



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**PRODUCCIÓN Y PLEGAMIENTO DE FRAGMENTO
(Fab) RECOMBINANTE DE UN ANTICUERPO
MONOCLONAL QUE NEUTRALIZA EL EFECTO
TÓXICO DEL VENENO DE Loxosceles boneti Y
L. reclusa**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ELBA CAMPOS LIRA



DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. ALEJANDRO OLVERA RODRÍGUEZ

MÉXICO, D. F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno Campos Lira Elba 56227602 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 301131328
2. Datos del tutor M. en C. Olvera Rodríguez Alejandro
3. Datos del sinodal 1 Dr. Alagón Cano Alejandro
4. Datos del sinodal 2 Dr. Quintero Hernández Verónica
5. Datos del sinodal 3 M. en C. García Álvarez Jorge Antonio
6. Datos del sinodal 4 Dr. Vilchís Peluyera Alfonso José
7. Datos del trabajo escrito Producción y Plegamiento de fragmento (Fab) recombinante de un anticuerpo monoclonal que neutraliza el efecto tóxico del veneno de <u>Loxosceles boneti</u> y <u>L. reclusa</u> 67 p. 2010

Esta tesis se realizó bajo la dirección del M. en C. Alejandro Olvera Rodríguez en las instalaciones del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Estuvo financiada por los laboratorios Bloclon-Silanes a quienes agradezco por el apoyo incondicional.

*A mis Padres y a
mi abuela.*

Gracias....

INDICE

	Página
Resumen	1
Introducción	
1. Descripción general de arañas	2
2. Género <i>Loxosceles</i>	3
3. Loxoscelismo	6
3.1 Loxoscelismo cutáneo	7
3.2 Loxoscelismo sistémico	7
4. Diagnóstico y Tratamiento	8
5. Anticuerpos	11
5.1 Anticuerpos monoclonales	13
5.2 Anticuerpos recombinantes	15
5.3 Sistemas de expresión	16
Antecedentes	20
Justificación	22
Hipótesis	22
Objetivos	23
Materiales y Métodos	
♦ Amplificación de rL5C10 y rH5C10	24
♦ Clonación y secuenciación de rH5C10	26
♦ Expresión de rH5C10 y rL5C10	28
♦ Obtención y purificación de rH5C10 y rL5C10	30
♦ Replegamiento	31
♦ Ensayos de ELISA directo	31
♦ Pruebas de Inmunodetección por western blot	33
♦ Ensayo de inhibición enzimática	34
Resultados y Discusión	
♦ Amplificación de la cadena pesada	37
♦ Ensamblaje en el vector de expresión y obtención de la secuencia de rH5C10 y rL5C10	38
♦ Expresión de rH5C10 y rL5C10	42
♦ Obtención de rH5C10 y rL5C10 de manera soluble	45
♦ Inmunoensayos por western blot y ELISA para detectar SMD de <i>Loxosceles</i> con rL5C10 y rH5C10	47
♦ Ensayos de inhibición enzimática <i>in vitro</i> por rL5C10 y rH5C10	49
♦ Expresión de rL5C10 y rH5C10 en cuerpos de inclusión	50
♦ Replegamiento	51
♦ Análisis del replegamiento	52
♦ Inmunoensayos por ELISA del producto rFab 5C10	55
♦ Ensayo de inhibición del rFab 5C10	55
Conclusiones	57
Perspectivas	59

Bibliografía
Apéndice A

60
65

Introducción

1. Descripción general de arañas

En el mundo se han descrito alrededor de 35, 000 especies de arañas, éstas pertenecen al phylum Arthropoda, subphylum Chelicerata (quelicerados), clase Arachnida, orden Araneae; este último se divide en dos: suborden Labidognatha (arañas verdaderas), infraorden Araneomorphae y suborden Orthognatha (tarántulas), infraorden Mygalomorphae (Quintana y Otero, 2002).

El cuerpo de las arañas y otros arácnidos está dividido en dos segmentos o regiones, el segmento anterior llamado cefalotórax o prosoma, donde encontramos de manera externa los quelíceros y ganchos inoculadores, estos últimos en las arañas verdaderas son cruzados como un par de tenazas y la glándula venenosa se encuentra una parte en el cefalotórax y la otra en el quelícero a diferencia de las tarántulas que presentan los ganchos inoculadores de manera vertical oblicua y la glándula de veneno se ubica totalmente en el quelícero (Brusca *et al.* 2003). Hacia fuera de los quelíceros están los pedipalpos, estructuras articuladas con 6 segmentos cada uno, de los cuales el último es el órgano copulador de los machos. Externamente cuatro pares de patas con siete segmentos cada una. Los ojos en el dorso y parte frontal del prosoma son entre uno y cuatro pares; según su posición y número puede servir para identificar a las arañas a nivel de género. El abdomen u opistosoma, donde se encuentran los

estigmas pulmonares, la hendidura genital, los órganos reproductores, las hiladeras (Fig. 1) (normalmente seis y por donde sale la seda) y posteriores a éstas el ano (Ubick *et al.* 2005).

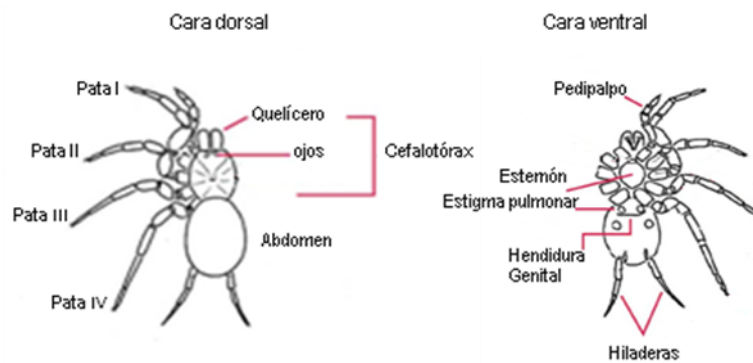


Fig. 1 Principales caracteres morfológicos de una araña

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera de interés médico a tres géneros del infraorden Araneomorphae (*Latrodectus*, familia Theridiidae, *Loxosceles*, familia Sicariidae y *Phoneutria*, familia Ctenidae) y uno del infraorden Mygalomorphae (*Atrax*, familia Hexantheriidae) por las manifestaciones clínicas y letalidad de sus venenos (Quintana y Otero, 2002)

2. Género *Loxosceles*

Las arañas del género *Loxosceles* llegan a medir 4 cm de longitud con las extremidades extendidas (Hurtado *et al.* 2005), el color puede variar de café pálido a marrón dependiendo de la especie (Silva *et al.* 2004).

Reciben el nombre común de araña violinista por una marca característica

del género en forma de violín en el dorso del cefalotórax (Figura 2) y es también conocida como araña reclusa e inespecíficamente como araña café o del rincón (Vetter e Isbister, 2008). Tienen seis ojos arreglados en pares, como se muestra en la figura 3 (Ubick *et al.* 2005). Son sedentarias, tímidas, de hábitos nocturnos y tejen telarañas irregulares. Pueden llegar a vivir de tres a siete años, son capaces de sobrevivir muchos días e incluso meses sin agua ni comida.

Se les puede encontrar en lugares apartados y deshabitados como debajo de troncos, trozos de madera, piedras y hoyos; sin embargo también se les puede encontrar dentro de domicilios, en lugares secos y oscuros, donde casi no haya movimiento o aseo regular y entre la ropa almacenada (Vetter y Rust, 2008). Después de la actividad nocturna tienden a ocultarse en la ropa tirada en el suelo o en zapatos. Las mordeduras por *Loxosceles* ocurren cuando la araña no tiene escapatoria y se defiende al ser presionada contra el cuerpo humano al momento de vestirse, ponerse los zapatos o entre las ropas de cama durante la noche (Hogan *et al.* 2004).



Fig. 2. Fotografía de *Loxosceles reclusa* donde se aprecia la forma de un violín invertido en el dorso del cefalotórax.

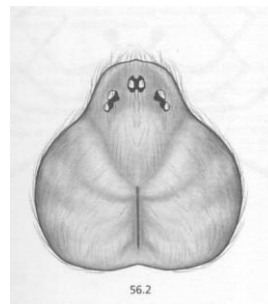


Fig. 3. Disposición de los ojos de las arañas de la familia Sicaridae (Ubick *et al.* 2005)

Estas arañas pueden resistir temperaturas que van desde los 8 hasta los 43 °C, su distribución es cosmopolita (Silva *et al.* 2004), sin embargo, en América se encuentran 84 de las 100 especies descritas (Moctezuma, 2008). Según Gertsch y Ennik (1983), en Norteamérica podemos encontrar un grupo de 50 especies relacionadas por la similitud en apariencia y en características genitales al que llama grupo reclusa, y forma parte de la fauna de los Estados Unidos, México, países adyacentes de Centroamérica y la mayoría de las islas del Caribe (Fig. 4). En México para 1983 se reportaban 36 especies descritas, a la fecha se han encontrado sólo 3 nuevas especies sumando un total de 39 para nuestro país (Moctezuma, 2008).

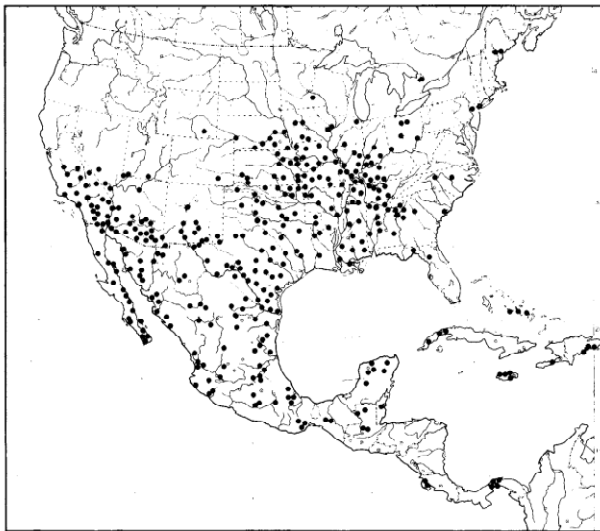


Fig 4. Distribución del género *Loxosceles* en Norteamérica, Centroamérica y las islas del Caribe

Estudios acerca de los venenos de diferentes especies de *Loxosceles* demostraron la presencia de varias enzimas como lipasas, proteasas, hidrolasas, hialuronidasa, fosfatasa alcalina y colágena, sin embargo el componente en mayor cantidad y el más importante para el ser humano

es la esfingomielinasa D (SMD) (Barbaro *et al.* 2005), que cataliza la hidrólisis de la esfingomielina, liberando 1-fosfoceramida y colina (Fig. 5). Del mismo modo, las esfingomielinas son componentes integrales de diversas membranas celulares eucariontes, incluyendo mamíferos (Ramos-Cerrillo *et al.* 2004).

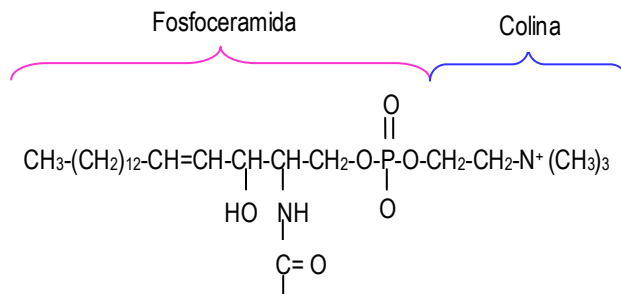


Fig. 5. Estructura de la esfingomielina y productos liberados por la hidrólisis de la SMD.

3. Loxoscelismo

Desde 1872 los médicos reportaban una peculiar lesión en la piel, ahora reconocida como aracnidismo necrótico o específicamente como Loxoscelismo, el cual es causado por la mordedura de las arañas del género *Loxosceles* (Gertsch y Ennik, 1983).

Las manifestaciones clínicas de la mordida dependen de diversos factores como la sensibilidad de la persona al veneno, la localización de la mordida y la exposición de la herida a contaminantes (Hurtado *et al.* 2005).

3.1 Loxoscelismo cutáneo

En el envenenamiento por *Loxosceles* ésta es la manifestación más común, presentándose en el 85-97% de los casos (Quintana y Otero, 2002).

El Loxoscelismo cutáneo se puede manifestar de manera leve, moderada o grave, como una simple reacción inflamatoria, una lesión menor con edema y eritema o bien presentar una ulceración que puede persistir hasta derivar en la necrosis del área afectada (Vetter e Isbister, 2008).

Este tipo de Loxoscelismo no es letal, ya que en los casos más graves sólo ocasiona consecuencias estéticas y/o funcionales (Saracco y de Roodt, 2008)

3.2 Loxoscelismo sistémico

Este tipo de envenenamiento es poco común. En Chile y Brasil, se reportan entre 3-16% del total de los accidentes causados por *Loxosceles* (Quintana y Otero, 2002).

Los síntomas se presentan generalmente durante las primeras 24 horas, algunos de ellos pueden ser alteraciones hematológicas y renales como la hemólisis intravascular, hemoglobinuria, insuficiencia renal aguda, coagulación intravascular diseminada (CID), desfibrinación, anemia e ictericia, siendo la insuficiencia renal aguda y la CID las principales causas de muerte (Guilherme *et al.* 2001). La sintomatología de este tipo de envenenamiento es independiente de la gravedad de las manifestaciones del loxoscelismo cutáneo (Ríos, 2004).

Se han reportado casos de envenenamiento por *Loxosceles* en los cinco continentes, sin embargo donde se tiene una mejor documentación acerca del tema es en Sudamérica y los Estados Unidos de Norteamérica.

4. Diagnóstico y Tratamiento

Hoy en día el mejor diagnóstico que se tiene para Loxoscelismo es por identificación de la araña, sin embargo rara vez se colecta a la araña en el momento del incidente, ya que, como se explicó con anterioridad, la araña pocas veces es descubierta infringiendo la mordedura. Debido a esta limitante, el diagnóstico generalmente se basa en el historial médico, los signos y síntomas clínicos del paciente (Dyachenko *et al.* 2006).

Algunos estudios han tratado de implementar diferentes estrategias en pruebas de ELISA para detectar el veneno en la sangre o exudados tomados de lesiones en la piel, antígenos circulantes en el suero o biopsias de pacientes. Desafortunadamente, este tipo de pruebas aún no son comerciales y requieren de una correlación clínica (Sneff-Ribeiro *et al.* 2008).

El tratamiento primario contra la mordedura por *Loxosceles* es: descanso, colocar hielo, compresión y elevación de la zona de la mordedura si es posible. En algunos casos se aplica inmunización antitetánica y antihistamínicos para evitar el dolor; ya que la mayoría de los casos son menores (Hurtado *et al.* 2005). En casos graves donde aparecen lesiones como úlceras o necrosis en la piel, se siguen otras indicaciones como

administración de corticoides o inhibidores de polimorfos nucleares (Dapsone); ambos tratamientos han mostrado efectividad contra los síntomas generados por el veneno, sin embargo, pueden dar lugar a una serie de efectos secundarios, ocasionando complicaciones importantes para el paciente (Sams *et al.* 2001). Otras estrategias inespecíficas son el uso de ácido acetilsalicílico, antibióticos para evitar infecciones, oxígeno hiperbárico a modo de favorecer la cicatrización de la lesión o bien la alternativa de una excisión quirúrgica para una posterior reconstrucción de la zona afectada (Dyachenko *et al.* 2006).

En Sudamérica, el Instituto Butantan en São Paulo, Brasil, fabrica un antiveneno polivalente compuesto por fracciones F(ab')₂ contra una mezcla de venenos de arácnidos incluyendo *L. gaucho*, *P. nigriventer*, *Tityus serrulatus* y *Tityus bahiensis*, el cual ha mostrado excelentes resultados neutralizando la actividad de los venenos de *L. laeta* y *L. intermedia* (Hogan *et al.* 2004). También existe un antiveneno polivalente (*L. intermedia*, *L. laeta* y *L. gaucho*) y uno monovalente (*L. intermedia*) disponibles en el Centro de Produção e Pesquisa em Imunobiológicos en Paraná, Brasil (Pauli *et al.* 2006). En Lima, Perú, también se produce un antiveneno compuesto por inmunoglobulinas hiperinmunes anti *L. laeta* (Isbister *et al.* 2003).

En México contamos con la evaluación de un antiveneno F(ab')₂ producido a base de inmunógenos recombinantes de esfingomielinasa D

del veneno de *L. reclusa*, *L. boneti* y *L. laeta* (Olvera *et al.* 2006 y Sneff-Ribeiro *et al.* 2008). Este antiveneno se encuentra en proceso de registro y ha sido utilizado en pacientes muy graves en el hospital La Raza por la Dra. Ma. del Carmen Sánchez, obteniendo muy buenos resultados (Moctezuma, 2008).

Cada uno de estos antivenenos, compuestos ya sea por anticuerpos completos o fragmentos de éstos, han obtenido muy buenos resultados en estudios y a nivel de tratamiento ya que todos ellos neutralizan el efecto de la toxina, deteniendo el progreso de la lesión.

5. Anticuerpos

Todos los vertebrados tenemos un sistema inmune capaz de diferenciar lo ajeno de lo propio, una vez reconocido lo ajeno el sistema inmune es capaz de eliminarlo con diferentes estrategias (Abbas *et al.* 2008).

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) son glicoproteínas producidas por linfocitos B o células B en respuesta a virus, bacterias, proteínas o cualquier

macromolécula extraña (antígenos) uniéndose a ellos e inactivándolos o bien marcándolos para su posterior eliminación (Kindt *et al.* 2006).

La estructura básica de un anticuerpo (Fig. 5) está compuesto por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas ligeras (25 KDa) y dos pesadas (50 KDa), ambos tipos de cadenas se componen de regiones variables (V) amino terminales y regiones constantes (C) carboxilo terminales. Las cadenas ligeras (L) se unen a las cadenas pesadas (H) por medio de un puente disulfuro, dando lugar al sitio de unión al antígeno (Fab, por sus siglas en inglés **F**ragment **a**ntibody), específicamente, en las regiones variables de cada una. Al mismo tiempo ambas cadenas pesadas se unen entre sí por medio de puentes disulfuro, formando la región bisagra; bajo ésta se encuentra la fracción cristalizable (Fc), que es responsable de activar las funciones efectoras del sistema inmune (Abbas *et al.* 2008). Cada anticuerpo está compuesto por dos mitades idénticas, cada una con el mismo sitio de unión al antígeno.

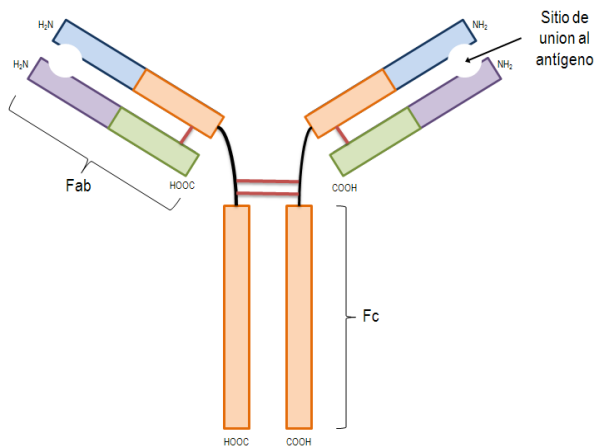


Fig. 6. Esquema de un anticuerpo. En morado la región variable de la cadena ligera (VL), en verde la región constante de la cadena ligera (CL), en azul la región variable de la cadena pesada (VH), en naranja la región constante de la cadena pesada (CH) y en rojo los puentes disulfuro.

Tanto las cadenas ligeras como pesadas contienen series de unidades homólogas repetidas de alrededor de 110 amino ácidos cada una, plegándose independientemente de manera globular y comúnmente llamados dominios de Ig. Estos dominios tienen dos capas de hojas con un plegamiento β y cada capa se compone de tres a cinco hebras de cadenas polipeptídicas antiparalelas como se observa en la figura 7 (Abbas *et al.* 2008).

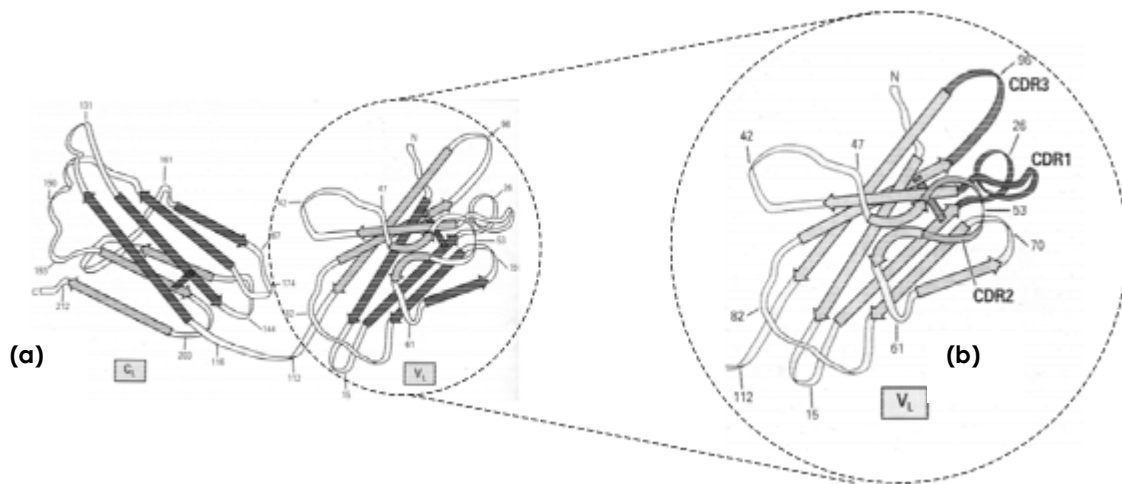


Fig. 7. Panel (a) muestra el plegamiento de los dominios de la cadena ligera de una IgG humana. El panel (b) muestra la proyección tridimensional de los CDR's de la región variable de la cadena ligera.

región C; la cadena pesada al igual que la ligera presenta un dominio de Ig en la región V y de tres a cuatro en la región C.

Como su nombre lo indica, en las regiones constantes se encuentran las secuencias de amino ácidos más conservadas y dentro de las regiones variables existen tres pequeños segmentos llamados hipervariables también conocidos como regiones determinantes de complementariedad (CDR)

en donde residen las diferencias de secuencia entre distintos anticuerpos y la mayoría de los residuos que interactúan con el antígeno por medio de complementariedad físico-química. La ubicación de los CDR's es discontinua en la secuencia lineal de la regiones variables, pero cuando se analiza la estructura tridimensional de un anticuerpo, éstos se proyectan en forma de *loops* sobre la estructura formada por las secuencias más conservadas de la propia región variable, en su conjunto llamadas regiones marco (frameworks), como muestra la figura 7 (Gavilondo, 1995).

5.1 Anticuerpos monoclonales

La respuesta inmune de un organismo cuando es expuesto a un antígeno origina una respuesta policlonal, es decir, se producen anticuerpos contra un rango amplio de epítopes o determinantes. Por otro lado los anticuerpos monoclonales (AcM's) reconocen sólo a un epítope, lo cual los hace altamente específicos (Breedveld, 2000).

A mediados de la década de los 70's, las investigaciones de Georges Köler y Cesar Milstein dieron como resultado la posibilidad de obtener preparaciones específicas, repetibles e inagotables de anticuerpos con funciones predefinidas; fusionando linfocitos provenientes de ratones BALB/c previamente inmunizados con antígenos definidos y mielomas murinos para obtener células híbridas (Hibridomas) que secretan anticuerpos, los hibridomas pueden mantenerse en cultivo o soportar congelación indefinida (Gavilondo, 2000).

Existen dos estrategias para la producción de estos anticuerpos: *In Vitro*, manteniendo el cultivo de los hibridomas y purificando los anticuerpos que son secretados al medio. *In vivo*, induciendo tumores ascíticos al inocular con hibridomas a ratones en la cavidad intraperitoneal, consiguiendo una mayor producción que en medio de cultivo (Gavilondo, 2000).

La afinidad y la especificidad de los AcM's por su antígeno abrió las puertas para el uso de éstos a nivel terapéutico, de diagnóstico e investigación (Fipula, 2007). Sin embargo el primer anticuerpo monoclonal lanzado al mercado no tuvo el éxito esperado, ya que fue reconocido por el sistema inmune humano, produciendo anticuerpos contra la proteína de ratón, limitando la capacidad terapéutica de éste y provocando efectos adversos en los pacientes (Mata *et al.* 2008).

5.2 Anticuerpos recombinantes

Con el afán de reducir los problemas de inmunogenicidad que ocasiona el uso de anticuerpos murinos, se decidió implementar técnicas de ingeniería genética para modificar estas moléculas (Little *et al.* 2000), ya sea cambiando las regiones constantes por las de Ig's humanas dando como resultado un anticuerpo quimérico (30% ratón-70% humano) o bien sustituyendo, además de las regiones constantes, las regiones marco y conservando solo los CDR's murinos, generando un anticuerpo humanizado (90-95% humano). Otra estrategia es la inmunización de

ratones transgénicos que producen el anticuerpo 100% humano contra el antígeno de interés (Fig 8).

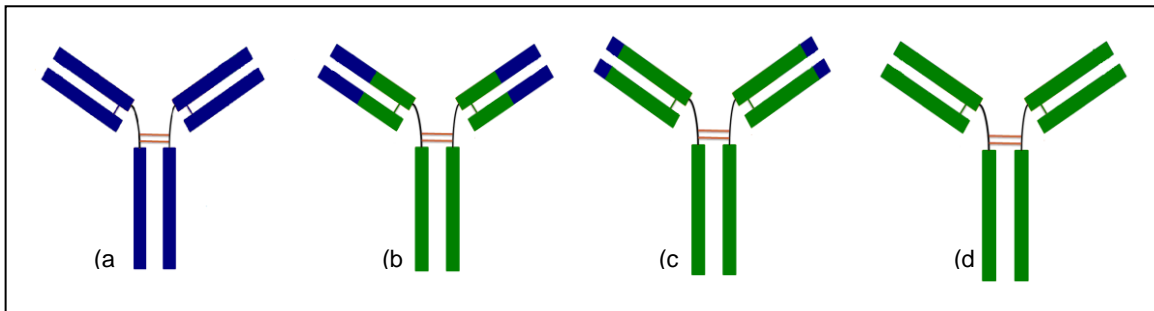


Fig. 8. Diferentes modificaciones de los anticuerpos monoclonales de (a) 100% murino, pasando por (b) quimérico (65-70% humano), (c) humanizado (90-95% humano) y humano (100% humano). En azul las secuencias murinas y en verde las secuencias humanas.

Para evitar los efectos inmunogénicos relacionados con la FC, una forma es producir fragmentos del anticuerpo tales como $F(ab')_2$ y Fab mediante la hidrólisis del anticuerpo. Actualmente se producen clonando los genes que codifican para los dominios variables y constantes de ambas cadenas, dando como resultado un Fab recombinante, o bien clonar sólo las regiones variables unidas por un péptido linker formando un fragmento de cadena sencilla o scFv (Aires da Silva *et al.* 2008). Ver figura 9.

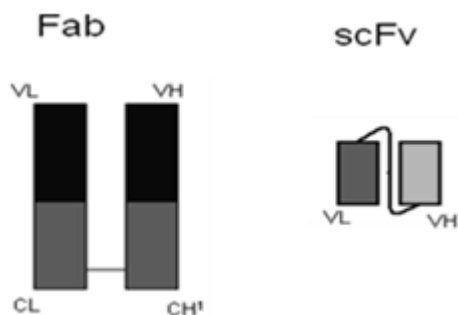


Fig. 9 Fab recombinante quimérico, VL y VH secuencias murinas y CL y CH secuencias humanas. scFv formado por los fragmentos variables de cadena ligera y pesada de secuencias humanas, unidas por un péptido linker generalmente compuesto por Gly y Ser.

5.3 Sistemas de Expresión

La elección del sistema de expresión de anticuerpos recombinantes, debe estar basada en diferentes características, como el tipo de anticuerpo que se desea obtener (IgG, Fab, scFv), la cantidad, calidad, y pureza del producto final, el propósito del anticuerpo y la relación costo-beneficio del sistema elegido (Verma *et al.* 1998).

Células animales

Los sistemas de expresión que se eligen para la producción de IgG's completos, generalmente son aquéllos que pueden hacer modificaciones postraduccionales, como las glicosilaciones que necesita la Fc de los anticuerpos. El cultivo de células de mamífero y animales transgénicos son potencialmente capaces de producir los oligosacáridos necesarios para este proceso, dado que son muy similares a los contenidos en anticuerpos humanos (Chadd y Chamow, 2001).

Una ventaja más que presentan estos sistemas de expresión es el correcto plegamiento de la proteína (Hayden *et al.* 1997). Sin embargo, todo el proceso que se lleva a cabo para obtener anticuerpos a partir de células animales es caro y los beneficios que se obtienen basados en los rendimientos de producción, no se comparan a los de inversión.

Células de Insecto

Otro de los sistemas de expresión apto para los anticuerpos completos, son las células de insecto. Baculovirus es la línea de células más usadas en este sistema, ha sido capaz de expresar anticuerpos funcionalmente activos, los

rendimientos pueden llegar a ser mayores que en células de mamíferos, además son capaces de llevar a cabo modificaciones postraduccionales; asimismo, son más seguras que las células de mamífero ya que son hospedero de pocos patógenos, lo que las hace menos susceptibles a contaminación. No obstante los medios de cultivo también son caros, el crecimiento es lento y nuevamente la relación costo-beneficio no es buena (Verma *et al.* 1998).

Plantas

El sistema de expresión en plantas es uno de los más prometedores a nivel comercial, pensando en grandes extensiones de cultivos y por tanto una producción masiva del anticuerpo. El DNA del anticuerpo se introduce en la planta generalmente por medio de una infección de *Agrobacterium*, la proteína puede obtenerse en las semillas o bien en las hojas (Chadd y Chamow, 2001). Además de que los costos de producción son bajos, las plantas son capaces de producir IgG's, Fab, scFv o bien algún tipo de fragmento acoplado a algún dominio proteico (Littlel *et al.* 2000).

No obstante, se necesita toda la infraestructura que le permita a las plantas desarrollarse y mantenerlas protegidas de la plagas que puedan atacarles, lo que nos habla de una fuerte inversión inicial (Chadd y Chamow, 2001).

Levadura

Un sistema de expresión a considerar es la levadura, que crece rápidamente en un medio de cultivo bastante simple y económico; esto lo hace atractivo a nivel clínico e industrial, ya que puede ser implementado en un sistema de fermentación a gran escala. Asimismo ya se han expresado con éxito algunos anticuerpos y fragmentos de estos con una actividad de unión al antígeno comparable con aquellos secretados por células linfoides (Verma *et al.* 1998) Las levaduras son capaces de producir proteínas de mamífero con plegamiento correcto y funcionalmente activas, ya que la levadura al ser un organismo eucarionte puede estar mejor capacitada que otros sistemas, por ejemplo, las bacterias (Grönwall y Ståhl, 2009).

Bacteria

La producción de Fab y scFv en bacterias, especialmente en *E. coli*, ha tenido un gran auge, ya que ninguna de estas proteínas necesita glicosilaciones. Además, el sistema de expresión es bastante sencillo, generalmente. El DNA externo es fácilmente introducido en el organismo, el cual es capaz de producir una gran cantidad de proteína, permite purificar y probar la actividad de la proteína de interés, todo esto en un lapso de tiempo significativamente más corto que cualquier otro sistema y el costo de producción es mínimo (Sandee *et al.* 2005).

Existen básicamente dos estrategias de producción de anticuerpo en *E. coli*, una es dirigiendo a la proteína al espacio periplásmico, en donde el

ambiente oxidante y la presencia de chaperoninas como las isomerasas, que forman puentes disulfuro, pueden ayudar al correcto plegamiento del anticuerpo (Verma *et al.* 1998). La otra estrategia es la expresión de las proteínas en el citoplasma, en donde el ambiente es reductor y generalmente las proteínas están mal plegadas y forman agregados llamados cuerpos de inclusión, los cuales pueden disolverse con sales cautrópicas como el cloruro de guanidinio o urea y desarrollar un protocolo de replegamiento in-vitro (Belin *et al.* 2004).

Antecedentes

La FDA aprobó tres fragmentos Fab, uno de ellos es una molécula quimérica, la cual se usa en el tratamiento de trastornos cardiovasculares, Abciximab (2004). Los dos siguientes son Fab humanizados, el primero; Ranibizumab (2006-2007), para el tratamiento de la degeneración macular húmeda y Certolizumab (2008) en el tratamiento de la enfermedad de Crohn (Mata *et al.* 2008).

En el laboratorio del Dr. Alagón (Instituto de Biotecnología, UNAM) se obtuvo un AcM (5C10) que reconoce e inhibe a las toxinas nativas y recombinantes de *L. boneti* y *L. reclusa*.

Uno de los objetivos de la tesis de maestría de Claudia L. Moctezuma fue generar fragmentos Fab mediante la digestión con pepsina del AcM 5C10, observando que el comportamiento de reconocimiento e inhibición se conserva después de la fragmentación de éste. Posteriormente ella generó un Fab recombinante quimérico compuesto por las regiones variables murinas del AcM 5C10 y regiones constantes humanas, siguiendo la estrategia de expresión en *E. coli* y señalizando a la proteína para transportarla a espacio periplásmico, un ambiente adecuado para tener un correcto plegamiento del fragmento; logrando la expresión del Fab 5C10 quimérico recombinante. Sin embargo, el mejor rendimiento obtenido fue de 62 µg por litro de cultivo. Además el Fab obtenido no mostraba un efecto neutralizante sobre la SMD de *L. boneti* o *L. reclusa*.

Se puede concluir que la estrategia anterior no fue eficiente para la producción del Fab quimérico del AcM 5C10.

Lee y Kwak en el año 2008, construyeron y clonaron en plásmidos separados a la cadena ligera y a la cadena pesada del Fab de un anticuerpo monoclonal específico contra la apolipoproteína B-100 (apo B-100) de plasma humano. La cadena ligera y la cadena pesada se expresaron como cuerpos de inclusión en el citoplasma de *E. coli*, éstos se obtuvieron del lisado de las células, se solubilizaron en 6 M guanidinio-HCl y se mezclaron en cantidades molarmente equivalentes. El replegamiento se llevó a cabo en tres pasos de diálisis de tal forma que la concentración de guanidino-HCl bajara gradualmente hasta llegar a cero. Después del replegamiento el Fab recombinante (rFab) fue purificado a través de una columna de afinidad acoplada a apo B-100.

Cuando compararon la actividad del rFab contra las del Fab nativo por medio de un ensayo de ELISA, observaron que la afinidad del rFab fue ligeramente menor al del nativo. Además los rendimiento obtenidos por litro de cultivo de *E. coli* fueron de 2.4 a 3 mg de rFab activo.

Justificación

Producir un Fab recombinante quimérico del AcM 5C10, en un sistema de expresión como *E. coli*, que reduce los costos de producción y aumenta el rendimiento, y manteniendo las propiedades de especificidad, abre las puertas a una serie de estudios de evaluación como un posible antiveneno.

Hipótesis

La producción de una gran cantidad de cadena ligera y cadena pesada del AcM 5C10 a manera de cuerpos de inclusión, permitirá llevar a cabo el plegamiento in-vitro de un Fab recombinante quimérico que conserve las características de especificidad y neutralización del anticuerpo murino.

Objetivos

General

Optimizar la producción del Fab 5C10 recombinante quimérico que reconozca e inhiba a la esfingomielinasa-D de las arañas *L. boneti* y *L. reclusa*.

Particulares

- Encontrar las condiciones óptimas de expresión tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera.
- Analizar por separado la forma soluble de las cadenas ligera y pesada recombinantes.
- Efectuar pruebas de reconocimiento e inhibición con la cadena ligera y la cadena pesada recombinantes por separado y compararlos con el AcM 5C10 completo.
- Realizar el replegamiento in-vitro de las dos cadenas para formar el Fab 5C10 quimérico.
- Efectuar pruebas de reconocimiento e inhibición con el Fab 5C10 quimérico recombinante y compararlas con el AcM 5C10 completo.

Materiales y Métodos

Amplificación de la cadena ligera y cadena pesada

A partir de las construcciones ya existentes en el laboratorio del Dr. Alagón, tanto para la cadena ligera como la cadena pesada del AcM 5C10, las cuales se encontraban en el vector pQE60, ambas flanqueadas por los sitios de restricción *NcoI* en el amino terminal y *BglII* en el carboxilo terminal, se obtuvo una buena expresión de la cadena ligera, no así para la cadena pesada (Claudia Moctezuma).

Para la cadena pesada se diseñó una nueva construcción con los sitios de restricción *BamHI* para el amino terminal y *BglII* en el carboxilo terminal.

Obtención del DNA plasmídico

Se utilizó el Kit High Pure Plasmid Purification (ROCHE) siguiendo las recomendaciones del proveedor.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se obtuvo el DNA plasmídico que contenía el gen codificante para la cadena pesada con los sitios *NcoI/BglII*, el cual se usó como templado.

Para el PCR se utilizaron los oligonucleótidos de la tabla 1, que llevan los sitios de restricción para las enzimas *BamHI* y *BglII* y generan un producto de aproximadamente 700 pb.

Tabla 1. Oligonucleótidos para la construcción *BamHI/BglII*

Oligo	Secuencia	Posición de alineamiento
--------------	------------------	---------------------------------

SenHBamHI	5'GGA TCC CAG GTT ACT CTG AAA GAG T 3'	Extremo 5' de la cadena pesada de AcM 5C10
AntHBgIII	5' G TTT TGA GTG TGT CCG CGG CGC 3'	Extremo 3' de la cadena pesada de AcM 5C10

La mezcla para la reacción en cadena de la polimerasa fue de 5 µl de buffer 10x + Mg²⁺ para PCR, 4 µl de dNTP (Biolabs) 2.5 mM, 20 pmoles del oligo sentido, 20 pmoles del oligo antisentido, 0.5 µl de Taq DNA polimerasa y 1 µl del templado, ajustando el volumen a 50 µl con agua estéril.

Condiciones para la reacción de PCR

94 °C 2 min. 1 ciclo
94 °C 1 min.
55 °C 2 min. 25 ciclos
72 °C 2 min.
72 °C 10 min. 1 ciclo
4 °C ∞

Temperaturas de alineamiento determinadas con el programa Oligo 6.1.

El producto de PCR se analizó en un gel de agarosa a una concentración del 1 %.

Los oligos fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Clonación y secuenciación del producto de PCR

La construcción de la cadena pesada (H5C10 BamHI/BgIII) fue clonada en el vector pCR[®]2.1-TOPO[®] (TOPO) de Invitrogen de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Este vector se encuentra linearizado y en cada extremo exhibe una timidina sobresaliente que se encuentra unida

covalentemente a una topoisomerasa I que se sirve de la adenina que deja la Taq polimerasa para ligar el fragmento amplificado por PCR.

Se transformaron células competentes a Ca²⁺ XL1-Blue con la construcción TOPO-H5C10. Las células fueron plaqueadas en cajas petri de medio Luria Bertani (LB) (Apendice A) más agar con 40 µl de X-gal a una concentración de 40 mg/ml.

Los vectores de la serie pUC permiten un análisis colorimétrico a nivel de placa, el cual es posible gracias a la α-complementación de la β-galactosidasa.

Cuando se inserta el material genético de interés en el sitio de clonación múltiple del plásmido, en este caso TOPO, se interrumpe la transcripción del amino terminal de la β-galactosidasa, por tanto la complementación no ocurre y las bacterias son incapaces de metabolizar al X-gal, formando colonias blancas en presencia de este sustrato.

Se seleccionaron las colonias blancas y se inocularon en 3 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml), posteriormente se purificó el DNA plasmídico de éstas y se llevo a cabo un análisis de restricción con las enzimas *Bam*HI y *Bg*III. El material genético de las clonas positivas se envió a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Subclonación en el vector de expresión

Una vez que se verificó que la secuencia del inserto es correcta, se trasladó al vector de expresión pQE60, el cual posee un sitio de clonación múltiple

que permite el uso de tres sitios de restricción: *Nco*I, *Bam*HI y *Bgl*III, seguido de una etiqueta de seis histidinas en el carboxilo terminal; asimismo confiere resistencia a ampicilina (Fig. 11)

La etiqueta de histidinas nos permitió purificar la proteína recombinante acoplándola a una columna de níquel (Ni-NTA), no interviniendo en la estructura o función de la misma.

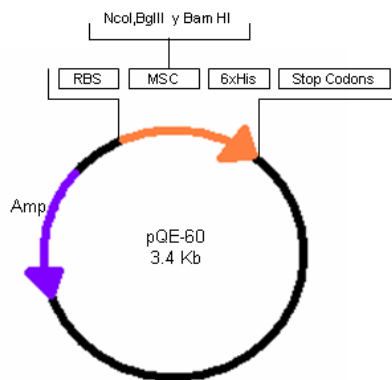


Fig. 11. Diagrama del plásmido pQE60. El diagrama muestra el sitio de clonación múltiple con los sitios de restricción que posee y la etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo terminal.

En la figura 12 se muestra una representación de la construcción de la cadena pesada con el sitio *Bam*HI en el extremo 5' y *Bgl*III para el extremo 3'.

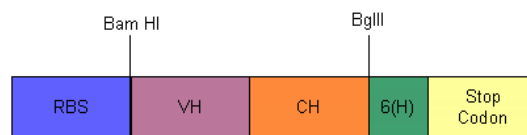


Fig. 12. Representación esquemática de la construcción para la expresión de la cadena pesada. RBS sitio de unión al ribosoma, VH región variable de la cadena pesada (murina), CH región constante de la cadena pesada (humana), 6(H) etiqueta de 6 Histidinas.

Al igual que en la clonación en *E. coli*, se realizó un análisis de restricción con las enzimas correspondiente, observando los resultados en geles de agarosa al 1%.

La figura 13 muestra un esquema de la construcción de la cadena ligera con el sitio de restricción *Nco*I en el extremo 5' y *Bgl*III en el extremo 3'.

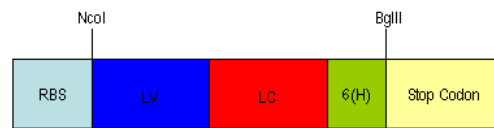


Fig. 13. Representación esquemática de la construcción para la expresión de la cadena ligera. RBS sitio de unión al ribosoma, LV región variable de la cadena ligera (murina), LC región constante de la cadena ligera (humana) subclase Kappa, 6(H) etiqueta de 6 Histidinas

Expresión de la cadena pesada (rH5C10) y cadena ligera (rL5C10)

Se transformaron células competentes a Ca^{2+} de la *E. coli* cepa BL21-DE3 Gold con ambas construcciones. Posteriormente se plaquearon en medio LB sólido más ampicilina a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ y se dejaron crecer durante 12 horas a 37 °C. De las colonias resultantes se inocularon cultivos de 3 ml de LB más ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$); se incubaron durante toda la noche a 37 °C con agitación constante (250 rpm).

Después se tomaron 100 μl del cultivo anterior para inocular 3 ml de LB más ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$), incubando a 37 °C con agitación constante (250 rpm) hasta alcanzar una OD_{600} igual a 0.6 y se adicionó IPTG 1 mM. Posteriormente se incubó por tres horas a 37 °C con agitación constante (250 rpm).

El análisis de expresión se llevó a cabo tomando 1 ml de cultivo y centrifugando a 13 000 rpm durante 3 min, realizando una lisis total al resuspender en 40 μl de agua y adicionando 40 μl de simple buffer 2X

(Apendice A). Se comparó el nivel de expresión de diferentes clonas en un SDS-PAGE al 12.5 % en condiciones desnaturalizantes.

Identificadas las clonas que expresaban a las proteínas de interés, se inocularon cultivos de 3 ml con las condiciones antes mencionadas. Transcurrido el tiempo de incubación, se inocularon 500 ml de LB a la misma concentración de antibiótico con un décimo del cultivo de cada cadena; se incubó a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6, una vez alcanzada, se indujo el cultivo con 2 mM IPTG a la misma temperatura durante tres horas.

Obtención y purificación de rH5C10 Y rL5C10

Terminada la inducción, el cultivo se centrifugó a 8 000 rpm por 20 minutos a 4 °C; se desechó el sobrenadante y las células se sometieron al método Bug Búster (Novagen) siguiendo las indicaciones del proveedor. Este método permite separa las proteínas solubles y aquéllas que quedan en cuerpos de inclusión.

La purificación se hizo por medio de una columna de afinidad a níquel con la resina Níquel-nitrilacético (Ni-NTA) de QIAGEN.

Proteína soluble

Para cada proteína se utilizaron 2 ml de resina, éstas fueron equilibradas con 20 ml de PBS 1X (Apéndice A), posteriormente se pasaron las muestras por las columnas y recircularon dos veces a flujo muy lento, a continuación

fueron lavadas con 40 ml de 25 mM imidazol en PBS 1X, después las muestras se eluyeron en 250 mM imidazol en PBS 1X; finalmente se dializaron contra 1 L de PBS 1X durante toda la noche a 4 °C.

Cuerpos de Inclusión

Los cuerpos de inclusión se resuspendieron en un volumen aproximado de 25 ml PBS 1X con 6 M cloruro de guanidinio (Gnd-HCl) y la solución se centrifugó por 25 min. a 13 000 rpm para remover los precipitados insolubles, posteriormente se incubaron durante dos horas con la finalidad de solubilizarlos por completo.

Replegamiento

Después de purificar los cuerpos de inclusión de las cadenas pesada y ligera, se mezclaron en cantidades equimolares, una vez hecho esto, se agregó β -Mercaptoetanol a una concentración final de 70 mM (reducción de puentes disulfuro) y se incubó a 40 °C durante 1 hora. Transcurrido el tiempo se agregaron 200 μ l de solución rédox (Apéndice A) por cada mililitro de mezcla, después se realizó una diálisis de 1 hora en 100 ml de buffer de replegamiento (Apéndice A) con 3 M Gnd-HCl.

Posteriormente se añadió a la diálisis 100 ml de buffer de replegamiento con 1 M Gnd-HCl, lentamente (2 ml/min). Por último se agregaron 100 ml de buffer de replegamiento a una velocidad de 1 ml/min. y se dejó reposar por 1 hora. Transcurrido el tiempo, la mezcla de replegamiento se dejó dializando toda la noche en 1L de 0.1 M Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA para

remover el β -Mercaptoetanol y Glutathion Oxidado (GSSG); dando tiempo suficiente para la formación de puentes disulfuro y mantener la estructura del Fab (Lee y Kwak, 2003).

Pruebas de ELISA Directo

Para este ensayo la placa de ELISA se sensibilizó con toxina recombinante de *L. boneti* a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$, incubando por dos horas a 37 °C. Se lavó la placa con 200 μl por pozo de solución de lavado por triplicado (repetiendo este procedimiento al término de cada incubación).

El bloqueo se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C con 200 μl por pozo de buffer de bloqueo (Apéndice A).

Posteriormente se adcionó la cadena recombinante rL5C10, rH5C10 o rFab 5C10, se hicieron diluciones 1:2 en buffer de reacción (Apendice A) 100 μl por pozo incubando por 1 hora a 37 °C.

Como segundo anticuerpo se utilizó un suero de conejo α -IgG`s humanas en una dilución 1:1000 en buffer de reacción, 100 μl /pozo, incubando durante 1 hora 37 °C.

El tercer anticuerpo fue de cabra α -conejo acoplado a fosfatasa alcalina (Zymed) en una dilución 1:1000 en buffer de reacción, se usaron 100 μl /pozo y se incubó durante 1 hora a 37 °C.

La prueba fue revelada con 100 µl/pozo de sustrato, ABTS (ROCHE), la reacción se incubó a temperatura ambiente por 15 min. y se detuvo con 25 µl/pozo de SDS al 20%.

La lectura de la placa se realizó en el lector de ELISA a 405 nm (Magellan). Los análisis de los datos obtenidos se realizaron con el programa PRISM[®] (Graph Pad, San Diego, CA).

Ensayos de inmunodetección por western blot

En un gel de poliacrilamida, se corrieron las muestras que se deseaban analizar, terminada la corrida, se realizó una transferencia a corriente constante (400 mA) durante una hora a una membrana de nitrocelulosa, para lo cual se utilizó una cámara de transferencia (OWL) en condiciones semihúmedas. A continuación, la membrana fue bloqueada en una solución de leche descremada/TBST + 0.02% de azida de sodio durante toda la noche a temperatura ambiente y con agitación constante, a manera de evitar el pegado inespecífico de los anticuerpos.

Al día siguiente, se lavaron las membranas con TBST 1X durante diez minutos (tres veces), terminados los lavados se incubaron las membranas con los anticuerpos correspondientes a una concentración conocida en TBST con leche descremada al 0.1%, con agitación constante, a

temperatura ambiente durante una hora, se hicieron lavados tres lavados con TBST de diez minutos cada uno entre cada anticuerpo.

Finalmente se lavaron las membranas por triplicado con TBST y se reveló con el buffer de reacción NTB-BCIP (Zymed) dejando actuar entre 5 y 10 min.

Western blot de productos recombinantes

Para identificar a rL5C10 y rH5C10 tanto de manera soluble como en cuerpos de inclusión, se corrieron 20 µl de cada muestra y aplicando el protocolo anterior, se utilizó un anticuerpo anti-histidinas acoplado a fosfatasa alcalina (ROCHE).

Western blot utilizando los productos recombinantes como anticuerpo

Para probar la afinidad del rL5C10 y rH5C10 solubles hacia la toxina de *L. boneti* extraída del glándula se corrió una escalera de 4,3,2 y 1 µg de la toxina y para el control con el AcM 5C10 se usaron 1, 0.5, 0.25 y 0.125 µg de la toxina.

Los fragmentos rL5C10 y rH5C10 se usaron a una dilución 1:100 (500 µg) cada uno y el AcM completo (control) se usó en una dilución 1:1000 (5 µg). Como segundo anticuerpo para los fragmentos se utilizó el anti-histidinas acoplado a fosfatasa alcalina (ROCHE) y para el control un anti-ratón acoplado a fosfata alcalina (Zymed).

Ensayo de inhibición enzimática

El kit Amplex™ Red (Molecular Probes) es capaz de medir la actividad enzimática de la esfingomielinasa D por medio de una cascada acoplada de tres reacciones. La primera es la hidrólisis de la esfingomielina, por esfingomielinasa D en fosfoceramida y colina. La segunda es la oxidación de la colina por la colina oxidasa liberando betaína y peróxido de hidrógeno. Finalmente la peroxidasa interactúa con el Amplex Red generando un compuesto colorido, Resorufina (Fig.14).

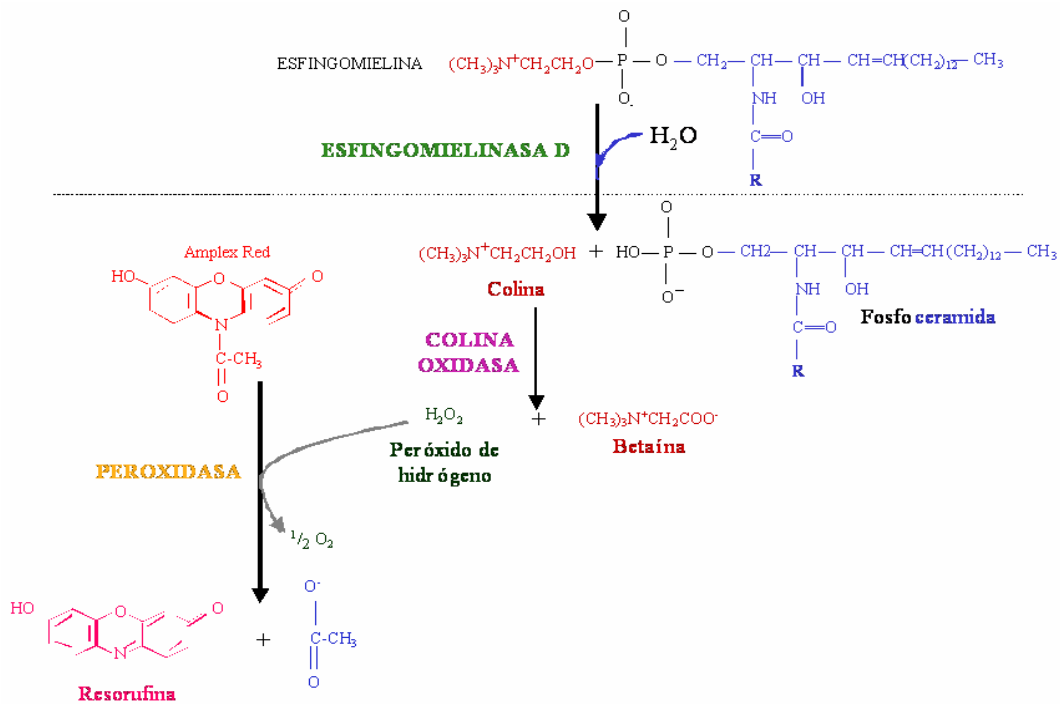


Fig. 14. Esquema del mecanismo de acción del Kit Amplex Red (Molecular Probes)

El experimento de la inhibición enzimática generalmente se hace incubando diferentes concentraciones de anticuerpo junto con la toxina.

Para este caso se modificó de la siguiente manera:

Se incubaron 15 ng de toxina *rL. boneti* junto con el máximo volumen (250 μ l) por pozo de anticuerpo, incubando 30 min. a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron 100 μ l y se pasaron a pozos limpios dentro de la misma placa a manera de duplicados y después se agregaron 100 μ l de la mezcla de reacción (Tabla 1) se incubó por 30 min. a 37 °C, posteriormente se tomó la lectura de la absorbancia a 570 nm en el lector de ELISA.

Tabla 1. Componentes de la mezcla de reacción

Solución Stock	Concentración final 1x	Proporción en la mezcla
Agua destilada	cbp	Cbp
Buffer 5x	50 mM	1/5
HRP (200 U/ml)	1 U/ml	1/100
Colina Oxidasa (20 U/ml)	0.1 U/ml	8/100
Esfingomielina (5 mM)	0.25 mM	1/10
Amplex Red (10 mM)	0.05 mM	1/100

En el procesamiento de los datos, la absorbancia del control positivo se tomó como el 0% de inhibición, así el porcentaje de inhibición se calculó proporcionalmente al del control positivo, promediando los duplicados para cada muestra.

Resultados y Discusión

Amplificación de la cadena pesada

EL material genético codificante para la cadena pesada se encontraba en el plásmido pQE60 con el sitio de restricción *Nco*I en N-terminal y *Bgl*III en C-terminal. Esta construcción fue sometida a los experimentos de expresión de la proteína, obteniendo cantidades mínimas, lo cual nos llevó a realizar una nueva construcción.

Basándonos en experiencias previas utilizando este plásmido en la expresión de proteínas recombinantes, donde se obtuvo una buena expresión cambiando el sitio *Nco*I por *BAm*HI en el extremo amino terminal, se decidió tomar como template la construcción de la cadena pesada bordeada por los sitios *Nco*I/*Bgl*III y amplificarlo usando los oligos Sen BamHI y Ant Bgl II. El tamaño esperado del producto de PCR con los nuevos sitios de restricción fue de aproximadamente 700 pares de bases (pb). Ver figura 15.

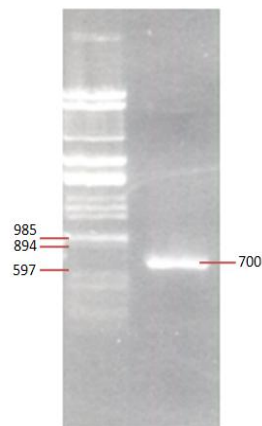


Fig. 15 Producto de PCR con los oligos SenBam HI y AntBgl II, con un peso aproximado de 700 pares de bases en comparación con el marcador de peso molecular λ Eco RI.

El producto de PCR se clonó en el vector TOPO, posteriormente se transformaron células competentes XL1Blue y se plaquearon en presencia de X-gal permitiendo diferenciar por α -complementación, las colonias que presentaban el inserto (blancas) de aquéllas que no (azules).

Ensamblaje del vector de expresión y obtención de las secuencias de la cadena pesada y ligera.

Para subclonar a la cadena pesada en el plásmido pQE60 se liberó el inserto del vector TOPO, usando los nuevos sitios de restricción antes mencionados, como se muestra en la figura 16.

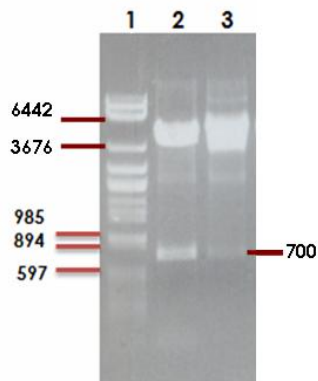


Fig. 16 Análisis de restricción (Bam HI/Bgl II) de los plásmidos (TOPO) de dos clonas que presentan la secuencia que expresa para la cadena pesada.

El fragmento liberado se purificó y subclonó en el plásmido pQE60; ya que ofrece diversas ventajas, como la etiqueta de histidinas que permite una fácil purificación a través de una columna de níquel y no interfiere con el sitio de unión al antígeno ya que se encuentra en el extremo carboxilo terminal. La transformación se hizo en células BL21 DE3-Gold al igual que la construcción de la cadena ligera.

Se hizo un análisis de restricción de varias clonas para verificar que los sitios de restricción se encontraran en el plásmido y se mandaron a secuenciar aquellas que liberaron el fragmento de interés (Fig. 17).

Se hizo un análisis de restricción de varias clonas para verificar que los sitios de restricción se encontraran en el plásmido y se mandaron a secuenciar aquellas que liberaron el fragmento de interés (Fig. 17).

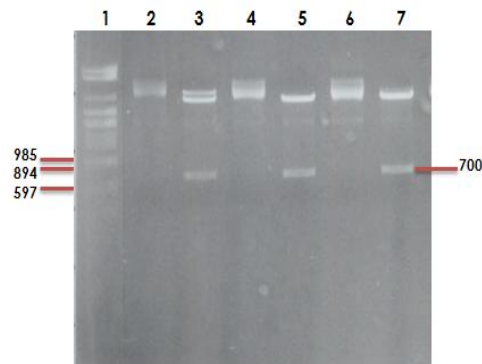


Fig. 17. Análisis de restricción (Bam HI/Bgl II) en el plásmido pQE60. En el carril 1 se encuentran los marcadores de peso molecular λ Eco 471, del carril 2-7 se encuentran las clonas 1-6 respectivamente, mostrando solo en el caso de los carriles 3, 5 y 7 la presencia de una banda del tamaño correspondiente a la cadena pesada (700pb aprox.)

La secuenciación de este fragmento se llevó a cabo para comprobar que la secuencia era correcta y se encontraba en una dirección codificante adecuada.

La secuencia nucleotídica madura de la cadena pesada recombinantes quimérica se muestra en la figura 18. Ésta se compone de 693 pb junto con lossitios de restricción y la etiqueta de histidinas.

```

ATG GGA GGA TCC CAG GTT ACT CTG AAA GAG TCT GGC CCT GGG ATA TTG CAG CCC TCC CAG ACC
CTC ATT CTG ACT TGT TCT GTC TCT GGG TTT TCA GTG AGC ACT TCT ACT TTG GGT GTA GGC TGG ATT
CGT CAG CCT TCA GGG AAG GGT CTG GAG TGG CTT TCA CAC ATT TTG TGG AAT GAG AGT CAG TTC
TTT AAC CCA ACC CTG AAG AGC CGG CTC ACA ATC TCC AAG GAT ACC CAC AAC GAC CAG GTT TTC
CTCAAG ATC GCC AAT GTG GAC ACT GCA GAT AGT GCC ACA TAT TAC TGT GCT CGA AAA GCT GGG
ACT GGC TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC GCA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GCC TCC ACC
AAG GGC CCA TCG GTCTTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC
CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC
CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC
AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AACGTG AAT
CACAAAG CCC AGC AAC ACC AAG GTC GAC AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC

```

La obtención de la cadena ligera y los procesos de clonación, subclonación y análisis de la expresión de la cadena ligera se realizaron por CAudia Moctezuma en el laboratorio del Dr. Alagón. La secuencia nucleotídica que codifica para la cadena ligera recombinante quimérica se compone de 645 pb con los sitios de restricción y la etiqueta de histidinas (Fig. 19).

```

ATG GGA GAC ATA TTG TTG ACC CAG TCT CCA GCC ATC CTG TCT GTG AGT CCA GGA GAA AGA GTC
AGT TTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGC ATT GGC ACA AGC ATA CAC TGG TAT CAG AAA GAA CAA
ATG GGT TCT CCA AGG CTT CTC ATA AAG TAT GTT TCT GAG TCT ATC TCT AGG ATC CCT TCT AGG TTT
AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAT TTT ACT CTT AGC ATC AAC AGT GTGGAG TCT GAA GAT ATT
GCA GAT TAT TAC TGT CAA CAG AGT TAT AGC TGG CCA ACC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG
CTGGAG CTG AAG CGG CGG ACC GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG
CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC
AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAGAGT GTC ACA GAG
CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC
GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG
AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT AGA TCT CAT CAC CAT CAC CAT CAC
  
```

Para el análisis *in silico* de ambas cadenas se utilizaron los programas Gene

Con: Fig. 19 Secuencia nucleotídica de la cadena ligerarecombinante quimérica . De color azul la región variable murina y de color rojo la región constante humana, subclase kappa, en gris el sitio NcoI, en negro el sitio de restricción BqII y en cian la etiqueta de seis histidinas.

ambas cadenas, obtenidas en la tesis de maestría (Moctezuma, 2008)

Las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada recombinante

quimérica (rH5C10) (Fig. 20) y de la cadena ligera recombinante quimérica

(rL5C10) (Fig. 21) se muestran a continuación.

```

M G S Q V T L K E S G P G I L Q P S Q T L I L T C S V S G F S V S
T S T L G V G W I R Q P S G K G L E W L S H I L W N E S Q F F N
P T L K S R L T I S K D T H N D Q V F L K I A N V D T A D S A T Y
Y C A R K A G T G W Y F D V W G A G T T V T V S S A S T K G P S
V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V
S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V
P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C
D K T H T G A A R S H H H H H H
  
```

Fig. 20. Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada recombinante quimérica. En morado la región variable de la cadena pesada, en anaranjado la región constante de una IgG humana, en verde en sitio de restricción Bam HI, en negro el sitio Bgl II y en cian la etiqueta de 6 His.

```

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

```

Fig. 21. Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera recombinante quimérica. De color azul la región variable murina y de color rojo la región constante humana, subclase kappa, en gris el sitio Nco I, en negro el sitio de restricción Bgl II y en cian la etiqueta de seis histidinas

La 10119

u de o

histifinas es de 215 aminoácidos y 231 aminoácidos para rH5C10. Ambas cadenas presentan la etiqueta de histidinas para poder ser purificadas mediante afinidad Ni-NTA. Las cisteínas (sombreadas) son los aminoácidos capaces de formar puentes disulfuro tanto intracadena como intercadena en ambas proteínas.

Expresión de la cadena ligera y de la cadena pesada

La expresión de ambas proteínas se realizó en la cepa de *E. coli* BL21-DE3 Gold, debido a la experiencia previa y los buenos resultados con otras proteínas recombinantes en el laboratorio. Las condiciones óptimas de expresión fueron cuando el cultivo alcanzó la O.D.₆₀₀ de 0.6 e inducción por tres horas a 37° C con agitación constante (250 rpm) y 2 mM de IPTG. El análisis de expresión se llevó a cabo extrayendo las proteínas por medio de un lisado total y corriéndolas en un SDS-PAGE.

Puede observarse una clara sobreexpresión de una proteína alrededor de los 25 KDa que se acerca al peso esperado por parte de la cadena ligera

en la figura 22. Sin embargo en la figura 23 correspondiente a la cadena pesada no hay una diferencia significativa entre las bandas que se encuentran cerca de los 25 KDa, que es donde se esperaba la sobreexpresión de la cadena pesada.

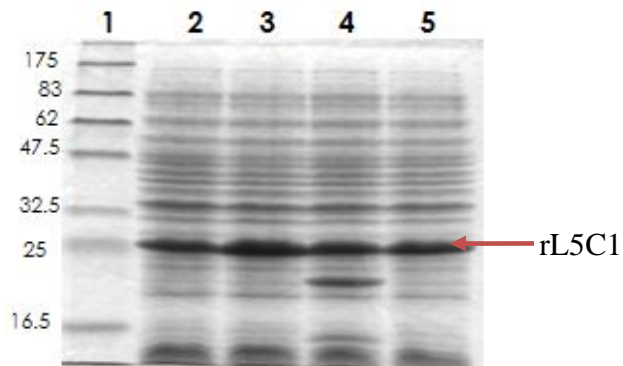


Fig. 22 Análisis electroforético de la expresión de la cadena ligera (L5C10) del Fab recombinante quimérico 5C10. En el carril 1 marcadores de peso molecular (MPM), carril 2-5 pQE60 con L5C10 de las clonas 1-4 respectivamente. Todas las muestras se tomaron después de la inducción.

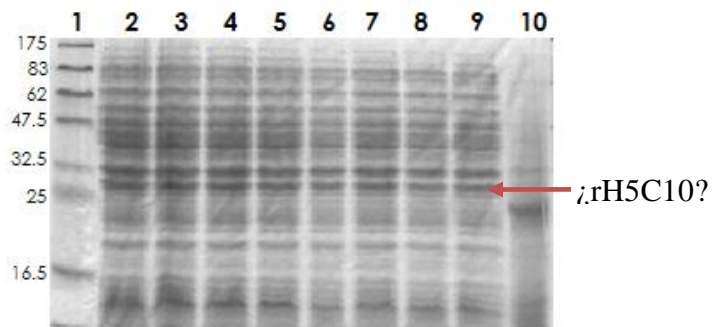


Fig. 23 Análisis electroforético de la expresión de la cadena pesada (H5C10) del Fab recombinante quimérico 5C10. El carril 1 MPM, carril 2-9 pQE60 con H5C10 de las clonas 1-8 respectivamente y en el carril 10 control de la lisis total de la clona 2 de L5C10.

Se realizó un análisis alterno para verificar la presencia de las proteínas de interés, siendo esto posible gracias a la etiqueta de histidinas que presentan ambas en el extremo carboxilo terminal, permitiendo la

detección de éstas por medio de western blot, utilizando un anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina específico anti-histidinas.

En la figura 24 se observa que, la banda reconocida por el anticuerpo, coincide perfectamente con la banda que se sobre expresa en el SDS-PAGE de la figura 22 correspondiente a rL5C10.

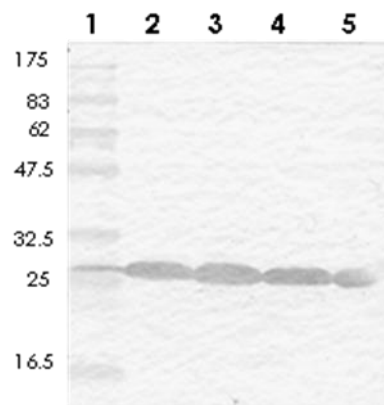


Fig. 24 Análisis de la expresión de L5C10 por medio de western blot, utilizando un anticuerpo específico anti-His acoplado a fosfatasa alcalina. En el carril 1, MPM; carriles de 2-5 proteínas extraídas de las clonas 1-4 respectivamente.

La figura 25 muestra una banda cercana a los 20 kDa, lo que se acerca al peso esperado para rH5C10. En el caso de ambas proteínas se observa que hay una alta especificidad por parte del anticuerpo, ya que no hay un reconocimiento en proteínas que no tienen una etiqueta de histidinas.

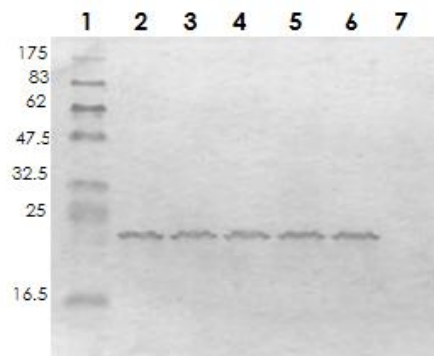


Fig. 25 Análisis de la expresión de H5C10 por medio de western blot, utilizando un anticuerpo específico anti-His acoplado a fosfatasa alcalina. Carril 1: MPM, carril 2-6 proteínas extraídas de las clonas 1-5 y carril 7 control negativo para el anticuerpo, AcM 5C10 carente de etiqueta de His.

Otra observación interesante en las figuras 24 y 25 es que el patrón electroforético de la cadena pesada es muy particular; ya que esperábamos que la proteína se encontrara por arriba de la cadena ligera y observamos que es contrario a lo esperado. Esto puede ocurrir por la composición de aminoácidos de la cadena pesada, es decir una proteína compuesta mayoritariamente por residuos de aminoácidos con carga negativa podría migrar más rápidamente aún cuando todas las muestras sean tratadas con SDS.

Una vez obtenidos estos resultados, se seleccionaron la clona 4 para L5C10 y la clona 2 para H5C10; con éstas se llevaron a cabo cultivos de 500 ml. Al igual que los resultados anteriores se utilizaron las condiciones óptimas de expresión, que para ambas proteínas son 37^a C, 2 mM de IPTG (inductor) a una agitación constante de 250 rpm durante tres horas.

Estos cultivos fueron concentrados para posteriormente purificar por separado los cuerpos de inclusión en Gnd-HCl y la proteína soluble en PBS 1X.

Obtención de las cadenas ligera y pesada de manera soluble

Por las condiciones del citoplasma de la bacteria se sabía que la mayoría de la proteína se encontraría en cuerpos de inclusión; sin embargo BL21 es una cepa que favorece la expresión de la proteína soluble, así que se

decidió realizar un análisis electroforético y western blot del sobrenadante del concentrado de los cultivos de 500 ml de ambas proteínas.

En la figura 26, se observa que en el caso de rL5C10 posterior a la purificación existen dos bandas cercanas a los 25 KDa, sin embargo en el western blot de la figura 27, indica que la banda que corresponde a la cadena ligera es la que presenta mayor peso molecular. Con base en esto podemos decir que para la cadena ligera tenemos alrededor de un 2 % de proteína en el total de la muestra y para la cadena pesada alrededor de un 8%.

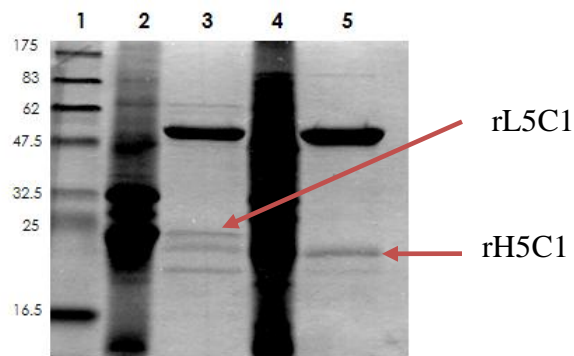


Fig. 26 Análisis de la expresión de rL5C10 y rH5C10 en estado soluble. Carril 1: MPM, carril 2: lisis total de la clona 4/L5C10 (16 μ l), carril 3: purificación de L5C10 por columna de Ni-NTA (4 μ g), carril 4: lisis total de la clona 2/H5C10 (16 μ l), carril 5: purificación de H5C10 por columna de Ni-NTA.(6 μ g)

Al hacer una comparación de ambas cadenas a nivel de western blot (fig. 27) confirmamos que la cadena pesada se ubica por debajo de la cadena ligera.

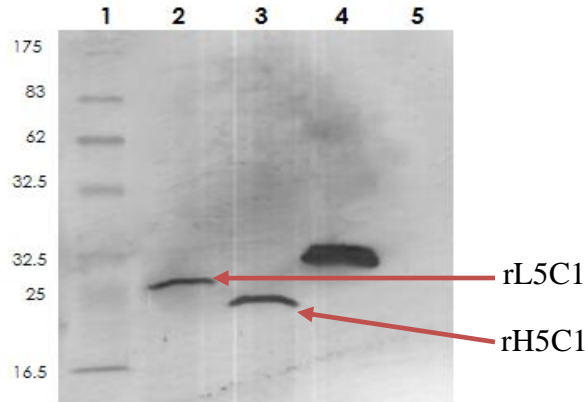


Fig. 27 Análisis de la expresión de L5C10 y H5C10 en estado soluble por medio de western blot; detectando con un anticuerpo específico anti-His acoplado a fosfatasa alcalina. Carril 1: MPM, carril 2: purificación de L5C10 por columna de Ni-NTA, carril 3: purificación de H5C10 por columna de Ni-NTA, carril 4: toxina recombinante *L. boneti* con etiqueta de His Como control positivo del anticuerpo y carril 5: AcM 5C10.

Inmunoensayos por western blot y ELISA para detectar SDM de *Loxosceles* con rL5C10 y rH5C10 solubles

Por medio de un western blot se observó que rL5C10 y rH5C10 en su forma solubles, son capaces de detectar ala esfingomielinasa D de *Loxosceles* (fig. 28).

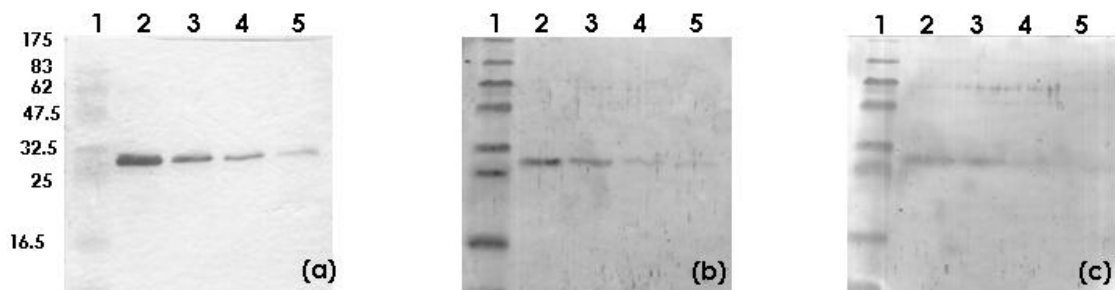


Fig. 28. Reconocimiento de la toxina de *L. reclusa* por parte del AcM 5C10, rL5C10 y rH5C10. Panel (a) carril 2-5 escalera de 1-0.125 µg de toxina, detectando con 5 µg del AcM 5C10 como control y detectado por un anticuerpo anti-ratón . Panel (b) y (c) escalera de 4-1 µg de toxina, el panel (b) detectando con 50 µg rL5C10 y panel (c) detectando con 50 µg rH5C10, ambos fragmentos detectados con anticuerpo anti-histidinas. Carril 1 en todos los paneles MPM

Al (panel c), es claro que la cadena ligera tiene mayor afinidad por su antígeno, sin embargo, no es comparable con la que tiene el control (AcM

5C10) , ya que éste reconoce perfectamente hasta los 0.125 µg de toxina [carril 5/panel (a)], en contraste con la cadena ligera que reconoce 1 µg de la toxina [carril 5/panel (b)] y la cadena pesada que reconoce débilmente 3 µg de toxina [carril 3/panel (c)] (Fig. 28).

En ensayos de ELISA se inició con 5 µg por pozo haciendo diluciones 1:2 tanto de rL5C10 y rH5C10. La mayor afinidad por parte de la cadena ligera hacia su antígeno se conserva, y el comportamiento de las curvas y los valores de EC50 son completamente diferentes entre las dos proteínas (Fig. 29). La diferencia que hay entre la EC50 de rL5C10 y rH5C10 es de dos órdenes de magnitud.

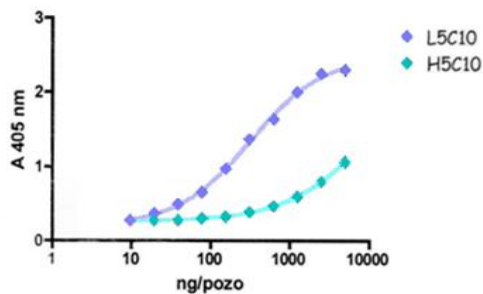


Fig. 29 Ensayo de reconocimiento de L5C10 y H5C10 contra la toxina rL. reclusa. Los valores de EC50 fueron 320.2 para L5C10 y 10377 para H5C10

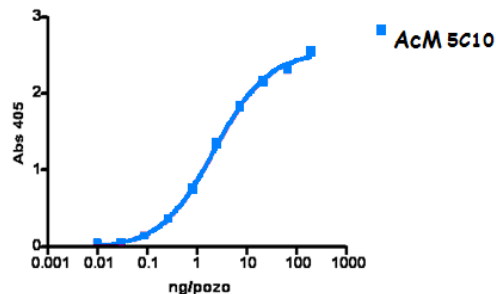


Fig. 30 Ensayo de reconocimiento del AcM 5C10 contra la toxina rL. reclusa. El valor de la EC50 fue de 1.5

Además es importante recordar que en las muestras, la concentración en el caso de rL5C10 es solo del 2% y de rH5C10 es el 8% del total de las muestras, esto nos confirma que rL5C10 tiene mayor afinidad por su

antígeno, ya que a pesar de estar en menor concentración, la unión de esta proteína con su blanco es más fuerte y por tanto da una mejor señal en ambos experimentos.

Sin embargo aún cuando el reconocimiento de la cadena ligera hacia la toxina es bueno, ésta no conserva la estabilidad y la finidad del anticuerpo completo (Fig. 30).

Ensayos de inhibición enzimática *in-vitro* por L5C10 y H5C10 solubles

Los ensayos de inhibición se hicieron con el Kit Amplex Red. Para el caso de las muestras solubles, los porcentajes de inhibición fueron negativos, -1.4 % para la cadena ligera y -37.8 para la cadena pesada. Esto está directamente relacionado con los valores de absorbancia, ya que el de ambas cadenas fue mayor al del control positivo; probablemente la razón por la cual las muestras presentan una mayor absorbancia que el control positivo es por todos los contaminantes que presentan, como es visible en la figura 26.

Por todo lo anterior podemos decir que las proteínas obtenidas por esta estrategia son incapaces de inhibir la actividad enzimática de la toxina *rL. reclusa* y *rL. boneti*.

Expresión de la cadena ligera y pesada en cuerpos de inclusión

Llevado a cabo el proceso de obtención de los cuerpos de inclusión y una vez purificados se llevó a cabo un análisis electroforético, donde podemos

observar que a diferencia de las proteínas solubles, las muestras no presentan tantos contaminantes visibles; facilitando la identificación de las proteínas de interés (Fig. 31).

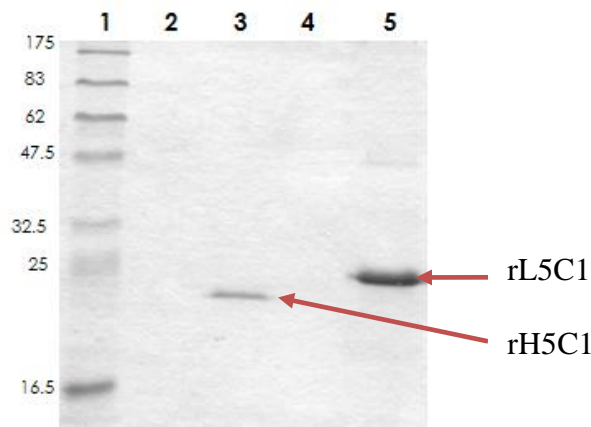


Fig. 31 Análisis electroforético de L5C10 y H5C10 en cuerpos de inclusión. Carril 1: MPM, Carril 3: 10 µg de H5C10 y carril 5: 10 µg de L5C10, los carriles 2 y 4 no contienen muestra.

Cabe recalcar que a pesar de cargar la misma cantidad de proteína total, cuantificada por el método Bradford para ambas muestras, se observa que hay aproximadamente cuatro veces más de rL5C10 en comparación con rH5C10; esta diferencia se observa en los carriles tres y cinco de la figura 31. Esto nos indica que los cuerpos de inclusión no se encuentran totalmente puros y que en las muestras existen otras proteínas que intervienen al momento de la cuantificación, y con mayor huella en la cadena pesada aún cuando sean poco detectables en el SDS-PAGE. En la figura 32 se confirma la presencia de las proteínas de interés por medio de una inmunodetección a nivel western blot con un anticuerpo específico detectando la etiqueta de histidinas que poseen ambas.

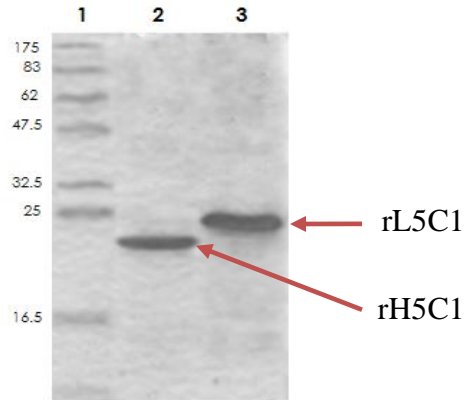


Fig. 32 Análisis de los cuerpos de inclusión de L5C10 y H5C10 por medio de western blot con un anticuerpo específico anti-His acoplado a fosfatasa alcalina. Carril 1: MPM, carril 2: 10 µg de H5C10 y carril 3: 10 µg de L5C10.

Replegamiento

Las muestras con los cuerpos de inclusión de rL5C10 se encontraban a una concentración de 3.5 mg/ml y rH5C10 a una concentración de 1.6 mg/ml, ambos en PBS 1X más 6 M Gnd-HCl. Basandonos en el SDS-PAGE de la figura 31, se ajustó el volumen de ambas cadenas, de tal forma que ambas proteínas se encontraran en un equivalente molar en la mezcla para el replegamiento. En la tabla 2 se muestra el volumen y la concentración aproximada de cada una de las muestras que se utilizó para la mezcla de replegamiento.

Tabla 2 Componentes de la mezcla de replegamiento

	H5C10	L5C10	Mezcla para replegamiento
Volumen (ml)	3 ml	0.35 ml	3.35 ml
Cantidad de proteína (mg)	4.8 mg	1.2 mg	6 mg

Análisis del replegamiento

En la figura 33 se observa un SDS-PAGE en condiciones no reductoras. El carril tres presenta dos bandas cercanas a los 47.5 KDa, alguna de estas bandas puede corresponder al Fab recombinante esperado.

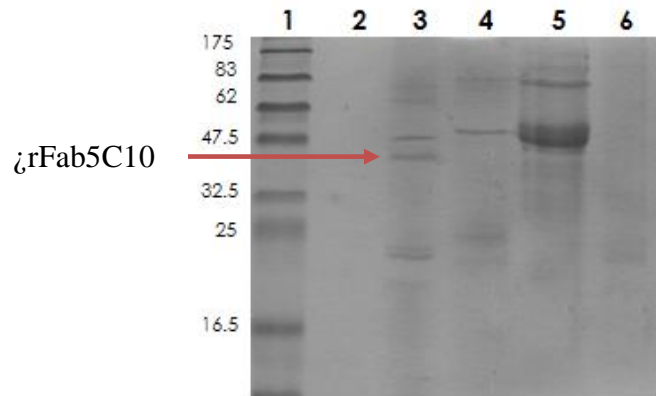


Fig. 33 Análisis del replegamiento para formar el Fab 5C10 recombinante quimérico. Carril 1 Marcadores de peso molecular, carril 3: la muestra soluble del replegamiento, carril 4: cadena ligera soluble, carril 5: cadena pesada soluble y carril 6: precipitado del replegamiento.

Co

1 blot

(Fig. 34), detectando de manera específica sólo la banda por debajo de los 47.5 KDa, no así la banda superior al peso anterior. LA banda que se observa por arriba de los 47.5 KDa, probablemente corresponde a algún agregado proteico de los contaminantes de las muestras de los cuerpos de inclusión, ya que no son reconocidos por el anticuerpo anti-histidinas.

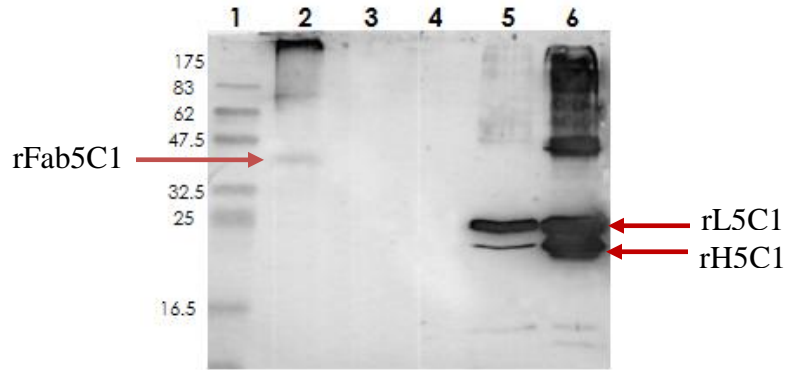


Fig. 34 Análisis del replegamiento para formar el rFab 5C10 recombinante quimérico por medio de western blot, utilizando un anticuerpo anti-His acoplado a fosfatasa alcalina. Carril 1: MPM, carril 2: la muestra soluble del replegamiento, carril 3: precipitado del replegamiento, carril 4: AcM 5C10, carril 5: muestra soluble del replegamiento en condiciones reductoras y carril 6: precipitado del replegamiento en condiciones reductoras. Los carriles 2-4 se encuentran en condiciones no reductoras.

Retomando el carril dos de la figura 34, se observan bandas que reconocen el anticuerpo, una por debajo de los 83 KDa y otra muy intensa por arriba de los 175 KDa, estos son agregados de las cadenas que forman al FAb mal plegados, también corresponden a dímeros que se forman por rL5C10, recordando que es del tipo Kappa y se ha reportado que tienden a la formación de estas estructuras (Lee y Kwak, 2003). EL carril 5 corrobora lo anterior, ya que la cadena ligera se ve en mayor concentración que la pesada cuando la muestras del replegamiento se analiza en condiciones reductoras.

En todo replegamiento, se obtiene un precipitado de las proteínas que no lograron plegarse de manera correcta y forman agregados muy densos e insolubles. En el carril tres (Fig. 34) y carril 6 (Fig. 33) se observa que en condiciones no reductoras el precipitado es tan denso que no es capaz de entrar en el gel de poliacrilamida.

El mismo precipitado en condiciones reductoras se muestra en el carril 6 de la figura 34, donde se observa la gran cantidad de rL5C10 y rH5C10 que no pudo plegarse de manera correcta, formando agregados tan grandes que se encuentran en el precipitado. El barrido de proteínas que se observa desde los 175 KDa hasta los 45 KDa son los agregados proteicos de estas cadenas que no fueron completamente desnaturalizados por el β -Mercaptoetanol, ya que también los reconoció el anticuerpo específico contra histidinas.

Es importante mencionar que las cinco cisteínas presentes en ambas cadenas tienen la posibilidad de formar hasta 945 puentes disulfuro en distintas conformaciones (Verma *et al.* 1998). De modo que, para comprobar que el rFab 5C10 formado por este método es funcional, se realizaron las pruebas de reconocimiento e inhibición siguientes.

Inmunoensayo por ELISA del producto del replegamiento rFab 5C10

El ensayo de ELISA realizado con el rFab5C10, presenta una baja afinidad por su antígeno en comparación con el anticuerpo monoclonal 5C10 (Fig. 35, panel b)

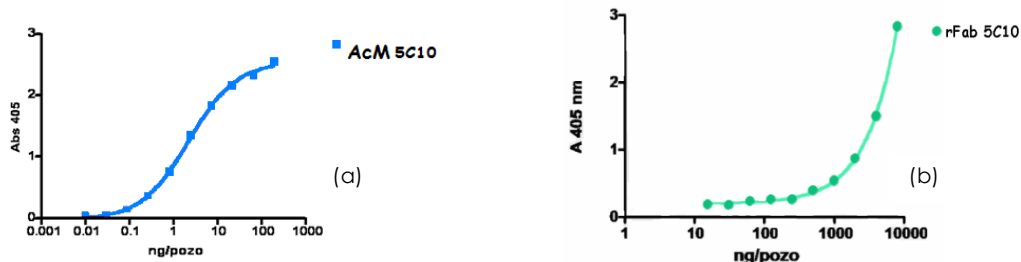


Fig. 32 Ensayo de reconocimiento del producto de replegamiento rFab 5C10 contra la toxina rL. reclusa. El valor de EC50 para el rFab fue de 605514. Se empezó con 50 μ g y se realizaron diluciones 1:2. El panel a muestra la curva estándar del AcM 5C10 con una EC50 de 1.5, comenzando con 5 μ g y haciendo diluciones 1:3

A pesar de tener una mayor concentración de la muestra de replegamiento que del AcM 5C10, se observa un bajo reconocimiento por parte del rFab 5C10, debido a la presencia de los dímeros y agregados, reduciendo la concentración neta del rFab, además es muy probable que éste no se encuentre en la conformación correcta, lo cual también influye de manera importante en el reconocimiento del antígeno.

Ensayo de inhibición del rFab 5C10

El anticuerpo monoclonal 5C10 es capaz de inhibir a las toxinas *L. reclusa* y *L. boneti*, el ensayo de inhibición por parte del producto de replegamiento no mostró el mismo comportamiento, se trabajó con el mismo protocolo modificado que se utilizó con las cadenas en forma soluble.

En el ensayo la concentración del rFab 5C10 fue de 26 μ g. Como control se utilizó el Fab recombinante triple mutante que reconoce a la la fracción Cn2 de la toxina del alacrán *Centruroides noxius* a la misma concentración del rFab 5C10 y también al AcM 5C10 a una concentración de 1 μ g, la cual se sabe inhibe a la toxina rL. reclusa.

Los porcentajes de inhibición para rFab 5C10 fue de 22 %, rFab Cn2 de 53 % y para el AcM 5C10 de 90 %. Esto nos indica que la inhibición por parte del rFab 5C10 no es específica, ya que el otro rFab contra la toxina del alacrán fue capaz de inhibir a la toxina de *Loxosceles*, incluso de manera más efectiva. Esto nos habla de una efecto masa en la inhibición de la toxina, de alguna manera los fragmentos de anticuerpo impiden alguna de las reacciones que forman el compuesto colorido.

Conclusiones

El rendimiento de las proteínas en estado soluble por litro de cultivo, para la cadena ligera es aproximadamente de 9 µg y para la cadena pesada de 39 µg; este rendimiento es bajo. No obstante, es importante recalcar que los fragmentos rL5C10 y rH5C10 son capaces de reconocer a la esfingomielinasa D de las especies *L. reclusa* y *L. boneti* a nivel de pruebas de ELISA y western blot, pero particularmente la mayor afinidad que presenta la cadena ligera por su antígeno, ya que se reporta que la unión y el reconocimiento por parte de los anticuerpos es en mayor medida responsabilidad de la cadena pesada (Aires da Silva *et al.* 2008). Esto nos

habla de que en materia de proteínas es imposible generalizar, ya que cada una de ellas y su función es particular y los anticuerpos no están exentos de este matiz de propiedades distintas.

Los rendimientos por parte de los cuerpos de inclusión por litro de cultivo fueron de 1.15 mg para la cadena ligera y de 0.536 mg para la cadena pesada.

Se logró el replegamiento del Fab recombinante quimérico 5C10, sin embargo, parece que la conformación no es la correcta dado que disminuye de manera significativa el reconocimiento por su antígeno y claramente no conserva las propiedades de inhibición del AcM 5C10 y el Fab 5C10 murino. Además el rendimiento obtenido por litro de cultivo es de 114.5 µg el cual es muy bajo.

Todo lo anterior, impide tomar esta estrategia para la producción de un antiveneno formado por Fab's recombinantes quiméricos del AcM 5C10 a pequeña y gran escala.

Perspectivas

- Se podrían optimizar las condiciones de replegamiento, como la temperatura o la concentración de las proteínas utilizadas hasta encontrar condiciones bajo las cuales el fragmento del anticuerpo monoclonal 5C10 conserve sus propiedades de reconocimiento e inhibición.
- Utilizando una estrategia como scFv, esto es, insertando un péptido linker entre ambas cadenas, se puede optimizar la relación estequiométrica entre ambas cadenas de modo tal que se promueva su interacción y mejore el rendimiento del replegamiento.
- Un sistema de expresión que convendría explorar para la producción de un fragmento Fab es la levadura, puesto que presenta muchas de las ventajas que ofrece *E. coli* pero en un organismo eucarionte.
- Se podría intentar generar los anticuerpos recombinantes en otro sistema de expresión que permita expresar fragmentos más grandes

o incluso el anticuerpo completo. Algunas opciones incluyen la expresión en plantas, células de insecto y de mamífero.

Bibliografía

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., y Pillav, S. 2008. Inmunología celular y molecular. Elsevier, España. 566 pp.

Aires da Silva, F., Corte-Real, S. y Goncalves, J. 2008. Recombinant Antibodies as Therapeutic Agents. *Biodrugs* 22 (5): 301-314

Barbaro, K.C., Knysak, I., Martins, R., Hogan C. y Winkel, K. 2005. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity of five *Loxosceles* spiders venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon* 44: 507-514

Belin, P., Dassa, J., Drevet, P., Lajeunesse, e., Savatier, A., Boulain, J.C. y Ménez, A. 2004. Toxicity-based selection of *Escherichia coli* mutants for functional recombinant protein production: application to an antibody fragment. *Protein Engineering, Design & Selection* 17: 491-500

Breedveld, F.C. 2000. Therapeutic monoclonal antibodies. *The lancet* 355: 735-740.

Brusca, R., Brusca, G. y Haver, N. 2003. Invertebrates. Sinauer Associates, Massachussets. 936 pp

Dyachenko, P., Ziv, M. y Rozenman, D. 2006. Epidemiological and clinical manifestation of patients hospitalized with brown recluse spider bite. *JEADV* 20: 1121-1125

Fipula, D. 2007. Antibody engineering and modification technologies. *Biomol. Eng.* 24: 201-215

Gavilondo, J.V. 1995. Anticuerpos Monoclonales. Teoría y Práctica. *Elfos Scientiae*, la Habana.

Gertsch, W. J., and F. Ennik. 1983. The spider genus *Loxosceles* in North America, Central America and West Indies (Araneae, Loxoscelidae). *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 175: 264-360

Grönwall, C. y Ståhl, S. 2009. Engineered affinity proteins-Generation and applications. *Review. J Biotech.* 140: 254-269

Hayden, M.S., Gilliland, L.K. y Ledbetter, J.A. 1997. Antibody engineering. *Curr Opin Immunol.* 9: 201-212

Hogan, C.J., Barbaro, K. C. y Winkel, K. 2004. Loxoscelism: Old Obstacles, New Directions. *Revisión. Ann Emerg Med.* 44: 608-624

Hurtado, V.J., Sotelo, C.N. e Ibarra, S.R. 2005. Trabajo de revisión. Envenenamiento por *Loxosceles reclusa* (araña "parda"). *Rev Mex Pediatr* 72(2): 85-88

Isbister, G.K., Graudins, A., White, J. y Warrel, D. 2003. Antivenom Treatment in Arachnidism. *J Toxicol Clin Toxicol* 41 (3): 291-300

Kindt, T., Osborne, B. y Goldsby, R. 2006. Kuby Immunology. W.H. Freeman, UK. 574 pp.

Mata, M.T., Garcia, W., Alagón, A. y Paniagua, J. 2008. Anticuerpos monoclonales para uso terapéutico en humanos. *Informacéutico* 15 (5): 30-36

Moctezuma, C. 2008. Producción de un fragmento de anticuerpo recombinante quimérico anti esfingomielinasa D contra la mordedura de la araña *Loxosceles*. Tesis profesional de maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos. 53 pp.

Quintana, J.C. y Otero, R. 2002. Envenenamiento aracnidito en las Américas. Revisión del tema. *MEDUNAB* vol. 5 No. 13

Ramos-Cerrillo, B., Olvera, A., Odell G.V., Zamudio, F., Paniagua_Solís, J., Alagón, A. y Stock, R.P. 2004. Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from North America fiddelback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusae*. *Toxicon* 44: 507-514

Rios, J., Pris, M.E., Werner, R.L. y Ramirez, G. 2004. Guía clínica para el manejo de mordedura de la araña del rincón *Loxosceles laeta*. *Rev. Med. Chile*: 1-8

Sams, H., Heart, S., Long, L., Wilson, D., Sanders, D. y King, L. 2001. Nineteen documented cases of *Loxosceles reclusae* envenomation. *J Am Acad Dermatol* 44(4): 603-608

Sandee, D., Tungpradabkul, S., Kurokawa, Y., Fukui, K. y Takagi, M. 2005. Combination of Dsb Coexpression and an Addition of Sorbitol Markedly Enhanced Soluble Expression of Single-Chain Fv in Escherichia coli. *Biotech and Bioengin* 91: 418-424

Saracco, A.S. y de Root A.R. 2008. *Loxoscelimo*. *Rev. Med. Univ. Facultad de Ciencias Médicas-Un Cuyo* 4 (1)

Silva, P.H., Silveira, R.B., Appel, M.H., Mangili, O.C., Gremski, W. y Sanches, V.S. 2004. Revisión. Brown spider and loxoscelism. *Toxicon* 44: 693-709

Sneff-Ribeiro, A., Silva, P.H., Chaim, O.M., Gremski, L.H., Paludo, K.S., Silveira, R.B., Gremski, W., Mangili C.O., Sanches Veiga, S. 2008. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. *Biotech Adv* 26: 210-218

Ubick, D., P. Paquin, P.E. Cushing, y V. Roth 2005. *Spiders of North America: an identification manual*. *Am Arachnol Soc.* 377 páginas

Verma, R., Boleti, E. y George, A.J.T. 1998. Antibody engineering: Comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *J. Immunol. Methos.* 216: 165-181

Vetter, R.S. e Isbister, G.K. 2008. Medical Aspects of Spider Bites. *Annu. Rev. Entomol.* 53: 409-429

Vetter R.S. y Rust M.K. 2008. Refugia Preferentes by the Spiders *Loxosceles reclusa* and *Loxosceles laeta* (Araneae: Sicariidae). *J. Med. Entomol.* 45(1): 36-41

Apéndice A

Electroforesis de Proteínas

Solución de acrilamida (30% acrilamida + 0.8% bis-acrilamida)

Buffer interior (1.5 M Tris + 0.4% SDS)

Buffer superior (0.5 M Tris + 0.4% SDS)

Buffer de corrida (0.25 M Tris, 0.19 M Glicina y 0.1% SDS)

Buffer de muestras desnaturalizantes 2X (10% Glicerol, 2.5% SDS, 50 mM, Tris-HCl pH 6.8, 5% β -mercaptoetanol, 0.02% azul de bromofenol)

Solución de Coomasie (25% Isopropanol, 10% ácido acético, 0.2% azul de Coomasie y R-250)

Solución de destinción (10% isopropanol, 10% ácido acético)

Gel concentrador 4%	Gel separador 12.5%
Buffer superior 630 µl	Buffer inferior 1.50 ml
Agua desionizada 1.54 ml	Agua desionizada 2 ml
Solución de acrilamida 333 µl	Solución de acrilamida 2.5 ml
TEMED 2.5 µl	TEMED 5 µl
10% PSA 12.5 µl	10% PSA 20 µl

Western blot

Buffer de transferencia (Nitrocelulosa) para 500 ml (39 mM glicina: 1.45 g, 48 mM Tris-Base: 2.9 g, 0.03% SDS: 0.185 g y 20% etanol: 100 ml).

TBST 500 ml (1 M Tris-HCl pH 7.5: 5 M NaCl: 15 ml y 0.2% Tween 20: 250 µl).

Prueba de ELISA

Solución de sensibilizado de carbonatos (NaCO³ 4.2 g, ajustar a pH 9 con 5 N NaOH, aforando a 500 ml).

Solución de bloqueo (25 ml Tris_HCl pH8, 2.5 g de gelatina, 1 ml Tween 20, aforando a 500 ml).

Solución de reacción (25 ml Tris HCl pH 8, 50 ml NaCl 5 M, 0.5 g de gelatina, 250 µl Tween 20, aforar a 500 ml).

Solución de lavado (50 ml Tris-HCl pH 8, 30 ml NaCl 5 M, 500 µl Tween 20, aforar a 1 L).

Replegamiento

Solución Redox (PBS 1x, 6 M Gnd-HCl y 130 mM GSSG).

Buffer de Replegamiento (0.1 M Tris-HCl pH 8, 3 mM de β -Mercaptoetanol y 1 mM de GSSG).

PBS 1x para 1 L (8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na_2HPO_4 , 0.24 g KH_2PO_4 , 800 ml de agua bidestilada, ajustar pH a 7.2 con N