



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN
TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO,
A.C.**



**DESARROLLO DE UNA PRUEBA ELISA BASADA EN DOMINIOS
VNAR ANTI-TGF β PARA LA POTENCIAL DETECCIÓN DE
ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA**

PRESENTA

Q.F.B. MARCO JESÚS KU CENTURIÓN

**DRA. TANYA AMANDA CAMACHO VILLEGAS
DIRECTORA DE TESIS**

**DRA. RAQUEL ECHAVARRÍA ZEPEDA
CODIRECTORA**

**DRA. ANA LAURA MARQUEZ AGUIRRE
ASESORA**

Guadalajara, Jalisco, agosto, 2021

JUNTA DIRECTIVA

DIRECTORA DE TESIS: DRA.TANYA AMANDA CAMACHO VILLEGAS

CO-DIRECTORA DE TESIS: DRA. RAQUEL ECHAVARRIA ZEPEDA

ASESORA DE TESIS: DRA. ANA LAURA MARQUEZ AGUIRRE



GOBIERNO DE
MÉXICO



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



Guadalajara, Jalisco, a 10 de agosto de 2021
CP/917/2021

MARCO JESÚS KU CENTURIÓN
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA
NÚMERO DE MATRÍCULA 1803MF6407
PRESENTE

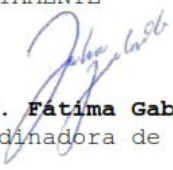
Por este medio le informo que el trabajo de tesis "**Desarrollo de una prueba Elisa basada en dominios VNAR ANTI TGF- β para la potencial detección de enfermedad renal crónica**" desarrollado bajo la dirección del siguiente comité tutorial:

Dra. Tanya Amanda Camacho Villegas. Directora de tesis
Dra. Raquel Echavarría Zepeda. Co-directora de tesis
Dra. Ana Laura Márquez Aguirre. Asesora de tesis

ha sido aprobado para su impresión definitiva y defensa correspondiente para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Innovación Biotecnológica.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE


Mtra. Fatima Gabriela Ordóñez de la Cruz
Coordinadora de Posgrados





Guadalajara, Jalisco a 2 de agosto de 2021

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial del estudiante **Marco Jesús Ku Centurión**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “DESARROLLO DE UNA PRUEBA ELISA BASADA EN DOMINIOS VNAR ANTI TGF- β PARA LA POTENCIAL DETECCIÓN DE ENFERMEDAD RENAL CRONICA” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el estudiante para aspirar al grado de Maestro en Ciencias en Innovación Biotecnológica con opción terminal Médica Farmacéutica durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 2 del mes de agosto del año dos mil veintiuno.

Dra. Tanya Amanda Camacho Villegas

Directora de tesis

Dra. Raquel Echavarría Zepeda

Dra. Ana Laura Márquez Aguirre

Asesora

DEDICATORIA

A Dios

Por acompañarme desde siempre.

A mis padres y abuelos

Por enseñarme sus valores, trabajo y esfuerzo para lograr lo que se proponga.

A mis hermanos

Por enseñarme muchas cosas y motivarme a hacer aquellas que no me atrevía

AGRADECIMIENTOS PROFESIONALES

A la Dra. Tanya por permitirme trabajar en su equipo de trabajo, por su confianza en mi desempeño, por su tiempo, profesionalismo, conocimientos, recomendaciones, consejos, calidez humana y enseñarme a que todo en la vida tiene un equilibrio.

A la Dra. Raquel por su asesoría y facilidades brindadas en cuanto a reactivos, conocimientos, tiempo y dedicación para desempeñar este trabajo.

A la Dra. Ana Laura por su gran apoyo en la orientación, realización y diseño de los ensayos en este trabajo, su profesionalismo y orientación.

Al Dr. Pavel Lugo por sus enseñanzas cercanía y apoyo en todo lo académico y personal durante mi estancia y fuera del centro de investigación.

Dra. Julia Cano por brindarme la información y orientarme en mi proceso de ingreso al CIATEJ.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca económica otorgada para el desarrollo y permanencia en mi proyecto de tesis.

A la Dra. Elia Reza escobar por amistad, sus enseñanzas y paciencia desde el principio de mi proyecto profesional

A la M. en C. Mirna Burciaga Flores, M. en C. Lorena Zapata Cuellar, M. en C Wendy Lopez Romero y M. en C. Nayely Perez Padilla por amistad, su dedicación y asesoría en brindarme su conocimiento en el desarrollo de mi proyecto de tesis.

Al Dr. Abel Gutierrez, el Dr. Hugo Esquivel, el Dr. Mario Flores Valdez por su apoyo profesional, personal y material para el desarrollo adecuado de mi proyecto profesional

Al área administrativa del CIATEJ, especialmente a la M. Fatima Gabriela Ordoñez, Lic Erika, Lic Diego y Lic Carolina por brindar siempre su amabilidad y apoyo durante toda mi estancia en el CIATEJ.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Mayra Macias por su confianza, amabilidad y haberme acompañado en aquellos momentos difíciles que me tocó vivir durante 2020.

A Sandra Cortes por haber compartido todos aquellos momentos antes y durante su llegada y mi permanencia en el CIATEJ.

A Francisco Ortiz, por brindarme una verdadera amistad y compañerismo mas allá de las instalaciones de CIATEJ.

A mis compañeros y amigos Alejandro, Roger, Iliany, Yeranny, David, Angel, Sarah, Isabel, Martha, Andrés, Elda, Roque, Jesús, Mirna, Marissa, Nayely, Wendy, Lore.

Tonantzin y Jannete por su cercanía, amistad y amabilidad siempre durante las estancias en el laboratorio.

Y muchos otros más, que en su momento agradecí y siempre estaré agradecido por haber compartido conmigo una sonrisa, charla, un saludo, una gran platica, un consejo que me brindaron.

A todos ustedes, ¡muchas gracias!

INDICE

1.- INTRODUCCIÓN	15
2.- ANTECEDENTES	16
2.1.- Generalidades del TGF- β	16
2.2.- Efectos del TGF- β en los tejidos	17
2.3.- TGF- β en los procesos fibróticos	20
2.4.- Fibrosis.....	21
2.5.- Fibrosis renal.....	22
2.6.- ERC.....	24
2.7.- Diagnóstico y clasificación según la severidad de ERC.....	26
2.8.- Evaluación del daño asociado a fibrosis por ERC.....	27
2.9.- Biomarcadores para la detección de fibrosis renal.....	28
2.10.- El TGF- β como marcador de procesos fibróticos renales	31
2.11.- Estrategias para la determinación de TGF- β	33
2.12.- Anticuerpos y estrategias anti TGF- β	35
2.13.- Nuevas estrategias de detección: vNAR anti-TGF- β	37
2.14.- vNARs como moléculas de interés biológico	39
2.15.- Estado actual de los vNAR potenciales aplicaciones y usos.....	40
2.16.- Ventajas de vNAR recombinantes (rvNAR).....	42
2.17.- Validación de pruebas de diagnóstico basadas en anticuerpos.....	44
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	45
4.- JUSTIFICACION	46
5.- HIPÓTESIS	47
5.1.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	47
6.- OBJETIVO GENERAL.....	48

6.1.- Objetivos específicos	48
7.- METODOLOGÍA	49
7.1.- Clonación del fragmento vNART1 en el vector de pET28a+	49
7.2.- Clonación del fragmento Trx-vNART1 en el vector pET32a+	51
7.3.- Transformación de <i>E. coli</i> para producir vNAR-T1 y Trx-vNART1	51
7.4.- Preparación del preinóculo e inóculo de <i>E. coli</i> para producir vNART1 y Trx-vNART1	52
7.5.- SDS-PAGE de las proteínas vNART1 y Trx-vNART1	53
7.6.- Western blot para identificación de etiqueta de histidina del vNART1 y la proteína Trx-vNART1	54
7.7.- Protocolo de replegamiento y purificación del vNART1 y de la proteína Trx-vNART1 basado en glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG)	55
7.8.- Concentración de las proteínas vNART1 y Trx-vNART1.....	56
7.9.- Protocolo de purificación y replegamiento en columna para la proteína Trx-vNART1 por gradiente de urea.....	56
7.10.- Diálisis de proteína recombinante.	59
7.11.-Propuesta de ELISA indirecta para la detección de rhTGF- β empleando vNART1	59
7.12.- Diseño del ensayo ELISA tipo sándwich basado en vNART1 para el reconocimiento de rhTGF- β	61
7.13.- Evaluación de linealidad usando TGF- β recombinante humana y la proteína Trx-vNART1.	63
7.14.-Curva de calibración y evaluación de muestras de suero usando Trx-vNART1 para detección.....	63
7.15.- Origen de las muestras biológicas	65
7.16.- Evaluaciones de detección de TGF- β empleando un kit comercial.....	65
7.17.- Análisis estadísticos.....	65

8.- RESULTADOS	66
8.1.- Digestión y clonación de construcción pET28a+T1.....	66
8.2.- Verificación de inserto Trx-vNART1 y transformación en BL21(DE3)	67
8.3.- Cuantificación de plásmido pET32a+vNART1	68
8.4.- Expresión del vNART1 en el vector pET28a+	69
8.5.- Expresión de la proteína Trx-vNART1 en el plásmido pET32a+	70
8.6.- Detección del vNAR T1 y de la proteína Trx-vNART1 por Western blot	73
8.7.- Replegamiento y purificación del vNART1 y la proteína Trx-vNART1 con glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG)	75
8.8.- Concentración del vNART1 y de la proteína Trx-vNART1	76
8.9.- Purificación y replegamiento en columna para la proteína Trx-vNART1 en por gradiente de urea	78
8.11.- Rendimiento de producción para vNART1 y la proteína Trx-vNART1	80
8.12.- Evaluaciones de reconocimiento de rhTGF- β por vNART1	80
8.13.- Evaluaciones de reconocimiento de rhTGF- β por la proteína Trx-vNART1	81
8.14.- Evaluaciones de linealidad empleando Trx-vNART1	84
8.15.- Evaluación de sueros humanos inmovilizados en placa para la detección de TGF- β	86
8.16.- ELISA tipo sándwich para el reconocimiento de rhTGF- β con el vNART1 o con la proteína Trx-vNART1	88
8.17.- Evaluación de sueros de pacientes con ERC en ELISA tipo sándwich empleando el anticuerpo de santa cruz para la detección de TGF- β y el vNART1 ...	90
8.18.-Resultados de la evaluación con kit comercial.....	93
9.-DISCUSIONES	95
10.-CONCLUSIONES	101
11.-PERSPECTIVAS.....	103

12.- ANEXOS	104
13.- REFERENCIAS.....	111

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

ERC	Enfermedad renal crónica
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
kDa.	Kilodalton
vNAR	Nuevo receptor de antígeno de calenda variable
LAP	Péptido asociado a latencia
TNF- α	Factor de necrosis tumoral Alfa
ERCT	Enfermedad renal crónica fase terminal
OPS	Organización Panamericana de la salud
OMS	Organización mundial de la salud
TFG	Tasa de filtrado glomerular
PIIINP	Propeptido aminoterminal del colágeno tipo 3
MCP	Proteína quimioatrayente de monocitos
L-FABP	Proteína urinaria tipo L de Unión tipo ácido graso
NGAL	Lipocalina asociada a gelatinasa neutrofílica
A SMA	Alf actina de músculo liso
Col1	Colágeno tipo 1
LPA	Receptor del acido lisofosfatidico
ET	Endotelina
ET1	Endotelina 1
CTGF	Factor de crecimiento del tejido conectivo
EFG	Factor de crecimiento epidermico
MRI	Resonancia magnética nuclear
Th1	Linfocitos t helper uno
Th2	Linfocitos t helper 2
ROS	Especies reactivas de oxígeno
R-smads	Receptor asociado a Smad
NCT	National clinical trials

Trx	Tiorredoxina
ELISA	Inmunoensayo ligado a enzimas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
GSH	Glutati3n reducido
GSSG	Glutati3n oxidado
6x His	Etiquetas de polihistidina

RESUMEN

Los protocolos que actualmente se llevan a cabo para establecer el diagnóstico de ERC incluyen pruebas de diversa índole, siendo las invasivas aquellas que ofrecen información acerca del grado de daño al riñón en esta afección, es por ello, que encontrar estrategias o alternativas menos invasivas o no invasivas que nos permitan relacionar directamente la presencia de un biomarcador con los niveles de daño presentes en el riñón del paciente. Esta es una de las metas en las estrategias de pruebas diagnósticas y que abre la posibilidad de aprovechar el potencial del papel de la citocina TGF- β con los niveles de daño renal asociado a fibrosis.

Los vNAR son moléculas inmunes provenientes de especies marinas que desempeñan un papel en la opsonización de diversos antígenos, en nuestro equipo de trabajo se cuenta con uno que es específico a TGF- β , es por ello que a través de su clonación y expresión en vectores pET28a+(expresión con etiqueta de histidina simple) y pET32a+(expresión con doble etiqueta de histidina) se logró evaluar su expresión, capacidad de reconocimiento antigénico, linealidad y reconocimiento en una matriz biológica (suero humano).

Los resultados nos muestran que la expresión en el sistema de expresión E. coli BL21 D3 con el vector pET32a+ se obtienen niveles mayores en comparación con la cantidad expresada en pET28a+. Así mismo la capacidad de reconocimiento resulta más específica a la isoforma 1 del TGF- β , demostrándose una aceptable correlación lineal entre la respuesta analítica y concentración de citocina en la prueba de ELISA desarrollada, aún es necesario realizar más evaluaciones empleando sueros de pacientes con enfermedad que implique procesos fibróticos por lo que los resultados de las evaluaciones en suero dan la pauta para continuar con las evaluaciones y posterior validación de esta prueba analítica.

1.- INTRODUCCIÓN

Existen citocinas que pueden causar daño y comprometer la adecuada funcionalidad de diversos órganos cuando son secretadas en niveles distintos a los fisiológicamente normales. Algunas enfermedades que afectan al riñón tienen un origen infeccioso o son ocasionadas por estados crónico-degenerativos, por lo general, conducen a daño progresivo que eventualmente da lugar a Enfermedad Renal Crónica (ERC). Este conjunto de enfermedades tienen en común un proceso mediado por citocinas, por ejemplo, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), que al producirse en forma excesiva se convierte en un promotor de procesos fibróticos¹ correlacionándose positivamente con el daño renal. El riñón es un órgano cuya función principal es la filtración, recibe una perfusión sanguínea de aproximadamente 600 mL de sangre por minuto y tiene una tasa de filtración glomerular cercana a 125 mL/min, que es equivalente a 180 L durante 24 horas. La formación de orina en el riñón permite mantener el equilibrio hidroelectrolítico y eliminar solutos no útiles producidos por el catabolismo o provenientes de la ingesta. También la reducción en la filtración glomerular y el deterioro del riñón se asocian con la pérdida de su capacidad funcional.

Generalmente, la detección de citocinas involucra la utilización de anticuerpos monoclonales tipo IgG con un tamaño de aproximadamente 150 kDa. Dado su forma de obtención a través de hibridomas, los anticuerpos monoclonales tienen un alto costo y requieren de un largo tiempo para su producción. Esto ha motivado la investigación de nuevas opciones de diseños de anticuerpos o dominios sencillos, que son formatos más compactos y funcionales, por ejemplo, los dominios denominados nuevos receptores de antígeno de región variable (vNAR) provenientes de especies marinas como el tiburón (12-15 kDa) o los fragmentos VHH presentes en camélidos (12-15 kDa). Específicamente, los vNAR son moléculas prometedoras para el reconocimiento de citocinas y podrían ser empleadas en el desarrollo de estrategias terapéuticas o de diagnóstico en la detección de biomarcadores en diversos procesos patológicos. En el caso de la enfermedad renal, los vNAR podrían emplearse para la generación de inmunoensayos que permitan detectar la citocina TGF- β y asociarla como un biomarcador en las distintas etapas de la enfermedad.

2.- ANTECEDENTES

2.1.- Generalidades del TGF- β

El TGF- β es una citocina que se encuentra involucrada en los procesos de proliferación, diferenciación, autofagia, apoptosis, fibrosis entre otros.² En los seres humanos esta citocina tiene tres isoformas denominadas TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. La isoforma TGF- β 1 es secretada por los linfocitos T CD4⁺ reguladores, los macrófagos activados y diversos tipos celulares.³⁻⁵ El TGF- β también induce la diferenciación de células mesenquimales de fibroblastos a miofibroblastos, adjudicándosele un rol fundamental en procesos fibróticos.^{6,7}

Esta citocina es biosintetizada en el aparato de Golgi en forma inactiva, compuesta por una estructura homodimérica asociada a un péptido denominado péptido asociado a latencia (LAP). Una vez secretada al exterior de la célula, el LAP es eliminado a través de una escisión proteolítica permitiendo al TGF- β adquirir su forma activa para realizar sus funciones biológicas.⁵ (Figura 1).

El TGF- β tiene funciones específicas, algunas de éstas son la inhibición de la proliferación y las funciones efectoras de los linfocitos T, así como la activación de los macrófagos por la vía clásica. De igual modo, el TGF- β ejerce un efecto supresor sobre otras células como neutrófilos y células endoteliales con la finalidad de controlar respuestas inflamatorias e inmunitarias exacerbadas.⁵ TGF- β también está involucrado en funciones de regulación de subgrupos de linfocitos, por ejemplo en linfocitos CD4⁺ inhibe la orientación hacia linajes de linfocitos T helper 1 (T_H1) y linfocitos T helper 2 (T_H2) e induce la diferenciación de los linfocitos CD4⁺ hacia el linaje de linfocitos reguladores (T_{reg}) o proinflamatorios T helper 17 (T_H17), dependiendo del microambiente de citocinas como la interleucina 10 (IL-10) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).⁵

TGF- β interviene en la síntesis de anticuerpos IgA debido a que induce del cambio hacia este isotipo de anticuerpo en los linfocitos B. Esta citocina también está asociada a funciones de reparación tisular después de que los procesos de inflamación han

disminuido; esto principalmente debido a que el TGF- β influye directamente sobre los macrófagos y fibroblastos, originando un efecto promotor sobre la síntesis de colágeno y la producción de enzimas que modifican la matriz celular. Este tipo de respuesta permite mantener la homeostasia en el organismo. Sin embargo, TGF- β también tiene un papel importante y perjudicial en procesos patológicos donde la fibrosis es un elemento clave. Finalmente, en procesos reparativos y fibrótico, los macrófagos activados por la vía alternativa son buenos productores de TGF- β .⁵

2.2.- Efectos del TGF- β en los tejidos

En condiciones normales, las células de los diferentes tejidos pueden encontrarse expuestas a estímulos tales como las especies reactivas de oxígeno (ROS), plasmina, entre otros. Estos factores propician un microambiente fibrótico que promueve la escisión del LAP del TGF- β inactivo para dar lugar a su forma activa (Figura 1). Una vez que el TGF- β se encuentra en su forma activa es capaz de interactuar con el receptor tipo 2 del TGF- β (T β RII).^{3,4}

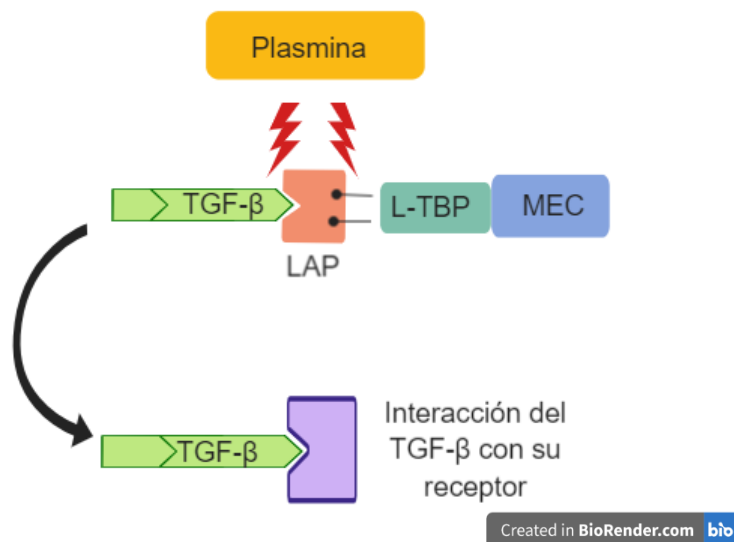


Figura 1.- Síntesis de TGF- β . El TGF- β se sintetiza como una molécula inactiva que se encuentra unida al péptido asociado a latencia (LAP), que está anclada a la matriz extracelular mediante la proteína de unión al TGF- β latente (LTBP), la cual necesariamente debe ser separada proteolíticamente para que el TGF- β soluble pueda interactuar con su receptor. Imagen tomada y modificada de “El factor de crecimiento transformante β como blanco terapéutico”, Gálvez F. et. al., 2004.⁸

El receptor tipo 2 T β RII, tiene un papel constitutivo de cinasa, cuando interactúa con TGF- β el receptor se encarga de reclutar al receptor tipo 1 del TGF- β (T β RI), con la subsecuente fosforilación del receptor asociado a Smad (R-Smads),³ lo que permite la propagación secuencial intracelular de la señal generada y los efectos pro-inflamatorios o anti-inflamatorios en diversos tipos celulares⁴ (ver Figura 2).

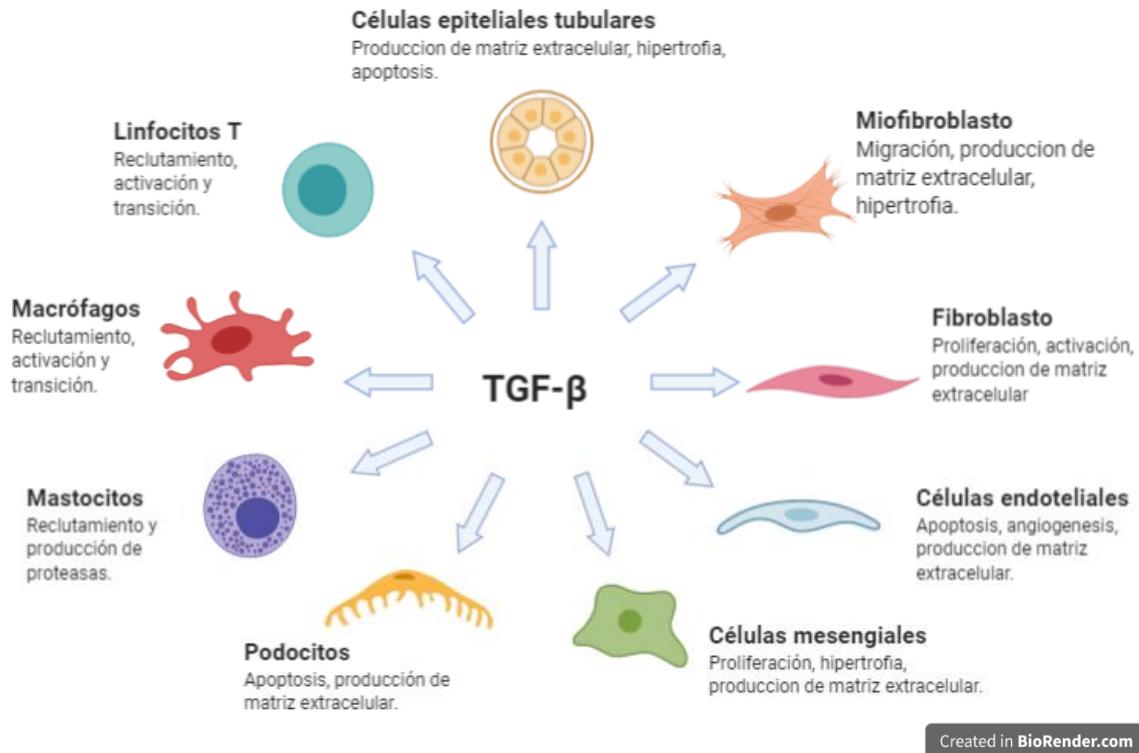


Figura 2.- Efecto a nivel celular del TGF- β sobre diferentes células. Se observa el efecto e interacción que tiene la citocina en los diversos tipos celulares presentes en el riñón. Información de la imagen tomada y modificada de "TGF- β / Smad signaling in renal fibrosis", Meng X. et. al., 2015.⁴

En este punto de la vía intracelular, los oligómeros fosforilados Smad2 y Smad3 dan lugar a la formación de un dímero capaz de interactuar con Smad4. Este complejo tiene la capacidad de translocarse al núcleo celular y permitir la regulación de la transcripción de genes que codifican promotores de la acumulación de matriz extracelular:⁴ alfa-actina del músculo liso (α -SMA) y colágeno tipo 1 (Col1). (Figura 3)

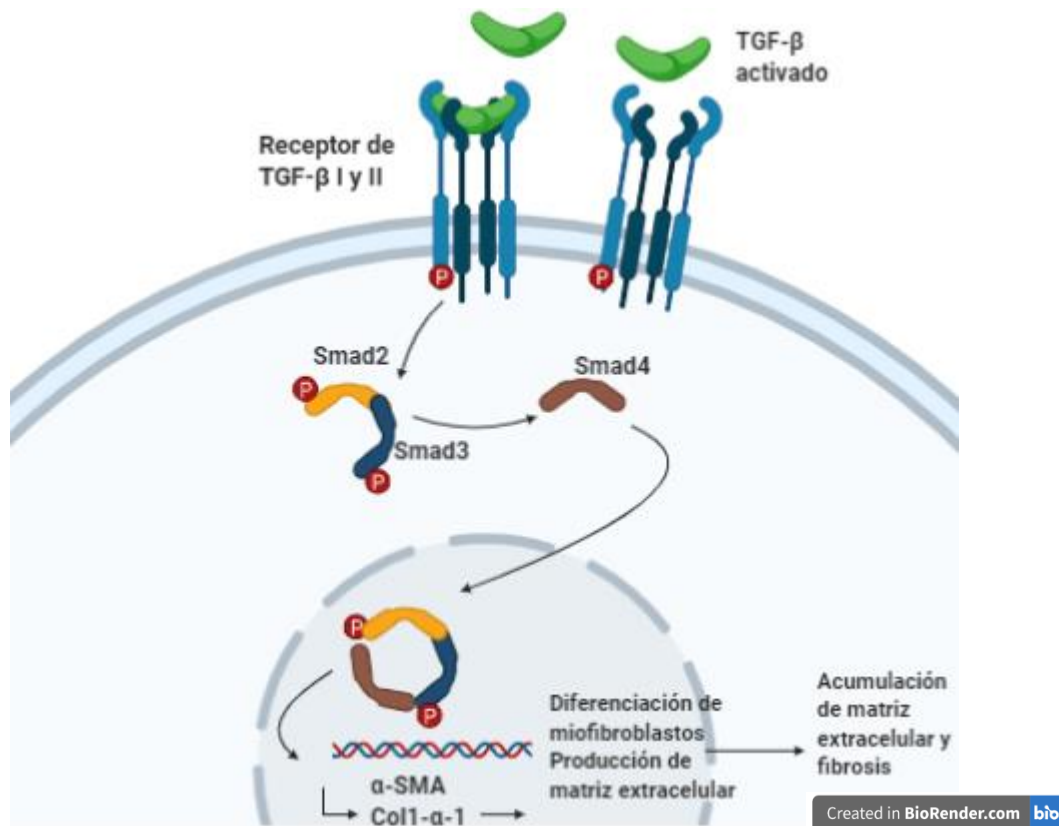


Figura 3.- Vías de activación y señalización de los efectos fibróticos del TGF-β. En este proceso interviene el receptor 2 del TGFβ (rII-TGF-β) que se encarga de reclutar al receptor tipo1 (rI-TGF-β) y a través de un mecanismo de fosforilación downstream promueve la generación de precursores profibróticos.⁴

En contraparte, existe un mecanismo regulador de esta vía a través de Smad7 que actúa como un inhibidor de fibrogénesis.⁹ El equilibrio correcto en la regulación de ambas vías de Smad3 y Smad7 se encarga de mantener en niveles adecuados el balance de la fibrosis, la acumulación de miofibroblastos y la matriz extracelular, así como su regulación.⁴

En el ambiente fibrótico, se ha estudiado el efecto específico del TGF-β1 asociado a su LAP en la matriz extracelular y sus componentes, encontrándose que la fibrina y la fibronectina son moléculas de interacción covalente con TGF-β por acción de la enzima transglutaminasa.¹⁰ Esto evidencia que es posible obtener un depósito de TGF-β

latente que empezará a ser fisiológicamente activo cuando un proceso patológico desencadene su liberación.¹¹ En un proceso de daño establecido los fibroblastos se trans diferencian y se activan dando lugar a miofibroblastos. Esta citocina ha sido reportada con la capacidad de estimular¹² e inhibir¹³ tanto a células del tejido epitelial como a células endoteliales, creando las condiciones propicias para que los miofibroblastos inducidos lleven a cabo sus propiedades invasivas al responder positivamente al estímulo.¹²

2.3.- TGF- β en los procesos fibróticos

El proceso de fibrosis se caracteriza por la presencia de un depósito excesivo de material extracelular que forma una matriz extracelular compuesta principalmente por proteoglicanos, ácido hialurónico y proteínas fibrilares, junto con colágeno y fibronectina. Estos elementos en el contexto de la fibrosis conducen a la pérdida de integridad funcional y morfológica del órgano o tejido.¹⁴ En algunos órganos como en el riñón, el grado de la severidad de la fibrosis está directamente relacionado con la afectación del riñón de los pacientes.^{15,16}

El miofibroblasto es un tipo celular que se encuentra involucrado en procesos fibrogénicos. Esta célula es un promotor directo en el proceso de la fibrosis.¹⁷ Algunos tipos celulares tienen la capacidad de convertirse a miofibroblastos¹⁸ mediante el estímulo de factores del ambiente extracelular como las citocinas, los factores de crecimiento y el daño causado por estrés mecánico.^{19,20}

Existen receptores presentes en el miofibroblasto que se encuentran encargados directamente en el desencadenamiento de sus funciones entre los cuales se encuentran: el receptor del ácido lisofosfatídico (LPA), la endotelina (ET), endotelina-1 (ET-1), el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) y el TGF- β .¹⁴ Es importante hacer mención del activador inhibidor del plasminógeno 1, que al ser sobreexpresado permite la deposición de matriz extracelular.²¹ En condiciones normales, los miofibroblastos responden ante un estímulo de estrés o daño, lo que propicia su activación con la finalidad de dar lugar a la reparación del tejido. Una vez

que se ha realizado esta función, los miofibroblastos se autoeliminan a través de apoptosis.¹⁴

2.4.- Fibrosis

La existencia de fibrosis excesiva en los tejidos significa un proceso fuera de control en relación con la auto-reparación del tejido u órgano, lo que conduce a la pérdida de función tisular. En condiciones normales, la auto-reparación se encarga de reordenar las células del tejido que han sufrido daño y apoptosis. Este daño tiene diversas causas como lo son las infecciones, reacciones de tipo autoinmune, entre otros.²²

Los mecanismos normales de reparación tienen como finalidad la regeneración del tejido en donde son reemplazadas las células dañadas por otras idénticas y no existe evidencia del daño que tuvo lugar. Los miofibroblastos cumplen una función de reparación efectiva, mientras que en desregulaciones patológicas se encuentran participando en una fase fibrogénica que da lugar al reemplazo del parénquima por tejido conectivo en donde la matriz extracelular se produce de manera continua.²³ La desregulación de estos mecanismos involucrados en la reparación del tejido es determinante en la remodelación de la matriz extracelular, promoviendo el establecimiento la matriz fibrótica que viene como resultado de procesos inflamatorios crónicos.²²

El colágeno es uno de los principales componentes involucrados en el proceso de fibrosis debido a su acumulación y depósito en órganos, específicamente en el intersticio intratubular del riñón se produce un adelgazamiento de los capilares peritubulares, dando como resultado la falta de oxigenación en el tejido afectado. Este evento de hipoxia favorece mecanismos fibróticos dando lugar a un sistema profibrótico de retroalimentación positiva.²⁴

El daño causado en el tejido favorece condiciones pro-fibróticas, promoviendo el efecto de mediadores inflamatorios que inician el proceso anti-fibrinolítico de coagulación. En este proceso primeramente existe la formación de un coágulo y una matriz extracelular provisional, seguido de la degranulación de las plaquetas lo que permite la vasodilatación. Las células del endotelio dañado secretan citocinas, factores de

crecimiento y quimiocinas que permiten el reclutamiento de células proinflamatorias. Las células reclutadas son estimuladas a través del ambiente de daño al liberar citocinas que promueven la reparación tisular como el TGF- β y la IL-10.²²

Este ambiente de citocinas permite la diferenciación del fibroblasto a miofibroblasto, seguido de su migración hacia el centro de la lesión, favoreciendo la contracción de la misma.²² Un evento importante a considerar es que cuando ocurre un proceso de daño repetido, la inflamación crónica seguido de reparación dan lugar a la acumulación de elementos que promueven la acumulación excesiva de matriz extracelular, entre ellos se encuentra el ácido hialurónico, fibronectina, proteoglicanos, colágeno intersticial, mismos que favorecen el mantenimiento de una herida persistente.²²

Se ha relacionado el papel de las citocinas como el TGF- β sobre el efecto proinflamatorio y también sobre el favorecimiento de la transformación de fibroblastos a miofibroblastos.²⁵ En la fibrosis es característico observar la diferenciación de los miofibroblastos, así como su infiltración progresiva y crónica en el sitio de la lesión produciendo continuamente matriz extracelular.²⁴

2.5.- Fibrosis renal

En el caso particular del riñón son diversas las patologías que agravan la fibrosis del órgano causando complicaciones patogénicas. Estos cambios patogénicos son originados por efecto del TGF- β , que promueve el cambio de fenotipo celular (ver figura 5) y la producción de colágeno, además de la interacción con otras moléculas que maximizan el efecto dañino.¹⁵ La fibrosis renal se caracteriza por la excesiva acumulación y depósito de matriz extracelular que conduce a la pérdida progresiva e irreversible de la capacidad de filtración en el riñón que se denomina ERC. Esta acumulación de tejido conjuntivo está directamente relacionada con la pérdida de la función fisiológica de los túbulos y capilares renales y su consecuente progresión desencadena un estado patológico más grave denominado enfermedad renal de estado terminal (ERCT). En este contexto, se hace evidente la determinación de los niveles o grado de fibrosis alcanzado en una escala cuantitativa.^{4, 24}

Los cortes histológicos de pacientes con ERC se caracterizan por acumulación de tejido conjuntivo, mismo que está directamente relacionado con la pérdida de la función fisiológica de los túbulos y capilares renales. (ver figura 4) Este hecho lo vincula estrechamente al progreso y deterioro del órgano en la ERC. ²⁴

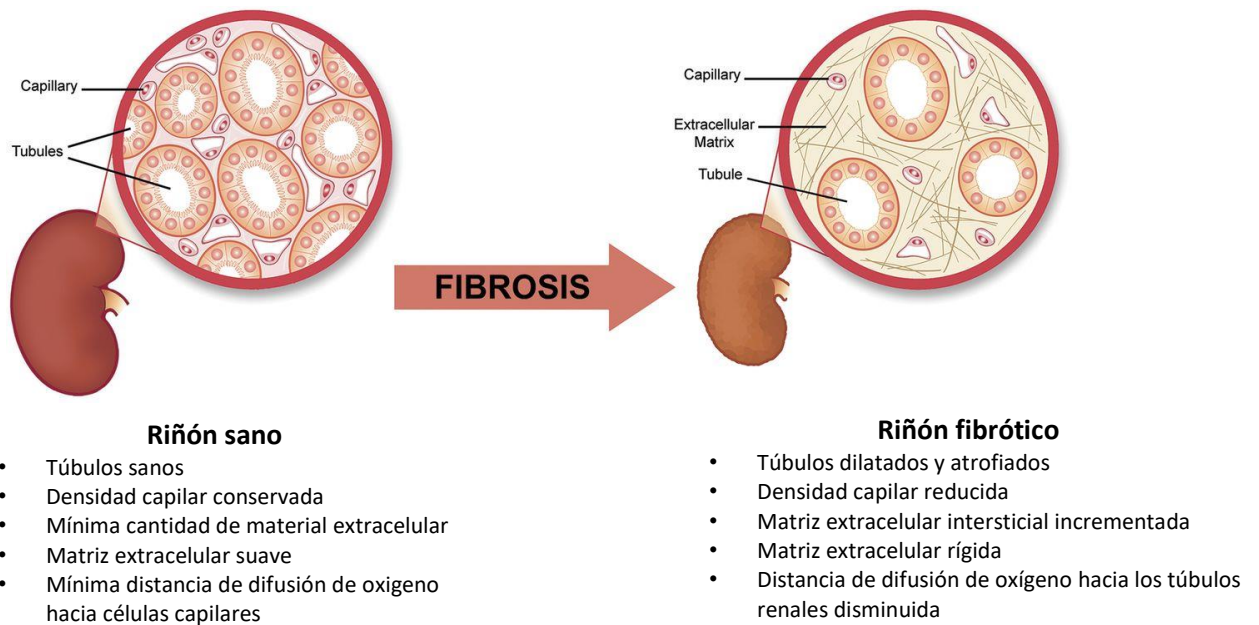


Figura 4.- Excesiva acumulación y depósito de colágeno y tejido conjuntivo da lugar a la pérdida de la capacidad de filtración en el riñón en ERC. Existe acumulación de colágeno, depósito de tejido conjuntivo, adelgazamiento de capilares peritubulares, pérdida de la función fisiológica, hipoxia y con retroalimentación positiva para fibrosis. ²⁶

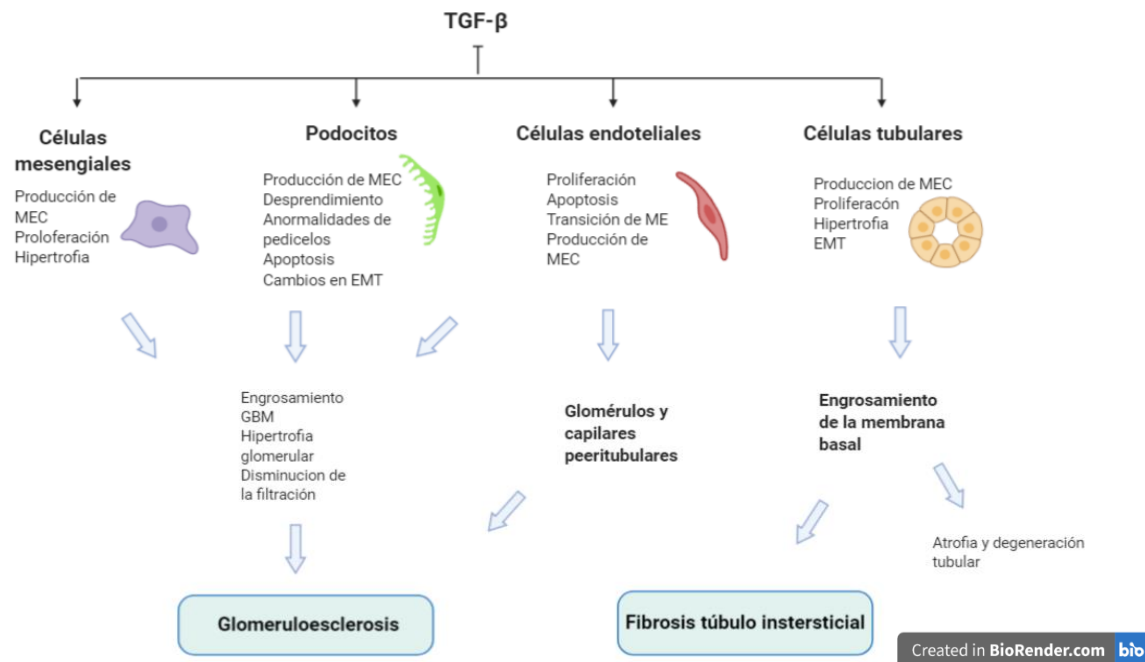


Figura 5.- Representación de las vías del TGF- β que conducen a glomeruloesclerosis y fibrosis túbulo intersticial. Los cambios en las células renales (hipertrofia, apoptosis y anormalidades de los podocitos) conducen a la disminución de la tasa de filtrado glomerular, pérdida de capilares glomerulares e intersticiales, atrofia tubular, fibrosis intersticial. Imagen tomada de "TGF- β y otras moléculas profibróticas en enfermedad renal crónica" Topete-Reyes. 2015¹⁵

2.6.- ERC

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), la ERC también denominada insuficiencia renal crónica representa un estado patológico que se caracteriza por la pérdida gradual de la función renal; y cuando se ha alcanzado una etapa avanzada los niveles de solutos de desechos que normalmente se eliminan se incrementan causando daños en el organismo.²⁷

Las causas que originan la ERC pueden originarse a partir de patologías como nefropatía diabética,²⁸ nefropatía por IgA,²⁹ nefropatía membranosa,³⁰ glomeruloesclerosis focal y segmentaria,³¹ entre otras. En estas enfermedades los mecanismos patológicos de daño en el tejido siguen las siguientes directrices:

inicialmente existe presencia de inflamación, seguido de fibrosis, donde es evidente la presencia de una matriz extracelular proteica, proteoglicanos y glicoproteínas,³² así como, el incremento de depósitos de colágeno con la siguiente afectación en la capacidad fisiológica del órgano por causa de la fibrosis.¹⁵

Según un comunicado de la OPS y la Organización Mundial de la Salud (OMS), se declara que la ERC afecta a cerca del 10% de la población a nivel mundial, a pesar de no tener una cura eficaz, es considerada una condición prevenible.³³ La ERC se produce por efecto de los daños atribuidos a enfermedades crónico-degenerativa, principalmente la diabetes e hipertensión arterial no controlada, siendo estos los factores más importantes en el desarrollo de la ERCT.^{34,35}

Estas enfermedades desencadenan un proceso asociado a daño mediado por citocinas como el TGF- β ,³⁶ el factor derivado de las plaquetas (PDGF), el TNF- α , las interleucinas 1 y 6 (IL1 e IL6),³⁷ el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF).³⁸

Actualmente, el incremento en la incidencia de la ERC impacta económicamente en la atención de los pacientes debido al elevado costo de los tratamientos.³⁹ La ERC avanza junto con el daño renal de manera progresiva hasta la etapa avanzada e irreversible donde la diálisis peritoneal, la hemodiálisis y el trasplante renal son las opciones para tratarla. Estas terapias de sustitución renal son invasivas y no se encuentran disponible para toda la población debido a los costos elevados, así como la disponibilidad de personal médico especializado y la escasa donación de órganos.³³ La iniciativa de calidad de la evolución de la enfermedad renal de la Fundación Nacional del Riñón (NKF / KDOQI, por siglas en inglés), presenta un esquema que agrupa a los pacientes con afectación renal y los clasifica según las siguientes condiciones clínicas para el diagnóstico de pacientes con ERC, considerando los valores de la filtración glomerular inferior a los 60 mL/ min * 1.73 m² de superficie corporal que puede estar acompañado de anomalías y daño al riñón durante al menos 3 meses.⁴⁰ En México, la ERC no se encuentra cubierta dentro del cuadro básico de enfermedades en pacientes mayores de 20 años por lo que se produce un impacto

económico negativo tanto para las familias de los pacientes, así como a largo plazo para las instituciones de salud.⁴¹

2.7.- Diagnóstico y clasificación según la severidad de ERC

Según la guía de práctica clínica para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la ERC se puede considerar en etapa temprana cuando en dos determinaciones en un período de 3 meses exista evidencia de daño renal y/o disminución en la tasa de filtración glomerular (TFG) en el paciente (Tabla 1).⁴²

Actualmente el diagnóstico de ERC se basa en los resultados de la evaluación de la función renal contemplando los siguientes parámetros: 1) TFG, proteinuria o albuminuria, y 2) la presencia de otros elementos como células, cierto tipo de cilindros o cristales en el sedimento urinario los cuales dan información acerca de la presencia de enfermedad glomerular, intersticial o vascular. Otras pruebas que nos permiten complementar un diagnóstico más certero son 3) las pruebas de imagen y 4) las imágenes histopatológicas. Las estrategias empleadas en este diagnóstico son por lo general utilizadas cuando el paciente presenta la afectación avanzada.⁴²

Estadio	Descripción	TFG (mL*min/1.73m ²)	Plan de acción
0	Incremento del riesgo	Mayor o igual a 90 (con factores de riesgo)	Escrutinio y reducción de factores de riesgo para ERC
1	Daño renal con TFG normal	Mayor o igual a 90	Diagnóstico y tratamiento Tratamiento de morbilidad asociada , intervenciones para retardar la progresión, reducción de factores de riesgo para la enfermedad cardiovascular
2	Daño renal con TFG levemente disminuida	60-89	Estimación y retraso de la progresión
3	Disminución moderada de la TFG	30-59	Evaluación y tratamiento de complicaciones

4	Disminución severa de la TFG	15-29	Preparar para terapia de reemplazo renal
5	Enfermedad renal terminal	Menor a 15	Terapia de reemplazo renal

Tabla I.- Clasificación de la severidad de la enfermedad renal crónica según la TFG (Modificado de Levey A. *Ann Med* 2004; 141: 959-961).

2.8.- Evaluación del daño asociado a fibrosis por ERC

Existen una diversidad de enfermedades renales que pueden desencadenar en ERC debido a mecanismos fisiopatológicos como: inducción en el cambio del fenotipo celular presente en el parénquima renal, incremento en la síntesis de colágeno y acumulación de matriz extracelular.¹⁵

Actualmente, existen ciertos parámetros que permiten evaluar el grado de fibrosis alcanzado por el riñón, comúnmente la biopsia renal es utilizada para la evaluación del daño fibrótico una vez que se han agotado todas las opciones no invasivas para evaluar la integridad del parénquima renal (Tabla 1). Esta técnica actualmente es considerada en conjunto con las pruebas de imagen como “estándar de oro”⁴³ en la evaluación del daño renal por fibrosis. Sin embargo, es un tratamiento invasivo y además, debido a la pequeña porción de tejido analizada tiene la desventaja de ser susceptible a cometer un sesgo en el muestreo, ya que por lo general las muestras evaluadas corresponden a las porciones más distantes a la médula renal siendo una muestra poco homogénea. Debido a estas limitaciones, se han buscado alternativas más efectivas y confiables para evaluar el daño fibrótico, entre ellas están las pruebas de imagen como la resonancia magnética nuclear (MRI) que tienen mayor calidad y resolución. Estas pruebas permiten evaluar el nivel de daño que se ha alcanzado en el tejido renal sin embargo, el costo elevado así como el uso de equipos especializados que son operados únicamente por personal certificado significan un limitante en su implementación.²⁶

Se estima que cerca del 75% de individuos mayores de 70 años se encuentran en el estadio en donde existe alteración en la TFG, las pruebas de imagen, aparición de elementos que evidencian daño a través de la observación del sedimento urinario, así como albuminuria mantienen al paciente en un estado asintomático. Sin embargo, el daño se ha establecido.⁴⁴

La aplicación de la fórmula de Cockcroft-Gault permite estimar la función renal considerando la creatinina, sin embargo, presenta ciertos inconvenientes ya que existen variaciones de los valores de creatinina entre diferentes poblaciones de pacientes, por lo que no es posible considerarla como un estándar de alteración renal asociado a fibrosis. Los valores de la creatinina dependen de diversos factores como la edad del paciente, la masa muscular, entre otros, e inclusive algunos autores reportan que el riñón es capaz de perder hasta el 50% de su función sin reflejar incremento en la creatinina sérica.^{44,45}

2.9.- Biomarcadores para la detección de fibrosis renal

Actualmente no existe un biomarcador ideal para asociar eficientemente niveles de fibrosis con el daño presente en el órgano y la única herramienta clínica que permite detectar la presencia de fibrosis es la biopsia renal. Sin embargo, la biopsia trae riesgos por lo que no es empleada rutinariamente.⁴⁶ Ante este panorama, se han buscado moléculas que permitan establecer cierto grado de correlación de su presencia o concentración con el nivel de lesión presente en el órgano. Un biomarcador de daño renal ideal permitiría detectar etapas tempranas del mismo, así como ser de utilidad para la predicción de la progresión del daño.⁴³

Los parámetros a considerar para biomarcadores con aplicación clínica son: 1) Que la técnica empleada, así como la estrategia sea lo menos invasiva pero que obtenga los valores del analito de interés a partir de una muestra de suero u orina; 2) Determinación medible de manera rápida a través de protocolos estandarizados; 3) Sensible de modo que se permita la detección temprana permitiendo que existan diferentes puntos de estratificación de los valores del analito según el grado de afectación; 4) Capaz de

relacionar y asociar los resultados clínicos como necesidad de diálisis, tiempo de permanencia en el hospital, mortalidad; 5) Guiar el inicio de terapias; 6) Monitorizar la respuesta de los pacientes frente a tratamientos.⁴⁷

En el caso de un biomarcador renal, la detección temprana de daño en el tejido es clave aun cuando el paciente no presente signos y/o síntomas clínicos de ERC (Etapas 1-2).⁴³ Debido a que el riñón es un órgano capaz de llevar a cabo sus funciones a pesar de presentar afectación en el tejido, las manifestaciones clínicas avanzan silenciosamente hasta que el tejido renal ha adquirido un daño considerable y que es irreversible. Es por ello que se hace evidente la importancia de la detección del daño renal en etapas tempranas.⁴⁴

En 2017 fue publicado un metaanálisis que recopiló información de aquellas moléculas que se encuentran ampliamente expresadas en afectaciones en el riñón, determinando posibles biomarcadores del estadio 1 por ejemplo: 1) el pro-péptido amino terminal del colágeno tipo 3 (PIIINP) urinario se correlaciona positivamente con la fibrosis; 2) el TGF- β sérico, haciendo posible diagnosticar fibrosis, mientras que el TGF- β urinario se correlaciona positivamente con la aparición de fibrosis un año posterior al diagnóstico clínico;⁴⁸ 3) la proteína quimio-atrayente de monocitos (MCP-1) demostró ser útil para diagnosticar fibrosis;^{43,49} 4) el inhibidor-1 del activador del plasminógeno (PAI-1) es un biomarcador con valores evaluados y se encontró que su presencia correlaciona positivamente con fibrosis;⁵⁰ 5) la metaloproteinasa 2 (MMP-2), se correlacionó con los niveles de fibrosis en los pacientes evaluados.⁴³ En la fase 2 del estudio, los biomarcadores como TGF- β , MCP-1, y MMP-2 presentes en muestras de suero u orina se relacionaron positivamente con alteraciones en la funcionalidad renal además de presencia de fibrosis.⁴³

Han sido reportadas otras moléculas asociadas a daño como la hepcidina⁵¹, la proteína urinaria tipo L de unión tipo ácido graso (L-FABP)⁴⁹, Retinol Binding Protein RBP urinario⁵². En pacientes con lupus y glomerulopatías estos marcadores han demostrado estar presentes en estudios donde se evaluaron los grados de correlación de dicho biomarcador y grado de fibrosis en la biopsia analizada.⁴³ Otros biomarcadores evaluados han sido lipocalina asociada a la gelatinasa neutrofílica

(NGAL, por sus siglas en inglés)⁴⁷ y la molécula 1 de lesión renal (KIM-1, por sus siglas en inglés).^{47,53}

Dentro de los biomarcadores renales recientemente evaluados KIM-1 ha sido una molécula que ha despertado interés en el diagnóstico de lesión renal y es posible encontrar en el mercado kits comerciales para su detección.^{54,55,56} Debido a que ha sido reportada como una molécula con la capacidad para correlacionar sus niveles con el daño agudo⁴⁷ con la duración y severidad de la lesión renal.⁵³ Ha sido correlacionada la presencia de KIM-1 con los niveles de daño en un modelo animal de ratones con lesión renal inducida a través de isquemia-reperfusión. Del mismo modo también fueron evaluados los niveles de KIM-1 en pacientes con diabetes tipo 1 y proteinuria, encontrándose que KIM-1 es un biomarcador que refleja específicamente la lesión renal aguda. Además de ser una herramienta útil que pronostica la TFG y el riesgo de aparición de enfermedad renal de estado terminal durante 5-15 años subsecuentes.⁵⁷

Es posible encontrar en la circulación sanguínea a KIM-1 únicamente cuando existe lesión renal, esto se debe al daño en el parénquima específicamente en los túbulos renales que se vierten sobre el intersticio, permitiendo una mayor permeabilidad trans-epitelial favoreciendo que los contenidos tubulares se viertan a la circulación sanguínea.^{58 59}

KIM-1 es una proteína que provee información acerca del daño inicial en la arquitectura del riñón. Sin embargo, no proporciona información acerca de un probable proceso fibrótico que se pueda estar estableciendo principalmente durante procesos patológicos (nefropatía diabética, microalbuminuria, nefropatía IgA, anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo, lupus, glomerulonefritis membranosa idiopática) en donde la presencia de fibrosis es característica. El proceso fibrótico tiene lugar en diferentes fases, donde primariamente se tiende a proteger el tejido dañado.^{60,61}

Cuando el daño renal no es detectado a través de biomarcadores tempranos de daño como KIM-1 y el daño tisular continua ocurren uno de dos eventos probables de reparación del tejido: el primero es aquel donde todas la células dañadas son reemplazadas por células idénticas totalmente funcionales y no existe presencia de daño que ha tenido lugar, mientras que por el segundo tipo de reparación implica un

proceso de inflamación crónica donde tiene lugar el inicio de la fase fibrogénica promoviendo la acumulación de tejido conectivo.²²

Lo anterior pone en evidencia el área de oportunidad que existe cuando no se detecta el daño inicial en el riñón y ha tenido lugar el establecimiento del proceso de fibrosis, es aquí donde se abre un área de oportunidad para determinar el grado de fibrosis presente en el órgano. Esta premisa hace notar las ventajas que ofrece la determinación de TGF- β sobre los biomarcadores ya establecidos y caracterizados como KIM-1.

2.10.- El TGF- β como marcador de procesos fibróticos renales

El TGF- β ha sido reportado como un agente clave en el desarrollo de fibrosis en todos los órganos.⁶² Específicamente su sobreproducción por células renales permite dar lugar a la expresión de proteínas de matriz extracelular resultando en una amplia variedad de cambios fisiopatológicos que provocan la disfunción renal.¹⁶

Ha sido reportado el papel clave que tiene en la patogénesis de fibrosis cardiaca e hipertrofia, ya que se ha relacionado y comprobado que el TGF- β promueve la trans diferenciación de los miofibroblastos y síntesis de matriz extracelular evitando la activación de macrófagos proinflamatorios.⁶³ También se ha demostrado que su presencia es un factor importante en el progreso de la ERC en pacientes con glomerulonefritis crónica de origen diabético con la presencia de las tres isoformas de esta citocina tanto en el intersticio tubular como en el glomerular. Esto se relaciona directamente la presencia de la citocina con el nivel de matriz extracelular presente en el tejido.⁶⁴

En otro estudio fueron evaluados los niveles de esta citocina en la orina, los resultados mostraron presencia de niveles significativamente mayores en comparación a aquellos que no presentaban afectación en el riñón. Además de una relación directamente proporcional de fibrosis y esclerosis en el tejido renal.⁶⁵

En otro estudio, se evidenció el rol fundamental del TGF- β en un modelo de fibrosis hepática en roedores en conjunto con el monitoreo del progreso de daño glomerular en el riñón por efecto de la sobreexpresión de esta citocina en su forma activa por parte de las células hígado.⁶⁶ *Kumar y cols.*, evaluaron el efecto funcional del TGF- β en un modelo murino con diabetes inducida por estreptozotocina. En este estudio fue administrado un anticuerpo tipo IgG monoclonal anti-TGF- β . Los resultados mostraron que el grupo tratado con el anticuerpo tenía un efecto preventivo de hipertrofia glomerular en comparación con el grupo control no tratado.⁶⁷

En otro estudio se determinaron los niveles de TGF- β 1 urinario en 41 pacientes con glomerulonefritis idiopática, 25 pacientes sanos, 6 pacientes con previo trasplante renal y 7 pacientes con proteinuria. Los resultados mostraron que los niveles de TGF- β 1 presente en el suero de pacientes con enfermedad (glomerulonefritis idiopática) fue significativamente más alta que en los controles sanos, los autores concluyen que la excreción de TGF- β está directamente relacionada con la excreción de albúmina y también se correlaciona con la inflamación intersticial.⁶⁵

Existen patologías que son causadas tanto por la excesiva producción del TGF- β en el organismo como por su inhibición tanto a nivel de expresión como bloqueo de la citocina para evitar que alcance a su receptor específico. Se ha encontrado que la inhibición del TGF- β como estrategia terapéutica en contra de la generación de tejido fibrótico resulta ser de utilidad en diferentes patologías donde están involucrada la participación de miofibroblastos²⁵. Esto podría enfocarse en patologías como la enfermedad de Dupuytren que se caracteriza por un excesivo depósito de matriz extracelular,⁶⁸ la fibrosis en órganos como hígado, pulmones, riñones,⁶⁹ la acumulación de matriz extracelular en procesos cancerosos.⁷⁰ Sin embargo, estudios en un modelo animal deficiente del gen que codifica para TGF- β demostraron que el TGF- β 1 es un factor que tiene un rol regulatorio de gran importancia evidenciando que su disrupción es causante de respuesta celular inflamatoria exacerbada y necrosis del tejido.⁷¹ Otros estudios han reportado resultados similares en donde la no expresión de esta citocina compromete al organismo debido a la respuesta inflamatoria excesiva acompañado de infiltración masiva de células como linfocitos, macrófagos en diversos

órganos además de ser causante de muerte prematura.⁷² Por otro lado, su rol en procesos mutagénicos indican que el TGF- β interfiere en procesos que se encargan de la reparación del ADN específicamente interviniendo negativamente en la expresión de genes con función reparadora del ADN.⁷³ Sin embargo, el eliminar al TGF- β o interferir en sus componentes en sus vías de señalización puede llevara a efectos adversos no deseados.⁷⁴

El TGF- β es esencial para el correcto funcionamiento del organismo cuando éste mantiene sus niveles adecuados. Sin embargo, su desbalance y producción excesiva en ciertos estados patológicos es una de las causas en las complicaciones que se presentan. Ante este panorama se abre la posibilidad de emplear al TGF- β como una molécula de referencia en el progreso de fibrosis en órganos como el riñón, considerando de particular importancia este órgano debido a que la fibrosis renal es el destino patológico en común donde convergen una gran variedad de patologías que afectan al riñón donde existe incremento del depósito y producción de la matriz extracelular, superando la capacidad de degradación, derivando en la desregulación de la interacción celular y matriz, infiltración de células inflamatorias así como la transformación de las células propias del parénquima renal, siendo en este escenario que TGF- β es el responsable de estos efectos fisiológicos.⁷⁵

2.11.- Estrategias para la determinación de TGF- β

Ante este escenario, el TGF- β se propone como marcador de la presencia de fibrosis renal debido a que en diversos estudios se ha vinculado positivamente a la citocina con los niveles de fibrosis y daño renal.⁴³ Actualmente se encuentran disponibles diversos kits para la determinación o cuantificación de la citocina TGF- β , donde se emplean anticuerpos monoclonales tipo IgG como base para los inmunoensayos. Sin embargo, existe el inconveniente del costo elevado así como presentar variabilidad en sus resultados haciéndolo cuestionables y/o poco útiles por su pobre precisión.^{76,77}

En la actualidad los diseños de inmunoensayos basados en formatos de inmunoglobulinas buscan poder determinar y brindar de una manera más efectiva, ofrecer mayor sensibilidad, especificidad, precisión y exactitud permitirán obtener

datos más certeros acerca de los niveles en suero de esta citocina en pacientes con potencial riesgo de desarrollar ERC asociada fibrosis. Por lo tanto, en esta tesis se propone desarrollar una prueba inmuno-enzimática con un dominio sencillo vNAR para la detección del TGF- β que es considerado un marcador de daño renal a fin de tener utilidad diagnóstica en la ERC. ²⁶

En la mayoría de los estudios donde se detecta a la citocina TGF- β se emplean anticuerpos monoclonales y el analito se puede encontrar en diversas matrices biológicas como suero, plasma, orina y sobrenadantes de cultivos celulares. Algunos de los anticuerpos específicos a TGF- β que han sido empleados en estudios con fines de investigación y que pueden ser encontrados en el mercado son: Human TGF- β 1 Immunoassay (R&D Systems) y la Human TGF-beta 1 IQELISA Kit (Ray Biotech). Ambos inmunoensayos se basan en un formato de ELISA tipo sándwich.

En los formatos existentes de inmunoensayos, el ELISA tipo sándwich se basa en que un anticuerpo anti-TGF- β sirva de captura de la citocina presente en la muestra. La citocina capturada será reconocida por un anticuerpo secundario acoplado con la enzima (peroxidasa, fosfatasa, entre otras). Finalmente, el revelado se logra a través de la interacción de la enzima con su sustrato específico (Figura 6).^{65,76-78}

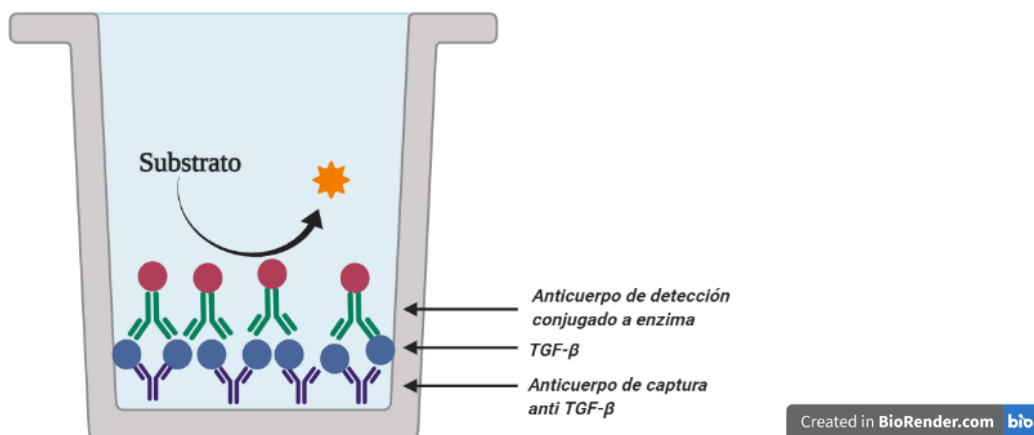


Figura 6.- Formato del inmunoensayo ELISA tipo sándwich empleado comúnmente en los kits de detección de TGF- β disponibles comercialmente.

2.12.- Anticuerpos y estrategias anti TGF- β

Actualmente existen tratamientos basados en anticuerpos monoclonales con capacidad de reconocer a TGF- β que han sido empleados con fines de investigación y debido a los resultados prometedores se han iniciado evaluaciones en fases clínicas para el tratamiento de padecimiento en humanos. Estos anticuerpos son capaces de intervenir en las vías de señalización donde el TGF- β juega un papel crucial en el progreso y mantenimiento de la enfermedad. Los resultados prometedores han permitido evidenciar su capacidad como inhibidores de angiogénesis en procesos cancerígenos,⁷⁹ procesos de hipertrofia de tejido renal,⁶⁷ procesos fibróticos a nivel de la córnea⁸⁰ o inclusive estrategias que intervienen en las vías de señalización por la infección causada por parásitos como *Trypanosoma cruzi*⁸¹ quien es el agente causal de la enfermedad de Chagas.

Algunas estrategias que difieren de los anticuerpos monoclonales son los oligonucleótidos anti-sentido que se encargan de bloquear las secuencias de ARN que codifican para TGF- β 1 y TGF- β 2⁸², nombrados AP11014 y AP12009/Trabedersen respectivamente. Estos oligonucleótidos anti-sentido se encuentran diseñados para el tratamiento del melanoma, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal y glioma.⁸³ Por otro lado, la alteración en las vías del proceso de generación de fibrosis por acción del TGF- β ha demostrado ser un área de oportunidad en la reparación de tejido afectado por fibrosis.⁶²

En la Tabla II, se presenta una actualización de los ensayos clínicos Triage donde son empleados anticuerpos monoclonales como tratamientos anti-TGF- β según la National Clinical Trial (NCT).

Código NCT*	Fase clínica	Enfermedad	Estrategia
01291784	I	Mielofibrosis.	Anticuerpo monoclonal anti TGF-β1 (CAT-192/Metelimumab, Genzyme)
00043706	I/II	Esclerosis sistémica, Escleroderma.	Anticuerpo monoclonal anti TGF-β1 (CAT-192/Metelimumab, Genzyme)
01113801	II	Nefropatía diabética, Glomeruloesclerosis diabética.	Anticuerpo monoclonal anti TGF-β1 (LY238770, Eli Lilly)
00923169	I	Melanoma maligno avanzado.	Anticuerpo monoclonal pan específico anti TGF-β (GC1008, Fresolimumab, Genzyme)
00356460	I	Carcinoma renal, Melanoma.	Anticuerpo monoclonal pan específico anti TGF-β (GC1008, Fresolimumab, Genzyme)
01284322	I	Esclerosis sistémica difusa.	Anticuerpo monoclonal pan específico anti TGF-β (GC1008, Fresolimumab, Genzyme)
00125385	I	Fibrosis pulmonar idiopática.	Anticuerpo monoclonal pan específico anti TGF-β (GC1008, Fresolimumab, Genzyme)
00464321	I	Glomeruloesclerosis focal segmental.	Anticuerpo monoclonal pan específico anti TGF-β (GC1008, Fresolimumab, Genzyme)
01112293	II	Fibrosis cutánea.	Anticuerpo monoclonal pan específico anti TGF-β (GC1008, Fresolimumab, Genzyme)
03470350	I/II	Cáncer metastásico Colon rectal.	Anticuerpo monoclonal anti TGF-β1 (Galunisertib LY2157299)
01291784	I	Mielofibrosis primaria, mielofibrosis, policitemia vera, mielofibrosis post policitemia fase post esencial, Trombocitemia relacionada a mielofibrosis.	Anticuerpo monoclonal anti TGF-β1.

01112293	II	Mesotelioma pleural maligno.	IgG4 kappa anticuerpo monoclonal anti TGF- β .
----------	----	------------------------------	--

*National Clinical Trials⁸⁴

Tabla II.- Evaluaciones de tratamientos anti TGF- β en fase clínica donde son empleados anticuerpos específicos a la citocina como estrategia terapéutica.⁸⁵

2.13.- Nuevas estrategias de detección: vNAR anti-TGF- β

En el ser humano se encuentran bien caracterizadas las estructuras de las inmunoglobulinas o anticuerpos. Las inmunoglobulinas se producen en respuesta ante algún antígeno que haya ingresado al organismo, y están encargadas de cumplir funciones de neutralización o reconocimiento específico, pudiéndose encontrar tanto de manera soluble como unidos en la membrana de los linfocitos B.⁵ En humanos, los anticuerpos están agrupados en 5 tipos (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE). Su estructura convencional consta de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Cada una de estas cadenas tiene una región variable y regiones constantes donde su número depende del tipo de anticuerpo, pero su peso molecular aproximado es de 150 kDa.⁵

Además de la estructura convencional de los anticuerpos tipo IgG, también existen anticuerpos únicos, que carecen de cadena ligera y se denominan IgW presentes en camélidos. En el caso de estas peculiares inmunoglobulinas presentes en camélidos, su dominio de unión al antígeno corresponde al dominio variable pesado y se denominan VHH⁸⁶. Adicionalmente, se han encontrado anticuerpos de solo cadena pesada en elasmobranchios como los tiburones, rayas y quimeras. Estos anticuerpos se denominan IgNAR (inmunoglobulina de nuevo receptor antigénico, por sus siglas en inglés). Las inmunoglobulinas IgNAR están conformadas por una cadena pesada que contiene 6 dominios de inmunoglobulina, de las cuales cinco regiones son constantes y una región es variable.⁸⁷ En tiburones, estos dominios variables que se unen al antígeno se llaman vNAR.⁸⁸ Se han obtenido vNARs de especies como el tiburón marino *Ginglymostoma cirratum*.⁸⁹

El dominio variable pesado tiene función de reconocimiento antigénico; estos dominios se denominan fracción variable del nuevo receptor de antígeno (vNAR, por sus siglas en inglés) y tienen un peso molecular de ~12-15 kDa. Los vNAR son una clase de moléculas capaces de reconocer y unirse eficazmente a su antígeno contra el cual son específicos,⁹⁰ por lo tanto se han considerado como una prometedora herramienta con aplicaciones en el diagnóstico y terapéutica debido a la ventaja de su pequeño tamaño.⁹¹ Específicamente, algunos vNAR previamente identificados y evaluados se han seleccionado y validado su especificidad contra citocinas humanas como TGF- β , TNF- α y VEGF₁₆₅. Estos vNAR provienen del tiburón *Heterodontus francisci*.⁹² En este proyecto de tesis, se utilizó un vNAR aislado de este tiburón que tiene la capacidad de reconocer y neutralizar a la citocina TGF- β .

Estos dominios vNAR se obtienen a través de técnicas de biología molecular y la tecnología del ADN recombinante, donde se emplean células bacterianas o de levadura como sistemas de expresión heteróloga.⁹³ Estos dominios vNAR presentan resistencia a condiciones que habitualmente degradan a la mayoría de las proteínas como la temperatura y osmolaridad elevadas. Con respecto a la temperatura, los vNAR cuentan con termoestabilidad pueden mantenerse a 50 °C hasta por 4 semanas⁹⁴. También tienen la capacidad de replegamiento después de la desnaturalización por temperatura a 95 °C⁹⁵ y resisten una elevada osmolaridad.⁹⁶ Adicionalmente, se ha descrito que los vNAR poseen dos sitios determinantes de complementariedad (CDR1 y CDR3), siendo el CDR3 de mayor longitud (~26 aminoácidos), lo que le confiere una mayor variabilidad y capacidad de reconocimiento antigénico.⁹⁷ También, la longitud del CDR3 le permite acceder a sitios blanco que resultarían inasequibles a las inmunoglobulinas del tipo IgG.⁹³

Asimismo, los vNAR presentan baja inmunogenicidad, por lo tanto, existe la hipótesis de que no requieren una humanización posterior.⁹⁶ En un estudio reciente evaluaron *in vitro* la inmunogenicidad de un vNAR fusionado con diferentes fármacos comerciales, encontrando baja inmunogenicidad al no detectar anticuerpos dirigidos contra los vNAR-fármacos, por lo tanto, no se afectó la eficiencia de los vNAR-fármacos.⁹⁸

En esta línea donde los vNARs son empleados como moléculas quiméricas en 2012, se desarrolló y produjo de forma recombinante un dominio vNAR nombrado T1 (vNART1), del cual se evaluó *in vitro* la capacidad neutralizante contra el TGF- β humano. Los resultados mostraron que el vNART1 tiene reconocimiento de las isoformas 1, 2 y 3 de la citocina TGF- β .⁹⁹ Posteriormente, en 2018 en nuestro equipo de trabajo fue insertada la secuencia del vNART1 en el vector pET32a+, mismo que en su secuencia codifica para la proteína tiorredoxina (Trx), con el objetivo de expresar el vNART1 anti-TGF- β totalmente funcional en el espacio periplásmico en *E. coli*, pero con la proteína Trx como chaperona para incrementar su expresión recombinante. La construcción incluye una etiqueta de histidina que se emplea para la detección y purificación de la proteína quimérica.¹⁰⁰

La existencia de anticuerpos y dominios de anticuerpos que son específicos a la citocina TGF- β tales como los vNAR abre la posibilidad de emplearlos en el diagnóstico, siendo el enfoque principal de este proyecto; a través del diseño y la validación inicial de un inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) que permita realizar la determinación de TGF- β en muestras de pacientes con fibrosis o riesgo de desarrollar ERC.

Grandes avances en la detección y diagnóstico han sido reportados con los anticuerpos convencionales. Sin embargo, también existen limitaciones que se pueden superar por dominios como los dominios vNAR. Estos dominios han demostrado afinidad y especificidad por su antígeno y, que *“debido a su pequeño tamaño, arquitectura simple, alta solubilidad y estabilidad ofrecen mayores ventajas en comparación de los anticuerpos clásicos y otras estructuras similares encontradas en la naturaleza.”*⁹⁶

2.14.- vNARs como moléculas de interés biológico

Los anticuerpos monoclonales han despertado especial interés como moléculas biológicas para fines de tratamiento y diagnóstico, estos han tenido un enorme auge comercial y está previsto que su mercado continúe creciendo.⁹⁶ En 2013, el mercado de productos de interés biológico estaba estimado en 200.6 billones de dólares y se

esperaba un crecimiento anual de 10.6% y un crecimiento de 386.7 billones de dólares para finales de 2019.¹⁰¹

Recientemente se han estado implementando mejoras en los productos donde los anticuerpos monoclonales están presentes, se ha orientado la búsqueda e implementación de estrategias que ofrezcan ventajas en cuanto a tamaño o estabilidad.⁹⁶

Los vNARs son una estrategia prometedora ya que ofrecen múltiples ventajas que cumplen con las características en las que ahora son de un interés creciente en el mercado⁹⁶ Una de las principales ventajas que evidencia la utilización de biológicos recombinantes de interés farmacéutico como los vNAR (15 kDa), es que en comparación con los anticuerpos monoclonales (150 kDa) los costos de manufactura se ven reducidos considerablemente, algunos autores mencionan: “Para la obtención de anticuerpos monoclonales se requiere de infraestructura que ofrezca las condiciones adecuadas para llevar a cabo las practicas adecuadas para su obtención, sistemas eucariontes optimizados y sumado al tamaño relativamente grande de un anticuerpo monoclonal representa una desventaja en comparación de estructuras análogas obtenidas de manera recombinante, además de que la accesibilidad de dichos componentes representan limitantes debido a su tamaño ya que solamente se alcanzarían antígenos de superficie causado la pobre penetración en los tejidos”.⁹⁶

2.15.- Estado actual de los vNAR potenciales aplicaciones y usos

En 2020, un artículo de revisión recopiló el estado de los usos y potenciales aplicaciones a las cuales están dirigidos los vNAR. En el documento se resaltó el gran potencial terapéutico de estos dominios como candidatos de tratamientos o diagnóstico de enfermedades humanas.¹⁰² (Tabla III)

Nombre del vNAR	Antígeno	Especie de procedencia	Aplicación	Estatus	Inventor
14I-1, 14I1-M15	AMA1	<i>O. maculatus</i>	Malaria	Uso potencial	CSIRO Health Sciences and

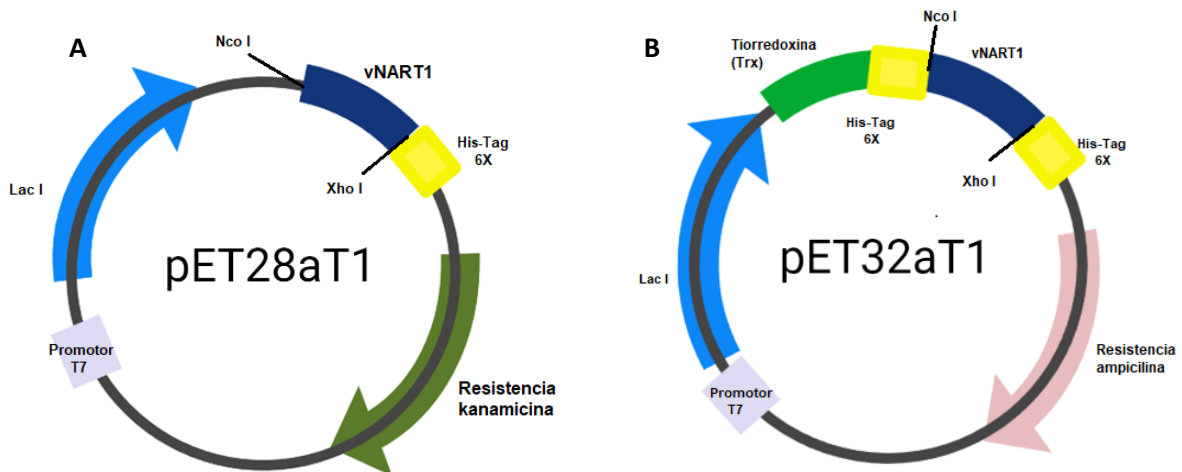
					<i>Nutrition (Australia)</i>
<i>Anti-TNF vNAR</i>	<i>TNF</i>	<i>H. francisci</i>	<i>Choque endotóxico</i>	<i>Fase preclínica</i>	<i>Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chavez (Mexico)</i>
<i>BFF1</i>	<i>BAFF</i>	<i>G. cirratum</i>	<i>Esclerosis múltiple</i>	<i>Uso potencial</i>	<i>Ossianix (UK)</i>
<i>vNAR-D01</i>	<i>Aurora-A cinasa</i>	<i>O. maculatus</i>	<i>Tumores sólidos</i>	<i>Uso potencial</i>	<i>University of Leeds (UK)</i>
<i>ELN/21, ELN/22</i>	<i>ICOSL</i>	<i>G. cirratum</i>	<i>Uveítis autoinmune</i>	<i>Validación in vivo</i>	<i>Elasmogen (UK)</i>
<i>D1-BA11-C4, D1-Fc-C4</i>	<i>TNF-α</i>	<i>G. cirratum</i>	<i>Poliartritis</i>	<i>Fase preclínica</i>	<i>Elasmogen (UK)</i>
<i>V13</i>	<i>VEGF</i>	<i>H. francisci</i>	<i>Enfermedad vascular ocular</i>	<i>Uso potencial.</i>	<i>CONACYT (México)</i>
<i>F1</i>	<i>GPC3</i>	<i>G. cirratum</i>	<i>Cáncer de hígado</i>	<i>Uso potencial.</i>	<i>NCI (US)</i>
<i>Her2A6</i>	<i>Her2</i>	<i>G. cirratum</i>	<i>Tumores sólidos Her2 positivos.</i>	<i>Uso potencial.</i>	<i>NCI (US)</i>
<i>PD1A1</i>	<i>PD1</i>	<i>G. cirratum</i>	<i>Tumores sólidos</i>	<i>Uso potencial.</i>	<i>NCI (US)</i>
<i>MERS A3, A7, A8, B4, B5</i>	<i>Proteína de espiga del MERS</i>	<i>G. cirratum</i>	<i>Virus MERS</i>	<i>Uso potencial.</i>	<i>NCI (US)</i>
<i>SARS binder</i>	<i>Proteína de espiga del SARS</i>	<i>G. cirratum</i>	<i>Virus SARS</i>	<i>Uso potencial.</i>	<i>NCI (US)</i>
<i>PE38 B6</i>	<i>P. exotoxina</i>	<i>G. cirratum</i>	<i>Infección por Pseudomonas</i>	<i>Uso potencial</i>	<i>NCI (US)</i>

Tabla III.- Recopilación de los dominios vNAR que se encuentran en etapas de desarrollo con potenciales aplicaciones clínicas. (Tomado de English H, et al., 2020)

2.16.- Ventajas de vNAR recombinantes (rvNAR)

Los dominios vNAR pueden obtenerse de forma recombinante a través de la inserción en un vector o plásmido de la secuencia específica que codifica para el vNAR de interés. Un plásmido consiste en una secuencia circular de ADN de doble cadena que es independiente del ADN cromosomal,¹⁰³ que se mantiene en un número adecuado de copias considerando las capacidades metabólicas del sistema de expresión heteróloga seleccionado¹⁰⁴ y puede variar entre una copia única hasta unos cientos de copias por célula.^{105,106}

En este proyecto se emplearán dos construcciones para la expresión recombinante del dominio vNART1. En la Figura 7 se muestran las características generales de los plásmidos.



Created in BioRender.com bio

Figura 7.- Representación de las construcciones de vector + inserto. La construcción A corresponde al plásmido pET28a+, al plásmido conteniendo el inserto vNART1 se le denominó pET28a+T1. La construcción B corresponde al plásmido pET32a+, al plásmido conteniendo el inserto vNART1 se le denominó pET32aT1. Estas construcciones cuentan con 1) Secuencia de inicio que da lugar al inicio la replicación por parte de la maquinaria celular del sistema de expresión. 2) Un Promotor T7 el cual tiene

la función dar lugar al inicio de la transcripción. 3) Un marcador de selección de resistencia a antibióticos (Kanamicina en pET28+ y Ampicilina en pET32a+). 4) Etiquetas o "tags", que facilitan identificar la proteína recombinante expresada. Nótese la presencia de una doble etiqueta de histidina en la construcción pET32aT1 debido a la presencia del gen que codifica para la proteína chaperona tioredoxina (Trx). 5) Inserto del gen de interés a expresar, para ambas construcciones el inserto se llama vNART1 y se encuentra anclado en los sitios específicos XhoI y NcoI.

El plásmido puede ingresarse en un sistema bacteriano, de levadura, en células de insecto o en células animales, por ejemplo, las células CHO (células de ovario de hámster chino) y las células HEK-293 (Células embrionarias renales).^{104,111} Entre las ventajas de los sistemas de expresión heteróloga, se encuentra una mayor reproducibilidad y consistencia entre lotes de producción posterior a la identificación y ajuste de las variables para la expresión de la proteína recombinante en el sistema de expresión seleccionado.^{105,107}

En cambio, la secuencia de ADN que codifica para el vNAR de interés puede obtenerse de bibliotecas génicas ya sean inmunes o no inmunes¹⁰⁸ y seleccionarse a través de la técnica de despliegue en fagos.¹⁰⁹ Los dominios vNAR pueden modificarse con herramientas bioinformáticas permitiendo mejorar su sensibilidad, afinidad o especificidad.

En este proyecto se empleará *E. coli*, como el sistema de expresión heterólogo siendo el más empleado en la biotecnología¹¹⁰ debido a sus múltiples ventajas entre ellas: 1) su fácil manejo, 2) costos de mantenimiento relativamente inferiores en comparación con sistemas de expresión eucariontes, 3) además es aceptado por entidades regulatorias a nivel internacional para la obtención de biofármacos,¹⁰⁶ 4) existe gran variedad de modificaciones a nivel genético que han dado origen a distintas cepas comerciales que favorecen la expresión de proteínas en condiciones ideales de estructura terciaria,¹¹¹ eficiencia traduccional o transcripcional, estabilidad del material genético (plásmidos o ARN) o inclusive la presencia de promotores que eficiente la obtención de proteínas recombinantes.¹¹² Adicionalmente, *E. coli* crece rápidamente en medios de cultivo sin incrementar los costos haciendo factible la escalabilidad a nivel industrial del bioproceso.¹¹²

Los dominios vNAR pueden obtenerse de manera soluble o insoluble en cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión corresponden a agregados de proteínas que se acumulan en el citosol y que pueden encontrarse no plegadas o parcialmente plegadas, careciendo de actividad biológica¹¹³ Por lo general, se busca obtener las proteínas recombinantes de manera soluble ya que se encuentran en su forma nativa y con actividad biológica característica. Sin embargo, la obtención de proteína proveniente de cuerpos de inclusión se ha considerado como una estrategia rentable aunado a la alta tasa de expresión¹¹⁴ y que puede ser modificada de tal modo que eficiente los tiempos de obtención, nivel de pureza y costos para fines de investigación e industriales,¹¹⁵ obteniéndose resultados prometedores en cuanto a la eficiencia de la obtención de proteína funcional tanto para los vNAR¹¹⁶ y VHH.¹¹⁷

2.17.- Validación de pruebas de diagnóstico basadas en anticuerpos

La validación es un concepto que se aplica a los inmunoensayos, que se emplean específicamente en el campo de los ensayos analíticos o de diagnóstico. *Weller G.* 2018 define el término validación en el contexto de los inmunoensayos de la siguiente manera: “la validación es la prueba experimental y documental de que un anticuerpo específico es adecuado para ser utilizado para una aplicación o propósito”¹¹⁸. Es decir, la validación nos permite corroborar que se cumplen los lineamientos establecidos de un método o técnica a través de evaluaciones que proporcionan datos certeros.¹¹⁹

Otros autores mencionan que para realizar la validación de un anticuerpo es necesario demostrar 1) su especificidad (capacidad de reconocer a su antígeno para el cual fue diseñado este anticuerpo), 2) selectividad (capacidad de discriminar entre el antígeno y estructuras similares al antígeno al que es específico el anticuerpo) y 3) reproducibilidad (que el anticuerpo empleado pueda permitir obtener los mismos resultados independiente mente del lote, día de análisis, analista, etc.). Estos son los lineamientos generales acerca del proceso de la validación de anticuerpos con fines analíticos, en la sección de metodología se describen los parámetros a considerar en este trabajo experimental.¹¹⁸

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, la ERC es considerada una enfermedad olvidada y principalmente en el estado de Jalisco, la ERC la prevalencia es considerablemente elevada y está directamente relacionada con afecciones crónico-degenerativas como la diabetes e hipertensión arterial. En el campo de las nefropatías se ha visto que desde el siglo pasado la ERC es causada por diferentes patologías que tienen un signo en común: la fibrosis. Se sabe que la fibrosis está directamente relacionada con el daño al órgano y con la función que éste desempeña, y que en muchas ocasiones cuando se llega a un daño irreversible desemboca en enfermedad renal terminal. Los biomarcadores renales que actualmente se emplean para el diagnóstico por ejemplo la proteína KIM-1, han demostrado buena capacidad de correlación clínica, pero solamente son de utilidad cuando existe lesión en etapa aguda y por lo tanto, no aporta información acerca del daño fibrótico que se lleva a cabo.⁶ La detección de fibrosis no es un procedimiento de rutina ya que requiere de técnicas invasivas como la biopsia renal, y en muchas ocasiones los datos que aporta no son homogéneos. Por lo tanto, se han evaluado biomarcadores en fases donde el daño fibrótico ha sido alcanzado, específicamente el TGF- β tiene una correlación positiva¹²⁰ por lo tanto es considerado el analito a detectar en este proyecto. Ante este escenario, es preciso determinar las concentraciones de biomarcadores que cuenten con correlación positiva en pacientes diagnosticados con ERC. La relevancia de detectar fibrosis en estos pacientes es que debido a que mas del 90% de las personas con ERC por enfermedades crónico-degenerativas se halla en etapas tempranas de daño y poder relacionar dichos niveles con el grado de avance que la fibrosis ha tenido. ¹²¹

4.- JUSTIFICACION

La ERC es un problema de salud con incidencia importante en México, debido a la alta prevalencia de enfermedades crónico-degenerativa y en la gran mayoría de los casos las etapas de daño al órgano no son detectadas en etapas tempranas.

Según datos del gobierno de México la prevalencia es de 12.2% , lo que corresponde a 51.4 muertes por cada 160,000 habitantes.¹²¹ En la actualidad, las pruebas o métodos que ayudan en el diagnóstico certero de ERC y presencia de fibrosis no resultan ser empleadas en la rutina y para su implementación e interpretación es necesario personal capacitado.²⁵

Existen moléculas como el TGF- β que participan directamente en procesos de fibrosis. En el caso del riñón, la presencia de TGF- β se relaciona con el deterioro del órgano, incrementándose en los pacientes según el grado de daño y severidad, por lo tanto, se considera al TGF- β como un potencial biomarcador de ERC, con posible aplicación en la detección temprana de fibrosis en etapas no avanzadas, especialmente en pacientes que se encuentran en grupos de riesgo para presentar ERC. ¹²²

En nuestro equipo de trabajo, previamente se logró obtención de un dominio vNAR aislado del tiburón *Heterodontus francisci* (vNAR) e identificar su secuencia.¹²¹ Los vNAr en comparativa con los anticuerpos IgG tienen un tamaño mas pequeño lo cual ofrece múltiples ventajas tales como ser producidos como proteínas recombinantes, así como la capacidad de penetrar tejido. Este dominio vNAR fue nombrado T1 (vNART1) ha demostrado ser capaz de reconocer al TGF- β humano en sus tres isoformas (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3), debido a que esta citocina se encuentra catalogada como agente clave en el progreso de daño asociado a fibrosis. La propuesta en este trabajo es diseñar y evaluar una metodología fundamentada en un inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) que permita detectar la presencia de esta citocina en suero de pacientes con ERC.

5.- HIPÓTESIS

La prueba ELISA basada en el vNART1 permitirá determinar la presencia de TGF- β en muestras de suero de pacientes con ERC.

5.1.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es posible detectar a la citocina TGF- β en muestras de suero de pacientes con ERC a través de una prueba de ELISA basada en un dominio vNART1?

6.- OBJETIVO GENERAL

Diseñar y desarrollar una prueba ELISA usando el dominio vNART1 y la proteína Trx-vNART1 anti-TGF- β para la detección potencial de ERC en muestras de suero.

6.1.- Objetivos específicos

- Estandarizar las condiciones óptimas para la obtención recombinante del vNART1 y de la proteína Trx-vNART1 ambas con reconocimiento a la citocina humana TGF- β .
- Diseñar una prueba ELISA basada en el dominio vNART1 y la proteína Trx-vNART1 anti-TGF- β .
- Evaluar la capacidad de reconocimiento del dominio vNART1 y la proteína Trx-vNART1 con *rh*TGF- β y con suero de pacientes con ERC.
- Evaluar el diseño del inmunoensayo tipo ELISA sándwich para la detección de TGF- β recombinante, mediante la determinación de la linealidad.

7.- METODOLOGÍA

7.1.- Clonación del fragmento vNART1 en el vector de pET28a+

La clonación del fragmento vNART1 parte de una construcción realizada con anterioridad. En el equipo de trabajo, se había caracterizado el vNART1 anti-TGF- β contenido en el plásmido pCOMb3x.¹²¹ Este trabajo se basó en la caracterización de la expresión del vNART1 con potencial uso terapéutico. Sin embargo, los resultados de rendimiento no fueron idóneos, por lo tanto, un objetivo particular de esta tesis incluye dos estrategias de clonación en los vectores pET28a+ y pET32a+; que producen el vNART1 como proteína recombinante sin y con proteína chaperona Trx, respectivamente, para obtener un rendimiento de proteína purificada mayor al previamente reportado.

Para realizar la clonación del vNART1 en el vector pET28a+ se siguieron los métodos descritos a continuación. Fueron amplificados fragmentos vNART1 de interés empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando oligonucleótidos específicos que contienen los sitios de restricción para las enzimas NcoI y XhoI. El primer FORWARD TGF-L-TNF-NcoI 5' TTTTCCATGGCATCCTTGGACCAGACC 3' y el primer reverso T1 R-XhoI 5' TTT TCT CGA GGT TGA CAG TAA GGA CGG TT 3'. El volumen de reacción de PCR fue de 25 μ L, conteniendo amortiguador de PCR 1X, 5 mM MgCl₂, 0.8 mM dNTP's, 0.2 U polimerasa GoTaq Flexi, 0.4 μ M oligonucleótidos y 50 ng del plásmido T1-pCOMb3X, mismo que contiene en su secuencia al vNART1. La reacción se realizó en las siguientes condiciones: 95 °C por 1 min, 30 ciclos de 95 °C de desnaturalización, seguido de 45 s de polimerización 53 °C por 45 s de hibridación, 72 °C 45 s, y un ciclo de extensión de 72 °C por 10 min. Los productos de reacción fueron cargados en un gel de agarosa al 1.0% y fue corrido a 80 V durante 90 min. Fue identificado un amplicón entre 300 y 400 pb, fue cortado y purificado usando el kit DNA Gel Extraction Kit de Zymo Research, según las especificaciones del fabricante. Posteriormente, los fragmentos se cuantificaron por espectrofotómetro Nanodrop 2000 y se resguardaron -20 °C.

En el siguiente paso se emplearon 500 ng del plásmido pET-28a+ (Novagen), donado por el Dr. Abel Gutiérrez Ortega (CIATEJ-BMF). El plásmido fue digerido empleando 20 U de las enzimas NcoI-HF y XhoI (NEB). El volumen de reacción fue de 20 µL y contenía amortiguador Cutsmart 1X; se incubó a 37 °C durante 1 h, se cargó en un gel de agarosa al 1 % y se corrió a 80 V durante 90 min.

Se identificó una banda correspondiente al vector digerido en ambos sitios y fue cortada la banda correspondiente a 5,200 pb. Se purificó con el kit DNA Gel Extraction de Zymo Research y se cuantificó mediante el espectrofotómetro Nanodrop 2000. La muestra se resguardó a -20°C hasta su uso posterior.

El fragmento de ADN correspondiente al vNART1 amplificado previamente por PCR de aproximadamente 350 pb también fue digerido con las enzimas NcoI-HF y XhoI (NEB) en las mismas condiciones antes mencionadas. Se purificó con el kit DNA Gel Extraction de Zymo research según las especificaciones del proveedor. Los fragmentos vNART1 fueron cuantificados con el Nanodrop 2000. Una vez digeridos, purificados y cuantificados tanto los fragmentos vNART1 (inserto) y el vector pET28a+ (vector), se procedió a su ligación con la T4 ligasa (NEB M0202S). El volumen de reacción de ligación fue de 20 µL conteniendo 400 U de T4 ligasa, 1X de amortiguador de ligación, 100 ng de vector en una proporción 3:1 (inserto:vector). La reacción se desarrolló durante 16 h a 25°C y después se inactivó la enzima a 65 °C durante 10 min. Los productos de la ligación se emplearon para transformar células electrocompetentes de *E. coli* cepa BL21.

Para verificar que el vector pET28a+ fue ligado exitosamente y contenía el fragmento génico que codifica para el vNART1, se aislaron colonias transformadas crecidas en placas de LB agar con kanamicina 50 µg/mL, y a partir de estas se realizó una PCR de colonia, siguiendo las mismas condiciones de reacción previamente mencionadas y con oligonucleótidos específicos para la secuencia del promotor T7 del plásmido. Las colonias que amplificaron el tamaño esperado del vNAR (~500 pb) se aislaron y se crecieron en medio líquido 2XYT con 50 µg/µL kanamicina a 30 °C y 250 rpm durante toda la noche. Se extrajo plásmido con el kit comercial DNA Plasmid Miniprep Kit de Zymo Research según las especificaciones del proveedor. Los plásmidos fueron cuantificados y resguardados a -20 °C

Una vez realizada la clonación de la construcción pET28a+T1 que permite la clonación de fragmento de interés empleando las enzimas de restricción NcoI-HF (NEB R3193S) y XhoI (NEB R0146S). Esta construcción de vNAR en el plásmido pET28a+ se denominó vNART1 y tiene la capacidad de reconocer TGF- β humano y adicionalmente, puede ser empleado para el reconocimiento en muestras obtenidas de orina o lágrimas humanas, demostrando que puede reconocer a la citocina en diversas matrices biológicas.

7.2.- Clonación del fragmento Trx-vNART1 en el vector pET32a+

La construcción del Trx-vNART1 fue llevada a cabo previamente en nuestro equipo de trabajo¹²³, donde partiendo de la construcción pCOMb3x-T1 se obtuvo el inserto vNART1 mediante la digestión y ligación del fragmento en el vector pET32a+ empleando las enzimas de restricción NcoI-HF (NEB R3193S) y XhoI (NEB R0146S). Esta construcción de Tiorredoxina(Trx)+vNART1 en el plásmido pET32a+ fue nombrada Trx-vNART1 (Figura 7). La proteína recombinante obtenida de esta construcción en el plásmido pET32a+ tiene la capacidad de reconocer TGF- β . Adicionalmente, puede ser empleada para el reconocimiento en muestras obtenidas de orina o lágrimas humanas, demostrando que puede reconocer a la citocina en diversas matrices biológicas.

7.3.- Transformación de *E. coli* para producir vNAR-T1 y Trx-vNART1

Se emplearon 3 mL de medio SOC (medio SOB, glucosa 1M, MgCl₂ 1M, MgSO₄ 1M) mantenidos en un tubo de 50 mL en hielo, una alícuota de células electrocompetentes *E. coli* BL21 a las cuales les fue agregado 1 μ L del vector pET28a+T1 (para producir vNART1) y pET32aT1 (para producir Trx-vNART1). La mezcla fue homogenizada perfectamente y transferida a una celda de electroporación, incubada en hielo durante 3 min. Después, se electroporó a 2.5 kV, 200 Ω y 23 μ F durante 2.5 ms, se agregó 1

mL del medio SOC y se homogenizó el contenido de la celda que fue recogido y dispuesto en el tubo que contenía los 3 mL de medio SOC. El medio con células inoculadas fue llevado a agitación de 250 rpm, 37 °C durante una hora.

7.4.- Preparación del preinóculo e inóculo de *E. coli* para producir vNART1 y Trx-vNART1

A los cultivos obtenidos en el paso anterior, es decir, *E. coli* BL21(DE3) transformada de forma independiente con los plásmidos pET28a+ ó pET32a+, se les agregaron 3 mL de medio LB suplementado con kanamicina a una concentración de 50 µg/mL y ampicilina a una concentración de 100 µg/mL, respectivamente. Se incubaron con agitación constante a 250 rpm y 37 °C durante 12-16 h. Fue determinada la densidad óptica de los cultivos obtenidos al cabo de las 12-16 h de incubación. Se tomó la cantidad necesaria del preinóculo para una solución 1/100 en medio LB (IBI Scientific IB49020), TB (Fluka T09181-1KG) y 2XYT (Sigma Y2377-250G) adicionados con kanamicina 50 µg/mL ó ampicilina a 100 µg/mL, respectivamente. Se incubó a 30 °C y 250 rpm. Se monitoreó la densidad óptica DO_{600nm} hasta que se alcanzó una lectura de 0.6. Inmediatamente, se adicionó el inductor isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Mid Sci 367-93-1) a una concentración final de 1mM. Los cultivos se mantuvieron en crecimiento durante 5 h en agitación constante y fue tomada la lectura de la densidad óptica cada hora. En paralelo fue llevado a cabo un cultivo siguiendo las mismas condiciones con *E. coli* BL21(DE3) sin transformar que fue empleado como control negativo de producción.

Una vez finalizada la inducción fue obtenido el paquete bacteriano de células BL21(DE3) para ello fue colocado el volumen total del cultivo en tubos de 50 mL y centrifugado a 8000 rpm a 4 °C. El paquete bacteriano se resguardó a -20 °C hasta su posterior uso.

7.5.- SDS-PAGE de las proteínas vNART1 y Trx-vNART1

Para realizar el análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE de las proteínas vNART1 y Trx-vNART1 fueron preparados geles al 12% de poliacrilamida:bisacrilamida con grosor de 1 mm. Se emplearon 2.1 mL de agua destilada, 1.5 mL de Tris-SDS pH 8.8, 2.4 mL de acrilamida bis-acrilamida al 30%, 18 μ L de PSA al 10% y 3.75 μ L de TEMED. La mezcla fue homogenizada y vertida en el molde de vidrio y agregada una fina capa de etanol al 96%. Una vez polimerizado el gel separador, se preparó el gel concentrador al 4% de poliacrilamida:bisacrilamida, empleándose por cada gel 1.2 mL de agua destilada, 500 μ L de Tris-SDS pH 6.8, 250 μ L de solución de acrilamida bis-acrilamida al 30%, 10 μ L de PSA al 10% y 2 μ L de TEMED. La mezcla fue homogenizada y se colocó el peine para la formación de los pocillos. Una vez polimerizado el gel fue colocado en la cámara de electroforesis vertical. La cámara fue cargada con buffer de corrida (Tris base 20 mM, glicina 190 mM, SDS 3.5 mM). Las muestras fueron desnaturalizadas en buffer de corrida durante 10 min a 95 °C, enfriadas a 4 °C y posteriormente cargadas en el gel. Fue empleado el marcador de peso molecular (Precision plus protein standards Dual color BioRad, 161-0394). Las muestras fueron concentradas sometiénolas a un voltaje de 180 V durante 10 min con amperaje constante, seguido de un periodo de corrida de 45 min a 120 V con amperaje constante.

Una vez terminado el proceso de separación de las proteínas, fue removido el gel y teñido con una solución de azul brillante concentrado (Sigma B8647-1EA). Para desteñir la muestra fue empleado buffer de metanol (Meyer, 67-56-1), ácido acético (Sigma-Aldrich, 655092), y agua destilada en relación 4:1:5. El gel se dejó en agitación a 80 rpm a temperatura ambiente hasta la completa eliminación del exceso de colorante. Posteriormente, se tomó registro de la imagen empleado el fotodocumentador Gel Doc EZ Imager BioRad.

7.6.- Western blot para identificación de etiqueta de histidina del vNART1 y la proteína Trx-vNART1

A través de la técnica de Western blot, se evaluó la obtención del vNART1 y de la proteína Trx-vNART1, después de la inducción del sistema de expresión heteróloga en diferentes medios de cultivo y diferentes condiciones de temperatura de inducción. Primero, se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% siguiendo el protocolo descrito, con las condiciones de corrida de 180 V durante 10 min, seguido de 40 min a 120 V con un amperaje constante.

Una vez terminada la electroforesis se procedió a realizar la electrotransferencia semiseca a 200 Amp por 75 min con voltaje constante. Previamente, los papeles filtro, la membrana de nitrocelulosa y el gel fueron sumergidos en 1X de buffer de tris-glicina (10x Tris/Glicina) con metanol al 10%. Una vez finalizada la transferencia se llevó a cabo el bloqueo de la membrana empleando una solución de 3% BSA (Gibco, 9048-46-8) en PBS 1X durante 12-16 h a 4°C. Una vez terminado el bloqueo fueron realizados 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0.05% (Sigma, P9416). La solución de lavado fue desechada e inmediatamente se agregó el anticuerpo anti-His-HRP (MA1-21315-HRP) en dilución 1:5,000 en BSA al 1% en PBS 1X. El anticuerpo anti-His-HRP es específico para la etiqueta de hemaglutinina contenida en el vNART1. La membrana fue incubada con el anticuerpo por 12 h a 4 °C. Después, se realizaron tres lavados con PBS-Tween 0.05%. Se descartó el anticuerpo y se agregó el sustrato para peroxidasa, preparando la solución A: 1.5 mL de metanol, 5 mg de HRP color development reagent 4CN (Biorad, 170-6534) y la solución B: 8.5 mL de PBS 1X, 10 µL de peróxido de hidrógeno al 30%. Ambas soluciones se prepararon por separado. Se agregó la solución B en la solución A. La mezcla anterior se vertió sobre la membrana, se tomó el registro en fotodocumentador a los 10 min de haber iniciado la reacción.

7.7.- Protocolo de replegamiento y purificación del vNART1 y de la proteína Trx-vNART1 basado en glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG)

Una vez determinado que en ambos plásmidos empleados en este proyecto el vNART1 contenía la etiqueta de polihistidina (6x His) detectada en el Western blot, se procedió a realizar la purificación del dominio vNART1 y de la proteína Trx-vNART1. El paquete bacteriano obtenido del cultivo de 100 mL en medio 2XYT se resuspendió en 5 mL de buffer de sonicado (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris base pH 8) y las células fueron lisadas por ultrasonido a 500-600 W durante 10 s un total de 6 veces, con un periodo de enfriamiento de 40 s entre cada ciclo de lisis. Una vez finalizada la sonicación, el paquete celular lisado fue centrifugado a 12,000 rpm durante 20 min a 4 °C. El procedimiento descrito fue repetido en dos ocasiones adicionales. El sobrenadante se conservó aparte para análisis SDS-PAGE posterior. El paquete lisado y centrifugado se resuspendió en 5 mL de buffer desnaturalizante B (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris base, 8 M urea pH 8). Esta mezcla se colocó en agitación a 300 rpm a 30 °C en un agitador orbital durante 90 min, posteriormente fue centrifugada a 12,000 rpm por 30 min a 20 °C. Se rescató el sobrenadante y se incubó en agitación a 120 rpm por 90 min con glutatión reducido (GSH) a una concentración final de 60 mM. El sobrenadante se añadió y aforó a un volumen final de 500 mL de buffer renaturalizante (50 mM Tris base, 5 % v/v de glicerol, 0.5 mM glutatión oxidado (GSSG) pH 8) y se incubó en agitación magnética durante 16 h a 4-6 °C. Después, se agregó un volumen resina His Pur Ni-NTA (Thermo Scientific) y se incubó en estas mismas condiciones para posteriormente continuar con la purificación.

La mezcla anterior que contiene la resina, el buffer re-naturalizante y las proteínas extraídas fue cargada en una columna de plástico para mantener la resina y eluir por gravedad los buffers y las proteínas contaminantes. Esta fracción se denominó *fracción no retenida (FNR)*. La resina se lavó con 10 volúmenes de columna (VC) con buffer de lavado 1 (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM pH 8), seguido de un segundo lavado con 10 VC de buffer de lavado 2 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 50 mM de imidazol pH 8). Las fracciones correspondieron a un volumen de 10 mL. La elución del vNART1 se realizó con 12 mL de buffer de elución (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl

300 mM, imidazol 100 mM pH 8). Seguido de 20 mL de buffer de elución (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM pH 8). Cada fracción fue analizada por SDS-PAGE.

7.8.- Concentración de las proteínas vNART1 y Trx-vNART1

Una vez replegado el vNART1 y el Trx-vNART1 fueron colectadas las fracciones donde se eluyeron las proteínas replegadas. Estas eluciones de las proteínas fueron concentradas empleando tubos concentradores (Amicon Ultra 15 Centrifugal Filters Ultracel) de poro de 3 kDa (Sigma, Z740200-24EA). Al mismo tiempo de ser concentrado el vNART1 y la proteína Trx-vNART1, se realizó un gradiente descendente de imidazol, para ello fue preparada una solución de 50 mM de NaH_2PO_4 , 300 mM de NaCl e imidazol en concentraciones que decrecientes desde 250 mM hasta 10 mM de imidazol. Las eluciones fueron concentradas en tubos concentradores, según las condiciones descritas por el fabricante y evaluadas en una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% siguiendo las condiciones anteriormente descritas en el apartado 7.5). Las muestras fueron cuantificadas por la técnica de micro BCA (Biovision, K813-2500) siguiendo las instrucciones del fabricante y se resguardó a -20°C hasta su uso posterior.

7.9.- Protocolo de purificación y replegamiento en columna para la proteína Trx-vNART1 por gradiente de urea.

Se empleó un protocolo alternativo al de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) para la extracción y replegamiento de la proteína Trx-vNART1 con la finalidad de mejorar los rendimientos de proteína obtenida, debido a que los resultados prometedores obtenidos con el protocolo de GSH y GSSG.

Para la extracción de la proteína Trx-vNART1, por cada gramo de peso húmedo del paquete bacteriano centrifugado se agregaron 10 mL de buffer de lisis (50mM NaCl y Tris-Cl 50mM, pH 7.5) enriquecido con inhibidor de proteasas 1X (SIGMAFAST/Protease inhibitor Cocktail Tablets EDTA Free, S8830-2TAB).

Posteriormente el paquete bacteriano fue sometido a un proceso de lisis por sonicación empleando el equipo Misonix ultrasonic liquid processors L200 series, con un esquema de 14 ciclos en frío de 10 s cada uno en nivel 7, seguido de 40 s de reposo y enfriamiento, manteniendo un baño de hielo durante todo el proceso. Una vez finalizados los ciclos de sonicación, se procedió a separar las fracciones obtenidas, centrifugando el paquete bacteriano lisado a 10000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se obtuvo la fase soluble que corresponde a la proteína Trx-vNART1 extraída por buffer de lisis y el paquete bacteriano lisado que contiene proteína Trx-vNART1 contenida dentro de cuerpos de inclusión. Ambas fracciones fueron evaluadas a través de SDS PAGE.

Para la extracción en condiciones desnaturalizantes, el paquete bacteriano lisado que fue obtenido del paso anterior fue resuspendido en una solución de NaH₂PO₄ 100 mM, Tris-Cl 10 mM, Urea 8M pH 8, a razón de 5 mL por cada gramo de peso húmedo. Se mantuvo en agitación durante 15-60 min a 250 rpm a temperatura ambiente, evitando la formación de burbujas. Inmediatamente fue centrifugada la solución obtenida a 10000 rpm durante 25 min a temperatura ambiente (25 °C). Fue recuperado el sobrenadante, y tomada una alícuota para evaluarse por SDS-PAGE (*esta muestra se denominó "fracción antes de pasar"[AP] en referencia a que es muestra sin pasar por el proceso de purificación*).

Este protocolo se empleó para la purificación y replegamiento en columna de la proteína Trx-vNART1 y se basa en un gradiente de urea. Se empleó 1 mL de resina His-Pur Ni-NTA (Thermo scientific, 88222) en un soporte de columna de purificación; se prestó atención especial en homogenizar perfectamente la resina antes de depositarla en el interior de la columna. Una vez depositada la resina en el soporte, se esperó a que sedimentara y se adicionaron 5 mL (VC, 1 mL) con el buffer con 100 mM NaH₂PO₄, 8M de urea pH 8, 10 mM de Tris-Cl por 5 VC.

Una vez acondicionada la columna, el lisado celular fue eluído en dos ocasiones. Se colectó y se tomó una alícuota para evaluar en SDS-PAGE la cual fue denominada "*Fracción no retenida*" (NR). Se realizaron dos lavados con 4 mL con buffer de lavado (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris-Cl 10 mM, urea 8M, pH 6.3). Se recogieron las fracciones

para evaluarse en SDS-PAGE. Estas fracciones se nombraron "*Fracción de lavado L1 y L2*", respectivamente.

Las eluciones de la proteína se realizaron realizando 4 fracciones de 500 μ L de buffer de elución D (NaH_2PO_4 100 mM, Tris-Cl 10 mM, urea 8M, pH 5.9). Se tomó una alícuota para analizar por SDS-PAGE (estas fracciones se nombraron: "D1", "D2", "D3", "D4"). La segunda fase de elución de la proteína se realizó realizando 4 fracciones de 500 μ L de buffer E (NaH_2PO_4 100 mM, Tris-Cl 10 mM, urea 8M, pH 4.5). Se colectaron todas las fracciones y se tomó una alícuota para analizar por SDS-PAGE (estas muestras se denominaron: "E1", "E2", "E3", "E4")

Se continuó con una elución final de 3 mL de buffer de E (NaH_2PO_4 100 mM, Tris-Cl 10 mM, urea 8M, pH 4.5). Se colectó la fracción y se tomó una alícuota para evaluar por SDS-PAGE (esta muestra se nombró como "*Fracción E final*"). Después, se realizó una elución de 5 mL con agua destilada, fue tomada una alícuota para evaluarse por SDS-PAGE ("*Fracción H₂O final*").

Para el replegamiento en columna, se realizó un gradiente descendente de urea (buffer de NaH_2PO_4 100 mM, Tris-Cl 10 mM, urea 8M a pH 8). Fue preparado buffer conteniendo 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris Cl con urea a diferentes concentraciones (7 M, 6M, 5M, 4M, 3M, 2M, 1M, 0.5 M, 0M). Al mismo tiempo fue agregado buffer de replegado (20 mM Tris base, 500 mM de NaCl, 20 mM de Imidazol, 1mM β -2-mercaptoetanol) con los siguientes volúmenes: 0.125, 0.250, 0.500, 0.750, 1, 1.250, 1.50, 1.750 y 2 mL.

La columna fue equilibrada con buffer B (solución 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris Base y urea 8M, pH 8.0). Se ajustó el pH a 8.0 de la muestra a replegar y se tomó una alícuota para analizar por SDS PAGE (esta muestra se nombró "AP"). La muestra fue pasada en tres ocasiones por la columna para favorecer su replegamiento.

Después de pasar la muestra por la columna en tres ocasiones se agregó el primer buffer de elución conteniendo 7 M de urea, siguiendo con las eluciones con los buffers que contienen las concentraciones decrecientes de urea, hasta llegar a cero. En cada punto fue tomada una alícuota para análisis por SDS PAGE. Una vez finalizado el

gradiente descendente de urea, por cada mL de columna empleada se realizó un lavado con 10 mL de solución 50 mM NaH₂ PO₄, 300 mM NaCl e imidazol 20 mM, pH8. Inmediatamente fue realizado un lavado con 10 mL de solución 50 mM NaH₂ PO₄, 300 mM NaCl e imidazol 50 mM, pH8. Después, se prosiguió con un lavado con 2 mL de solución 50 mM NaH₂ PO₄, 300 mM NaCl y 250 mM de imidazol, pH8 Finalmente fue realizada una elución con 2 mL de solución 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl y 500 mM de imidazol, pH8. Se tomaron alícuotas para análisis por SDS-PAGE correspondiente a cada lavado.

7.10.- Diálisis de proteína recombinante.

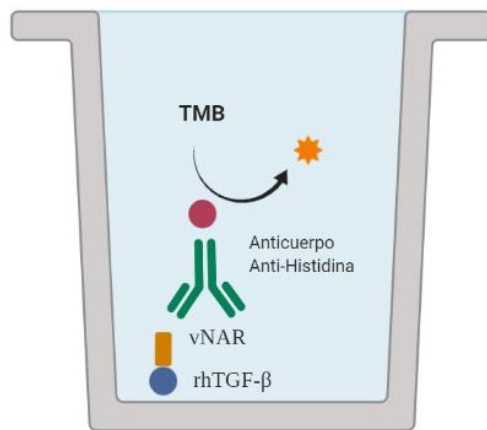
Una vez obtenida la proteína replegada por la estrategia de GSH y GSSG o por gradiente de urea, las proteínas fueron dializadas empleando una membrana con tamaño de poro de 3 kDa (ThermofisherScientific 88242). La membrana fue cerrada con pinzas y se verificó que no hubiera fugas. La membrana fue dispuesta en un contenedor con buffer PBS 1X, pH 7.4 en proporción 1:200 según el volumen de proteína contenida dentro de la membrana. Se mantuvo en agitación constante a 4 °C. Se realizaron tres recambios del PBS 1X cada 2 h. Finalmente, en el último recambio se mantuvo la agitación por 12-16 h. Una vez finalizado la diálisis, la proteína fue recolectada cuidadosamente y cuantificada usando el kit de cuantificación micro BCA. Las muestras fueron etiquetadas y almacenadas a 4 °C hasta su posterior uso.

7.11.-Propuesta de ELISA indirecta para la detección de rhTGF-β empleando vNART1

Para evaluar la capacidad de reconocimiento del vNART1 por la citocina, se propuso un formato de ELISA indirecta que consiste en la citocina recombinante humana TGF-β (rhTGF-β) directamente fijada en el pozo.

Fueron colocados 100 ng de rhTGF- β 1 (PEPROTECH, 100-21), rhTGF- β 2 (PEPROTECH, 100-35B) y rhTGF- β 3 (PEPROTECH, 100-36B) por pozo y por triplicado empleando placas de 96 pozos de alta afinidad (CORNING, 9018) y en un volumen de 50 μ L. La placa se incubó por 12-16 h a 4 °C. Se descartó la solución y los pozos fueron bloqueados con 100 μ L de una solución de BSA al 3% en PBS 1X. La placa fue incubada por 2 h a 37 °C.

El contenido de los pocillos fue descartado y se realizaron cinco lavados por pozo con 300 μ L de PBS 1X-Tween 20 al 0.05%, con intervalos de agitación de 30 s. Posteriormente, fueron agregados 50 μ L del vNART1 a cada pocillo de la placa, según esquema de diluciones seriadas 1:2 iniciando con 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 50 y 0 ng de vNAR por pocillo. La placa fue incubada a 37 °C durante 1 h. El contenido fue descartado y se realizaron cinco lavados con 300 μ L en cada pocillo de PBS 1X-Tween 20 al 0.05% con intervalos de agitación de 30 s. Se descartó el líquido y posteriormente fueron agregados 50 μ L de anticuerpo anti-histidina conjugado a peroxidasa (MyBiosource, MBS435072) en una dilución 1:1000 en BSA 1% Tween 20 al 0.05% en PBS 1X. La placa fue incubada por 2 h a 37 °C. Después, el contenido de los pocillos fue descartado y se realizaron cinco lavados con 300 μ L en cada pocillo de PBS 1X-Tween 20 al 0.05% en PBS 1X con intervalos de agitación de 30 s. Posteriormente, fueron agregados 50 μ L del sustrato de revelado 1-StepUltra TMB-ELISA (BioRad, 34028). La placa fue incubada a 37 °C por 10 min en ausencia de la luz y la reacción fue detenida con una solución de ácido sulfúrico 0.5 M (MEYER, 7664-93-9). La lectura fue realizada en un espectrofotómetro (xMark Microplate Spectrophotometer BioRad) a una longitud de onda de 450 nm. (Figura 8)



Created in BioRender.com bio

Figura 8.- Formato de ELISA propuesto para la determinación preliminar de detección de rhTGF- β mediante vNART1, este formato corresponde a una ELISA indirecta.

7.12.- Diseño del ensayo ELISA tipo sándwich basado en vNART1 para el reconocimiento de rhTGF- β

Se realizó un formato de ELISA tipo sándwich. Este formato se encuentra conformado por un anticuerpo IgG anti-TGF- β de captura (Sino-Biologicals® CAT 1DB14-MM18) dilución 1:250 en BSA 3% en PBS 1X. También, se empleó el anticuerpo SCBT anti TGF- β (SC-130348) dilución 1:250 en BSA 3% en PBS 1X, el anticuerpo se dejó fijándose en la placa durante 12-16 h a 4°C. Se descartó la solución y los pozos fueron bloqueados con 100 μ L de una solución de BSA al 3% en PBS 1X e incubados por 2 h a 37 °C.

En antígeno de interés corresponde a TGF- β ya sea proveniente de suero humano o de estándares de concentración conocida. La placa se incubó por 12-16 h a 4°C.

El contenido de los pocillos fue descartado y se realizaron cinco lavados con 300 μ L de PBS 1X-Tween 20 al 0.05% por pozo, con intervalos de agitación de 30 s. Posteriormente, fueron agregados 500 ng del Trx-vNART1 en un volumen final de 50

μL a cada pocillo de la placa. La placa fue incubada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h. El contenido fue descartado y se realizaron cinco lavados con $300\text{ }\mu\text{L}$ de PBS 1X- Tween 20 al 0.05% por pocillo, con intervalos de agitación de 30 s. Se descartó el líquido y posteriormente fueron agregados $50\text{ }\mu\text{L}$ de anticuerpo anti-histidina conjugado con peroxidasa (MyBiosource, MBS435072) en una dilución 1:1000 en BSA 1% Tween 20 al 0.05% en PBS 1X. La placa fue incubada por 2 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después el contenido de los pocillos fue descartado y se realizaron cinco lavados con $300\text{ }\mu\text{L}$ de PBS 1X-Tween 20 0.05% en PBS 1X en cada pocillo con intervalos de agitación de 30 s. Posteriormente, fueron agregados $50\text{ }\mu\text{L}$ del sustrato de revelado 1-StepUltra TMB-ELISA (BioRad, 34028). La placa fue incubada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min en ausencia de la luz y la reacción fue detenida con una solución de ácido sulfúrico 0.5 M (MEYER, 7664-93-9) por pozo. La lectura fue realizada en un espectrofotómetro (xMark Microplate Spectrophotometer BioRad) a una longitud de onda de 450 nm. (Figura 9)

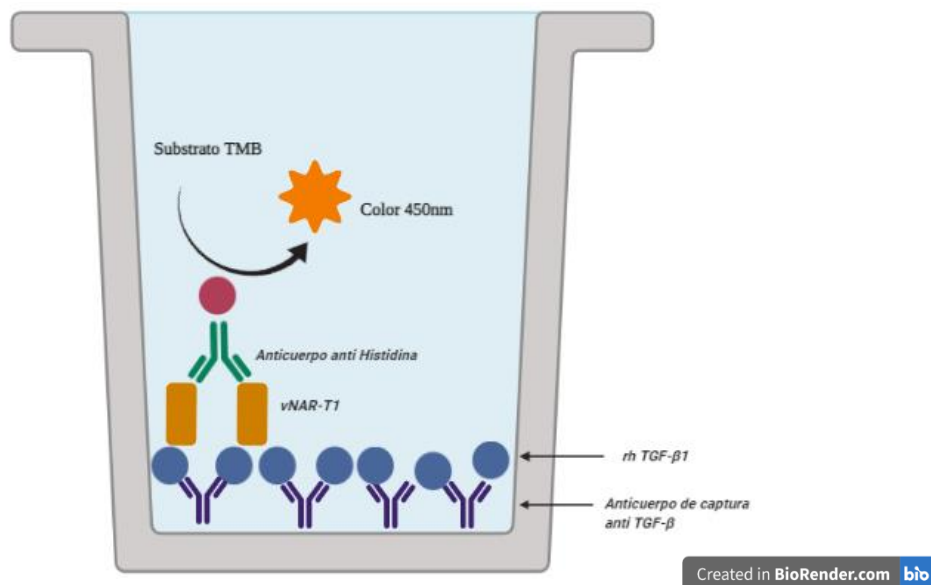


Figura 9.- Formato de ELISA propuesto para determinación cuantitativa de $rhTGF-\beta$, este formato corresponde a una ELISA sándwich donde el vNART1 es empleado como anticuerpo primario de reconocimiento.

7.13.- Evaluación de linealidad usando TGF- β recombinante humana y la proteína Trx-vNART1.

La linealidad de un método es una característica que indica que la respuesta analítica es proporcional a la concentración del analito determinado. La representación de la linealidad resulta de la aplicación de un modelo matemático como el de regresión lineal que nos permite inferir la concentración desconocida de un analito a partir del análisis de estándares concentración conocida

Para evaluar la linealidad para los fines de este trabajo, sólo se consideraron un blanco, un control negativo y por lo menos 6 puntos de calibración diferentes empleando el formato de ELISA indirecta.

Fue aplicado el modelo matemático de regresión lineal, el cual describe adecuadamente la relación entre la concentración y la señal instrumental, que proporciona una respuesta continua y reproducible en el intervalo de trabajo de una curva de calibración.

7.14.-Curva de calibración y evaluación de muestras de suero usando Trx-vNART1 para detección

Se evaluaron muestras de suero de pacientes diagnosticados con compromiso renal (ERC), así como muestras de pacientes sin afectación en el riñón (suero sano). Las muestras fueron evaluadas mediante la prueba de ELISA basada en dominios Trx-vNART1 anti-TGF- β .

La curva de calibración se realizó a partir de TGF- β humano recombinante (rhTGF- β) a concentraciones de: 0, 10, 80, 160, 240. 390 y 500 ng/mL por pozo. La placa se incubó por 12-16 h a 4°C. Se descartó la solución y los pozos fueron bloqueados con 100 μ L de una solución de BSA al 3% en PBS 1X e incubados por 2 h a 37 °C.

El contenido de los pocillos fue descartado y se realizaron cinco lavados con 300 μ L de PBS 1X-Tween 20 al 0.05% por pozo, con intervalos de agitación de 30 s. Posteriormente, fueron agregados 50 μ L del vNART1 a cada pocillo de la placa. La

placa fue incubada a 37 °C durante 1 h. El contenido fue descartado y se realizaron cinco lavados con 300 µL de PBS 1X- Tween 20 al 0.05% por pocillo, con intervalos de agitación de 30 s. Se descartó el líquido y posteriormente fueron agregados 50 µL de anticuerpo anti-histidina conjugado con peroxidasa (MyBiosource, MBS435072) en una dilución 1:1000 en BSA 1% Tween 20 al 0.05% en PBS 1X. La placa fue incubada por 2 h a 37 °C. Después el contenido de los pocillos fue descartado y se realizaron cinco lavados con 300 µL de PBS 1X-Tween 20 0.05% en PBS 1X en cada pocillo con intervalos de agitación de 30 s. Posteriormente, fueron agregados 50 µL del sustrato de revelado 1-StepUltra TMB-ELISA (BioRad, 34028). La placa fue incubada a 37 °C por 10 min en ausencia de la luz y la reacción fue detenida con una solución de ácido sulfúrico 0.5 M (MEYER, 7664-93-9) por pozo. La lectura fue realizada en un espectrofotómetro (xMark Microplate Spectrophotometer BioRad) a una longitud de onda de 450 nm.

Para convertir al TGF-β a su forma activa fue necesario que las muestras de suero humano fueran activadas (eliminación de la fracción LAP) mediante un procedimiento de acidificación-neutralización, para ello fue necesario adicionar 25µL de HCL 1N en 50 µL de muestra, seguido de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente. Inmediatamente se procede a realizar la neutralización empleando 25 µL de NaOH 1N.

Las muestras control se prepararon en la misma matriz biológica que las muestras obtenidas de pacientes, y como control negativo se empleó suero de pacientes sin enfermedad renal (suero sano). Se estableció el intervalo de la curva de calibración en función del límite mínimo de reconocimiento de TGF-β fijado en placa, a partir de estos datos se consideró como la menor cantidad reconocida.

La curva de calibración permitió obtener la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación (r^2) con los estándares de TGF-β humano recombinante. La señal se determinó midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 450-600 nm, que permitieron asociar a un valor de absorbancia directamente proporcional a la concentración de dicho estándar. Se utilizó la regresión lineal con la finalidad de determinar la concentración.

7.15.- Origen de las muestras biológicas

Las muestras biológicas analizadas son sueros de donadores sanos y pacientes con ERC que provienen de un protocolo aprobado por el Comité Local de Ética e Investigación del Hospital de Especialidades NUM. 1, Bajío, León, Guanajuato, Instituto Mexicano del Seguro Social (aprobación No. CLIEIS R-2018-1001-114) y donadas a CIATEJ para la realización de esta tesis. Este protocolo cumplió con los principios éticos para la investigación médica especificados en la Declaración de Helsinki; cada participante firmó el consentimiento informado y autorizó por escrito el uso de sus muestras biológicas para investigación antes de la inscripción en el estudio. La información acerca de la identidad y el historial clínico de los pacientes no fue proporcionada a CIATEJ para conservar la privacidad y la confidencialidad de los datos de los participantes.

7.16.- Evaluaciones de detección de TGF- β empleando un kit comercial

Así mismo, para determinar las concentraciones de TGF- β mediante un método distinto al de vNAR se empleó el kit comercial DUO SET ELISA de R&D Bio-systems (DY240-05) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras empleadas fueron las mismas para el kit y para el ELISA con vNART1. Además, estas cuantificaciones sirvieron de control.

7.17.- Análisis estadísticos

Para el análisis de los datos fue utilizado el software Graph Pad PRISMA® en versión para Windows, los valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos entre los controles y las muestras analizadas para las evaluaciones de sueros, evaluación de linealidad mediante ensayos de ELISA. En la evaluación de los diferentes grupos el análisis de los datos de las muestras en donde la distribución de los datos es gaussiana (paramétrica) fue aplicada la prueba de ANOVA o en el caso de los datos no gaussianos (no paramétricos) con prueba de *Kruskall Wallis*. La linealidad se evaluó mediante la prueba de regresión lineal y se consideró el valor de r^2 considerando un valor idóneo aquel mayor o igual a 0.90.

8.- RESULTADOS

8.1.- Digestión y clonación de construcción pET28a+T1.

Una vez realizado el proceso digestión y ligación del inserto vNART1 con el vector pET28a+, fueron transformadas la cepa BL21(DE3) de *E. coli*. Se evaluaron colonias aisladas a través de la técnica de PCR empleando los primers T7 que se unen al plásmido. Para verificar la transformación positiva de las células con el plásmido y corroborar que efectivamente se encontrara la construcción de inserto vNART1. El resultado se visualizó en una electroforesis en gel de agarosa al 1%, fue tomado un inóculo directamente de la colonia seleccionada a partir de cultivo en placa de células previamente transformadas. En la Figura 10, se muestra el resultado del PCR de colonia de seis colonias seleccionadas al azar. El fragmento esperado es de aproximadamente 500 pb. Se puede observar que todas las colonias son positivas al inserto, por lo tanto la estrategia de transformación mediante electroporación fue efectiva. Como control negativo, se emplearon: la mezcla de reacción sin plásmido para verificar que no hubiera contaminación en la reacción (carril 1) también, la cepa BL21(DE3) sin plásmido para verificar que no hubiera contaminación de la cepa (carril 2). Como control positivo, se empleó una construcción previamente realizada y verificada por secuenciación, donde el fragmento esperado es de 1000 pb, este control sirve para verificar que el PCR se realizó de forma adecuada. Finalmente, en los carriles 11 y 12, se muestra el plásmido pET28a+T1 purificado que corresponde a dos clones positivos del PCR de colonias. Estos dos plásmidos fueron enviados a secuenciar para verificar el correcto marco de lectura y la secuencia específica que corresponde al vNART1.

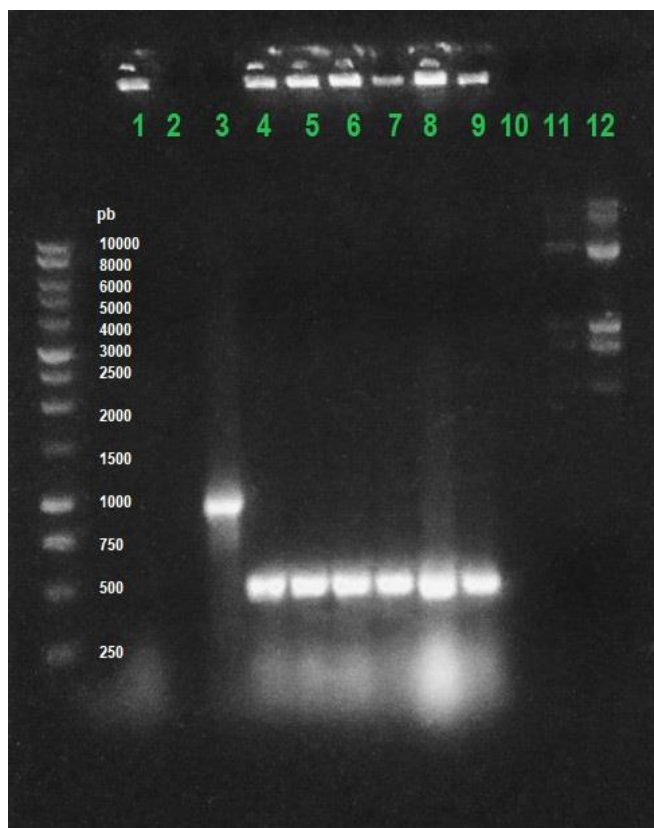


Figura 10.- Electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar la clonación pET28a+T1 en células *E. coli* BL21(DE3). Se emplearon los primers T7 que unen en el vector. En el carril 1 y 2 se encuentran los controles negativos: mezcla de reacción y la cepa BL21(DE3) sin transformar, respectivamente. Se empleó un constructo previamente verificado por secuenciación de 1000 pb (carril 3). Los carriles 4 a 9 corresponden a colonias aisladas que son positivas al amplicón esperado para el vNART1 (500 pb) en el vector pET28a+. Finalmente, en los carriles 11 y 12 se encuentran los productos de plásmido extraído a partir de dos colonias transformadas.

8.2.- Verificación de inserto Trx-vNART1 y transformación en BL21(DE3)

Debido a que en el grupo de trabajo previamente se había generado la construcción pET32a+ Trx-vNART1 se empleó este plásmido para transformar la cepa BL21(DE3) y confirmar por PCR la presencia del inserto. Por lo tanto, de las colonias aisladas, se emplearon los primers específicos para el fragmento vNART1, el fragmento esperado es de 350 pb aproximadamente. Posteriormente el resultado fue verificado a través una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 11). Las cinco colonias seleccionadas

son positivas al inserto. Por lo tanto, se emplearon dos colonias para proceder al aislamiento de plásmido.

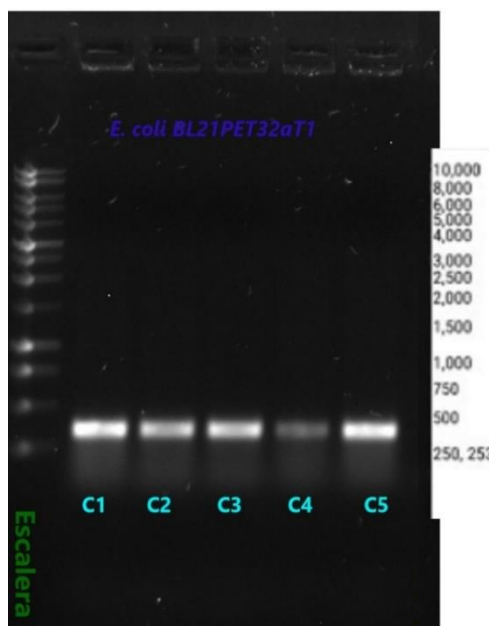


Figura 11.- Electroforesis en gel de agarosa al 1% del PCR de colonia para verificar la presencia de la secuencia que codifica para el vNART1 en el plásmido pET32a+. Se emplearon primers específicos para el vNART1.

8.3.- Cuantificación de plásmido pET32a+vNART1

Una vez confirmada la presencia de la secuencia que codifica para la proteína Trx-vNART1, se extrajo el plásmido pET32a+vNART1 que codifica para vNART1 iniciando con el cultivo de *E. coli* BLA21(DE3) transformadas. La extracción se realizó utilizando el kit Plasmid Miniprep Kit siguiendo las instrucciones del fabricante. El plásmido extraído se cuantificó y se evaluó en gel de agarosa al 1% empleándose buffer TAE 1X con la escalera de 1Kb. En la Figura 12, se muestran los plásmidos obtenidos de las colonias 1 y 2 de la cepa BL21(DE3). Se muestran dos plásmidos aislados, las concentraciones obtenidas fueron de 230.2 ng/mL y 156.4 ng/mL.

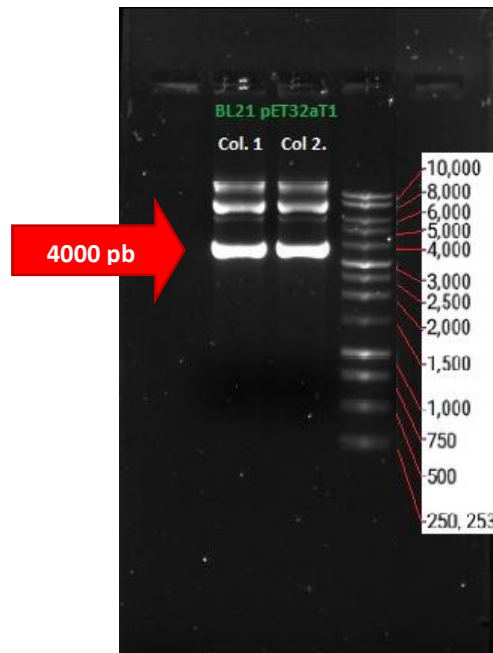


Figura 12.- Determinación de la integridad de plásmido de dos colonias aisladas y transformadas con el plásmido pET32a+Trx-vNART1. La banda correspondiente a 4000 pb representa la forma relajada del plásmido.

8.4.- Expresión del vNART1 en el vector pET28a+

La expresión del vNART1 de la construcción en el plásmido pET28a+T1, se llevó a cabo según las condiciones de cultivo e inducción según es descrito en el apartado 7.4. Los resultados mostrados a continuación corresponden a 16 h de inducción a 30 °C, debido a que al inicio de la inducción el crecimiento en matraz fue lento. La extracción de las fases solubles e insolubles se realizó según se describe el apartado 7.4. La imagen de las fracciones extraídas y evaluadas se muestran a continuación en la Figura 13, donde el control negativo consistió en la fracción soluble y no soluble de *E. coli* BL21(DE3) sin transformar (carriles 1 y 2). Se observa el bandeo proteico característico de la cepa sin plásmido. En los carriles 3 y 4, se observan las fracciones solubles e insoluble respectivamente de los cultivos de *E. coli* BL21(DE3) transformada con el plásmido pET28a+T1. Se observa una banda de 12-15 kDa característico al vNART1. La banda correspondiente al vNART1 está señalada con una flecha azul. Al

comparar el resultado de los carriles 3 y 4 es evidente que el vNART1 se obtiene de forma insoluble.

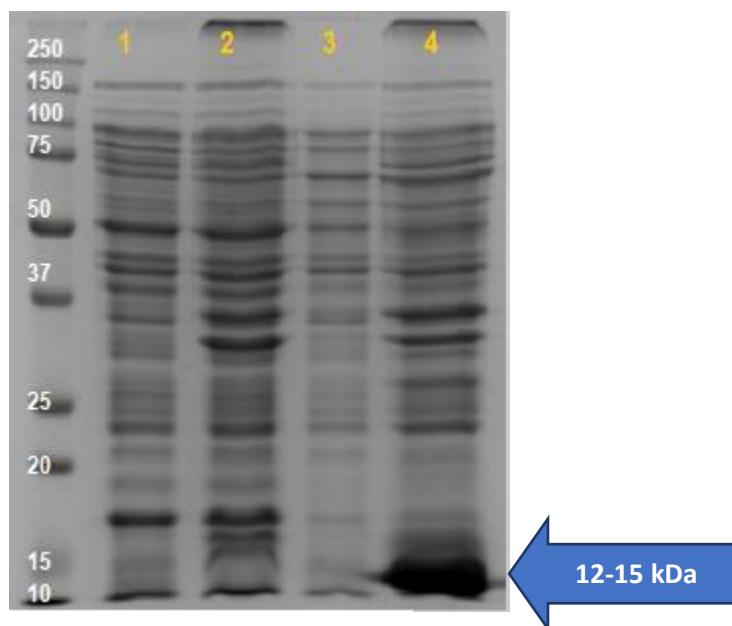


Figura 13.- Evaluación de la expresión del vNART1 en *E. coli* BL21(DE3) con la construcción pET28a+T1. Como control negativo, se evaluó el bandeo correspondiente a *E. coli* sin transformar con plásmido pET28a+ en sus fracciones solubles e insolubles (carril 1 y 2, respectivamente). También, se muestran las fracciones solubles e insolubles de *E. coli* transformada con el plásmido pET28a+vNART1 (carril 3 y 4, respectivamente). Se observa la expresión del vNART1 en el carril 4 con un peso entre 12-15 kDa resaltado con la flecha azul.

8.5.- Expresión de la proteína Trx-vNART1 en el plásmido pET32a+

Con la finalidad de incrementar la expresión proteica del vNART1 se empleó la estrategia de incluir la proteína chaperona tiorredoxina que se incluye en el plásmido pET32a+vNART1. Esta construcción permite la expresión de la proteína Trx-vNART1.

Como se sabe, la tiorredoxina se emplea para la expresión de la proteína recombinante de interés para favorecer el correcto plegamiento (formación de enlaces disulfuro) y favoreciendo su actividad biológica. Debido a que anteriormente se han reportado rendimientos menores a 1 mg/L para diversos vNAR´s obtenidos en el laboratorio, se decidió realizar modificaciones en la extracción y purificación de la proteína Trx-VNART1.

La expresión del Trx-vNART1 fue llevada a cabo en diferentes condiciones de cultivo: por ejemplo, temperatura (30 °C, 37 °C), tiempo de incubación (5 y 12 h) y medio de cultivo (LB, SB, 2XYT). Así como dos cepas de *E. coli* como BL21(DE3) y C3030. Los resultados de la expresión indican que es óptima en la cepa BL21(DE3) en medio de cultivo 2XYT a 30 °C. Estos resultados fueron publicados en una memoria en extenso (Ver anexo 2).

A continuación, se presenta la evaluación en gel de poliacrilamida de la fracción soluble y no soluble de *E. coli* BL21DE3 empleando los medios de cultivo TB y 2XYT, ambos cultivos fueron realizados en idénticas condiciones, siendo en la fracción no soluble de células crecidas en el medio 2XYT donde se puede observar una expresión considerable de Trx-vNART1 (Figura 14).

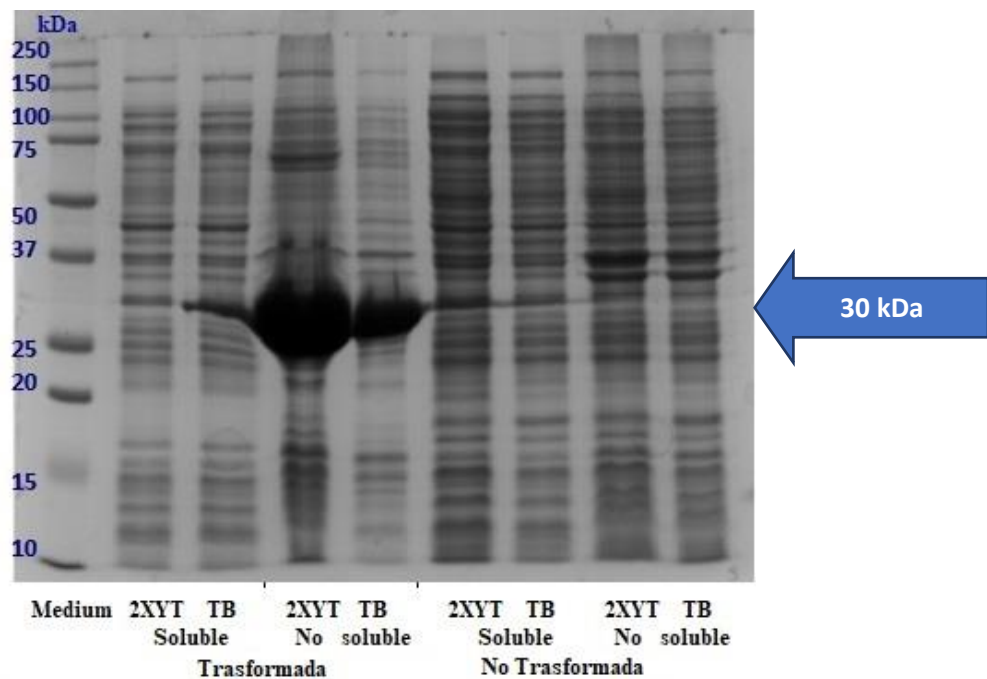
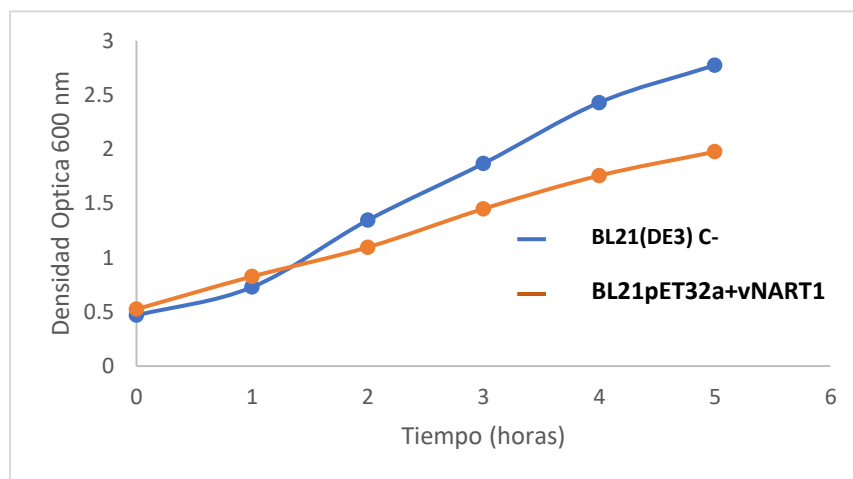


Figura 14.- Evaluación de la expresión de la proteína Trx-vNART1 en gel de poliacrilamida al 12%. Evaluación en medios 2XYT y TB a 30 °C. En la fracción no soluble (insoluble), se observa la banda correspondiente a un peso esperado de 30 kDa que corresponde a la proteína Trx-vNART1 en el medio de cultivo 2XYT. También se observa la proteína Trx-vNART1 en el medio TB extraída en condiciones no soluble, sin embargo, se consideró solamente las condiciones de inducción y extracción correspondiente al 2XYT y 30 °C para los siguientes experimentos.

A continuación, se muestran resultados de la cinética de crecimiento a lo largo de 5 h de inducción de la proteína Trx-vNART1. Los resultados muestran que realizando la inducción a la temperatura de 30 °C después de 3 h de inducción se incrementó cuatro veces la densidad óptica final del cultivo de *E. coli* BL21(DE3) (Gráfica 1). Además, se realizó una cinética de expresión de la proteína Trx-vNART1 en el medio de cultivo 2XYT tomando una alícuota a cada hora de inducción y analizando en SDS-PAGE. Se obtiene más expresión de proteína a las 5 h de inducción considerando que la extracción de realice en condiciones no solubles (Figura 15). Con base en estos resultados, se seleccionó el medio de cultivo 2XYT y la inducción por 5 h a 30 °C como las mejores condiciones para la obtención de la proteína Trx-vNART1. Por lo tanto, se decidió continuar el proceso experimental empleando estas condiciones.



Gráfica 1.- Datos de la densidad óptica obtenida en la cinética de expresión en BL21(DE3) transformada con el vector pET32a+vNART1, crecida en medio 2XYT a 30 °C.

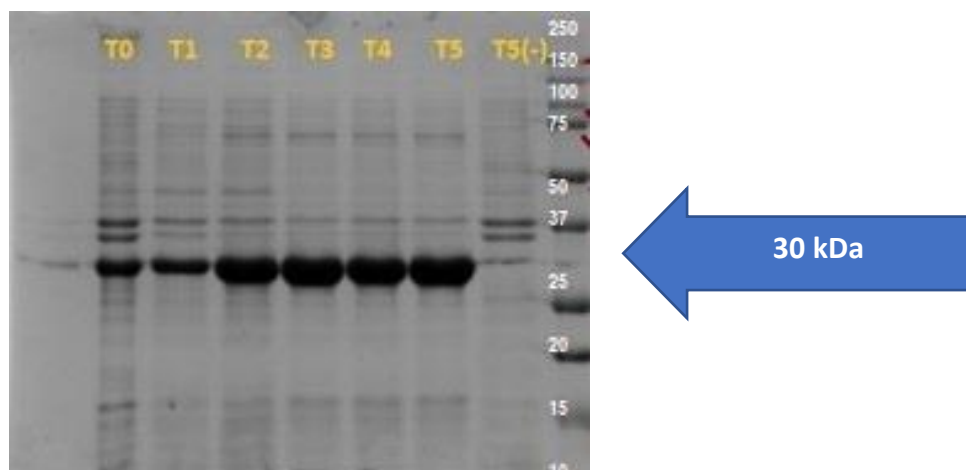


Figura 15.- Evaluación de la cinética de expresión de la proteína Trx-vNART1 en gel de poliacrilamida al 12%. Se observa la banda correspondiente a dicha proteína a un peso esperado de 30 kDa (T1 a T5). Control negativo corresponde a la cepa BL21(DE3) sin transformar después de 5 h de inducción (T5-).

8.6.- Detección del vNAR T1 y de la proteína Trx-vNART1 por Western blot

Se llevó a cabo un Western blot para detectar la etiqueta de histidinas presente en la secuencia del vNART1 expresado de forma recombinante y comparando la extracción en condiciones solubles e insolubles. Los resultados se muestran en la Figura 16 y corresponden al cultivo inducido a 30 °C. En el carril 1 y 2, se muestran los controles negativos que consistieron en la fracción soluble y no soluble de *E. coli* BL21(DE3) sin transformar. En los carriles 3 y 4, se muestra la cepa transformada con plásmido pET28a+vNART1 y las extracciones de proteína en condiciones solubles e insolubles, respectivamente. Se observa una banda de 12-15 kDa característica al vNART1.

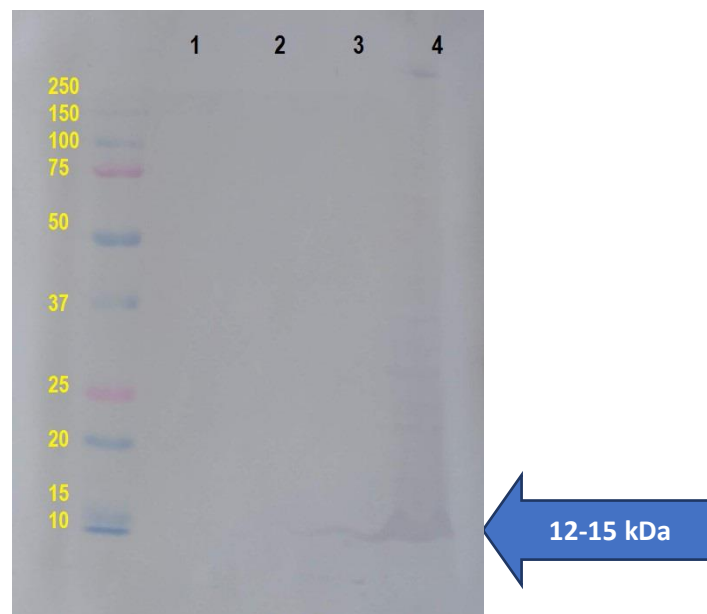


Figura 16.- Western blot para evaluar la presencia del vNART1 mediante la detección de su etiqueta de histina. Se evaluaron las fracciones solubles e insolubles de *E. coli* sin transformar (carriles 1 y 2, respectivamente). También las fracciones solubles e insolubles (carril 3 y 4, respectivamente) de *E. coli* transformada con el plásmido pET28a+vNART1. Se observa la presencia de una banda que indica la expresión del vNART1 en el carril 4 con un peso entre 12-15 kDa.

Para la construcción correspondiente a la proteína Trx-vNART1 se empleó el plásmido pET32a+. Posterior a la inducción y extracción de la proteína, se verificó que la proteína mayoritaria de 30 kDa observada en los geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Comassie sea efectivamente la proteína Trx-vNART1, se llevó a cabo un Western blot para detectar la etiqueta de histidinas. Los resultados de la Figura 17, muestran que efectivamente en la cepa BL21(DE3) crecida a 30°C expresa la proteína de interés.

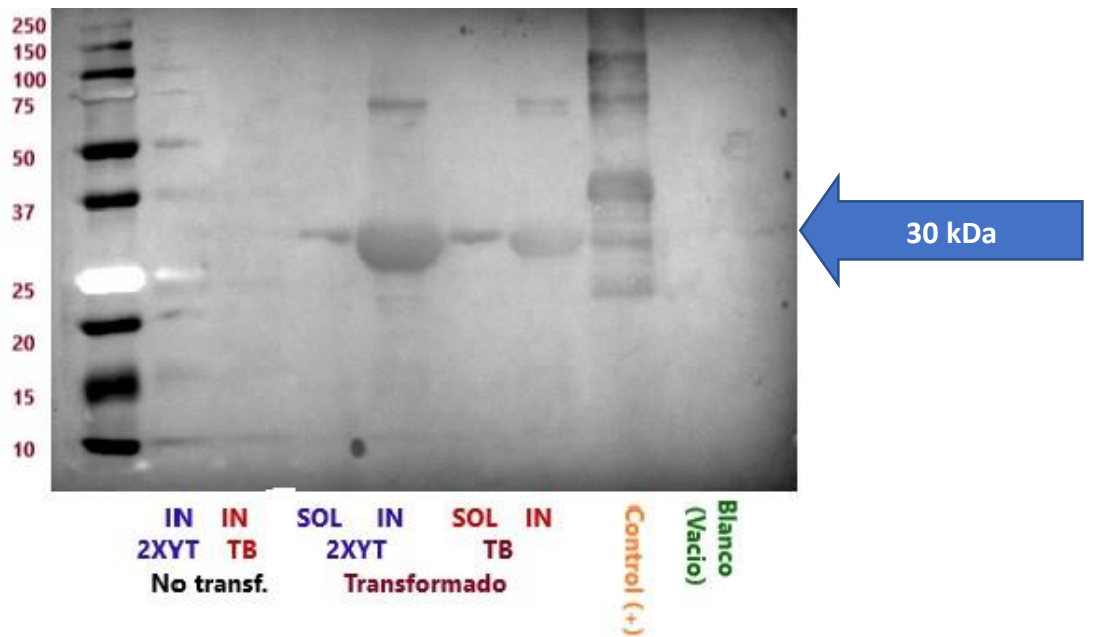


Figura 17.- Western blot para evaluar la presencia de la etiqueta de histidina en la proteína Trx-vNART1. En la figura se encuentra la evaluación de cultivos crecidos e inducidos en medio 2XYT y TB a 30 °C, así como las extracciones en condiciones soluble y no soluble. Se observa la banda correspondiente a la proteína Trx-vNART1 en un peso esperado de 30 kDa.

8.7.- Replegamiento y purificación del vNART1 y la proteína Trx-vNART1 con glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG)

Una vez que se corroboró que el vNART1 y la proteína Trx-vNART1 contienen la etiqueta de histidina, se procedió con su purificación. Debido a que ambas proteínas se encuentran principalmente en la fracción insoluble fue necesario extraerla de los cuerpos de inclusión (fracción no soluble) empleando condiciones desnaturalizantes. Las condiciones desnaturalizantes rompen la estructura tridimensional de la proteína, por lo tanto, es necesario restablecer los enlaces disulfuro en un proceso de replegamiento. En el caso del vNART1, el resultado posterior a los pasos de purificación y renaturalización fueron analizados en un gel de SDS-PAGE (Figura 18). El protocolo de purificación y renaturalización corresponde a un gradiente descendente de imidazol. Se puede observar la proteína de 12-15 kDa en los carriles 7, 8 y 9 que corresponden a 250 M de imidazol.

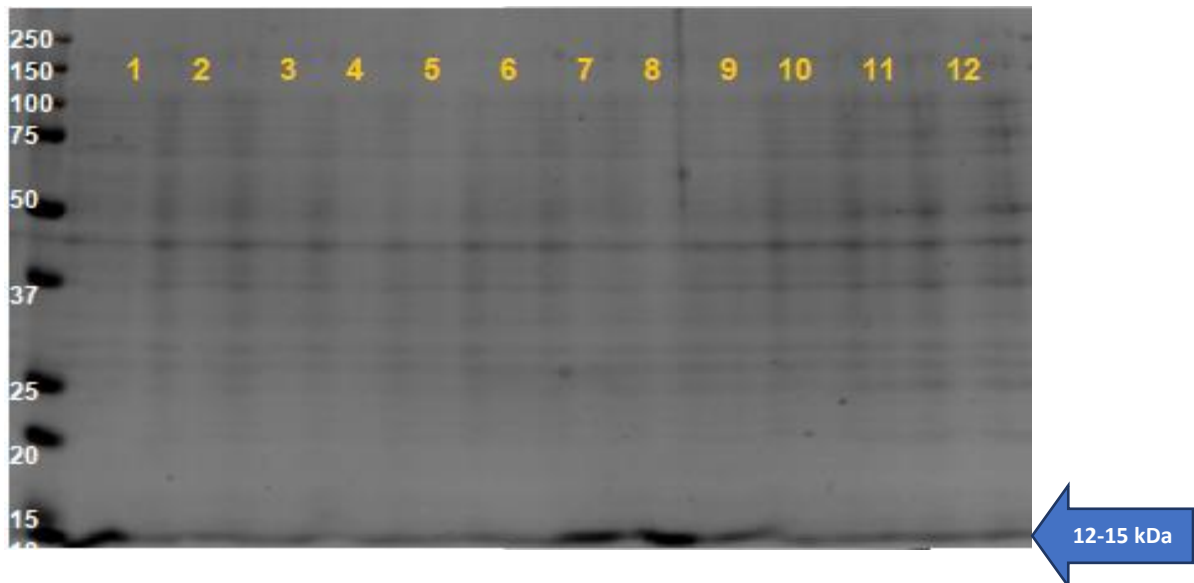


Figura 18.- Purificación y replegamiento del fragmento vNART1 expresado en *E. coli* BL21(DE3), se presentan las eluciones: Antes de la purificación (carril 1), Lavado 1 y 2 (carriles 2 y 3, respectivamente), eluciones con 100 mM de imidazol (carriles 4, 5 y 6, respectivamente), eluciones con 250 mM de imidazol (carriles 7, 8 y 9, respectivamente) y finalmente, eluciones con 500 mM de imidazol (carriles 10, 11 y 12, respectivamente). Se observa el vNART1 eluído en los carriles 7, 8 y 9 con un peso de 12-15 kDa.

Para la proteína Trx-vNART1, se analizaron las diferentes fracciones obtenidas después de la purificación en condiciones desnaturalizantes. Como control se empleó la extracción de BL21(DE3) sin transformar (carril 1). En el carril 2, se muestra la cepa sin transformar después de la extracción en condiciones insolubles. En los carriles 3 a 6 se muestran las fracciones correspondientes a las fracciones de proteína recombinante obtenidas del proceso de extracción en condiciones desnaturalizantes (Figura 19).

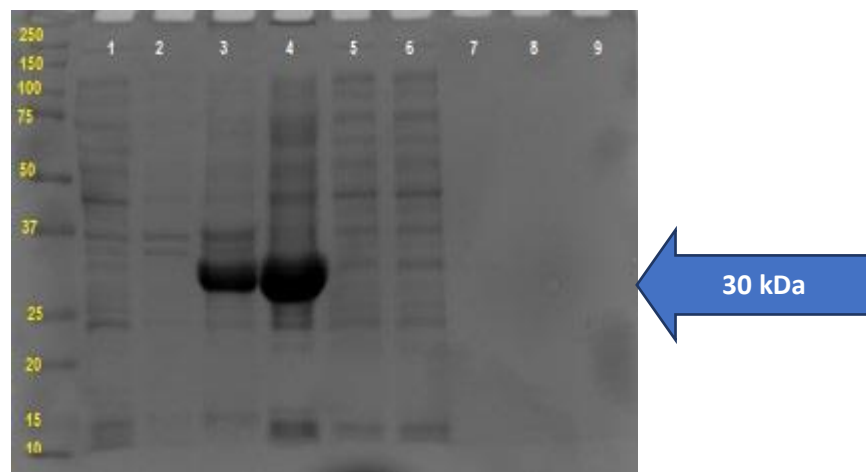


Figura 19.- Gel de poliacrilamida al 12% de las fracciones de purificación de la proteína Trx-vNART1. Carril 1: BL21 soluble, Carril 2: BL21 insoluble, Carril 3: BL21pET32a+T1, fracción insoluble después de someter a proceso de desnaturalización Carril 4: BL21pET32a+T1, fracción soluble, después de someter a proceso de desnaturalizado, Carril 5 y 6 fracción soluble: BL21pET32a+T1 (Duplicado), Carril 7: Fracción No Retenida (Vol. 500 mL), Carril 8: Lavado 1(150 mL). Carril 9: Lavado 2 (150 mL).

8.8.- Concentración del vNART1 y de la proteína Trx-vNART1

En la Figura 20, se observa el resultado de la concentración del vNART1 después de pasar por el Amicon (carril 3) quedando en un buffer de 10 mM de imidazol, 150 mM de NaCl y 50 mM de NaH₂PO₄.

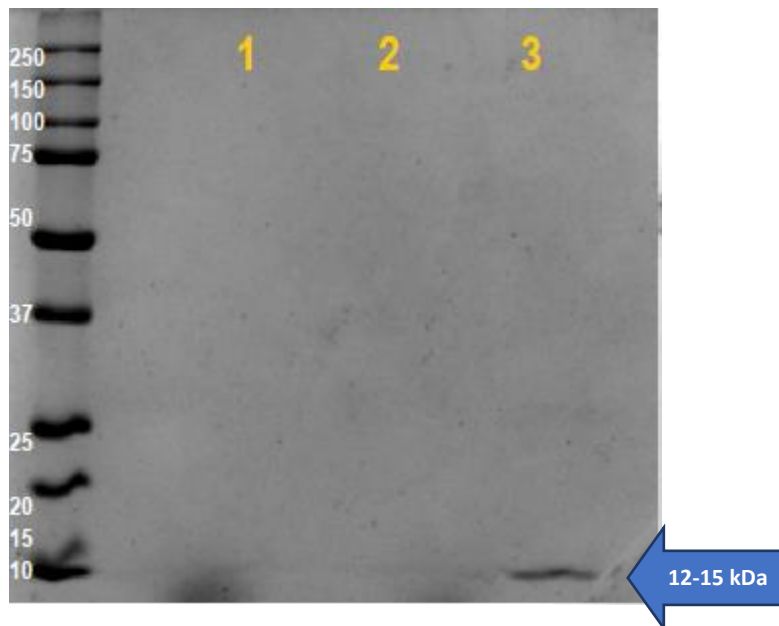


Figura 20.- Concentración de las eluciones obtenidas en la purificación del vNART1. Se muestra la elución antes de pasar (carril 1), la fracción no retenida (carril 2) y finalmente, la fracción concentrada 10 mM de imidazol, 150 mM de NaCl y 50 mM de NaH_2PO_4 (carril 3).

Una vez que fue llevado a cabo el proceso de purificación y replegado de Trx-vNART1, se procedió a concentrarla y disminuir la concentración de sales e imidazol presentes en el buffer de elución debido a que estos componentes interfieren con la cuantificación. Para concentrar y cambiar de buffer, se emplearon tubos de ultrafiltración marca Amicon con poro de tamaño 3 kDa por centrifugación. El mismo sistema permite intercambiar el buffer a PBS 1X y eliminar el imidazol contaminante. En la Figura 21, se muestra el resultado de la concentración donde se observa que en la fracción 1 correspondiente al vNART1 replegado y diluido. También, la fracción no fue retenida por la membrana del tubo concentrador siendo notorio que no hay bandas que sugieran pérdidas de vNART1 a través de la membrana de filtración. Finalmente, en la fracción 3, se observa la banda correspondiente al vNART1 con un peso de 12-15 kDa.

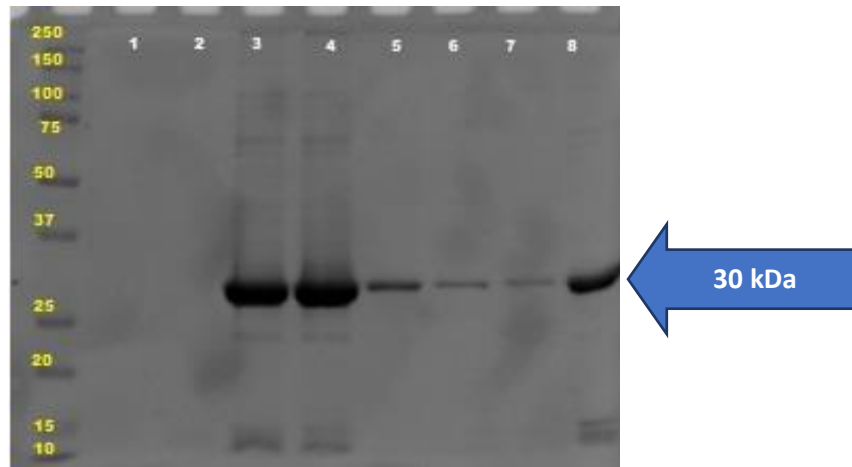


Figura 21.- Gel de poliacrilamida al 12% Evaluación de la proteína Trx-vNART1. Carril 1: Fracción 1, Carril 2: Fracción 2, Carril 3: Fracción 3, Carril 4: Fracción 4, Carril 5: Fracción 5, Carril 6: Fracción 6, Carril 7: Fracción No Retenida concentrado de tubo Amicon, Carril 8: concentrado tubo ámicon (50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 10 mM Imidazol).

8.9.- Purificación y replegamiento en columna para la proteína Trx-vNART1 en por gradiente de urea

Debido a los resultados obtenidos en los ensayos de inducción y expresión realizados con Trx-vNART1, fue evaluada una metodología adicional con la finalidad de determinar mejoras potenciales que incrementen el rendimiento final de proteína recombinante purificada. Por lo tanto, se procedió a purificar la fracción no soluble de la proteína Trx-vNART1 expresada y almacenada en los cuerpos de inclusión. Para lograr este propósito, fue puesta en marcha una metodología para obtener proteína recombinante en condiciones desnaturalizantes, se empleó la metodología según lo recomienda el manual de QIAGEN y que se encuentra previamente descrito en este documento. (Figura 22)

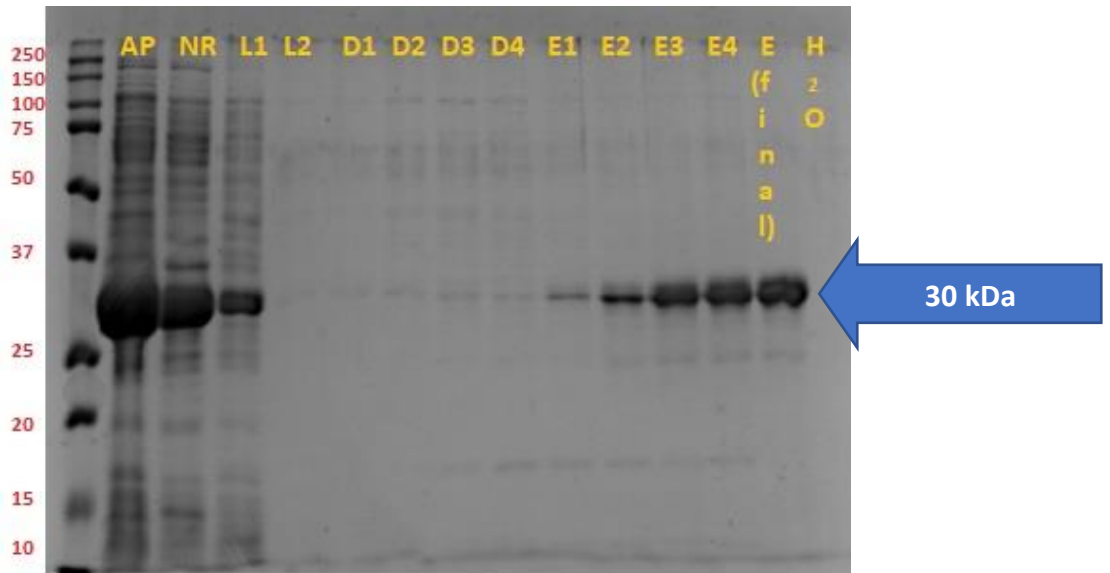


Figura 22.- Purificación de la proteína Trx-vNAR T1 expresado en *E. coli* BL21(DE3) a través de condiciones desnaturalizantes con urea 8 M bajo un gradiente de pH (pH8 a 4.5) en columna de níquel NiTA+. Se observa la presencia de proteína en la elución con el buffer E con pH 4.5 en los carriles E1 al E final.

Sin embargo, debido a que la urea empleada para la extracción de la proteína Trx-vNART1 rompe la conformación tridimensional de la proteína (enlaces disulfuro), se necesita un protocolo de replegamiento para reestablecer la conformación nativa del Trx-vNART1 y de este modo, sea capaz de reconocer a la citocina TGF- β . En esta modificación del método, se empleó un gradiente descendente de urea que facilita el replegamiento en columna. En la Figura 23, se muestra un gel de SDS-PAGE donde se analizaron alícuotas de los diferentes pasos de la purificación y replegamiento en columna empleando el gradiente descendente de urea.

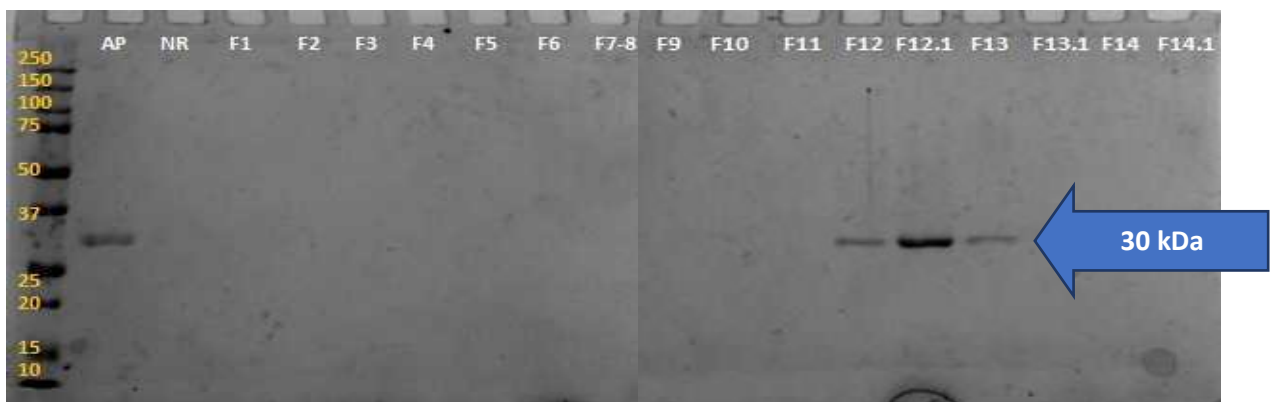


Figura 23.- Replegamiento en columna de níquel NiTA de la proteína Trx-vNART1 a través de un gradiente descendente de urea. Se observa la presencia de proteína en presencia del buffer F12 y F12.1 que corresponden a eluciones de 250 mM de imidazol, además de la F13 que corresponde a la elución con 500 mM de imidazol (pH 8). AP: proteína Trx-vNART1 antes de pasar por la columna, empleado como control.

8.11.- Rendimiento de producción para vNART1 y la proteína Trx-vNART1

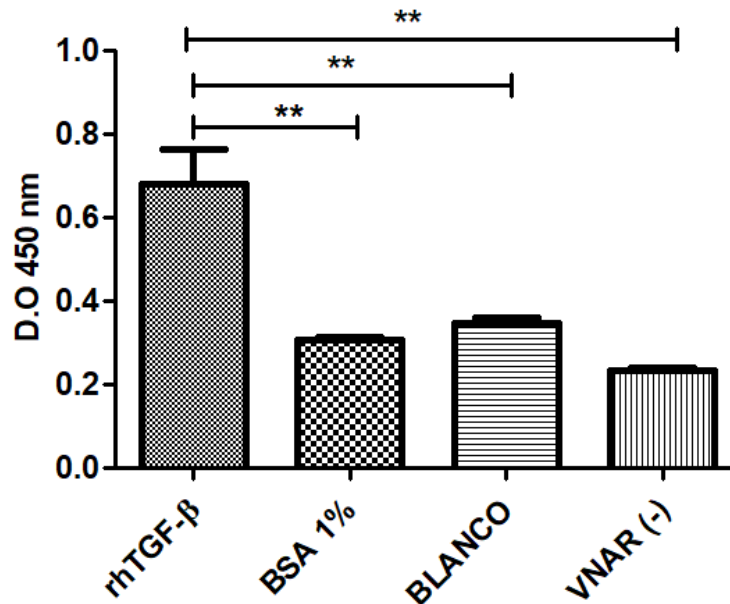
El rendimiento corresponde a la cantidad de proteína obtenida en mg sobre el volumen de inducción realizada (L). Para obtener el rendimiento del vNART1 expresada en *E. coli* y con el plásmido pET28a+vNART1, después de la extracción de la fracción insoluble, la purificación y el replegamiento, se obtuvo un rendimiento de 2.659 mg/L de medio de cultivo.

En cambio, el rendimiento final de producción de la proteína Trx-vNART1 obtenida por la metodología del glutatión oxidado y reducido fue de 145.970 mg/L. Este resultado es 54 veces mayor que el obtenido para el vNART1. En contraparte, el rendimiento obtenido para la proteína Trx-vNART1 usando el gradiente de urea fue de 2.64 mg/L. Conviene hacer un análisis a fondo del costo beneficio de usar urea, sin embargo, debido a los alcances de este proyecto dicha evaluación se mantiene como perspectiva. Los rendimientos fueron obtenidos de las diversas proteínas concentradas por Amicon o dializadas con membrana, ambos con tamaño de poro de 3 kDa.

8.12.- Evaluaciones de reconocimiento de rhTGF- β por vNART1

Para evaluar la capacidad de reconocimiento del vNART1 a la citocina rhTGF- β , se empleó una prueba de ELISA. El formato consistió en un inmunoensayo ligado a enzima en formato de ELISA indirecta descrito en la *Figura 8* correspondiente al apartado de metodología. En pozo se inmovilizó la rhTGF- β , posteriormente se procedió al bloqueo y se empleó el vNART1 como anticuerpo primario, debido a que el vNART1 no tiene acoplada enzima, fue necesario emplear el anti-His-HRP que

reconoce la etiqueta de histidinas presente en el vNART1. Los resultados de la Gráfica 2, muestran que existe reconocimiento significativo del vNART1 por la citocina rhTGF- β (** $P < 0.05$) respecto a los controles negativos empleados en el ELISA. Como control negativo se empleó 1% de BSA, el blanco corresponde a una solución de PBS 1X. El control negativo corresponde a las proteínas extraídas de la *E. coli* BL21(DE3) sin transformar. Por lo tanto, el vNART1 extraído en condiciones desnaturalizantes, purificado y replegado tiene la capacidad de reconocer a la citocina cuando se emplea en un formato de ELISA indirecto.

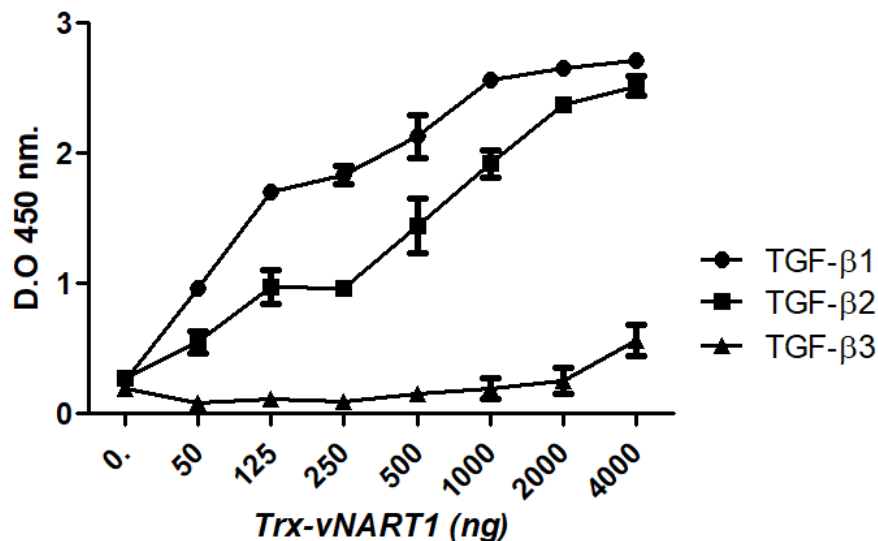


Gráfica 2.- Evaluación del reconocimiento de rhTGF- β empleando 250 ng de vNART1 por pocillo. La concentración de rhTGF- β fue de 100 ng/mL. Se observa diferencia significativa entre pocillos con rh TGF- β y el control negativo $P < 0.05$.

8.13.- Evaluaciones de reconocimiento de rhTGF- β por la proteína Trx-vNART1

También, se evaluó la capacidad de reconocimiento de la proteína Trx-vNART1 por la citocina rhTGF- β en el formato de prueba de ELISA indirecto descrito en la *Figura 8*. Para este análisis se incluyeron las tres isoformas de la citocina manteniendo su concentración constante en todos los pozos. En cambio, se realizaron diluciones

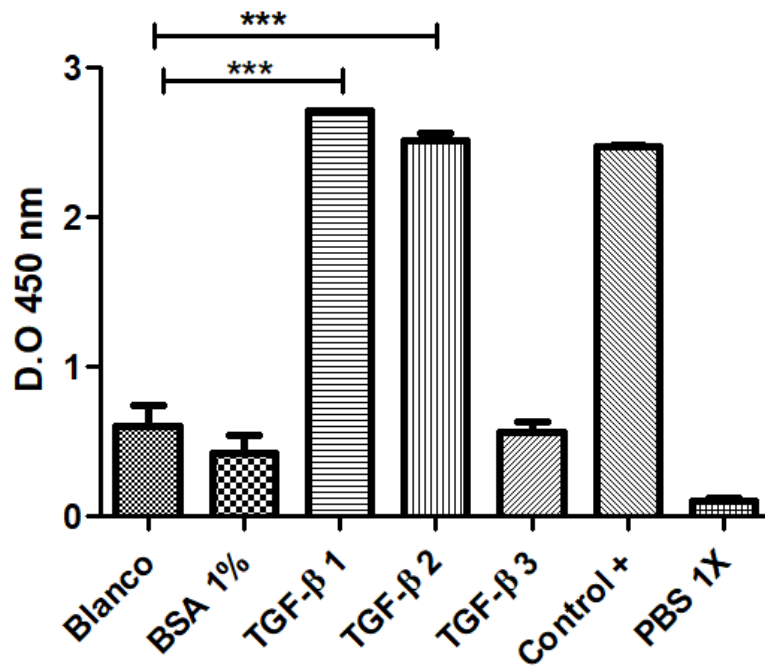
seriadas 1:2 de las concentraciones de la proteína Trx-vNART1 iniciando en 4000 ng/pozo y la menor concentración fue de 50 ng/pozo. Los resultados que se muestran en la Gráfica 5 corresponden a una curva dependiente de concentración, es decir, al modificar la concentración de la proteína Trx-vNART1 se modifica la absorbancia obtenida. Los resultados muestran que la proteína Trx-vNART1 reconoce preferentemente las isoformas 1 y 2 de la citocina TGF- β . Anteriormente, se había reportado que el dominio vNART1 nativo reconocía de manera similar a las tres isoformas. Por lo tanto, serían necesarios más experimentos para confirmar si la presencia de la proteína chaperona tioredoxina en la proteína Trx-VNART1 afecta el reconocimiento por la isoforma 3.



Gráfica 3.- Evaluación del reconocimiento de rhTGF- β en un esquema de diluciones de la proteína Trx-vNART1. En los pozos con citocina se colocaron 100 ng de cada isoforma. Cada uno de los puntos fue realizado por triplicado. Se muestra de desviación estándar.

Entonces, empleando el mismo tipo de ELISA indirecto, se procedió a la determinación de la capacidad de reconocimiento de la proteína Trx-vNART1 por las diversas isoformas y comparando con los siguientes controles: el blanco corresponde solución de PBS 1X; el BSA 1% se colocó como control negativo; como control positivo se

empleó la proteína Trx-vNART1 directamente inmovilizada en pozo y revelada con anti-His; finalmente como control negativo de inespecificidad del anti-His se colocó PBS 1X. Los resultados se muestran en la Gráfica 6, donde se confirma la preferencia de la proteína Trx-vNART1 por las isoformas 1 y 3 con significancia estadística ($***P < 0.0001$) al comparar con el blanco. Los ensayos se realizaron por triplicado. Debido a que se obtiene mayor rendimiento de la proteína Trx-vNART1, se optó por continuar trabajando con esta molécula. Adicionalmente, se ha visto que la isoforma mayoritaria de TGF- β que se encuentra en la circulación sanguínea es la isoforma 1.



Gráfica 4.- ELISA indirecta de reconocimiento del Trx-vNART1 por las isoformas de la citocina TGF- β . Se incluyeron diversos controles negativos como blanco, control de BSA 1% para verificar inespecificidades de la proteína Trx-vNART1. Como control positivo, se inmovilizo directamente en placa la proteína Trx-vNART1 y se detectó con anti-his. Finalmente, para verificar inespecificidades del anti-His se empleó PBS como control negativo.

8.14.- Evaluaciones de linealidad empleando Trx-vNART1

Fueron llevados a cabo ensayos de linealidad empleando rhTGF- β directamente inmobilizado en pozo y un diseño de ELISA indirecta empleando la proteína Trx-vNART1 como anticuerpo de detección. Las concentraciones de citocina TGF- β 1 fueron de 0, 10, 80, 160, 240, 440, 500 ng/mL. Cada punto en la curva de calibración se realizó por duplicado, sin embargo, empleando este esquema no se hallaba reproducibilidad ni linealidad (Figura 24).

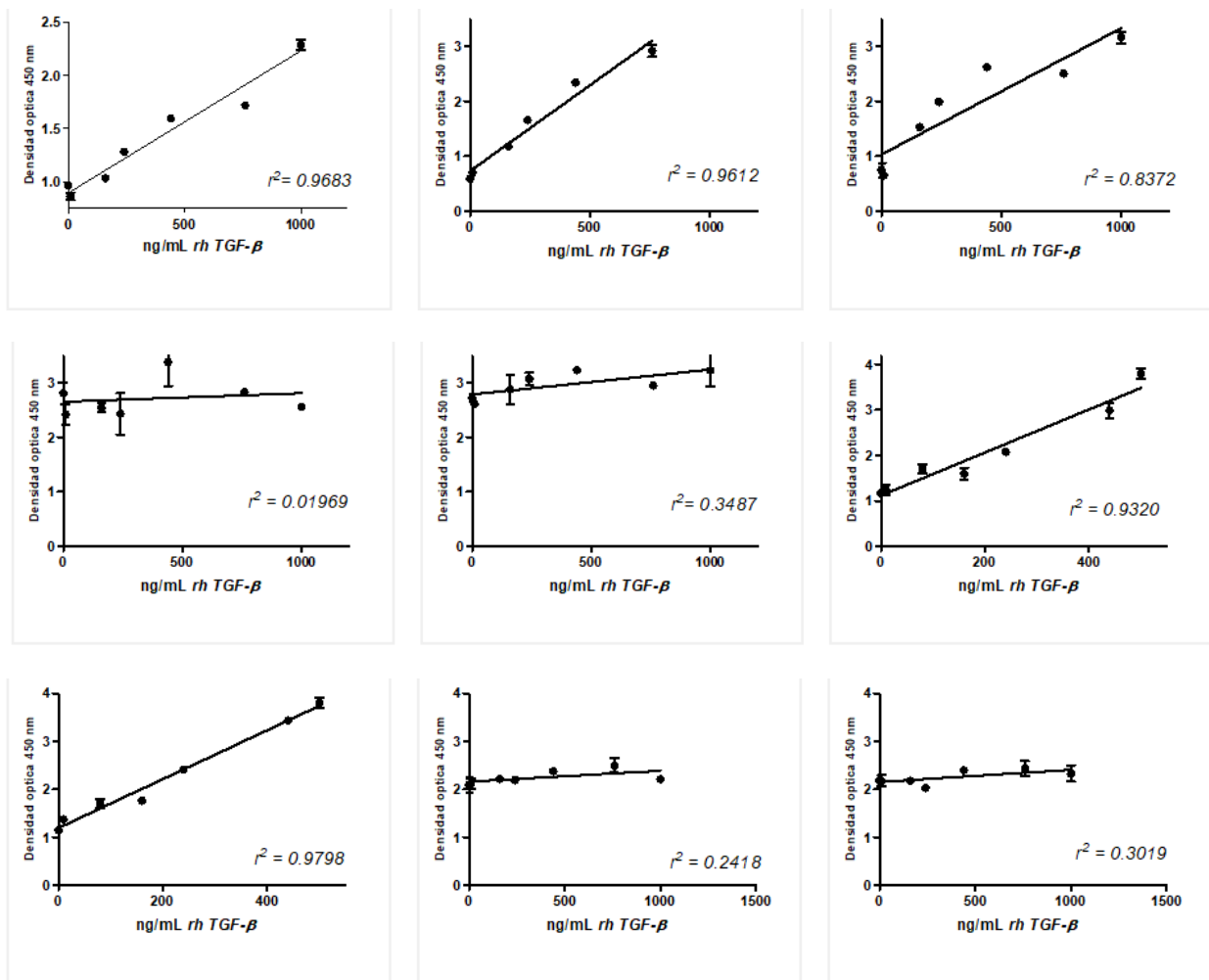
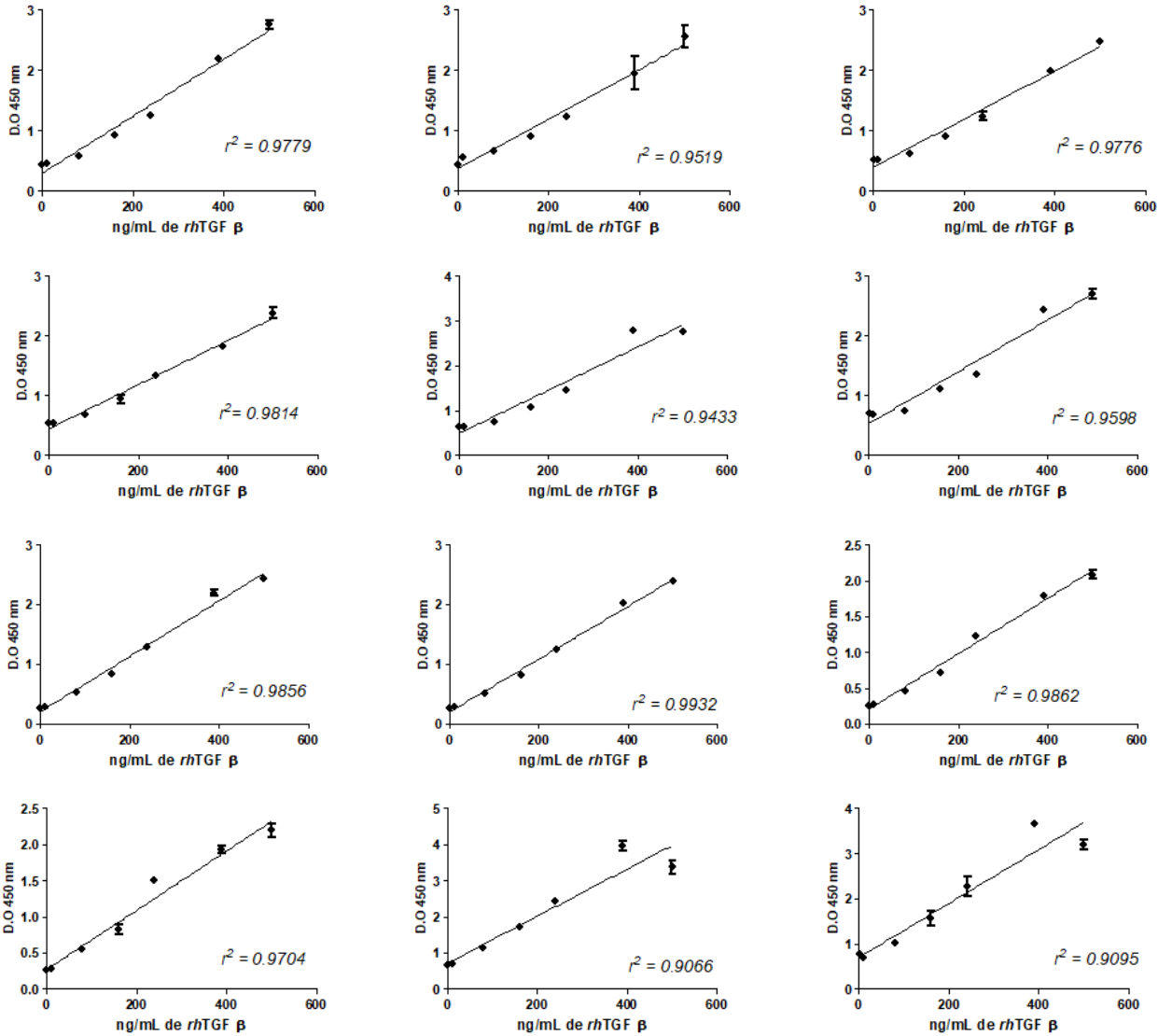


Figura 24.- Evaluación preliminar de la linealidad de la ELISA indirecta empleando la proteína Trx-vNART1 como anticuerpo de detección y la rhTGF- β . Se muestra el coeficiente de correlación (r^2) en cada gráfico.

Los resultados obtenidos previamente dieron pauta para realizar un nuevo esquema de diluciones a fin de obtener una curva de calibración con un rango más adecuado, se obtuvo mejoría en el coeficiente de correlación empleando el siguiente esquema de concentraciones: 0, 10, 80, 160, 240, 390 y 500 ng/mL de TGF-β1 (cada punto de la curva se realizó por duplicado). Los resultados obtenidos muestran consistencia en cuanto a la reproducibilidad y repetibilidad (Figura 25).



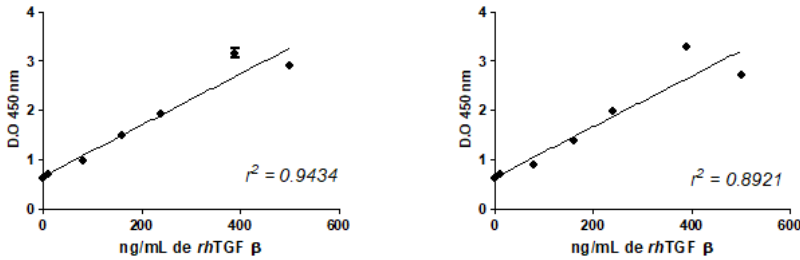


Figura 25.- Evaluación de la linealidad de la ELISA indirecta empleando la proteína Trx-vNART1 como anticuerpo de detección y la rhTGF-β1. Se muestra el coeficiente de correlación (r^2) en cada gráfico. Los ajustes realizados a la curva favorecen la linealidad y la repetitividad.

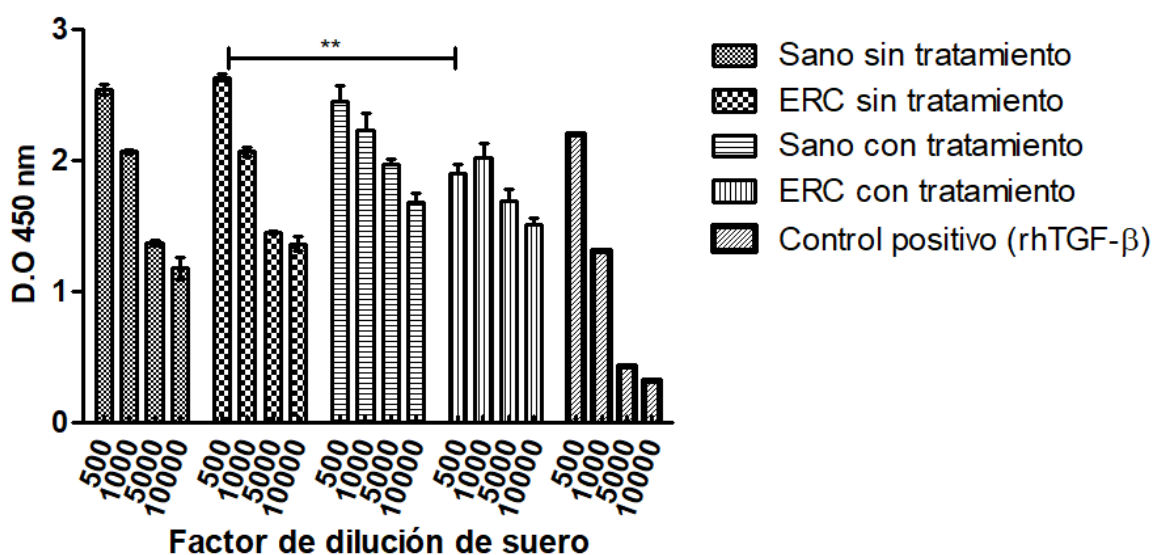
Se corrieron un total de 15 repeticiones en días diferentes, cada curva de calibración tuvo al menos 6 puntos y cada punto se analizó por duplicado. El coeficiente de correlación r^2 es aceptable ya que siempre ronda del 0.9 (máximo de 0.99 y mínimo de 0.89) lo cual habla de buena linealidad.

En esta evaluación se determinó el límite mínimo de detección de citocina que la proteína Trx-vNART1 es capaz de detectar siendo de 4 ng/mL de TGF-β1. Esto corresponde a una cantidad considerable en contraste a cantidades mucho menores con las que trabajan los kits comerciales empleados en la detección de TGF-β que se encuentran en el rango de picogramos. Sin embargo, la proteína Trx-vNART1 es capaz de detectar a la citocina, entonces se procedió a determinar si puede detectar a la citocina TGF-β presente en muestras de suero humano, para ello se evaluaron diversas alternativas de inmunoensayos.

8.15.- Evaluación de sueros humanos inmovilizados en placa para la detección de TGF-β

En vista de estos resultados se decidió evaluar los sueros humanos fijándolo directamente a la placa de ELISA. El fondo del pocillo fue recubierto con suero humano (pool de 6 individuos) sano en dos versiones, 1) suero sano sin tratamiento 2) suero sano activado. También, se incluyó un pool de 6 individuos con ERC en dos versiones: 1) ERC sin tratamiento y 2) ERC activado. Se emplearon diferentes diluciones de las

muestras de suero de ambos grupos, las cuales fueron 500, 1000, 5000 y 10000. En la Gráfica 9, se muestran los resultados. No existen diferencias estadísticas al comparar entre el pool de suero sano vs pool de suero con ERC, aun cuando fueron procesado con ácido/base. En el grupo control positivo se emplearon 500 ng/mL de rhTGF- β inmovilizado directamente en pozo. Las absorbancias obtenidas son similares entre todas las muestras analizadas al comparar las diluciones de los sueros sano vs ERC.



Gráfica 5.- Evaluación de muestras de suero inmovilizado en pozo y reconocido con la proteína Trx-vNART1 como anticuerpo de detección. Suero sano sin tratamiento: corresponde a suero de paciente sano sin procesamiento de muestra; ERC sin tratamiento: corresponde suero de paciente diagnosticado con ERC, este suero no fue procesado; Suero sano activado: corresponde a suero de paciente sano con tratamiento (ácido/base del suero); ERC activado: corresponde a suero de paciente con ERC con tratamiento ácido/base.

Debido a que no se observaron diferencias entre grupo sanos con tratamiento (ácido/base) vs ERC con tratamiento (ácido/base) en ninguna de las diluciones analizadas, se consideró la posibilidad de que los componentes del suero (albúmina, anticuerpos, etc.) podrían causar interferencias en la eficiencia de detección de TGF- β por la proteína Trx-vNART1. Por lo tanto, se decidió modificar el formato de ELISA a un inmunoensayo tipo sándwich, donde se empleará un anticuerpo monoclonal

comercial anti-TGF- β para capturar la citocina y eliminar las posibles interferencias de otros componentes del suero, de esta forma hacer más eficiente el reconocimiento ya sea por el vNART1 o por la proteína Trx-vNART1.

8.16.- ELISA tipo sándwich para el reconocimiento de rhTGF- β con el vNART1 o con la proteína Trx-vNART1

Una vez corroborado que el vNART1 tiene la capacidad de reconocimiento del antígeno, se modificó el formato del inmunoensayo a una ELISA tipo sándwich (ver Figura 9). Empleando como anticuerpo de captura un monoclonal comercial anti-TGF- β (Santa Cruz BioTechnology) debido a que demostró mejores resultados en un análisis preliminar (ver Anexo 1). Fue construída una curva de calibración con el formato de ELISA tipo sándwich. Inicialmente se emplearon las concentraciones de citocina de 500, 1000, 1500 y 2000 pg/mL por pozo, sin embargo como se observa en la Figura 26a, la mayoría de las absorbancias obtenidas se encontraron en el rango de 0 a 500 pg/mL de citocina. Por lo tanto, se repitió la curva pero ampliando el rango de concentraciones de TGF- β a: 10, 80, 160, 240, 390 y 500 pg/mL por pozo.

En la Figura 26b, se muestra el resultado correspondiente cuando se empleó el vNART1 como anticuerpo de detección, empleando esta estrategia no es posible obtener un coeficiente de correlación r^2 aceptable en la curva de calibración generada. Cada curva fue generada en días separados y cada punto de la curva consta de un triplicado.

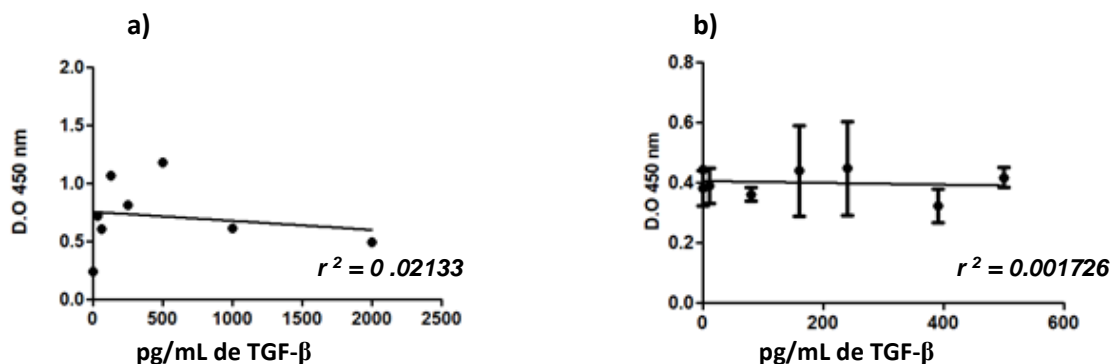
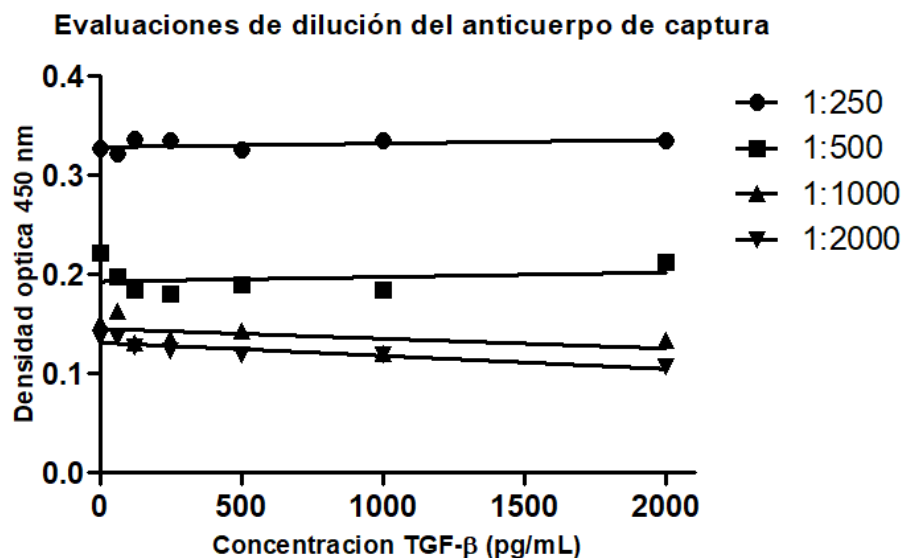


Figura 26.- Curva empleando la ELISA tipo sándwich y el vNART1 como anticuerpo de detección. En a) las concentraciones de TGF- β empleadas fueron 500, 1000, 1500 y 2000 pg/mL. En b) las concentraciones de TGF- β empleadas fueron 0.25, 10, 80, 160, 240, 390 y 500 ng/mL. No hay buena linealidad, ni coeficiente de correlación aceptable.

En el caso de la proteína Trx-vNART1 una vez que había sido comprobada la capacidad de reconocimiento del TGF- β humano, se continuo con la estandarización de las diluciones del anticuerpo monoclonal anti-TGF- β que se emplearía para capturar a la citocina en suero de pacientes. Primero, se determinó la dilución óptima (siguiendo las sugerencias del fabricante (Sino-Biologicals), fijando en pozo como anticuerpo de captura. El resultado se muestra en la Gráfica 7.



Gráfica 6.- Estandarización de concentraciones de anticuerpo monoclonal de captura anti-TGF- β (Sino Biologicals) y como anticuerpo de detección la proteína Trx-vNART1. Es presentada la gráfica donde se muestra la señal obtenida (D.O) contra la concentración de la citocina y las diferentes diluciones de trabajo propuestas por el fabricante.

Seguendo el intervalo de dilución sugerido por el fabricante del anticuerpo monoclonal anti-TGF- β empleado para la captura de citocina, se observó disminución de las absorbancias asociada a la dilución, es decir a menor dilución de monoclonal mayor

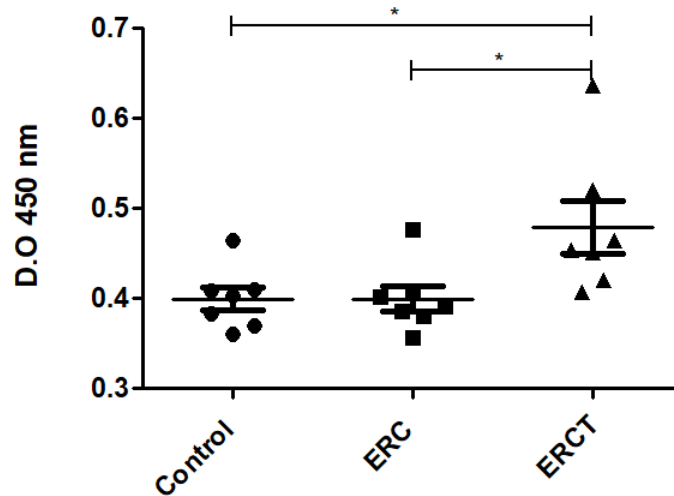
absorbancia y viceversa. Sin embargo, no existe diferencia entre las absorbancias obtenidas en las diferentes concentraciones de citocina que se emplearon, es decir, las absorbancias son similares para la concentración mínima y la máxima de citocina, por lo tanto, no existe linealidad para la curva de concentraciones de citocina capturada empleando el anticuerpo monoclonal de Sino Biologicals. Adicionalmente, las lecturas de absorbancia obtenidas oscilan entre 0.15 y 0.35, aún para la concentración máxima de citocina (2000 pg/mL). Se obtuvo el mismo resultado entre la mínima y máxima dilución de anticuerpo monoclonal.

Con base en estos resultados, se analizaron diferentes controles para definir si: 1) la proteína Trx-vNART1 estaba reconociendo inespecíficamente a la citocina, 2) si el anticuerpo monoclonal (Sino Biologicals) y la proteína Trx-vNART1 competían por el mismo sitio de reconocimiento de la citocina y 3) si existe interacción entre el anticuerpo monoclonal y la proteína Trx-vNART1 independiente de la presencia de citocina (Sino Biologicals). Estos resultados se encuentran resumidos en el Anexo 1 (Tabla IV). Debido a que existe interacción entre el anticuerpo monoclonal de captura y la proteína Trx-vNART1, se descartó este anticuerpo monoclonal como opción para captura en el ELISA sándwich y se optó por analizar otra opción de monoclonal de una casa comercial diferente.

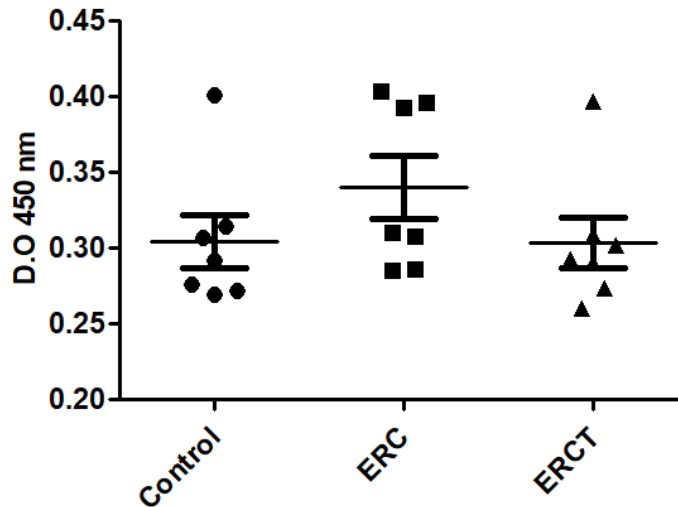
8.17.- Evaluación de sueros de pacientes con ERC en ELISA tipo sándwich empleando el anticuerpo de santa cruz para la detección de TGF- β y el vNART1

Se empleó el anticuerpo monoclonal de la marca Santa Cruz Biotechnology (SC-146 CBT) como nueva opción de anticuerpo de captura. Debido a las interacciones inespecíficas observadas en la proteína Trx-vNART1 y el anticuerpo de captura Sinobiologicals, se probó el dominio vNART1 como anticuerpo de detección en la ELISA. Como control se emplearon sueros sanos (pool de 7 pacientes). También, un pool de 7 pacientes con ERC (enfermedad en fase no terminal, TFG ≥ 15 mL*min/1.73m²) y finalmente, un pool de 7 sueros de pacientes con ERCT (enfermedad en fase terminal, TFG < 15 mL*min/1.73m²). En la Gráfica 7, se observa el resultado donde existe diferencia significativa (*P < 0.05) entre los grupos ERCT y controles sanos. También existe diferencia entre ERC y ERCT. Sin embargo, en el

Gráfico 8, se puede observar el resultado de la repetición en diferente día de la misma ELISA tipo sándwich donde se emplearon los mismos componentes, diseño y sueros y no hay repetibilidad entre ambos ensayos.



Grafica 7.- ELISA sándwich para detectar TGF- β en muestras de sueros de pacientes, empleando el vNART1 como anticuerpo de detección y el monoclonal de Santa Cruz Biotechnology como anticuerpo de captura. Existe diferencia significativa entre el grupo ERC2 y el grupo control de suero sano (ANOVA $P < 0.05$)



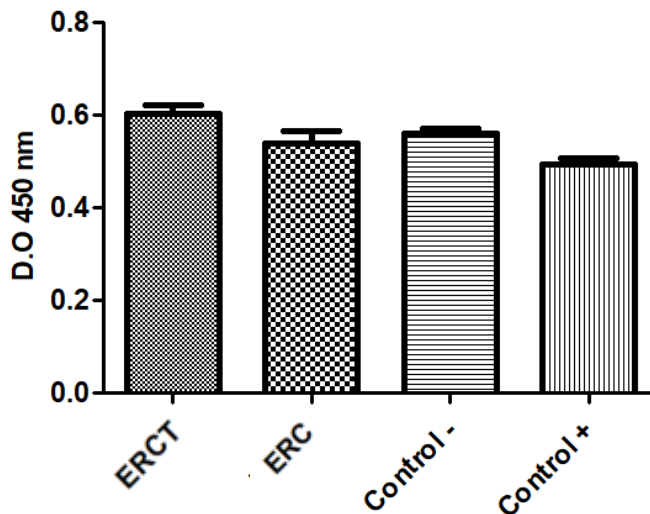
Gráfica 8.- Repetición de la ELISA tipo sándwich para detectar TGF- β en muestras de sueros de pacientes, empleando el vNART1 como anticuerpo de detección y el monoclonal de Santa Cruz Biotechnology como anticuerpo de captura. No existe diferencia significativa entre grupos.

Aun cuando no se repite el resultado entre ambas ELISAs, es posible sugerir que emplear el dominio vNART1 en la determinación de TGF- β empleando el anticuerpo Antibody SCBT - Santa Cruz Biotechnology. Sin embargo, es necesario continuar con las evaluaciones a fin de corroborar la reproducibilidad y repetibilidad del diseño de ELISA tipo sándwich, para tener resultados concluyentes en cuanto a la detección de TGF- β presente en las muestras de suero de pacientes evaluados.

Entonces, se realizó un ELISA tipo sándwich empleando el mismo anticuerpo monoclonal comercial de captura, los mismos grupo de muestras Control sano, ERCT y ERC, pero sustituyendo el dominio vNART1 por la proteína Trx-vNART1. Las condiciones de cantidades, lavados e incubaciones fueron las mismas en ambas ELISAs. En la Gráfica 9, se muestran los resultados obtenidos cuando se emplea la proteína Trx-vNART1 como molécula de detección primaria. Donde no fue posible diferenciar de forma confiable entre los grupos de muestras, pues no existe diferencia significativa entre ninguno de los grupos.

Por lo tanto, son necesarios más experimentos que permitan mejorar la expresión del dominio vNART1 y demostrar su aplicabilidad en el formato de ELISA tipo sándwich, pues los resultados anteriores sugieren que tiene más potencial de funcionar en la detección de enfermedad renal. En el caso de la proteína Trx-vNART1, se demostró

un incremento sustancial en la expresión, purificación y replegado de la proteína, sin embargo, cuando se incluye en la ELISA tipo sándwich existe interacción inespecífica con los anticuerpos monoclonales empleados para la captura de la citocina presente en el suero de pacientes con ERC en etapa temprana o terminal.



Gráfica 9.- Evaluaciones de reconocimiento de diferentes grupos de muestras de suero empleando la proteína Trx-vNART1 como anticuerpo primario de detección. Enfermedad renal crónica terminal (ERCT), Enfermedad renal crónica (ERC), Control negativo que corresponde a suero de paciente sano sin afección renal, Control positivo adicionado con 100 ng de TGF- β recombinante. No hay diferencia significativa entre los grupos evaluados en la prueba ANOVA.

8.18.-Resultados de la evaluación con kit comercial.

A continuación, fue realizado el ensayo de ELISA para la determinación cuantitativa de TGF- β en muestras de suero de pacientes con ERC y ERCT, para ello fue seguido el protocolo que indica el fabricante del kit comercial R&D systems Duo Set (DY240-05). Los ensayos fueron realizados en dos días diferentes siguiendo condiciones idénticas, los resultados muestran que siguiendo el protocolo establecido no se obtiene un buen coeficiente de correlación (r^2). Por otra parte, fueron analizados tres diferentes grupos de muestras de suero humano: el grupo control que corresponde a pacientes sanos sin daño renal, un grupo de pacientes con ERC y un grupo con

compromiso renal en la fase terminal (ERCT). Los resultados de esta determinación nos muestran la presencia de tendencias en donde el grupo control genera una mayor respuesta al ser comparados con los grupos de interés analizados. Sin embargo, estas tendencias no fueron estadísticamente significativas. Por lo tanto, es necesario repetir estos experimentos de cuantificación de la citocina con muestras de pacientes más recientes y realizar esta determinación antes de iniciar los análisis de ELISA sándwich con el dominio vNART1 o la proteína Trx-vNART1.

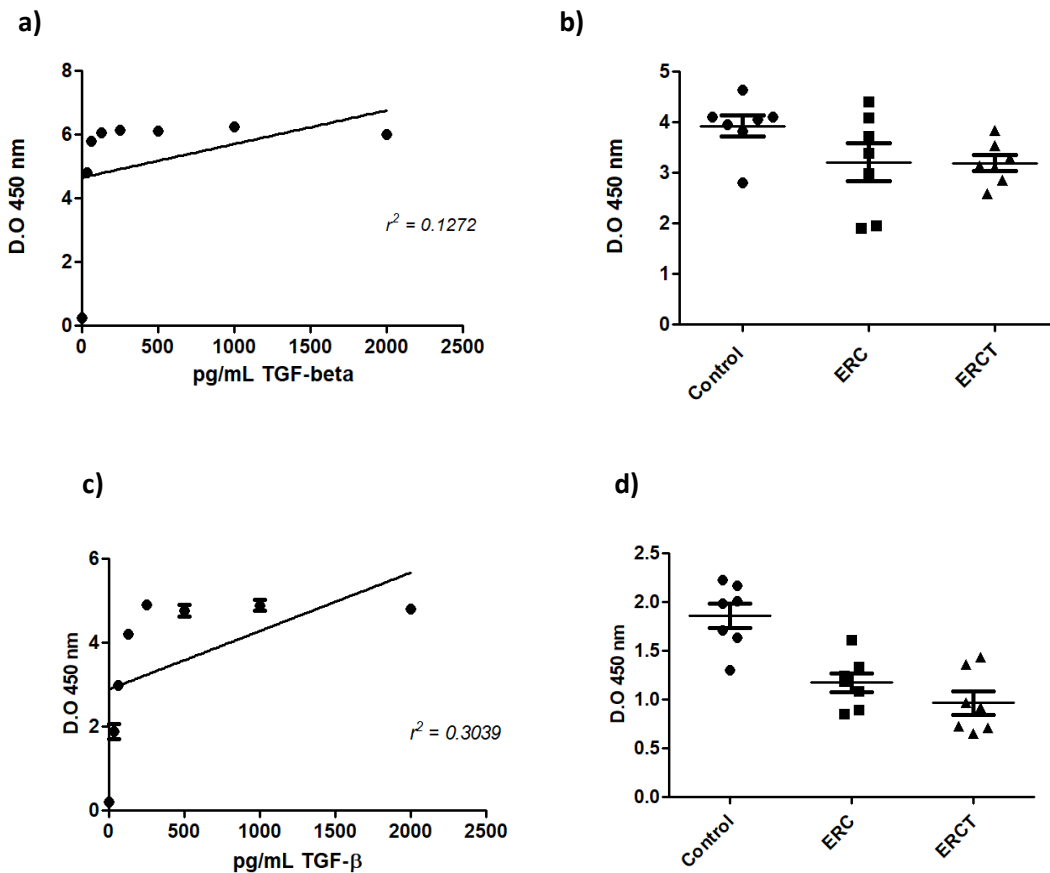


Figura 27.- Gráficas de la determinación de TGF-β en muestras de suero humano mediante el kit comercial R&D Systems, a y c) curvas de calibración construidas con los estándares y condiciones indicadas por el fabricante, no se encuentra en ninguna de las curvas un buen coeficiente de correlación, no fue posible aplicar el modelo de regresión lineal para la cuantificación de citocina b y d) evaluaciones por grupo de pacientes (control sano, ERC y ERCT), ambas determinaciones son realizadas en días diferentes, a pesar que se observan tendencias no hay presencia de diferencias estadísticas.

9.-DISCUSIONES

En años recientes se ha prestado particular interés a los vNAR recombinantes, debido a su potencial y características únicas que pueden impactar tanto en el área terapéutica y diagnóstica. Así mismo, debido a su tamaño reducido en comparación de los IgG es factible obtenerlos en sistemas de expresión heteróloga como *E. coli*. Esto ha enfocado la investigación al análisis y comparación de los sistemas de expresión recombinante y la optimización de las condiciones de expresión adecuadas para obtenerlos como proteínas recombinantes en cantidades óptimas y totalmente funcionales.^{116,124} Es justamente que se hace presente el potencial que tienen estas moléculas inmunes para ser empleadas en pruebas de fase clínica, tal como lo es el vNAR identificado y capaz de reconocer el factor de necrosis tumoral humano (TNF- α) empleado en casos de choque endotóxico¹²⁵ o el vNAR anti TNF- α empleado como tratamiento de poliartritis.¹²⁶

Como antecedente previo a este trabajo, se obtuvo del tiburón *Heterodontus francisci* el vNART1 anti TGF- β en 2013.⁹⁹ Además, se purificó y evaluó su capacidad neutralizante y efecto citotóxico, empleando la levadura *Pichia pastoris* como sistema de expresión sin embargo, los resultados de rendimiento no resultaron ser óptimos, a pesar de haber empleado un sistema de expresión eucarionte, mismo que es filogenéticamente más complejo en comparación de *E. coli* y que por lo consiguiente era de esperarse una producción eficiente del vNART1.²¹

Es en este contexto que se procedió a obtener el vNART1 en el vector de expresión pET28a+, este vector se caracteriza por brindar alto nivel de expresión de las proteínas de interés¹²⁷. Sin embargo, los resultados nos muestran que el nivel de expresión de dicha proteína aun podía ser mejorado, es por este motivo que fue empleado otro vector del grupo de los plásmidos pET, el vector pET-32a+. Este vector está diseñado para la expresión de proteína recombinante, además que posee un promotor T7 (al igual que pET28a+) que confiere la ventaja de poder obtener proteína recombinante de una manera más eficiente¹²⁸ que puede ser empleada en variedad de procesos¹²⁹. Adicionalmente, como característica relevante es que esta proteína puede transportarse hacia el espacio periplásmico y llevarse a cabo el replegamiento

proteico, además de que posee una secuencia que expresa la proteína acopladas con una etiqueta de histidina¹³⁰

A pesar de estar bien caracterizadas las potenciales desventajas que ofrecen los sistemas de expresión procarionte como *E. coli* en la obtención de proteínas de origen eucarionte, se optó por considerar uso de péptidos señal y proteínas chaperonas de co-expresión como la tiorredoxina como estrategias para mejorar la expresión en cantidad óptima y mejorar la solubilidad de las proteínas mediante la formación de los enlaces disulfuro adecuados con el consecuente replegado a su conformación nativa de vNART1, tal como ha sido realizado en trabajos similares,¹¹⁶ donde a través de técnicas de ingeniería genética se trató de obtener un vNAR capaz de detectar una región rica en histidinas en *Plasmodium falciparum* (PFHRP2-H8VNAR) replegado y con actividad biológica. Los resultados obtenidos en esta tesis, apuntan a que las proteínas obtenidas (vNART1 y Trx-vNART1) son preferentemente expresadas y agregadas en estructuras denominadas cuerpos de inclusión que depositan en el citosol, lo que concuerda con los resultados obtenidos por *Leow y cols.*,¹¹⁶ donde la proteína producida esperaba ser preferentemente expresada en su forma nativa en la fracción soluble, sin embargo, esta se agregó en cuerpos de inclusión independientemente de la presencia o ausencia de proteínas chaperonas como la tiorredoxina. La formación de cuerpos de inclusión ocasiona que se empleen metodologías donde se obtenga la proteína replegada y funcional, agregando pasos a los protocolos de laboratorio.^{116,117,124}

Ha sido bien documentado que *E. coli* es un buen sistema de expresión^{110,131} sin embargo no precisamente para generar grandes cantidades de proteína y tampoco para producir proteínas recombinante de origen eucarionte. Los resultados de esta tesis muestran que son grandes las cantidades de las proteínas expresadas vNART1 y Trx-vNART1, lo que induce a la bacteria a formar agregados proteicos o cuerpos de inclusión, confirmando lo reportado en la literatura.¹¹⁰ Es importante mencionar el efecto esperado ante la presencia de tiorredoxina como proteína chaperona que tiene como función favorecer la obtención de vNART1 plegado de forma correcta¹¹⁶, sin embargo, en las dos metodologías empleadas para extraer y purificar la proteína Trx-

vNART1, cuando la tiorredoxina está presente, la obtención de proteína incrementa su cantidad en comparación con la proteína vNART1 expresada en el plásmido pET28a+ es 55 veces. En ambos casos, las proteínas expresadas vNART1 y Trx-vNART1 están presentes en los agregados de los cuerpos de inclusión. Esto sugiere que, aunque el vNART1 sea co-expresado con Trx como una proteína completa de 30 kDa su presencia favorece su expresión en grandes cantidades, por lo tanto, aunque se deban agregar pasos de purificación y replegamiento de la proteína Trx-vNART1 el rendimiento final es considerablemente mayor.

Existen diferentes protocolos para purificación y de replegado de los vNAR o moléculas similares como los VHH.¹²⁴ Es importante mencionar que en este trabajo fue realizado el proceso de purificación y replegado de Trx-vNART1 mediante dos metodologías, en una, la purificación en columna empleó un gradiente de urea como agente caotrópico que permitió la extracción de los cuerpos de inclusión empleando una concentración de 8M, seguido del proceso de replegamiento con 2-mercaptoetanol. A pesar de este escenario, no se evaluó la eficiencia de replegado para el vNART1 anti TGF- β , sin embargo, con esta metodología los resultados de rendimiento final son de igual modo considerablemente menores (50 veces menos).

Algunas metodologías que valdría la pena evaluar para la calidad del replegado son: las de *Maggi y Scotti*¹¹⁷, *Pérez-Padilla*¹²⁴, *Reza-Escobar*¹³², *Leow*,¹¹⁶ *Camacho-Villegas*,⁹² pero es necesario evaluaciones posteriores para determinar la mejor opción de purificación y replegado, por ejemplo la fluorescencia y espectroscopia de dicróismo circular entre otras, que nos permitan determinar la estructura terciaria y secundaria del vNAR respectivamente con el consecuente establecimiento de la mejor alternativa en cuanto a calidad de replegamiento.¹³³

Los resultados en cuanto al rendimiento final obtenido de las construcciones contenidas en los vectores pET28a+ o pET32a+ permiten comparar niveles de expresión del vNART1 recombinante, encontrando un rendimiento de 2.65 mg/L y 145.97 mg/L de proteína recombinante replegada, tal como lo demuestran trabajos similares.¹³⁴

La metodología empleada en la purificación tanto de vNART1 y Trx-vNART1 ofrece mejores resultados en cuanto a cantidad de proteína recombinante obtenida, así como en el consumo de reactivos, en comparación con el método de gradiente descendente de urea. Esto puede impactar en los costos de producción en un escalamiento debido a menor cantidad de reactivos y pasos empleados. Sin embargo, se debe realizar un análisis de costos que permita asegurar esta hipótesis.

Existen métodos que han demostrado ser más eficientes en la obtención de proteínas recombinantes con una eficiencia alta en donde es posible obtener inclusive hasta 7 veces más cantidad de proteína en comparación de la que podría obtenerse replegada y biológicamente activa proveniente del espacio periplásmico.¹¹⁷ Esto nos lleva a pensar en perspectiva que a través de un análisis exhaustivo de los costos de obtención de vNAR tanto de origen periplásmico como el proveniente de los cuerpos de inclusión con su posterior replegamiento es técnicamente viable obtener proteína en forma de agregados para posteriormente replegarla¹³⁵ en comparación de obtener proteína plegada pero en cantidades mínimas.

La capacidad de reconocimiento de Trx-vNART1 se comprobó, con el TGF- β en sus tres isoformas mediante una prueba de prueba de ELISA de las cuales reconocida principalmente la isoforma 1 (TGF- β 1).

Las diferencias en cuanto al reconocimiento entre las 3 isoformas y que preferente sobre la 1 puede explicarse debido a que la homología entre la isoforma 1 y 2 es de un 70% y la homología entre la isoforma 2 y 3 es de un 79⁸, concordando con los datos que muestran que la isoforma 1 es preferentemente reconocida , seguido de la segunda y finalmente la isoforma 3. Interesantemente, este hecho tiene una relevancia clínica en cuanto a la determinación de dicha citocina ya que la isoforma 1 es la que es principalmente secretada en procesos fibróticos.¹³⁶

El Trx-vNART1 en las pruebas preliminares mostró que ofrece reproducibilidad y linealidad al evaluar el reconocimiento, cabe mencionar que este evento se dio al ser fijado directamente en placa una cantidad establecida de citocina, lo cual nos permitió conocer cuál es la cantidad de citocina que requiere estar fijada en un sistema de anticuerpos de captura y para ser eficientemente reconocida por los vNAR. A pesar de

no lograrse el objetivo de poder hacer funcional la prueba ELISA en el formato establecido. Esto da la pauta para que más adelante, con estos datos preliminares, la prueba de ELISA empleando vNAR como anticuerpo de detección sea totalmente funcional empleando un formato de sándwich.

Como se menciona anteriormente, lo inconvenientes presentados en la realización de las pruebas es muy importante mencionar los componentes que juegan un papel clave, tal es el caso del anticuerpo de captura empleado, en este caso el anticuerpo de captura empleado (Sino-Biologicals®) es altamente interferente debido a que al aumentar su concentración en la placa, es evidente el aumento de la señal emitida en las prueba de detección con el vNAR, esto puede ser un factor por el cual en los resultados se obtenían falsos positivo. (Ver gráfica 6)

Esto puede ser causado por un efecto descrito por *Boscato y cols, 1986*¹³⁷ en el que una sustancia dentro de nuestro sistema de análisis está actuando como una sustancia de unión al anticuerpo, es decir que el anticuerpo de captura tiene regiones que son reconocidas por el anticuerpo de detección (vNART1) produciendo un resultado falso positivo en las evaluaciones realizadas, este efecto ha sido descrito como uno de los problemas comunes en inmunoensayos donde intervienen la interacción ligando-anticuerpo de captura, lo mismo sucede en la interacción anticuerpo de detección-ligando.

Cuando se emplea el vNART1 en la detección de suero inmovilizado en pozo, es posible que existan interferencias ocasionadas por proteínas del suero o de componentes asociados al almacenamiento del suero (anticoagulante, etc.), que dificultan la obtención de resultados confiables. Los resultados obtenidos con el vNART1 mostraron alta respuesta inclusive en los controles negativos, esto nos habla de que emplear al vNART1 detectando antígenos de suero directamente fijados en la placa ofrece inespecificidad.¹³⁸ Esto llevó a utilizar un formato de ELISA en sándwich como mejor alternativa para emplear el vNART1 como anticuerpo de detección.

Es por lo que fue necesario evaluar opciones diferentes de anticuerpos de captura que nos permitieran este propósito. Quedó evidenciado con el uso de un anticuerpo anti TGF- β diferente (Santacruz Biotechnology), en resultados preliminares no ofrece una

señal de fondo sugiriendo que no existe interferencia entre este anticuerpo de captura y el vNART1, este anticuerpo redujo la presencia de falsos positivos.

Una vez estandarizada la cantidad de anticuerpo de captura y que el vNART1 sea capaz de reconocer al TGF- β capturado, será posible proseguir con una validación completa.

Es probable que emplear muestras de diferente índole como muestras de orina se permita obtener mejores señales y diferenciaciones debido a que la orina posee menos componentes proteicos a diferencia del suero.^{76,77,139}

Es necesario evaluar el efecto de múltiples factores que tiene potencial efecto interferente, tal como el pH, temperatura o tiempos de incubación, estos factores pueden afectar directamente sobre la especificidad de unión en pruebas ELISA cuando es empleado muestras de suero humano.¹⁴⁰

10.-CONCLUSIONES

Se realizaron dos clonaciones en los plásmidos pET28a+ y pET32a+ que fueron empleados para la expresión recombinante del dominio vNART1 anti-TGF- β y la proteína Trx-vNART1 usando *E. coli* cepa BL21(DE3) como sistema de expresión heteróloga.

El dominio vNART1 recombinante se expresa y mantiene en cuerpos de inclusión dentro de *E. coli*, aun cuando se empleó la proteína chaperona Trx. Se describen dos principales ventajas de usar la chaperona tioredoxina en la producción de proteínas recombinantes, por ejemplo, que incrementa la cantidad de proteína soluble expresada al favorecer la formación de enlaces disulfuro y que incrementa la cantidad de proteína total expresada. Sin embargo, pero en el caso del dominio vNART1 la fusión con la chaperona Trx solo incrementó la cantidad de vNART1 total.

Así mismo la evaluación de los dos protocolos diferentes para la purificación y replegado de Trx-vNART1 muestra una evidente diferencia en cuanto a la cantidad de proteína extraída y replegada, siendo la metodología de purificación bajo u gradiente de urea aquella con la que se obtienen menores cantidades de Trx-vNART1.

Se evaluó la capacidad de reconocimiento de las proteínas recombinantes vNART1 y Trx-vNART1 contra la citocina recombinante humana, se determinó su linealidad estableciendo el límite mínimo de detección en 10 ng de TGF- β en la prueba de ELISA indirecta.

Se diseñó un inmunoensayo de ELISA tipo sándwich empleando las proteínas recombinantes vNART1 y Trx-vNART1 para la detección de TGF- β en suero de pacientes y el anticuerpo IgG comercial anti-TGF- β de la marca Sino Biologicals, los resultados muestran que ambos anticuerpos (vNART1 e IgG comercial) probablemente compiten por el sitio de unión a la citocina haciendo difícil la detección. Además, las interferencias debido a que presumiblemente por naturaleza de los componentes de dicho formato no permitieron la validación completa.

En contraste, con la combinación del anticuerpo anti TGF- β de Santacruz Biotechnnology como anticuerpo de captura y el vNART1 como anticuerpo secundario

donde preliminarmente se logra eliminar el ruido de fondo como sucede al emplear el anticuerpo SinoBiologicals.

Así mismo, las fueron evaluados sueros humanos las evaluaciones preliminares de sueros empleando el formato de ELISA sándwich indican que es posible determinarse en este formato, sin embargo, aún es necesario realizar más evaluaciones para tener resultados definitivos


11.-PERSPECTIVAS

- Evaluar diferentes opciones de anticuerpos de captura y estandarizar las cantidades para ser usados en la prueba de ELISA para la detección de TGF- β empleando el vNART1 como anticuerpo secundario.
- Estandarizar las condiciones como tiempos de incubación, temperatura y tiempo de la ELISA de detección de TGF- β .
- Validar la técnica de ELISA de detección de TGF- β empleando muestra de suero y orina humana de pacientes con compromiso renal
- Evaluar las ventajas y desventajas en cuanto a costo de obtención de vNART1 siguiendo diferentes metodologías de purificación.

12.- ANEXOS

Anexo 1.- Evaluación de especificidad entre los componentes de la ELISA tipo sándwich

Para evaluar la especificidad de los componentes de la prueba ELISA sándwich, según el formato descrito en la imagen 9 se empleó el anticuerpo monoclonal de captura de la marca Sino Biologicals. Según el fabricante este monoclonal está descrito con capacidad de reconocimiento de la citocina TGF- β . El ensayo se realizó como se indica en la Tabla IV. Se empleó la rhTGF- β para este ensayo. Todos los pozos se realizaron por duplicado/triplicado. En el recuadro en rojo se resalta el resultado obtenido cuando se emplea el monoclonal, la citocina, la proteína Trx-vNART1 y el anti-His-HRP para el revelado; en este caso la absorbancia después de restar el control negativo de la placa es de 7.473. En el recuadro azul se resalta el resultado obtenido cuando se emplea el monoclonal, la proteína Trx-vNART1 y anti-His-HRP, en estos pozos no se agregó citocina, sin embargo, la absorbancia obtenida después de restar el control negativo de placa fue de 6.120. Este resultado sugiere que existe interacción entre el anticuerpo monoclonal anti-TGF- β con la proteína Trx-vNART1. Por lo tanto, se descartó este anticuerpo monoclonal como opción de captura para el ELISA sándwich y se optó por analizar otra opción de una casa comercial diferente.



ID	Pocillo			Resultado esperado	Datos crudos	Ajustando el negativo
	IgG anti TGF beta	TGF beta rh	vNAR			
A1	+	+	+	+	8.553	7.473
B1	+	+	-	-	0.460	-0.073
C1	+	-	-	-	0.550	0.017
D1	+	-	+	-	6.120	5.523
E1	-	+	-	-	0.437	-0.097
F1	-	-	-	-	0.537	0.000
G1	-	-	+	-	5.613	4.767
H1	-	+	+	-	8.047	7.143

Tabla IV.- Evaluación de interacción entre los componentes de la ELISA sándwich, donde se empleó el monoclonal antiTGF- β (Sino Biological) como anticuerpo de captura y la proteína Trx-vNART1. La dilución del monoclonal fue 1: 250. a) fotografía representativa de los pozos analizados.

PRODUCCION RECOMBINANTE DE UNA PROTEINA CONFORMADA POR TIORREDOXINA Y EL DOMINIO vNART1 CON RECONOCIMIENTO ESPECIFICO A rhTGF-β1

QFB Marco Jesus Ku Centurión¹, Dra. Tanya Amanda Camacho Villegas*²,
Dra. Raquel Echavarría Zepeda.³

Resumen— Los vNARs son moléculas inmunes análogas a los anticuerpos IgG, pero que ofrecen ventajas significativas. El objetivo fue producir un vNAR quimérico y específico a TGF-β. El fragmento *Trx-vNART1* codificado para la proteína tiorredoxina fusionada al vNART1. La clonación se realizó en el plásmido pET32a+. Esta construcción de proteína recombinante se denominó *Trx-T1*. Se estandarizaron las condiciones fisicoquímicas y de cultivo para obtener *Trx-T1* en *E. coli* BL21 y C3030 con la inducción con IPTG (1 mM) y posteriormente se evaluó la expresión. Fue determinada la temperatura (30°C), tiempo de inducción (5 h) y medio de cultivo ideal (2XYT) para producir la proteína *Trx-T1*. Adicionalmente, se determinaron las condiciones de extracción, purificación y replegamiento a partir de cuerpos de inclusión. Finalmente, se evaluó el reconocimiento con TGF-β recombinante humano, demostrándose que vNART1 presente en *Trx-T1* mantiene dicha capacidad. En conclusión, la fusión del vNART1 con tiorredoxina no afecta su especificidad y puede tener aplicaciones en el área de diagnóstico.

Palabras clave— Citocina, TGF-β, pET32a+, vNAR, cuerpos de inclusión.

Introducción

Existen citocinas que causan daño y comprometen la funcionalidad adecuada de varios órganos o sistemas cuando son secretadas en niveles fisiológicamente anormales. La neutralización de las citocinas con un enfoque terapéutico o diagnóstico generalmente implica el uso de anticuerpos monoclonales tipo IgG (150 kDa). Sin embargo, debido a su tamaño y características, se han realizado esfuerzos para encontrar nuevas moléculas inmunológicas que ofrezcan mejores ventajas que la IgG; dentro de las nuevas alternativas se encuentran los dominios vNAR presentes en organismos como tiburones o rayas (12-15 kDa) o los dominios VHH que son aislados de camélidos (12-15 kDa). Estos dominios variables de cadena pesada ofrecen ventajas tales como alta resistencia a la osmolaridad, altas temperaturas y alta humedad¹ sin perder el reconocimiento de las citocinas.

Descripción del Método

Transformación de E. coli BL21 y C3030.

A 50 µL de *E. coli* BL21 y C3030 electrocompetentes, se les agregó 1 µL de plásmido pET32a+/Trx-T1 y se electroporó a 1.7 kV, 200 Ω y 23 µF y 2.5 milisegundos a 1 mL de medio SOC a 4 ° C, los contenidos celulares se homogeneizaron y se colocaron en 3 mL de medio SOC, se inocularon y se agitaron a 250 rpm y 37 ° C durante una hora. Se añadieron 3 mL de LB 100 µg/mL y se agitó 250 rpm a 37 ° C durante 12-16 h. Se determinó la densidad óptica (OD) del cultivo obtenido después de 12-16 horas, una proporción de inóculo 1/100 se adicionó en medio LB, TB y 2XYT ampicilina a 100 µg/mL, incubación 30 ° y 37 ° C a 250 rpm. Se obtuvo la lectura de D.O. a 600 nm hasta alcanzar 0.6. Inmediatamente se añadió isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Mid Sci) a concentración final de 1 mM. El cultivo se mantuvo en crecimiento durante 5 horas en agitación constante, fue tomada la lectura de D.O.600nm cada hora. El cultivo se centrifugó a 8000 rpm a 4°C.

Extracción de proteína soluble Trx-T1 (condiciones nativas).

¹ Marco Jesus Ku Centurión es estudiante de Maestría en ciencias en innovación biotecnológica en la opción terminal Médica Farmacéutica del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Guadalajara Jalisco, México. maku_al@ciatej.edu.mx

^{*2} La Dra. Tanya Amanda Camacho Villegas es cátedra CONACYT adscrita a la Unidad de Biotecnología Médica Farmacéutica del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Guadalajara Jalisco, México. tcamacho@ciatej.mx (autor corresponsal).

³ La Dra. Raquel Echavarría Zepeda es cátedra CONACYT adscrita al Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO) del Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara Jalisco, México. rechavarría@conacyt.mx

El paquete de células se resuspendió en tampón de lisis y se sonicó con un equipo ultrasonico Misonix L200. El lisado se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, las fracciones se evaluaron a través la electroforesis SDS PAGE.

Extracción de proteína no soluble Trx-T1 (condiciones desnaturalizantes).

El sedimento celular lisado se resuspendió en una solución de tampón NaH_2PO_4 100 mM, Tris-HCl 10 mM y urea 8 M, pH 8, a un volumen de 5 mL por gramo. El lisado celular se mantuvo bajo agitación durante 1 hora a 250 rpm a 25°C, e inmediatamente se centrifugó durante 25 minutos a 10000 rpm a 25 °C. Se recogió la proteína Trx-T1 presente en el sobrenadante y se evaluó mediante SDS-PAGE.

Purificación con columna Ni-NTA.

Se añadió 1 mL de resina His-Pur Ni-NTA en una columna para la purificación, se esperó a que se sedimentara y se acondicionó usando 5 volúmenes de columna con tampón NaH_2PO_4 100 mM, Tris-HCl 10 mM, urea 8M a pH 8. Se recogió la fracción no retenida (NR). Se realizaron 2 eluciones con 4 mL de tampón de elución (NaH_2PO_4 100 mM, Tris-HCl 10 mM, urea 8M) a pH 6,3 (L1 y L2). Se recogieron cuatro fracciones (D1, D2, D3 y D4) de 500 μL utilizando tampón de elución a pH 5.9. Después, se recogieron 4 fracciones (E1, E2, E3 y E4) usando elución de tampón a pH 4,5. Finalmente, se realizó una elución de 5 mL con agua destilada. Todas las fracciones fueron evaluadas por SDS PAGE.

Replegamiento de la proteína Trx-T1.

La columna se equilibró con solución tampón de NaH_2PO_4 100 mM, base Tris 10 mM y urea 8M pH8. La muestra de proteína se llevó inmediatamente a un pH de 8 y se añadieron 5 mL de tampón NaH_2PO_4 100 mM, base Tris 10 mM con urea (8M-0M). Todas las fracciones se recogieron y analizaron mediante SDS-PAGE. Al mismo tiempo, se añadió tampón de replegamiento (base Tris 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM, β -2-mercaptoetanol 1 mM, pH 8) con volúmenes: 0 a 2 mL a cada punto de concentración de urea. Se realizó un lavado con 10 mL de solución de NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM y imidazol 20 mM, 50 mM y 250 mM a pH 8. Cada fracción se analizó por SDS-PAGE.

Concentración y cuantificación de la proteína Trx-T1.

Las fracciones donde se eluyó la proteína se concentraron empleando tubos concentradores de poro 3k (Amicon Milipore), el imidazol se eliminó a través de un gradiente de 250 mM - 10 mM en una solución de NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM. El concentrado de proteínas obtenido fue cuantificado mediante micro BCA (Biovisión) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se almacenó a -20 °C.

Prueba de inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA).

Cada pocillo se sensibilizó con 100 ng de rhTGF- β 1- β 3 y con sus respectivos controles en un volumen de 50 μL . Se incubaron 12-16 horas a 4 °C, la placa se bloqueó usando 100 μL de BSA al 3% en 1X PBS y se incubó durante 2 horas a 37 °C. Se realizaron 5 lavados con 300 μL con Tween 20 al 0.05% en PBS 1X en cada pocillo con intervalos de agitación de 30 segundos. Después de esto, se añadió a cada pocillo una cantidad de 4000 ng de Trx-T1 en un volumen de 50 μL , la placa se incubó a 37 °C durante 1 hora. El contenido se descartó y se realizaron una serie de 5 lavados. 50 μL de anticuerpo anti-histidina conjugado con peroxidasa en dilución 1:1000 con Tween 20 al 1% y BSA al 0.05% en PBS 1X. La placa se incubó durante 2 horas a 37 °C sin luz. Se descartó el contenido de los pozos y se realizó una serie de 5 lavados. Se agregaron 50 μL del sustrato para revelar la reacción, usando 1-StepUltra TMB-ELISA (BioRad) como sustrato según lo indicado por el fabricante. La densidad óptica se determinó en un espectrofotómetro a 450 nm.

Resultados

Transformación de E. coli con el plásmido pET32a.

Partiendo del plásmido pET32a+/Trx-T1 que contiene el fragmento de ADN que codifica la proteína Trx-T1, se transformaron dos cepas de la bacteria *E. coli*. Se utilizaron oligonucleótidos específicos diseñados en nuestro

laboratorio y que son específicos para el dominio vNART1 (Figura 1a). Posteriormente, se realizó una evaluación en electroforesis de agarosa. Se observó el amplificado correspondiente a la banda de interés (400 pb). (figura 1b).



Fig. 1. a) Representación de la secuencia *Trx-T1*. b) PCR de colonia para verificar la presencia del fragmento (400 pb) correspondiente a vNART1. Se utilizó la escalera de ADN de 1 kb para la electroforesis de ADN (PROMEGA).

Condiciones de inducción en las cepas BL21 y C3030 para producir Trx-T1.

Se observó que ambas cepas pueden cultivarse en las condiciones estándar. Sin embargo, la cepa C3030 requirió 6 h para alcanzar la DO_{600nm} de 0.4 - 0.6, este rango indica que el cultivo está en la fase logarítmica (Tabla 1). Por lo tanto, la cepa BL21 crece casi 2,5 veces más rápido que C3030, por esta razón se decidió continuar los experimentos solo con la cepa BL21. Se emplearon dos medios de cultivo (2XYT y TB) para verificar el impacto en la biomasa expresada en DO y, en consecuencia, en la proteína Trx-T1 total que se puede obtener. La Tabla 2 muestra la DO_{600nm} máxima obtenida después de 5 h de aplicación del inductor IPTG a una temperatura de incubación de 30°C.

Condiciones óptimas para el crecimiento de las cepas E. coli.

Fue evaluado el medio de cultivo LB usando las cepas *BL21* y *C3030* de *E. coli*. (Tabla 1)

Tabla 1. Tiempo óptimo de cultivo para realizar la inducción de cultivos de bacterias transformadas con pET32a+/TrxT-1

Temperatura	Transformed <i>E. coli</i> strain	Induction (h)
37°C	BL21	2.5
37°C	C3030	6

Tabla 2. Condiciones físicas para inducir la cepa BL21 transformada con el vector pET32a+-TrxT-1

Medio de cultivo	Cepa transformada de <i>E. coli</i>	D.O.
2XYT	BL21	1.976
TB	BL21	1.784

Evaluación de la expresión de la proteína Trx-T1.

Todas las muestras se procesaron en condiciones nativas y en condiciones desnaturalizantes. Como se observa en la Figura 2, hay presencia de la proteína *Trx-T1* en el medio 2XYT, pero principalmente en la fracción insoluble. En comparación, la proteína insoluble extraída es menor en el cultivo crecido en medio TB. Por lo tanto, se decidió continuar trabajando solo con la proteína insoluble extraída de los cultivos en medio 2XYT con 5h de

inducción a 30 °C. Como control, fue usada la cepa BL21 sin transformar, esto, con la finalidad de conocer la producción basal de proteína en la cepa demostrando la ausencia de la banda de 30 kDa correspondiente a la proteína *Trx-T1*. La proteína extraída está presente en el cultivo realizado en medio TB, sin embargo, la cantidad obtenida del medio 2XYT es mayor.

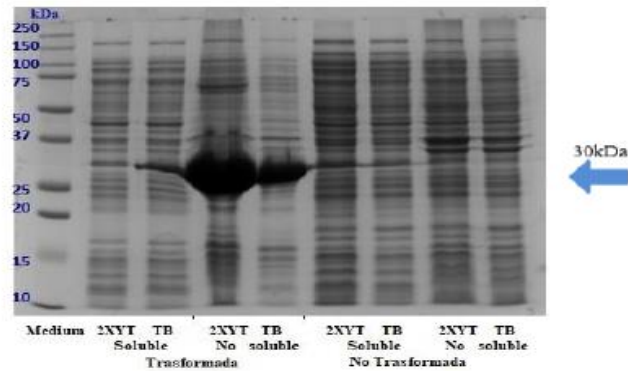


Fig. 2. Evaluación del crecimiento en diferentes medios de cultivo. Se evaluó la expresión de *Trx-T1* en medios de cultivo 2XYT y TB, fracciones solubles y no solubles a 30 ° C. Se observa la alta expresión de *Trx-T1* (30 kDa) en la fracción no soluble utilizando medio 2XYT.

Purificación de proteínas en condiciones desnaturalizantes.

La fracción no soluble de la proteína expresada y extraída de los cuerpos de inclusión fue purificada. La purificación del fragmento *Trx-T1* expresado en *E. coli BL21* a través de condiciones desnaturalizantes con urea 8 M bajo un gradiente de pH (pH 8 a 4.5) en una columna de níquel NTA, se observó la presencia de proteína en la elución con tampón E con pH 4.5 como se puede observar en la Figura 3.

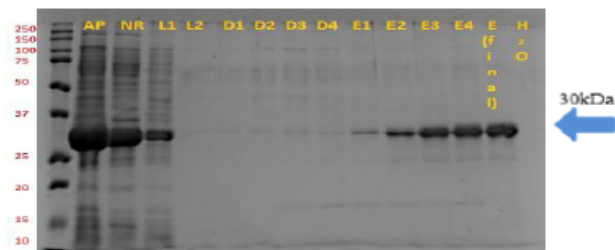


Fig. 4. Purificación de *Trx-T1* anti TGF- β . La proteína se retuvo en una columna cromatográfica y se eluyó usando un gradiente de pH, observándose como una banda de 30 kDa en las fracciones E1-E4, no se observan otras bandas de proteínas accesorias.

Replegamiento de Trx-T1 a través del gradiente de urea en columna.

El replegamiento se realizó a través de un gradiente descendente de urea en la columna de acuerdo con la metodología descrita anteriormente. La evaluación en gel de poliacrilamida de la elución obtenida se muestra en la Figura 4. La presencia de proteína se observa en presencia de tampón F12, F12.1 y F13 correspondientes a la elución con imidazol a 250 mM y 500 mM (pH 8).

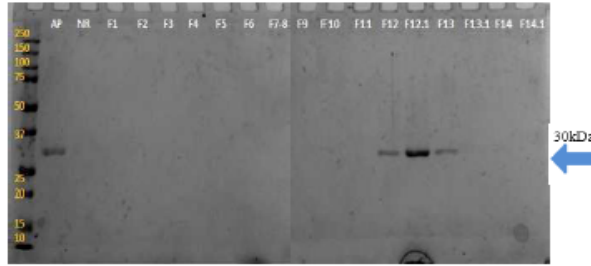


Fig. 5. Repliegamiento de *Trx-T1* anti TGF- β . *Trx-T1* se retuvo en una columna cromatográfica y se eluyó usando un gradiente de imidazol. La concentración de proteínas y la eliminación de imidazol se llevaron a cabo al mismo tiempo, y en la cuantificación la cantidad de *Trx-T1* obtenida por litro de cultivo BL21 fue de 15.213 mg.

ELISA de reconocimiento por Trx-T1.

Los resultados en la evaluación del reconocimiento por la técnica ELISA muestran que *Trx-T1* es capaz de reconocer TGF- β recombinante humano en sus 3 isoformas siendo la isoforma 1 y 2 las que son principalmente reconocidas de las que se obtiene diferencia significativa al ser comparadas estadísticamente por ANOVA con el blanco, adicionalmente también se observa el efecto de la ausencia del recubrimiento previo, recubrimiento con BSA 1%, así como de la ausencia de *Trx-T1* (vNAR).

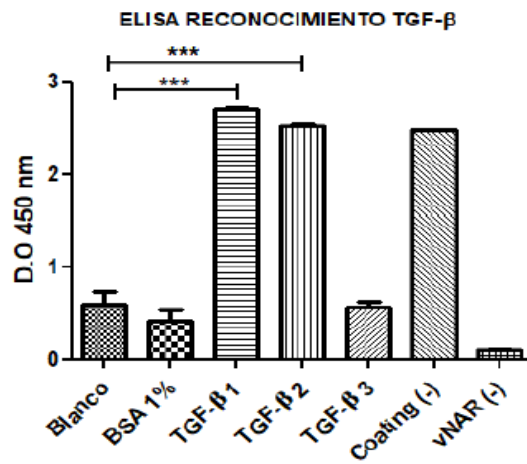


Fig. 6.- ELISA de reconocimiento de *Trx-T1*, evaluación de isoformas y recubrimientos coating (-) y vNAR(-) se realizó sin bloqueo. Fue empleado 100 ng de cada isoforma de TGF- β por pocillo, 4000 ng de *Trx-T1* anti TGF- β por pocillo en un volumen de 50 μ L, fue empleado el análisis de varianza (ANOVA con $P < 0.05$)

Discusión

La obtención de proteína recombinante se realizó en condiciones desnaturalizantes debido a que la proteína expresada se encuentra en los cuerpos de inclusión² lo cual puede asociarse a la gran cantidad producida y al diseño del plásmido, sin embargo, como se puede observar en las Figuras 2 y 3 es factible obtenerla de forma eficiente empleando condiciones desnaturalizantes. Obtener *Trx-T1* en condiciones desnaturalizantes, implica eliminar componentes de los amortiguadores como imidazol y sales, sin embargo, se demostró que el protocolo de repliegamiento permite que la proteína se restablezca a su conformación nativa. El vNART1 como componente de *Trx-T1*, se había descrito previamente con la capacidad de reconocer su antígeno de fuentes humanas, pero no asociado a una construcción con Trx.³

La producción de proteínas y la capacidad de reconocimiento de antígenos se usaron como parámetro y se evaluaron utilizando esta nueva proteína fusionada. La evaluación de reconocimiento indica que *Trx-T1* mantiene su capacidad de reconocimiento de antígenos, esto abre la posibilidad de que pueda usarse como herramienta de diagnóstico o incluso como herramienta terapéutica en condiciones donde los niveles de citocinas juegan un papel importante.⁴ Finalmente, es bien sabido que *E. coli* produce enormes cantidades de proteína y es posible utilizar esta ventaja para producir grandes cantidades de la proteína *Trx-T1* de alto interés farmacéutico o biotecnológico.⁵

Comentarios Finales

Resumen de resultados

En este trabajo se determinó que la cepa de *E. coli* BL21 tuvo un crecimiento más acelerado en comparación de la cepa C3030. Así mismo, al evaluar el crecimiento de la cepa BL21, en diferentes medios de cultivo queda evidenciado que el medio 2XTY permite obtener una mayor cantidad de proteína expresada en la fracción insoluble del lisado celular, esto indica que la proteína expresada es almacenada en cuerpos de inclusión. La extracción de la proteína en condiciones desnaturizantes permitió obtenerla y posteriormente replegarla eliminando las proteínas accesorias que son propias de la cepa *BL21*. Finalmente, el ensayo de reconocimiento permitió corroborar que *Trx-T1* es capaz de reconocer TGF- β humano recombinante encontrándose diferencia significativa con su respectivo control.

Conclusión

La construcción pET32aT1 es un sistema de expresión recombinante permite expresar *Trx-T1*. La cepa BL21 es la óptima para la inducción utilizando el medio 2XYT a una temperatura de 30 °C. En estas condiciones se obtiene la mayor expresión de la proteína en comparación con otros medios de cultivo evaluados. Fue posible purificar *Trx-T1* usando condiciones desnaturizantes con urea 8M y su posterior replegamiento para restaurar su forma nativa con actividad biológica. *Trx-T1* purificado y replegado manteniendo el reconocimiento biológico específico para TGF- β humano recombinante en sus tres isoformas.

Recomendaciones

Este trabajo abre la oportunidad de escalar el proceso para obtener grandes cantidades de *Trx-T1* de interés biomédico. En cuanto al proceso técnico es posible mejorar de extracción a través de la evaluación de otros métodos de extracción, replegamiento y purificación reportados para proteínas similares a *Trx-T1*. Finalmente, la capacidad demostrada por *Trx-T1* de reconocer al TGF- β abre la posibilidad de continuar las evaluaciones de esta proteína en líneas celulares o modelos animales en futuros estudios.

Referencias

- 1.- Griffiths, K.; *et al.* Shark Variable New Antigen Receptor (VNAR) Single Domain Antibody Fragments: Stability and Diagnostic Applications. *Antibodies* 2013, 2 (4), 66–81. <https://doi.org/10.3390/antib2010066>.
- 2.- Silow, M.; Oliveberg, M. Transient Aggregates in Protein Folding Are Easily Mistaken for Folding Intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997, 94 (12), 6084–6086. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6084>.
- 3.- Martínez Olivares, C. Purificación y Evaluación Citológica de Un Anticuerpo Tipo VNAR Neutralizante de TGF- β , Aislado Del Tiburón *Heterodontus Francisci*, 2014. <https://doi.org/10.1192/bjp.205.1.76a>.
- 4.- Saerens, D.; Ghassabeh, G. H.; Muyldermans, S. Single-Domain Antibodies as Building Blocks for Novel Therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2008, 8 (5), 600–608. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2008.07.006>.
- 5.- García, J.; Santana, Z.; Zumalacárregui, L.; Quintana, M.; González, D.; Furrázola, G.; Cruz, O. Estrategias de Obtención de Proteínas Recombinantes En *Escherichia Coli*. *Vaccinmonitor* 2013, 22 (2), 30–39.

13.- REFERENCIAS

1. Restrepo Valencia CA. Anatomía y Fisiología renal. In: *Nefología Básica 2.* ; 2010:1-9.
2. Meng XM, Chung ACK, Lan HY. Role of the TGF- β /BMP-7/Smad pathways in renal diseases. *Clin Sci.* 2013;124(4):243-254. doi:10.1042/CS20120252
3. Wrana L, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagu J. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature.* 1994;370:341-371.
4. Meng X, Tang PM, Li J, Lan HY. TGF- β / Smad signaling in renal fibrosis. *Front Physiol.* 2015;6:1-8. doi:10.3389/fphys.2015.00082
5. Abbas A, Litchman A. *Inmunología Celular y Molecular.* 6th ed. España: McGraw-Hill Interamericana; 2008.
6. Sung JY, Yoon K, Ye S, et al. Upregulation of transforming growth factor-beta type I receptor by interferon consensus sequence-binding protein in osteosarcoma cells. *BBA - Mol Cell Res.* 2019:1-35. doi:10.1016/j.bbamcr.2019.01.015
7. Bachman KE, Ho B. Dual nature of TGF- β signaling : tumor suppressor vs . tumor promoter. *Curr Opin Oncol.* 2004;17:49-54.
8. Gálvez-gastélum FJ, Sandoval-rodríguez AS, Armendáriz-borunda J. El factor de crecimiento transformante β como blanco terapéutico. *Salud Publica Mex.* 2004;46(4):341-350.
9. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003;113(6):685-700. doi:10.1016/S0092-8674(03)00432-X
10. Mark T, Dean S. TGF- β Activation and Function in Immunity Mark. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:51-82. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120257.TGF-
11. Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, et al. Dysregulation of TGF- β activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet.* 2003;33:407-411. doi:10.1038/ng1116
12. Derynck R, Akhurst RJ. Differentiation plasticity regulated by TGF- β family proteins in development and disease. *Nat Cell Biol.* 2007;9(9):1000-1004.
13. Coffey RJ, Sipes N, Bascom CC, et al. Growth Modulation of Mouse Keratinocytes by Transforming Growth Factors. *Cancer Res.* 1988;48(6):1596-1602.
14. Tsou P, Haak AJ, Khanna D, Neubig RR. Cellular Mechanisms of Tissue Fibrosis . Current and future drug targets in fibrosis : focus on Rho GTPase-regulated gene transcription. *Am J cell Physiol.* 2014;307(1):1-27.
15. Topete Reyes JF. TGF- β y otras moléculas profibróticas en enfermedad renal crónica. *Revista Médica MD.* 2015:104-110.
16. Loeff I, Wolf G. Transforming growth factor- β and the progression of renal disease. *Nephrol Dial Transpl.* 2013;29:37-45. doi:10.1093/ndt/gft267
17. Phan S. The Myofibroblast in Pulmonary fibrosis. *Remodel repair Respir Dis.* 2002;122(6):320S-326S. doi:10.1378/chest.122.6

18. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med*. 2007;13(8):952-961. doi:10.1038/nm1613
19. Willis BC, Roland M, Borok Z. Epithelial Origin of Myofibroblasts during Fibrosis in the Lung. *Proceedings Am Thorac Soc*. 2006;3:377-382. doi:10.1513/pats.200601-004TK
20. Lin RJ, Su ZZ, Liang SM, et al. Role of Circulating Fibrocytes in Cardiac Fibrosis. *Chin Med J (Engl)*. 2016;129(3):326-331. doi:10.4103/0366-6999.174503
21. Rabieian R, Boshtam M, Zareei M, Kouhpayeh S, Masoudifar A, Mirzaei H. *Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 as a Regulator of Fibrosis*. Vol 119.; 2018. doi:10.1002/jcb.26146
22. Wynn TA, Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest*. 2007;117(3):524-529. doi:10.1172/JCI31487.524
23. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano- regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3:349-363. doi:10.1038/nrm809
24. Schmitt R. Mechanismen der renalen Fibrose Mechanisms of renal fibrosis. *Der Nephrol*. 2012;7(1):10-17. doi:10.1007/s11560-011-0582-y
25. Serini G, Gabbiani G. Mechanisms of Myofibroblast Activity and Phenotypic Modulation. *Exp Cell Res*. 1999;283:273-283.
26. Leung G, Kirpalani A, Szeto SG, et al. Could MRI be used to image kidney fibrosis? A review of recent advances and remaining barriers. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017;12(6):1019-1028. doi:10.2215/CJN.07900716
27. OPS. Enfermedad renal cronica segun OPS.
https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=349&Itemid=40937&lang=es. 2020.
https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=349&Itemid=40937&lang=es.
28. Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic Kidney Disease. *Clin Am Soc Nephrol*. 2017;12(18):2032-2045. doi:10.2215/CJN.11491116
29. Rodrigues JC, Haas M, Reich HN. IgA Nephropathy. *Clin Am Soc Nephrol*. 2017;12:677-686.
30. Praga M. Nefropatía Membranosa. Lorenzo V, López Gómez JM (Eds) Nefrología al Día. <http://www.revistanefrologia.com/es-monografias-nefrologia-dia-articulo-nefropatia-membranosa-167>. Published 2019.
31. Lee HS. Mechanisms and consequences of TGF- β overexpression by podocytes in progressive podocyte disease. *Cell Tissue*. 2012;347:129-140. doi:10.1007/s00441-011-1169-7
32. Eddy A. Insights Into Renal Interstitial Fibrosis1. *J Am Soc Nephrol*. 1996:2495-2508.
33. OMS, OPS. La OPS / OMS y la Sociedad Latinoamericana de Nefrología llaman a prevenir la enfermedad renal y a mejorar el acceso al tratamiento. Centro de prensa. https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10542%3A2

015-opsoms-sociedad-latinoamericana-nefrologia-enfermedad-renal-mejorartratamiento&Itemid=1926&lang=es.

34. IMSS. El IMSS en cifras : la mortalidad en la población derechohabiente, 2003. 2004;42:353-364.
35. Antonio MD, Francisco MB, Teresa TY. Epidemiología de la insuficiencia renal crónica en México. *Diálisis y Transpl.* 2010;31(1):7-11.
36. Phyllis A, Manikkam S. Transforming growth factor beta and progression of renal disease. *Kidney Int.* 2003;64(87):99-104.
37. Rojo P, Bover J, Moreno V, Bosch DRRJ. Citoquinas y patología renal. *Nefrología.* 1998;XVIII(1):32-41.
38. Kok HM, Falke LL, Goldschmeding R, Nguyen TQ. Targeting CTGF, EGF and PDGF pathways to prevent progression of kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2014:1-12. doi:10.1038/nrneph.2014.184
39. Alejandro TB. Insuficiencia renal crónica: catastrófica y por ello prioritaria. *Cir Cir.* 2004;72(1):3-7.
40. Levey AS. American Journal of Kidney Diseases. *Am J Kidney Dis.* 2003;41(1):1-12. doi:10.1053/ajkd.2003.50007
41. Juan T y O, Santiago LQ. *La Enfermedad Renal Crónica En México.*; 2016.
42. Instituto Mexicano del Seguro Social. Guía de Referencia Rápida Prevención , Diagnóstico y Tratamiento de la Enfermedad Renal Crónica Temprana Guía de Práctica Clínica GPC. 2008:8. doi:10.1109/55.75679
43. Mansour SG, Puthumana J, Coca SG, Gentry M, Parikh CR. Biomarkers for the detection of renal fibrosis and prediction of renal outcomes : a systematic review. *BMC Nephrol.* 2017;18(72):1-13. doi:10.1186/s12882-017-0490-0
44. Carracedo AG. Insuficiencia renal crónica. *Tratado Geriátrica para Resid.* 2004:637-646.
45. Calabia ER. Medida de la función renal . Evaluación del cociente microalbuminuria / creatinina . Valor de la tira reactiva y del examen del sedimento urinario . Indicaciones para solicitar ecografía renal. *Nefrología.* 2004;24(6):35-46.
46. Manno C, F. G, Strippoli L, et al. Predictors of bleeding complications in percutaneous ultrasound-guided renal biopsy. *Kidney Int.* 2004;66:1570-1577. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00922.x
47. Devarajan P. Biomarkers for the Early Detection of Acute Kidney Injury. *Curr Opin Pediatr.* 2011;23(2):194-200. doi:10.1097/MOP.0b013e328343f4dd.Biomarkers
48. Susianti H, Handono K, Gunawan A, Mintaroem K, Purnomo BB, Kalim H. Transforming growth factor β 1 is better than α smooth muscle actin for the prediction of renal fibrosis in patients with nephritic lupus. *Biomarkers Genomic Med.* 2015;7(1):25-30. doi:10.1016/j.bgm.2014.08.010
49. Zhang X, Nagaraja HN, Nadasdy T, et al. A composite urine biomarker reflects interstitial inflammation in lupus nephritis kidney biopsies. *Kidney Int.* 2012;81(4):401-406. doi:10.1038/ki.2011.354

50. H-r C, S-f Y, J-d L, et al. Prediction of chronic allograft damage index of renal allografts using serum level of plasminogen activator inhibitor-1. *Clinical Transplant*. doi:10.1111/j.1399-0012.2009.00970.x
51. Weerd NC Van Der, Grooteman MPC, Nubé MJ, Wee PM, Swinkels DW, Gaillard CAJM. Heparin in chronic kidney disease : not an anaemia management tool , but promising as a cardiovascular biomarker. *Neth J Med*. 2015;73(3):108-118.
52. Pallet N, Chauvet S, Chassé JF, et al. Urinary retinol binding protein is a marker of the extent of interstitial kidney fibrosis. *PLoS One*. 2014;9(1). doi:10.1371/journal.pone.0084708
53. Devarajan P. Emerging Biomarkers of Acute Kidney Injury. *Early Diagnosis Prev AKI*. 2007;156:203-212.
54. Biosource M. KIM 1 ELISA Kit: Human Kidney Injury Molecule. <https://www.mybiosource.com/human-elisa-kits/kidney-injury-molecule-1-kim-1/700484>. 2020.
55. ELISA SS. Mouse KIM-1 ELISA Kit (TIM1) (ab213477). <https://www.abcam.com/mouse-kim-1-elisa-kit-tim1-ab213477.html>. 2020.
56. Life Sciences E. KIM-1 (human) ELISA kit. <https://www.enzolifesciences.com/ADI-900-226/kim-1-human-elisa-kit/>. 2020.
57. Sabbisetti VS, Waikar SS, Antoine DJ, et al. Blood Kidney Injury Molecule-1 Is a Biomarker of Acute and Chronic Kidney Injury and Predicts Progression to ESRD in Type I Diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25:2177-2186. doi:10.1681/ASN.2013070758
58. Bryan D, Francis C, Hilberman M, Michaelis A. Transtubular leakage of glomerular filtrate in human acute renal failure. *Am Physiol Soc*. 1979:319-324.
59. Sutton TA. Alteration of microvascular permeability in acute kidney injury. *Microvasc Res*. 2009;77(1):4-7. doi:10.1016/j.mvr.2008.09.004
60. Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. Inflammatory processes in renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. 2014;10(9):493-503. doi:10.1038/nrneph.2014.114
61. Grande MT, Pérez-Barriocanal F, Lopez-Novoa JM. Role of inflammation in tubulo-interstitial damage associated to obstructive nephropathy. *J Inflamm*. 2010;7:1-14. doi:10.1186/1476-9255-7-19
62. Stramer BM, Austin JS, Roberts AB, Fini ME. Selective Reduction of Fibrotic Markers in Repairing Corneas of Mice Deficient in Smad3. *J Cell Physiol*. 2005;203:226-232. doi:10.1002/jcp.20215
63. Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. Transforming Growth Factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;51(4):600-606. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.10.033.Transforming
64. Yamamoto T, Noble NA, Cohen AH, et al. Expression of transforming growth factor-beta isoforms in human glomerular diseases. *Kidney Int*. 1996;49:461-469. doi:10.1038/ki.1996.65
65. Honkanen E, Teppo AM, Tornroth T, Groop PH, Gronhagen-Riska C. Urinary

- transforming growth factor- β 1 in membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 1997;12(12):2562-2568. doi:10.1093/ndt/12.12.2562
66. Sanderson N, Factor V, Nagy P, et al. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Cell Biol*. 1995;92:2572-2576.
 67. Sharma K, Jin Y, Guo J, Ziyadeh FN. Neutralization of TGF- β by Anti-TGF- β Antibody Attenuates Kidney Hypertrophy and the Enhanced Extracellular Matrix Gene Expression in STZ-Induced Diabetic Mice. *Diabetes*. 1996;45:522-530.
 68. Berndt A, Kosmel H, Mendel U, et al. TGF- β and β FGF synthesis and localization in Dupuytren ' s disease (nodular palmar fibromatosis) relative to cellular activity , myofibroblast phenotype and oncofetal variants of fibronectin. *Histochem J*. 1995;1020(27):1014-1020.
 69. Jun J, Lau LF. Resolution of organ fibrosis. *J Clin Invest*. 2018;128(1):97-107.
 70. Pujuguet P, Hammann A, Moutet M, Samuel JL, Martin F, Martin M. Expression of Fibronectin ED-A + and ED-B + Isoforms by Human and Experimental Colorectal Cancer Contribution of Cancer Cells and Tumor-Associated Myofibroblasts. *Am J Pathol*. 1996;148(2):579-592.
 71. Shull M, Ormsy I, Kier A, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*. 2014;359(6397):693-699. doi:10.1038/359693a0.Targeted
 72. Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, et al. Transforming growth factor β 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(2):770-774. doi:10.1073/pnas.90.2.770
 73. Pal D, Pertot A, Shirole NH, et al. TGF- β reduces DNA ds-break repair mechanisms to heighten genetic diversity and adaptability of CD44 + / CD24 A cancer cells. *Cancer Biol*. 2017:1-28. doi:10.7554/eLife.21615
 74. Massagué J. How cells read TGF- β signals. *Nat Rev Mol cell Biol*. 2000;1(December):169-178.
 75. Isaka Y. Targeting TGF- β Signaling in Kidney Fibrosis. *Int J Mol Sci*. 2018;19:1-13. doi:10.3390/ijms19092532
 76. Murakami K, Takemura T, Hino S, Yoshioka K. Urinary transforming growth factor- β in patients with glomerular diseases. *Pediatr Nephrol*. 1997;11(3):334-336. doi:10.1007/s004670050289
 77. Tsakas S, Goumenos DS. Accurate measurement and clinical significance of urinary transforming growth factor- β . *Am J Nephrol*. 2006;26(2):186-193. doi:10.1159/000093178
 78. Chen T, Nie H, Gao X, et al. Epithelial – mesenchymal transition involved in pulmonary fibrosis induced by multi-walled carbon nanotubes via TGF- β / Smad signaling pathway. 2014;226:150-162. doi:10.1016/j.toxlet.2014.02.004
 79. Arteaga CL, Fendly BM, Forbes JT. Anti-transforming growth factor (TGF) - β antibodies inhibit breast cancer cell tumorigenicity and increase mouse spleen natural killer cell activity . Implications for a possible role of tumor cell / host TGF- β

- interactions in human breast cancer. *J Clin Invest*. 1993;92(6):2569-2576.
80. Jester J, Barry-Lane P, Petroll M, Olsen D, Cavanagh D. Inhibition of Corneal Fibrosis by Topical Application of Blocking Antibodies to TGF β in the Rabbit.pdf. *Cornea*. 1997;16(2):177-187.
 81. Hasen D, Villacres-Eriksson M, Akerblom L, Segura E, Carlomagno M, Morein B. An Immunoaffinity-Purified Trypanosoma cruzi Antigen Suppresses Cellular Proliferation through a TGF- β -Mediated Mechanism. *Scand J Immunol*. 1998;47:509-516.
 82. Jaschinski F, Rothhammer T, Jachimczak P, Seitz C, Schneider A, Schlingensiepen K. The Antisense Oligonucleotide Trabedersen (AP 12009) for the Targeted Inhibition of TGF- β 2. 2011;(Ap 12009):2203-2213.
 83. Bogdahn U, Balasubramaniam A, Nair S, et al. Targeted therapy for high-grade glioma with the TGF- β 2 inhibitor trabedersen: results of a randomized and controlled phase IIb study. *Neuro Oncol*. 2011;13(1):132-142.
 84. National Clinical Trials Database. *U S Natl Libr Med*. 2021. <https://clinicaltrials.gov/>.
 85. Araújo-Jorge TC, Waghbi MC, Bailly S, Feige JJ. The TGF- β pathway as an emerging target for chagas disease therapy. *Clin Pharmacol Ther*. 2012;92(5):613-621. doi:10.1038/clpt.2012.102
 86. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. 1993;363(6428):446-448. doi:10.1038/363446a0
 87. Flajnik MF, Deschacht N, Muyldermans S. A case of convergence: Why did a simple alternative to canonical antibodies arise in Sharks and Camels? *PLoS Biol*. 2011;9(8):1-5. doi:10.1371/journal.pbio.1001120
 88. A. Greenberg, D. Avila, M. Hughes et al. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature*. 1995;374(6518):168-173.
 89. Leow C, Fischer K, Leow C, Cheng Q, Chuah C, McCarthy J. Single Domain Antibodies as New Biomarker Detectors. *Diagnostics*. 2017;7(52):1-33. doi:10.3390/diagnostics7040052
 90. Barelle CJ, Kolmar H, Zielonka S, Empting M, Grzeschik J, Doreen K. Structural insights and biomedical potential of IgNAR scaffolds from sharks. 2015;(February):15-25.
 91. Siontorou CG. Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:4215-4227. doi:10.2147/IJN.S39428
 92. Camacho-villegas T, Mata-gonzalez T, Paniagua J, Sanchez E, Licea A. Human TNF cytokine neutralization with a vNAR from Heterodontus francisci shark A potential therapeutic use. *MAbs*. 2013;5(1):80-85.
 93. Saerens D, Ghassabeh GH, Muyldermans S. Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*. 2008;8(5):600-608. doi:10.1016/j.coph.2008.07.006
 94. Griffiths K, Dolezal O, Parisi K, et al. Shark Variable New Antigen Receptor (VNAR)

- Single Domain Antibody Fragments: Stability and Diagnostic Applications. *Antibodies*. 2013;2(4):66-81. doi:10.3390/antib2010066
95. Liu JL, Zabetakis D, Brown JC, Anderson GP, Goldman ER. Thermal stability and refolding capability of shark derived single domain antibodies. *Mol Immunol*. 2014;59(2):194-199. doi:10.1016/j.molimm.2014.02.014
 96. Kovaleva M, Ferguson L, Steven J, Porter A, Barelle C. Shark variable new antigen receptor biologics -- a novel technology platform for therapeutic drug development. *Expert Opin Biol Ther*. 2014;14(10):0. doi:10.1517/14712598.2014.937701
 97. Stanfield RL, Stanfield RL, Dooley H, Flajnik MF, Wilson IA. Crystal Structure of a Shark Single-Domain Antibody V Region in Crystal Structure of a Shark Single-Domain Antibody V Region in Complex with Lysozyme. *Science (80-)*. 2004;305:1770-1773. doi:10.1126/science.1101148
 98. Ubah OC, Porter AJ, Barelle CJ. In Vitro ELISA and Cell-Based Assays Confirm the Low Immunogenicity of VNAR Therapeutic Constructs in a Mouse Model of Human RA : An Encouraging Milestone to Further Clinical Drug Development. 2020;2020.
 99. Martín Olivares C. Purificación y evaluación citotóxica de un anticuerpo tipo vNAR neutralizante de TGF-beta, aislado del tiburón *Heterodontus francisci*. *Cent Investig científica y Educ Super Ensenada, Baja Calif*. 2014. doi:10.1192/bjp.205.1.76a
 100. Hernandez Guevara E, Lopez Zavala A. CURRENT PERSPECTIVES ON THE USE OF RECOMBINANT PROTEINS AND THEIR IMPORTANCE IN THE SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL INVESTIGATION. *Rev Ciencias Biológicas y la Salud*. 2013:8-17.
 101. BBC/Publishing. Biologic Therapeutic Drugs: Technologies and Global Markets. *Mark Res Reports*. 2019.
 102. English H, Hong J, Ho M. Ancient species offers contemporary therapeutics : an update on shark V NAR single domain antibody sequences , phage libraries and potential clinical applications. *Antib Ther*. 2020;3(1):1-9. doi:10.1093/abt/tbaa001
 103. Lodish H, Berk A, Zipursky S. DNA Cloning with plasmid vectors. In: Freeman, ed. *Moleccullar Cell Biology*. 4th ed. New York, NY; 2000. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21498/>.
 104. Nordstrom K, Uhlin B. Runaway replication plasmids as tools to produce large quantities of proteins from cloned genes in bacteria. *Nat Publ Gr*. 1992;10:661-666.
 105. Rai M, Padh H. Expression systems for production of heterologous proteins. *Curr Sci*. 2014;80(9):1121-1128.
 106. García J, Santana Z, Zumalacárregui L, et al. Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Vaccimonitor*. 2013;22(2):30-39.
 107. ABCAM. Recombinant antibodies: reproducible with tailored specificity. <https://www.abcam.com/primary-antibodies/recombinant-antibodies>. Published 2020.
 108. Nuttall SD, Krishnan U V, Hattarki M, Gori R De. Isolation of the new antigen receptor from wobbegong sharks , and use as a scaffold for the display of protein loop libraries. *Mol Immunol*. 2001;38:313-326.
 109. Hames PAC, Oogenboom HERH. Tecnología de presentación de anticuerpos en la

- superficie de fagos. In: ; 1997:161-178.
110. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in Escherichia coli : advances and challenges. *Frontiers Microbiol.* 2014;5(172):1-17. doi:10.3389/fmicb.2014.00172
 111. Yamaguchi H, Miyazaki M. Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. *Biomolecules.* 2014;4:235-251. doi:10.3390/biom4010235
 112. Noguchi T, Nishida Y, Takizawa K, et al. Accurate quantitation for in vitro refolding of single domain antibody fragments expressed as inclusion bodies by referring the concomitant expression of a soluble form in the periplasms of Escherichia coli. *J Immunol Methods.* 2016. doi:10.1016/j.jim.2016.11.014
 113. González A, Fillat MF. Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en Escherichia coli. *Rev Educ Bioquímica.* 2018;37(1):14-27.
 114. Jia B, Jeon CO. High-throughput recombinant protein expression in Escherichia coli : current status and future perspectives. *Open Biol.* 2016;6(8).
 115. Yuan TZ, Ormonde CFG, Kudlacek ST, et al. Shear-Stress-Mediated Refolding of Proteins from Aggregates and Inclusion Bodies. *ChemBioChem.* 2015;16(3):393-396. doi:10.1002/cbic.201402427
 116. Leow HC, Fischer K, Leow YC, Braet K, Cheng Q, McCarthy J. Cytoplasmic and periplasmic expression of recombinant shark VNAR antibody in Escherichia coli. *Prep Biochem Biotechnol.* 2019;49(4):315-327. doi:10.1080/10826068.2019.1566145
 117. Maggi M, Scotti C. Enhanced expression and purification of camelid single domain VHH antibodies from classical inclusion bodies. *Protein Expr Purif.* 2017;136:39-44. doi:10.1016/j.pep.2017.02.007
 118. Weller MG. Ten Basic Rules of Antibody Validation. *Anal Chem Insights.* 2018;13:1-5. doi:10.1177/1177390118757462
 119. Andreasson U, Armand P-L, Linda J. C. van W van D, Blennow K, Chiasserini D. A practical guide to immunoassay. *Front Neurol.* 2015;6(179):1-8. doi:10.3389/fneur.2015.00179
 120. Yang J, Liu Y. Dissection of Key Events in Tubular Epithelial to Myofibroblast Transition and Its Implications in Renal Interstitial Fibrosis. *Am J Pathol.* 2001;159(4):1465-1475.
 121. INSP. La Enfermedad Renal Crónica en México. Gobierno de México, Instituto Nacional de Salud Pública.
 122. Meng X. *Inflammatory Mediators and Renal Fibrosis.* (B.-C. Liu et al., ed.). Springer Singapore; 2019. doi:10.1007/978-981-13-8871-2
 123. Fuentes Medina E. PRODUCCION Y CARACTERIZACION PARCIAL DE UNA PROTEINA RECOMBINANTE COMPUESTA POR LA CHAPERONA TIORREDOXINA Y EL DOMINIO vNAR-T1. 2019.
 124. Perez-Padilla N, Camacho-villegas T. Expresión, renaturalización y purificación de dominios variables vNAR a partir de cuerpos de inclusión. In: *Academia Journals ISSN*

1946-5351. Vol 11. ; 2019:246-253.

125. Bojalil R, Mata-gonzález MT, Sánchez-muñoz F, et al. Anti-tumor necrosis factor V NAR single domains reduce lethality and regulate underlying inflammatory response in a murine model of endotoxic shock. *BMC Immunol.* 2013;14(17):1-7. doi:10.1186/1471-2172-14-17
126. Ubah OC, Steven J, Porter AJ, Barelle CJ, Lucas R. An Anti-hTNF- α Variable New Antigen Receptor Format Demonstrates Superior in vivo Preclinical Efficacy to Humira $\text{\textcircled{R}}$ in a Transgenic Mouse Autoimmune Polyarthritis Disease Model. *Front Immunol.* 2019;10:1-12. doi:10.3389/fimmu.2019.00526
127. Shilling PJ, Mirzadeh K, Cumming AJ, Widesheim M, Köck Z, Daley DO. Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*. *Commun Biol.* 2020;3(214):1-8. doi:10.1038/s42003-020-0939-8
128. Komura R, Aoki W, Motone K, Satomura A, Ueda M. High-throughput evaluation of T7 promoter variants using biased randomization and DNA barcoding. *PLoS One.* 2018:1-16. doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196905 May
129. Merk. T7 promoter System. 2020. file:///C:/Users/Marco Jesús/AppData/Local/Mendeley Ltd/Mendeley Desktop/Downloaded/merck t7.pdf.
130. NOVAGEN. pET-32a (+) Vectors. 2020:1-2. https://www.merckmillipore.com/MX/es/product/pET-32a+-DNA-Novagen,EMD_BIO-69015#anchor_VSEQ.
131. Recombinant production of protein i *E. coli*.pdf.
132. Reza Escobar E. Desarrollo y evaluación in vitro de inmunocombinados para terapia contra glioblastoma. 2020.
133. Singh A, Upadhyay V, Panda AK. Solubilization and Refolding of Inclusion Body Proteins. In: *Methods in Molecular Biology*. Vol 1258. ; 2015:283-291. doi:10.1007/978-1-4939-2205-5
134. Cabanillas Bernal O. Análisis comparativo de los niveles de expresión de fragmentos de anticuerpos recombinantes vNAR en *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*. 2014. <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/546>.
135. Burgess RR. *Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins*. Vol 463. 1st ed. Elsevier Inc.; 2009. doi:10.1016/S0076-6879(09)63017-2
136. Yu L, Wayne AB, Huang Y, Nancy N. TGF-beta isoforms in renal fibrogenesis. *Kidney Int.* 2003;64:844-856.
137. Boscato LM, Stuart C. Incidence and Specificity of Interference in Two-Site Immunoassays. *Clin Chem.* 1986;32(8):1491-1495.
138. Tate J, Ward G. Interferences in Immunoassay. *Clin Biochem Rev.* 2004;25:105-120.
139. Titan SM, Vieira JM, Dominguez W V., et al. Urinary MCP-1 and RBP: Independent predictors of renal outcome in macroalbuminuric diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications.* 2012;26(6):546-553. doi:10.1016/j.jdiacomp.2012.06.006
140. Doucet J, Zhao A, Fu J, Avrameas A. Development and Validation of an ELISA at Acidic pH for the Quantitative Determination of IL-13 in Human Plasma and Serum. *Dis*

Markers. 2013;35(5):465-474.