



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**GENERACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA DE LA REGIÓN DETERMINANTE  
DE COMPLEMENTARIEDAD CDR-H3 HUMANA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**OMAR URIEL GUZMÁN BRINGAS**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DRA. SONIA MAYRA PÉREZ TAPIA**



**CD. MX.**

**2018**



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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** PROFESOR: SOBEIDA SANCHEZ NIETO  
**VOCAL:** PROFESOR: MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO  
**SECRETARIO:** PROFESOR: SONIA MAYRA PÉREZ TAPIA  
**1er. SUPLENTE:** PROFESOR: OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA  
**2do. SUPLENTE:** PROFESOR: SARA MARGARITA GARZA AGUILAR

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**UNIDAD DE DESARROLLO E INVESTIGACION EN BIOPROCESOS (UDIBI)  
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, IPN**

## **ASESOR DEL TEMA:**

**DRA. SONIA MAYRA PÉREZ TAPIA**

---

## **SUPERVISOR TÉCNICO:**

**BIOL. KEYLA MARIA GOMÉZ CASTELLANO**

---

## **SUSTENTANTE:**

**OMAR URIEL GUZMÁN BRINGAS**

---

# Contenido

Índice general.....	i
Índice de Figura.....	iii
Índice de Tablas.....	v
Abreviaturas.....	vi
Resumen.....	ix
1. Introducción.....	1
1.1. Anticuerpos: Estructura y Características.....	1
1.2. Diversidad de los dominios variables y regiones CDR.....	3
1.3. Funciones de los anticuerpos.....	5
1.4. Desarrollo de nuevos anticuerpos: Anticuerpos Monoclonales (mAbs).....	6
2. Antecedentes.....	10
2.1. Construcciones Genéticas de Fragmentos de anticuerpos.....	10
2.2. Fragmento variable de cadena sencilla (scFv).....	11
3. Justificación.....	13
4. Objetivos.....	14
5. Estrategia general.....	15
6. Materiales y métodos.....	16
6.1. Obtención de PBMNC's (Peripheral Blood Mononuclear Cells).....	16
6.2. Extracción de RNA total con Trizol™ Reagent.....	17
6.3. Aislamiento de RNA mensajero.....	18
6.4. Síntesis de cDNA.....	19
6.4.1. Control de calidad del cDNA.....	20
6.5. Estandarización del PCR (Polymerase chain Reaction) para la Amplificación del cDNA.....	20
6.6. Clonamiento de los productos de PCR.....	21
6.6.1. Preparación de <i>E. coli</i> DH5- $\alpha$ químicamente competentes.....	22
6.6.2. Ligación de los Productos de PCR con el vector pCR® 2.1 TOPO® 3.9 Kb.....	23
6.6.3. Transformación de <i>E. coli</i> DH5- $\alpha$ con la mezcla de clonación.....	24



6.6.4. Selección de colonias transformadas.....	24
6.6.5. Aislamiento del DNA plasmídico de las clonas aisladas.....	25
6.6.6. Amplificación por PCR del DNA plasmídico aislado de las colonias transformadas con la región CDR-H3.....	25
6.7. Secuenciación de los CDR-H3 obtenidos por el método de Sanger.....	25
6.8. Generación de Fragmentos de DNA de la región determinante de complementariedad CDR-H3 humana de 200 individuos sanos.....	26
7. Resultados.....	27
7.1. Optimización del aislamiento de PBMNC's obtenidos a partir de CLP's.....	27
7.2. Extracción del RNA Total a partir de PBMNC's mediante el Método de TRizol Reagent.....	28
7.3. Aislamiento de RNA mensajero (mRNA).....	30
7.4. Síntesis de DNA complementario (cDNA) y control de Calidad de cDNA.....	31
7.5. Estandarización del PCR para la amplificación del cDNA.....	32
7.6. Clonamiento de los productos de PCR.....	35
7.6.1. Transformación de los productos de clonamiento en <i>E coli</i> DH5- $\alpha$ .....	35
7.6.2. PCR confirmatoria de clonamiento.....	38
7.7. Secuenciación de los CDR-H3 obtenidos.....	39
7.8. Generación de Fragmentos de DNA de la región determinante de complementariedad CDR-H3 humana de 200 individuos sanos.....	42
7.8.1. Clonación de fragmentos naturales H3J's en el vector pCR <sup>®</sup> 2.1 TOPO <sup>®</sup> 3.9 Kb.....	42
7.8.2. Amplificación por PCR de fragmentos naturales H3J's con los oligonucleótidos M13 del vector pCR <sup>®</sup> 2.1 TOPO <sup>®</sup> 3.9 Kb.....	44
7.8.3. Secuenciación de los fragmentos naturales H3J's amplificados con los oligonucleótidos M13 del vector pCR <sup>®</sup> 2.1 TOPO <sup>®</sup> 3.9 Kb.....	46
8. Discusión.....	49
9. Conclusiones.....	52
10. Perspectivas.....	53
11. Apéndices.....	54
12. Referencias.....	62



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Representación de un anticuerpo de clase IgG y sus distintos fragmentos.....	<b>3</b>
<b>Figura 2.</b> Representación tridimensional de cinta de un fragmento Fv con sus dominios VH (derecha) y VL (izquierda).....	<b>4</b>
<b>Figura 3.</b> Tipos de anticuerpos monoclonales.....	<b>8</b>
<b>Figura 4.</b> Esquematación de una construcción de un scFv.....	<b>11</b>
<b>Figura 5.</b> Características generales del vector de clonación pCR® 2.1 TOPO®.....	<b>22</b>
<b>Figura 6.</b> Esquema de ligación del vector pCR® 2.1 TOPO® con el producto de PCR amplificado con la Taq polimerasa.....	<b>23</b>
<b>Figura 7.</b> Integridad de RNA total extraído mediante el método de TRIzol Reagent.....	<b>29</b>
<b>Figura 8.</b> Integridad de las muestras de RNA total posterior a tratamiento con solución inhibidora de RNAsas (RNase ZAP™).....	<b>30</b>
<b>Figura 9.</b> Visualización del cDNA sintetizado.....	<b>32</b>
<b>Figura 10.</b> Productos de amplificación mediante PCR.....	<b>33</b>
<b>Figura 11.</b> Esquema de temperaturas empleadas en el programa del termociclador para la amplificación de los fragmentos de DNA de la región CDR-H3.....	<b>34</b>
<b>Figura 12.</b> Gel preparativo para la purificación de los CDR-H3 para su clonación.....	<b>34</b>
<b>Figura 13.</b> DNA plasmídico proveniente de las clonas transformantes con el inserto CDR-H3.....	<b>37</b>



<b>Figura 14.</b> Productos de amplificación de cada joining empleando como templado el plásmido obtenido.....	<b>38</b>
<b>Figura 15.</b> Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas; alineado con el editor de secuencias BioEdit.....	<b>41</b>
<b>Figura 16.</b> DNA plasmídico proveniente de las 30 clonas transformantes de los fragmentos H3J.....	<b>44</b>
<b>Figura 17.</b> Productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos M13 del vector pCR® 2.1 TOPO®.....	<b>45</b>
<b>Figura 18.</b> Alineamiento múltiple de secuencias proteicas; alineado con el programa CLUSTALW.....	<b>48</b>



## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Condiciones evaluadas para la optimización de la extracción de PBMNC's a partir de concentrados leucoplaquetarios.....	<b>27</b>
<b>Tabla 2.</b> Cuantificación de RNA mensajero obtenido mediante espectrofotometría.....	<b>31</b>
<b>Tabla 3.</b> Numero de clonas obtenidas durante transformación del vector pCR® 2.1 TOPO® clonado con los fragmentos de DNA de CDR-H3.....	<b>35</b>
<b>Tabla 4.</b> Resultados de búsqueda de similitud mediante BLAST obtenido de cada secuencia de CDR-H3, comparado con la base de datos de NCBI.....	<b>39</b>
<b>Tabla 5.</b> Numero de clonas obtenidas durante transformación del vector pCR® 2.1 TOPO® clonado con los fragmentos naturales H3J's.....	<b>43</b>
<b>Tabla 6.</b> Resultados de similitud mediante un BLAST obtenido a partir de las secuencias de los fragmentos naturales H3J; comparado con la base de datos de NCBI.....	<b>46</b>
<b>Tabla 7.</b> Frecuencia de cada Joining para las 18 secuencias aminoacídicas obtenidas a partir de los aminoácidos firma.....	<b>48</b>





## Abreviaturas

$\alpha$ . Alfa

$\beta$ . Beta

$\gamma$ . Gamma

$\delta$ . Delta

$\epsilon$ . Épsilon

$\kappa$ . Kappa

$\lambda$ . Lamda

$\mu$ . Mu

(P/V). Peso-Volumen

**Ab.** Anticuerpo (del inglés: *Antibody*)

**Abs.** Anticuerpos

**ADCC.** Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (del inglés: *Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity*)

**BLAST.** *Basic Local Alignment Search Tool*

**CDC.** Citotoxicidad dependiente de complemento (del inglés: *Complement-Dependent Cytotoxicity*)

**cDNA.** DNA complementario

**CDR.** Región determinante de complementariedad (del inglés: *Complementarity Determining Region*)

**CDR-H3.** Tercera región determinante de complementariedad de cadena pesada

**cds.** Secuencias codificantes (del inglés: *Coding Sequences*)

**cel.** Células

**C<sub>H</sub>.** Dominio constante de cadena pesada

**C<sub>L</sub>.** Dominio constante de cadena ligera

**CLP's.** Concentrados Leucoplaquetarios



**D.O.** Densidad Óptica

**ddNTP.** Didesoxinucleotidos

**DNA.** Ácido desoxirribonucleico (del inglés: *Deoxyribonucleic Acid*)

**dNTP.** Desoxinucleotidos

**dT.** de Timina

***E. coli.*** *Escherichia coli*

**Fab.** Fragmento de unión a antígeno (del inglés: *Fragment Antigen Binding*)

**Fc.** Fragmento cristalizable

**FcR.** Receptores de Fc (del inglés: *Fc Receptor*)

**FDA.** *Food and Drug Administration*

**Fv.** Fragmento variable

**IgA.** Inmunoglobulina de clase A

**IgD.** Inmunoglobulina de clase D

**IgE.** Inmunoglobulina de clase E

**IgG.** Inmunoglobulina de clase G

**IgM.** Inmunoglobulina de clase M

**IPTG.** Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

**kb.** Kilobase

**kDa.** Kilo Dalton

**lac.** Lactosa

**LB.** Luria-Bertani

**mAbs.** Anticuerpos Monoclonales (del inglés: *monoclonal Antibodies*)

**MPM.** Marcador de Peso Molecular

**mRNA.** RNA mensajero

**MuLV.** Virus de Leucemia murina (del inglés: *Murine Leukemia Virus*)



**NCBI.** *National Center for Biotechnology Information*

**NEB.** *New England Biolabs*

**neg.** Negativo

**pb.** Pares de base

**PBMNC's.** Células mononucleares de Sangre Periférica (del inglés: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

**PBS.** Amortiguador salino de Fosfatos (del inglés: *Phosphate-Buffered Saline*)

**PCR.** Reacción en cadena de la Polimerasa (del inglés: *Polymerase Chain Reaction*)

**RNA.** Ácido Ribonucleico (del inglés: *Ribonucleic Acid*)

**RNAsas.** Enzimas que degradan el RNA

**rpm.** Revoluciones por minuto

**rRNA.** RNA ribosomal

**RT.** Retro transcriptasa

**scFv.** Fragmento variable de cadena sencilla (del inglés: *single-chain variable Fragment*)

**TAE.** Tris-acetato-EDTA

**Taq.** *Thermophilus aquaticus*

**TM.** Marca registrada (del inglés: *Trademark*)

**US.** *United States*

**USD.** Dólares Americanos (del inglés: *United States Dollar*)

**UV.** Ultravioleta

**V.** volt

**V<sub>H</sub>.** Dominio variable de cadena pesada

**V<sub>L</sub>.** Dominio variable de cadena ligera

**X-gal.** 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil- $\beta$ -D-Galactopiranósido



## RESUMEN

Los anticuerpos son moléculas esenciales dentro de la respuesta inmune adaptativa ya sea para la regulación homeostática del organismo, o para la eliminación de diferentes patógenos. No es sorpresa que los científicos se hayan interesado de manera inmediata en conocer la estructura y la forma en la que estas moléculas se producen y actúan; es a partir de toda esta investigación que se descubrieron los distintos fragmentos que constituyen a los anticuerpos: el fragmento de unión a antígeno (Fab) y el fragmento cristalizante (Fc). Dentro de los Fab se encontró una región muy importante que participa en el sitio reconocimiento de antígenos. La región CDR-H3, es la región con mayor variabilidad comparada con el resto de las regiones, lo que hace que esta sea la región que aporta la mayor diversidad a los anticuerpos.

El desarrollo de diversas tecnologías para la generación de distintos tipos anticuerpos de interés comercial o de investigación, ha generado un incremento en los últimos años en el número de anticuerpos aprobados por distintas entidades regulatorias. Un ejemplo de este tipo de tecnologías es la tecnología de “*phage display*”, la cual de manera virtual se puede emplear para la obtención de distintos anticuerpos de interés. Para implementar la tecnología de *phage display*, es esencial tener una adecuada construcción de la secuencia de DNA de la proteína que se pretenda expresar, ya sea un fragmento de unión a antígeno (Fab) o un fragmento de unión a cadena sencilla (scFv). En el presente trabajo se desarrolló la metodología para obtención de fragmentos naturales de DNA de la región CDR-H3 de humanos, para su implementación en una biblioteca sintética de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv).

Durante el presente trabajo se implementaron diversos controles de calidad durante los distintos pasos del proceso de generación de los fragmentos de DNA, a manera de que los fragmentos obtenidos fueran de una calidad adecuada para la construcción del scFv. La metodología generada sirvió para la obtención de CDR-H3 humanas de alta calidad, adecuadas para su empleo en una construcción de una biblioteca genómica de scFv.



## INTRODUCCIÓN

### 1.1. Anticuerpos: Estructura y Características

En el año de 1891, Emil Behring y Shibasaburo Kitasato comenzaron a dilucidar la existencia de cuerpos provenientes del suero de animales hiperinmunizados con los patógenos causantes de la difteria y el tétanos. Behring y Kitasato transfirieron el suero de los animales, a pacientes infectados con difteria, y observaron que el suero lograba disminuir la sintomatología de estas infecciones(1) sin embargo es hasta 1897, con la teoría de la cadena lateral de Paul Ehrlich, que se acuñó el término de anticuerpo (2).

Los anticuerpos (Abs) o inmunoglobulinas (Igs) son glicoproteínas producidas exclusivamente por las células B, cuya función es defender al organismo de las infecciones microbianas, virales, parasitarias, y fúngicas uniéndose de manera específica a los patógenos y a las moléculas secretadas por estos. Los anticuerpos también tienen como función, regular la homeostasis del tejido, participando en el control de fenómenos de origen tumoral, así como en procesos inmunomoduladores (3).

En 1959, Gerald M. Edelman y Rodney R. Porter, describieron finalmente la estructura de los anticuerpos.(4, 5) Edelman demostró que, al someter a los anticuerpos a un tratamiento reductor, estos se disociaban en dos clases de moléculas, determinando así que los anticuerpos están constituidos por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas ligeras ( $C_L$ ) de aprox. 25 kDa cada una y dos cadenas pesadas ( $C_H$ ) de 50 kDa. Fue a partir de estos estudios que se sugirió una conformación para los Abs en forma de "Y", la cual posteriormente fue confirmada mediante estudios de microscopía electrónica y de difracción de rayos X (5).

Tiempo después se determinó que la cadena ligera puede ser de dos tipos, cadena de tipo lamda ( $\lambda$ ) o tipo kappa ( $\kappa$ ), (6), mientras que para la cadena pesada existen principalmente cinco clases –  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , y  $\mu$  (7). Tanto la cadena ligera como la cadena pesada cuentan con dominios variables y constantes. La cadena pesada cuenta con un dominio variable ( $V_H$ ) y dependiendo de la inmunoglobulina de la que



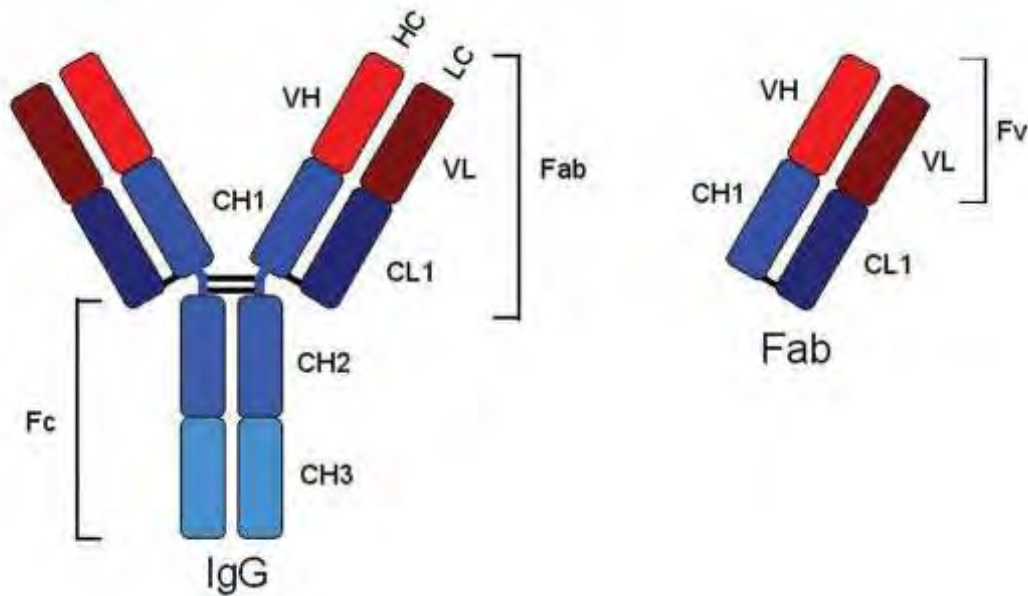
se trate puede tener tres dominios constantes ( $C_H$ ) o cuatro dominios, mientras que la cadena ligera cuenta con únicamente un dominio variable ( $V_L$ ) y uno constante ( $C_L$ ) (6).

Los anticuerpos se agrupan en cinco isotipos distintos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, dependiendo de la clase de cadena pesada por la cual estén conformados. Cada isotipo cuenta con distintas funciones biológicas (6, 7).

Por otra parte, los estudios realizados por Porter en 1959, permitieron dilucidar aún más la estructura de los Abs. Sus ensayos se enfocaron en un anticuerpo específico de la fracción gamma globulina de suero de conejo, llamada inmunoglobulina G (5). Porter empleó un tratamiento enzimático con papaína para romper la molécula del anticuerpo, lo que dio origen a tres fragmentos de igual tamaño (50 kDa), dos de esos fragmentos compuestos por los extremos N-terminal de la cadena pesada y de la cadena ligera del anticuerpo eran idénticos y aún conservaban la capacidad de unirse al antígeno, denominando así a estos fragmentos como Fab (del inglés, *Fragment antigen binding*) (8, 9); el fragmento restante no contenía actividad de unión a antígeno, pero se observó que el fragmento era un homodímero que se cristalizaba con facilidad, y por esta razón se denominó Fc, (del inglés, *Fragment crystallizable*) (5). El Fc está compuesto únicamente por dominios constantes de la cadena pesada (10, 11). La interacción de este fragmento con sus receptores interviene en la respuesta de las células efectoras del sistema inmune y sirve para incrementar la vida media de los anticuerpos(11).

Formando parte de la región Fab, es posible identificar una fracción más pequeña compuesta únicamente por los dominios variables de cadena pesada y de cadena ligera (6, 7), esta región en específico es nombrada fragmento variable (*Fragment variable*, Fv) (ver figura 1), El Fv es el fragmento más pequeño del Fab que aún mantiene las propiedades de unión al antígeno(12).





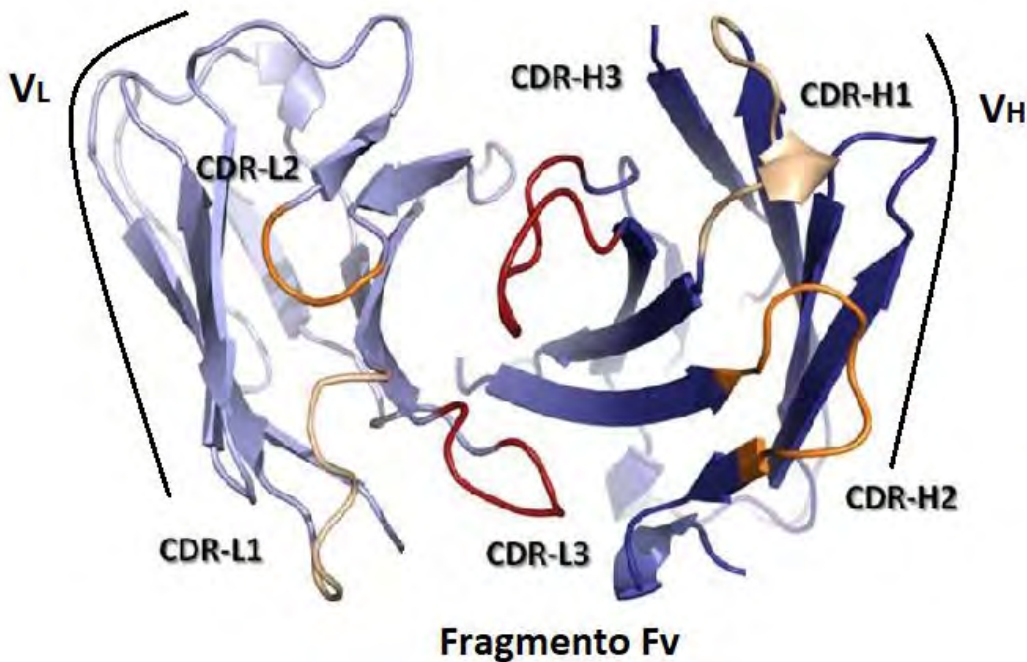
**Figura 1. Representación de un anticuerpo de clase IgG y sus distintos fragmentos.** CH, dominio constante de cadena pesada; CL, dominio constante de cadena ligera; Fab, fragmento de unión a antígeno; Fc, fragmento cristalizante; VH, dominio variable de cadena pesada; VL, dominio variable de cadena ligera. Modificado de Nelson et al., 2010 (9)

## 1.2. Diversidad de los dominios variables y regiones CDR

La principal característica de los anticuerpos es su capacidad para reconocer de manera específica casi cualquier epítipo proveniente de una gran variedad de antígenos. Lo anterior radica en la existencia de un repertorio muy diverso de anticuerpos.

La diversidad de los anticuerpos es atribuida a la formación de *loops* o asas hipervariables (13), o también llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDRs) (14); estas regiones hipervariables fueron llamadas así, debido a que tenían una tasa de variabilidad bastante alta comparada con el resto de las demás regiones (14). Cada dominio variable del anticuerpo contribuye con tres CDRs al sitio de unión del antígeno (ver figura 2), de esta manera la cadena ligera contribuye con tres CDRs; CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 y la cadena pesada contribuye con 3 más: CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 (10, 15, 16).





**Figura 2.** Representación tridimensional de cinta de un fragmento Fv con sus dominios VH (derecha) y VL (izquierda). Los CDR de los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada se marcan de color amarillo (CDR-1), naranja (CDR-2), y rojo (CDR-3). Imagen modificada de Finlay et al., 2012. (10)

A pesar de que los 6 CDRs contribuyen a la formación del paratopo o sitio de unión al antígeno, existe un especial interés en la tercera región CDR de cadena pesada (CDR-H3), ya que es, por mucho, el *loop* con mayor diversidad en cuestión de longitud y secuencia, con respecto a los demás CDRs (17), lo que ha demostrado que esta es la región que aporta la mayor diversidad al paratopo. Aunado a lo anterior, se ha demostrado que este dominio es el que contribuye en mayor porcentaje en la interacción paratopo-epítipo (18).

La diversidad en los dominios variables de los receptores de las células B se origina mediante la recombinación de genes preexistentes de tres líneas germinales; de manera similar a como ocurre con los receptores de células T (19). Estos segmentos de genes son conocidos como variable (V), diverso (D), y unión o *joining* (J). El dominio variable de la cadena pesada resulta de la recombinación somática de los segmentos V (D) J, mientras que el dominio variable de la cadena ligera es resultado





únicamente de la recombinación de V y J (19-21). El segmento V (D) J, de la cadena pesada cuenta con alrededor de 39 genes funcionales para los genes V, repartidos en 7 familias de genes; 27 genes para D, también clasificados en siete familias; y 6 genes para J (17). Es la recombinación somática de estos segmentos de genes V(D)J, el principal mecanismo responsable de conferir la diversidad a los receptores de las células B y T (20); sin embargo, la generación de la diversidad de los anticuerpos no es únicamente controlada por la recombinación de los diversos genes V(D)J. Los mecanismos como la combinación de las distintas cadenas pesadas y ligeras, la diversificación de las regiones amino-terminales y la hipermutación somática, también son mecanismos claves que contribuyen a la diversidad de los anticuerpos.

### **1.3. Funciones de los anticuerpos**

Las funciones de los anticuerpos son muy amplias pero la gran mayoría de ellas están encaminadas al reconocimiento de diferentes blancos para su eliminación o neutralización. Por ejemplo, los anticuerpos pueden afectar a distintos patógenos (22) mediante la unión específica a ciertas moléculas propias de los microorganismos, este reconocimiento recluta diferentes tipos de células del sistema inmunitario y un sistema de proteínas de la sangre, colectivamente llamadas *complemento* (23). Son estas células del sistema inmune y proteínas activas del complemento las que se encargan de eliminar los agentes patógenos o a las células infectadas (7).

Dentro de estas funciones de los Abs, se encuentra la neutralización de patógenos, mediante su interferencia en la unión del patógeno con el tejido del huésped (22), disminuyendo así su capacidad infectiva y promoviendo su agregación para permitir el atrapamiento de las bacterias en la mucosa y su posterior aclaramiento mediante peristalsis (24). También los anticuerpos pueden inhibir la motilidad de distintos microorganismos flagelados para evitar su propagación dentro del organismo (25). E incluso los Abs pueden neutralizar aun cuando el agente patógeno ya se implanto en su célula huésped, este tipo de anticuerpos van dirigidos a limitar el ciclo de replicación (22).



Sin embargo gran parte de la actividad biológica de un anticuerpo esta mediado por las interacciones de su Fc con receptores para el Fc (FcR) que se encuentran presentes en varias células efectoras, por ejemplo, las interacciones de los Fc con su FcR, puede activar un proceso llamado citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) (22, 26). Otros ejemplos de la actividad biológica inducida por los anticuerpos son: la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP)(27) y la inducción de apoptosis (28).

#### **1.4. Desarrollo de nuevos anticuerpos: Anticuerpos Monoclonales (mAbs)**

Los anticuerpos son altamente específicos para unirse a un amplio rango de moléculas, incluyendo proteínas, péptidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. Es esta capacidad de reconocer determinantes antigénicos específicos lo que hace que los anticuerpos sean moléculas muy valiosas (29).

En la actualidad, existen dos tipos diferentes de anticuerpos en el mercado: los anticuerpos policlonales, los cuales provienen de distintos linfocitos B, y están dirigidos contra diferentes epítopos del antígeno, un ejemplo de estos son los anti-venenos. Por otra parte se encuentran los anticuerpos monoclonales (mAbs), los cuales reconocen un único epítipo del antígeno. Los mAbs actualmente son el tipo de anticuerpo de mayor demanda en la clínica debido a que se unen de manera específica al mismo epítipo, ya que estos son producidos a partir de una misma clona de linfocito B (30, 31), esta característica de los mAbs genera resultados reproducibles en la investigación o en los tratamientos terapéuticos, en los cuales se emplean.

A pesar de que ambos tipos de anticuerpos son ampliamente empleados, la actual demanda de monoclonales ha impulsado a la industria biotecnológica a desarrollar nuevas tecnologías para su desarrollo y obtención. La piedra angular para el desarrollo de este tipo de moléculas fue la generación de hibridomas desarrollada por Kohler y Milstein, en 1975 (32), la cual permitió la obtención de anticuerpos monoclonales por primera vez. Esta tecnología consiste en la inmunización de



determinada especie animal (principalmente ratones) con un blanco de interés, posterior a la inmunización se obtienen los linfocitos B del bazo del animal, los cuales se fusionan con una línea celular de mieloma y se cultivan en un medio selectivo; el resultado de esta fusión es la que origina el hibridoma (31). Los hibridomas positivos y sus anticuerpos monoclonales obtenidos, son almacenados en nitrógeno líquido para su preservación (31).

Fue así como los primeros mAbs fueron desarrollados durante la década de 1980. Muromonab-CD3 (OKT3) fue el primer mAb en ser aprobado por la FDA (por su siglas en inglés, *Food and Drug Administration*), sin embargo, el uso de mAbs murinos está limitado debido a la pérdida de su eficacia derivada de la inmunogenicidad producida por las secuencias proteicas provenientes del ratón, además de que el Fc proveniente de estos mAbs no es reconocido de manera adecuada por las moléculas de complemento y los FcR humanos; aunado a esto tras años de emplear esta tecnología se encontró que los hibridomas pueden generar bajo rendimiento o ser genéticamente inestables (33), lo anterior derivó en el desarrollo de tecnologías capaces de generar anticuerpos con mayor similitud a los de origen humano, lo cual permitiría reducir la inmunogenicidad que estos generaban y al mismo tiempo aumentar su eficacia.

Con la finalidad de superar las distintas desventajas que poseen los anticuerpos murinos, se han desarrollado nuevas tecnologías que permitan reducir las secuencias innecesarias que tenían estos mAbs, pero sin afectar el reconocimiento antígeno-anticuerpo (34). Lo anterior ha dado origen a diferentes tipos de anticuerpos (Ver Figura 3); los mAbs quiméricos fueron los primeros en aparecer, los cuales constan de regiones variables de ratón, y regiones constantes de humano; posteriormente se generaron los mAbs humanizados, de los cuales únicamente las regiones CDRs provienen de ratón; por último, se encuentran los mAbs humanos, de los cuales la totalidad de su secuencia es completamente humana (35-37).



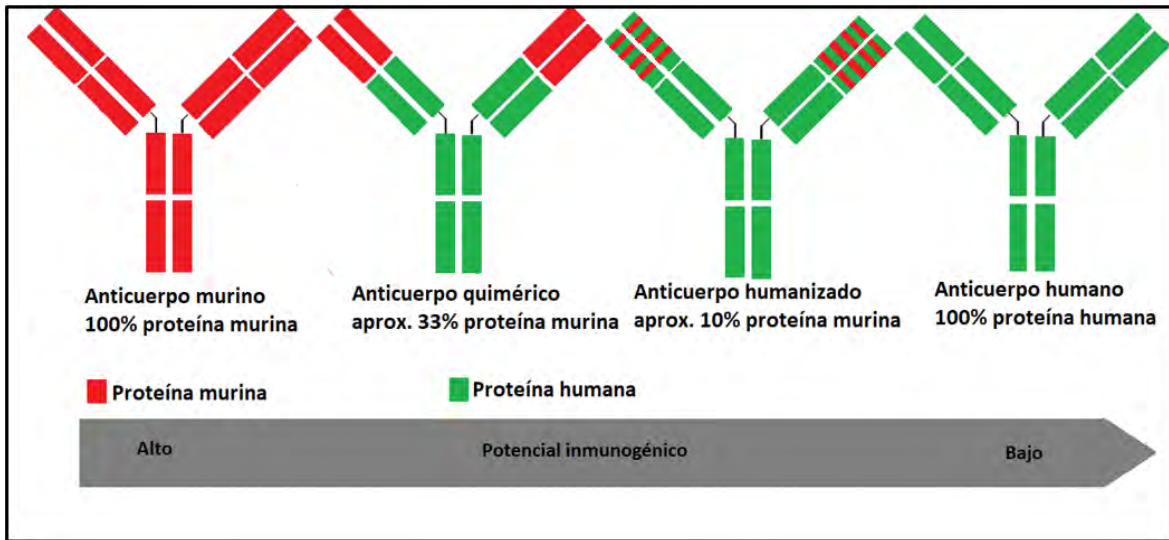


Figura 3. Tipos de anticuerpos monoclonales. Imagen realizada por Guzmán-Bringas, 2018.

Es entonces que desde la comercialización del primer anticuerpo monoclonal murino en 1986, esta clase de productos biofarmacéuticos ha crecido significativamente, al grado que, para el 10 de noviembre de 2014, había cuarenta y siete anticuerpos monoclonales de distintos tipos, aprobados en los Estados Unidos o Europa para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades, y muchos de estos productos también fueron aprobados en otros mercados internacionales. Con la tasa de aprobación actual de cuatro nuevos productos por año, aproximadamente 70 productos de anticuerpos monoclonales estarán en el mercado para 2020, y las ventas mundiales combinadas serán de casi 125 mil millones de dólares (USD) (38). Para el año 2017, la FDA ha aprobado al menos 21 anticuerpos terapéuticos dirigidos únicamente para la inmunoterapia del cáncer (39).

La tendencia actual de la industria biotecnológica es generar anticuerpos completamente humanos, o fragmentos de estos anticuerpos que mantengan su actividad biológica, y a su vez sean menos inmunogénicos. Avances en la tecnología, especialmente hablando del uso de animales transgénicos y plataformas para la expresión de fragmentos de anticuerpos en levaduras como el *yeast display*,



o en fagos como el *phage display*; generaron un gran desarrollo de mAbs humanos (40). Así fue que para el año 2002, adalimumab, un inhibidor del Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ), fue el primer mAb completamente humano en ser aprobado por la *US Food and Drug Administration* (FDA). Este mAb ha sido eficaz para el tratamiento de enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide, artritis psoriásica, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, psoriasis crónica, espondilitis anquilosante(41-43).

El uso de tecnologías como la de *phage display* involucra la obtención de secuencias de DNA que codifican para los dominios variables ( $V_H$  y  $V_L$ ), las cuales posteriormente son incorporadas en una construcción genómica para finalmente llevar a cabo su expresión en la superficie de un bacteriófago (31). Esto permite obtener secuencias de anticuerpos que reconocen un antígeno en específico.

Sin embargo, para generar una construcción genética que presente una adecuada variabilidad es importante tener segmentos de DNA de las regiones  $V_H$  y  $V_L$ , que aporten esa variabilidad. Es por esto que se deben considerar todos los aspectos que puedan afectar la calidad del DNA al momento de construir el fragmento de DNA necesario para construir una biblioteca de expresión en fagos. De manera que la generación de fragmentos de DNA de alta calidad se convierte en un punto crítico para la generación y búsqueda de nuevo anticuerpos monoclonales.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Construcciones genéticas de fragmentos de anticuerpos

Durante los últimos años, los avances en las técnicas de DNA recombinante han permitido la manipulación de los distintos fragmentos de anticuerpos (44). Estos avances mejoraron la comprensión que se tenía sobre la estructura de los anticuerpos, además de que han generado el desarrollo de una gran variedad de fragmentos de anticuerpos destinados para la investigación, diagnóstico y terapia; la cual quizá no se hubiese alcanzado con el empleo de la tecnología de los hibridomas (44).

Las nuevas técnicas de anticuerpos recombinantes incluso pueden reemplazar las prácticas aun presentes de inmunización de animales y desarrollo de hibridomas, sustituyendo estos sistemas por un sistema bacteriano capaz de sintetizar y expresar cantidades ilimitadas de fragmentos de anticuerpos contra casi cualquier antígeno. Sin embargo el primer estudio para la producción de anticuerpos recombinantes en bacterias se vio obstaculizado por el mal plegamiento de la inmunoglobulina y la agregación de ésta en el citoplasma bacteriano (45).

Los avances en la tecnología de DNA recombinante y su aplicación en la ingeniería de anticuerpos han permitido que fragmentos de anticuerpos se puedan clonar y expresar con éxito en distintos sistemas. En 1988, Skerra y Pluckthun, lograron expresar de manera eficiente un fragmento Fv funcional en un sistema bacteriano y compararlo con el anticuerpo del cual provenía, y determinaron que la constante de afinidad era idéntica en ambas moléculas (46). Posterior a este avance se consiguió expresar fragmentos de anticuerpos en células de mamíferos (47), en levaduras, células de vegetales e inclusive células de insecto (48, 49).

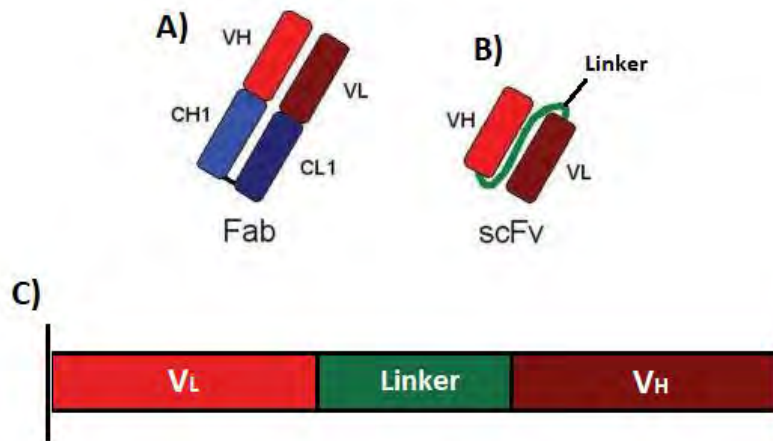
De manera que la generación de fragmentos de anticuerpos (Fab, Fv o scFv) mediante elaboración de distintas construcciones y de su expresión en distintos sistemas, ha abierto un nuevo campo en la ingeniería de anticuerpos, esto es debido a las ventajas que pueden otorgar este tipo de fragmentos. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos al ser más pequeños comparados con los mAbs pueden



llegar a tener un menor tiempo de retención lo que les permite ser no inmunogénicos o tener una inmunogenicidad muy reducida (44). Otra ventaja de las construcciones de scFv es que estas permiten obtener una única secuencia proteica, que contiene tanto el dominio  $V_H$  como el dominio  $V_L$ , lo cual facilita su purificación.

## 2.2. Fragmento variable de cadena sencilla (scFv)

Las construcciones de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv), se han convertido en una técnica muy importante para la obtención de moléculas de alta afinidad. Los scFv se construyen uniendo el dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) y el dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ), unidos mediante una secuencia corta de aminoácidos llamada linker (Ver Figura 4) (50). La longitud del linker es crítica para generar un correcto plegamiento de las cadenas variables; se estimó que la longitud del linker debe ser de 3.5 nm (35 Å); esto es entre 13 y 18 aminoácidos aproximadamente. Esta extensión del linker va a permitir el correcto plegamiento del scFv sin afectar su capacidad de unión al antígeno. (51)



**Figura 4. Esquemización de una construcción de un scFv.** A) Fragmento Fab; B) Representación gráfica de un fragmento scFv; C) Representación lineal del scFv. Modificado de Nelson, 2010 (9)

La obtención de las secuencias  $V_H$  y  $V_L$  que constituyen los scFv, pueden ser obtenida a partir de hibridomas que generan anticuerpos contra un antígeno específico (52), de células de bazo de ratones inmunizados con un antígeno específico, y de células B de humanos sanos o que sufren de algún padecimiento (53). A partir de cualquiera de estas células se puede extraer el RNA mensajero, y



posteriormente sintetizar el cDNA (empleando una retrotranscriptasa), el cual finalmente servirá como templado para amplificar el segmento deseado de las regiones variables. Dentro de las construcciones de scFv se ha reportado que la orientación de las secuencias VH y VL, puede ser VH – Linker – VL o bien VL – Linker – VH; (ambas orientaciones se ha aplicado en el campo) siendo la orientación VH – linker- VL la más empleada (54, 55). Sin embargo la orientación del scFv puede variar dependiendo del sistema en el cual se quiera expresar la proteína recombinante, ya que es posible que para determinado sistema una orientación se exprese mejor que la otra (56).

Con el uso de las construcciones de scFv y su combinación con plataformas, como la de *phage display*, se puede generar bibliotecas de fagos-scFv que expresen scFv para la búsqueda de nuevos anticuerpos (57). Los scFv son una manera rápida de obtener candidatos a posibles anticuerpos terapéuticos, sin embargo, estos en realidad no son anticuerpos, ya que no cuentan con la región Fc; el cual es el fragmento que tiene las secuencias proteicas específicas para la activación de las células efectoras. Además, debido a la falta de la región Fc, la vida media de los scFv suele ser muy corta (50, 58). Pese a estas desventajas se han construido numerosos fragmentos scFv dirigidos contra haptenos, proteínas, carbohidratos, receptores, antígenos tumorales, y virus; todos estos scFv cuentan con un alto potencial terapéutico o de diagnóstico (44).

Actualmente la Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos (UDIBI), en colaboración con las compañías *GlobalBio Inc.*, y *Antibody Design Laboratories (ADL)* han proyectado la generación de una biblioteca semisintética de scFv's. Esta construcción se desarrollará en una primera fase con una diversidad sintética en los dominios variables L1, L2, L3, H1, H2, y H3. Y en una segunda fase sobre esta se escindirá la región H3 y en su lugar se insertará la región CDR-H3 natural obtenida durante la realización del presente trabajo, esto a manera de aportar la diversidad natural de la región CDR-H3, la cual es imposible alcanzar de manera sintética.





### 3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la diversidad que aporta la región CDR-H3 es demasiado alta para poder ser alcanzada mediante un diseño *in silico*, es necesario generar fragmentos de DNA de la región CDR-H3 obtenidos de fuentes naturales. Estos CDR-H3 naturales, serán los responsables de aportar la mayor diversidad a la biblioteca del scFv.



## 4. OBJETIVOS

### Objetivo general

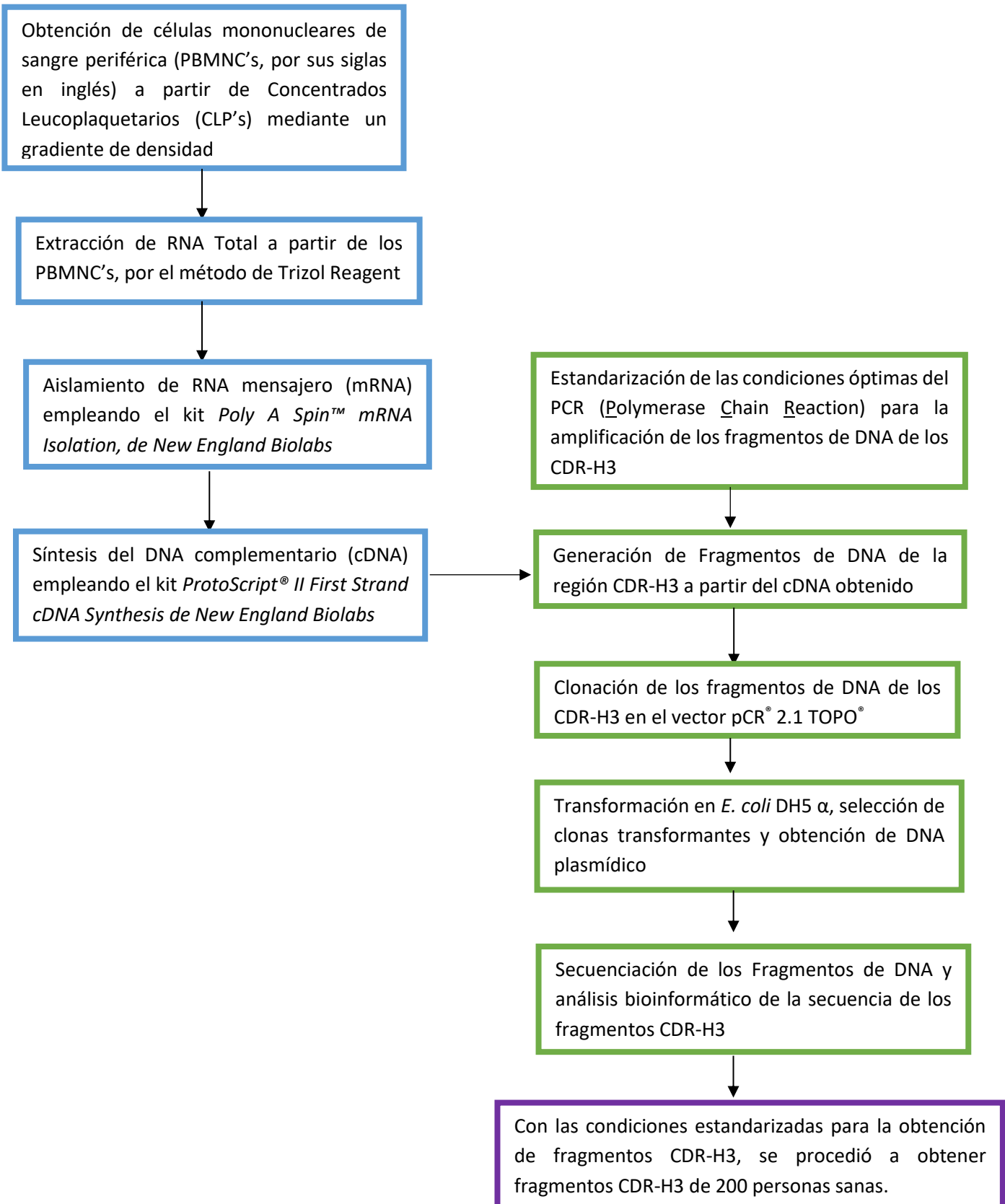
- Obtener fragmentos de DNA de la tercera región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR-H3) humana.

### Objetivos específicos

- Establecer una metodología adecuada para la generación de fragmentos de DNA de la región CDR-H3 humana.
- Determinar los parámetros críticos para la obtención de fragmentos de DNA de la región CDR-H3 humana.
- Evaluar la calidad e identidad de los fragmentos de DNA de la región CDR-H3 humana mediante secuenciación.
- Generar fragmentos de DNA de la región CDR-H3 de 200 individuos sanos.



## 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMNC's del inglés Peripheral Blood Mononuclear Cells)

Para los fines del presente proyecto, se procedió a obtener las secuencias de DNA de la región determinante de complementariedad CDR-H3 a partir de PBMNC's obtenidos de humanos; para llevar esto a cabo se obtuvieron Concentrados Leucoplaquetarios (CLP's) de donantes sanos. Los criterios de inclusión para la selección de los CLP's fueron los siguientes: los donantes debían cumplir con el criterio de individuos clínicamente sanos, esto es serología infecciosa Negativa a: Anticuerpos contra *Treponema pallidum* (Ac TPall), Virus de inmunodeficiencia humano 1 y 2 (HIV I-II), Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), Anticuerpos contra virus de la hepatitis C (Ac HVC), Anticuerpos contra *Tripanosoma Cruzi* (Ac Tcruzi), Prueba de detección de ácidos nucleicos del virus de inmunodeficiencia humana (VIH NAT ULTRIO), Prueba de detección de ácidos nucleicos de virus de la hepatitis B (HBV NAT ULTRIO); otro criterio de inclusión fue que además los individuos seleccionados debían tener edades entre 18 y 40 años. Todo lo anterior de acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, para la disposición de sangre humana y sus componentes para fines terapéuticos. (59)

A partir de los CLP's se procedió a optimizar la obtención de las células mononucleares. Para la optimización se emplearon cuatro CLP's con los cuales se probaron distintos volúmenes de sangre y distintas cantidades de Lymphoprep a utilizar. El objetivo de la optimización de estos parámetros se encaminó a la obtención de suficiente cantidad de PBMNC's para la extracción posterior del RNA total; así como para la utilización de la menor cantidad de reactivos.

La obtención de PBMNC's se realizó mediante gradiente de densidad con Lymphoprep (Apéndice 1). La técnica de separación de las células mononucleares por gradiente de densidad se basa en la diferencia de densidades que hay entre los distintos componentes de la sangre y el Lymphoprep. Los granulocitos y los eritrocitos tienen una mayor densidad comparada con la densidad de los PBMNC's.



Al mezclar la sangre con el Lymphoprep, se genera un gradiente de densidad en donde los eritrocitos y granulocitos con mayor densidad sedimentan, mientras que los PBMNC's se sitúan en la interface plasma (60, 61).

Siguiendo esta metodología se procedió a probar las distintas condiciones para la optimización de la técnica; se extrajeron con una jeringa los siguientes volúmenes de CLP's 1 mL, 2 mL y 4mL; esto con la finalidad de evaluar el volumen mínimo requerido de cada CLP para la obtención de entre  $5-10 \times 10^6$  células mononucleares. Los volúmenes de CLP's se diluyeron 1:2 con PBS 1x y posteriormente se realizó el gradiente de densidad con el Lymphoprep.

Una vez obtenidas las células mononucleares, se procedió a resuspender el botón celular en 250  $\mu$ L de PBS 1x, y enseguida se determinó la viabilidad celular y se realizó un conteo celular por el método del azul de tripano. Posteriormente se agregó 750  $\mu$ L de TRIzol™ Reagent y se resguardaron las muestras a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Una vez obtenidos los mejores parámetros para obtención del material celular, estos fueron aplicados para el resto de las muestras.

## **6.2. Extracción de RNA total con TRIzol™ Reagent**

Se realizó la extracción del RNA total empleando el método de TRIzol™ Reagent (Apéndice 2). El método de TRIzol™ Reagent permite el aislamiento simultáneo de RNA, DNA y proteínas de muestras de células y tejidos. Este método se basa en el uso de una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina; el primero desnaturaliza las proteínas de la muestra y el segundo es un agente caotrópico, el cual favorece la disolución de la membrana celular e inhibe la acción de RNAsas lo cual permite conservar el RNA integro (62). A continuación se agregó cloroformo para separar las fases orgánica y acuosa, y finalmente el RNA se recupera de la fase acuosa y este se precipita con isopropanol.

Una vez extraído el RNA total de las células mononucleares, este se disolvió en agua Tipo 1 estéril, y posteriormente se procedió a cuantificar su concentración y pureza mediante espectrofotometría UV a partir de la relación  $D.O_{260\text{nm}}/ D.O_{280\text{nm}}$  (63, 64). Únicamente se seleccionaron las muestras cuyos valores de  $D.O_{260\text{nm}}/$



D.O<sub>280 nm</sub> se localizarán entre 1.8 – 2.2, lo cual indica que el material obtenido tiene una pureza óptima.

Además de evaluar la pureza del RNA total por espectrofotometría UV, se evaluó también la integridad mediante electroforesis en un gel de agarosa (*Ultrapure™ Agarose*, de *Invitrogene*; disuelta en Amortiguador TAE 1x) al 2% en condiciones nativas y empleado GelRed™ 10,000x como agente intercalador; como amortiguador de corrida se empleó TAE 1x. A partir de las concentraciones obtenidas se realizó el cálculo de los microlitros de muestras necesarios para cargar aproximadamente 1 µg de RNA total por muestra; la electroforesis se llevó a cabo a 60 Volt x 60 min. Terminado el tiempo de corrimiento se procedió a visualizar el gel en el fotodocumentador (Chemidoc™ MP, de BIORAD) y se determinó cuales muestras de RNA se encontraban integras, mediante la visualización de las subunidades ribosomales 28s y 18s. (65). Este método de verificación, se basa en el supuesto de que la calidad y la cantidad del RNA ribosomal reflejan la de la población del RNA mensajero subyacente. Únicamente las muestras en las que visualizaba la presencia de las bandas de las subunidades del RNA ribosomal 28s y 18s y que contaban con la concentración y pureza adecuada fueron las que continuaron con el procesamiento.

### **6.3. Aislamiento de RNA mensajero (mRNA)**

Para obtener moléculas viables de cDNA para la síntesis del DNA de la región CDR-H3, se acordó realizar un paso intermedio entre la obtención del RNA total y la síntesis del cDNA. Este paso es el aislamiento de mRNA, para ello se empleó el kit *Poly A Spin™ mRNA Isolation*, de *New England Biolabs*, la metodología empleada se describe en el Apéndice 3. Esta metodología de aislamiento se basa en la característica del mRNA de poseer una secuencia relativamente grande de 200 a 300 residuos de adenina, en una secuencia conocida como poli A; esta secuencia de adeninas permite la hibridación con oligos dT ancladas a perlas de celulosa, y por complementariedad de base de la secuencia de poli A con los oligos dT se aísla el mRNA del RNA total (66, 67).



Para llevar a cabo el aislamiento del mRNA se procedió a realizar una selección de las mejores muestras de RNA total a partir de las cuales se procedió a realizar “Pools”, se colocaron cantidades equivalentes de RNA en cada Pool; posteriormente ya con la mezcla se procedió al aislamiento del mRNA con el kit anteriormente mencionado.

Una vez aislado el RNA mensajero, este se solubilizó en agua Tipo 1 y se procedió a cuantificar su concentración y pureza mediante espectrofotometría UV, (Relación  $D.O_{260nm}/D.O_{280nm}$ ) y se procedió directamente con la síntesis de cDNA.

#### **6.4. Síntesis de DNA complementario (cDNA)**

La síntesis de cDNA a partir de RNA mensajero, debe ser dirigida por el uso de una enzima especializada que convierta el RNA en su cDNA, este tipo de enzimas son denominadas retro-transcriptasas (RT's). Las RT's emplean como templado RNA y primers cortos que se unen al extremo 3' del RNA, es así que se comienza con la síntesis de cDNA. Una de las RT-transcriptasas más empleadas en el campo de la biología molecular es la M-MuLV (68).

La síntesis de cDNA se realizó empleando la metodología sugerida en el kit, *ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis de New England Biolabs* (Apéndice 4). El cDNA se obtuvo a partir del mRNA previamente aislado. Una vez generada la muestra de cDNA, se procedió a realizar un control de “No síntesis de cDNA” de acuerdo con lo descrito en el protocolo anteriormente mencionado; este control de “No síntesis” fue empleado en la etapa de control de calidad de las muestras de cDNA.



#### **6.4.1. Control de calidad del cDNA (Evaluación del cDNA en gel de agarosa al 2%)**

Como parte del control de calidad de las moléculas de cDNA generadas, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa (*Ultrapure™ Agarose*, de *Invitrogene*; disuelta en Amortiguador TAE 1x) al 2% en condiciones nativas y empleado GelRed™ como agente intercalador; como amortiguador de corrida se empleó TAE 1x.

#### **6.5. Estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polimerase chain reaction*) para la amplificación de la región CDR-H3**

La reacción de PCR, es una técnica de biología molecular desarrollada en 1983 por Kary Mullis, la cual permite la generación de una gran cantidad de copias de un fragmento particular de DNA a partir de incluso una única copia del fragmento original (69). Se realizó una amplificación por PCR de la región determinante de complementariedad CDR-H3, para ello se emplearon oligonucleótidos específicos diseñados *in silico* para amplificar la región CDR-H3 junto con las distintas regiones adyacentes (*joinings*). Las secuencias de estos oligonucleótidos no se muestran en el presente trabajo debido a cuestiones de confidencialidad y protección de la propiedad intelectual, esto debido a que los oligonucleótidos fueron diseñados por la compañía *GlobalBio, Inc.*, única y exclusivamente para su empleo durante la generación de los CDR-H3.

Sin embargo, previo a la amplificación de las moléculas CDR-H3, se procedió a la estandarización de las condiciones idóneas para la amplificación, de tal manera que se obtuviera la menor cantidad de productos inespecíficos. Mediante una PCR de gradiente se determinó la temperatura de alineamiento para la amplificación, así mismo se evaluó la cantidad de templado requerida para la reacción para una óptima amplificación de los productos, esto se determinó realizando 3 distintas diluciones del templado (cDNA).





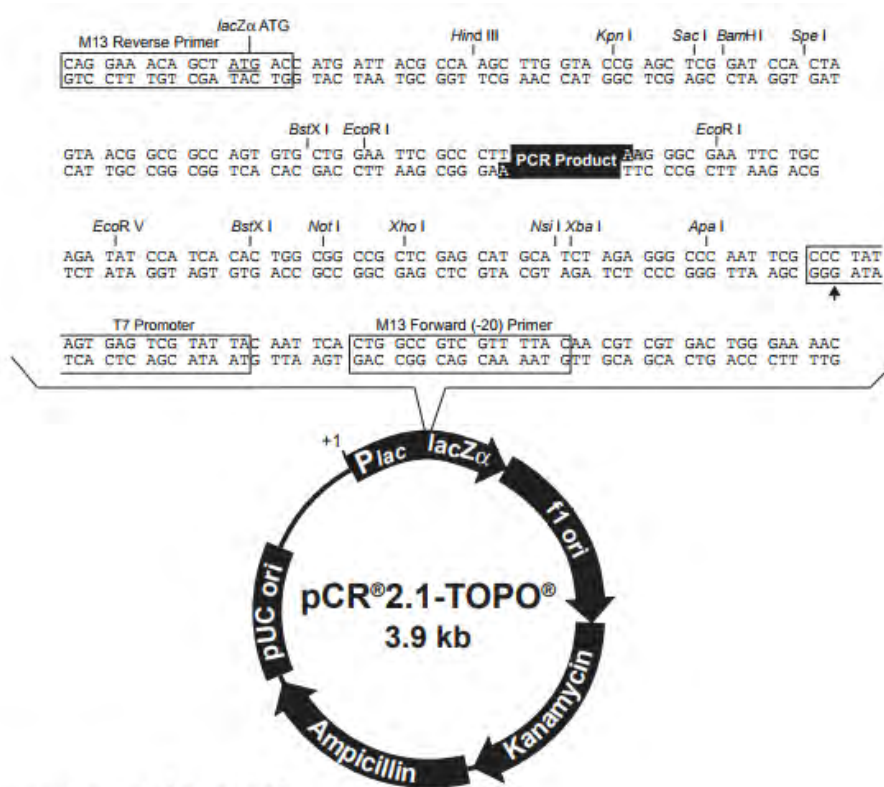
Una vez determinadas las condiciones de amplificación y de templado, se procedió a repetir la PCR empleando estas condiciones, para la amplificación de las regiones de complementariedad CDR-H3 a partir del cDNA. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 3% empleando *Ultrapure™ Agarose*, de *Invitrogene* disuelta en TAE 1X, y empleando GelRed™ como intercalador, este mismo gel sirvió para realizar una purificación del DNA a partir del gel.

Se escindieron las bandas correspondientes a las bandas deseadas y se procedió a la purificación a partir del gel empleando el Kit *QIAquick Gel Extraction* de *QIAGEN* (Apéndice 5). Una vez eluido el DNA, se cuantificó por espectrometría UV (Relación  $D.O_{260nm}/D.O_{280 nm}$ ) y se continuó con la clonación de estos productos en el vector TOPO pCR® 2.1 TOPO® el kit *TOPO TA Cloning*, de *INVITROGEN*.

### **6.6. Clonación de los productos de PCR**

El proceso de clonación tiene como propósito generar múltiples copias de un único fragmento de DNA, en este caso particular, generar múltiples copias de un fragmento de DNA de la región de complementariedad CDR-H3 humana. La clonación de la región CDR-H3, permite el posterior análisis de las secuencias de DNA que se están generando.





**Comments for pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>**  
**3931 nucleotides**

LacZ $\alpha$  fragment: bases 1-547  
M13 reverse priming site: bases 205-221  
Multiple cloning site: bases 234-357  
T7 promoter/priming site: bases 364-383  
M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406  
f1 origin: bases 548-985  
Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113  
Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991  
pUC origin: bases 3136-3809

**Figura 5.** Características generales del vector de clonación pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup>. Modificado del Kit TOPO<sup>™</sup> TA Cloning<sup>™</sup> de Invitrogen (70).

### 6.6.1. Preparación de *E. coli* DH5- $\alpha$ químicamente competentes.

La transformación es el proceso mediante el cual las bacterias captan DNA exógeno presente en el medio. Para que este proceso suceda es necesario que la bacteria permita el ingreso de dicho material genético a su interior, la capacidad de hacer dicha incorporación se denomina competencia. Este proceso de competencia y transformación ocurre de manera natural en algunas bacterias, sin embargo, existe distintas técnicas en la biología molecular diseñadas para incrementar la competencia de las bacterias y lograr procesos de transformación eficientes. Es por

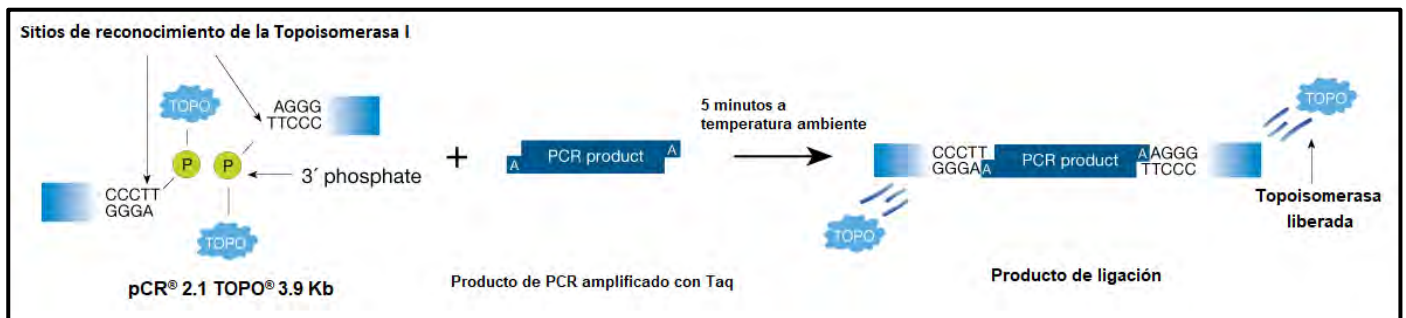


esto que para el presente proyecto previo a comenzar con la clonación se prepararon bacterias de *E. coli* DH5- $\alpha$  químicamente competentes empleando el método de Cloruro de Calcio (71) (Apéndice 6).

### 6.6.2. Ligación de los Productos de PCR con el vector pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup>

Como primer paso de la clonación se encuentra la ligación de los productos de PCR con el vector; para ello, se tomó una mezcla de los productos de PCR purificados y se ligó con el vector pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup> 3.9 Kb (ver figura 5) de acuerdo al Kit TOPO<sup>™</sup> TA Cloning<sup>™</sup> de Invitrogen(70) (Apéndice 7).

La implementación del vector pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup> es posible debido a que para la amplificación de los productos de PCR se empleó la DNA polimerasa de *Thermophilus aquaticus* la cual añade una adenina en la posición terminal 3', mientras que por otra parte el vector TOPO que encuentra linearizado y en su extremo 3' lleva un residuo de deoxitimidina T. Esta característica permite la unión del producto de PCR con el vector TOPO por complementariedad de bases (Ver Figura 6), y finalmente con la actividad de ligasa de la topoisomerasa quedan ligados los dos fragmentos. (71, 72)



**Figura 6.** Esquema de ligación del vector pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup> con el producto de PCR amplificado con la Taq polimerasa. Modificado de Invitrogen scientifics (73)

Posteriormente la mezcla de clonación obtenida se empleó para la transformación de *E. coli* DH5- $\alpha$  a manera que se obtuvieran múltiples secuencias de la región CDR-H3.



### **6.6.3. Transformación de *E. coli* DH5- $\alpha$ con la mezcla de clonación.**

La transformación es un proceso por el cual una bacteria competente interioriza un DNA exógeno, de esta manera la bacteria asimila el DNA exógeno como propio permitiendo heredar dicho DNA a las células hijas cada que la bacteria transformada se duplique (71). Tras la transformación, la célula que ha recibido el DNA se suele denominar transformante.

La transformación se realizó empleando células químicamente competentes de *E. coli* DH5- $\alpha$  y empleando el vector pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup> clonado con la mezcla de los productos de PCR de las regiones CDR-H3. La transformación de las bacterias químicamente competentes se hizo de acuerdo con el apéndice 8.

### **6.6.4. Selección de colonias transformantes.**

El vector pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup> posee dos marcadores de selección, el primero de ellos es un cassette de resistencia a ampicilina con el cual las bacterias que adquieran el vector podrán crecer en medio suplementado con dicho antibiótico. El segundo marcador de selección corresponde al gen *lacZ* del operon *lac*, el cual codifica para una  $\beta$ -galactosidasa, esta enzima permite la degradación de los galactósidos del medio. Un ejemplo de un galactósido es el X-Gal, el cual al ser degradado por la  $\beta$ -galactosidasa, libera un producto colorido. El vector pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup> está diseñado para permitir la inserción del producto de PCR justo en medio de la secuencia del dicho gen, lo que ocasiona que cuando el vector tenga un producto de PCR adecuadamente insertado, el gen se verá interrumpido y con ello se inhibirá la síntesis de la enzima; esto permitirá la selección de clonas transformantes mediante la visualización de colonias de distinto color en un medio con X-Gal.

El empleo de un inductor del operon *lac* (IPTG) combinado con el análogo de la  $\beta$ -galactosa, X-gal, permite la obtención de colonias azules y blancas, siendo estas últimas las bacterias de interés debido a que son las que contiene el gen *lacZ* del vector pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup> interrumpido por la secuencia de interés (74).



De tal manera que las clonas transformadas con la secuencia de la región CDR-H3 fueron aquellas que crecieron en un medio suplementado con ampicilina y que presentaron un color blanco.

#### **6.6.5. Aislamiento del DNA plasmídico de las clonas aisladas.**

Una vez identificadas las colonias que contenían insertos, se procedió al aislamiento del DNA plasmídico de cada una (se seleccionaron 32 colonias en total) siguiendo las especificaciones descritas en el protocolo del Kit QIAprep Spin Miniprep de QIAGEN (Apéndice 9). Los plásmidos aislados se cuantificaron mediante espectrofotometría UV (Relación  $D.O_{260nm}/D.O_{280nm}$ ), aunado a la cuantificación por espectrofotometría UV se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para verificar la integridad.

#### **6.6.6. Amplificación por PCR de la región CDR-H3 para la confirmación de clonas**

A partir del DNA plasmídico aislado se realizó una amplificación mediante PCR empleando oligonucleótidos específicos de la región CDR-H3; las condiciones empleadas para la amplificación fueron las mismas que se obtuvieron durante el PCR para la amplificación de la región CDR-H3. La realización de esta amplificación tuvo como propósito evidenciar la presencia o ausencia de los insertos correspondientes a la región determinante de complementariedad CDR-H3 junto con sus respectivos joinings.

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

#### **6.7. Secuenciación de los CDR-H3 obtenidos por el método de Sanger**

Una vez confirmado que los plásmidos contenían nuestros fragmentos de interés, seleccionaron 20 clonas para realizar su secuenciación. El DNA plasmídico correspondiente de cada clona fue enviado a la compañía *Wyzer Biosciences* para efectuar la secuenciación mediante el método de Sanger automatizado. Este



método se basa en la inserción selectiva de los didesoxinucleótidos (ddNTPs) durante la elongación de cadena de DNA por la DNA polimerasa.

Los ddNTPs a diferencia de los desoxinucleotidos (dNTP) carecen del grupo 3'-OH, la ausencia de este grupo impide la formación del enlace fosfodiéster para el siguiente nucleótido y por lo tanto la elongación se ve interrumpida en el momento en que se incorpora un ddNTP a la cadena molde (75); estos ddNTPs están marcados con fluoróforos distintos.

Tras la incorporación de un ddNTP marcado, cada fragmento avanzará por el gel a través de un tubo capilar. Cuando los distintos fragmentos marcados pasan a través de la cámara detectora, el fluoróforo es excitado con un láser, emitiendo una fluorescencia de un color específico para cada ddNTP. Con ello, la determinación del color permite asignar el nombre de la base correspondiente y el orden de las emisiones revela la secuencia de DNA (76, 77).

Las secuencias recibidas se procesaron con los editores de secuencias BIOEDIT y SnapGene. El programa SnapGene permitió la determinación del tamaño de las secuencias mediante su alineación; empleando el vector pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup> como secuencia referencia. Para realizar el alineamiento múltiple de las diferentes secuencias obtenidas, se utilizó el editor de secuencias BIOEDIT.

### **6.8. Generación de fragmentos de DNA de la región determinante de complementariedad CDR-H3 humana de 200 individuos sanos**

Una vez estandarizadas las diferentes técnicas para la generación de los fragmentos de DNA de la región determinante de complementariedad CDR-H3 humana, se procedió a repetir el proceso para finalmente obtener un conjunto de fragmentos CDR-H3 provenientes de 200 individuos clínicamente sanos, 100 hombres y 100 mujeres; esto a manera de tener un gran repertorio de fragmentos CDR-H3. A partir de este conjunto de fragmentos, se realizó nuevamente una clonación, transformación y secuenciación de algunas clonas transformantes para determinar la identidad y la variabilidad de las regiones CDR's obtenidas.



## 7. Resultados

### 7.1. Optimización del aislamiento de PBMNC's obtenidos a partir de Concentrados Leucoplaquetarios (CLP's)

Debido a que el RNA de la región CDR-H3 se encuentra dentro de las células B, era importante aislar una cantidad suficiente de células mononucleares de sangre periférica con el fin de obtener una cantidad suficiente de material genético. Las diferentes condiciones evaluadas (ver tabla 1) en la optimización fueron las siguientes: la cantidad empleada de sangre periférica, la dilución de esta con PBS 1x, la cantidad de Lymphoprep empleada, y la relación de estas condiciones con la cantidad de PBMNC's obtenidas.

**Tabla 1.** Condiciones evaluadas para la optimización de la extracción de PBMNC's a partir de concentrados leucoplaquetarios.

Concentrado Leucoplaquetarios (CLP)	Volumen de sangre empleada	Dilución con PBS 1x	Cantidad de Lymphoprep empleado	Cuenta celular empleando Azul Tripano (cel/mL)
Donador 1	1 mL	1:2	1 mL	$2.38 \times 10^6$
	2 mL	1:2	2 mL	$6.85 \times 10^6$
	4 mL	1:2	4 mL	$1.66 \times 10^7$
Donador 2	1 ml	1:2	1 mL	$1.45 \times 10^7$
	2 mL	1:2	2 mL	$1.96 \times 10^7$
	4 mL	1:2	4 mL	$2.91 \times 10^7$
Donador 3	1 ml	1:2	1 mL	$9.20 \times 10^6$
	2 mL	1:2	2 mL	$1.39 \times 10^7$
	4 mL	1:2	4 mL	$2.41 \times 10^7$
Donador 4	1 ml	1:2	1 mL	$4.28 \times 10^6$
	2 mL	1:2	2 mL	$9.75 \times 10^6$
	4 mL	1:2	4 mL	$1.39 \times 10^7$



Finalmente después de probar distintos volúmenes de sangre, se determinó que 2 mL es un volumen adecuado de muestra para obtener una cantidad suficiente de células (entre  $5-10 \times 10^6$  células).

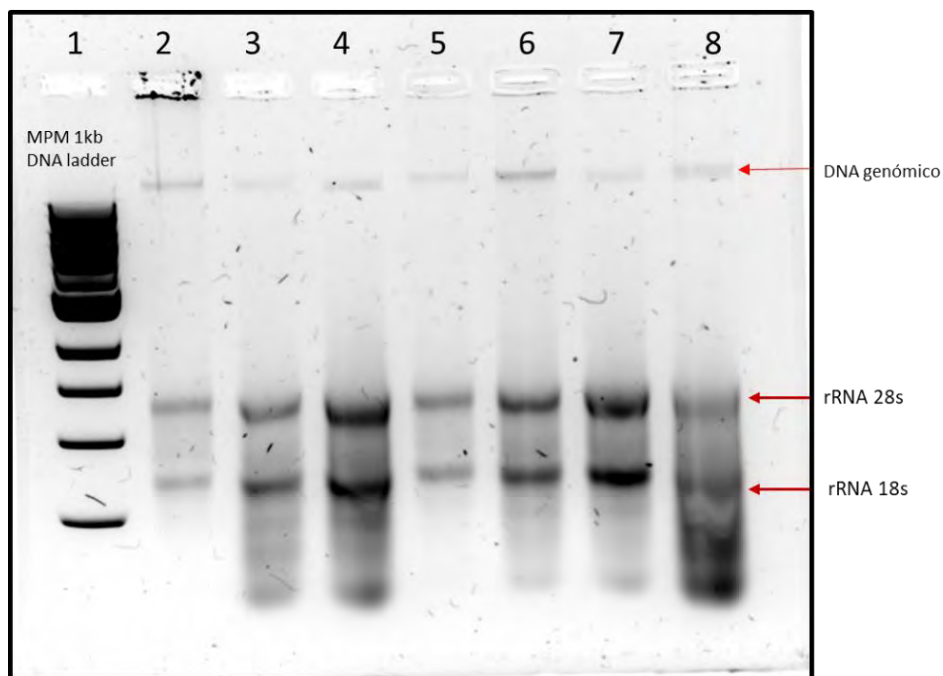
## **7.2. Extracción del RNA Total a partir de PBMNC's mediante el método de TRizol Reagent.**

A partir de células mononucleares de sangre periférica se realizó la extracción del RNA total (rRNA, mRNA, tRNA), la cual se llevó a cabo de acuerdo como se describe en el apéndice 2. A las muestras de RNA obtenidas se les efectuaron diversos controles de calidad para determinar que efectivamente el RNA se encontrara en óptimas condiciones para emplearse en la síntesis de cDNA.

La mayoría de las muestras presentaron una alta concentración de RNA total (mayor a  $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ), y también arrojaron valores de relación  $D.O._{260\text{nm}/280\text{nm}}$  dentro de los límites (1.8 – 2.2) de pureza óptima para el RNA. Conjunto a la evaluación de estos parámetros, se evaluó que el RNA total se encontraba íntegro y que no había sufrido degradación durante el proceso de extracción, para ello se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% (P/V), con el fin de visualizar las dos bandas características del RNA ribosomal (rRNA) humano, correspondientes a las subunidades 28s y 18s. A pesar de que el RNA de interés es el mRNA, este no es posible visualizarlo directamente debido a que únicamente constituye del 1 al 5% del RNA total, contrario al rRNA el cual constituye el mayor porcentaje (del 80% al 85%) (71). Es por lo que en las muestras que se observaban integras las bandas de rRNA, también se infirió que el mRNA se encontraba de igual manera íntegro.





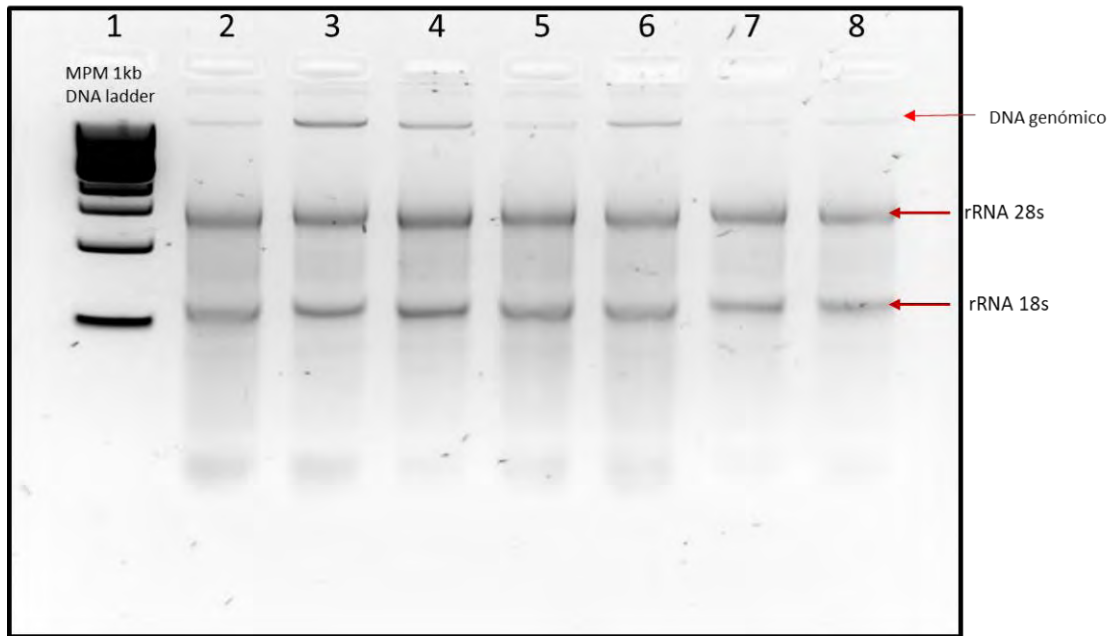


**Figura 7. Integridad de RNA total extraído mediante el método de TRIzol Reagent.** Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% (P/V); Condiciones de corrida: 90 Volts x 90 min. **Carril 1:** Marcador de Peso Molecular 1kb DNA ladder de NEB™; **Carriles 2 -8:** Muestras de RNA total.

En esta primera estandarización de la extracción del RNA (ver figura 7), en la mayoría de las muestras el RNA total se encuentra degradado en cierto grado, siendo el RNA del carril 8 el que presenta mayor degradación. El RNA es extremadamente susceptible a degradación debido a la presencia ubicua de RNAsas en el ambiente, es por ello que con el fin de prevenir la degradación se procedió a limpiar de manera exhaustiva la cabina de PCR y todos los materiales dentro de ella (como lo son micropipetas, puntas plásticas, recipientes) con una solución inhibidora de RNAsas (RNaseZAP™), a fin de eliminar cualquier fuente de RNAsas.

Posterior a la limpieza de todos los materiales, se procedió nuevamente a la realización de la extracción del RNA total siguiendo nuevamente lo descrito en el apéndice 2.





**Figura 8.** Integridad de las muestras de RNA total posterior a tratamiento con solución inhibidora de RNAsas (RNaseZAP™). Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% (p/v); Condiciones de corrida: 90 Volts x 60 Min. **Carril 1:** Marcador de Peso Molecular 1 kb DNA Ladder, **Carril 2 – 8:** Muestras de RNA total extraídos posterior al tratamiento con (RNaseZAP™)

La limpieza con el inhibidor de RNAsas nos permitió obtener un material de mejor calidad. En la figura 8, se observa que todas las muestras de RNA total presentaron las dos bandas características del RNA ribosomal integras, lo cual sugiere que el mRNA también mantiene dicha integridad y calidad.

### 7.3. Aislamiento de RNA mensajero

Una vez determinado cuales muestras de RNA total cumplían con los estándares de pureza, de concentración e integridad, se procedió con la realización del aislamiento del mRNA; para ello se mezclaron las muestras de RNA total. Cada mezcla estaba constituida por 10 muestras de RNA total en cantidades equivalentes a manera de que en la mezcla se tuviera un mínimo 0.1 mg de RNA total. Una vez obtenida la mezcla, se procedió a realizar el aislamiento del mRNA empleando el kit *Poly A Spin™ mRNA Isolation*, de *New England Biolabs* (Apéndice 3).

Dado que el mRNA se eluyó en un volumen final de 20  $\mu$ L (la cual es una cantidad bastante escasa) y debido también a que el mRNA es una molécula muy lábil; únicamente se realizó la cuantificación mediante espectrofotometría (relación



D.O.<sub>260nm/280nm</sub>) empleando 2  $\mu$ L del mRNA aislado, para determinar la concentración y la pureza (ver tabla 2).

**Tabla 2.** Cuantificación de RNA mensajero obtenido mediante espectrofotometría.

RNA mensajero aislado	
D.O. 280nm	2.038
D.O. 260nm	1.014
D.O. 280nm/260nm	2.010
<b>Concentración mRNA (ng/<math>\mu</math>L)</b>	81.525

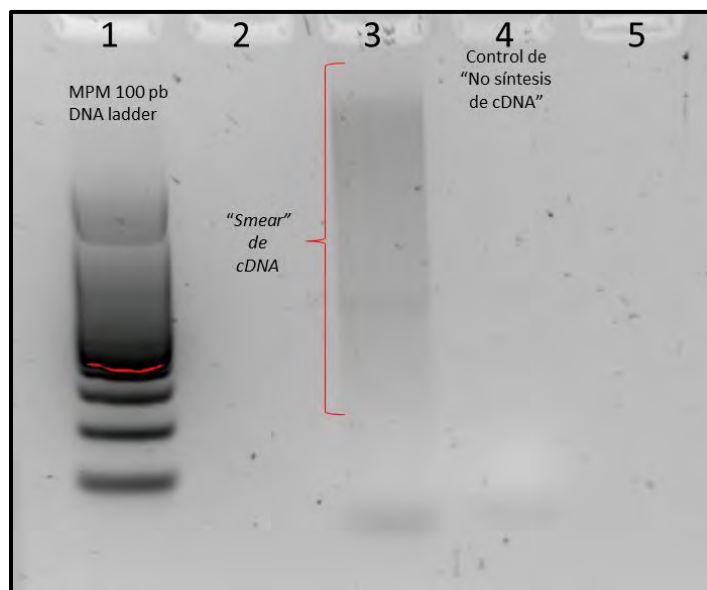
El resto del mRNA (18  $\mu$ L) se empleó directamente para la síntesis del DNA complementario (cDNA).

#### **7.4. Síntesis de DNA complementario (cDNA) y control de calidad de cDNA**

Para llevar a cabo la síntesis del cDNA es necesaria la actividad de una Retro-Transcriptasa. La retro-transcriptasa empleada fue la del virus de leucemia murina (M-MuLV) (68), la cual permite sintetizar el cDNA complementario a partir de un molde de RNA o DNA monocatenario.

El procedimiento de síntesis se hizo de acuerdo con el kit *ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis* (Apéndice 4), una vez sintetizado el cDNA se procedió a su visualización en un gel de agarosa al 2 %, empleando un control de “No síntesis” como control negativo de la reacción (ver figura 9). El control de “No síntesis” se constituyó de los mismos componentes que en la síntesis de cDNA sin embargo para este control se inactivó inmediatamente la retro-transcriptasa una vez agregada a la mezcla de reacción, impidiendo la síntesis del cDNA.





**Figura 9. Visualización del cDNA sintetizado.** Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% (p/v); Condiciones de corrida: 80 Volts x 40 min. **Carril 1:** Marcador de Peso Molecular 100 pb DNA Ladder Promega™, **Carril 3:** Molécula de cDNA sintetizada, **Carril 4:** Control de “No Síntesis de cDNA”.

Como se aprecia en la figura 9, las moléculas de cDNA se observan como un ligero barrido o “smear” en el gel de agarosa mientras que en el control de “No síntesis” no se observa banda alguna. Este barrido, que varía desde varias pares de bases a varios Kpb, es indicativo de que se llevó a cabo la síntesis de cDNA. Se realizaron las amplificaciones del CDR-H3 empleando estos cDNA como templados.

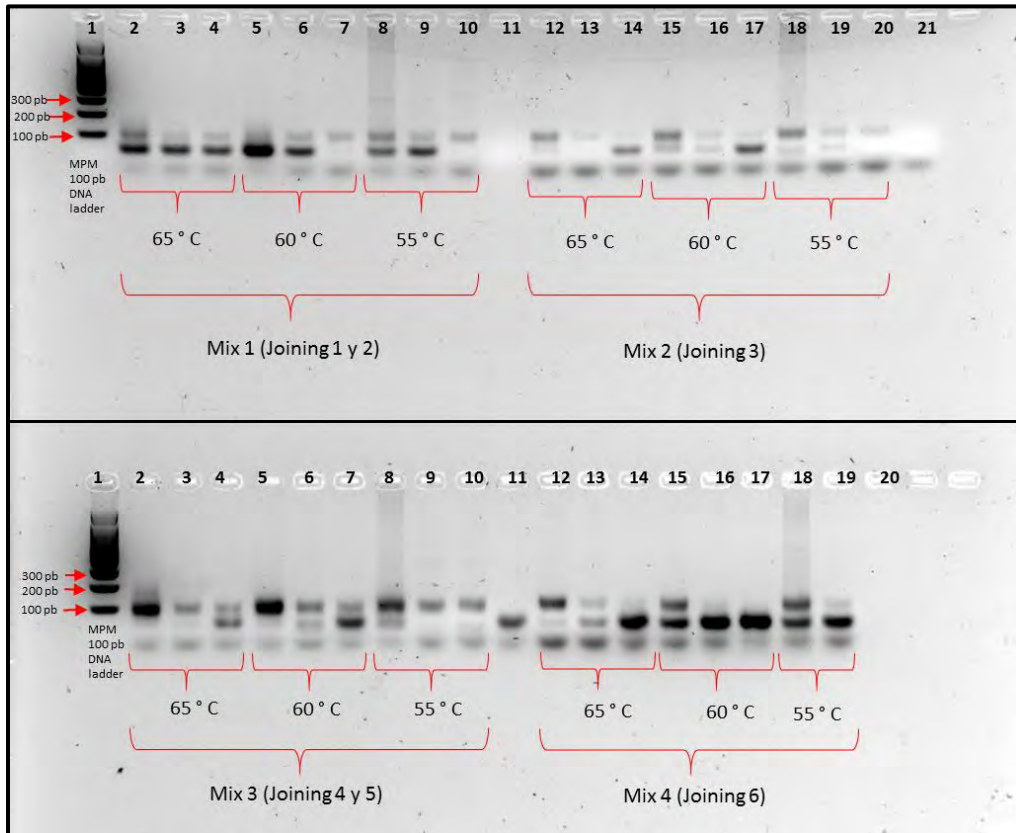
### 7.5. Estandarización de la PCR para la amplificación del fragmento CDR-H3

Dado que la intención de sintetizar el cDNA, es amplificar los fragmentos de DNA de la región CDR-H3, para el uso de estos en la construcción de un scFv. Se requirió comprobar que el cDNA obtenido a partir del mRNA realmente sirviera como templado en la amplificación de la región CDR-H3.

Para ello primero se realizó una estandarización de la PCR empleando un gradiente de temperatura para determinar cuál era la temperatura de *annealing* o hibridación más adecuada para llevar a cabo la amplificación. Las temperaturas evaluadas para la etapa de hibridación fueron 55 °C, 60 °C y 65 °C; así mismo se probaron conjunto a estas temperaturas distintas concentraciones de templado del cDNA, las diluciones de templado empleadas fueron: cDNA dilución 1:10, cDNA dilución 1:5 y



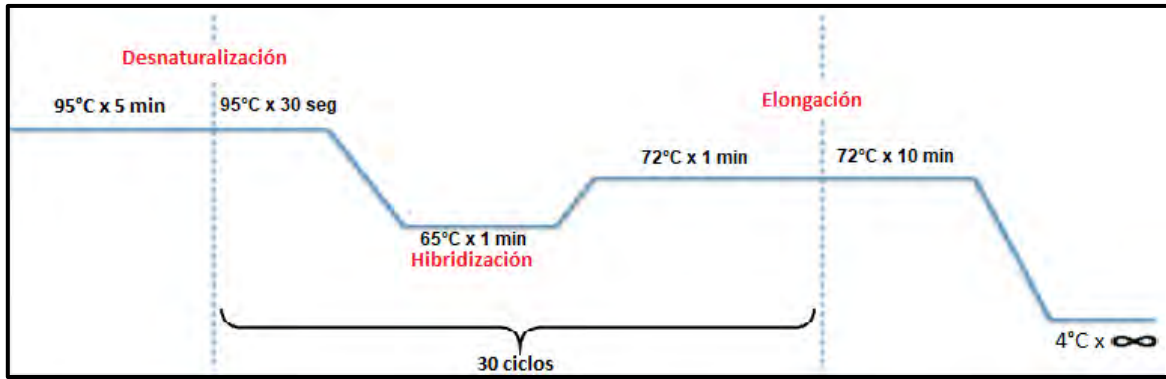
cDNA sin diluir. Estas dos condiciones fueron probadas con cuatro pares de oligos diseñados *in silico*, específicos para evaluar los seis distintos genes IGHJ (joinings) reportados en la literatura para las regiones CDR-H3(10). Una vez llevada a cabo la PCR, se visualizaron las muestras en un gel de agarosa (Ver Figura 10).



**Figura 10. Productos de amplificación mediante PCR.** Corrida electroforética en gel de agarosa al 3%. Sección Superior: Evaluación de tres distintas temperaturas de “annealing”; empleo de dos pares de oligonucleótidos para los joining 1, 2 y 3; Carriles 2, 5, 8, 12, 15 y 18: Templado cDNA sin diluir; Carriles 3, 6, 9, 13, 16 y 19: Templado cDNA dilución 1:5; Carriles 4, 7, 10, 14, 17 y 20: Templado cDNA dilución 1:10. Carriles 11 y 21: Controles negativos. Sección Inferior: Evaluación de tres distintas temperaturas de “annealing”; empleo de dos pares de oligonucleótidos para los Joining 4, 5 y 6; Carriles 2, 5, 8, 12, 15 y 18: Templado cDNA sin diluir; Carriles 3, 6, 9, 13, 16 y 19: Templado cDNA dilución 1:5; Carriles 4, 7, 10, 14 y 17: Templado cDNA dilución 1:10. Carril 11: Control negativo.

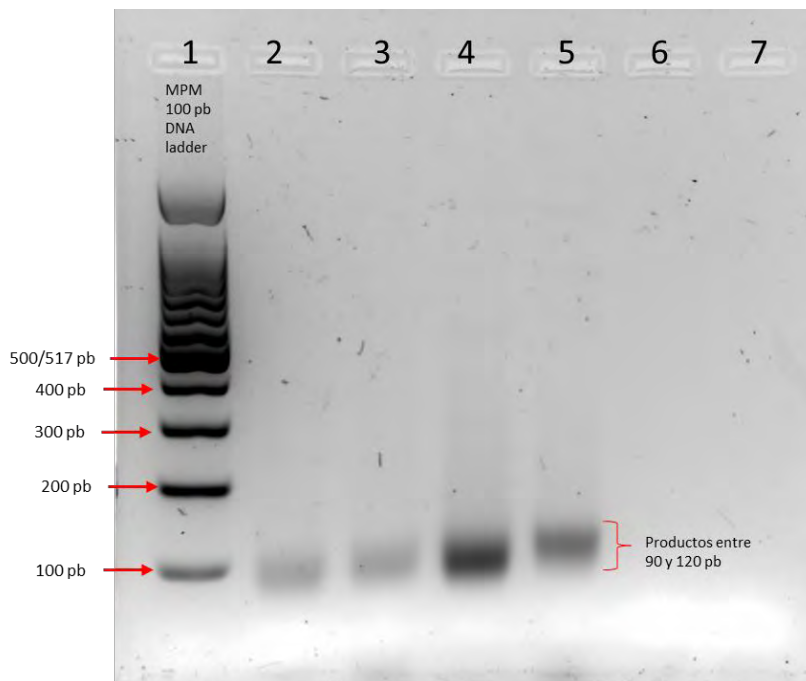
Con los resultados obtenidos se determinó que las condiciones adecuadas de ciclaje eran 65 °C de temperatura de *annealing* (ver figura 11) y emplear el templado de cDNA sin diluir, ya que con estas condiciones se obtenía el producto esperado de entre 90 y 120 pb con o sin ningún producto inespecíficos.





**Figura 11.** Esquema de temperaturas empleadas en el programa del termociclador para la amplificación de los fragmentos de DNA de la región CDR-H3.

Previo a la clonación, con las condiciones ya establecidas de la PCR se realizó nuevamente la amplificación de la región CDR-H3 empleando los 4 pares de oligonucleótidos, diseñados para amplificar esta región junto con sus 6 distintos joinings reportados en la literatura, Posteriormente se cargaron las muestras en un gel electroforético preparativo (ver figura 12) para escindir las bandas amplificadas y purificarlas mediante el Kit *QIAquick Gel Extraction* de *QIAGEN* (Apéndice 5).



**Figura 12.** Gel preparativo para la purificación de los CDR-H3 para su clonación Carril 1: Marcador de Peso Molecular: 100 pb DNA Ladder, Carril 2: Producto PCR Mix 1 (Joining 1 y 2), Carril 3: Producto PCR Mix 2 (Joining 3), Carril 4: Producto PCR Mix 3 (Joining 4 y 5), Carril 5: Producto PCR Mix 4 (Joining 6), Carril 6: Control Negativo (H<sub>2</sub>O). Condiciones de corrida: 90 V x 60 min; gel de agarosa al 2 % (P/V)



Como se mencionó anteriormente la región CDR-H3 es la más hipervariable no solo en su secuencia nucleotídica, sino también en extensión, debido a esta variabilidad se esperan productos de amplificación de distintos tamaños; la obtención de una banda ancha es indicativo de la presencia de productos de PCR de distintos tamaños, con un tamaño aproximado entre las 90 y 120 pares de bases (pb) (ver figura 12)

El DNA purificado se cuantificó por espectrofotometría (relación D.O<sub>260nm/280nm</sub>). Con el DNA purificado se realizó la clonación en el vector pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup>; siguiendo el protocolo descrito en el kit “TOPO TA Cloning pCR 2.1-TOPO Vector”.

## 7.6. Clonación de los productos de PCR

### 7.6.1. Transformación de los productos de clonación en *E coli DH5-α*

Se procedió a transformar las bacterias *E. coli* DH5-α (Ver apéndice 8), se inocularon dos placas petri de agar LB/Ampicilina (50µg/mL)/IPTG/X-Gal, una con 100 µL del producto de clonación y otra con el doble del volumen (200 µL) del mismo producto. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3. Número de clonas obtenidas durante transformación con el vector pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup> que contiene los fragmentos de DNA de CDR-H3.**

Producto de clonación	Placa 100 µL inóculo		Placa 200 µL inóculo		Total de colonias transformantes de interés (colonias blancas)
	# Colonias blancas	# Colonias azules	# Colonias blancas	# Colonias azules	
Mix 1(Joining 1y 2)	7	5	24	9	31
Mix 2(Joining 3)	6	7	10	16	16



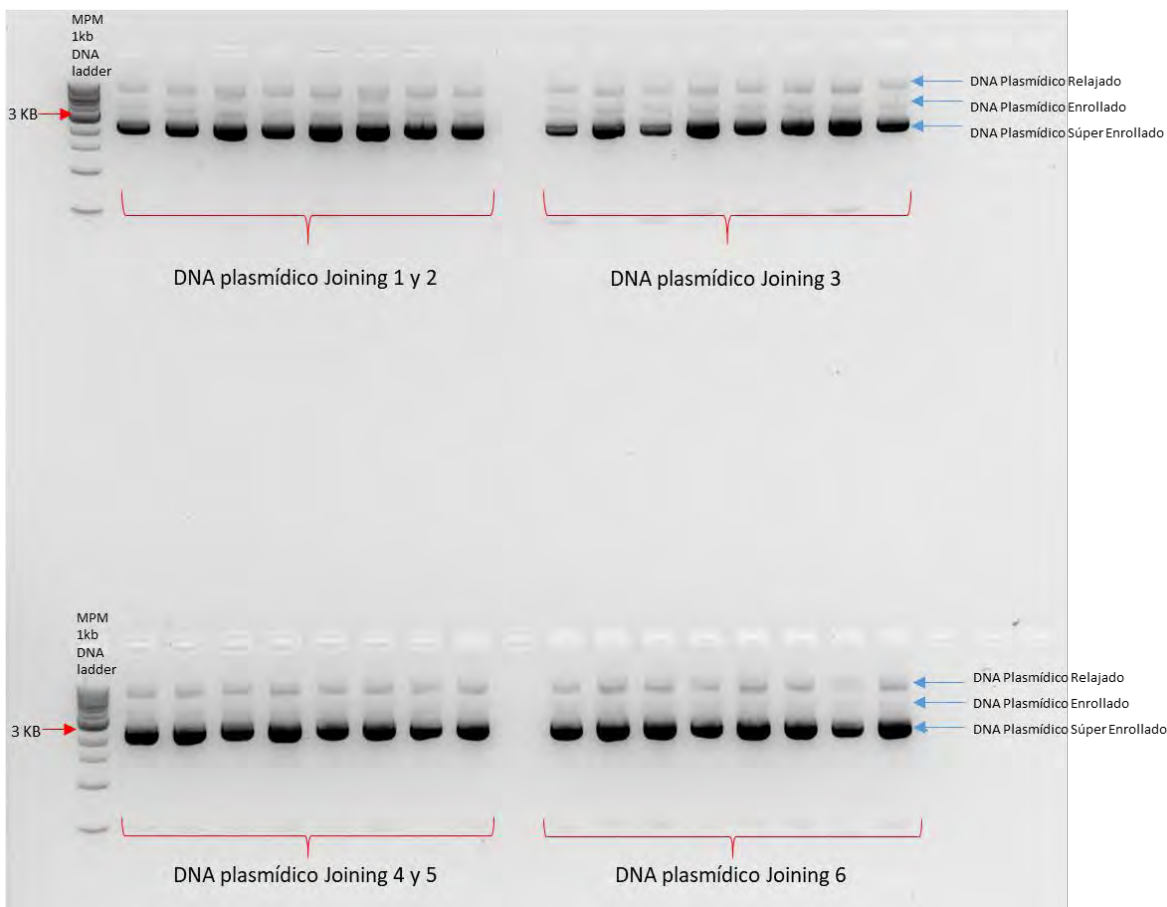
Mix 3 (Joining 4 y 5)	6	5	17	14	23
Mix 4 (Joining 6)	4	1	9	7	13
Background (Vector solo)	0	1	0	4	0
Control positivo TOPO	14	4	24	6	38

Se seleccionaron 8 colonias blancas de cada uno de los mix de los Joinings para proceder con la purificación del DNA plasmídico de cada clona. Las clonas seleccionadas se colocaron en medio LB liquido con Ampicilina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se dejaron crecer una noche a 37 °C con agitación a 225 rpm.

Al día siguiente se procesaron los cultivos de las colonias transformantes para la purificación del DNA plasmídico mediante el Kit QIAprep Spin Miniprep de QIAGEN (Apéndice 9). A los plásmidos obtenidos se les evaluó la concentración mediante relación D.O.  $_{260\text{nm}}/_{280\text{nm}}$  y su integridad mediante un gel de agarosa (ver figura 13).







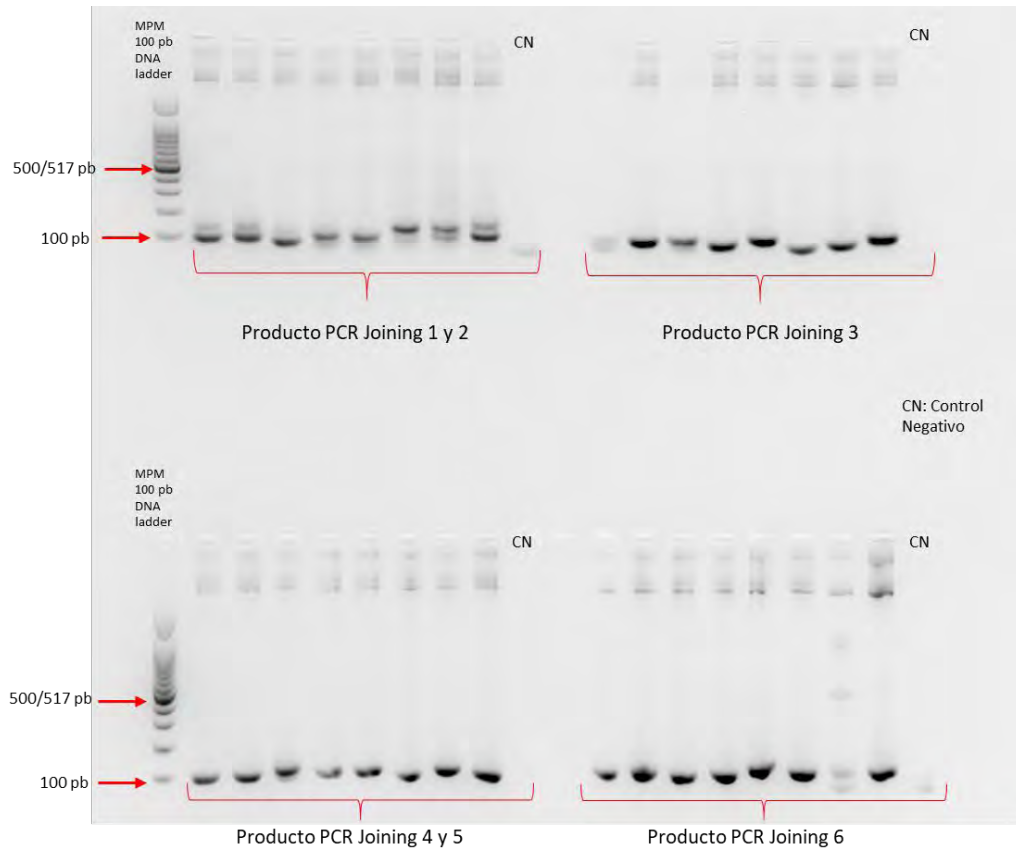
**Figura 13. DNA plasmídico proveniente de las clonas transformantes con el inserto CDR-H3.** Se muestra la corrida electroforética en un gel de agarosa al 1.5% (P/V), de los plásmidos extraídos de las clonas seleccionadas de cada joining respectivo, se muestran las distintas formas topológicas del plásmido. Condiciones de corrida: 90 V x 120 min; en amortiguador TAE 1x.

En la Figura 13 se puede apreciar que el DNA plasmídico de las clonas transformantes presenta distintas topologías, siendo la isoforma “súper enrollada” la más abundante, y la que migra más fácilmente a través del gel de agarosa. Por otro lado, es la isoforma “relajada” la que tarda mayor tiempo en migrar a través del gel debido al tamaño que esta forma presenta, mientras que la isoforma “enrollada” migra entre estas dos.



### 7.6.2. PCR confirmatoria de la clonación

Una vez seleccionadas varias clonas de los diferentes joinings, y aislado su DNA plasmídico, se procedió a realizar un PCR con los oligonucleótidos específicos de cada uno, a manera de confirmar que efectivamente el inserto de los plásmidos contenía la secuencia de CDR-H3, dichos productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa a 2% (P/V) (ver figura 14).



**Figura 14. Productos de amplificación de cada joining empleando como templado el plásmido obtenido.** Se muestra la corrida electroforética en un gel de agarosa al 2% (P/V), de los productos de PCR, amplificados a partir de los plásmidos extraídos de las clonas seleccionadas de cada joining. Condiciones de corrida: 90 V x 95 min; en amortiguador TAE 1x.

Se observó que algunas las clonas evaluadas presentaban insertos de distintos tamaños, esto permitió inferir que las clonas presentaban fragmentos correspondientes a la región CDR-H3 con su respectivo joining. Con la confirmación obtenida con el PCR, se procedió a enviar el DNA plasmídico extraído para su secuenciación y así determinar la identidad de los insertos obtenidos.



## 7.7. Secuenciación de los CDR-H3 obtenidos

Se seleccionaron cinco DNA plasmídicos de cada uno de los joinings para ser enviados a secuenciar a *Wizer Biosciences (Cambridge, MA)*. Los resultados de secuenciación fueron proporcionados en formato FASTA y se analizaron las secuencias empleando diferentes programas bioinformáticos disponibles en línea.

Del total de las clonas enviadas a secuenciar, sólo no se obtuvieron secuencias en cinco clonas; cuatro de ellas debido a una mezcla de DNA, y una debido a que aparentemente no presentaba el inserto de interés.

El primer paso del análisis consistió en la búsqueda de similitud de las secuencias obtenidas comparándolas contra una base de datos para ello se utilizó un BLAST- (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ver tabla 4), este programa informático de alineamiento local de secuencias, ya sea de DNA o de proteínas compara una secuencia problema contra secuencias que se encuentren en una base de datos (como por ejemplo la base de datos *GenBank*) encontrando las secuencias de la base de datos que tienen mayor parecido a la secuencia problema.

**Tabla 4. Resultados de búsqueda de similitud mediante BLAST obtenido de cada secuencia de CDR-H3, comparado con la base de datos de NCBI.**

Joining	Clona	Tamaño del inserto	Identidad con otras secuencias en la Base de Datos de NCBI	% Identidad*
1 y 2	13	95	Homo sapiens clone 6fb43 immunoglobulin mu heavy chain-like mRNA, partial sequence	90
1 y 2	16	105	Homo sapiens IG VH mRNA (clone mAB 63VH)	92
3	22	114	Homo sapiens clone CRV-CD5-3-VH immunoglobulin heavy chain variable region mRNA, partial cds	87
3	24	89	Homo sapiens clone HG1-8 circulating B cell antibody heavy chain variable region mRNA, partial cds	81
3	25	111	Homo sapiens isolate 431_5_fetusliver_pre-BI immunoglobulin heavy chain variable region (IGH) gene, partial cds	83
3	27	86	Homo sapiens isolate RSV24HB immunoglobulin heavy chain variable region mRNA, partial cds	81



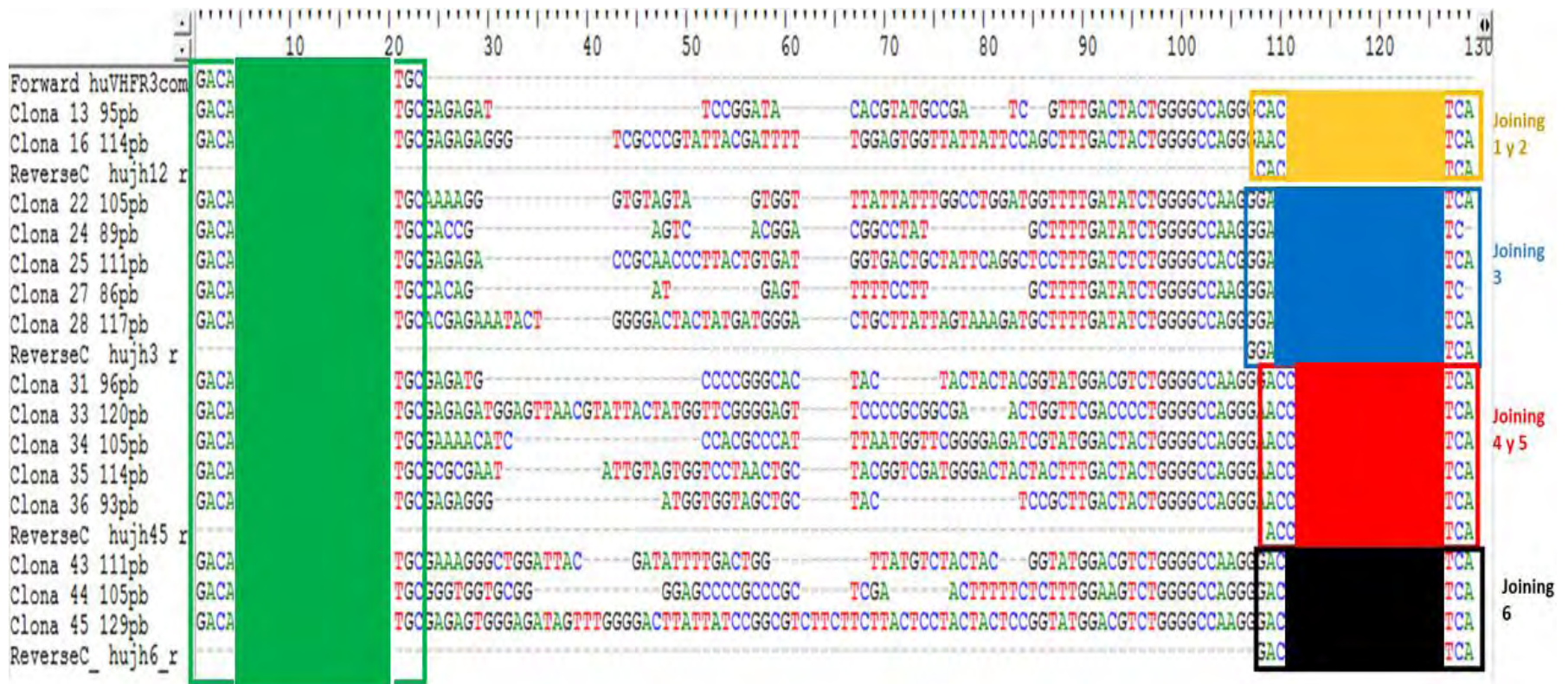
3	28	117	Homo sapiens isolate RAR0617AL immunoglobulin G heavy chain variable region mRNA, partial cds	84
4 y 5	31	96	Homo sapiens isolate 432_47_fetusBM_naive-B immunoglobulin heavy chain variable region (IGH) gene, partial cds	93
4 y 5	33	120	Homo sapiens clone 74A9 immunoglobulin heavy chain variable region mRNA, partial cds	88
4 y 5	34	105	Synthetic construct clone R-64VH immunoglobulin heavy chain variable region	86
4 y 5	35	114	Homo sapiens clone 505322+t7 immunoglobulin mu heavy chain mRNA, partial cds	86
4 y 5	36	93	Homo sapiens clone 1ap58 immunoglobulin mu heavy chain mRNA, partial cds	93
6	43	111	Homo sapiens isolate 431_8_fetusBM_pre-BI immunoglobulin heavy chain variable region (IGH) gene, partial cds	90
6	44	105	Homo sapiens partial IGHV3-23*01 gene for immunoglobulin heavy chain variable region, IGHV3-23*01 allele, clone CE27A21	92
6	45	129	Homo sapiens partial IGHV3-23*01 gene for immunoglobulin heavy chain variable region, IGHV3-23*01 allele, clone DA02B38	84

*\*Nota: solo se reporta el mayor porcentaje de identidad arrojado por la búsqueda.*

La mayoría de las secuencias presentaron un alto porcentaje de identidad (>86%); con las secuencias reportadas en la base de NCBI las cuales codifican para moléculas de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulinas humanas. Este análisis nos indica que efectivamente se generaron fragmentos diferentes de DNA de la región variable de la cadena pesada humana. Posterior a la realización del BLAST con las secuencias se procedió al alineamiento múltiple de estas secuencias empleando el Editor de secuencias BIOEDIT, y empleando el programa CLUSTALW.

El alineamiento múltiple de secuencias (ver figura 15) se realizó siguiendo como punto de partida la dirección 5' – 3' del oligonucleótido sentido. Para que las secuencias de los oligonucleótidos reversos pudieran alinear, se colocaron las secuencias reversas complementarias.





**Figura 15. Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas; alineado con el editor de secuencias BioEdit.** Los cuadros de colores indican bloques de identidad con los oligonucleótidos respectivos. Las secuencias se muestran alineadas de acuerdo al sentido 5' – 3' del Forward huVHFR3com, empleado para la amplificación. Para el caso de los oligonucleótidos reverse estos fueron colocados con sus respectivas secuencias reversa complementarias para poder ser alineadas en una misma cadena con el Forward. Nota: Por cuestiones de confidencialidad de la identidad de los oligonucleótidos se cubrió el contenido de estos mismos, dejando únicamente los extremos visibles para evidenciar el alineamiento de las secuencias.

## **7.8. Generación de Fragmentos de DNA de la región determinante de complementariedad CDR-H3 humana de 200 individuos sanos**

Finalmente, como parte medular del proyecto, las condiciones anteriormente estandarizadas para la generación de fragmentos de DNA de la región CDR-H3 se aplicaron de manera iterativa para la obtención de fragmentos de DNA de doscientos donadores clínicamente sanos. Una vez obtenidas las muestras de doscientas personas se procedió a generar un único pool colocando cantidades equivalentes de cada una de las muestras de CDR-H3 (a partir de ahora llamados; fragmentos naturales H3J's). Del total de este conjunto de fragmentos H3J's se evaluó una pequeña porción mediante secuenciación, para lo cual se realizó nuevamente una clonación en el vector TOPO, seguido de un PCR confirmatorio de clonas transformadas, y por último los plásmidos obtenidos fueron enviados a secuenciar para volver a determinar la identidad y la variabilidad de estos fragmentos.

### **7.8.1. Clonación de fragmentos naturales H3J's en el vector pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup>**

La clonación se realizó tomando una pequeña alícuota del pool de los fragmentos naturales H3Js, y se prosiguió de acuerdo con el apéndice 7 y 8, para la ligación de los productos de amplificación con el vector pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup> y para la Transformación de *E. coli* DH5  $\alpha$ , respectivamente.

La ligación se llevó a cabo empleando dos cantidades diferentes del producto de PCR (Mezcla 1: 1  $\mu$ L de producto de PCR; Mezcla 2: 2  $\mu$ L del producto de PCR), mientras que para el paso de la transformación se inocularon esas dos mezclas en dos placas de agar LB con Ampicilina, IPTG y X-Gal, inoculando de cada mezcla de ligación un volumen de 150  $\mu$ L para la primera placa y un volumen de 300  $\mu$ L para la segunda placa (ver tabla 5).

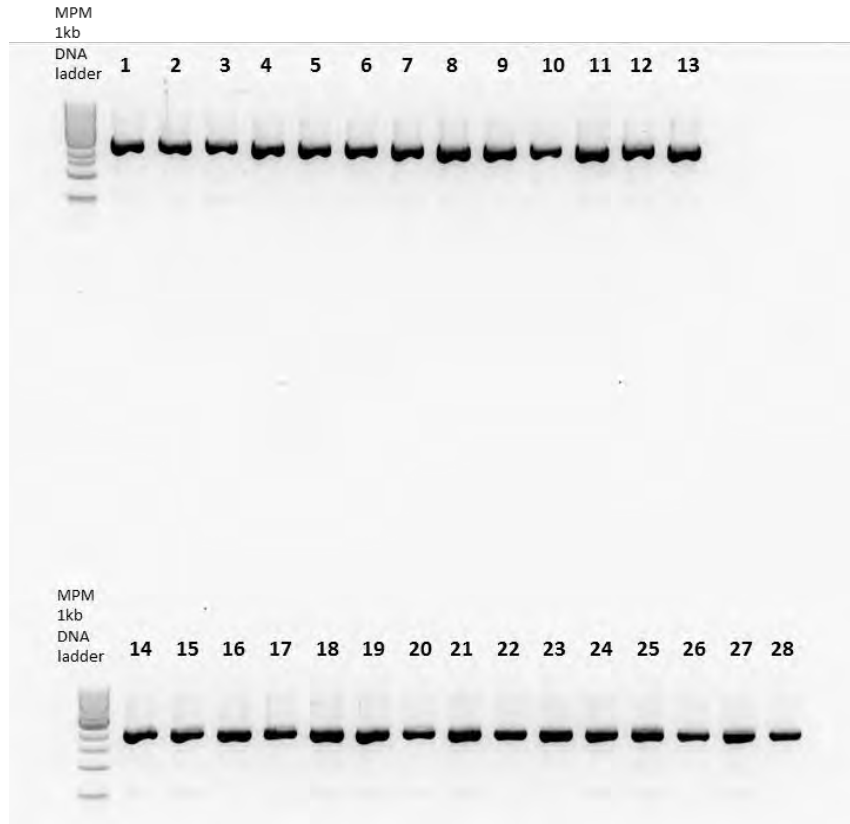


**Tabla 5. Número de clonas obtenidas durante transformación del vector pCR® 2.1 TOPO® clonado con los fragmentos naturales H3J's**

Condición	Placa c/150 µL de mezcla de ligación		Placa c/300 µL de mezcla de ligación	
	Colonias blancas	Colonias azules	Colonias blancas	Colonias azules
Mezcla 1 (1 µL)	46	16	228	64
Mezcla 2 (2 µL)	59	17	180	51
Vector pCR® 2.1 TOPO®	0	8	4	22
Control positivo + vector pCR® 2.1 TOPO®	56	19	82	28

En esta ocasión se seleccionaron 28 colonias blancas, estas colonias se crecieron en 5 mL de medio LB suplementado con ampicilina (50 µg/mL), y se dejaron incubando a 37 °C a 225 rpm durante aproximadamente 14 h. Al día siguiente se procedió a extraer el DNA plasmídico de acuerdo con el apéndice 9, una vez obtenido el DNA plasmídico se procedió a cuantificar cada muestra mediante espectrofotometría (relación 260<sub>nm</sub>/280<sub>nm</sub>). Adicional a la cuantificación se realizó un análisis en un gel de agarosa al 1% en donde se corrieron las muestras para determinar la integridad del DNA plasmídico (ver Figura 16).





**Figura 16. DNA plasmídico proveniente de las 30 clonas transformantes de los fragmentos H3J.** Marcador de peso molecular (MPM) DNA Ladder 1 Kb; Gel de agarosa al 1% (P/V); Carril 1-28: Se visualiza el DNA plasmídico integro en todas las clonas aisladas; Condiciones de corrida: 100 V x 30 min.

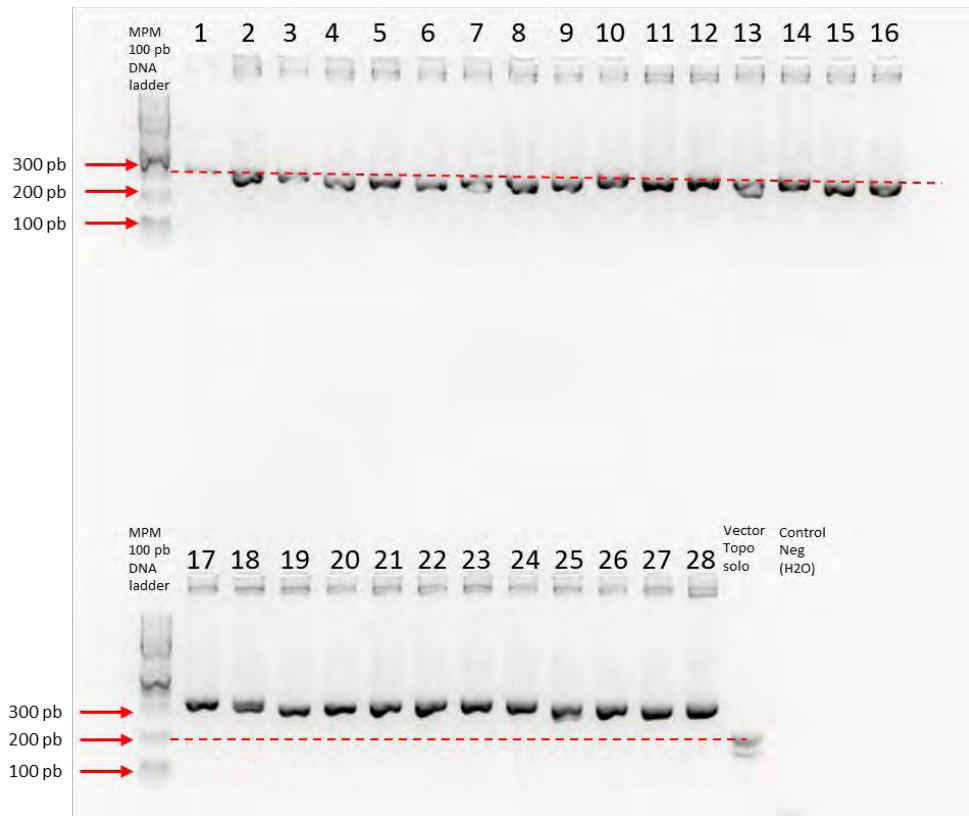
### 7.8.2. Amplificación por PCR de fragmentos naturales H3J's con los oligonucleótidos M13 del vector pCR® 2.1 TOPO®

Con la finalidad de determinar que las clonas transformadas H3Js con el vector pCR® 2.1 TOPO® contenían insertos de 90 – 120 pb; correspondientes a la región CDR-H3, se procedió a realizar una amplificación por PCR del DNA plasmídico empleando los oligonucleótidos M13 proveniente del Kit TOPO™ TA Cloning™ de Invitrogen. De acuerdo con los sitios de reconocimiento de los oligonucleótidos M13 del vector TOPO, el producto de amplificación sin el vector inserto tendría un tamaño aproximado de 200 pb, mientras que los amplificados con inserto presentarían tamaños entre 290-320 pb aproximadamente.





El programa de temperaturas a ingresar al termociclador fue el que se indica en el Kit TOPO™ TA Cloning™ para la amplificación con los oligonucleótidos M13.



**Figura 17.** Productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos M13 del vector pCR® 2.1 TOPO®. Gel de agarosa al 3% (P/V); MPM: 100 pb DNA ladder; Condiciones de corrida: 100 V x 60 min.

En el gel se muestran los amplificadores de los insertos junto con el vector TOPO (Ver Figura 17), para tener diferentes formas de visualizar las muestras e identificar que efectivamente contenían el inserto. Las muestras 1 – 16 únicamente se compararon con el marcador de peso molecular de 100 pb, el cual al momento de alinearse con las muestras indica que estas tienen un peso de ~300 pb. Por otro lado las muestras 17 – 28 se compararon con el amplificado del Vector TOPO sin inserto, el cual indica que tiene un peso de 200 pb, lo que es ~100 pb menor que el peso de las muestras de ~300 pb. Ambas visualizaciones muestran que todos los productos de amplificación con los oligonucleótidos M13 tienen un peso molecular de ~300 pb, el cual sería el peso del vector TOPO (200 pb) junto con el inserto H3Js (~100 pb); Confirmando finalmente que las clonas obtenidas contienen el inserto H3Js.



### 7.8.3. Secuenciación de los fragmentos naturales H3J's amplificados con los oligonucleótidos M13 del vector pCR® 2.1 TOPO®

De las 28 clonas obtenidas, sólo se seleccionaron 20 para enviar a secuenciar con los oligonucleótidos M13. Las clonas fueron enviadas a *Wyzer Biosciences* para su secuenciación por el método de Sanger automatizado.

Sin embargo, dos de las 20 muestras estaban contaminadas con una mezcla de clonas, por ello únicamente se obtuvieron 18 secuencias. En la tabla 12 se presentan los resultados de la búsqueda de similitud de las secuencias obtenidas con respecto a las reportadas en las bases de datos de NCBI.

**Tabla 6. Identidad entre las secuencias amplificadas y las reportadas. Análisis se realizado mediante un BLAST a partir de las secuencias de los fragmentos naturales H3J contra la base de datos de NCBI.**

Clona	Identidad con secuencia en la Base de Datos de NCBI	% Identidad*
2-001	Homo sapiens isolate K66 AF3 non-allergic immunoglobulin epsilon heavy chain variable region mRNA, partial cds	89
6-001	Homo sapiens clone 2d479 immunoglobulin mu heavy chain mRNA, partial cds	91
7-001	Homo sapiens isolate P3_Ass_3.2.6 immunoglobulin variable region mRNA, partial cds	89
8-001	Homo sapiens clone eg59a31 immunoglobulin heavy chain variable region mRNA, partial cds	94
9-001	Homo sapiens isolate 13905_33_childBM_naive-B immunoglobulin heavy chain variable region (IGH) gene, partial cds	89
10-001	Homo sapiens clone pCmpD4 immunoglobulin mu heavy chain mRNA, partial cds	90
11-001	Homo sapiens mRNA for immunoglobulin M (IgM), partial cds (VH3-N-D-N-JH6)	91
13-001	Homo sapiens partial IGHV3-23*01 gene for immunoglobulin heavy chain variable region, IGHV3-23*01 allele, clone CD05A08	92
14-001	Homo sapiens clone 48u-22 immunoglobulin heavy chain variable region (IGH) mRNA, partial cds	90
15-001	Homo sapiens clone 50550+t7 immunoglobulin mu heavy chain mRNA, partial cds	94

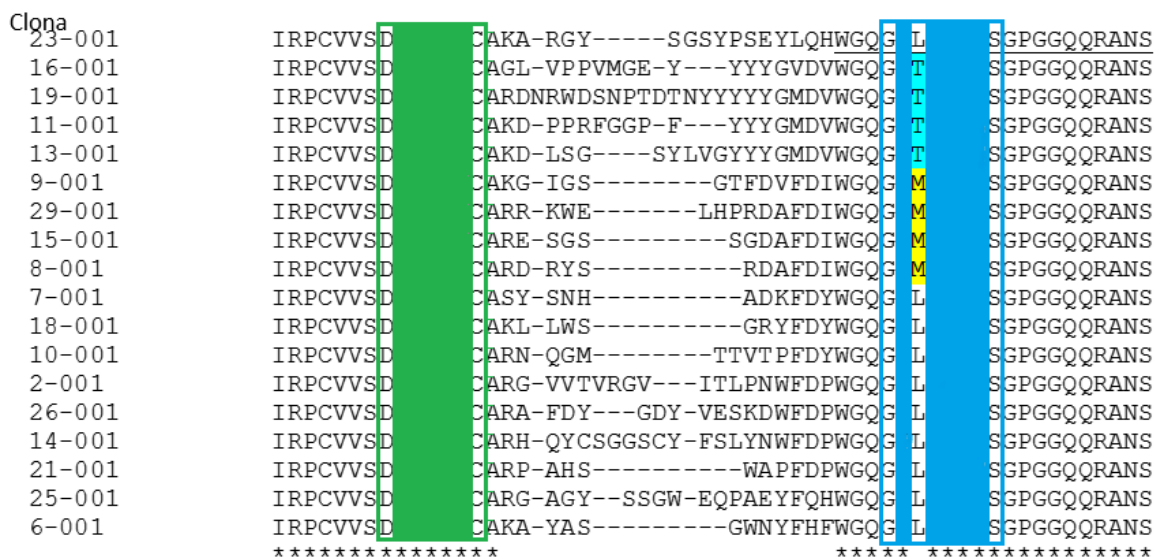


16-001	Homo sapiens partial IGHV3-23*01 gene for immunoglobulin heavy chain variable region, IGHV3-23*01 allele, clone CM03A29	86
18-001	Homo sapiens partial IGHV3-23*01 gene for immunoglobulin heavy chain variable region, IGHV3-23*01 allele, clone BJ09A48	90
19-001	Homo sapiens clone F5P4F8 immunoglobulin heavy chain variable region mRNA, partial cds	87
21-001	Homo sapiens isolate Ila06015g immunoglobulin G heavy chain variable region mRNA, partial cds	88
23-001	Homo sapiens clone pCmpC3 immunoglobulin mu heavy chain mRNA, partial cds	87
25-001	Homo sapiens clone eg59a24 immunoglobulin heavy chain variable region mRNA, partial cds	89
26-001	Homo sapiens clone KV110 immunoglobulin heavy chain variable region gene, partial sequence	88
29-001	Homo sapiens partial mRNA for vaccinia virus specific immunoglobulin heavy chain variable region (IGHV gene), clone 27H	90

*\*Nota: solo se reporta el mayor porcentaje de identidad arrojado por la búsqueda.*

El BLAST de las secuencias de los fragmentos de DNA (ver tabla 6) enviados a secuenciar determinó que efectivamente cada una de las secuencias nuevamente presentaba un alto porcentaje de identidad con secuencias pertenecientes a la cadena pesada de distintas inmunoglobulinas, reportadas en la base de datos de NCBI. Por último se empleó la herramienta Translate de ExpASy (78) para traducir la secuencia nucleotídica de cada clona a su secuencia aminoacídica, y posteriormente con estas secuencias se realizó un alineamiento múltiple con el programa CLUSTALW.





**Figura 18. Alineamiento múltiple de secuencias proteicas; alineado con el programa CLUSTALW.** Los cuadros de colores indican bloques de identidad con las secuencias proteicas de los oligonucleótidos respectivos. La alineación se muestra de acuerdo con el marco de referencia 5' – 3' del Forward huVHFR3com, empleado para la amplificación. La única alineación de aminoácidos mostrada en la región del reverse, corresponde a los aminoácidos firma de cada joining. Nota: Por cuestiones de confidencialidad de la identidad de los oligonucleótidos, se cubrió el contenido de estos, dejando únicamente los extremos visibles para evidenciar el alineamiento de las secuencias.

En la figura 18 se observa la diversidad en longitud y secuencia de los 18 fragmentos naturales H3Js; adicionalmente se observan las secuencias aminoacídicas firma específicas de los oligonucleótidos reversos. Las secuencias aminoacídicas firma permitió un análisis de la frecuencia con la que se repetían los joining (ver tabla 7).

**Tabla 7.** Frecuencia de cada Joining para las 18 secuencias aminoacídicas obtenidas a partir de los aminoácidos firma

Joining	Aminoácido Firma asociado	Frecuencia en las 18 secuencias analizadas
Joining 1, 2, 4, 5	L	55.55%
Joining 3	M	22.22 %
Joining 6	T	22.22%



## 8. Discusión

Las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR), son secuencias aminoacídicas que se encuentran relacionadas con la capacidad de reconocimiento de los anticuerpos hacia distintos antígenos. Específicamente, se ha determinado que la tercera región de determinante de complementariedad de la cadena pesada es la que aporta la mayor variabilidad entre el resto de las regiones (14, 79).

Las células responsables de la producción de anticuerpos son los linfocitos B, por lo que la obtención de estas células a partir de PBMNC's fue esencial para el desarrollo de este trabajo experimental. Por lo anterior, fue de suma importancia estandarizar la metodología que nos permitiera obtener las cantidades de sangre periférica necesaria para la adquisición de un número establecido de células mononucleares, esta primera etapa de estandarización tuvo la intención de obtener cantidades similares de material celular a partir de cada muestra de sangre (ver Tabla 1).

A partir de los PBMNC's obtenidos se obtuvo el RNA total, el cual fue evaluado individualmente para determinar la calidad e integridad del mismo. Sin embargo, debido que el RNA es una molécula que se degrada ante la presencia de RNAsas (ver figura 7), fue preciso trabajar bajo rigurosas condiciones de limpieza para evitar su degradación, lo cual represento un punto crítico durante el desarrollo del presente trabajo.

Por otra parte, a pesar de que siempre se colectaron 2 mL de sangre de cada donador para aislar las células mononucleares, esto no siempre permitía obtener la misma cantidad de células, por lo que al aislar el material genético, este presentaba variaciones, tal y como se observa en las diferentes intensidades de banda del RNA total aislado (ver figura 7 y 8). Debido a estas variaciones, durante la etapa de aislamiento del RNA mensajero se realizaron mezclas de RNA total, agregando cantidades equivalentes de cada muestra a la mezcla, lo anterior con la finalidad tener cantidades iguales de RNA de cada individuo. Lo anterior evitó favorecer las secuencias de un único individuo y permitió la amplificación de las regiones CDR-



H3 de todos los individuos por igual y de esta manera evitar un sesgo en la población de los CDR-H3.

La estrategia desarrollada en el presente trabajo para la generación de fragmentos de DNA de la región de complementariedad CDR-H3, fue muy similar a la empleada por otros grupos de investigación. Esto ha permitido realizar estudios bastante amplios sobre esta región y descubrir más acerca de su papel en la generación de la variabilidad del repertorio de las inmunoglobulinas (20), y ha derivado en su empleo en la construcción de distintas plataformas de descubrimiento de nuevos anticuerpos (44, 80). Las diferencias más relevantes entre el presente trabajo y las realizadas por otros autores radica en el origen de las células mononucleares, las cuales pueden provenir de distintas partes del organismo o inclusive de distintas especies de animales(81), lo anterior atiende al interés de la investigación. Existen reportes donde, la obtención del material celular puede provenir incluso de especies que han sido previamente inmunizadas con un antígeno particular (80, 81).

Previo a la amplificación de los fragmentos CDR-H3, se estandarizaron las condiciones para llevar a cabo la PCR, estas se visualizan en la figura 11. Las variables de temperatura de hibridación y templado fueron lo suficientemente estrictas para generar pocos o ningún producto inespecífico y obtener el producto de amplificación esperado el cual tiene un tamaño aproximado de entre 90 y 120 pb, correspondientes a los tamaños reportados para esta región (13, 16).

Para confirmar la identidad de la regiones de interés, se realizó un clonamiento de los fragmentos amplificados, en el vector pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup> y la transformación en *Escherichia coli* DH5- $\alpha$ , para posteriormente enviar a secuenciar los plásmidos de las clonas transformantes obtenidas. El BLAST realizado a partir de cada una de las secuencias y comparado con la base de datos de *GenBank* (ver tabla 4), arrojó que la mayoría de las muestras enviadas a secuenciar presentaban un alto porcentaje de identidad al ser comparadas con secuencias reportadas en el *GenBank* asociadas a moléculas de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulinas humanas.



Posteriormente un análisis múltiple de secuencias de los CDR-H3 arrojó que las secuencias nucleotídicas eran diferentes y que también presentaban diferentes tamaños en un rango de entre 86 pb y 129 pb. El análisis de identidad de cada una de las secuencias, así como las diferencias entre la longitud y la diversidad entre cada clona determinó que efectivamente se amplificaron fragmentos de DNA de región del CDR-H3 con una gran diversidad. Lo anterior, permitió continuar con la implementación del procedimiento estandarizado para la generación de fragmentos de DNA de la región CDR-H3 de doscientos donadores (H3J naturales) con la finalidad de generar un repertorio extenso de CDR-H3 de origen humano y proporcionar una fuente de diversidad natural para la construcción de una biblioteca semi-sintética de scFv.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas de los H3J naturales fue traducida a secuencias de aminoácidos a partir de las cuales se realizó un alineamiento múltiple empleando el programa CLUSTALW (ver figura 18), esto permitió observar que las secuencias presentaban una amplia diversidad en cuestión de longitud y secuencia.

Finalmente, a partir de las secuencias aminoacídicas firma de los joinings se pudo identificar la frecuencia con la cual cada joining se expresa (ver tabla 7), esta frecuencia fue similar a lo reportado para los joining 1,2,4,5, sin embargo para los joining 3 y joining 6 esta frecuencia es diferente a lo esperado(20). De acuerdo a la frecuencia obtenida y la frecuencia esperada, el joining 3 se favorece sobre el joining 6 (20, 82), esta diferencia pudiese ser debida al número limitado de muestras analizadas, a la población de individuos empleada para el análisis o inclusive a un sesgo durante la amplificación. A pesar de esta diferencia en las frecuencias de los joinings se determinó que los fragmentos H3J naturales obtenidos presentaban la calidad adecuada para su empleo en la siguiente etapa de la construcción de la librería semi-sintética de scFv's.



## 9. Conclusiones

- Para la obtención de fragmentos de DNA de la región CDR-H3 dirigidos a la construcción de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv), tanto la calidad del DNA, así como la identidad del fragmento a insertar es crucial para su posterior aplicación. Es por esto que durante el presente trabajo se implementaron múltiples controles para conseguir ambas características.
- A partir de la presente metodología descrita, es posible generar fragmentos de DNA desde una única muestra de PBMNC's hasta un gran número de muestras, esto sin disminuir en la calidad e identidad de los fragmentos de DNA obtenidos.
- Se obtuvieron fragmentos de DNA de la tercera región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR-H3) de doscientos individuos sanos, y así mismo la muestra obtenida a partir del conjunto de estos fragmentos presentó una amplia diversidad en tamaño y secuencia.





## 10. Perspectivas

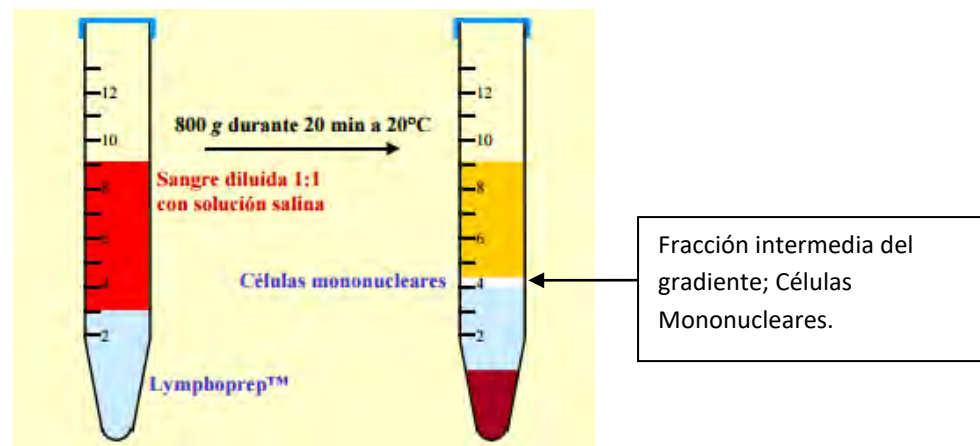
A partir de los resultados mostrados en el presente trabajo, los fragmentos de DNA de la región CDR-H3 obtenidos de doscientos donadores clínicamente sanos se emplearan, como fuente de diversidad natural en la construcción de una biblioteca semi-sintética de scFv, la cual será empleada como plataforma para el descubrimiento y generación de nuevos anticuerpos con fines terapéuticos.



## 11. Apéndices

### Apéndice 1. Obtención de células monocitarias de sangre periférica

1. Tomar aproximadamente 2 mL de sangre y diluir la muestra 1:2 con PBS 1X.
2. Realizar un gradiente de separación con Lymphoprep.  
Colocar 2 mL de Lymphoprep en un tubo, posteriormente agregar lentamente por las paredes del tubo los 4 mL de Sangre diluida (1:2 con PBS 1X)



**Ilustración 1.** Ejemplo ilustrado de la técnica de separación por gradiente de densidad por el método de Lymphoprep. Tubo izquierda: Sangre diluida con solución de Lymphoprep; Tubo derecha: Muestra posterior a la centrifugación, se indica donde se quedan las células mononucleares, suero, eritrocitos. Tomado del inserto de Lymphoprep™, Alere Technologies AS

3. Centrifugar durante 30 min a 800 x g a 20 °C en un rotor oscilante con aceleración mínima y desaceleración mínima para evitar la mezcla de las fracciones.
4. Recuperar la fracción de células intermedia del gradiente en un tubo nuevo.
5. A la fracción de células recuperadas, añadir 5 mL de PBS 1X y centrifugar a 200 g durante 10 min.



6. Decantar el sobrenadante y resuspender el botón celular con 5 mL de PBS 1X frío; se centrifuga 200 g durante 5 min.
7. Decantar el sobrenadante y resuspender el botón celular con 250  $\mu$ L de PBS 1X.

## **Apéndice 2 Aislamiento de RNA total de células en suspensión por el método de TRIzol Reagent**

### Lisis celular

1. Centrifugar las células y descartar el sobrenadante.
2. Adicionar 0.75 mL de TRIzol Reagent por 0.25 mL de muestra de PBMNC's
3. Homogenizar el lisado
4. Incubar por 5 min para permitir la completa disociación del complejo nucleoproteico.
5. Adicionar 0.2 mL de cloroformo por cada 1 mL de TRIzol Reagent usado para la lisis
6. Incubar por 2-3 min.
7. Centrifugar la muestra por 15 min a 12,000 x g a 4°C.
8. Transferir únicamente la fase acuosa que contiene el RNA a un nuevo tubo.

### Aislamiento RNA

1. Precipitación del RNA
  - 1.1. Adicionar 0.5 mL de isopropanol a la fase acuosa.
  - 1.2. Incubar 10 min
  - 1.3. Centrifugar por 10 min a 12,000 x g a 4°C. El RNA total precipita en forma de un granulo blanco (pellet) similar a un gel en el fondo del tubo.
  - 1.4. Descartar el SN con una micropipeta.
  
2. Lavado del RNA
  - 2.1. Resuspender el botón en 1 mL de etanol 75%



- 2.2. Agitar brevemente la muestra en el vortex, después centrifugar por 5 min a 7,500 x g a 4°C.
- 2.3. Descartar el sobrenadante con una micropipeta.
- 2.4. Secar al aire el pellet de RNA por 5-10 min.
- 2.5. Resuspender el pellet de RNA con 50 µL de agua estéril Tipo 1

**Apéndice 3. Aislamiento de RNA mensajero a partir de las muestras de RNA total empleando el kit *Poly A Spin™ mRNA Isolation*, de *New England Biolabs***

1. Adicionar 50 µL de NaCl 5M por cada 450 µL de solución de RNA total.
2. Calentar a 65°C por 5 min y rápidamente enfriar en baño de hielo por 3 min.
3. Aplicar la solución de RNA total a las perlas de celulosa-oligo(dT)<sub>25</sub> equilibradas, sellar la tapa y mezclar.
4. Centrifugar 13,000 x g por 10 segundos.
5. Pipetear el sobrenadante en el tubo de microcentrifuga original. Repetir del paso 2 al paso 4.
6. Pipetear de nuevo el sobrenadante en el tubo de microcentrifuga original para almacenar.
7. Adicionar 400 µL de amortiguador de lavado a las perlas de celulosa-Oligo (dT)<sub>25</sub>. Agitar manualmente para resuspender las perlas de celulosa.
8. Transferir el amortiguador de lavado y las perlas de celulosa-Oligo (dT)<sub>25</sub> a la columna.
9. Mantener a temperatura ambiente por 2 min agitando manualmente. Centrifugar por 10 segundos. Descartar el eluido.
10. Adicionar nuevamente 400 µL de amortiguador de lavado a la columna, agitar manualmente 2 min, centrifugar por 10 segundos a 13,000 x g; repetir este paso tres veces.
11. Usando el mismo método del paso 10, lavar la columna una vez con 400 µL of amortiguador de baja salinidad.
12. Remover la columna y colocar en un tubo de microcentrifuga limpio.



13. Adiciona 200  $\mu\text{L}$  de amortiguador de elución precalentado a la columna.  
Agitar por 2 min. Centrifugar por 10 segundos a 13,000 x g.
14. Repetir el paso 12 utilizando nuevo amortiguador de elución precalentado
15. Colocar el eluido en hielo.
16. Para la precipitación del mRNA agregar al eluido (400  $\mu\text{L}$ ) 44  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3M, luego 20  $\mu\text{L}$  de glicógeno y 1 mL de etanol al 95%.
17. Incubar a  $-20^{\circ}\text{C}$  por al menos 30 min.
18. Para la recuperación del mRNA centrifugar a 12,000 x g por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , cuidadosamente decantar el sobrenadante
19. Lavar el pellet de mRNA con etanol al 70%. Centrifugar 7,500 x g por 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y decantar el sobrenadante con una micropipeta.
20. Se deja secar el pellet de mRNA invirtiendo el tubo por 10 min.
21. Resuspender el mRNA en 20  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNAsas, e incubar a  $55^{\circ}\text{C}$  por 10 min.

**Apéndice 4. Síntesis de cDNA por Transcripción Reversa empleando el kit *ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis* de New England Biolabs**

1. Descongelar los componentes del kit *ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis* en hielo y mezclar por inversión repetidas veces.
2. Mezclar la muestra de RNA y el Random Primer en un tubo de microcentrífuga libre de RNAsas, de acuerdo a la siguiente tabla.

Componente	Volumen
RNA templado (mRNA)	1-6 $\mu\text{L}$ (hasta 1 $\mu\text{g}$ )
Random Primers	2 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	Cbp 8 $\mu\text{L}$

3. Desnaturalizar la muestra de RNA y Random Primers por 5 min a  $65^{\circ}\text{C}$ . Centrifugar brevemente y poner inmediatamente en hielo.



4. Adicionar los siguientes componentes.

Componente	Volumen
ProtoScript II Reaction Mix (2X)	10 $\mu$ L
ProtoScript II Enzyme Mix (10X)	2 $\mu$ L

5. Incubar la muestra a 25°C por 5 min, posteriormente incubar los 20  $\mu$ L de la reacci3n de s3ntesis de cDNA a 42°C por una hora.
6. Inactivar las enzimas a 80°C por 5 min. El producto de cDNA deber3 guardarse a -20°C.
7. Correr el cDNA en un gel de agarosa al 2% para verificar la correcta s3ntesis del mismo.

Para tener un control negativo de la reacci3n (no -RT), se deber3 mezclar los siguientes componentes e incubar a 42°C por una hora.

Componente	Volumen
Templado de RNA	Hasta un 1 $\mu$ g
Random Primer	2 $\mu$ L
ProtoScript II Reaction Mix (2X)	10 $\mu$ L
H2O libre de nucleasas	Cbp 20 $\mu$ L



## **Apéndice 5. Purificación a partir del gel empleando el Kit *QIAquick Gel Extraction***

1. Escindir las bandas a purificar a partir del gel de agarosa, pesar cada pedazo de agarosa escindido.
2. Agregar 600  $\mu\text{L}$  de amortiguador QG por cada 100 mg de peso de la banda.
3. Incubar las muestras a 50°C por 10 min, hasta disolver el gel.
4. Adicionar 100  $\mu\text{L}$  de isopropanol por cada 100 mg de gel.
5. Colocar la muestra en la columna QIAquick, centrifugar 10,000 g x 1 minuto.  
Descartar el eluido
6. Lavar la columna con 750  $\mu\text{L}$  de amortiguador PE, centrifugar 10,000 g x 1 minuto
7. Repetir un paso de centrifugación para eliminar el amortiguador PE residual
8. Colocar la columna en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL
9. Eluir el DNA con 50  $\mu\text{L}$  de agua Tipo 1 estéril
10. Cuantificar el DNA mediante espectrofotometría (Relación 260<sub>nm</sub>/280<sub>nm</sub>)

## **Apéndice 6. Preparación de *E. coli* DH5 $\alpha$ químicamente competentes**

1. Tomar una colonia aislada de una placa de agar LB que previamente fue inoculada con la cepa de *E. coli* DH5  $\alpha$ . Inocular dicha colonia aislada en 50 mL de medio LB durante 4 horas a 37°C a 150 rpm.
2. Transferir el cultivo a un tubo estéril frío, enfriar el cultivo en hielo por 10 min
3. Centrifugar el tubo a 2,700 x g por 10 min a 4°C
4. Decantar el sobrenadante.
5. Resuspender el pellet bacteriano en 15 ml de una solución de MgCl<sub>2</sub>-CaCl<sub>2</sub> fría.
6. Centrifugar el tubo a 2,700 x g por 10 min a 4°C
7. Descartar el sobrenadante



8. Resuspender el pellet con 1 mL de una solución de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M fría
9. Generar alícuotas de las bacterias *E. coli* DH5 α competentes y almacenar a -70°C hasta su posterior uso en la transformación.

### **Apéndice 7. Ligación de productos de PCR con el vector pCR® 2.1 TOPO® 3.9 Kb**

1. En un tubo de 1.5 mL estéril colocar 1 µL de la solución de la solución de sal
2. Colocar 1 µL del vector pCR® 2.1 TOPO® 3.9 Kb
3. Adicionar 4 µL del producto de PCR a la mezcla
4. Incubar a 22°C por 5 min

### **Apéndice 8. Transformación de *E. coli* DH5 α químicamente competentes.**

1. Descongelar un vial de *E. coli* DH5 α en hielo.
2. Adicionar la mezcla de ligación que contiene el vector a insertar
3. Incubar en hielo 30 min.
4. Realizar un choque térmico a 42°C x 90 segundos, colocar inmediatamente en hielo
5. Adicionar 200 µL de medio LB estéril.
6. Incubar a 37°C por 30 min.
7. Inocular en placas de agar LB con Ampicilina, IPTG 1mM y X-Gal.
8. Incubar las placas a 37°C durante aproximadamente 12 – 14 h.

### **Apéndice 9. Aislamiento de DNA plasmídico de las colonias transformantes de acuerdo al Kit QIAprep Spin Miniprep de QIAGEN.**





1. Inocular la colonia transformante de la cual se pretenda aislar el DNA plasmídico en 5 mL de medio LB con ampicilina (50 µg/mL), se deja crecer hasta el día siguiente.
2. Centrifugar los 5 mL de cultivo bacteriano a 6800 x g por 3 min
3. Descartar el sobrenadante.
4. Resuspender el pellet con 250 µL de la solución de lisis P1.
5. Transferir la suspensión a un tubo de microcentrifuga de 1.5mL.
6. Adicionar 250 µL de la solución de lisis P2, mezclar.
7. Adicionar 350 µL de la solución de neutralización N3, mezclar.
8. Centrifugar a 13,000 rpm por 10 min.
9. Transferir el sobrenadante a la columna QIAprep 2.0.
10. Centrifugar a 13,000 rpm por 60 segundos.
11. Lavar la columna con 750 µL del amortiguador de lavado, centrifugar y descartar el eluido.
12. Centrifugar de nuevamente a 13,000 rpm por 60 segundos para eliminar los residuos del amortiguador de lavado.
13. Colocar la columna en un tubo de microcentrifuga nuevo
14. Adicionar 50 µL de agua Tipo 1 estéril a la columna, incubar 5 min.
15. Centrifugar a 13,000 rpm por 60 segundos.
16. Cuantificar el DNA plasmídico obtenido mediante espectrofotometría (relación 260<sub>nm</sub>/280<sub>nm</sub>).



## 12. Referencias

1. Winau F, Winau R. Emil von Behring and serum therapy. *Microbes Infect.* 2002;4(2):185-8.
2. Winau F, Westphal O, Winau R. Paul Ehrlich--in search of the magic bullet. *Microbes Infect.* 2004;6(8):786-9.
3. Schwartz-Albiez R, Monteiro RC, Rodriguez M, Binder CJ, Shoenfeld Y. Natural antibodies, intravenous immunoglobulin and their role in autoimmunity, cancer and inflammation. *Clin Exp Immunol.* 2009;158 Suppl 1:43-50.
4. Edelman GM, Benacerraf B, Ovary Z, Poulik MD. Structural differences among antibodies of different specificities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1961;47:1751-8.
5. Ribatti D. Edelman's view on the discovery of antibodies. *Immunol Lett.* 2015;164(2):72-5.
6. Janeway CA Jr TP, Walport M, et al. . The structure of a typical antibody molecule. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.* 5th edition ed. New York: Garland Science; 2001.
7. Alberts B JA, Lewis J, et al. B Cells and Antibodies. *Molecular Biology of the Cell.* 4th edition ed. New York: Garland Science; 2002.
8. Liu H, Smith TJ, Lee WM, Mosser AG, Rueckert RR, Olson NH, et al. Structure determination of an Fab fragment that neutralizes human rhinovirus 14 and analysis of the Fab-virus complex. *J Mol Biol.* 1994;240(2):127-37.
9. Nelson AL. Antibody fragments: hope and hype. *MAbs.* 2010;2(1):77-83.
10. Finlay WJ, Almagro JC. Natural and man-made V-gene repertoires for antibody discovery. *Front Immunol.* 2012;3:342.
11. Lobner E, Traxlmayr MW, Obinger C, Hasenhindl C. Engineered IgG1-Fc--one fragment to bind them all. *Immunol Rev.* 2016;270(1):113-31.
12. Zdanov A, Li Y, Bundle DR, Deng SJ, MacKenzie CR, Narang SA, et al. Structure of a single-chain antibody variable domain (Fv) fragment complexed with a carbohydrate antigen at 1.7-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(14):6423-7.
13. Chothia C, Lesk AM. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol.* 1987;196(4):901-17.
14. Wu TT, Kabat EA. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med.* 1970;132(2):211-50.
15. Morea V, Tramontano A, Rustici M, Chothia C, Lesk AM. Conformations of the third hypervariable region in the VH domain of immunoglobulins. *J Mol Biol.* 1998;275(2):269-94.
16. North B, Lehmann A, Dunbrack RL, Jr. A new clustering of antibody CDR loop conformations. *J Mol Biol.* 2011;406(2):228-56.
17. Almagro JC, Raghunathan G, Beil E, Janecki DJ, Chen Q, Dinh T, et al. Characterization of a high-affinity human antibody with a disulfide bridge in the third complementarity-determining region of the heavy chain. *J Mol Recognit.* 2012;25(3):125-35.
18. Honegger A. Engineering antibodies for stability and efficient folding. *Handb Exp Pharmacol.* 2008(181):47-68.
19. Market E, Papavasiliou FN. V(D)J recombination and the evolution of the adaptive immune system. *PLoS Biol.* 2003;1(1):E16.
20. Arnaout R, Lee W, Cahill P, Honan T, Sparrow T, Weiland M, et al. High-resolution description of antibody heavy-chain repertoires in humans. *PLoS One.* 2011;6(8):e22365.
21. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature.* 1983;302:575-81.



22. Forthall DN. Functions of Antibodies. *Microbiol Spectr.* 2014;2(4):1-17.
23. Murphy K TP, Walport M. *Janeway's Immunobiology.* 7 ed. New York and London: Garland Science; 2008. p. 61–80.
24. Phalipon A, Cardona A, Kraehenbuhl JP, Edelman L, Sansonetti PJ, Corthesy B. Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo. *Immunity.* 2002;17(1):107-15.
25. Campodonico VL, Llosa NJ, Grout M, Doring G, Maira-Litran T, Pier GB. Evaluation of flagella and flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* as vaccines. *Infect Immun.* 2010;78(2):746-55.
26. Forthall DN, Moog C. Fc receptor-mediated antiviral antibodies. *Curr Opin HIV AIDS.* 2009;4(5):388-93.
27. Kurdi AT, Glavey SV, Bezman NA, Jhatakia A, Guerriero JL, Manier S, et al. Antibody dependent cellular phagocytosis by macrophages is a novel mechanism of action of elotuzumab. *Mol Cancer Ther.* 2018.
28. Smith CA, Williams GT, Kingston R, Jenkinson EJ, Owen JJ. Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature.* 1989;337(6203):181-4.
29. Howard GC, Bethell DR. *Basic methods in antibody production and characterization.* Boca Raton: CRC Press; 2001. 271 p. p.
30. Little M, Kipriyanov SM, Le Gall F, Moldenhauer G. Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. *Immunol Today.* 2000;21(8):364-70.
31. Liu JK. The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations. *Ann Med Surg (Lond).* 2014;3(4):113-6.
32. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. *J Immunol.* 2005;174(5):2453-5.
33. Li F, Vijayasankaran N, Shen AY, Kiss R, Amanullah A. Cell culture processes for monoclonal antibody production. *MAbs.* 2010;2(5):466-79.
34. Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(10):767-74.
35. Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(21):6851-5.
36. Merino AG. Monoclonal antibodies: Basic features. *Neurology.* 2010;26(5):301-6.
37. Casanova Estruch B. Safety profile and practical considerations of monoclonal antibody treatment. *Neurologia.* 2013;28(3):169-78.
38. Ecker DM, Jones SD, Levine HL. The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs.* 2015;7(1):9-14.
39. Almagro JC, Daniels-Wells TR, Perez-Tapia SM, Penichet ML. Progress and Challenges in the Design and Clinical Development of Antibodies for Cancer Therapy. *Front Immunol.* 2017;8:1751.
40. Almagro JC, Fransson J. Humanization of antibodies. *Front Biosci.* 2008;13:1619-33.
41. Navarro-Sarabia F, Ariza-Ariza R, Hernandez-Cruz B, Villanueva I. Adalimumab for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005(3):CD005113.
42. McLeod C, Bagust A, Boland A, Dagenais P, Dickson R, Dundar Y, et al. Adalimumab, etanercept and infliximab for the treatment of ankylosing spondylitis: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2007;11(28):1-158, iii-iv.
43. Dretzke J, Edlin R, Round J, Connock M, Hulme C, Czczot J, et al. A systematic review and economic evaluation of the use of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) inhibitors, adalimumab and infliximab, for Crohn's disease. *Health Technol Assess.* 2011;15(6):1-244.



44. Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, Ho WY, Alitheen NB, Hamid M. scFv antibody: principles and clinical application. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:980250.
45. Boss MA, Kenten JH, Wood CR, Emtage JS. Assembly of functional antibodies from immunoglobulin heavy and light chains synthesised in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* 1984;12(9):3791-806.
46. Skerra A, Pluckthun A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science.* 1988;240(4855):1038-41.
47. Ho M, Nagata S, Pastan I. Isolation of anti-CD22 Fv with high affinity by Fv display on human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(25):9637-42.
48. Galeffi P, Lombardi A, Pietraforte I, Novelli F, Di Donato M, Sperandei M, et al. Functional expression of a single-chain antibody to ErbB-2 in plants and cell-free systems. *J Transl Med.* 2006;4:39.
49. Choo AB, Dunn RD, Broady KW, Raison RL. Soluble expression of a functional recombinant cytolytic immunotoxin in insect cells. *Protein Expr Purif.* 2002;24(3):338-47.
50. Zhang H. Empowering scFv with effector cell functions for improved anticancer therapeutics. *Oncoimmunology.* 2013;2(6):e24439.
51. Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, et al. Single-chain antigen-binding proteins. *Science.* 1988;242(4877):423-6.
52. Deng XK, Nesbit LA, Morrow KJ, Jr. Recombinant single-chain variable fragment antibodies directed against *Clostridium difficile* toxin B produced by use of an optimized phage display system. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10(4):587-95.
53. Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol.* 1991;222(3):581-97.
54. Dai K, Zhu H, Ruan C. Generation and characterization of recombinant single chain Fv antibody that recognizes platelet glycoprotein Iba $\alpha$ . *Thromb Res.* 2003;109(2-3):137-44.
55. Hu X, O'Dwyer R, Wall JG. Cloning, expression and characterisation of a single-chain Fv antibody fragment against domoic acid in *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* 2005;120(1):38-45.
56. Luo D, Mah N, Krantz M, Wilde K, Wishart D, Zhang Y, et al. VI-linker-Vh orientation-dependent expression of single chain Fv-containing an engineered disulfide-stabilized bond in the framework regions. *J Biochem.* 1995;118(4):825-31.
57. Chester KA, Begent RH, Robson L, Keep P, Pedley RB, Boden JA, et al. Phage libraries for generation of clinically useful antibodies. *Lancet.* 1994;343(8895):455-6.
58. Filpula D. Antibody engineering and modification technologies. *Biomol Eng.* 2007;24(2):201-15.
59. OFICIAL D. NORMA Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos. México2012 [cited 2018 Junio 26]. Available from: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/219069/NOM-253-SSA1-2012\\_Para\\_la\\_disposicion\\_de\\_sangre\\_humana\\_y\\_sus\\_componentes\\_con\\_fines\\_terapeuticos.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/219069/NOM-253-SSA1-2012_Para_la_disposicion_de_sangre_humana_y_sus_componentes_con_fines_terapeuticos.pdf).
60. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. . *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968;97:7.
61. TECHNOLOGIES S. Lymphoprep. Density gradient medium for the isolation of mononuclear cells Canada2017 [cited 2018 Jun 13]. Available from: [https://cdn.stemcell.com/media/files/pis/29283-PIS\\_1\\_2\\_0.pdf?\\_ga=2.128332367.2136455922.1528953690-539429174.1528953690](https://cdn.stemcell.com/media/files/pis/29283-PIS_1_2_0.pdf?_ga=2.128332367.2136455922.1528953690-539429174.1528953690).
62. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.* 1993;15(3):532-4, 6-7.



63. Glasel JA. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques*. 1995;18(1):62-3.
64. Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*. 1997;22(3):474-6, 8-81.
65. Huded AKC, Jingade P, Mishra MK. A rapid and efficient SDS-based RNA isolation protocol from different tissues of coffee. *3 Biotech*. 2018;8(3):183.
66. Heidy Y, Guerrero MOR, Moisés Wasserman Evaluation of two methods for the separation of *Plasmodium falciparum* messenger RNA. *Biomédica*. 1998;18(1):55-65.
67. Darnell JE, Philipson L, Wall R, Adesnik M. Polyadenylic acid sequences: role in conversion of nuclear RNA into messenger RNA. *Science*. 1971;174(4008):507-10.
68. Biolabs NE. Reverse Transcription (cDNA Synthesis) 2017 [cited 2018 May 10]. Available from: <https://www.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-preparation/reverse-transcription-cdna-synthesis>.
69. Bartlett JM, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol*. 2003;226:3-6.
70. technologies ll. Vector pCR® 2.1 TOPO® 3.9 K 2017 [cited 2018 May 11]. Available from: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/vectors/pcr2\\_1topo\\_map.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/vectors/pcr2_1topo_map.pdf).
71. Green MR, Sambrook J, Sambrook J. *Molecular cloning : a laboratory manual*. 4th ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.
72. Holton TA, Graham MW. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(5):1156.
73. Scientifics T. The Technology Behind TOPO Cloning United States 2017 [cited 2018 May 12]. Available from: <http://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/cloning/topo/topo-resources/the-technology-behind-topo-cloning.html>.
74. Dong W, Roy AK, Li Y. Rapid Identification of Cloned HIV-1 Fragments. *Methods Mol Med*. 1999;17:83-7.
75. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463-7.
76. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*. 1986;321(6071):674-9.
77. Smith LM, Fung S, Hunkapiller MW, Hunkapiller TJ, Hood LE. The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus: synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis. *Nucleic Acids Res*. 1985;13(7):2399-412.
78. ExPASy. Translate Tool 2017 [cited 2018 May 19]. Available from: <https://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna2aa.cgi>.
79. Wu TT, Johnson G, Kabat EA. Length distribution of CDRH3 in antibodies. *Proteins*. 1993;16(1):1-7.
80. Azzazy HM, Highsmith WE, Jr. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem*. 2002;35(6):425-45.
81. Okamoto T, Mukai Y, Yoshioka Y, Shibata H, Kawamura M, Yamamoto Y, et al. Optimal construction of non-immune scFv phage display libraries from mouse bone marrow and spleen established to select specific scFvs efficiently binding to antigen. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;323(2):583-91.
82. Brezinschek HP, Foster SJ, Brezinschek RI, Dorner T, Domiati-Saad R, Lipsky PE. Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells. *J Clin Invest*. 1997;99(10):2488-501.

