



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**EVALUACIÓN DEL PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN INTRACELULAR  
pPIC3.5 EN LA PRODUCCIÓN DEL ANTICUERPO scFv 6009F EN *Pichia  
pastoris* GS115 Y KM71**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

BIOL. DANIELA ALEXIS LÓPEZ GALINDO

**DIRECTORES DE TESIS**

**DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL**

**DRA. HILDA VÁZQUEZ LÓPEZ**

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE, 2019

## ÍNDICE

ÍNDICE .....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iii
RESUMEN.....	iv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 ALACRÁN EN MÉXICO .....	3
2.1.1 GENERO CENTRUROIDES .....	4
2.2 PICADURA DE ALACRAN .....	5
2.2.1 SÍNTOMAS .....	6
2.2.2 COMPOSICIÓN DEL VENENO .....	6
2.3 ANTIVENENOS.....	7
2.3.1 ANTICUERPOS.....	8
2.3.2 CARACTERISTICAS DE FRAGMENTOS VARIABLES DE CADENA SENCILLA (scFv). .....	9
2.3.3 EXPRESIÓN DE ANTICUERPOS .....	10
2.4 <i>Pichia pastoris</i> .....	12
2.5 ANTECEDENTES DIRECTOS .....	16
3. JUSTIFICACIÓN.....	19
4. HIPOTESIS.....	19
5. OBJETIVO GENERAL .....	19
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES .....	19
6. MATERIALES Y METODOS.....	20
6.1 CEPAS BACTERIANAS .....	20
6.1.1 CEPAS DE LEVADURAS .....	20
6.1.2 VECTORES DE EXPRESIÓN.....	20
6.2 PROPAGACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pSyn1 y pPIC3.5.....	21
6.3 AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO scFv 6009F POR PCR.....	21
6.4 LIGACIÓN EN EL VECTOR pPIC 3.5 .....	22
6.5 TRANSFORMACIÓN DE <i>Pichia pastoris</i> .....	23
6.6 ANÁLISIS DE LAS TRANSFORMANTES DE <i>Pichia pastoris</i> POR PCR.....	24
6.7 EXPRESION DE SCFV 6009F EN <i>E. coli</i> TG1 y <i>Pichia pastoris</i> KM71 y GS115 ...	24
6.8 PURIFICACIÓN DE LA PROTEINA EXPRESADA EN <i>E. coli</i> TG1 y <i>Pichia pastoris</i> KM71 y GS115.....	25

6.9 CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA.....	26
6.10 TÉCNICA DE WESTERN-BLOT.....	26
6.11 TÉCNICA DE ELISA PARA EVALUAR EL RECONOCIMIENTO DE scFv 6009F FRENTE A LA TOXINA Cn2 .....	26
7. RESULTADOS .....	27
7.1 PROPAGACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pSyn1 y pPIC3.5.....	27
7.2 OBTENCIÓN DEL FRAGMENTO 6009F.....	28
7.3 LIGACIÓN EN EL VECTOR pPIC3.5 .....	29
7.4 TRANSFORMACIÓN DE <i>Pichia Pastoris</i> .....	34
7.5 ANÁLISIS DE LAS TRANSFORMANTES DE <i>Pichia pastoris</i> POR PCR.....	34
7.6 EXPRESION Y PURIFICACIÓN DE scFv 6009F EN <i>Pichia Pastoris</i> .....	35
7.7 EXPRESION DE Y PURIFICACIÓN scFv 6009F EN <i>E. coli</i> TG1.....	41
7.8 RECONOCIMIENTO DE scFv 6009F FRENTE A LA TOXINA Cn2.....	43
8. DISCUSIÓN.....	43
8. CONCLUSIONES .....	46
9. PERSPECTIVAS .....	47
10. BIBLIOGRAFÍA.....	48
11. ANEXOS.....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales áreas de distribución del alacranismo en el Mundo. ....	4
Figura 2. Distribución de género <i>Centruroides</i> en México.....	5
Figura 3 Estructura general de un anticuerpo Inmunoglobulina G .....	8
Figura 4. (a) Representación esquemática fragmentos scFv y (b) fragmentos scFv que se pueden diseñar en formatos multivalentes.....	10
Figura 5. Alineamiento de las toxinas de los alacranes <i>C. limpidus</i> , <i>C. noxius</i> , y <i>C.</i> <i>suffusus</i> .....	16
Figura 6. Plásmido pSyn1 .....	21
Figura 7. Vector pPIC3.5.....	21
Figura 8. Transformantes de <i>E. coli</i> con los plásmidos: a) pSyn1 y b) pPIC3.5. ....	27
Figura 9. Purificación de plásmidos: a) pSyn1 y b) pPIC 3.5.....	28
Figura 10. Amplificación del fragmento 6009F .....	29
Figura 11. Fragmento 6009F y vector pPIC3.5 digerido con las enzimas EcoRI y AvRII. .	29
Figura 12. Se obtuvieron colonias positivas verificadas con los oligonucleótidos del vector pPIC3.5 en: a) En los carriles 3, 6, 8 10; y b). en los carriles 4, 8 y 9 .....	31
Figura 13. Liberación del Fragmento 6009F .....	31
Figura 14. Alineamiento con el programa BLAST.....	32
Figura 15. Alineamiento de la secuencia en color rojo se muestra el cambio.....	33
Figura 16. Clonas positivas de la cepa <i>P. pastoris</i> KM71.....	35

Figura 17. Clonas positivas de la cepa GS115. ....	35
Figura 18. Gel de SDS al 12.5% lavados con PBS. ....	36
Figura 19. Elusiones con imidazol en <i>P. pastoris</i> Km71/pPic3.5.....	36
Figura 20. Gel SDS PAGE al 12.5% muestras y controles de expresiones en <i>P. pastoris</i>	37
Figura 21 Gel SDS PAGE 12.5 % muestras de los tiempos de la cepa KM71. ....	39
Figura 22 Gel SDS PAGE 12.5 % muestras de los tiempos de la cepa GS115. ....	39
Figura. 23 Western blot con diferentes muestras de expresiones en <i>Pichia</i> .....	40
Figura 24 Gel de SDS al 12.5% referencia para el western blot .....	41
Figura 25 Reconocimiento por western blot.....	41
Figura 26 Gel SDS con las muestras de <i>E. coli</i> TG1 del proceso de purificación .....	42
Figura 27 Elisa con las diferentes expresiones en <i>Pichia Pastoris</i> . ....	43

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Producción de proteínas en <i>Pichia pastoris</i> .....	11
Tabla 2. Cepas de <i>Pichia pastoris</i> utilizadas en la expresión de proteínas recombinantes .....	13
Tabla 3 Vectores de expresión .....	14
Tabla 4 Combinaciones entre cepas de <i>P. pastoris</i> con los plásmidos compatibles para la expresión intracelular o extracelular que se trabajan en nuestro grupo de investigación. 18	
Tabla 5. Componentes de las reacciones de PCR.....	22
Tabla 6. Oligonucleótidos específicos para el scfv 6009F.....	22
Tabla 7. Perfil de ciclado de PCR. ....	22
Tabla 8. Componentes para ligación del fragmento 6009 y vector 3.5 .....	23
Tabla 9. Oligonucleótidos para el vector pPIC 3.5. ....	23
Tabla 10. Perfil de ciclado de PCR con los oligonucleótidos del vector.....	23
Tabla 11. Linealización con Sall. ....	24
Tabla 12. Concentraciones del plásmido pPic3.5 y el gen scFv6009F .....	30
Tabla 13 Cuantificación de proteína total de la cepa KM71 .....	38
Tabla 14 Cuantificación de proteína de la expresión en <i>E. coli</i> TG1 .....	42
Tabla 15 Expresiones en <i>Pichia</i> detectadas en geles SDS PAGE y Western blot.....	44

## RESUMEN

La OMS considera la intoxicación por picadura de alacrán como un problema de salud pública. A nivel mundial se reportan 1.5 millones de envenenamientos que involucran 2600 muertes. El género *Centruroides* de la familia *Buthidae*, es el de mayor importancia médica en el país y principalmente se ha estudiado desde de los puntos de vista toxicológico y epidemiológico. Hoy en día se cuenta con antivenenos de tipo faboterápicos, los cuales son producidos en caballos por lo que su producción de estos es costosa, por lo cual se buscan nuevas tecnologías para el desarrollo de anticuerpos constituidos por fragmentos variables de cadena sencilla (scFvs). Una alternativa es el scFv6009F que reconoce a la toxina Cn2 del alacrán *Centruroides noxius*. EL gen de scFv6009F se expresó en *E. coli* TG1 empleando el plásmido pSyn1, obteniendo una producción de 1.1 mg/L lo que permitió determinar su 2LD<sub>50</sub> frente al veneno de *Centruroides noxius* y sus toxinas Cn2 y Cn3, el veneno de *C. suffusus* y sus toxinas C<sub>ss</sub>2 y C<sub>ss</sub>4 C, y el veneno de *C. limpidus* y sus toxinas CII1 y CII2. El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión del fragmento scFv 6009F en dos cepas de *Pichia pastoris*, GS115 y KM71 empleando el plásmido pPIC3.5 que expresa la proteína intracelularmente y determinar si es capaz de reconocer la toxina Cn2 usando como control la expresión del mismo fragmento en *E. coli* TG1. Los resultados muestran que solo la expresión con un volumen de 10 mL a 28°C y 150 rpm se ha expresado el fragmento scFv6009F en la construcción KM71 pPIC3.5/6009F teniendo una concentración de proteína total de 200 ug/mL. Se espera purificar esta proteína para realizar los ensayos de neutralización con la toxina Cn2 y el veneno completo de *Centruroides noxius*.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los alacranes son organismos que se pueden encontrar fuera de su rango normal de distribución, debido a que pueden ser transferidos de un lugar a otro en el equipaje, cajas, contenedores y son transportados inadvertidamente a través de viajeros humanos. A nivel mundial se reportan 1.5 millones de envenenamientos por alacrán que involucran aproximadamente 2,600 muertes (Chiappaux, 2012). Se considera la intoxicación por picadura de alacrán como un problema de salud pública y urgencia médica, en países tropicales y subtropicales subdesarrollados, como África, el sur de la India, el Medio Oriente, América Latina y México. En México la OMS en el 2017, reporto 300,000 casos de picaduras y 1000 muertes al año por alacranes (Cheng y Dattaro, 2017; <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2015/sem03.pdf>).

Los anticuerpos son herramientas clave en el diagnóstico y detección de proteínas, microorganismos y como terapéuticos en enfermedades infecciosa. Se estima que los anticuerpos modificados representan casi el 30% de todos los agentes biofarmacéuticos que se encuentran en ensayos clínicos (Stech, y Kubick, 2015). Su aplicación en el tratamiento de diversas enfermedades, por ejemplo, cáncer, infección viral, inflamación, mordeduras de serpiente y picaduras de alacrán se ha incrementado en los últimos años. La terapia sérica convencional sigue siendo uno de los principales tratamientos para el envenenamiento ocasionado por animales ponzoñosos como serpientes, arañas y alacranes. Los anticuerpos que se utilizan como antivenenos están basados en sueros inmunizados obtenidos en caballos (Lee y Jeong, 2015). Entre los antivenenos comerciales se encuentran los faboterápicos como ALACRAMYN ampliamente usado en el sector salud y la Cruz Roja Mexicana y comercializado por Bioclón y Silanes. Este tipo de producto a parte de su ventaja, que es neutralizar las toxinas del veneno pueden presentar algunos efectos adversos al humano por provenir de origen equino. Entre los efectos adversos que son extraordinariamente raros están: a) La generación de reacciones alérgicas de hipersensibilidad tipo I y III, en personas hiperreactivas y b) una reacción por complejos inmunes, caracterizada

por urticaria y artralgias después de 5 a 10 días posteriores a la administración del producto.

En este sentido se siguen buscando nuevas alternativas para la producción de antivenenos con menos efectos adversos, por ejemplo, el desarrollo de anticuerpos constituidos por fragmentos variables de cadena sencilla (scFvs), los cuales pueden modificarse estructuralmente variando sus propiedades farmacocinéticas y producirlos en grandes cantidades a bajo costo mediante expresión heteróloga en varios hospederos (Monnier *et al.*, 2013).

Los sistemas de expresión que están disponibles actualmente para la producción de anticuerpos son: células de insecto, células de mamíferos, plantas, bacterias y levaduras. Entre las levaduras *Pichia pastoris* presenta un buen sistema de expresión debido a que es capaz de secretar la proteína soluble y funcional hacia al medio de cultivo lo que facilita la purificación de la proteína y evita realizar procesos de plegado posteriores. La levadura *Pichia pastoris* ha sido ampliamente empleada para la producción de proteínas heterólogas como; fragmentos de anticuerpos, uridina recombinante, eritropoyetina humana recombinante e insulina humana recombinante. Posee el promotor de la enzima alcohol oxidasa, el cual es fuerte y regulable por metanol, tiene capacidad para alcanzar altas densidades celulares en biorreactores en medios de cultivo baratos. La mayoría de las cepas de *P. pastoris* poseen como marcador de selección autotrófico al gen histidinol deshidrogenasa (*his4*), el cual es esencial para la síntesis del aminoácido histidina. Como esta levadura es capaz de emplear el metanol como fuente de carbono y energía la mayoría de sus vectores de expresión se basan en promotores de las enzimas involucradas en el metabolismo del metanol, como el del alcohol oxidasa1(AOX1). Las péptidas señales que se emplean con mayor frecuencia son; el factor de apareamiento tipo  $\alpha$  (FAT-  $\alpha$ ) de *S. cerevisiae*, el de la fosfatasa ácida de *P. pastoris* (PHO1) y el de la sacarosa invertasa de *S. cerevisiae* (SUC2), Por otro lado, *Pichia pastoris* es capaz de realizar N y O glicosilación de proteínas (Serrano-Rivera *et al.*, 2016), algo que no es deseado en productos farmacéuticos. Además, aunque en algunas cepas de *P. pastoris* se han

deletado genes de enzimas GS115 y KM71 no tienen dichos cambios, se ha reportado que esta actividad proteolítica puede degradar toda la proteína o sólo cortar las etiquetas de marcaje para purificar, cuantificar y detectar la proteína expresada como cola de Histidinas y C-myc, lo que dificulta detectar y cuantificar durante el proceso de expresión cuando no se cuenta con estas tags. La proteólisis puede ocurrir durante el transporte vesicular de la proteína recombinante por las proteasas residentes en la vía secretora o en el espacio extracelular por la secreción de proteasas asociadas a la pared celular o liberado en el medio de cultivo como resultado de la disrupción celular durante el cultivo de alta densidad celular (Ahmad *et al.*, 2014). Se han empleado diferentes estrategias para abordar el problema como: modificar los parámetros de fermentación (pH, temperatura y tasa de crecimiento específica), cambiar la composición del medio (medio rico, adición de casaminoácidos o peptona como sustratos competidores), disminuir la concentración de sal y adición de soja (Zhao *et al.* 2008), aplicando estrategias de ingeniería de proteínas (Gustavsson *et al.* 2001) e ingeniería del huésped de expresión para obtener cepas deficientes en proteasa (revisado por Idiris *et al.* 2010 y Macauley-Patrick *et al.* 2005 ) Sin embargo, en algunos casos, la optimización de los medios de fermentación y las estrategias de ingeniería de proteínas no lograron aliviar el problema de la proteólisis y ajustar la expresión del propio huésped fue la única opción viable (Li *et al.* 2010). Otros parámetros importantes de control durante la expresión son: densidad celular al inicio de la inducción, concentración de metanol en el medio de cultivo, aeración, control del oxígeno disuelto, efecto de la temperatura y pH, así como la fuente de Nitrógeno.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 ALACRÁN EN MÉXICO**

Los alacranes son animales muy antiguos, se calculan que existen desde hace 400 millones de años, desde entonces han estado desarrollado muchos mecanismos para defenderse de sus agresores y poder capturar a sus presas (Domingos, 2005). Conquistaron la mayoría de los ambientes ecológicos en el mundo (Figura. 1), siendo las áreas tropicales y subtropicales el hábitat principal

donde se encuentran distribuidos, excepto por los casquetes polares y las altas cumbres nevadas (de Roodt., 2015).

En México, los alacranes se han adaptados tanto en los ambientes tropicales y subtropicales como a los desérticos. Se cuenta con una gran diversidad de alacranes que se clasifican en 8 familias, 38 géneros y 281 especies que representa el 12% de la diversidad a nivel mundial figura 2 (Santibáñez-López *et al.*, 2016). Las familias presentes son: *Superstitioniidae* representado con un 100%, seguida por *Vaejovidae* con un 52%, *Diplocentridae* con 21%, *Buthidae* con 16%. *Buthidae* está representado por dos géneros *Centruroides* y *Tityopsis* con 44 especies La única familia endémica de México es *Typhlochactidae* y comprende solo el 4%. Un poco menos representadas están las familias *Caraboctonidae* y *Euscorpiidae* ambas con un 3%. Finalmente, el resto de las familias con el 1% (Santibáñez-López *et al.*, 2015, Vidal-Acosta, y Francke, 2009).

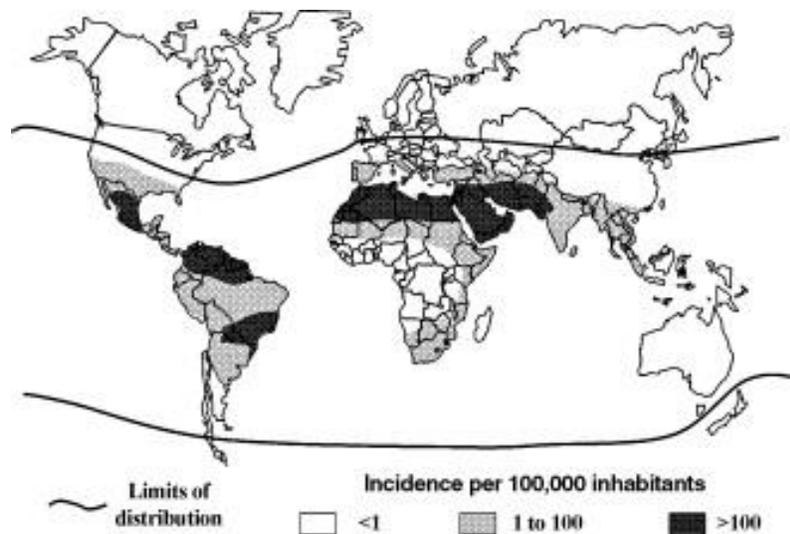


Figura 1. Principales áreas de distribución del alacranismo en el Mundo.

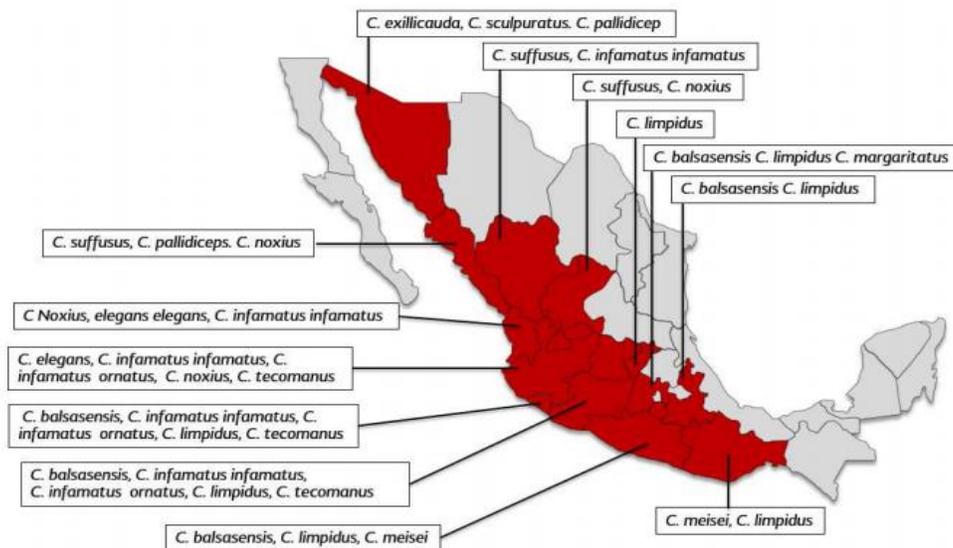
### 2.1.1 GENERO CENTRUROIDES

El género *Centruroides* de la familia *Buthidae*, es el de mayor importancia médica en el país y principalmente se ha estudiado desde de los puntos de vista toxicológico y epidemiológico. Los alacranes de esta familia se encuentran bajo piedras, objetos diversos que se encuentren en el suelo, bajo cortezas de árboles que estén ligeramente desprendidas, hendiduras en suelo o rocas y en

temperaturas muy bajas (4 a 10 °C) o altas (40 °C o más) (Ponce y Francke, 2004 y 2013). Las especies las especies del género de mayor incidencia de accidentes son: *Centruroides limpidus limpidus* (Guerrero, Morelos, Michoacán y Oaxaca), *C. limpidus tecomanus* (Colima), *C. infamatus infamatus* (Guanajuato y Estado de México), *C. suffusus suffusus* (Durango), *C. sculpturatus* (Sonora), *C. elegans* (Jalisco y Oaxaca), y *C. noxius* (Nayarit y Jalisco) que se muestran en Figura. 2, este último considerado el más tóxico dentro del territorio mexicano (Celis et al., 2007, Vigilancia Epidemiológica semana 3, 2015). Tres especies son las más peligrosas: *C. suffusus suffusus* por sus toxinas C<sub>ss2</sub> y C<sub>ss4</sub>, *C. noxius* por su toxina C<sub>n2</sub> (66 aminoácidos, la cual se une y modifica únicamente las funciones del canal del Na<sup>+</sup> humano Nav1.6) y por último *C. limpidus limpidus* por sus toxinas C<sub>II1</sub> y C<sub>II2</sub>. (Zamudio et al., 2004, Riaño-Umbarila et al., 2013).

## 2.2 PICADURA DE ALACRAN

La intoxicación por picadura de alacrán (IPPA) se ubica en el lugar número 15 entre los 20 padecimientos más importantes que van en aumento en los últimos 20 años en México.



**Fuente:** Fuente: Los Alacranes de México. Oscar F. Francke Ballvé. Instituto de Biología de la UNAM.

**Figura 2. Distribución de género *Centruroides* en México.**

### **2.2.1 SÍNTOMAS**

El primer síntoma por picadura de alacrán es dolor intenso (Camacho-Ramírez *et al.*, 2007). Su evolución es rápida, se distinguen tres etapas: Primera etapa: Envenenamiento leve, el paciente esta asintomático o solamente con dolor local, eritema y parestesia que permanece durante las 2 h posteriores a la picadura. Segunda etapa: Envenenamiento moderado, este se presenta dos horas después de la picadura, los síntomas locales que presenta son: prurito, sudores, dolor epigástrico, vómitos, cólicos, diarrea, priapismo, hipotensión, bradicardia, obstrucción pulmonar y disnea. La temperatura aumenta, el vómito constituye un signo de gravedad y requiere un monitoreo específico. Tercera etapa: Envenenamiento grave, presenta el riesgo de colapso cardiovascular, asociado con complicaciones respiratorias importantes: edema pulmonar, broncoespasmo y cianosis. Se puede observar hipertermia, arritmia cardíaca, signos electrocardiográficos de isquemia miocárdica. Existen varias causas que influyen en la sintomatología que presenta el paciente al ser picado por el alacrán entre las cuales están: 1) El tiempo que acude a recibir atención médica, reportándose casos de moderados a graves, cuando el tiempo es mayor de 60 minutos, 2) Cantidad de veneno inyectado (macho/hembra, glándula venenosa llena/vacía), 3) Tipo de especie y neurotoxinas que presenta el veneno (Camacho-Ramírez *et al.*, 2007, Chippaux, 2012).

### **2.2.2 COMPOSICIÓN DEL VENENO**

Los venenos de alacrán son mezclas complejas de componentes bioactivos que contienen enzimas, péptidos, nucleótidos, lípidos, mucopolisacáridos, aminos biogénicas, aminoácidos, nucleótidos y otras sustancias desconocidas con diversas propiedades farmacológicas y fisiológicas (Caliskan, 2015). Los péptidos que presenta el veneno son de pesos molecular relativamente bajo, de cadena corta de 22 a 47 aa, ó larga de 59 a 76 aa que reconocen a los canales iónicos de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y Cl<sup>-</sup>. Capaces de modificar del mecanismo de activación y bloquear la actividad del canal. Los canales juegan un papel importante de la regulación de la fisiología normal en mamíferos y otros organismos, la interrupción de la función de estos canales puede provocar alteraciones significativas en su

función normal que conducen a varios síntomas durante el envenenamiento (Almaaytah y Albalas, 2014).

### **2.3 ANTIVENENOS**

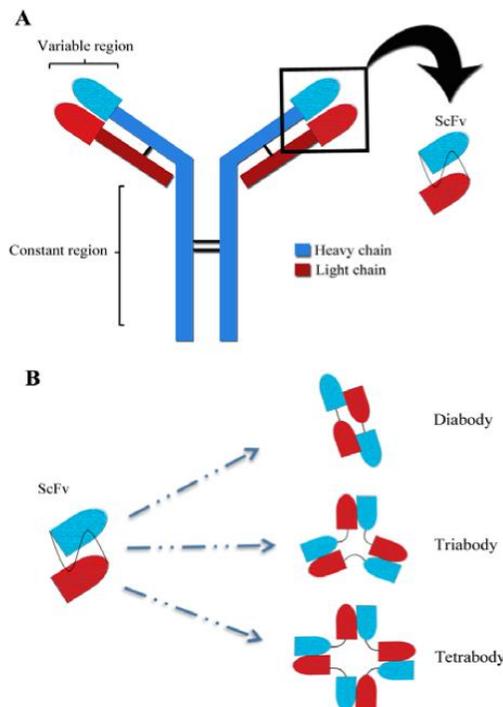
En 1909 Todd reportó la primera producción de un antiveneno contra el veneno del alacrán *Buthus quinquestriatus* endémico de Egipto, el cual se obtuvo por inmunización de caballos con veneno crudo como antígeno. Murano en 1915 desarrollo un antiveneno para el alacrán brasileño *Tityus bahiensis* pero con poca actividad neutralizante. Dos años después Vilela produjo el primer antiveneno brasileño efectivo. Para determinar si se produjo el anticuerpo se extrae una muestra de sangre del caballo se centrifuga, se separa el plasma del resto de la sangre. Este se precipita en sales como sulfato de amonio o sodio, pero este método solía contener una proporción de proteínas contaminantes como la albúmina, presentando una alta incidencia de reacciones adversas (Carmo *et al.*, 2015). Por este motivo se buscó una nueva alternativa para mejorar los antivenenos de primera generación, así surgió los antivenenos de segunda generación: consiste en purificar inmunoglobulinas a partir del suero, para eliminar las otras proteínas, pero aún se seguían presentándose casos de hipersensibilidad, pero en un menor porcentaje (Zavala *et al.*, 2004). Después surgieron los antídotos de tercera generación o faboterápicos, que se obtienen por digestión enzimática de la inmunoglobulina G, ya sea utilizando pepsina para la obtención del fragmento  $F(ab')^2$  o papaína para obtener el fragmento Fab (Verma *et al.*, 1998). Hoy en día la demanda de anticuerpo para terapias de picadura de alacrán ha ido en aumento, el mercado en México y Latinoamérica se cubre con el producto Alacramyn un faboterápico. Sin embargo, se busca desarrollar anticuerpos para combatir el envenenamiento utilizando nuevas tecnologías y, por lo tanto, también la necesidad de sistemas de producción eficientes y menos costosos. Entre ellas la obtención fragmentos Fab monovalentes, fragmentos de cadena sencilla “scFv” por sus siglas en inglés single-chain fragment variable (Fig. 4a), los fragmentos scFv se pueden diseñar en especies multivalentes: diacuerpo, triacuerpo y tetracuerpo y minicuerpos (Fig. 4b) Se han investigado las propiedades de estos fragmentos para mejorar y optimizar su afinidad por la



molécula de anticuerpo se conoce como región constante, formada por un dominio constante que constituye la cadena ligera CL y un dominio constante de cadena pesada CH, que a su vez se conforma por tres secciones a) CH1 la bisagra, y regiones b) CH2 y c) CH3, que constituyen la cadena pesada. Mientras que la región variable determina la unión a los receptores, el dominio del fragmento cristizable Fc está involucrada en las funciones efectoras y contiene sitios de unión en la región bisagra (Weisser y Hall, 2009).

### **2.3.2 CARACTERISTICAS DE FRAGMENTOS VARIABLES DE CADENA SENCILLA (scFv).**

Los fragmentos variables de cadena sencilla (scFvs) por lo general constan de un dominio de unión al antígeno (~ 30 kDa), formado por dos cadenas pesadas y dos ligeras unidas por un péptido de 15 aminoácidos constituido por GGGGSGGGGSGGGGS que le proporcionan solubilidad y flexibilidad (Figura 4). Carecen de la región Fc (Fragmento cristizable) lo que le permite una baja inmunogenicidad, convirtiéndolos en mejores agentes terapéuticos (Monnier *et al.*, 2013). Son herramientas poderosas en investigación y entornos clínicos, debido a que poseen mejores propiedades farmacocinéticas en comparación con los anticuerpos monoclonales parentales y la relativa facilidad de producirlos en grandes cantidades, a bajo costo. (Crivianu-Gaita, y Thompson, 2016).



**Figura 4. (a) Representación esquemática fragmentos scFv y (b) fragmentos scFv que se pueden diseñar en formatos multivalentes.**

### 2.3.3 EXPRESIÓN DE ANTICUERPOS

Los anticuerpos recombinantes se han expresado en células de insecto, mamíferos, bacterias y en levaduras con ventajas y limitaciones dependiendo de cada sistema (Ahmad *et al.*, 2012, Verma *et al.*, 1998, Kipriyanov y Little, 1999). La expresión génica mediada por baculovirus está establecida en insectos, produciendo proteínas funcionalmente activas, en cantidades que oscilan entre el 0.1 y el 50% de proteína total (Schirrmann *et al.*, 2008 y Verma *et al.*, 1998). Los sistemas de cultivos de células de animales presentan una mayor similitud a las células humanas, respecto a los patrones y capacidad de las modificaciones postraduccionales que realizan (Verma *et al.*, 1998). No obstante, su cultivo es más complicado, costoso y usualmente la producción alcanza rendimientos bajos, como el caso de la Apolipoproteína humana AI con 80 mg/L en células CHO y para laminina humana en células de riñón embrionario humano 1 mg/L (Schmidt, 2004). *Escherichia coli* entre las bacterias, sigue siendo el sistema de producción de elección para obtener fragmentos de anticuerpos recombinantes, no glicosilados, en los que se incluyen scFvs. *E. coli* crece rápidamente y permite la producción a gran escala de anticuerpos, alcanzando altos rendimientos 2 g/L

(Weisser y Hall, 2009). Una de las desventajas que tiene *E. coli* es la expresión en el entorno reductor del citoplasma donde se han logrado a altas concentraciones, pero a menudo da como resultado la formación de cuerpos de inclusión o en el espacio periplasmático de cepas modificadas (Verma *et al.*, 1998, Andersen y Krummen, 2002, Ahmad *et al.*, 2012). La producción de scFv en levaduras ofrece una rentabilidad y beneficios con las ventajas de la expresión eucariota con el procesamiento de proteínas, el plegamiento y las modificaciones postraduccionales en comparación con *E. coli* (Verma *et al.*, 1998, Ahmad *et al.*, 2012). Además, la proteína se expresa en el sobrenadante del cultivo de forma soluble permitiendo una purificación más rápida y fácil. Se han usado dos tipos de vectores para la expresión en levaduras: vectores episomales que se propagan extra cromosómicamente y vectores que se integran en el cromosoma mediante recombinación homóloga (Gasser y Mattanovich, 2007). *Saccharomyces cerevisiae* fue la primera levadura que se empleó para la obtención de proteínas recombinantes y productos biofarmacéuticos (Spadiut, *et al.*, 2014). Shusta y colaboradores en 1998, obtuvieron niveles hasta 20 mg/L del fragmento scFv McPC603 en *S. cerevisiae* ajustando la coexpresión de una chaperonina (BiP) y una proteína disulfuro isomerasa (PDI) en un cultivo en matraz. En la actualidad también se ha estado utilizando a la levadura *Pichia pastoris* como sistema de expresión, tiene un potencial para producir grandes cantidades de proteínas recombinantes ya sea intracelular o extracelularmente como se menciona en la tabla 1, donde se muestran cepas, vectores, anticuerpos, niveles de producción y referencia (Joosten, 2003 y Spadiut *et al.*, 2014). Hay algunos informes de secreción exitosa de proteínas intracelulares tales como la GFP logrando producir 2 mg/L (Ahmad *et al.*, 2014) y la enzima hidroxinitrilo liasa de la cual se obtuvieron 22 g/L (Hasslacher *et al.*, 1997).

**Tabla 1 Producción de proteínas en *Pichia pastoris***

Cepa	Vector	Proteína	Producción	Referencia
GS115	pPIC9	scFv anti-MUC1	10-15 mg/L	Rahbarizadeh <i>et al.</i> , 2006
GS115	pPICz $\alpha$ -A	anti-TNF-V H	5 mg/L	Ji <i>et al.</i> , 2013

X-33	pPICz-C	anti-EGFR VIII	8-10 mg/L	Omidfar <i>et al.</i> , 2007
X-33	pPICz $\alpha$ -A	Nanobody- NbAahl'22	17 mg/L	Ezzine <i>et al.</i> , 2012
GS115	pPIC3.5K	Enzima quitinasa	No reportado	Zhou <i>et al.</i> , 2009
GS115	pPIC3.5	Glicoproteína VIH-1	1.25 mg / ml	Scorer <i>et al.</i> , 1993
GS115	pPIC3.5K	Proteína fluorescente verde (GFP)	2 mg/ ml	Eiden-Plach <i>et al.</i> , 2004
KM-71	pJ902	Glicoproteína lactoferrina bovina	3.5 g/L	Iglesias-Figueroa <i>et al.</i> , 2016

## 2.4 *Pichia pastoris*

*P. pastoris* presenta las siguientes ventajas : (1) Tasa de crecimiento rápida; (2) Altos niveles de productividad en un medio casi libre de proteínas; (3) Eliminación de la contaminación por endotoxinas y bacteriófagos; (4) Facilidad de manipulación genética de vectores de expresión de levadura bien caracterizado; (5) Diversas modificaciones postraduccionales que incluyen plegamiento de polipéptidos, glicosilación, metilación, acilación, ajuste proteolítico y direccionamiento a compartimentos subcelulares; y (6) Capacidad de manipular proteínas secretadas que pueden purificarse del medio (Li, *et al* 2007).

*P. pastoris* es una levadura metilotrófica que contiene dos copias de gen alcohol oxidasa: AOX1 y AOX2 que le permiten el crecimiento en metanol como única fuente de carbono y energía. (Byrne, 2015). El promotor AOX1 regula aproximadamente el 90% de la actividad alcohol oxidasa en la célula mientras que el AOX2 menos del 10% (Cos *et al.*, 2006). Además, presenta tres tipos de fenotipos relacionados con la capacidad para utilizar metanol (Cos *et al.*, 2006; Li, *et al* 2007; Serrano-Rivero *et al.*, 2016). El fenotipo Mut<sup>+</sup> posee un crecimiento en metanol igual al de la cepa silvestre, ya que porta los genes AOX1 y AOX2 funcionales. El fenotipo Mut<sup>s</sup> que poseen un lento crecimiento en presencia de metanol respecto a la cepa silvestre, a causa de que sólo el gen AOX2 se encuentra funcional. Por último, el fenotipo Mut<sup>-</sup> de *Pichia pastoris* que no pueden emplear el metanol como fuente de carbono y energía, ya que poseen a los genes AOX1 y AOX2 inactivados. Las cepas de *P. pastoris* utilizadas para la expresión

de proteínas heterólogas se derivan de la cepa silvestre *P. pastoris* NRRL-Y 11430 (Serrano-Rivero *et al.*, 2016). La mayoría tienen mutaciones en el gen que codifica para la enzima histidinol deshidrogenasa (His4) que las hace incapaces de sintetizar el aminoácido histidina como se muestra en la tabla 2. También existen varios vectores de expresión disponibles, que contiene un origen de replicación para el mantenimiento en *E. coli* y marcadores de selección (Serrano-Rivero *et al.*, 2016). Estos se componen básicamente de un promotor, un sitio de clonaje múltiple (SCM) con uno o más sitios de restricción para la inserción del gen heterólogo, un terminador transcripcional, un marcador de selección que puede ser usado en *E. coli*, *P. pastoris* o en ambos y opcionalmente una secuencia que codifica para una péptida señal (FAT- $\alpha$  ó PHO5) entre el promotor y el SCM para la secreción de la proteína heteróloga hacia el medio de cultivo. (Tabla 3).

**Tabla 2. Cepas de *Pichia pastoris* utilizadas en la expresión de proteínas recombinantes**

Cepa	Genotipo	Fenotipo	Características
Y-11430	Silvestre	Silvestre	Consumo de metanol alto
X-33	Silvestre	Silvestre	Consumo de metanol alto
GS115	<i>his 4</i>	Mut <sup>+</sup> , His <sup>-</sup>	Consumo de metanol alto, auxótrofa a histidina
KM71	<i>his4, arg4aox1::ARG4</i>	Mut <sup>s</sup> , His <sup>-</sup>	Consumo de metanol bajo, auxótrofa a histidina
MC100-3	<i>his4, arg4, aox1::SARG4, aox2::PHIS4</i>	Mut, His <sup>-</sup>	Incapaz de consumir el metanol, auxótrofa a histidina
SMD1168	<i>pep4, his4</i>	Mut, His <sup>-</sup> deficiente en proteasas	Consumo de metanol alto, auxótrofa a histidina, no produce proteinasa A
SMD1165	<i>prb1, his4</i>	Mut <sup>+</sup> , His <sup>-</sup> deficiente en proteasas	Consumo de metanol alto, auxótrofa a histidina, no produce proteinasa B
SMD1163	<i>pep4, prb1, his4</i>	Mut <sup>+</sup> His <sup>-</sup> deficiente en proteasas	Consumo de metanol alto, auxótrofa a histidina, no produce proteinasa A, proteinasa B, ni carboxipeptidasa Y

**Tabla 3 Vectores de expresión**

Nombre del Vector	Marcadores seleccionables	Características
Vectores para expresión intracelular		
pHIL-D2	<i>HIS4</i>	<i>NotI</i> sitios para el reemplazo del gen <i>AOX1</i>
pAO8015	<i>HIS4</i>	Sitios <i>Bam</i> HI y <i>Bgl</i> II que flanquean el cassette de expresión para la generación del vector de expresión multicopia
pPIC3.5K	<i>HIS4</i> y <i>kan<sup>r</sup></i>	Sitio de clonación múltiple para la inserción de genes extraños; Selección G418 para cepas multicopia
pPic3.5	<i>HIS 4</i>	Sitio de clonación múltiple para la inserción de genes extraños. Gen de resistencia Ampicilina.
pPICZ	<i>ble<sup>r</sup></i>	Sitio de clonación múltiple para la inserción de genes extraños; potencial para la fusión de proteínas extrañas a etiquetas de epítomos His6 y myc; selección de zeocina para cepas multicopia.
pPIC6	<i>bsd<sup>r</sup></i>	Similar a pPICZ, excepto la resistencia a blasticidina utilizada para la selección directa de cepas multicopia
pGAPZ	<i>ble<sup>r</sup></i>	Expresión controlada por el promotor de GAP constitutivo: sitio de clonación múltiple para la inserción de genes extraños; Selección de zeocina para cepas multicopia; potencial para la fusión de proteínas extrañas a etiquetas de epítomos His6 y myc.
Vectores para la expresión secretada		
pHIL-S1	<i>HIS4</i>	AOX1p fusionado a la señal de secreción de PHO1; Sitio <i>XhoI</i> , <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i> disponible para la inserción de genes extraños.
pPIC9K	<i>HIS4</i> y <i>kan<sup>r</sup></i>	AOX1p fusionado a la secuencia <i>kan<sup>r</sup></i> de la señal prepro de $\alpha$ -MF; Sitios <i>EcoRI</i> , <i>NotI</i> , <i>SnaBI</i> y <i>AvrII</i> disponibles para la inserción de genes extraños; Selección G418 para cepas multicopia.
pPICZ $\alpha$	<i>ble<sup>r</sup></i>	AOX1p fusionado a la secuencia señal prepro de $\alpha$ -MF; sitio de clonación múltiple para la inserción de genes extraños; potencial para la fusión de proteínas extrañas a etiquetas de epítomos His6 y myc; Selección de zeocina para cepas multicopia.
pPIC6 $\alpha$	<i>bsd<sup>r</sup></i>	Similar a pPICZ $\alpha$ excepto resistencia a blasticidina Invitrogen utilizado para selección directa de cepas multicopia.
pGAPZ $\alpha$	<i>ble<sup>r</sup></i>	GAPp fusionado a la secuencia de señal prepro de $\alpha$ -MF sitio de clonación múltiple para la inserción de genes extraños; potencial para la fusión de proteínas extrañas a etiquetas de epítomos His6 y myc; Selección de zeocina para cepas multicopia.

Ridder *et al.*, 1995 informaron el primer resultado exitoso de la producción de anticuerpos en *P. pastoris* obteniendo un rendimiento superior a 100mg/L. Spadiut *et al.*, 2014 mencionan que ya se encuentran en el mercado dos fragmentos recombinantes de anticuerpos terapéuticos: Nanoanticuerpo ALX0061, que es un fragmento de anticuerpo de dominio único recombinante anti-receptor de IL6 utilizado para el tratamiento de la artritis reumatoide, y Nanoanticuerpo<sup>®</sup> ALX00171, un fragmento de anticuerpo de dominio único anti-RSV recombinante utilizado para el tratamiento de la infección por el virus sincicial respiratorio (VSR). En la producción de proteínas heterólogas se ha utilizado el etiquetado de las proteínas con parejas de fusión de polipéptidos o etiquetado de afinidad, es un método útil para facilitar la posterior purificación y detección de proteínas. A menudo hay una preferencia por la selección de una etiqueta de afinidad corta que pueda fusionarse con el gen objetivo más fácilmente utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Abel *et al.*, 1996 y Nygren *et al.*, 1994). Algunos ejemplos de etiquetas de afinidad de péptidos pequeños de uso común son poli-arginina (Arg), poli-histidina (His), myc y FLAG (Terpe, 2003). Las etiquetas de poli-histidina (etiquetas His), que contienen entre dos (His 2) y diez (His 10) residuos de histidina, se encuentran entre las etiquetas de afinidad más comunes utilizadas para la purificación de proteínas. El etiquetado con His implica la adición de un número elegido de histidinas al extremo N o C de la proteína recombinante (Debeljak *et al.*, 2006). La ubicación elegida de la etiqueta His es específica de la proteína y depende de las modificaciones posteriores a la traducción de la proteína (por ejemplo, la eliminación del péptido señal N-terminal, la digestión parcial C-terminal. Uno de los problemas para detección de la proteína en particular durante la selección de transformantes con un tag de Myc y/o His es a los niveles de expresión del gen recombinante (Ahmad *et al.*, 2014). Debeljak *et al.*, 2006 hicieron la detección de proteínas recombinantes con etiquetas His6 utilizando un anticuerpo monoclonal anti-Epo preparado por ellos y así como con cuatro anti-his comerciales. De entre los cuatro anticuerpos anti-His-tag empleados, solo Tetra-His (Qiagen) detectó confiablemente las proteínas

marcadas con His en transferencias de Western SDS-PAGE del medio adicionado concentrado, pero no purificado.

## 2.5 ANTECEDENTES DIRECTOS

Hace trece años Riaño-Umbarila y colaboradores en 2005, generaron una librería de scFv a través de RT-PCR, a partir de RNA obtenido de linfocitos B de sangre periférica humana, para identificar posibles anticuerpos anti-Cn2. La librería comprendió un total de  $1.2 \times 10^8$  miembros, de los cuales solo dos fragmentos scFv mostraron afinidad por la toxina Cn2 éstos fueron: scFv 3F y scFv C1, de *Centruroides noxius*, ambos con una constante de afinidad en el rango de  $10^{-7}$  M que es baja para neutralizar la toxina Cn2. Mediante las técnicas de evolución dirigida y despliegue en fagos se generaron mutantes con mejores propiedades de afinidad y/o estabilidad. Después de tres ciclos de evolución dirigida a partir del scFv 3F, se obtuvo como resultado el fragmento scFv 6009F con un nivel de afinidad de 446 veces más que el parental scFv3F, además fue capaz de neutralizar  $2LD_{50}$  del veneno completo de *C. noxius* mientras que la evolución dirigida de scFv C1 no tuvo éxito (Riaño-Umbarila *et al.*, 2005).

Después se demostró que scFv6009F presento una reactividad cruzada, es decir reconoce a diferentes toxinas como las toxinas Cn3, Css2, Css4 de interés clínico también, esto se debe a la alta identidad compartida por estas toxinas (Riaño-Umbarila *et al.*, 2011). En la figura 6 se muestra un alineamiento de las principales toxinas CII1 y CII2 de *C. limpidus*, Cn2 y Cn3, de *C. noxius*, Css2 y Css4 *C. suffusus*, los asteriscos muestran los aminoácidos conservados, punto y coma indican conservación de identidad y propiedades fisicoquímicas, espacios en blanco indican residuos diferentes.

```

1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....
C111 KEGYIVNLSTGCKYECYKLGDN DYCLRECKQQY GKGAGGYCYAFGCWCTHLYEQAVVWPLPKKTC
C112 KEGYIVNHSTGCKYECFKLGDNDYCLRECKQQY GKGAGGYCYAFGCWCNHL YEQAVVWPLPKKTCN
Cn2  KEGYIVDKNTGCKYECLKLGDN DYCLRECKQQY GKGAGGYCYAFACWCTHLYEQAI VWPLPNKRCS
Css2 KEGYIVSKSTGCKYECLKLGDN DYCLRECKQQY GKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNKTCN
Css4 KEGYIVNSYTGCKFECFKLGDNDYCLRECRQQY GKGSSGGYCYAFGCWCTHLYEQAVVWPLPNKTCN
Cn3  KEGYIVELGTGCKYECFKLGDNDYCLRECKARYGKGAGGYCYAFGCWCTQLYEQAVVWPLKKNKTCR
****;* , ****;* * *****; ;*** , ;***** ,*** , ;*****;**** ;* *

```

Figura 5. Alineamiento de las toxinas de los alacranes *C. limpidus*, *C. noxius*, y *C. suffusus*.

Algunas observaciones sugirieron que el fragmento scFv 3F presento propiedades útiles para generar anticuerpos con actividad neutralizante contra las toxinas de alacrán, por lo tanto, se realizaron tres ciclos de evolución dirigida para madurar scFv 3F y así surgió el fragmento 9004G capaz de neutralizar a la toxina C<sub>ss2</sub> y el veneno completo de *C. suffusus*, además de C<sub>n2</sub> y el veneno completo de *C. noxius*. Por lo que el scFv 9004G tiene el mismo potencial de reconocimiento de su parental y comportamiento análogo al de scFv 6009F. Las propiedades de estas variantes de anticuerpos son similares, pero no idénticas.

Ambos fragmentos presentan la misma mutación N74D esta mutación indica que es relevante para el reconocimiento de las toxinas C<sub>ss2</sub> y C<sub>n2</sub>. La mutación se encuentra cerca de los CDR pueden ser relevantes para la conformación e interacción con los residuos de los aminoácidos del antígeno.

El fragmento scFv 6009F es mejor como agente neutralizante, mientras que scFv 9004G muestra una expresión más alta con rendimientos de 1.9 mg/L en *E. coli* TG1 mientras que scFv 6009F fue de 1.1 mg/L (Riaño-Umbarila *et al.*, 2011). Estos rendimientos son bajos por lo que se ha estado buscando otra alternativa como sistema de expresión para obtener una alta productividad y buena actividad biológica para poder realizar otros estudios básicos como cristalografía, para poder en un futuro cercano establecer nuevas referencias en la generación de nuevos antivenenos del tipo scFv 6009F.

En nuestro grupo de Investigación se está trabajando con las cepas *P. pastoris* GS115 alto consumo de metanol , KM71 bajo consumo de metanol y X33 cepa silvestre ; empleando los vectores de expresión: a) intracelular: pHILD2, pPicZA y pPIC3.5; y extracelular: pHILS1, pPIC9 y pPICZ $\alpha$ A, en combinacion con diferentes cepas de *P. pastoris* para la expresión del gen scFv 6009 F que codifica para un anticuerpo humanizado, no todas las proteínas de interés son producidas o secretadas por *P. pastoris* por lo que los rendimientos son variables (Tabla 4).

**Tabla 4 Combinaciones entre cepas de *P. pastoris* con los plásmidos compatibles para la expresión intracelular o extracelular que se trabajan en nuestro grupo de investigación.**

<b>Construcción Intracelular</b>	<b>Construcción Extracelular</b>
<i>P. pastoris</i> GS115/pPIC3.5	<i>P. pastoris</i> GS115/pHILS1
<i>P. pastoris</i> GS115/pHILD2	<i>P. pastoris</i> GS115/pPIC9
<i>P. pastoris</i> X-33/pPICZA	<i>P. pastoris</i> GS115/pPICZ $\alpha$ A
<i>P. pastoris</i> KM71/pPIC3.5	<i>P. pastoris</i> KM71/pHILS1
<i>P. pastoris</i> KM71/pHILD2	<i>P. pastoris</i> KM71/pPIC9
	<i>P. pastoris</i> KM71/pPICZ $\alpha$ A
	<i>P. pastoris</i> X-33/pPICZ $\alpha$ A

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El fragmento scFv 6009F fue capaz de neutralizar los efectos de principales toxinas CII1 y CII2 de *C. limpidus*, Cn2 y Cn3, de *C. noxius*, Css2 y Css4 *C. suffusus*. Una de las ventajas que ofrece es que es de origen humano al obtenerse de una librería de fagos que fue mejorada por ciclos de evolución dirigida. A pesar de esto no se han realizado estudios de vida media del anticuerpo, o definido su estructura cristalina. En *E. coli* se obtuvo un rendimiento de producción de 1.1 mg/L de este anticuerpo scFv 6009F por lo que en este trabajo se busca evaluar la expresión del fragmento scFv 6009F en las cepas *Pichia pastoris* GS115 y KM71 empleando el plásmido pPIC3.5 que expresa la proteína intracelularmente para determinar si se puede obtener un mayor rendimiento en comparación con la expresión en *E. coli* y al mismo tiempo se exprese una proteína funcional.

### **4. HIPOTESIS**

La expresión del fragmento scFv 6009F en *Pichia pastoris* en las cepas GS115 y KM71 permitirá obtener un mayor rendimiento de producción de proteína que en *E. coli*.

### **5. OBJETIVO GENERAL**

Expresar el anticuerpo recombinante scFv 6009F en las cepas GS115 y KM71 de *Pichia pastoris* usando el plásmido pPIC3.5.

#### **5.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Expresar el gen scFv 6009F en *Pichia pastoris*.
- Comparar la producción del anticuerpo scFv 6009F en *Pichia pastoris* en las cepas GS115 y KM71.
- Evaluar el reconocimiento del anticuerpo scFv 6009F frente a la toxina Cn2.

## 6. MATERIALES Y METODOS

### 6.1 CEPAS BACTERIANAS

TOP10F' (Invitrogen): Cepa de clonación de *E. coli* TG1 utilizada con los plásmidos pSyn1 y pPIC3.5. Esta cepa contiene el episoma F' que porta el gen de resistencia a tetraciclina y permite el aislamiento del ADN monocatenario de vectores que tiene un origen de replicación f1, también lleva el represor *lacI<sup>q</sup>* para la expresión inducible de los promotores *trc*, *tac* y *lac* que usan IPTG.

#### 6.1.1 CEPAS DE LEVADURAS

**GS115** (Invitrogen): Cepa para la expresión de proteínas en *P. pastoris*, que presenta el genotipo: *his4*, fenotipo: Mut<sup>+</sup> His<sup>-</sup>. Posee el fenotipo *wild type* (wt) para la utilización de metanol, puede crecer tanto en medios ricos como en medios mínimos suplementados con histidina.

**KM71** (Invitrogen): Cepa para expresión en *P. pastoris*. Genotipo: *arg4 his4 aox1::arg4*. Fenotipo Mut<sup>S</sup> Arg<sup>+</sup> His<sup>-</sup>. La inserción del gen *arg4* dentro del gen *aox1* le confiere el fenotipo Mut<sup>S</sup> (Methanol Utilization Slow) por lo que crece lentamente en medios mínimos con metanol como única fuente de carbono. Al igual que la cepa GS115 también es His<sup>-</sup> y necesita el aporte de histidina en el medio de cultivo.

#### 6.1.2 VECTORES DE EXPRESIÓN

**pSyn1**: Es un vector de expresión de 3.178 Kb ver figura 7 en el cual se encuentra en el fragmento scFv 6009F (720pb). Este vector contiene: origen de replicación (*Ecol ori*), un péptido señal (*pelB*), promotor *lac* (*plac*), gen con resistencia a ampicilina (*Amp*), origen de replicación fágico (*M13*), etiqueta de polihistidina (*His tag*) nos permite purificar la proteína marcada usando columna de NI-NTA y una etiqueta Myc de epítipo (*C mcy*) popular para detectar la expresión de proteínas recombinantes en sistemas celulares de levaduras, bacterias, insectos y mamíferos.

**pPIC3.5**: Es un vector de transferencia de 7.8 Kb ver figura 8 para la expresión en *P. pastoris*. El gen de interés se inserta en el sitio de clonado múltiple (*MCS*), entre el promotor y el terminador *aox1*. También posee un origen de *ColE1* que le

permite replicarse en bacterias, contiene un gen de resistencia a ampicilina (Amp) y Gen histidinol deshidrogenasa (HIS4) que le confiere el fenotipo His<sup>+</sup>.

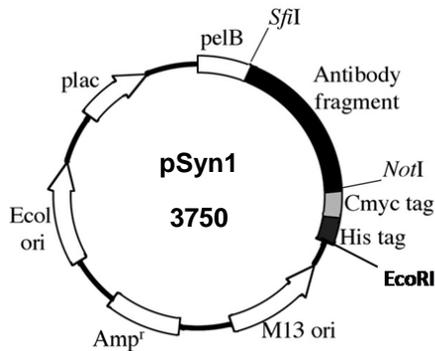


Figura 6. Plásmido pSyn1

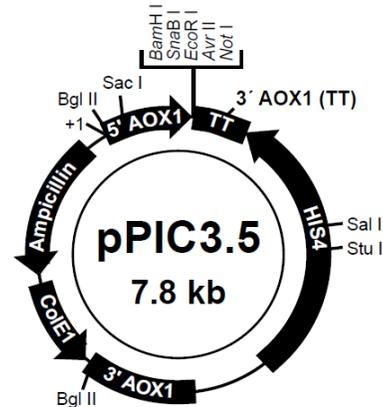


Figura 7. Vector pPIC3.5

## 6.2 PROPAGACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pSyn1 y pPIC3.5

En el plásmido pSyn1 se encuentra el fragmento de interés scFv 6009F (ver secuencia anexo A) fue donado por la Dra. Lidia Riaño del Instituto de Biotecnología- UNAM. Se realizó la transformación de células quimiocompetentes (Anexo B) de *E. coli* TOP10F de los plásmidos pSyn1 y pPIC 3.5 (Invitrogen, 2014), después 2 horas de recuperación las células transformadas se sembraron en medio Luria Bertini (LB) con 100 mg/ml de ampicilina y tetraciclina e incubándose por 24 h a 37°C. Después se seleccionaron las células y se realizó la purificación del plásmido utilizando el Kit Gene JET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific), el cual se verificó mediante un gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µl/ml.

## 6.3 AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO scFv 6009F POR PCR

Para la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del scFv 6009F se realizó reacciones de 50 µl con los componentes como se muestra en la tabla 5 y se usaron los oligonucleótidos específicos previamente diseñados (Tabla 6):

Tabla 5. Componentes de las reacciones de PCR.

Componentes	Volumen
Buffer taq 10x	5.0 µl
Dntp's	5.0 µl
Oligonucleótido Fw 4544	0.6 µl
Oligonucleótido Rv 5895	0.6 µl
MgCl <sub>2</sub>	5.0 µl
Enzima Taq	0.25 µl
ADN	3.0 µl
H <sub>2</sub> O	30.55 µl

Tabla 6. Oligonucleótidos específicos para el scfv 6009F.

Nombre	Secuencia	Especificaciones
Rv 5895	5'GCCCTAGGTTATTAATGGTGATGATGGTG'3	Sitio para la enzima <i>AvrII</i>
Fw 4544	5'TAAGAATTCACCATGGCCGAGGTG'3	Sitio para la enzima <i>EcoRI</i> y el sitio Kozak

Se agregaron los sitios de restricción que nos permitirán hacer la inserción en el plásmido pPIC3.5. El perfil de ciclado para realizar cada PCR se detalla en la siguiente tabla 7:

Tabla 7. Perfil de ciclado de PCR.

Temperatura (°C)	Tiempo(seg)	Ciclos
95.0	45	1
95.0	30	30
69.5	40	
72.0	90	
72.0	600	1

#### 6.4 LIGACIÓN EN EL VECTOR pPIC 3.5

Una vez obtenido el fragmento 6009F y el vector pPIC3.5 se realizó una doble digestión con las enzimas *EcoRI* y *AvrII* durante 2 horas a 37°C y se inactivo a 65°C por 20 min. Después se purificó las digestiones con la ayuda del kit GeneJET PCR Purification (Thermo Scientific). Se corrió un gel de agarosa al 0.8% el cual

se tiñó con bromuro de etidio. Se cuantificó el producto de la purificación para realizar la ligación durante 16 h a 16°C y se inactiva a 65°C durante 10 min como lo muestra la tabla 8.

**Tabla 8. Componentes para ligación del fragmento 6009 y vector 3.5**

Relación molar	3:1	5:1	7:1
Vector	1.0 ul	1.0 ul	1.0 ul
Inserto	0.62 ul	1.03 ul	1.45 ul
Buffer ligasa	2.0 ul	2.0 ul	2.0 ul
Enzima ligasa	1.0 ul	1.0 ul	1.0 ul
H <sub>2</sub> O	15.38 ul	14.97 ul	14.55 ul

Después se realizó la transformación en quimiocompetentes de *E. coli* TOP10F, una vez transformadas se sembraron y seleccionaron en placas de agar LB con ampicilina (100 µg/ml) y tetraciclina (10 µg/ml) obteniendo transformantes. Se seleccionaron al azar para realizar un PCR de colonia con los oligonucleótidos del vector (tabla 9 y 10) y purificar el ADN plasmídico una vez obtenido colonias positivas se mandaron a secuenciar.

**Tabla 9. Oligonucleótidos para el vector pPIC 3.5.**

Nombre	Secuencia
Rv AOX5	5'GCAAATGGCATTCTGACATCC 3'
Fw AOX3	5'GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3'

**Tabla 10. Perfil de ciclado de PCR con los oligonucleótidos del vector.**

Temperatura (°C)	Tiempo(seg)	Ciclos
94	120	1
94	60	25-35
55	60	
72	60	
72	420	1

## 6.5 TRANSFORMACIÓN DE *Pichia pastoris*

La construcción pPIC3.5/6009F se linealizó con *SaI* (tabla 11) para la integración del genoma. Se realizaron células electrocompetentes (Anexo C) de las cepas de

*P. pastoris* GS115 y KM71 una vez obtenidas se transformó mediante electroporación de acuerdo con Invitrogen 2014, para la obtención de las transformantes GS115-pPIC3.5/6009F y KM 71-pPIC3.5/6009F. Las cuales se seleccionaron en medio MD (1.34% YNB,  $4 \times 10^5$  Biotina, 2% Dextrosa) sin histidina, incubando a una temperatura de 28°C durante tres a cuatro días.

**Tabla 11. Linealización con *Sa*II.**

Componente	Volumen
H <sub>2</sub> O	16 µl
10x buffer O	2.0 µl
ADN (0.5- 1.0 ug)	1.0 µl
Enzima <i>Sa</i> II	0.5 µl

## 6.6 ANÁLISIS DE LAS TRANSFORMANTES DE *Pichia pastoris* POR PCR

Para confirmar la integración del gen 6009F en el genoma de las transformantes se realizaron extracciones de ADN genómico (Anexo D) de seis a diez colonias al azar de cada una de las transformaciones y se usaron como controles; ADN genómico extraído de la cepa silvestre y transformada de *P. pastoris* con el vector pPIC9/6009F. Se usarán los oligonucleótidos específicos de pPIC (Invitrogen). Con la ayuda de un gel de agarosa de 0.8% se pudieron observar la integración del gen.

## 6.7 EXPRESION DE SCFV 6009F EN *E. coli* TG1 y *Pichia pastoris* KM71 y GS115

En el caso para la expresión en *E. coli* se utilizó el plásmido pSyn1 en la cepa TG1 la cual se tomó para inocular 500 mL de medio 2XYT (adicionado con 0.1% de glucosa y 200mg/L de ampicilina) a 37°C a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (D.O. <sub>600</sub>) de 0.7 para después inducir con IPTG 1mM a 30°C durante 6 horas, después se centrifuga a 6000 rpm por 10 minutos a 4°C.

Una vez obtenida las transformantes positivas de GS115 y KM71 de *P. pastoris* se cultivaron en el medio BMGY (glicerol % como fuente de carbón) en el cual se cultivaron en 50 ml de medio en matraces bafleados de 250 ml incubados a 28 °C

a 230 rpm hasta que alcanzó una densidad óptica (D.O.<sub>600</sub>) de 2. Después se centrifugaron los cultivos a 1500-3000 g por 5 minutos decantaron el sobrenadante y resuspendió el sedimento celular en medio BMMY (metanol 0.5% como fuente de carbono e inductor) en matraces de 250 ml a una DO<sub>600</sub> de 2.0 se incubó a 28°C a 230 rpm, para la expresión de la proteína se le agregó metanol al 1.0% cada 24 h durante 4 días de incubación. Los cultivos fueron monitoreados para medir crecimiento celular mediante DO<sub>600nm</sub>, tomando una muestra a diferentes tiempos 0, 24, 48, 72 y 96 h y para la detección de la proteína se realizaron electroforesis SDS-PAGE al 12.5% colocando 5 µl de buffer de carga y 20 µl de muestra las cuales se hierven durante 5 minutos y una vez pasado el tiempo se les da un spin para después cargar la muestra en los geles correspondientes (Invitrogen, 2014).

#### **6.8 PURIFICACIÓN DE LA PROTEINA EXPRESADA EN *E. coli* TG1 y *Pichia pastoris* KM71 y GS115**

Una vez recolectado el pellet de *E. coli* TG1 se resuspendió en 12.5 mL en PPB (20% sacarosa, 1mM EDTA y 30mM Tris HCL pH 8) se incubo por 20 minutos en hielo, se centrifugo a 6000 rpm durante 15 minutos, se recupera el sobrenadante, pellet se volvió a resuspender en 12.5 mL de 5 mM MgSO<sub>4</sub> se incubo en hielo por 20 minutos y se centrifugo por 15 minutos a 6000 rpm se recuperó el sobrenadante y se mezcló con el sobrenadante del paso anterior el volumen total fue dializado con PBS 1X a 4°C por toda la noche, después se pasó por la columna de Ni<sup>2+</sup>-NTA (Quiagen, Hilden, Germany) y fue eluída con 250 mM de imidazol.

Para el caso de *Pichia pastoris* antes de la purificación se llevó acabo la lisis celular para extraer la proteína con la ayuda del Breaking Buffer (Invitrogen, 2014). Una vez obtenido el sobrenadante este fue dializado por 24 horas y se pasó por la columna de Ni<sup>2+</sup>-NTA (Quiagen, Hilden, Germany). Fue eluida con 10 mL de 250 Mm imidazol. Para finalmente ser analizado en geles de acrilamida SDS al 12.5%. También se realizó un western blot para observar el reconocimiento de la proteína con la ayuda de anti-His.

## **6.9 CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA**

La cuantificación de proteína total se realizó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se utilizó 10  $\mu$ L de muestra previamente purificada después se le adicionaron 200  $\mu$ L del reactivo de Bradford (Biorad), se dejó reaccionar durante 5 minutos y se leyó la absorbancia a 595 nm. Se usó albúmina sérica bovina como proteína estándar.

## **6.10 TÉCNICA DE WESTERN-BLOT**

La transferencia se realizó a partir de geles SDS-PAGE al 12.5%. Para llevar a cabo la transferencia el gel se retiró de los cristales, la membrana de nitrocelulosa y el papel filtro del mismo tamaño que la membrana se colocaron previamente en buffer de transferencia, después se colocaron en la cámara de transferencia por 40 minutos con un voltaje de 20 V, una vez terminada la transferencia la membrana se colocó en la solución bloqueadora (TBST 1X con 0.5 gramos de leche) con el anticuerpo primario anti-his de conejo durante 1 hora o bien toda la noche en agitación suave y constante. Posteriormente se retiró la solución bloqueadora con 3 lavados de buffer TBST cada lavado de aproximadamente de 5 minutos en constante agitación. Se colocó el anticuerpo secundario durante una o dos horas en agitación y después se le hizo 3 lavados con TBST y finalmente se reveló con TBM y la reacción se paró con agua desionizada.

## **6.11 TÉCNICA DE ELISA PARA EVALUAR EL RECONOCIMIENTO DE scFv 6009F FRENTE A LA TOXINA Cn2**

Se evaluará la capacidad de reconocimiento de scFv 6009F contra la toxina Cn2 de *Centruroides noxius*, se realizará el sensibilizado de la placa de ELISA con 0.3  $\mu$ g de toxina en buffer de bicarbonato a 50 mM (pH 9.5) incubando toda la noche a 4°C, posteriormente se realizarán tres lavados con NaCl/Pi y 0.1% (v/v) Tween, se realizará un bloqueo con 0.5% (p/v) BSA en NaCl/Pi por 2 h a 37°C (Riaño-Umbarilla *et. al.*, 2005). Riaño-Umbarilla *et. al.*, 2011 utilizaron proporciones 1:1 y 1:2 del scFv 6009F para realizar la detección con Anti-myc-HRP Antibody).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 PROPAGACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pSyn1 y pPIC 3.5

Se realizó la transformación en células químicocompetentes de *E. coli* TOP10F con los plásmidos pSyn1 y pPIC3.5 para su mantenimiento. Las células de *E. coli* TOP10F- pSyn1 y *E. coli* TOP10F - pPIC3.5 se sembraron en medio Luria Bertini (LB) con 100 µg/ml de ampicilina y 10 µg/ml tetraciclina obteniendo clonas positivas, para *E. coli* TOP10F con ambos plásmidos, como se muestra en la imagen figura 9. Los cultivos se dispensaron en tubos Eppendorf 1.5 ml se centrifugaron y se les agregó glicerol al 15 % para su preservación a -80 grados centígrados

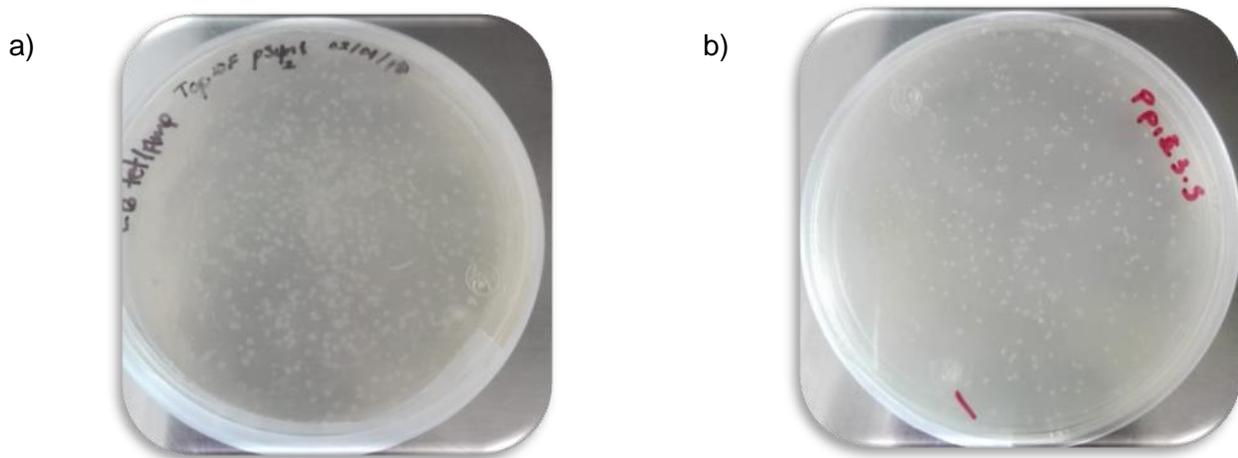


Figura 8. Transformantes de *E. coli* con los plásmidos: a) pSyn1 y b) pPIC3.5.

Después se realizó la purificación de plásmido con el Kit Gene JET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific) y se corrió un gel con las siguientes muestras: carril 1 el marcador de 1 Kb, en los carriles 2, 3, 4 y 5 se observa una banda de 3750 pb que corresponde al plásmido pSyn1 (Figura 10 a) y una banda de 7,800 pb correspondiente al plásmido pPIC3.5 (Figura 10 b). Además, se pueden observar otras bandas por arriba de las bandas de interés, esto se debe a que el ADN se encuentra en diferentes formas: superenrolladas, relajadas y la lineal. La forma super enrollada son más compactas, su volumen es menor y se pueden mover con mayor facilidad a través del gel, mientras que las formas relajadas y lineales

avanzan más lentamente que las superenrolladas. Sin embargo, las moléculas lineales avanzan un poco más rápido que la forma relajada.

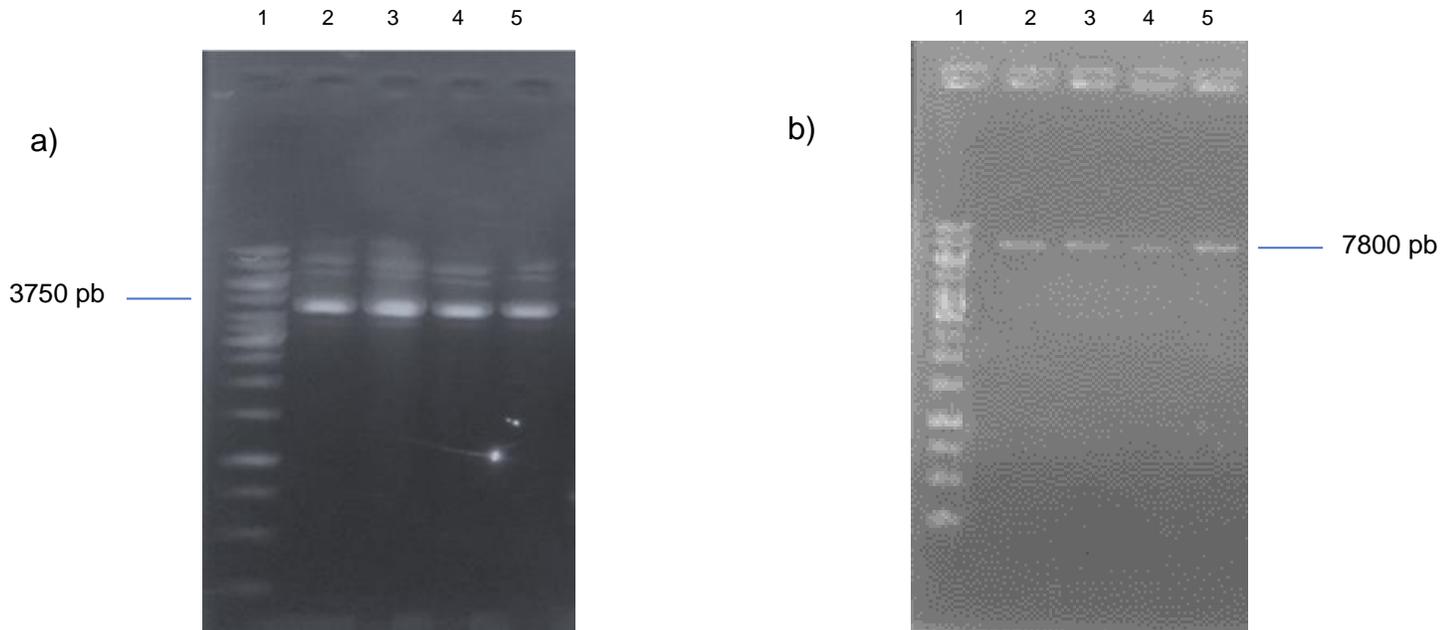
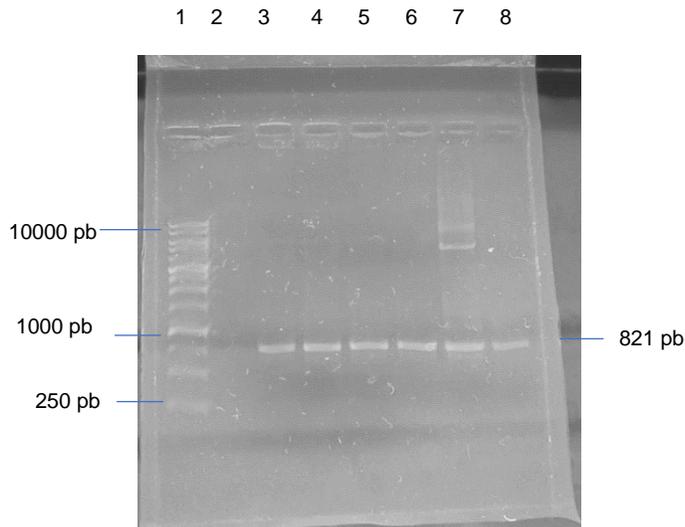


Figura 9. Purificación de plásmidos: a) pSyn1 y b) pPIC3.5.

## 7.2 OBTENCIÓN DEL FRAGMENTO 6009F

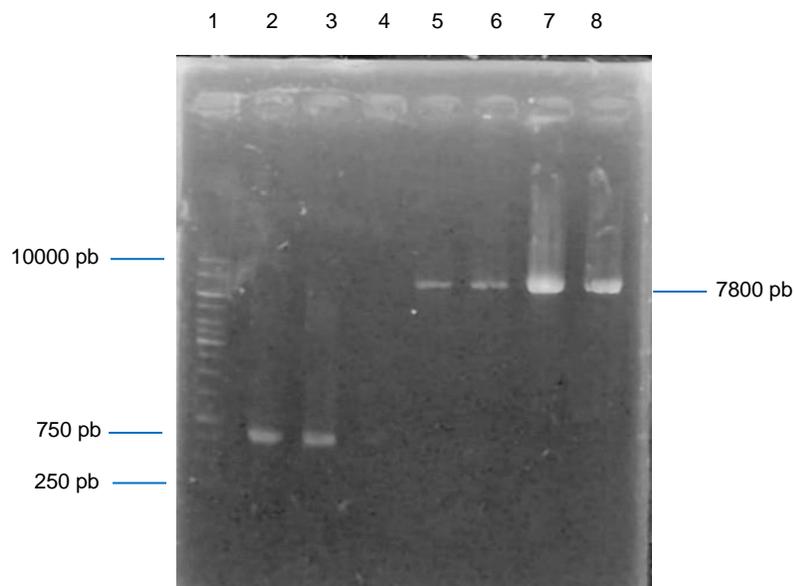
Una vez que se obtuvo el plásmido de pSyn1 se realizó un PCR para obtener el fragmento 6009F. Se utilizaron los oligonucleótidos previamente diseñados: Fw: 4544, Rv 5895 (tabla 6) y una taq de alta fidelidad (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase), utilizando 0.5  $\mu$ l de la enzima para evitar la introducción de errores. Después se realizó un gel de agarosa con las muestras: en el carril 1 el marcador de 1 Kb, en los carriles 3, 4, 5, 6, 7, 8 el fragmento de interés la banda de 821 pb, lo cual se muestra en la figura 11.



**Figura 10. Amplificación del fragmento 6009F**

### 7.3 LIGACIÓN EN EL VECTOR pPIC 3.5

Una vez obtenido el fragmento 6009F y el vector pPIC3.5 se realizó una doble digestión con las enzimas *EcoRI* y *AvRII* durante 2 horas a 37°C y se inactivo a 65°C por 20 min. Las digestiones fueron se purificadas con el kit para verificar se corrió un gel de agarosa: en el carril 1 el marcador de 1 Kb, en los carriles 2, 3, se muestra la banda de 821 pb corresponde al fragmento 6009F y en los carriles: 5, 6, 7, 8 se observa la banda que corresponde al vector pPIC3.5 de 7800 pb (Figura 11).



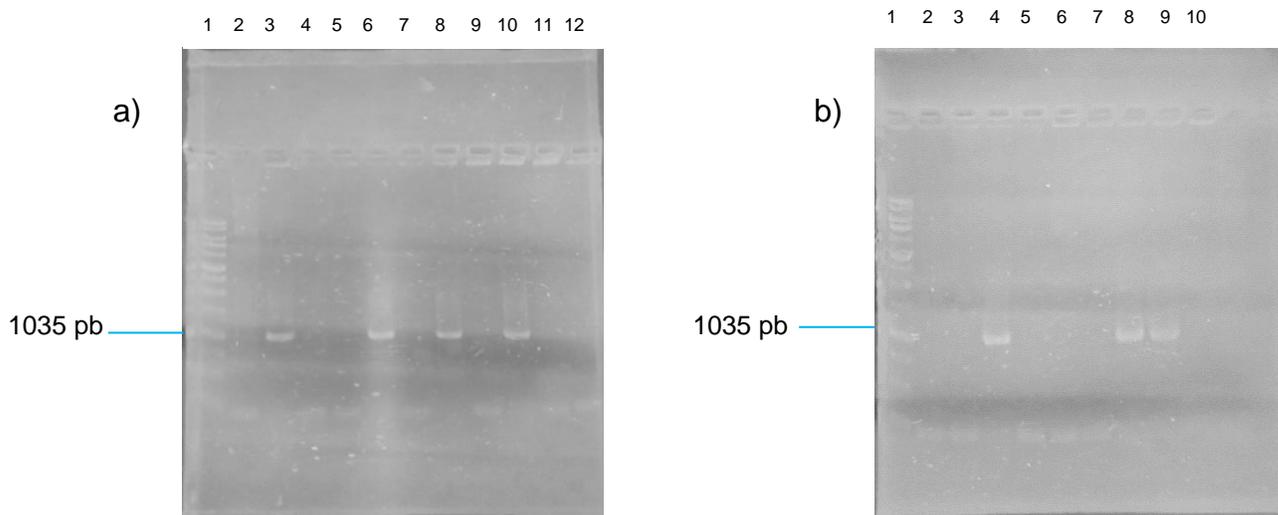
**Figura 11. Fragmento 6009F y vector pPIC3.5 digerido con las enzimas *EcoRI* y**

Una vez visualizando las bandas en el gel de agarosa se procedió a cuantificar el producto por nanodrop para obtener las concentraciones que se muestran en la tabla, para después estimar las concentraciones (Tabla 12) a utilizar para la reacción de ligación se utilizó el programa NEBioCalculator. (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>)

**Tabla 12. Concentraciones del plásmido pPic3.5 y el gen scFv6009F**

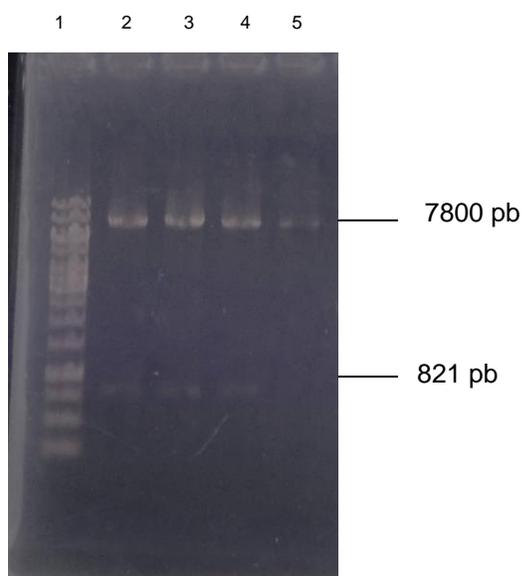
<b>Muestra</b>	<b>Concentración <math>\mu\text{g/mL}</math></b>
<b>Vector pPIC3.5</b>	87.2
<b>Vector pPIC3.5</b>	62.4
<b>Fragmento 6009F</b>	42.3
<b>Fragmento 6009F</b>	39.0

Inmediatamente terminada la reacción de ligación se realizó la transformación en la cepa de *E. coli* Top10F dejándolas crecer a 37°C. Una vez obtenidas transformantes se tomaron 19 colonias al azar para realizar un PCR de colonia con los oligonucleótidos del vector pPIC3.5. Después se realizó un gel de agarosa: en la figura 12 a: carril 1 el marcador de 1 Kb, carril 2 control negativo (vector pPIC3.5 sin inserto), en los carriles 3, 6, 8 y 10 clonas positivas obteniendo una banda de 1035 pb. En la figura 12 b se muestra en el carril 1 el marcador de 1Kb y en los carriles 4, 8, 9 las clonas positiva. Obteniendo en ambos geles un total de 7 clonas positivas. Las colonias positivas se pasaron en medio líquido Luria Bertini (LB) con 100  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina y 10  $\mu\text{g/ml}$  tetraciclina durante la noche a 37°C, para después realizar la purificación de plásmido con la ayuda del kit GeneJet comercial, se realizó la purificación de plásmido, se visualizó en un gel de agarosa al 0.8% y se observaron las bandas esperadas de 8600 pb aproximadamente.



**Figura 12. Se obtuvieron colonias positivas verificadas con los oligonucleótidos del vector pPIC3.5 en: a) En los carriles 3, 6, 8 10; y b). en los carriles 4, 8 y 9**

Una vez obtenido la purificación de plásmido se cuantificó en nanodrop y se realizó una doble digestión para observar la liberación del fragmento 6009F y el vector pPIC3.5 figura 13. Se muestra en el carril 1: el marcador 1Kb, en los carriles 2, 3, 4 la liberación del fragmento 6009F y por último en el carril 5: control negativo). Después de visualizar la liberación correcta del fragmento 6009F, se mandó a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del IBT-UNAM. Se envió a secuenciar una de las clonas positivas, se utilizaron 11  $\mu$ l de muestra, 1  $\mu$ l del oligonucleótido y 4  $\mu$ l de agua dando un volumen final de 16  $\mu$ l.



**Figura 13. Liberación del Fragmento 6009F**

Para realizar el análisis de las secuencias se utilizó la herramienta BLAST de la plataforma NCBI, para poder determinar la identidad de la secuencia con la del gen original scFv 6009F, el resultado da un 100% de identidad con la secuencia del fragmento 6009F reportada por Riaño-Umbarila en el 2011 (Figura 14).

single chain Fv antibody 6009F, partial [synthetic construct]  
 Sequence ID: [AAX11169.1](#) Length: 240 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 240 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
481 bits(1237)	1e-171	Compositional matrix adjust.	240/240(100%)	240/240(100%)	0/240(0%)
Query 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFDNYAMHWIRQVPGEGLEWVSGISRGSIGDY			60	
Sbjct 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFDNYAMHWIRQVPGEGLEWVSGISRGSIGDY			60	
Query 61	ADSVKGRFTISRDDAKKSLSLQMNSLRAEDTAVYYCARGGFGSFDTWGQGTMTVSSGGG			120	
Sbjct 61	ADSVKGRFTISRDDAKKSLSLQMNSLRAEDTAVYYCARGGFGSFDTWGQGTMTVSSGGG			120	
Query 121	GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSVSPGERAILSCRASQSVRSFLAWYQQKPGQAPRLLI			180	
Sbjct 121	GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSVSPGERAILSCRASQSVRSFLAWYQQKPGQAPRLLI			180	
Query 181	SDASNRATGIPARFTGGGSGTDFTLTISSLEPEDFAIYYCQYRYSPTFGQGTKVEIKR			240	
Sbjct 181	SDASNRATGIPARFTGGGSGTDFTLTISSLEPEDFAIYYCQYRYSPTFGQGTKVEIKR			240	

**Figura 14. Alineamiento con el programa BLAST.**

Cabe mencionar que la secuencia de la primera construcción se secuenció con los oligonucleótidos específicos del gen y con los oligonucleótidos del vector. El análisis de la secuencia mediante un BLAST dio como resultado un 99% de identidad. Sin embargo, hubo un cambio de un nucleótido en la secuencia como se muestra en la figura 16. Por lo que se volvió a realizar un PCR con enzima Taq polimerasa de alta fidelidad (Phusion) la cual tiene 50 veces mayor fidelidad que la Taq. Y con esta muestra se obtuvo un 100% de identidad con el gen depositado (Figura 15). en el Gene Bank.

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

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

Range 1: 1 to 240		<a href="#">GenPept</a>	<a href="#">Graphics</a>	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
479 bits(1232)	1e-170	Compositional matrix adjust.	239/240(99%)	240/240(100%)	0/240(0%)
Query	1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFDNYAMHWIRQVPGEGLWVSGISRGSIGY		60	
Sbjct	1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFDNYAMHWIRQVPGEGLWVSGISRGSIGY		60	
Query	61	ADSVKGRFTISRDDAKKSLSLQMNLSLAEDTAVYYCARGGF65FDTWGGTMVTVSSGGG		120	
Sbjct	61	ADSVKGRFTISRDDAKKSLSLQMNLSLAEDTAVYYCARGGF65FDTWGGTMVTVSSGGG		120	
Query	121	GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSVSPGERAILS CRASQSVRSFLAWYQKPGQAPRLLI		180	
Sbjct	121	GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSVSPGERAILS CRASQSVRSFLAWYQKPGQAPRLLI		180	
Query	181	SDASN RATGIPARFTGGGSGDFTLTISLPEPFAIYYCQYRYSRPTFGGTEV EIKR		240	
Sbjct	181	SDASN RATGIPARFTGGGSGDFTLTISLPEPFAIYYCQYRYSRPTFGGTEV EIKR		240	

**Figura 15. Alineamiento de la secuencia en color rojo se muestra el cambio.**

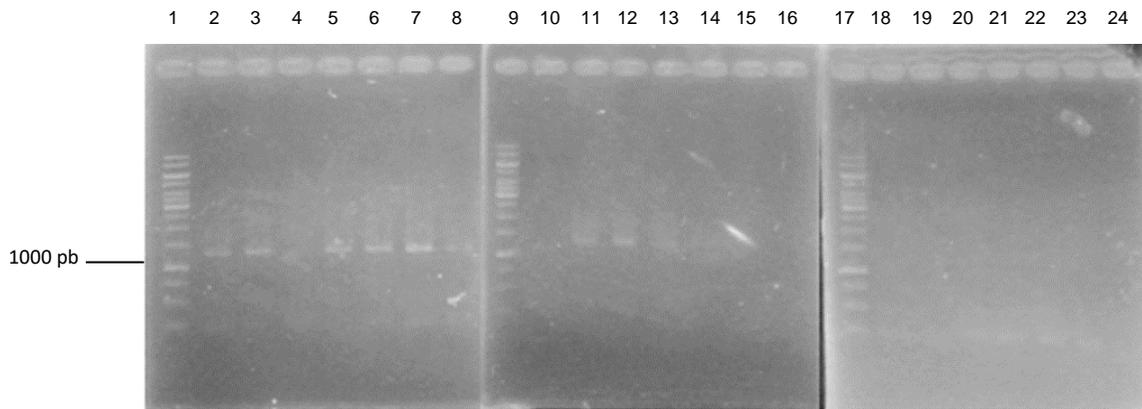
El PCR es un paso fundamental en la preparación de muestras de ADN para la secuenciación. Porque puede haber errores asociados a la amplificación por PCR. Potapov y Ong en el 2017, mencionan que una fuente de error durante el PCR es debido a los errores de las polimerasas en sí, estos se vuelven muy comunes en los ciclos posteriores del PCR. La polimerasa comete errores que incluyen sustituciones de un solo nucleótido o en menor velocidad, pequeñas inserciones o deleciones (Eckert y Kunkel, 1991). La baja fidelidad de la Taq polimerasa tiene consecuencias para muchas aplicaciones de la PCR. La Taq polimerasa carece una actividad exonucleasa 3'-5' y por lo que es incapaz de corregir los nucleótidos mal incorporados que se producen durante la síntesis del ADN. Por lo que se ha desarrollado polimerasas de alta fidelidad. McInerney *et al.*, 2014, realizaron un estudio con seis enzimas Taq polimerasas (Taq polymerase, AccuPrime-Taq High Fidelity, KOD Hot Start, cloned Pfu polymerase, Phusion Hot Start, and Pwo polymerase) para determinar la fidelidad, sus resultados indican que las polimerasas Pfu, Pwo y Phusion Hot Start producen niveles de mutaciones bajos en comparación de la Taq polimerasa.

#### **7.4 TRANSFORMACIÓN DE *Pichia Pastoris***

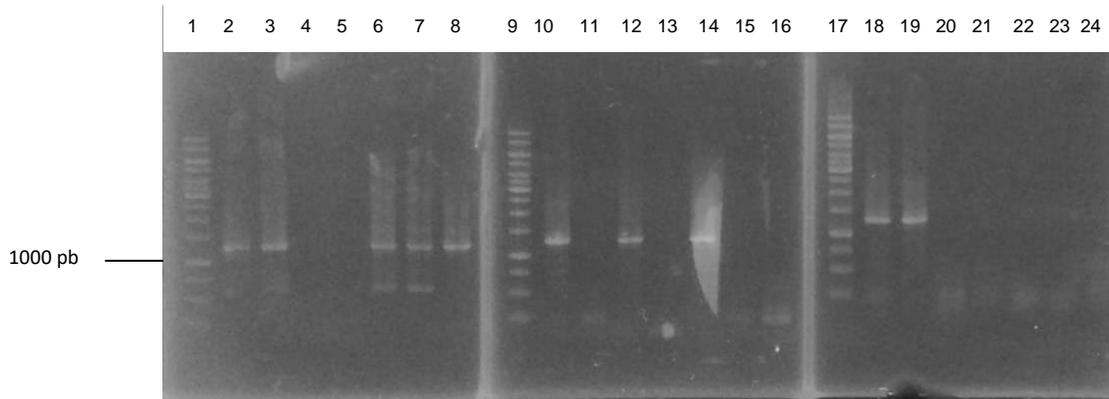
Se utilizaron células electrocompetentes de las cepas de *P. pastoris* GS115 y KM71 utilizando 2 µg de la construcción pPIC3.5/6009F linealizada previamente con la enzima *Sall*, se transformó *Pichia pastoris* mediante electroporación de acuerdo con el manual de Invitrogen 2014. Para la obtención de las transformantes se sembraron 300 µl y 100 µl a una concentración de células de  $1 \times 10^9$  electroporadas en placas de medio MD (1.34% YNB,  $4 \times 10^5$  Biotina, 2% Dextrosa) sin histidina, incubando a una temperatura de 28°C durante tres a cuatro días así obteniendo transformantes.

#### **7.5 ANÁLISIS DE LAS TRANSFORMANTES DE *Pichia pastoris* POR PCR**

Se tomaron 20 transformantes al azar de cada de cepa, se pasaron a placas y liquido de medio YPD para realizar la extracción de ADN genómico (Anexo D). Una vez terminada la extracción de ADN genómico se realizó el PCR con ayuda de los oligonucleótidos específicos del vector pPIC3.5, después se realizaron geles de agarosa al 0.8% para poder observar la banda espera de 1000 pb aproximadamente. En la figura 16 se muestran tres geles donde se analizaron 27 colonias de las cuales solo 7 fueron clonas positivas de la cepa *P. pastoris* KM71. En la figura 16 se encuentran en los carriles: 1, 9 y 17 el marcador de peso molecular, en los carriles 2, 3, 5, 6, 7, 8, 11,12 las clonas positivas, en el carril: 13 el control positivo y por último los carriles 5, 10 y del 14 al 24 las clonas negativas. En la figura 16 se muestran los resultados de la cepa GS115, se obtuvieron 10 clonas positivas como se muestra en la figura 17, en los carriles 1, 9 y 17 los marcadores de peso molecular, en los carriles 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 18 y 19 las clonas positivas, en los demás carriles las clonas negativas.



**Figura 16. Clonas positivas de la cepa *P. pastoris* KM71.**



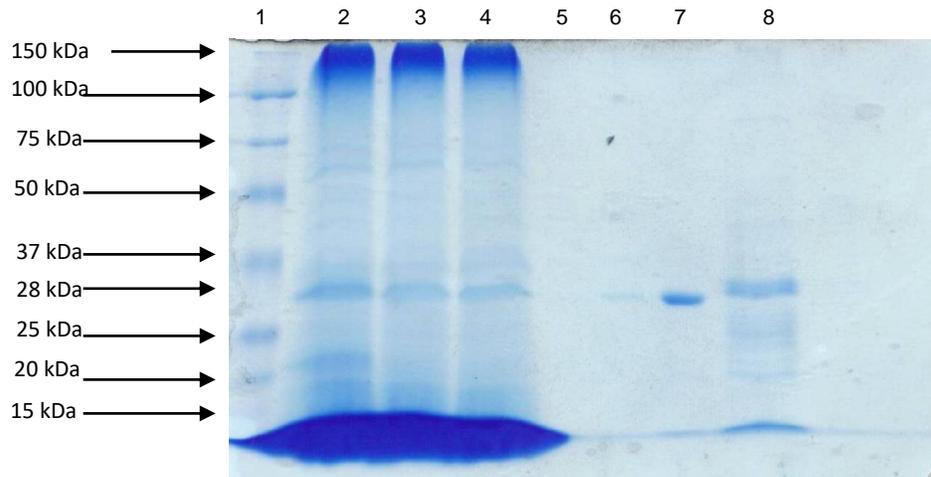
**Figura 17. Clonas positivas de la cepa GS115.**

## **7.6 EXPRESION Y PURIFICACIÓN DE scFv 6009F EN *Pichia Pastoris***

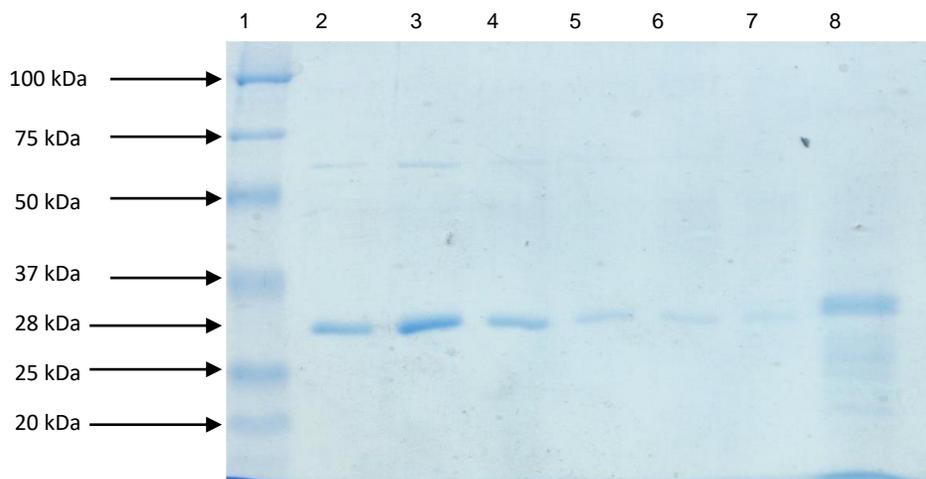
Una vez obtenida las clonas positivas se realizó la expresión de la clona KM71 pPIC3.5/6009F, cultivando la cepa transformada en 50 ml del medio BMMY (metanol 1.0% como fuente de carbono e inductor) ajustándose la absorbancia a una  $DO_{600}$  de 2.0. El cultivo se incubó a 28°C a 200 rpm en matraces de 250 ml en el pre-inóculo y se llevó a matraces bafleados de 500 ml para la expresión de la proteína, induciendo con metanol al 1.0% cada 24 h por 90 horas de incubación. Los cultivos fueron monitoreados para medir crecimiento celular mediante  $DO_{600nm}$ , tomando una muestra a diferentes tiempos 0, 24, 48, 72, y 90 h.

La muestra final se colocó en tubos Falcon de 50 ml para centrifugarse a 3000 g por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet resuspendió en 10 ml de breaking buffer (Triton x100 al 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM y Tris Cl 10 mM) después se pasó en la prensa francesa a 40 Kpsi, una vez recolectado el lisado se

dializó durante toda la noche y se pasó por la columna de Ni<sup>2+</sup>-NTA (Quiagen, Hilden, Germany) cual fue calibrada con PBS 1X, se hicieron lavados con diferentes concentraciones de imadazol: 10mM, 25mM, 40mM, 70mM y fue eluida en 250 Mm imidazol. Finalmente fueron analizados en geles de acrilamida SDS al 12.5%, en donde se pudo observar una banda de 28 kDa correspondiente al peso del scFv 6009F. En la figura 18 en el carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: Lisado celular, carril 3: recirculante, carril 4: lavado PBS 1X , carril 5: lavado con 10 mM de imidazol, carril 6: lavado con 25 de imidazol, carril 7: lavado con 40 mM y carril 8: control positivo KM71 pPIC9/6009F. En la siguiente figura 19 carril 1: marcador de peso molecular, en los carril del 2 al 7 son eluciones con 250 mM de imidazol, el carril 8: control positivo.

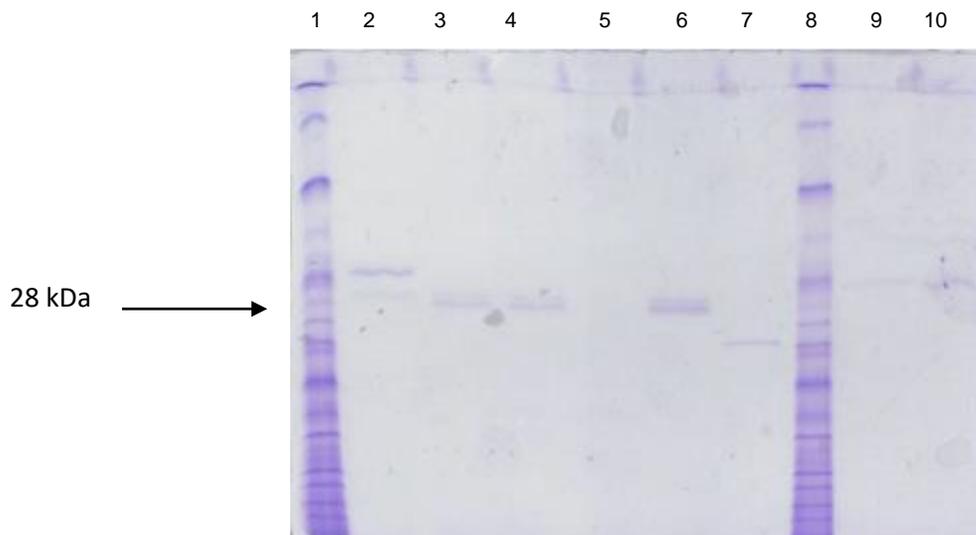


**Figura 18. Gel de SDS al 12.5% lavados con PBS.**



**Figura 19. Eluciones con imidazol en *P. pastoris* Km71/pPic3.5**

Se purificó el scFv 6009F por columna de níquel para montar la técnica, con las muestras se mantuvieron a 4°C durante 48 horas. Se realizaron geles de acrilamida SDS al 12.5% para luego correr un western blot. El resultado mostro que no hubo reconocimiento por el anticuerpo anti-His, no es claro porque sucedió esto, puede ser que a la temperatura de almacenamiento se presentara una proteólisis que removiera la tag de His, ya que no fue reconocido por el anticuerpo de His. Esta cepa *P. pastoris* KM71 tiene la proteínasa A que pudo haber cortado la cola de Histidinas (Jones, 1991, Shin *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007). Otra causa es que la cola de histidinas no sea accesible al anticuerpo por cómo se plegó la proteína. Posteriormente a las 48 h, se repitió el gel SDS PAGE con las muestras a las mismas condiciones, pero esta vez no se pudo observar en el gel SDS PAGE la muestra, parecería que la proteína estuviera completamente degradada (Figura 20). En dicha figura se muestra en el carril: 1 Marcador de peso molecular, carril: 2 control positivo scFv 6009F producido por *E.coli*, carriles: 3, 4, 6 KM71 pPIC9/6009F, carril 5: KM71 pPIC3.5/6009F, carril 7 KM71 pPICZA $\alpha$ /6009F proteína degradada, carril 8 marcador de peso molecular y por último en los carriles 9 y 10 X-33 pPICZA $\alpha$ /6009F.



**Figura 20.** Gel SDS PAGE al 12.5% muestras y controles de expresiones en *P. pastoris*

Se realizo la cuantificación de proteína total de la muestra pPIC3.5/6009F en KM71 en la tabla 13 se observa los resultados, en lo que se pude observar durante todo el proceso se va perdiendo proteína. La muestra de elución a 250 mM no se pudo determinar la proteína ya que la muestra se encontraba degradada.

**Tabla 13 Cuantificación de proteína total de la cepa KM71**

Muestras cepa KM71	Concentración mg/L
<b>Sobrenadante del Lisado</b>	1965
<b>Después diálisis</b>	1364
<b>Recirculante</b>	959
<b>Lavado PBS</b>	540
<b>Elución 250 mM imidazol</b>	Sin determinar

Se realizo otra expresión usando las clonas positivas KM71 pPic3.5/6009F y GS115 pPic3.5/6009F, sin embargo, en este experimento no se pudo mantener la temperatura estable a 28°C. Las muestras obtenidas se lisaron con un sonicador: un ciclo de 10 segundos de 30% de sonicación de amplitud, seguido de 10 segundos de descanso por tres veces, utilizando breaking buffer, se centrifugaron a 13000 rpm durante 4 minutos debido a que la proteína es intracelular. Se realizo gel electroforesis SDS-PAGE al 12.5%. del lisado de *P. pastoris* KM71 pPIC3.5/6009F. En las figuras 21 y 22 se muestran en carriles 1: marcador de peso molecular, carriles 2: tiempo 0, carriles 3: tiempo 24, carriles 4: tiempo 48, carriles 5: tiempo 72, carriles 6: tiempo 96 y carriles 8: control positivo *P. pastoris* pPIC9/6009F. En las muestras de *P. pastoris* KM71 pPIC3.5/6009F y GS115 pPIC3.5/6009F se pudo observar una banda de 28 kDa que corresponde al scFv 6009F.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

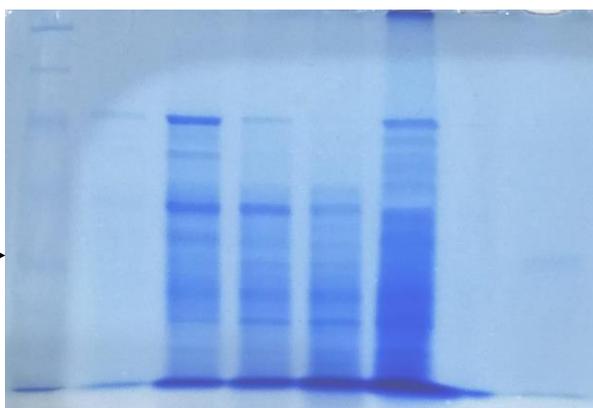


Figura 21 Gel SDS PAGE 12.5 % muestras de los tiempos de la cepa KM71.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

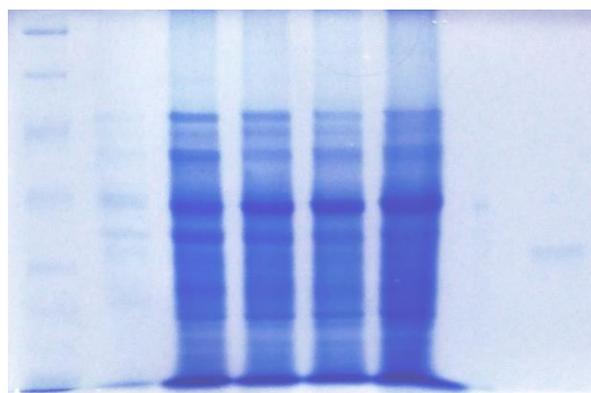
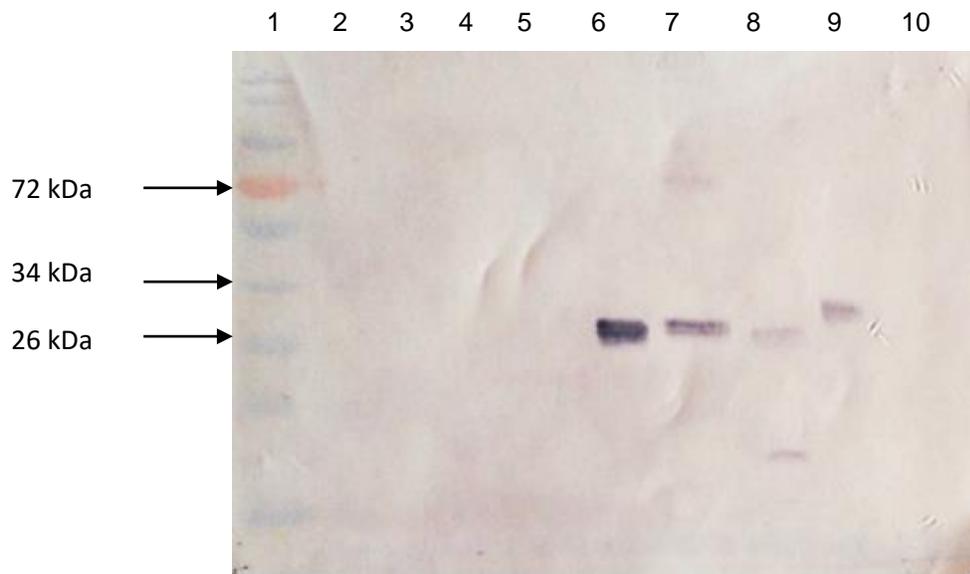


Figura 22 Gel SDS PAGE 12.5 % muestras de los tiempos de la cepa GS115.

Se usaron las muestras de los lisados celulares de las 96 horas de ambas construcciones para realizar un western blot, pero no se observó el reconocimiento del anticuerpo anti-His (figura 23). En la figura 23, se muestra en la carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: Pellet de lisado celular KM71 pPIC3.5/6009F, carril 3: Pellet de lisado celular GS115 pPIC3.5/6009F, carril 4: sobrenadante del lisado celular KM71 pPIC3.5/6009F, carril 5: sobrenadante del lisado celular GS115 pPIC3.5/6009F, carril 6: purificación por exclusión molecular de KM71 pPIC9/6009F, carril 7: control positivo, carril 8: sobrenadante de GS115 PHILS-1/6009F, carril 9: sobrenadante GS115 pPICZA $\alpha$ /6009F y carril 10: sobrenadante X-33 pPICZA $\alpha$ /6009F). En este western blot se colocaron las muestras de diferentes expresiones llevadas a cabo en *Pichia pastoris*. Como resultado se observó además que en las muestras de *Pichia pastoris* KM71 pPIC3.5/6009F y X-33 pPICZA $\alpha$ /6009F tampoco hubo reconocimiento.

Parece ser que ambas construcciones en las cepas de *Pichia pastoris* KM71 pPIC3.5/6009F y X-33 pPICZA $\alpha$ /6009F que se muestran en la figura 23 construcciones con plásmidos de expresión intracelular degradan la proteína durante el almacenamiento y después de la lisis no son estables, estas muestras no tuvieron cocktail inhibitor de proteasas, responsables de esta degradación. Las otras muestras de *Pichia pastoris* KM71 pPIC9/6009F y GS115 pHILS16009F con plásmidos que codifican para proteínas extracelulares y que se usaron como

controles positivos, carriles 6, 7, 8 y 9 si tuvieron reconocimiento por el anticuerpo anti-His, se observó que estas muestras tienen diferentes pesos moleculares lo que sugiere que las expresiones de KM71 pPIC9/6009F y GS155 pPICZA $\alpha$ /6009F podrían estar glicosiladas, en el caso GS115 PHILS-1/6009F parece ser que no está glicosilada ya que su P.M. es 28 kDa.



**Figura. 23 Western blot con diferentes muestras de expresiones en *Pichia*.**

Para corroborar que las clonas pPIC3.5/6009F en las cepas KM71 y GS115 que se seleccionaron se encontraban dentro del marco de lectura y descartar cualquier tipo de mutaciones se secuenció ADN genómico, los resultados muestran que no existen mutaciones y se encuentra correcto el marco de lectura.

Una vez realizado las pruebas anteriores se sugirió utilizar otra clona previamente ya verificada, pero en cultivos de menor volumen es decir 10 mL de medio BMGY en tubos falcón de 50 mL para la producción de biomasa. Después se realizó el subcultivo en medio BMMY induciendo la expresión con 1% de metanol cada 24 horas por 96 horas. Una vez terminada la inducción se centrifugó la muestra, el pellet se resuspendió en 5 ml de Tris-HCL 50 mM con 1mM de PMSF, se realizó la lisis del pellet con perlas de vidrio, se recolectó el sobrenadante el cual se utilizó para la realización de un gel SDS PAGE al 12.5%. En el gel SDS electroforesis de

la figura 25 se muestran en el Carril 1: Marcador de peso molecular, carriles 2, 3, 4: GS115/pPICZA $\alpha$ , carril 5: *E. coli* TG1 pSyn1, carril 6 GS115/pPIC3.5, carril 7: KM71/pPIC3.5, carril 8: GS115/pSHIL-1, carril 9: KM71/pPIC9 y carril 10: pPICZA $\alpha$ /X-33 y un Western blot. En ambas figuras 24 y 25, se observan los lisados sin pasar por columna de Ni<sup>2+</sup>-NTA de *E. coli* TG1 pSyn1 con un peso molecular de 28 kDa, en el carril 7 la expresión de la construcción de este trabajo la cepa en *P. pastoris* KM71/pPIC3.5 con una proteína del mismo PM que la de *E. coli* TG1 pSyn1. lo cual sugiere que la proteína es la misma y que al ser expresada en el plásmido pPIC3.5 no se encuentra glicosilada, ya que es intracelular. Esta muestra solo se le ha cuantificado proteína total que corresponde a 200 ug/mL. Será purificada por la columna de Ni<sup>2+</sup>-NTA para cuantificarla y realizar el reconocimiento de Elisa. La construcción en *P. pastoris* GS115/pPIC3.5 sé 26 kDa una banda correspondiente al peso del scFv6009F en el gel SDS pero no hubo reconocimiento con el anticuerpo His tag en el Western blot.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

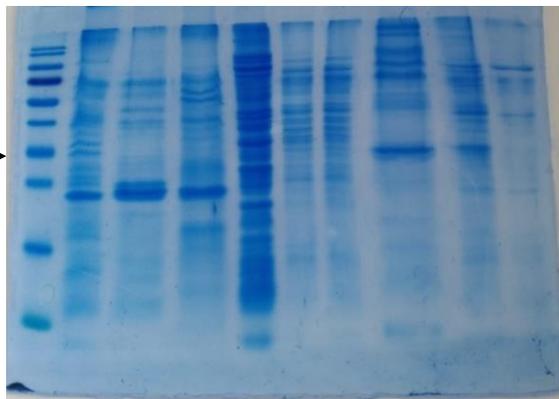


Figura 24 Gel de SDS al 12.5% referencia para el western blot

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

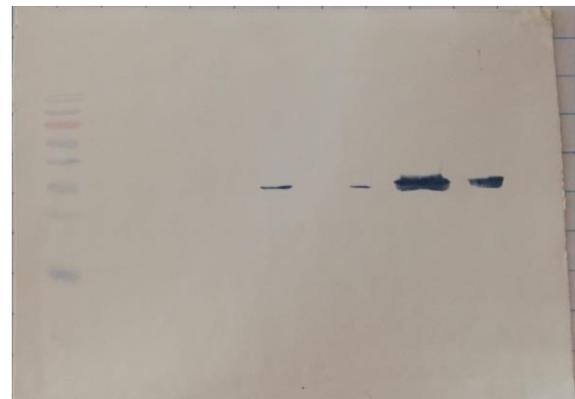


Figura 25 Reconocimiento por western blot

### 7.7 EXPRESION DE Y PURIFICACIÓN scFv 6009F EN *E. coli* TG1

Para la expresión de *E. coli* TG1 se utilizaron 4 matraces de 500 ml bafleados con 250 ml de medio 2XYT los cuales se incubaron a 30°C a 150 rpm durante su inducción, una vez terminada la inducción se realizó la lisis celular, se dializo y por último se realizó la purificación de la proteína scFv6009F por la columna de Ni<sup>+</sup>

como se muestra en la figura 26 se puede observar el gel de SDS con las muestras en el siguiente orden: carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: recirculante, carril 3: lavado con PBS, carril 4: lavado con imidazol a 40 mM, y por últimos carriles del 5 al 10 eluciones con 250 mM de imidazol en donde se puede apreciar la banda correspondiente a la proteína scFv6009F, sin embargo todavía se puede observar bandas de otras proteínas de alto peso molecular lo cual nos indica que no se encuentra totalmente pura.

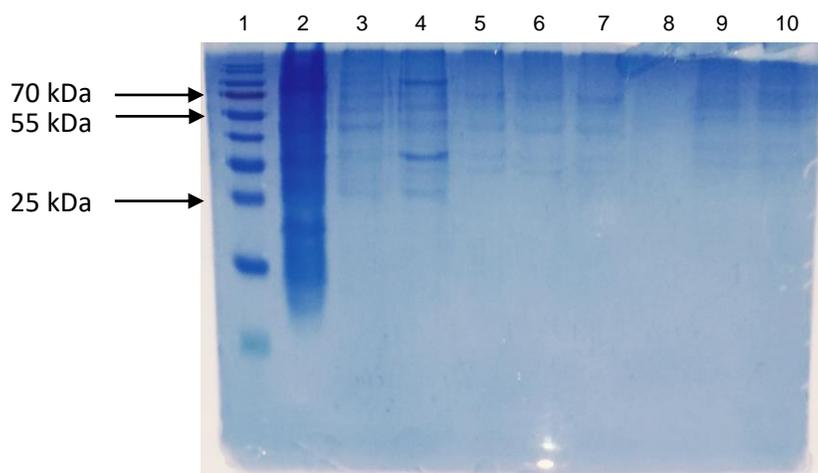


Figura 26 Gel SDS con las muestras de *E. coli* TG1 del proceso de purificación

También se cuantificó la proteína obtenida en *E. coli* TG1 durante su proceso de purificación como se observa en la tabla 14

Tabla 14 Cuantificación de proteína de la expresión en *E. coli* TG1

Muestras <i>E. coli</i> TG1	Concentración mg/mL
Sobrenadante del Lisado	884
Después diálisis	602
Recirculante	332
Lavado PBS	158
Elución 250 mM imidazol	20

## 7.8 RECONOCIMIENTO DE scFv 6009F FRENTE A LA TOXINA Cn2

Se realizó un Elisa con las muestras que ya se tenían purificadas el ensayo se realizó en una relación molar 1:10 (toxina/scFv6009F) de toxina Cn2 Se utilizaron dos diferentes anticuerpos: anti-His (1:500) y anti-cmyc (1:1000). En la figura 27 se puede observar la reacción de Elisa en cual mostro reconocimiento con la proteína expresada con la construcción KM71 pPIC9/6009F

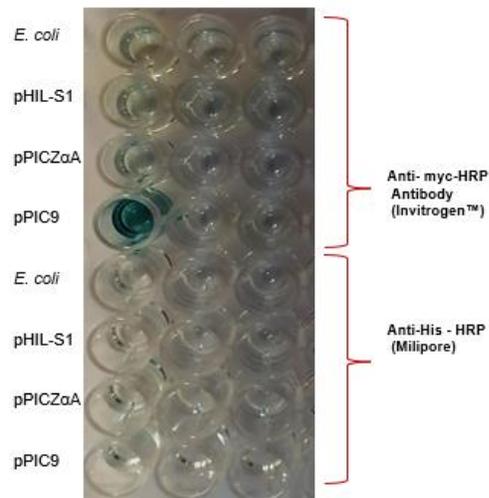


Figura 27 Elisa con las diferentes expresiones en *Pichia Pastoris*.

## 8. DISCUSIÓN

No obstante que la expresión intracelular de proteínas heterólogas recombinantes en el sistema de *Pichia pastoris* GS115 y KM71 se ha utilizado con éxito logrando niveles de expresión importantes y obteniendo moléculas activas (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Por ejemplo, se han expresado intracelularmente: la proteína GFP logrando producir 2 mg/L (Ahmad *et al.*, 2014) y la enzima hidroxinitrilo liasa de la cual se obtuvieron 22 g/L (Hasslacher *et al.*, 1997). Ying *et al.*, 2004 demostraron que el plásmido pPIC3.5K en la cepa KM71 obtuvieron 115 mg/L de lactoferrina huma en reactor 7.67 veces más que en un cultivo en matraz, en este trabajo los resultados fueron mucho menores solo 5.5 mg/L en KM71 pPIC3.5/6009F

En el trabajo de grupo del laboratorio se realizaron varias combinaciones de vectores y cepas *Pichia pastoris* como se muestran en la tabla 4. Todos los vectores que expresan extracelularmente permiten detectar la proteína en SDS PAGE y reconocerla por Western blot con anti-His. Las cepas GS115 y KM71 permiten detectar la proteína por Western blot, esto no ocurre con la cepa silvestre X-33. Sin embargo, con los plásmidos de expresión intracelular solo se visualizó la proteína con la construcción pPIC3.5 en KM71. Ninguna otra combinación de plásmido intracelulares al momento ha podido expresar la proteína. La mayoría de los artículos reportan GS115 como la mejor opción para producir proteínas terapéuticas, pero en el trabajo del grupo solo usando el plásmido PHIL-S1 con las cepas *P. pastoris* GS115 o KM71 se produce proteínas sin glicosidar como se muestra en la tabla 13.

**Tabla 15 Expresiones en *Pichia* detectadas en geles SDS PAGE y Western blot**

	<b>Construcción Intracelular</b>	<b>SDS PAGE</b>	<b>Western blot</b>
Daniela López	<i>P. pastoris</i> GS115/pPIC3.5	Si	No
Daniela López	<i>P. pastoris</i> KM71/pPIC3.5	Si	Si
José Soto	<i>P. pastoris</i> GS115/pHILD2	No se realizó	No se realizó
Nayelli García	<i>P. pastoris</i> X-33/pPICZA	Si	No
José Soto	<i>P. pastoris</i> KM71/pHILD2	No se realizó	No se realizó
	<b>Construcción Extracelular</b>		
Fernando Guzmán	<i>P. pastoris</i> GS115/pHILS1	Si	Si
Mariel Adame	<i>P. pastoris</i> GS115/pPIC9	Si	Si
Fernando Guzmán	<i>P. pastoris</i> GS115/pPICZ $\alpha$ A	Si	Si
Mariel Adame	<i>P. pastoris</i> KM71/pHILS1	Si	Si
Monica Amezcua	<i>P. pastoris</i> KM71/pPIC9	Si	Si
Monica Amezcua	<i>P. pastoris</i> KM71/pPICZ $\alpha$ A	No se realizo	No se realiza
Nalleli García	<i>P. pastoris</i> X-33/pPICZ $\alpha$ A	Si	No

En este trabajo se utilizó el vector pPIC3.5 para llevar acabo la expresión del scFv6009F de manera intracelular pero no se había tenido éxito en la producción y

reconocimiento de la proteína, no obstante, a realizar la expresión en otra clona en un volumen de 10 mL se pudo obtener la proteína de interés, porque el escalamiento es difícil ya que se cambian parámetros como el de agitación, aireación, volumen celular y concentración del inductor metanol. Otro problema es la estabilidad de la proteína a temperatura y pH, debido a la activación de proteasas intracelulares existe una degradación rápida del anticuerpo scFv6009F. *Pichia pastoris* cuenta con tres principales grupos de proteasas: proteosoma citosólico, proteasas vacuolares y proteasas localizadas junto con la vía secretora (Jones, 1991). Se ha reportado que la expresión de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris* GS115 y KM71 tiene como desventaja la degradación proteolítica de proteínas heterólogas intracelulares o extracelulares (Idiris *et al.*, 2010. Potvin *et al.*, 2012). En algunos casos las proteínas expresadas permanecen intactas, mientras que en otros casos suelen ser degradados por la actividad proteolítica. Los niveles de proteasas intracelulares y extracelulares son más altos en los cultivos que usan como fuente de carbono metanol en comparación de con los de glicerol (Sinha *et al.*, 2007, Yamashita *et al.*, 2009). Las fases de retraso del crecimiento, luego del estrés causado por el metanol o por la transición de una fuente de carbono dada al metanol durante la fase de inducción de cultivos regulados por pAOX, induce vías autofágicas en *P. pastoris* que pueden conducir a la sobreexpresión de proteasas y su liberación mediada por lisis al medio de fermentación, lo que resulta en una mayor degradación de las proteínas secretadas. Cuatro proteasas vacuolares, PrA, PrB, CpY y aminopeptidasa, se detectan generalmente en el sobrenadante de los cultivos de *P. pastoris*. La alta tasa de mortalidad celular durante la fase de inducción se correlaciona con la acumulación de especies de oxígeno reactivo intracelular (ROS), especialmente formaldehído y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que son subproductos del metabolismo del metanol. El estrés oxidativo causado por altos niveles de ROS intracelular daña o lisa las células, lo que lleva a una mayor liberación de proteasas vacuolares. Para poder disminuir la proteólisis existen en la modificación de parámetros en el cultivo celular como son: temperatura, pH y el uso de inhibidores de proteasas (Potvin *et al.*, 2012).

La mayoría de las fermentaciones en *Pichia* se lleva a cabo a una temperatura óptima 30°C, mientras que una temperatura por encima de 32°C es perjudicial para la expresión de proteína ya que se puede conducir a la muerte celular y esto dará como resultado la lisis celular y una mayor actividad de proteasas (Zhang et al., 2007). Se menciona que al llevar la expresión a una temperatura baja podría mejorar los rendimientos de proteínas recombinantes y a la vez la liberación de menos proteasas (Hong et al., 2002). Li et al. (2001) han demostrado que la disminución de la temperatura del proceso de 30°C a 23°C aumentó el rendimiento de las proteínas anticongelantes de arenque de 5.3 mg/l a 18.0 mg/l, y también aumentó la viabilidad celular.

## **8. CONCLUSIONES**

Se lograron los objetivos del trabajo, estableciendo se las condiciones para la amplificación por PCR para la extracción del gen scFv 6009F del plásmido pSyn1. Se obtuvieron las construcciones de *Pichia pastoris* GS115/scFv6009F y KM71/scFv6009F.

Se realizó la expresión de *Pichia pastoris* GS115 pPIC3.5/6009F y KM71 pPIC3.5/6009F, se obtuvo 200 ug/ml de proteína total, y observo el reconocimiento de la proteína scFv 6009F expresada intracelularmente en la cepa de *Pichia pastoris* KM71 sin realizar la purificación por columna de níquel.

Esta proteína se evaluará para determinar su capacidad de reconocimiento de la toxina Cn2 y el veneno completo de *C. noxius*.

Se inicio la producción de un anticuerpo de conejo para reconocer el anticuerpo scFv 6009F que no posea cola de His, faltan 5 inmunizaciones (Anexo E), pero ya se cuenta con la proteína pura para realizarlas.

## 9. PERSPECTIVAS

Escalar la producción pPIC3.5/KM71 a un volumen mayor para obtener más proteína.

Lograr la purificación de la expresión para poder realizar el reconocimiento contra la toxina Cn2 de *Centruroides Noxius*.

Establecer las condiciones óptimas para la producción quizá aumentando la concentración de metanol en la expresión del sFcv 6009F en la cepa GS115.

Contar con el anticuerpo de conejo anti scfrv600F para poder evaluar y cuantificar su producción cuando no posea cola de histidinas la proteína expresada.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Abel, J., Spannbrucker, N., Fandrey, J., & Jelkmann, W. (1996). Serum erythropoietin levels in patients with sepsis and septic shock. *European journal of haematology*, 57(5), 359-363.

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

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

Almaaytah, A., & Albalas, Q. (2014). Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: a review. *Peptides*, 51, 35-45.

Andersen, D. C., & Krummen, L. (2002). Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Current opinion in biotechnology*, 13(2), 117-123.

Becerril Luján, B., Riaño, L., & Possani, L. (2014). Bancos de anticuerpos recombinantes de origen humano: una fuente ideal de antivenenos modernos contra la picadura de alacrán. *Revista Digital Universitaria* [en línea]. 1 de noviembre de 2014, Vol. 15, No.11 [Consultada:]. Disponible en Internet: <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num11/art84/index.html>

Byrne, B. (2015). *Pichia pastoris* as an expression host for membrane protein structural biology. *Current opinion in structural biology*, 32, 9-17.

Caliskan, F. (2015). Scorpion Venom Research Around the World: Turkish Scorpions. In *Scorpion Venoms* (pp. 327-349). Springer Netherlands.

Camacho-Ramírez, R. I., Sánchez-Zapata, H., Jaramillo-Serna, R., & Ávila-Reyes, R. (2007). Alacranismo. *Pediatría de México*, 10(1), 21-26.

Carmo, A. O., Chatzaki, M., Horta, C. C. R., Magalhães, B. F., Oliveira-Mendes, B. B. R., Chávez-Olórtegui, C., & Kalapothakis, E. (2015). Evolution of alternative methodologies of scorpion antivenoms production. *Toxicon*, 97, 64-74.

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

Chen D., and Dattaro J. A. 2017. Scorpion Envenomation Clinical Presentation. Drug Diseases /Emergency Medicine <https://emedicine.medscape.com/article/168230-clinical>

Chippaux, J. P. (2012). Emerging options for the management of scorpion stings. *Drug design, development and therapy*, 6, 165.

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

Crivianu-Gaita, V., & Thompson, M. (2016). Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab'fragments: An overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements. *Biosensors and Bioelectronics*, 85, 32-45.

Debeljak, N., Feldman, L., Davis, K. L., Komel, R., & Sytkowski, A. J. (2006). Variability in the immunodetection of His-tagged recombinant proteins. *Analytical biochemistry*, 359(2), 216-223.

de Roodt, A. R. (2015). Veneno de escorpiones (alacranes) y envenenamiento. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 49(1), 55-71.

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

Eckert, K. A., & Kunkel, T. A. (1991). DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *Genome Research*, 1(1), 17-24.

Eiden-Plach, A., Zagorc, T., Heintel, T., Carius, Y., Breinig, F., & Schmitt, M. J. (2004). Viral prepro toxin signal sequence allows efficient secretion of green fluorescent protein by *Candida glabrata*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Schizosaccharomyces pombe*. *Applied and environmental microbiology*, 70(2), 961-966.

Ezzine, A., M'Hirsi el Adab, S., Bouhaouala-Zahar, B., Hmila, I., Baciou, L., & Marzouki, M. N. (2012). Efficient expression of the anti-Aahl'scorpion toxin nanobody under a new functional form in a *Pichia pastoris* system. *Biotechnology and applied biochemistry*, 59(1), 15-21.

Gasser, B., & Mattanovich, D. (2007). Antibody production with yeasts and filamentous fungi: on the road to large scale? *Biotechnology letters*, 29(2), 201-212.

Gopalakrishnakone, P., Possani, L. D., Schwartz, E. F., & de la Vega, R. C. R. (Eds.). (2015). *Scorpion Venoms*. Springer Netherlands.

Hasslacher, M., Schall, M., Hayn, M., Bona, R., Rumbold, K., Lückl, J., & Schwab, H. (1997). High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber *TreeHevea brasiliensis* in microbial hosts. *Protein expression and purification*, 11(1), 61-71.

Iglesias-Figueroa, B., Valdiviezo-Godina, N., Siqueiros-Cendón, T., Sinagawa-García, S., Arévalo-Gallegos, S., & Rascón-Cruz, Q. (2016). High-level expression of recombinant bovine lactoferrin in *Pichia pastoris* with antimicrobial activity. *International journal of molecular sciences*, 17(6), 902.

Ji, X., Lu, W., Zhou, H., Han, D., Yang, L., Wu, H., ... & Zhang, S. (2013). Covalently dimerized Camelidae antihuman TNF $\alpha$  single-domain antibodies expressed in yeast *Pichia pastoris* show superior neutralizing activity. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(19), 8547-8558.

Jimenez-Vargas, J. M., Quintero-Hernández, V., Gonzalez-Morales, L., Ortiz, E., & Possani, L. D. (2017). Design and expression of recombinant toxins from Mexican

scorpions of the genus *Centruroides* for production of antivenoms. *Toxicon*, 128, 5-14.

Joosten, V., Lokman, C., van Den Hondel, C. A., & Punt, P. J. (2003). The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi. *Microbial cell factories*, 2(1), 1.

Kebschull, J. M., & Zador, A. M. (2015). Sources of PCR-induced distortions in high-throughput sequencing data sets. *Nucleic acids research*, 43(21), e143-e143.

Kipriyanov, S. M., & Little, M. (1999). Generation of recombinant antibodies. *Molecular biotechnology*, 12(2), 173.

Lee, Y. J., & Jeong, K. J. (2015). Challenges to production of antibodies in bacteria and yeast. *Journal of bioscience and bioengineering*, 120(5), 483-490.

Li, P., Anumanthan, A., Gao, X. G., Ilangovan, K., Suzara, V. V., Düzgüneş, N., & Renugopalakrishnan, V. (2007). Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 142(2), 105-124.

McInerney, P., Adams, P., & Hadi, M. Z. (2014). Error rate comparison during polymerase chain reaction by DNA polymerase. *Molecular biology international*, 2014.

Monnier, P. P., Vigouroux, R. J., & Tassew, N. G. (2013). In vivo applications of single chain Fv (variable domain) (scFv) fragments. *Antibodies*, 2(2), 193-208.

Nygren, P. Å., Stefan, S., & Uhlén, M. (1994). Engineering proteins to facilitate bioprocessing. *Trends in biotechnology*, 12(5), 184-188

Omidfar, K., Rasaei, M. J., Kashanian, S., Paknejad, M., & Bathaie, Z. (2007). Studies of thermostability in *Camelus bactrianus* (Bactrian camel) single-domain antibody specific for the mutant epidermal-growth-factor receptor expressed by *Pichia*. *Biotechnology and applied biochemistry*, 46(1), 41-49.

Plataforma de expresión *Pichia* de RCT (<https://pichia.com/science-center/commercialized-products/>) Consultado marzo 2018.

Ponce Saavedra, J., & Francke, O. F. (2004). Una nueva especie de alacrán del género *Centruroides* Marx (1890) (Scorpionbes, Buthidae) de la depresión del Balsas, México. *Acta zoológica mexicana*, 20(2), 221-232.

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

Potapov, V., & Ong, J. L. (2017). Examining sources of error in PCR by single-molecule sequencing. *PloS one*, 12(1), e0169774.

Potvin, G., Ahmad, A., & Zhang, Z. (2012). Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: a review. *Biochemical Engineering Journal*, 64, 91-105.

Rahbarizadeh, F., Rasaei, M. J., Forouzandeh, M., & Allameh, A. A. (2006). Over expression of anti-MUC1 single-domain antibody fragments in the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular immunology*, 43(5), 426-435.

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

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

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

Ridder, R., Schmitz, R., Legay, F., & Gram, H. (1995). Generation of rabbit monoclonal antibody fragments from a combinatorial phage display library and their production in the yeast *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*, 13(3), 255.

- Saavedra, J. P., & Francke, O. F. (2014). Clave para la identificación de especies de alacranes del género *Centruroides* Marx 1890 (Scorpiones: Buthidae) en el Centro Occidente de México. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológicas Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 15(1), 52-62.
- Santibáñez-López, C. E., Francke, O. F., Ureta, C., & Possani, L. D. (2015). Scorpions from Mexico: From species diversity to venom complexity. *Toxins*, 8(1), 2.
- Serrano-Rivero, Y., Marrero-Domínguez, K., & Fando-Calzada, R. (2016). *Pichia pastoris*: una plataforma para la producción de proteínas heterólogas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 47(2), 67-77.
- Schirrmann, T., Al-Halabi, L., Dubel, S., & Hust, M. (2008). Production systems for recombinant antibodies. *Front Biosci*, 13(13), 4576-4594.
- Scorer, C. A., Buckholz, R. G., Clare, J. J., & Romanes, M. A. (1993). The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 136(1), 111-119.
- Serrano-Rivero, Y., Marrero-Domínguez, K., & Fando-Calzada, R. (2016). *Pichia pastoris*: una plataforma para la producción de proteínas heterólogas. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 47(2).
- Schmidt, F. R. (2004). Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied microbiology and biotechnology*, 65(4), 363-372.
- Shusta, E. V., Raines, R. T., Plückthun, A., & Wittrup, K. D. (1998). Increasing the secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae* for production of single-chain antibody fragments. *Nature biotechnology*, 16(8), 773.
- Sinha, J., Plantz, B. A., Inan, M., & Meagher, M. M. (2005). Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: Case study with recombinant ovine interferon- $\tau$ . *Biotechnology and bioengineering*, 89(1), 102-112.

Spadiut, O., Capone, S., Krainer, F., Glieder, A., & Herwig, C. (2014). Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments. *Trends in biotechnology*, 32(1), 54-60.

Stech, M., & Kubick, S. (2015). Cell-free synthesis meets antibody production: a review. *Antibodies*, 4(1), 12-33.

Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 60(5), 523-533.

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

Vidal-Acosta, V., & Francke, O. F. (2009). Redescrición de *Tityopsis aliciae* (Scorpiones: Buthidae). *Revista mexicana de biodiversidad*, 80(2), 333-339

Yamashita, S. I., Yurimoto, H., Murakami, D., Yoshikawa, M., Oku, M., & Sakai, Y. (2009). Lag-phase autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Genes to Cells*, 14(7), 861-870.

Weisser, N. E., & Hall, J. C. (2009). Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnology advances*, 27(4), 502-520.

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

Zhang, Y., Liu, R., & Wu, X. (2007). The proteolytic systems and heterologous proteins degradation in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Annals of Microbiology*, 57(4), 553.

Zhou, J., Chen, X., Zheng, X. Z., Lin, c. Z., Wang, Z. H., & Lu, G. D. (2009). Expression of a putative *Magnaporthe oryzae* chitinase in *Pichia pastoris* [J].

*Journal of Fujian Agriculture and Forestry University* (Natural Science Edition), 6,  
009.

## 11. ANEXOS

### Anexo A

#### Secuencia del fragmento scFv 6009F en nucleótidos y proteínas

Gen Bank: AY781341.1

```
1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGAGACTC
61 TCCTGTGCAG GCTCTGGATT CACCTTTGAT AATTATGCCA TGCATTGGAT ACGCCAAGTT
121 CCAGGGGAGG GCCTGGAGTG GGTCTCAGGT ATTAGTCGGG GCAGTGGTGA CATAGGCTAT
181 GCGGACTCTG TGAAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACG ACGCCAAGAA GTCCCTGTCT
241 CTGCAAATGA ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAGAGGGGGG
301 TTCGGAAGTT TTGATACCTG GGGCCAAGGG ACAATGGTCA CCGTCTCTTC TGGAGGTGGC
361 GGATCAGGAG GCGGAGGTTT TGGTGGAGGT GGGAGTGAAA TTGTGCTGAC TCAGTCTCCT
421 GCCACCCTGT CTGTGTCTCC CGGGGAAAGA GCCATCCTCT CCTGCAGGGC CAGTCAGAGT
481 GTTAGGAGCT TCTTAGCCTG GTACCAACAG AACCTGGGC AGGCTCCCAG GCTCCTCATC
541 TCTGATGCAT CCAACAGGGC CACTGGCATC CCAGCCAGGT TCACTGGCGG TGGGTCTGGG
601 ACAGACTTCA CTCTCACCAT CAGCAGCCTA GAGCCTGAAG ATTTTGCAAT TTATTACTGT
661 CAGCAGTATC GTTACTCACC TCGGACGTTT GGCCAAGGGA CCAAGGTGGA GATCAAACGT
```

```
1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAGSGFTFD NYAMHWIRQV PEGGLEWVSG ISRSGSDIGY
61 ADSVKGRFTI SRDDAKKSL S LQMNSLRAED TAVYYCARGG FGSFDTWGQG TMVTVSSGGG
121 GSGGGGSGGG GSEIVLTQSP ATLSVSPGER AILSCRASQS VRSFLAWYQQ KPGQAPRLLI
181 SDASNRATGI PARFTGGGSG TDFTLTISL EPEDFAIYYC QQYRYSPTF GQGTKVEIKR
```

### Anexo B

#### Preparación de Químicocompetentes

- Crecer un cultivo de células *E. coli* Top10F en medio LB toda la noche a 37°C.
- Se inoculan por cada 3 ml de medio LB con 100µl de cultivo y se deja crecer a 37°C hasta llegar a una D.O de 0.8.
- Se centrifuga a 14000 rpm durante 2 min a 4°C.
- Se resuspenden en Cl<sub>2</sub>Ca+ 2H<sub>2</sub>O 0.1 M con un décimo del volumen del cultivo.
- Se deja incubar en hielo durante 2 h.
- Se centrifuga a 14000 rpm durante 2 min a 4°C.
- Se resuspenden en Cl<sub>2</sub>Ca+ 2H<sub>2</sub>O 0.1 M con un décimo del volumen del cultivo.
- Se agregan 88µl de DMSO (estéril) por ml de células en Cl<sub>2</sub>Ca+ 2H<sub>2</sub>O 0.1 M.
- Se hacen alícuotas de 100µl por vial.

Transformación de células químiocompetentes.

- Añadir 1 µl o 5 µl de plásmido a la alícuotas de 100 µl.
- Colocar en hielo por 30 min.
- Se deposita en 42°C baño maria por 40 seg.
- Se coloca nuevamente en hielo por 5 min.
- Añadir 1 ml de LB
- Incubar 1 hr a 37°C.
- Retirar el medio, dejando 200 µl y se resuspenden las células.
- Sembrar en cajas con medio y antibiótico para seleccionar 10 µl.

## **Anexo C**

### **Preparación de electrocompetentes**

- Crecer 5 ml de *Pichia pastoris* en YPD en 50 ml a 30°C toda la noche.
- Inocular 500 ml de medio en un frasco de 2L con 0.1-0.5ml de cultivo overnigth. Crecer el cultivo overnigth con una D.O 1.3-1.5.
- Centrifugar las células por 1500 rpm por 5 min en 4°C. Resuspender el pellet con 500ml de H<sub>2</sub>O estéril.
- Centrifugar las células como el paso 3 y resuspender el pellet en 20 ml en sorbitol 1M frío.
- Centrifugar las células como paso 3 y resuspender el pellet en 1 ml en sorbitol 1M frío para tener un volumen final de 1.5 ml.

Transformación de células electrocompetentes

- Mezclar 80 µl de las células del paso anterior con 5-20 µg de DNA linealizado (en 5-10 µl TE buffer) y transferir a una cubeta de electroporación de 0.2 cm en hielo.
- Incubar la cubeta con las células en hielo por 5 min.
- Con ayuda de un electroporador realizar un pulso de 1500 V.
- Inmediatamente adicionar 1 ml de sorbitol 1 M frío en la cubeta. Transferir de la cubeta en tubos estériles.

- Realizar la propagación de 200-600µl de las alícuotas en placas de medio MD.
- Incubar las placas a 30°C hasta que las colonias crezcan.

## **Anexo D**

### **Extracción de ADN genómico**

- Crecer las células en 10 ml de YPD toda la noche a 30 °C, centrifugar a 14000 rpm durante 3 min, desechar el sobrenadante.
- Dejar el pellet durante 20 min a -80°C
- Se da un lavado con 500 µl se centrifuga durante 3 min y se descarta el sobrenadante.
- El pellet se coloca el pellet durante 20 min a -80°C.
- Pasando el tiempo se le agrega 200 µl del buffer breaking buffer y se coloca en frío y se lleva al sonicador durante 30 segundos.
- Se agrega 200 µl de fenol cloroformo alcohol isoamílico y vortexear durante 10 min a máxima velocidad.
- Se agrega 200 µl de buffer se TE vortexear por 5 min, después se centrifugar 10 min a máxima velocidad.
- Transferir la fase acuosa a un tubo limpio y se le agrega 1 ml de etanol al 100% se invierte y se deja a -80°C durante 1 h aproximadamente.
- Se centrifuga durante 10 min a máxima velocidad se remueve el sobrenadante y se resuspenden en 400 µl de buffer TE.
- Agregar 30 µl de RNAasa a una concentración de 1 mg/mL se incuba a 37°C por 5 min y agregar 10 µl de acetato de amonio y un 1mL de etanol al 100% se mezcla por inversión.
- Centrifugar durante 3 min a alta velocidad descartar el sobrenadante y se deja secar el pellet.
- Resuspender en 100 µl de buffer TE.

## Anexo E

### Esquema de inmunización del single chain 6009F

- Se inmunizaron conejos con las diferentes expresiones realizadas en *Pichia pastoris* y con la expresión en *E. coli* TG1.

ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN DE SINGLE CHAIN						
			Fechas de inmunización			
SEMANA	SINGLE CHAIN(ug)	ADYUVANTE	pPIC9	pHILS-1	<i>E.coli</i>	pPICZAa
1	20	Freud completo	19/08/2019	19/08/2019	26/08/2019	02/09/2019
2	20	Freud incompleto	26/08/2019	26/08/2019	02/09/2019	09/09/2019
3	50	Alumina	02/09/2019	02/09/2019	09/09/2019	16/09/2019
4	100	Freud incompleto	09/09/2019	09/09/2019	16/09/2019	23/09/2019
5	200	Alumina	16/09/2019	16/09/2019	23/09/2019	30/09/2019
6	400	Freud incompleto	23/09/2019	23/09/2019	30/09/2019	07/10/2019
7	800	Alumina	30/09/2019	30/09/2019	07/10/2019	14/10/2019
8	1000	Freud incompleto	07/10/2019	07/10/2019	14/10/2019	21/10/2019
9	2000	Alumina	14/10/2019	14/10/2019	21/10/2019	28/10/2019
10	2000	Freud incompleto	21/10/2019	21/10/2019	28/10/2019	04/11/2019
11	2000	Sin adyuvante	28/10/2019	28/10/2019	04/11/2019	11/11/2019
<b>TOTALES</b>	<b>8590</b>					



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor)  
Dra. Hilda Vázquez López (Co Tutor)  
Dr. Gerardo Corzo Burguete  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Tesis: "EVALUACIÓN DEL PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN  
INTRACELULAR pPIC3.5 EN LA PRODUCCIÓN DEL ANTICUERPO  
scFv 6009F EN *Pichia pastoris* GS115 Y KM71

Alumno que la presenta a revisión: **DANIELA ALEXIS LOPEZ GALINDO**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

**VOTO**

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

**ATENTAMENTE**

**DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL**



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor)  
Dra. Hilda Vázquez López (Co Tutor)  
Dr. Gerardo Corzo Burguete  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Tesis: "EVALUACIÓN DEL PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN  
INTRACELULAR pPIC3.5 EN LA PRODUCCIÓN DEL ANTICUERPO  
scFv 6009F EN *Pichia pastoris* GS115 Y KM71

Alumno que la presenta a revisión: **DANIELA ALEXIS LOPEZ GALINDO**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

**VOTO**

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

ATENTAMENTE

DRA. HILDA VAZQUEZ LOPEZ



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor)  
Dra. Hilda Vázquez López (Co Tutor)  
Dr. Gerardo Corzo Burguete  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Tesis: "EVALUACIÓN DEL PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN  
INTRACELULAR pPIC3.5 EN LA PRODUCCIÓN DEL ANTICUERPO  
scFv 6009F EN *Pichia pastoris* GS115 Y KM71

Alumno que la presenta a revisión: **DANIELA ALEXIS LOPEZ GALINDO**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

**VOTO**

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

ATENTAMENTE

DR. GERARDO CORZO BURGUETE



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor)  
Dra. Hilda Vázquez López (Co Tutor)  
Dr. Gerardo Corzo Burguete  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Tesis: "EVALUACIÓN DEL PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN  
INTRACELULAR pPIC3.5 EN LA PRODUCCIÓN DEL ANTICUERPO  
scFv 6009F EN *Pichia pastoris* GS115 Y KM71

Alumno que la presenta a revisión: **DANIELA ALEXIS LOPEZ GALINDO**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

**VOTO**

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

ATENTAMENTE

DR. JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor)  
Dra. Hilda Vázquez López (Co Tutor)  
Dr. Gerardo Corzo Burguete  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Tesis: "EVALUACIÓN DEL PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN  
INTRACELULAR pPIC3.5 EN LA PRODUCCIÓN DEL ANTICUERPO  
scFv 6009F EN *Pichia pastoris* GS115 Y KM71

Alumno que la presenta a revisión: **DANIELA ALEXIS LOPEZ GALINDO**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

**VOTO**

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

**ATENTAMENTE**

**DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA**