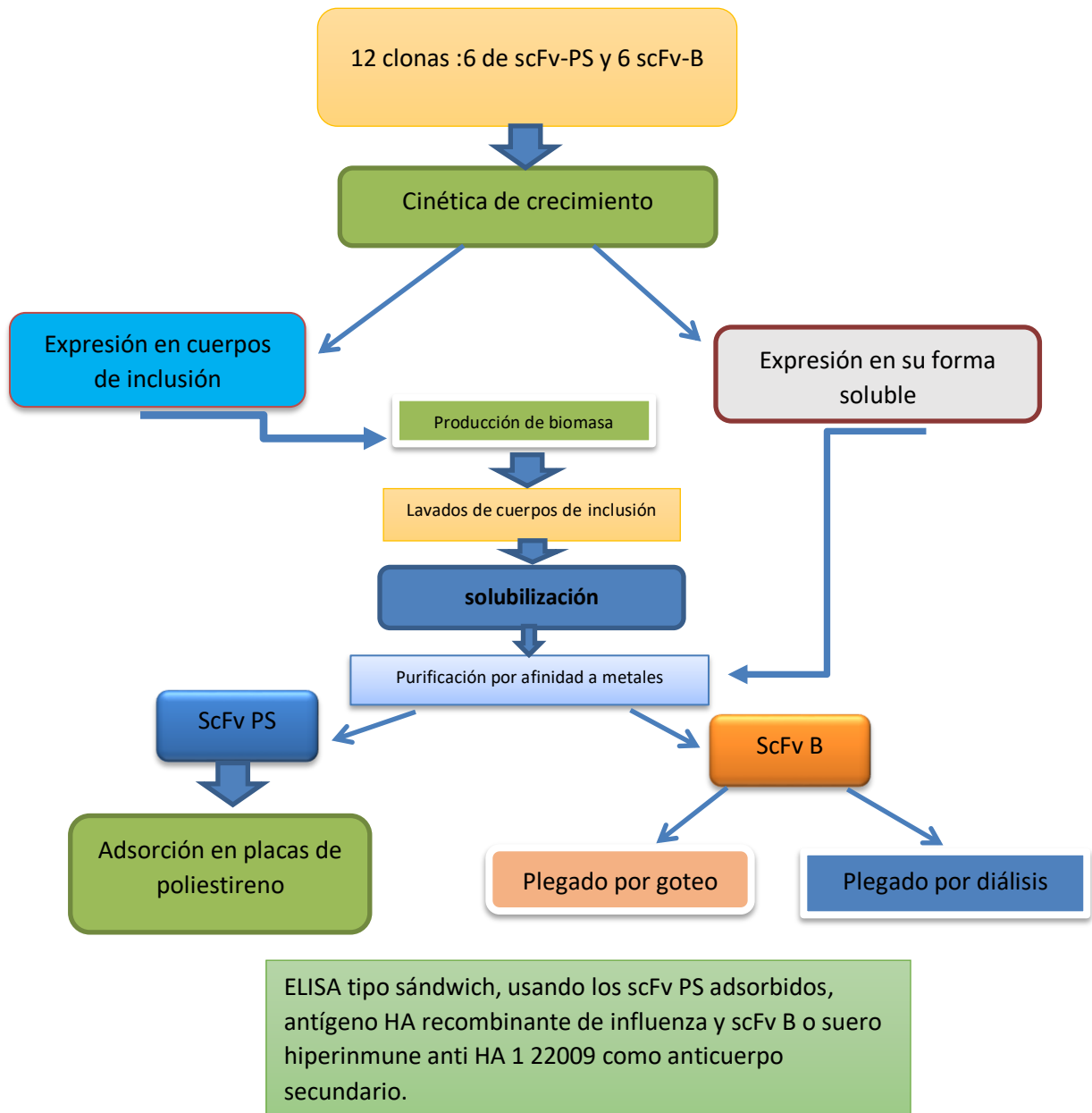
Estandarizar un ELISA tipo sándwich para reconocer la Hemaglutinina HA1-22009 mediante el uso de scFv-PS unidas a la placa y scFv-B como reactante secundario.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar la expresión y solubilidad de los scFvs para ser usados en un ELISA de captura y su potencial en el reconocimiento de la proteína Hemaglutinina HA1-22009.
- Estandarizar el protocolo de adsorción de scFvs-PS a placas de poliestireno.
- Estandarizar la detección de la proteína recombinante hemaglutinina HA1-22009 con los scFvs PS adsorbidos a las placas de poliestireno y los scFv-B usados como reactantes secundarios para el revelado.
- Comparar el uso de los scFvs-B y suero hiperinmune anti-Hemaglutinina HA1-22009 como reactivo secundario para el revelado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño Experimental



1.- Anticuerpos scFv

Se utilizaron 6 clonas recombinantes de *E. coli* transformadas con scFvs. Las clonas se obtuvieron al partir del tamizaje de 2 bibliotecas de anticuerpos desplegadas en fagos que fueron construidas a partir de la información genética de células de bazo (sp) y de medula ósea (BM), obtenidas de conejos inmunizados con la proteína recombinante HA1. De los animales inmunizados también se obtuvo el suero policlonal anti-HA1.

Cada uno de los anticuerpos obtenidos fueron modificados con un péptido aceptor de biotina (B) (sp1H3-B, sp2F9-B, BM1C7-B, BM1C4-B, sp2H3-B, BM1H3-B) y con una secuencia que permite la unión de los Acs a PS (sp1H3-PS, sp2F9-PS, BM1C7-PS, BM1C4-PS, sp2H3-PS, BM1H3-PS). (Vallecillo *et al.* ver anexo 1).

De esta forma, los anticuerpos con el péptido PS serían usados para cubrir las placas de PS esto con el propósito de lograr una orientación y exposición de los sitios de reconocimiento de los Acs. Por otra parte, los Acs marcados con la biotina se usarían como anticuerpos secundarios. Se incluyó también el suero policlonal anti-HA1 22009.

2.-Cinética de crecimiento de la cepa *E. coli* rosetta DE3

A partir de las alícuotas en glicerol de la *E. coli* Rosetta (DE3) transformada con cada uno de los 12 plásmidos pET22b que codifican para los scFVs, se sembraron las bacterias en Luria-Bertani (LB) agar suplementado con carbenicilina (100 µg/mL) (Sigma) (LB-Carb). Colonias individuales de cada caja fueron sembradas en 10 mL de LB-Carb. Los cultivos se crecieron a 37°C, en agitación a 200 rpm en incubadora (Infors HT, Suiza) toda la noche (aprox 16 h). Posteriormente, el cultivo se diluyó 1:100 en 50 mL LB-Carb. A fin de obtener las curvas de crecimiento de las bacterias se midió la densidad óptica (DO_{600nm}) de los cultivos cada hora con un espectrofotómetro (Jenway 6305, UK), (Ausubel *et al.*, 2005).

3.- Análisis de la expresión de los scFvs por SDS PAGE y Western Blot

El pre-cultivo y el cultivo de todas las clonas recombinantes se llevó a cabo como se describe arriba. A las 3 h se agregó el inductor (IPTG 250 µM). Los cultivos de dejaron a 37°C en agitación por 4 h más y las bacterias fueron entonces colectadas por centrifugación a 4500 rpm por 15 min (Hettich Rotina 420r, Alemania).

Los pellets se re-suspendieron en 10 ml de PBS, y 10 µl de cada uno, fueron resueltos en SDS PAGE al 12%. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF y se visualizaron usando la tinción azul de Coomassie. Después de ser bloqueadas con albumina sérica bovina (BSA) al 3% en PBS (PBS-BSA), se

incubaron con un anticuerpo anti-histidina marcado con peroxidasa (anti-hisHP), diluido 1:1000 (Roche), en PBS-BSA Tween 20 0.05% (PBS-T) en agitación por 1h a temperatura ambiente (TA). Después de 5 lavados con PBS-T las membranas fueron reveladas por la adición de 3 mg/mL de 3-3 diaminobenzidina (Sigma) en PBS-T y 3% H₂O₂ 1:1000 (Coligan *et al.*, 2001).

4.-Expresión y purificación de los scFvs seleccionados

Del primer tamizaje de los anticuerpos, únicamente las clonas sp1H3PS, sp1H3B y sp2H3B, mostraron un nivel de expresión adecuado. Estas fueron entonces crecidas en 600 mL de LB-Carb en matraces, a 37°C, en agitación a 200 rpm en incubadora (Infors HT, Suiza). Después de inducir la expresión con IPTG 250 µM, la biomasa fue recolectada como se describió anteriormente. El pellet fue resuspendido en 2 mL de buffer lisis por cada gramo de biomasa (Tris-HCl 50mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, PMSF 100 mM, lisozima 10 mg/mL, MgCl₂ 5 mM, Triton-x 100 1%); la muestra se mezcló en vortex suavemente y se incubó a 37°C por 30 minutos a 300 rpm en agitador (Thermomixer confort Eppendorf, Alemania). Posteriormente, se agregó a la muestra 1 mg/mL DNasa 1 (invitrogen) y se incubó a 37°C por 20 minutos en agitación. Las muestras fueron entonces sonicadas en hielo por 1.5 min (30 s de pulso por 30 s de descanso) a 50% de amplitud (Sonics Vibra cell, USA). El producto sonicado, se colocó en tubos de 1.5 mL y se centrifugó a 13 500 rpm durante 20 min a 4°C (centrifuga 5415C Eppendorf, Alemania). El sobrenadante, el extracto soluble (ES) se separó en un tubo de 50 mL. La pastilla conteniendo los CI se re-suspendió en 1200 µL de buffer de lavado Triton X-100 pH 8 (TrisHCl 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, Triton-x 100 0.5%, DTT 1 mM) y se mezcló en el vortex. La muestra se centrifugó a 13 500 rpm durante 20 min a 4°C el procedimiento se repitió 3 veces más. El ultimo lavado se llevó a cabo con el buffer (TrisHCl 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM) y finalmente, los CI se solubilizaron en 10 mL con el buffer TrisHCl 50mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, DTT 0.1 mM, urea 8 M). La muestra se dejó en agitación por 3 días (rockerMix 1030 Brinkmann, USA), al cabo de los cuales, se centrifugó a 13 500 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se almacenó a -70°C hasta su uso. Para evidenciar la presencia de la proteína se corrió un SDS-PAGE al 12% y un Western Blot para detectar los scFvs con el anti-hisHP (Coligan *et al.*, 2001).

5.-Purificación de las proteínas por afinidad a níquel

Los Acs fueron purificados del sobrenadante de los CI solubilizados en el sistema AKTA prime (GE Healthcare, USA) usando una columna Histrap^{MT} (GE Healthcare, USA). La purificación se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes usando urea 8M en todos los buffers. Después de equilibrar la columna con el buffer de unión (urea 8 M, Tris HCl 50 mM, NaCl 100 mM, Imidazol 20 mM, pH8) la muestra fue

cargada y la columna lavada con este mismo buffer. Posteriormente, los Acs fueron eluidos con el buffer de elución (urea 8 M, Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, Imidazol 500 mM) a un ml/min usando un gradiente de (0-100%) de buffer de elución. Para evidenciar la presencia de la proteína se corrió un SDS-PAGE al 12% de las fracciones donde se visualizaron los picos de elución, y se confirmó la presencia del scFv por Western Blot utilizando un anti-hisHP (Vallecillo *et al.*, 2017).

6.-Plegado de los scFvs por diálisis

Los picos eluidos, se dializaron en un buffer Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM pH 8, con concentraciones decrecientes de urea: 8 M, 4 M, 2 M, 1 M, 0.5 M y finalmente 0 M.

7.-Plegado de los scFvs biotinilados con protocolo de goteo

Para los anticuerpos biotinilados, se utilizó el método de dilución por goteo para lograr el plegamiento de las proteínas. Las muestras se diluyeron 100 veces en buffer de fosfatos 50 mM pH 6.5 adicionado con arginina 200 mM y CaCl₂ 1 mM. La dilución por goteo se realizó a 4 °C con agitación suave. La muestra se concentró a un volumen final de 1 mL utilizando tubos de filtración Millipore (Merck™, USA) de un punto de corte de 10,000 DA. La presencia de la proteína se verificó mediante SDS-PAGE al 12%.

8.- Plegado de los scFvs PS *in situ*

En vista de que el péptido de unión a PS permite el plegamiento de los anticuerpos solubilizados en urea 8 M directamente en las placas de PS, se utilizó el protocolo reportado por Kumada *et al.* (2010). Brevemente, los pozos se cubrieron con 0.25, 0.5, 1 2 y 4 µg de los scFvs con péptido de afinidad a PS diluidos en 100 µL PBS-T (vol final 200 µl) las muestras se incubaron durante 3 h a 25°C sin agitación (Thermomixer confort Eppendorf, Alemania). Terminado el tiempo de incubación, las placas se lavaron con PBS-T para ser usadas en el ELISA.

9.-Propuesta de sistema de detección de la hemaglutinina HA1 22009 en un ELISA sándwich indirecto usando el suero hiperinmune anti Hemaglutinina HA1 22009 generado en conejo

Debido a que no fue posible plegar los scFv-B que se usarían como anticuerpos de detección, se modificó el ELISA sándwich indirecto (Fig. 6) utilizando como Ac de captura el scFv scFv-PS, y el suero hiperinmune anti-HA1 en reemplazo del scFv-B como Ac de detección. Este suero fue generado en los conejos inmunizados con la proteína recombinante HA1 de donde se obtuvo el material genético de las células de bazo y medula ósea utilizado para generar la biblioteca de scFvs.

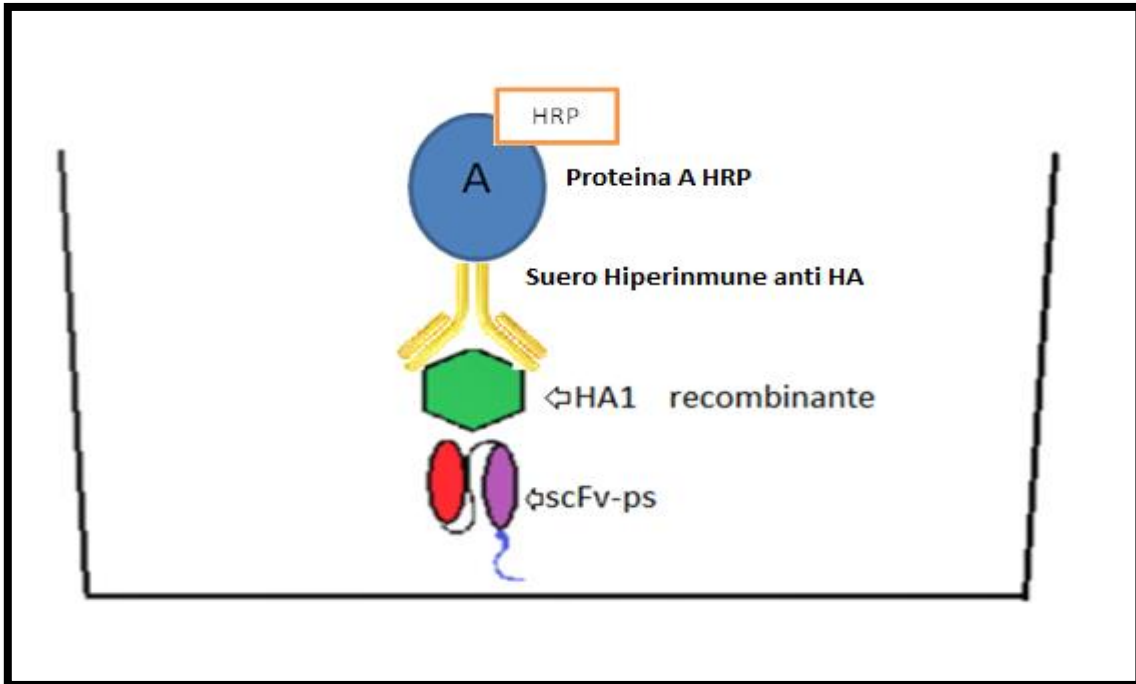


Figura 6: Diseño del ELISA sandwich indirecto alternativo con el suero hiperinmune anti-HA1 en reemplazo del scFv-B como anticuerpo de detección.

10.-Titulación de suero anti-HA1 (conejo) usando HA1 recombinante.

El suero anti-HA1 generado en conejo, se tituló utilizando diferentes diluciones del suero y concentraciones del Ag pegado a la placa. El Ag, la HA1, se diluyó en buffer de carbonatos en un volumen final de 100 μ L por pozo. La placa se incubó a 37°C durante 16 h (Thermomixer confort Eppendorf, Alemania). Al día siguiente, la placa se lavó 5 veces con 200 μ L de solución de lavado (PBS 1X, tween-20 al 0.05%) por 3 min cada uno y en agitación (rockerMix 1030 Brinkmann, USA). Enseguida se añadió 200 μ L de solución de bloqueo (PBS 1X, Tween-20 (PBS-T) al 0.05%, BSA 2%) y se incubó por 2 h a temperatura ambiente y en agitación, después de 3 lavados, se adicionó el suero anti-HA1 por duplicado diluido 1/50, 1/100, 1/200 y 1/300 en solución de incubación PBS-T-BSA y se incubó a TA y en agitación por 1 h. Posteriormente después de 3 lavados la placa añadió proteína A-HRP diluida 1/1000 en solución de incubación, y se incubó 1 h a TA en agitación. La reacción se reveló con 50 μ L de solución reveladora (citrato de sodio 0.1 M, ácido cítrico 0.1 M y 1 mg/mL de ortofenildiamina, peróxido de hidrogeno al 3%) al cabo de 10 min en la oscuridad, la reacción se detuvo con 200 μ L de ácido sulfúrico y se leyó la placa a una DO_{492nm} (Multiskan Thermo scientific, USA).

11.- ELISA sándwich indirecto para la detección de HA1 usando scFv con péptido de afinidad a poliestireno, suero anti-HA1 y proteína A

Se utilizó un ELISA sándwich indirecto en el cual las placas con el scFv-PS unido, fueron bloqueadas con PBS-BSA y se incubaron con diferentes concentraciones del Ag HA1 22009 por 1 h, posteriormente con la proteína A-HRP diluida 1/500. Este ensayo se repitió, con algunas modificaciones como el incremento en la cantidad del Ag hasta 4 µg y el tiempo de revelado a 20 min (Kumada *et al.*, 2010).

RESULTADOS

1.-Cinética de crecimiento de las cepas *E coli* roseta DE3

Los resultados de la cinética de crecimiento de las 12 clonas (6 scFv PS y 6 scFv B) fueron muy similares, las DO_{600nm} se midieron cada hora. La fase de crecimiento exponencial se registró entre las 3 y 4 horas y la fase estacionaria se alcanzó entre las 8 y 9 horas. (Figuras 7 y 8)

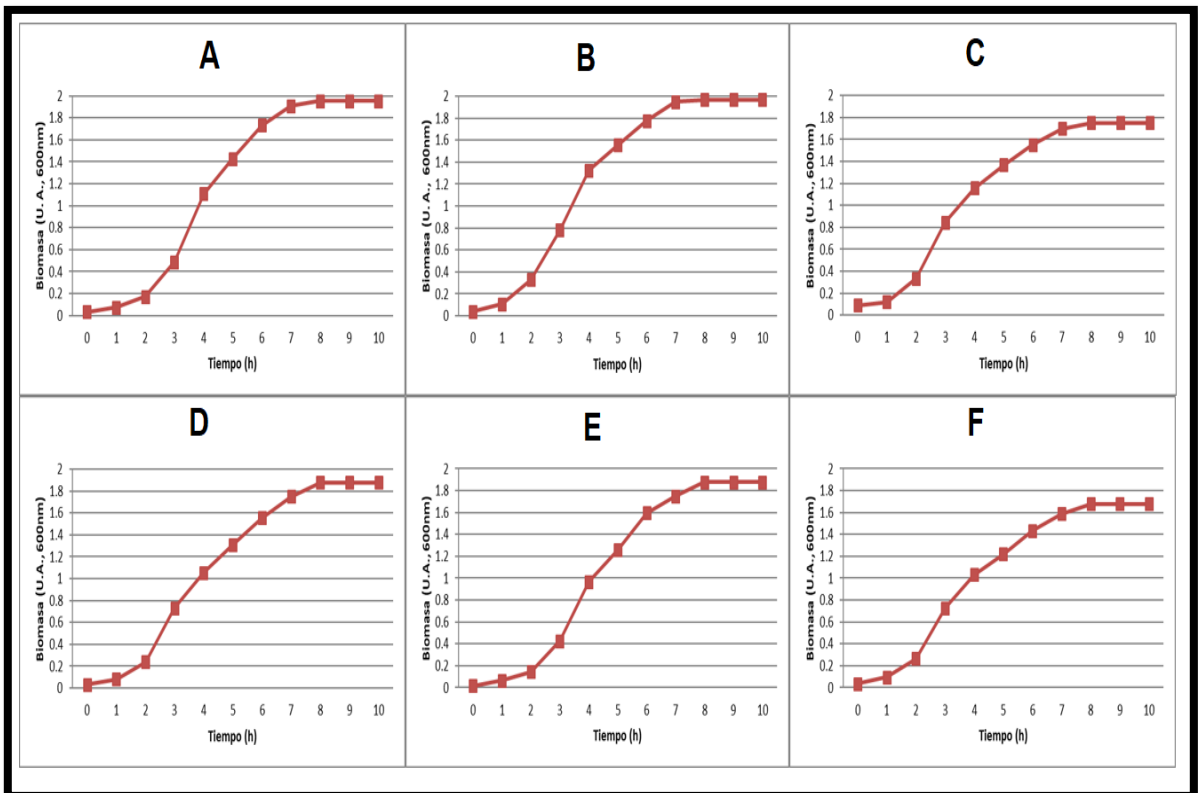


Figura 7: Cinética de crecimiento de las seis clonas de *E. coli* Rosetta (DE3) que expresaron los scFvs-PS; A) BM1C4-PS, B) BM1H3-PS, C) BM1C7-PS, D) SP2H3-PS, E) SP2F9-PS, F) SP1H3-PS.

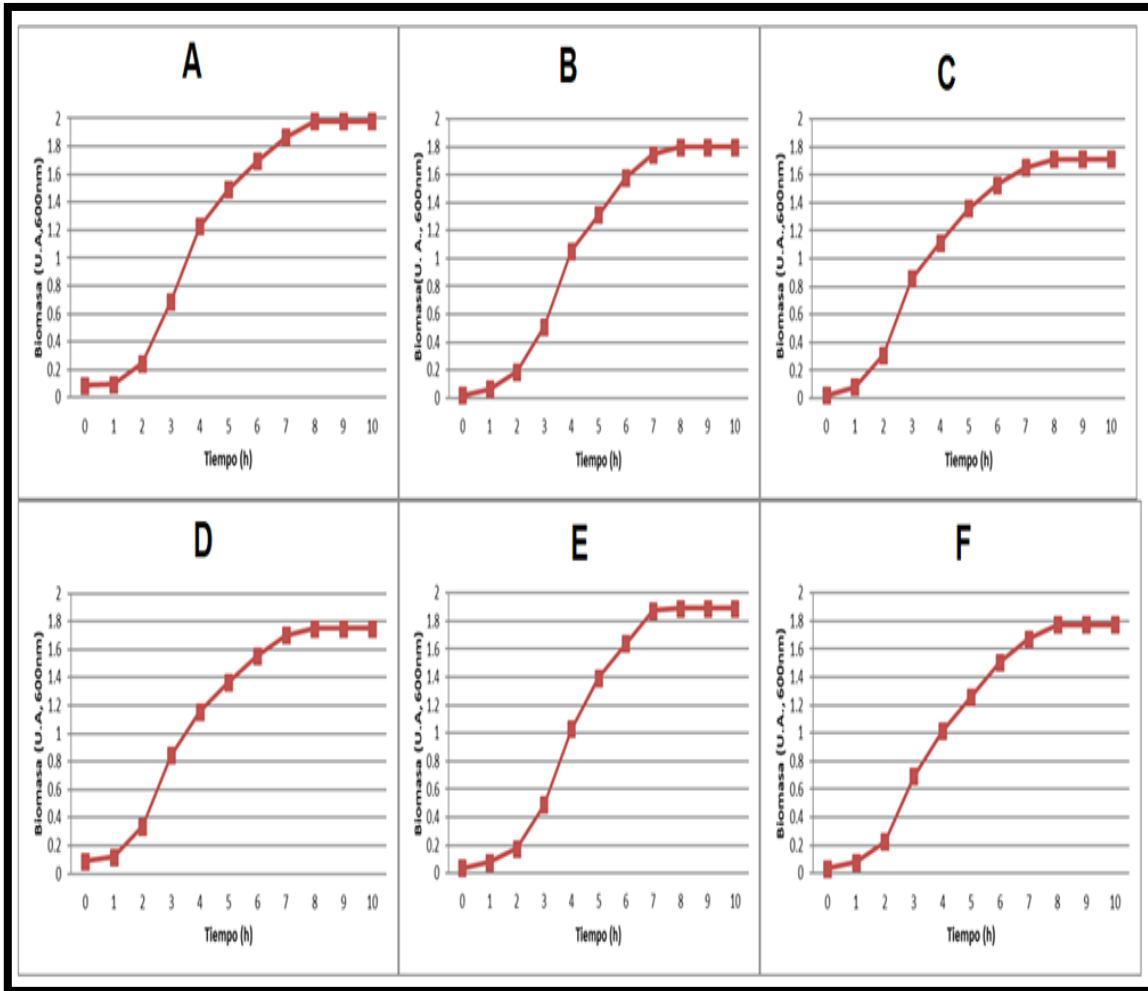


Figura 8: Cinética de crecimiento de las seis clonas de *E. coli* Rosetta (DE3) que expresaron los scFvs-B; A) BM1C4-B, B) BM1H3-B, C) BM1C7-B, D) SP2H3-B, E) SP2F9-B, F) SP1H3-B.

Tomando en cuenta estos resultados se decidió añadir el inductor (IPTG 250 μ M) a las tres horas de iniciado el cultivo, dentro de la fase log de la curva de crecimiento. La biomasa se recolectó 4 h después.

2.-Expresión de los scFv-PS y scFv-B

El análisis de expresión de los Acs scFv por las diferentes clonas mostró, que solamente 3 clonas; sp1H3-PS, sp1H3-B y sp2H3-B expresaron los Acs. En la Figuras 9 A, B y C se muestra el reconocimiento de los scFvs sp1H3-PS y sp1H3-B por el Ac anti-hisHP, que reconoció una proteína de aproximadamente de 31 KDa que corresponde con el peso molecular esperado para el scFv.

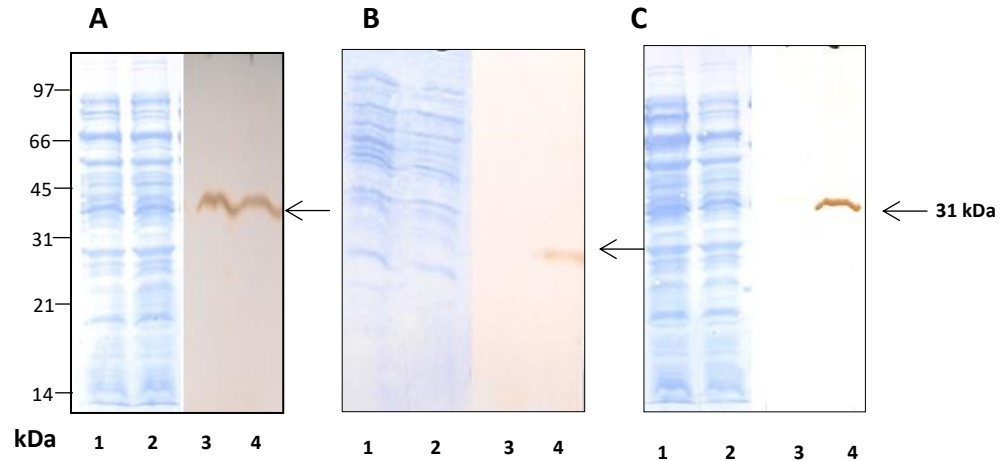


Figura 9. Expresión de los scFvs en *E. coli* : **A.** Tinción con azul de Coomassie del extracto proteico total de la clona sp1H3-B sin inducir (1), e inducida (2). Carriles 2 y 3 Western Blot revelado con el Ac anti-hisHP. **B.** Tinción con azul de Coomassie del extracto total de la clona sp2H3-B sin inducir (1), e inducida (2). Carriles 2 y 3 Western Blot revelado con el Ac anti-hisHP. **C.** Tinción con azul de Coomassie del extracto proteico total de la clona sp1H3-PS sin inducir (1), e inducida (2). Carriles 2 y 3 Western Blot revelado con el Ac anti-hisHP. El marcador de peso molecular se muestra a la izquierda y la flecha señala la proteína de 31 kDa reconocida por el anti-hisHP.

3.- Identificación de la expresión de los scFvs seleccionados en los extractos proteicos celulares

A partir de cultivos de 600 mL de las clonas sp1H3-PS y sp1H3-B se obtuvieron los extractos solubles (ES) y los cuerpos de inclusión (CI) estos últimos solubilizados en urea 8 M. En la Figura 10 A y B se observa que el anticuerpo anti-hisHP reconoció únicamente a los scFv en los CI.

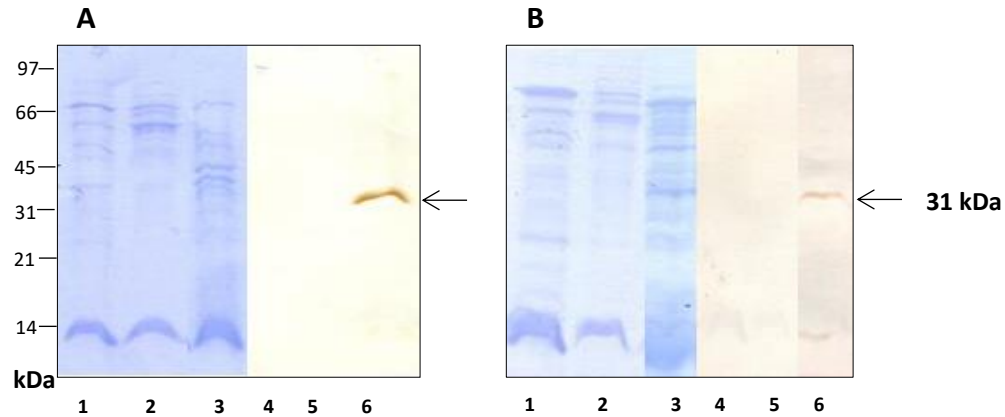
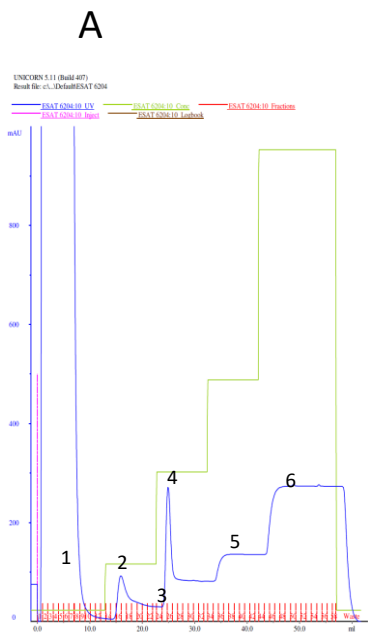


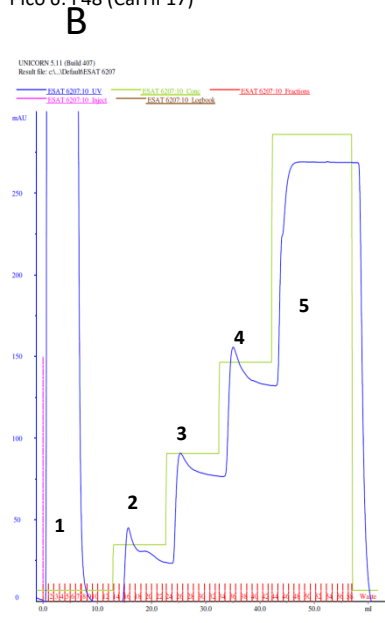
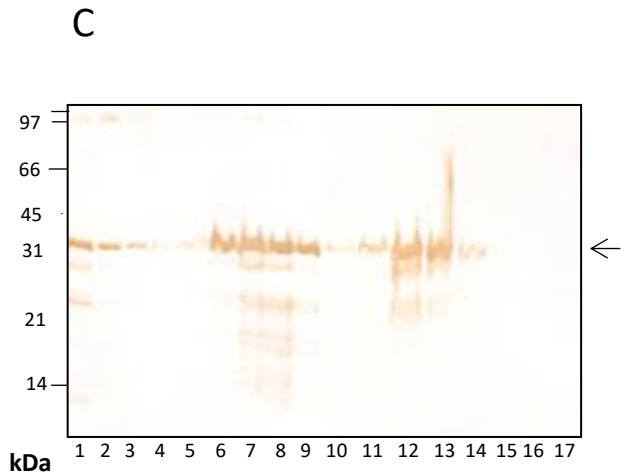
Figura 10: Identificación de los ScFv en las fracciones celulares A. Tinción con azul de Coomassie del extracto soluble, sobrenadante de los CI y CI de la clona sp1H3-B (Carriles 1,2 y 3 respectivamente). Carriles 4, 5 y 6 Western Blot de los extractos revelado con el Ac anti-hisHP. **B.** Tinción con azul de Coomassie del extracto soluble, sobrenadante de los CI y CI de la clona sp1H3-PS (Carriles 1, 2 y 3 respectivamente). Carriles 4, 5 y 6, Western Blot de los extractos revelado con el anti-hisHP. El marcador de peso molecular se indica a la derecha y la flecha señala la proteína de 31 kDa reconocida por el anti-hisHP.

4.-Purificación de los scFvs

A partir de los CI solubilizados, se purificaron los scFvs en una columna de afinidad a níquel. En la Figuras 11 A, B, C y D se muestra el cromatograma de la purificación de los ScFvs, sp1H3-B y sp1H3-PS y las fracciones obtenidas durante su purificación en donde los Acs eluidos fueron detectados por Western Blot revelado con el anti-hisHP. En la Fig 11B, claramente se observa que la producción del Ac sp1H3-B fué mucho mayor que el sp1H3-PS. En el sp1H3-B se observan algunas proteínas de peso molecular bajo que podrían ser productos de degradación.



- Pico 1: F3, F6 (No pegado Carril 2 y 3)
- Pico 2: F14,15,16,17,18 y 19 (Carriles 4,5,6,7,8 y 9)
- Pico 3: F24 y 25 (Carriles 10 y 11)
- Pico 4: F26,27 y 29 (Carriles 12,13, y 14)
- Pico 5: F37 y 38 Carriles 15,16)
- Pico 6: F48 (Carril 17)



- Pico 1: F4 (No pegado Carril 2)
- Pico 2: F15,16,17,18,20 y 24 (Carriles 3,4,5,6,7 y 8)
- Pico 3: F26,27 y 28 (Carriles 9,10 y 11)
- Pico 4: F35,37 y 39 (Carriles 12, 13,14)
- Pico 5: F46 y 48 (Carriles 15 y 16)

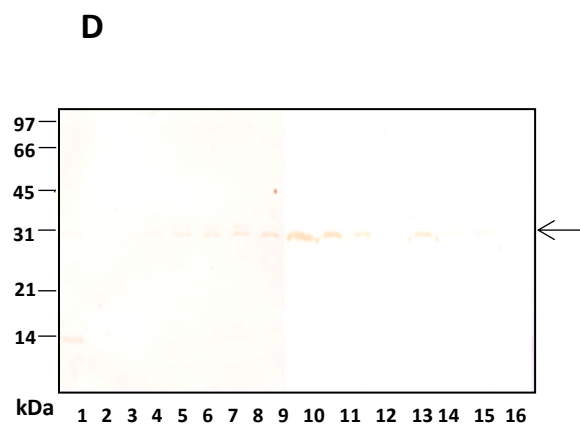


Figura 11: Purificación por cromatografía de afinidad a níquel de los scFv sp1H3-B y sp1H3-PS.

A y B. Cromatogramas de la purificación del scFv sp1H3-B (**A**) y sp1H3-PS (**B**) a partir de los CI solubilizados. Las proteínas se eluyeron con un gradiente de imidazol (0 a 100% del amortiguador de elución). Se indican las fracciones (**F**) colectadas y enumeradas de acuerdo al gráfico de la densidad óptica de las proteínas (línea azul). **C y D.** Análisis por SDS-PAGE/ Western Blot de los fracciones eluidas y colectadas durante el proceso de purificación de los scFvs sp1H3-PS y sp1H3-PS respectivamente. (**C**) 1. Cl. 2 y 3. F4, F6 no pegado, 4. F14, 5. F15, 6. F16, 7. F17, 8. F18, 9. F19, 10. F24, 11. F25, 12. F26, 13. F27 14. F29, 15. F37. 16. F38, 17. F48. El marcador de peso molecular se muestra a la izquierda y la flecha señala la proteína de 31 kDa reconocida por el anti-hisHP.

5.-Plegado de los scFvs

Con la diálisis de cambios graduales en la concentración de urea, no se logró solubilizar a la proteína, al llegar a la concentración de 0.5 M más del 90% de la proteína se precipitó. Por tal motivo la cantidad de proteína obtenida no fue suficiente para realizar los ensayos. Aunado a esto, se observó en el PAGE-SDS que la proteína presentaba dimerización y eventualmente se degradaba.

6.-Titulación de suero hiperinmune anti-HA1 (conejo) usando HA1 recombinante.

La Figura 12 se muestra la curva de titulación del suero hiperinmune. Se observa que la mayor absorbancia se obtuvo a la dilución 1:50 y con 0.5 µg de antígeno.

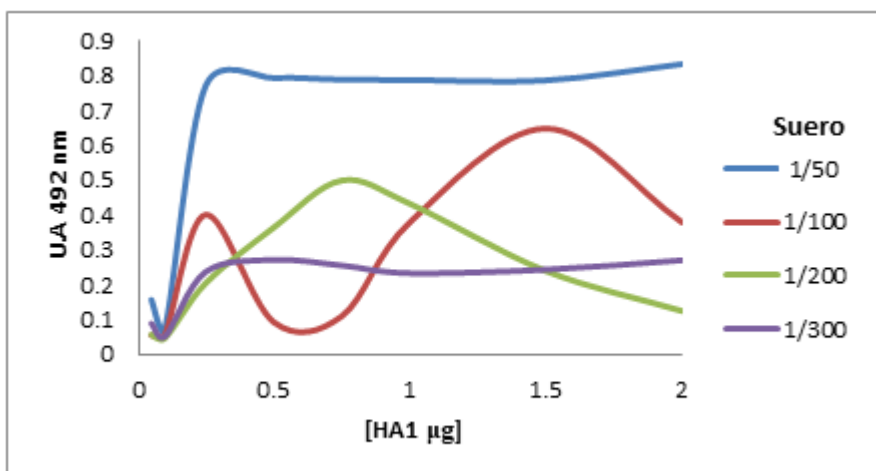
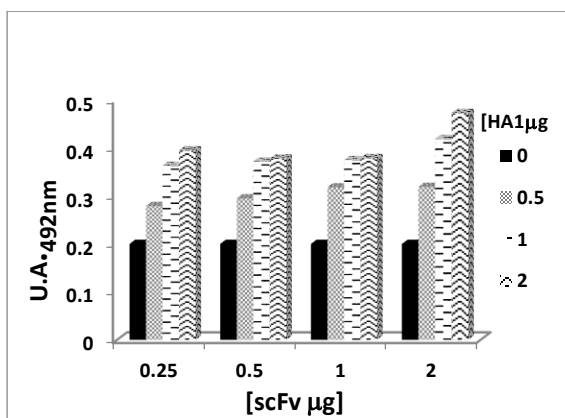


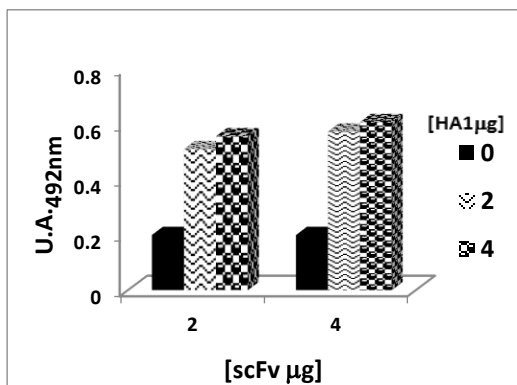
Figura 12: Titulación del suero anti-HA. Reconocimiento de concentraciones ascendentes de la proteína HA1 con diferentes diluciones del suero hiperinmune.

7.-ELISA sándwich indirecto para la detección de HA1 usando un scFv con péptido de afinidad a poliestireno, suero anti-HA1 y proteína A.

En las Figuras 13 A y B se muestran el reconocimiento específico de la HA1 del virus de la influenza en un ELISA sándwich indirecto utilizando como Ac de captura el scFv sp1H3PS y como Ac de detección un suero hiperinmune generado contra la HA1. El reconocimiento se hizo evidente con la proteína A conjugada HP, que reconoce las IgG del suero hiperinmune. En las Figuras se observa, que el incremento en la concentración tanto del Ag como del scFv y el incremento en el tiempo de revelado (Fig. 13 B), se traduce en un mejor reconocimiento del Ag en el sistema. Es importante mencionar que no obstante estos incrementos, el control negativo no se vio afectado, sus Unidades de Absorbancia permanecieron constantes en los dos ensayos.



A



B

Figura 13. Reconocimiento de la HA1 en un ensayo de ELISA sándwich indirecto, utilizando el scFvPS Como Ac de captura de la HA1. Este Ac fue unido específicamente a la placa a través del péptido de unión a poliestireno y re-naturalizado *in situ*. El reconocimiento de la HA1 capturada fue detectado con un suero hiperinmune generado contra la HA1. En la gráfica A, observa el incremento en U.A. a medida que se incrementan las concentraciones Ag y Ac. En la gráfica B, se observa un comportamiento similar, pero con un incremento mayor, atribuible posiblemente a un incremento en el tiempo de revelado de la placa. Los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado.

DISCUSIÓN

En este trabajo se analizaron los Acs scFvs (sp1H3, sp2F9, BM1C7, BM1C4, sp2H3, BM1H3), con especificidad hacia la Hemaglutinina HA1-22009 del virus de influenza A/H1N1/2009 con el objetivo de estandarizar un inmunoensayo (ELISA), para la detección del antígeno HA1-22009; usando la proteína recombinante como sistema modelo para la detección del antígeno en muestras y aislados clínicos. Las ventajas de los anticuerpos scFvs han sido descritas por Monnier *et al.* (2013), quienes mencionan las diferentes áreas de la medicina en las que los scFvs han demostrado tener utilidad a nivel experimental, entre otras, están siendo utilizados en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y la enfermedad de Huntington. Entre sus ventajas esta su tamaño que les permite acceder a diferentes tejidos y por lo tanto pueden ser usados como transportadores de péptidos y moléculas con fines terapéuticos. Así mismo para su uso en ELISA es posible sumarle propiedades que faciliten su capacidad de absorción a las placas, así como marcadores para su detección (Monnier *et al.*, 2013).

En este estudio se utilizaron los scFvs modificados con un péptido aceptor de biotina y un péptido con afinidad por las superficies de poliestireno (Yang *et al.*, 2004; Graslünd *et al.*, 2017). Los scFvs biotinilados para este ensayo se les agrego previamente el péptido GLNDIFEAQKIEWHE; el cual contiene la secuencia necesaria para ser reconocido por enzima BirA que transfiere una biotina a la Lisina incluida en esta secuencia de aminoácidos. También independientemente se les agregó el péptido RIIIRRIRR que tiene afinidad por poliestireno como fue sido descrito por Kumada *et al.*, (2009). La presencia del péptido con afinidad a polistireno permite el direccionamiento del anticuerpo de captura, el cual expone adecuadamente el sitio de interacción con el antígeno. (Kumada *et al.*, 2010; Kumada *et al.*, 2009).

Los 6 scFvs previamente obtenidos en el laboratorio en el año 2009 (sp1H3, sp2F9, BM1C7, BM1C4, sp2H3, BM1H3) fueron seleccionados empleando una biblioteca de scFvs desplegada en fagos, que fue generada a partir de conejos inmunizados con la Hemaglutinina recombinante HA1-22009 del virus de influenza A/H1N1/2009. El presente trabajo se inició con la expresión de todos los scFvs mencionados. Sin embargo, después de intentar diferentes estrategias de expresión de los mismo en forma soluble (disminución de la temperatura del cultivo y/o solubilización de los mismos mediante diálisis escalonada, y diálisis por goteo), solo se consiguió expresar las clonas sp1H3 PS y sp2H3B de manera estable. Por otra parte, la expresión en general de los scFv en forma soluble fue muy baja. A pesar de que, en el formato de fago, durante la selección en el *phage display* la expresión de los anticuerpos fue suficiente para ser detectados en el ELISA (Anexo 1 Fig. 1) hubo un cambio marcado en la expresión. Este fenómeno ha sido documentado por

diferentes autores. Kaku, *et al.* (2012), reportó que de 58 clonas de scFvs seleccionados por phage display, solo consiguió expresar en forma soluble 7 de ellas, lo cual nos muestra una tasa de expresión similar a la que se obtuvo en el presente trabajo (Kaku *et al.*, 2012).

Los scFvs que se expresaron en la bacteria *E. coli* Rosetta (DE3) usando los plásmidos pET22b. Los anticuerpos fueron purificados a partir de los cuerpos de inclusión generados por la bacteria, en un sistema similar a métodos usados por He *et al.* (2011) y Aziminia *et al.* (2016); quienes usando la misma bacteria y plásmidos pET, optimizaron la expresión usando varias temperaturas de incubación y concentraciones de IPTG (He Q *et al.*, 2011; He T *et al.*, 2018; Aziminia *et al.*, 2016). En este trabajo, los cuerpos de inclusión, donde se acumularon las proteínas recombinantes expresadas, tuvieron que ser disgregados con una solución de urea a 8M antes de poder ser purificadas, con lo cual se obtuvieron proteínas desnaturalizadas. En el caso de los scFvs biotinilados debían ser plegados para poder ser usados en el sistema de ELISA diseñado originalmente, para lo cual se usó un protocolo de plegado con diálisis para bajar la concentración de urea gradualmente de 8M a 0M. Desafortunadamente, este método no funcionó ya que la proteína se precipitaba, por lo cual se optó por probar el plegado por el método de goteo. Esto permitió plegar, aunque en baja proporción a la proteína, pero la mayor parte de ella se precipitó. También, se intentó el cultivo bacteriano a baja temperatura para intentar expresar la proteína en forma soluble evitando la formación de cuerpos de inclusión tal como lo reportaron Sina *et al.* (2015), desafortunadamente esta estrategia tampoco funcionó. Sin embargo, puesto que se contaba con un suero policlonal proveniente de los conejos inmunizados con la HA1-recombinante obtenido durante la generación de la biblioteca de scFvs se decidió utilizar este como anticuerpo secundario en el ELISA.

La explicación de la baja expresión y solubilidad de los anticuerpos usados en el presente trabajo pudiera deberse a algunos factores descritos en la literatura. Monnier *et al.* (2013) menciona que, no obstante, que la adición de péptidos parece agregar propiedades a los scFvs en sus diferentes aplicaciones. Estos podrían también afectar cualidades de la proteína en su proceso de producción y plegado, este fue el caso de scFvs expresados con el péptido de unión a PS cuya expresión fue más baja en comparación con los que no tenían el péptido aceptor de biotinilación.

Ayyar *et al.* (2015), mencionan que los scFvs seleccionados de una biblioteca generada en conejos y expresados en un sistema de células procariontas presentaron problemas, tales como bajo nivel de expresión, dimerización de la proteína o corte de la misma; por lo cual ellos recomiendan no usar bibliotecas generadas en conejos.

Finalmente, es importante mencionar que el pegado del scFv sp1H3PS a poliestireno en las placas de ELISA se llevó a cabo con la proteína desnaturalizada a través del péptido de afinidad a poliestireno. Posteriormente, se hizo el plegamiento retirando la urea mediante una secuencia de lavados, dejando expuesta la zona de reconocimiento del antígeno en la mayoría de los scFvs pegados en la placa. Posteriormente, para poder corroborar un correcto plegado de la proteína y verificar su afinidad por el péptido con el que fue seleccionado ya que como lo menciona Kaku *et al.* (2012), estas proteínas pueden perder la afinidad por el antígeno al cambiar su conformación al no estar unidas al fago. Se realizó el ELISA sándwich indirecto, los resultados muestran que la afinidad por el Ag con el que fue seleccionado este scFvs (Hemaglutinina recombinante HA1-22009 del virus de influenza A/H1N1/2009) se conservó en su forma soluble consiguiéndose un correcto plegado de la proteína y con esto se puede afirmar que el sistema funciona.

CONCLUSIÓN

El scFvPS seleccionado y expresado en forma recombinante para su uso en ELISA, mantiene el reconocimiento por el antígeno con que fué seleccionado. El uso de péptidos agregados al diseño de los scFvs otorga propiedades a estas proteínas como la orientación correcta para la captura del antígeno, lo cual nos permiten afirmar que los scFv así modificados tienen un gran potencial ya que podría ser usados de forma rutinaria en la generación de moléculas de captura de antígenos en inmunoensayos.

Referencias bibliográficas

1. 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. <https://doi.org/10.1155/2012/980250>
2. Ahn S J, Baek Y H, Lloren K K S, Choi W S, Jeong J H, Antigua K J C, Kwon H I, Park S J, Kim E H, Kim Y I, Si Y J, Hong S B, Shin K S, Chun S, Choi Y K, Song M S. (2019). Rapid and simple colorimetric detection of multiple influenza viruses infecting humans using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform. *BMC Infectious Diseases*. 1;19(1):676. doi: 10.1186/s12879-019-4277-8.
3. Arce A. (2007). *Prácticas de Inmunología General Aplicada y Veterinaria*. México: Editorial Manual Moderno.
4. Ausina V, Moreno S. (2006). *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
5. Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore D D, Seidman J G, Smith J A, Struhl K. (2005). *Current Protocols in Molecular Biology*. USA: John Wiley & sons inc.
6. Ayora G. (1999). Influenza: Historia de una enfermedad. *Revista Biomedica*.10:57-61.
7. Ayyar V, Hearty S, O'Kennedy R. (2015). Facile domain rearrangement abrogates expression recalcitrance in rabbit. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99:2693-3703. Doi: 10.1007/s00253-014-6268-4
8. Aziminia P, Pilehchian-Largroudi R, Esmaeilnia K. (2016). Cloning and expression of *Clostridium perfringens* type D Vaccine strain epsilon toxin gene in *E. coli* as a recombinant vaccine candidate. *Iranian Journal of Microbiology*. 8(4):226-231.
9. Chow E J, Doyle J D, Uyeki T M. (2019). Influenza virus-related critical illness: prevention, diagnosis, treatment. *Critical Care*. 23(1):214. doi: 10.1186/s13054-019-2491-9.
10. Coligan J E, Dunn B M, Ploegh H L, Speicher D W, Wingfield P T. (2001). *Current Protocols in Protein Science*. USA: John Wiley & sons inc.
11. Day M J, Schultz R D. (2014). *Veterinary Immunology: Principles and Practice*. Inglaterra. Editorial CRC Press.
12. Dawood F, Jain S, Finelli L. (2009). Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans. *The New England Journal of Medicine*. 360(25):2605-2615.
13. Della P, Castagna M, Lombardi A, Barison E, Tagliabue G, Ceriotti A., ... Fabbrini M S. (2015). Systematic comparison of single-chain Fv antibody-fusion toxin constructs containing *Pseudomonas* Exotoxin A or saporin

- produced in different microbial expression systems. *Microbial Cell Factories*. 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0202-z>
14. Eggenreich B, Willim M, Johannes D, Herwig C, & Spadiut O. (2016). Production strategies for active heme-containing peroxidases from *E. coli* inclusion bodies – a review. *Biotechnology Reports*, 10, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.03.005>
 15. Farajnia S, Ahmadzadeh V, Tanomand A, Veisi K, Khosroshahi A, Rahbarnia L, Khosroshahi S A. (2016). Development trends for generation of single-chain antibody fragments. *Immunopharmacology and immunotoxicology*.3973. <https://doi.org/10.3109/08923973.2014.945126>
 16. Figueroa M, Vargas L, Mendoza L, Acevedo O, Chavarría M, Fonseca E, Moya F. (1984). *Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos en Centro América*. San José, Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia.
 17. Franken K L M C, Hiemstra H S, Meijgaarden K E Van, Subronto Y, Hartigh J Den, Ottenhoff T H M, & Drijfhout J W. (2000). Purification of His-Tagged Proteins by Immobilized Chelate Affinity Chromatography : The Benefits from the Use of Organic Solvent. *Protein Expression and Purification*. 18;1:95–99. <https://doi.org/10.1006/prev.1999.1162>
 18. Galeffi P, Lombardi A, Pietraforte I, Novelli F, Di Donato M, Sperandei M, Tornambé A, Fraioli R, Martayan A, Natali PG, Benevolo M, Mottolese M, Ylera F, Cantale C, Giacomini P. (2006). Functional expression of a single-chain antibody to ErbB-2 in plants and cell-free systems. *J Transl Med*. 29; 4:39. doi.org/10.1186/1479-5876-4-39.
 19. Gilgunn S, Sharma S, Adamson K, Carthy E, Kennedy R O, & Forster R J (2016). Biosensors and Bioelectronics Detection of prostate specific antigen based on electrocatalytic platinum nanoparticles conjugated to a recombinant scFv antibody. *Biosensors and Bioelectronic*. 77: 759–766. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.10.058>
 20. Goodell C, Prickett J, Kittawornrat A, Zhou F, Rauh, R, Nelson W, O'Connell C, Burrell A, Wang C, Yoon KJ, Zimmerman JJ. (2013). Probability of detecting influenza A virus subtypes H1N1 and H3N2 in individual pig nasal swabs and pen-based oral fluid specimens over time. *Veterinary Microbiology*. 166(3-4):450-60.
 21. Graslünd S, Savitsky P, Müller S. (2017). In vivo biotinylation of antigens in *E. coli*. *Methods Molecular Biology*. 1586: 337-344. doi: 10.1007/978-1-4939-6887-9_22.
 22. Gutiérrez J. (2010). *Inmunología Veterinaria*. México: Editorial Manual Moderno.

23. He Q, Yang Q, Cheng A, Wang M, Xiang J, Zhu D, ... Chen X. (2011). Expression and characterization of UL16 gene from duck enteritis virus. *Virology Journal*, 8(1):413-421. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-413>
24. He T, Wang M, Cao X, Cheng A, Wu Y, Yang Q, ... Chen X. (2018). Molecular characterization of duck enteritis virus UL41 protein. *Virology Journal*, 1, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0928-4>
25. Hnasko R. (2015). *ELISA Methods and Protocols*. Humana Press.
26. Kaku Y, Noguchi A, Okutani A, Inoue S, Tanabayashi K, & Yamamoto Y. (2012). Altered specificity of single-chain antibody fragments bound to pandemic H1N1-2009 influenza virus after conversion of the phage-bound to the soluble form. *BMC Research Notes*, 5(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-483>
27. Kozel TR, Burnham-Marusich AR. (2017). Point-of-Care Testing for Infectious Diseases: Past, Present, and Future. *Journal Clinical Microbiology*. 55(8):2313-2320. doi: 10.1128/JCM.00476-17. Epub 2017 May 24. Review.
28. Kumada Y, Hamasaki K, Shiritani Y, Nakagawa A, & Elisa O. (2009). Direct immobilization of functional single-chain variable fragment antibodies (scFvs) onto a polystyrene plate by genetic fusion of a polystyrene-binding peptide (PS-tag). *Anal Bioanal Chem*. 759–765. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2999-y>
29. Kumada Y, Shiritani Y, & Hamasaki K. (2010). Novel solid-phase refolding method for preparation of scFv-immobilized polystyrene plates with high-antigen-binding activity. *Anal Bioanal Chem*. 1295–1303. doi.org/10.1007/s00216-010-4035-7.
30. Madec F. (2009). Genetic and Antigenic Evolution of Swine Influenza Viruses in Europe and Evaluation of Their Zoonotic Potential. *Zoonoses and Public Health* 56,310–325. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01236.x>
31. Madigan M, Martinko J, Parker J. (2009). *Brock Biología de los Microorganismos*. México: Editorial Pearson.
32. Monnier P P, Vigouroux R J, & Tassew N G. (2013). *In Vivo* applications of single chain Fv (Variable Domain) (scFv) fragments. *Antibodies Journal*. 2, 193–208. doi.org/10.3390/antib2020193
33. Murray R. (2007). *Harper Bioquímica Ilustrada*. México: Editorial Manual Moderno.
34. Nelson M, Holmes E C. (2007). The Evolution of epidemic influenza. *Nature Review Genetics*. 8:196-205. doi:10.1038/nrg2053.
35. Peteranderl C, Herold S, Schmoldt C. (2016). Human Influenza Virus Infections. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 37(4):487-500. doi: 10.1055/s-0036-1584801.
36. Ramos J. (2012). *Infectología Clínica*. México: Editorial Manual Moderno.

37. Secretaria de salud, Influenza. Documento técnico. Dirección General de Epidemiología. Actualización 5 de febrero 2014. http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/lineamientos/influenza/documento_tecnico_influenza.pdf
38. Sina M, Farajzadeh D, Dastmalchi S. (2015). Effects of environmental factor on soluble expression of a humanized Anti-TNF- α scFv Antibody in *E. coli*. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 5(4): 455-461. doi:10.15171/apb.2015.062
39. Stefura WP, Graham C, Lotoski L, HayGlass KT. (2019). Improved Methods for Quantifying Human Chemokine and Cytokine Biomarker Responses: Ultrasensitive ELISA and Meso Scale Electrochemiluminescence Assays. *Methods Mol Biol*. 2020:91-114. doi: 10.1007/978-1-4939-9591-2_7.
40. Trenevaska I, Li D, Banhan A H. (2017). Therapeutic antibodies against intracellular tumor antigens. *Frontiers in Immunology*. 8:1001.
41. Vallecillo A J, Parada C, Morales P, & Espitia C. (2017). *Rhodococcus erythropolis* as a host for expression, secretion and glycosylation of *Mycobacterium tuberculosis* proteins, *Microbial Cell Factories*. 16:12. doi.org/10.1186/s12934-017-0628-6
42. Vargas M A. (2010). Influenza A H1N1 de origen porcino: Métodos diagnósticos. *Revista Facultad Medicina*. 58(1),44-59.
43. Yang J, Shi R, Kwok W W, & Mohanakumar T. (2004). *In vivo* biotinylation of the major histocompatibility complex (MHC) Class II / Peptide. *Human Immunology*. 65, 692–699. doi:10.1016/j.humimm.2004.04.001

Anexo 1

Para el desarrollo de los scFv anti Influenza A/H1N1/2009 fueron necesarios los siguientes pasos:

1. Se cultivó el virus de Influenza A/H1N1/2009 en embriones de pollo para la obtención de RNA total.
2. Obtención de la secuencia codificante de la proteína Hemaglutinina (HA) del virus de Influenza A/H1N1 2009.
3. se seleccionó la porción globular de la HA y se diseñó de la proteína HA1-22009-His tag para expresar en *E. coli* y purificar por afinidad a metales.
4. Se realizó la inoculación de conejos con la proteína HA1-22009-His tag.
5. A los 127 días se realizó el sangrado a blanco del cual se obtuvo el suero hiperinmune anti HA, sacrificio de los animales y obtención del Bazo y uno de los Fémur de cada uno de los animales.
6. Se realizó la extracción de RNA total de bazo (Bz) y medula ósea (MO) de conejos, la obtención del cDNA y la amplificación de los fragmentos variables de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos del cDNA.
7. Se hizo PCR-overlapping para la unión de los productos de PCR de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos de Bz y MO de conejo.
8. Se generó la biblioteca de scFv's de conejos inmunizados con la proteína recombinante en *E. coli* HA1-22009 del virus de Influenza A/H1N1 2009.
9. Se Generaron partículas virales (fagos) para el despliegado de los scFv's.
10. Con las partículas virales obtenidas se procedió a la realización de las rondas de selección usando la proteína recombinante HA1-22009-His tag.
11. Para la realización del Fago-ELISA se seleccionaron 192 clonas independientes de cada una de las bibliotecas para lo cual se tomaron 192 colonias independientes de cultivos de la cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF' previamente transducida con los fagos recuperados de la cuarta ronda de selección.
12. Obtención de los fagémidos de las clonas seleccionadas, treinta y cuatro (7 clonas de la biblioteca de Bz y 27 de la de MO) clonas fueron considerados como positivas al reconocimiento de la proteína HA1-22009-His tag tomando como límite inferior 0.2 DO.

13. Las 34 clonas se sometieron a un mapeo de restricción para identificar las que incluyeran el inserto que codifica para el scFv correspondiente.

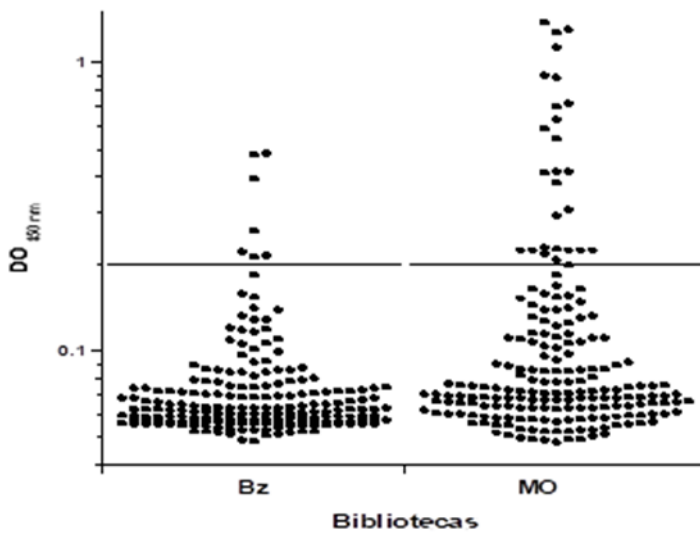


Figura 1. Fago-ELISA de las 192 clonas seleccionadas de cada una de las bibliotecas. Las clonas que mostraron una lectura mayor a 0.2 DO se tomaron como positivas.

14. Después de los procesos de secuenciación se obtuvo información de 6 clonas, las cuales fueron diseñadas para la adición de un péptido de afinidad a poliestireno (RIIRRIRR) y por separado a las mismas 6 la adición de un péptido, sustrato de la enzima bir A, aceptor de biotina (GLNDIFEAQKIEWHE) en un proceso *in vivo* en *E. coli*. (Yang et al., 2004; Graslünd et al., 2017).



Figura 2: Secuencia peptídica de cada una de las 6 clonas seleccionadas para la subclonación en los vectores de expresión y la adición en su extremo carboxilo los tags del Péptido de unión a poliestireno y el Péptido aceptor de biotina.