

**INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE**

**Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales**

**Sustentabilidad y tecnología**

**PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)**

**Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos II**



**ITESO, Universidad  
Jesuita de Guadalajara**

**4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos II**  
**Expresión recombinante y caracterización de un vNAR biespecífico**  
**realizadas en el CIATEJ**

**PRESENTAN**

Programas educativos y Estudiantes

Ing. en Biotecnología, Ramón Efrén Espinoza Sosa

Profesor PAP: Dra. Tanya Amanda Camacho Villegas

Tlaquepaque, Jalisco, diciembre de 2023

# ÍNDICE

## Contenido

REPORTE PAP .....	2
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional .....	2
Resumen .....	4
1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional.....	4
1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto .....	6
1.2 Caracterización de la organización.....	9
1.3 Identificación de la(s) problemática(s).....	10
1.4. Planeación de alternativa(s).....	11
1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora .....	16
1.6. Valoración de productos, resultados e impactos .....	43
1.7. Bibliografía y otros recursos .....	45
1.8. Anexos generales.....	47
2. Productos .....	47
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia.....	47
3.1 Sensibilización ante las realidades .....	48
3.2 Aprendizajes logrados .....	49

# REPORTE PAP

## Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

*[Este texto deberá aparecer en todos los RPAP]*

*Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son experiencias socio-profesionales de los alumnos que desde el currículo de su formación universitaria- enfrentan retos, resuelven problemas o innovan una necesidad sociotécnica del entorno, en vinculación (colaboración) (co-participación) con grupos, instituciones, organizaciones o comunidades, en escenarios reales donde comparten saberes.*

*El PAP, como espacio curricular de formación vinculada, ha logrado integrar el Servicio Social (acorde con las Orientaciones Fundamentales del ITESO), los requisitos de dar cuenta de los saberes y del saber aplicar los mismos al culminar la formación profesional (Opción Terminal), mediante la realización de proyectos profesionales de cara a las necesidades y retos del entorno (Aplicación Profesional).*

*El PAP es un proceso acotado en el tiempo en que los estudiantes, los beneficiarios externos y los profesores se asocian colaborativamente y en red, en un proyecto, e incursionan en un mundo social, como actores que enfrentan verdaderos problemas y desafíos traducibles en demandas pertinentes y socialmente relevantes. Frente a éstas transfieren experiencia de sus saberes profesionales y demuestran que saben hacer, innovar, co-crear o transformar en distintos campos sociales.*

*El PAP trata de sembrar en los estudiantes una disposición permanente de encargarse de la realidad con una actitud comprometida y ética frente a las disimetrías sociales. En otras palabras, se trata del reto de “saber y aprender a transformar”.*

*El Reporte PAP consta de tres componentes:*

*El primer componente refiere al ciclo participativo del PAP, en donde se documentan las diferentes fases del proyecto y las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo de este y la valoración de las incidencias en el entorno.*

*El segundo componente presenta los productos elaborados de acuerdo con su tipología.*

*El tercer componente es la reflexión crítica y ética de la experiencia, el reconocimiento de las competencias y los aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.*

## Resumen

El PAP “Expresión y Caracterización de un vNAR Biespecífico” comenzó en el semestre de otoño de 2023. Se trabajó con dominios vNARs, los cuales tienen el potencial de ser utilizados en el tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas las autoinmunes. Así, el objetivo general que se planteó fue el de establecer las condiciones de extracción y purificación de dos construcciones biespecíficas de vNARs de *Heterodontus francisci* clonados en *Escherichia coli* BL21 con potencial aplicación en el tratamiento de artritis reumatoide. A su vez, se establecieron cuatro objetivos específicos: obtener las proteínas correspondientes a través de extracción con urea, analizarlas en geles de poliacrilamida y en electrotransferencia semi-seca, obtenerlas por medio de IMAC y generar un banco maestro de las clonas de *E. coli* BL21 productoras de estas.

Para la extracción se incubaron pastillas celulares en un buffer con urea para provocar su lisis. Para la purificación, primeramente se preparó una resina NiNTA y después esta se utilizó para purificar las proteínas mediante un gradiente de urea. La determinación del peso molecular se hizo con SDS-PAGE y la detección de la presencia se hizo con *western blot* con transferencia semi-seca. El banco maestro se creó aislando colonias productoras de las construcciones y criopreservándolas en glicerol al 10%.

La SDS-PAGE y el *western blot* revelaron que la extracción y la purificación fueron exitosas, por lo que se logró estandarizarlas parcialmente. Asimismo, se vio que ambas construcciones, en efecto, se expresan. A su vez, el banco maestro pudo crearse.

### 1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional

El PAP es una experiencia de aprendizaje y de contribución social integrada por estudiantes, profesores, actores sociales y responsables de las organizaciones, que de manera colaborativa construyen sus conocimientos para dar respuestas a problemáticas de un contexto específico y en un tiempo delimitado. Por tanto, la experiencia PAP supone un proceso en lógica de proyecto, así como de un estilo de trabajo participativo y recíproco entre los involucrados.

El presente PAP de tipo experimental se realizó en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ). Esta institución, fundada el 24 de agosto de 1976 [1], hace parte del Sistema de Centros Públicos de Investigación (CPI) del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), específicamente de la Coordinación de Medio Ambiente, Salud y Alimentación. El CIATEJ, con sede en la ciudad de Guadalajara, Jalisco (donde se desarrolló el presente PAP), cuenta además con tres subsedes ubicadas en Zapopan, Jalisco, en Apodaca, Nuevo León y en Mérida, Yucatán. Su personal está formado por 166 especialistas, de los cuales 88 son doctores en ciencias, 21 maestros en ciencias y 57 ingenieros, tecnólogos y técnicos. El personal se agrupa en cinco líneas de investigación: Biotecnología Industrial, Biotecnología Vegetal, Biotecnología Médica y Farmacéutica, Tecnología Alimentaria y Tecnología Ambiental. De esta manera, el CIATEJ lleva a cabo una labor que gira en torno a la investigación, desarrollo tecnológico e innovación, a la vez que ofrece servicios tecnológicos y contribuye a la formación de recursos humanos altamente capacitados mediante programas de posgrado, de educación continua y de iniciación a la investigación [2].

La Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica busca, a través de un trabajo multidisciplinario en el que se colabora con otras unidades del CIATEJ, con otros centros públicos y con universidades e industrias nacionales e internacionales, atender las necesidades de los sectores farmacéutico y médico. Dicha Unidad realiza la transferencia de productos innovadores y ofrece servicios basados en los mecanismos moleculares de la salud y de la enfermedad para la prevención, diagnóstico, tratamiento y control de patologías infecciosas y no infecciosas, tanto humanas como animales. El trabajo realizado en esta Unidad, a la que pertenecen entre 22 y 24 investigadores, se divide en cuatro sublíneas de investigación: desarrollo y evaluación de productos con potencial terapéutico, desarrollo y evaluación de vacunas y compuestos inmunomoduladores, ingeniería biomédica de medicamentos biotecnológicos e ingeniería de tejidos y desarrollo y validación de pruebas de diagnóstico molecular [3].

El objetivo general del presente PAP es establecer las condiciones de extracción y purificación de un vNAR biespecífico de *Heterodontus francisci* clonado en *Escherichia coli*

BL21 con potencial aplicación en el tratamiento de artritis reumatoide. Los objetivos específicos son:

- Obtener las proteínas correspondientes a las construcciones biespecíficas a través de extracción con urea considerando que dichas proteínas fueron inducidas en volúmenes de 30 mL y 100 mL.
- Analizar las construcciones biespecíficas en geles de poliacrilamida para determinar su peso molecular y en electrotransferencia semiseca para determinar su presencia.
- Obtener las proteínas correspondientes a las construcciones biespecíficas a través de una purificación en columna IMAC.
- Generar un banco maestro de células electrocompetentes de *E. coli* BL21 para la conservación de la clonas productoras de las proteínas correspondientes a las construcciones biespecíficas.

### 1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

El sistema inmune o inmunológico está presente en los seres humanos y en otros vertebrados avanzados. Comprende todo el conjunto de respuestas de defensa cuyo objetivo es la eliminación de patógenos o de células anormales [4]. De manera más precisa, dichas respuestas son desencadenadas por sustancias conocidas como antígenos, las cuales se unen a receptores de células T (TCR) cuando, a su vez, se encuentran unidos al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), y a anticuerpos, ya sean estos de membrana, es decir, a receptores de células B (BCR), o solubles [5]. Entre los antígenos se incluyen los del propio cuerpo, llamados autoantígenos. De hecho, en todos los individuos existe un cierto grado de reconocimiento de dichos compuestos, encontrándose linfocitos T y linfocitos B autorreactivos y autoanticuerpos (anticuerpos que se unen a los autoantígenos) en circulación. Sin embargo, esta autoinmunidad termina traducándose en una patología cuando la tolerancia inmunológica falla en el control o eliminación de los linfocitos autorreactivos patogénicos. Es entonces cuando se presentan las enfermedades autoinmunes, las cuales afectan a entre un 5% y 8% de la población mundial [6].

La enfermedad autoinmune crónica de la artritis reumatoide afecta al 1.6% de los adultos mexicanos, teniendo una distribución no uniforme entre las diferentes regiones del país. En este padecimiento se acumulan células inflamatorias en la cápsula sinovial, lo que erosiona el cartílago y el hueso, pudiendo el primero de estos tejidos destruirse completamente en los casos más severos. Estos daños se deben a la producción de citocinas proinflamatorias y de autoanticuerpos por las células infiltradas. Por ejemplo, los macrófagos generan factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas como IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12. Además, células articulares, conocidas como sinoviocitos similares a macrófagos (MLSs) producen IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ , mientras que los llamados sinoviocitos similares a fibroblastos (FLSs) secretan IL-6, así como metaloproteinasas de matriz, sin pasar por alto que también activan los osteoclastos. Asimismo, los condrocitos inducen la producción de IL-6, TNF- $\alpha$ , metaloproteinasas de matriz y óxido nítrico [7].

La artritis reumatoide puede afectar cualquier articulación sinovial, aunque las más comúnmente dañadas son las de las manos, muñecas, codos, hombros y rodillas, seguidas de la cadera y de la articulación temporomandibular. También se ven afectadas las articulaciones claviculares y cricoaritenoideas. Además, los efectos de la artritis reumatoide se extienden a otros órganos, puesto que se presentan afectaciones en ganglios linfáticos, pulmones, ojos, sistema cardiovascular, piel, etc [8].

El tratamiento de la artritis reumatoide por medio de antirreumáticos biológicos modificadores de la enfermedad (BDMARDs, por sus siglas en inglés) se clasifica como una terapia biológica. Específicamente, se trata de una inmunoterapia, término que se refiere a un tratamiento que busca la inducción, activación o supresión de una respuesta inmune. Asimismo, al ser la artritis reumatoide un padecimiento de naturaleza autoinmune, se habla entonces de una inmunoterapia de supresión; tipo de tratamiento en el que se reduce, suprime o se dirige una respuesta inmunológica ya existente [9].

Entre los BDMARDs se encuentran distintas clases de anticuerpos o inmunoglobulinas, que son proteínas capaces de reconocer todo tipo de macromoléculas biológicas, principalmente otras proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y carbohidratos. Los anticuerpos son producidos por

los linfocitos B efectores o células plasmáticas y una vez que se han unido a su antígeno correspondiente dirigen a este último hacia otros componentes del sistema inmune para su eliminación o expulsión del cuerpo [10]. A mediados de la década de los 90' se descubrieron los anticuerpos denominados *immunoglobulin new antigen receptors* (IgNARs), los cuales son generados por el sistema inmunológico de tiburones y únicamente se componen de la cadena pesada, cuyos dominios variables (vNARs) poseen función autónoma como anticuerpos de dominio sencillo (sdAbs, por sus siglas en inglés). A diferencia de las inmunoglobulinas convencionales por ejemplo los anticuerpos de humano (IgG), los dominios sencillos vNARs tienen mayor facilidad para la unión a epítomos más crípticos y a los sitios catalíticos de las enzimas gracias a su gran variedad de secuencias y longitudes de *loops*, además de contar con una notable estabilidad fisicoquímica que se evidencia en sus propiedades de replegamiento después de ser expuestos a temperaturas de hasta 95 °C, hecho que es posible gracias a sus residuos de cisteína [11] que forman de uno a cuatro enlaces disulfuro, dependiendo del tipo de vNAR.

Debido al gran impacto de la artritis reumatoide a nivel nacional y mundial y al potencial de tratamientos que se basan en las moléculas del sistema inmunitario para tratar dicho padecimiento de carácter autoinmune, así como a las ventajas exhibidas por los vNARs, se crea en el CIATEJ el proyecto “Evaluación del Efecto de Dominios Biespecíficos vNAR en un Modelo 3D de Artritis Reumatoide”, al cual pertenece el presente PAP. Este proyecto comenzó en febrero de 2023, de manera que cuando el presente PAP dio inicio ya se había realizado, primeramente, la transformación de *E. coli* DH5 $\alpha$  con el plásmido pET28a+, que contenía la construcción del vNAR quimérico anti-TNF- $\alpha$  y anti-TGF- $\beta$ , mediante electroporación. Dicha construcción se hizo en dos sentidos: alfa-beta y beta-alfa. La transformación realizada permitió obtener más plásmido que, posteriormente, se utilizó para otra electroporación de *E. coli* BL21. Una vez que esta cepa fue transformada, se indujo la expresión del vNAR con isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Además, se llevó a cabo una secuenciación. La continuidad de este proyecto se traduce, a su vez, en la continuidad de un producto con potencial terapéutico que presenta ventajas sobre los otros tratamientos de su mismo tipo disponibles ya en el mercado o en fase de investigación.

## 1.2 Caracterización de la organización

La sede Guadalajara del CIATEJ tiene su domicilio en Normalistas #800, Colinas de la Normal. En ella laboran 63 investigadores distribuidos entre la Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, la Unidad de Tecnología Ambiental, la Unidad de Tecnología Alimentaria y la Unidad de Servicios Analíticos y Metrológicos, desde las que desarrollan cadenas de valor respecto a la calidad del agua, a la evaluación preclínica y medicina personalizada, a los alimentos procesados y confitería y al aguacate. También se llevan a cabo proyectos referentes a un laboratorio de digestión *ex vivo*, a la inocuidad, seguridad y trazabilidad alimentaria y a un tostador de café. De este modo, en esta sede se busca contribuir a los sectores médico-farmacéutico, ambiental y alimentario por medio de la innovación y de los servicios tecnológicos, formar recursos humanos y proporcionar servicios analíticos y metrológicos al sector agroalimentario. La directora general del CIATEJ es la Dra. Eugenia del Carmen Lugo Cervantes, quien forma parte de la línea de investigación de Tecnología Alimentaria [12].

En las distintas sublíneas de la Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica se realizan proyectos como los mostrados en la Tabla 1. El director de la unidad es el Dr. Jorge Bravo Madrigal, quien pertenece a la sublínea de desarrollo y evaluación de productos con potencial terapéutico. La investigadora responsable del presente PAP es la Dra. Tanya Amanda Camacho Villegas, que se halla integrada a esta misma sublínea, así como a la de desarrollo y evaluación de vacunas y compuestos inmunomoduladores y a la de ingeniería biomédica de medicamentos biotecnológicos e ingeniería de tejidos [3]. El proyecto “Evaluación del Efecto de Dominios Biespecíficos vNAR en un Modelo 3D de Artritis Reumatoide” representa el parte del proyecto de doctorado de la M. C. Jessica Andrea Badillo Mata, bajo cuya conducción se efectuó el presente PAP. También se contó con el apoyo de la M. C. Andrea Caridad Alfonseca Ladrón de Guevara y de la Ing. Luz Aurora Ramírez Ronzón.

**Tabla 1. Proyectos de las sublíneas de investigación que conforman la unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica.**

Sublínea de investigación	Proyectos
Desarrollo y evaluación de productos con potencial terapéutico	<ul style="list-style-type: none"><li>Selección y producción de anticuerpos policlonales, monoclonales y recombinantes</li></ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Identificación, caracterización y producción recombinante de biomarcadores</li> <li>• Producción de proteínas recombinantes</li> <li>• Medicina personalizada</li> <li>• Nuevos sistemas de suministro de fármacos o genes</li> <li>• Formulación y evaluación de Nutracéuticos</li> </ul>
Desarrollo y evaluación de vacunas y compuestos inmunomoduladores	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Generación y evaluación de candidatos a vacuna contra tuberculosis</li> <li>• Fortalecimiento de infraestructura para evaluación preclínica de vacunas</li> <li>• Nuevas vacunas contra garrapata del ganado bovino</li> <li>• Evaluación de candidatos a vacuna contra virus de influenza AH1N1</li> </ul>
Ingeniería biomédica de medicamentos biotecnológicos e ingeniería de tejidos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modelos transgénicos mediante el uso de células troncales</li> <li>• Sublínea de Investigación en Ingeniería Biomédica de Medicamentos Biotecnológicos e Ingeniería de Tejidos</li> </ul>
Desarrollo y validación de pruebas de diagnóstico molecular	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estudio piloto de la validación en campo de una nueva mezcla antigénica para el diagnóstico de la tuberculosis bovina</li> <li>• Diagnóstico diferencial de enfermedades febriles distintas a Dengue</li> </ul>

### 1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

La artritis reumatoide es, como la gran mayoría de las patologías reumáticas (de las cuales es la más común), una enfermedad autoinmune o autoinmunitaria, es decir, que ocurre cuando el sistema inmunológico ataca tejidos sanos del cuerpo como si estuvieran infectados tras una inmunorreacción contra antígenos autólogos, conduciendo a su deterioro crónico y disfunción. Se trata de un padecimiento que causa inflamación episódica y crónica de las articulaciones [10], las que terminan presentando erosiones y una sinovitis proliferativa. Una característica es que estas erosiones se presentan de manera simétrica en múltiples articulaciones periféricas, tales como la metacarpofalángica y la interfalángica proximal. Si bien es posible que esta enfermedad se presente a cualquier edad, la mayoría de las veces inicia entre los 45 y 65 años [13].

Entre el 0.5% y el 1% de la población mundial es afectada por la artritis reumatoide, estando distribuida de manera uniforme en todo el planeta. Las mujeres la padecen con más frecuencia en una proporción 2-3 a 1 respecto a los hombres [13]. En el caso de México, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reporta que alrededor de más de un millón de personas en el país sufre de artritis reumatoide, siendo el 75% mujeres. A su vez, tres cuartas partes de estas últimas se encuentran en edad productiva (25-55 años) [14].

El tratamiento de la artritis reumatoide puede hacerse utilizando distintas clases de fármacos: modificadores de los síntomas, antirreumáticos modificadores de la enfermedad sintéticos y BDMARDs. Estos últimos, en general, se refieren a los anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos o proteínas de fusión dirigidos a citocinas específicas proinflamatorias. Son más rápidos y eficaces que los antirreumáticos modificadores de la enfermedad tradicionales, logrando una mayor cantidad de casos con remisión de la enfermedad. Un ejemplo de este tipo de fármacos son los anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  que corresponden a IgG completas (150 kDa) [15].

No obstante, es importante mencionar que existe una tendencia de reducir el tamaño de los anticuerpos (150 kDa) a fragmentos del menor tamaño posible sin que la capacidad de unión al antígeno se pierda (por ejemplo los scFv de 30 kDa o los sdAbs de 12-15 kDa). Es así que los IgNARs, que naturalmente existen en peces cartilagosos como los tiburones, se presentan como una alternativa bastante prometedora. Sus dominios variables, designados como vNAR, exhiben, además de su tamaño reducido (12-15 kDa), ventajas como una mayor estabilidad térmica y química, una mejor penetración de los tejidos y resistencia al pH gástrico [16].

#### 1.4. Planeación de alternativa(s)

Para la concentración y purificación de productos biotecnológicos pueden emplearse distintos métodos. Sin embargo, a grandes rasgos pueden mencionarse seis operaciones principales: extracción, adsorción, cromatografía por elución, precipitación, ultrafiltración y electroforesis. En el caso de la adsorción, esta ocurre cuando un soluto se une y se concentra en una superficie sólida debido a las fuerzas intermoleculares que se forman entre ambos,

mismas que son reversibles. Para ello, primeramente se ponen en contacto la solución con el producto de interés y el adsorbente. Esto hace que el producto se una preferentemente a la superficie sólida en comparación con otros solutos. Después, se lava la columna con una solución que permita la eliminación de los solutos no deseados sin romper las fuerzas intermoleculares formadas en la adsorción. Finalmente, el producto se eluye con una solución que permita la desorción. Debe mencionarse que la columna con el adsorbente debe ser regenerada para poder usarse nuevamente [17]. El vNAR quimérico con el que se trabaja en el presente PAP posee en su estructura una etiqueta de 6 histidinas, lo que le permite unirse a superficies con iones de níquel. Precisamente, la construcción se hizo de este modo para poder realizar la purificación a través de una adsorción en una columna de sulfato de níquel (NiSO<sub>4</sub>).

Por otro lado, también se optó por la electroforesis para el análisis del vNAR, específicamente la que se realiza en geles de poliacrilamida. Estos geles consisten en un polímero y tienen, entre sus otros componentes, dodecil sulfato de sodio (SDS), que permite separar las proteínas según su peso molecular en condiciones desnaturalizantes; ya que el dodecil sulfato de sodio (SDS) es un detergente que, además, les confiere una carga negativa a las proteínas. Así, las proteínas migran hacia el polo positivo del campo eléctrico aplicado en función de su longitud y peso molecular [18]. Debido a la presencia de otros bioproductos en las muestras analizadas se elige este método para revisar la presencia del vNAR y la eficiencia de la purificación.

En la Tabla 2 se muestra el cronograma de las actividades que se realizaron a lo largo del presente PAP. Los significados de las siglas que en ella aparecen se indican en la Tabla 3.

**Tabla 2. Cronograma de actividades.**

Nombre de la actividad	Recursos	Tiempo (días)	Semana
------------------------	----------	---------------	--------

			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Introducción al laboratorio BSL1 de la Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica	TACV	1																
Preparación de la resina NiNTa® (Thermo Fisher Scientific®)	TACV ACALG JABM	4																
Seminario (preparación para el Festival Papirolas)	TACV PHLF	1																
Sonicación de cuerpos de inclusión y precipitación de la proteína PPAR- $\gamma$ (entrenamiento)	ACALG JABM LARR SON CEN CONVEI TBLO	1																
Purificación de la proteína PPAR- $\gamma$ por cromatografía de afinidad (entrenamiento)	ACALG JABM CCA BP	1																
SDS-PAGE de la proteína PPAR- $\gamma$ (entrenamiento)	TACV LARR ACALG CE FD	2																
SDS-PAGE de la proteína PPAR- $\gamma$ en condiciones no desnaturalizantes (entrenamiento)	TACV ACALG CE FD	2																
Presentación de resultados obtenidos hasta ese momento con la proteína PPAR- $\gamma$	TACV	1																
Preparación de buffers para purificación de la proteína PPAR- $\gamma$ mediante columna de glutatión y agarosa	JABM	1																
Extracción de vNAR sentido TGF- $\beta$ -TNF- $\alpha$ a partir de pastillas celulares obtenidas de inducciones en volúmenes de cultivo de 30 mL	JABM CONVEI IG CEN	1																
SDS-PAGE del extracto con vNAR obtenido de inducciones en volúmenes de cultivo de 30 mL	JABM CONVEI CE FP FD	1																
Presentación de resultados de SDS-PAGE del extracto con vNAR obtenido de inducciones en volúmenes de cultivo de 30 mL	TACV	1																
Preparación de buffers para la purificación del vNAR sentido	BA AV	1																

TGF- $\beta$ -TNF- $\alpha$ obtenido de inducciones en volúmenes de cultivo de 30 mL a través de cromatografía de afinidad	POT																		
Purificación del vNAR sentido TGF- $\beta$ -TNF- $\alpha$ obtenido de inducciones en volúmenes de cultivo de 30 mL a través de cromatografía de afinidad	JABM CONVEI CCA BP	1																	
Precipitación y desnaturalización del vNAR sentido TGF- $\beta$ -TNF- $\alpha$ obtenido de inducciones en volúmenes de cultivo de 30 mL	JABM CONVEI MH CEN TBLO	1																	
SDS-PAGE del vNAR sentido TGF- $\beta$ -TNF- $\alpha$ obtenido de inducciones en volúmenes de cultivo de 30 mL	JABM CONVEI CE FP FD	1																	
Preparación de material para el Festival Papirolas	TACV PHLF	4																	
Participación en el Festival Papirolas	TACV PHLF	1																	
Preparación de buffer de lisis para la extracción y purificación del vNAR sentido TGF- $\beta$ -TNF- $\alpha$ obtenido de inducciones en volúmenes de cultivo de 100 mL	BA AV POT	1																	
Extracción del vNAR sentido TGF- $\beta$ -TNF- $\alpha$ obtenido de inducciones en volúmenes de cultivo de 100 mL	JABM CONVEI IG CEN	1																	
Purificación del vNAR sentido TGF- $\beta$ -TNF- $\alpha$ obtenido de inducciones en volúmenes de cultivo de 100 mL	JABM CONVEI CCA BP	2																	
Precipitación y desnaturalización del vNAR sentido TGF- $\beta$ -TNF- $\alpha$ obtenido de inducciones en volúmenes de cultivo de 100 mL	CONVEI MH CEN TBLO	1																	
SDS-PAGE del vNAR sentido TGF- $\beta$ -TNF- $\alpha$ obtenido de inducciones en volúmenes de cultivo de 100 mL	JABM CONVEI CE FP FD	1																	
Western Blot del vNAR sentido TGF- $\beta$ -TNF- $\alpha$ obtenido de inducciones en volúmenes de cultivo de 100 mL	JABM AT FD	1																	
Cuantificación del vNAR sentido TGF- $\beta$ -TNF- $\alpha$ obtenido de inducciones en volúmenes de cultivo de 100 mL a través del método de BCA	JABM LMP	1																	



## 1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora

### *Producción y purificación de proteínas recombinantes*

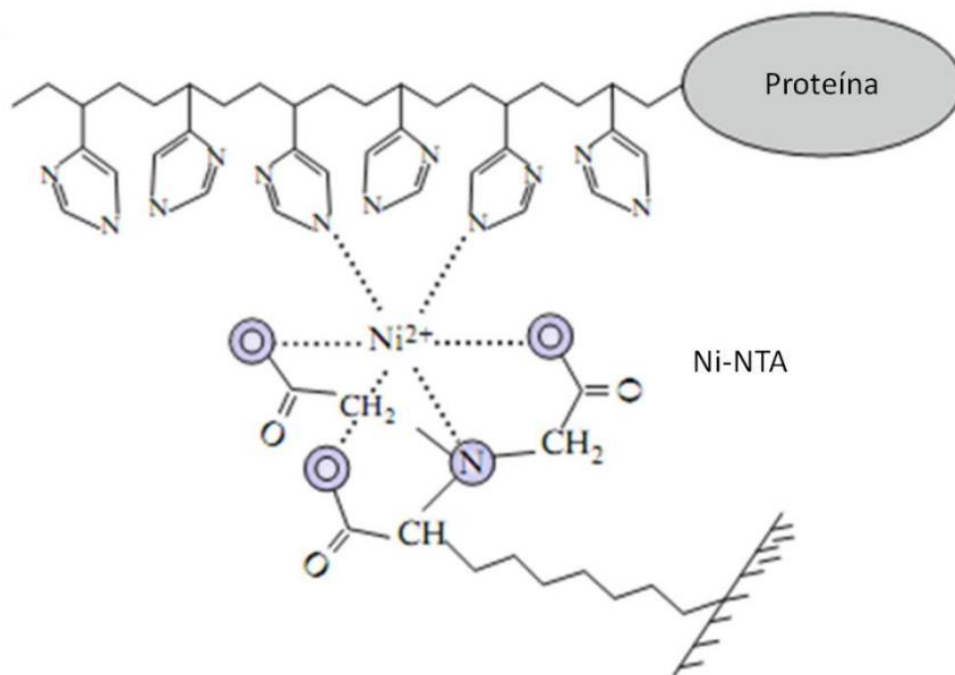
El principio más importante de la tecnología del ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante es la clonación de genes. En esta, se unen fragmentos de ADN provenientes de diferentes orígenes, más específicamente un fragmento de interés se liga a un vector; produciendo así una molécula de ADN recombinante que es introducida en una célula huésped [19]. El mencionado vector se refiere a la molécula acarreadora, que puede ser un plásmido, un bacteriófago, un cromosoma artificial, etc.; mientras que la célula huésped es el sistema biológico en el que se propaga el vector y puede ser procariota o eucariota [20].

La producción de proteínas a partir de la tecnología del ADN recombinante es uno de los aspectos más importantes de la manipulación de genes. De hecho, en la actualidad muchas de las proteínas de uso terapéutico son generadas de esta manera [20]. A esto se suma la posibilidad de crear proteínas quiméricas, que resultan tras la fusión de dos o más genes, a través de técnicas de ingeniería genética gracias a las cuales se aíslan y unen los distintos fragmentos de ADN [21].

Como es el caso de los vNARs, existen proteínas recombinantes de origen eucariótico que no son secretadas al espacio extracelular cuando son clonadas y expresadas en bacterias, de tal modo que permanecen como productos intracelulares. Sucede lo mismo con otros bioproductos como ciertas vacunas y enzimas. Por consiguiente, es necesario recurrir a métodos de rompimiento celular químicos, como el choque osmótico, la disolución lipídica, la digestión enzimática y el tratamiento alcalino; o mecánicos, como los molinos de perlas y la homogeneización [17].

Sin embargo, la aplicabilidad de las proteínas recombinantes se vería bastante afectada si para cada una de ellas se debiera crear una metodología específica para su purificación. Es por esta razón que se recurre a etiquetas de afinidad. Estas son clonadas junto con el gen de interés e interactúan de forma selectiva con un ligando inmovilizado en un soporte sólido. La

más común es la etiqueta de polihistidina, más precisamente aquella que consiste en seis residuos de histidina (6His). La 6His tiene la ventaja de ser una secuencia muy rara en la naturaleza, por lo que es muy poco probable que otras proteínas interactúen con el ligando; el cual es un metal de transición como  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$ . Otro componente importante del proceso es el ácido nitrilotriacético (NTA), que forma cuatro enlaces coordinados con el  $\text{Ni}^{2+}$  y le resta así dos valencias libres; haciendo posible la interacción del ion con los anillos imidazol de los residuos de histidina. Este proceso de purificación se denomina cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés) [22]. La Figura 1 esquematiza la interacción entre la 6His y el  $\text{Ni}^{2+}$ .

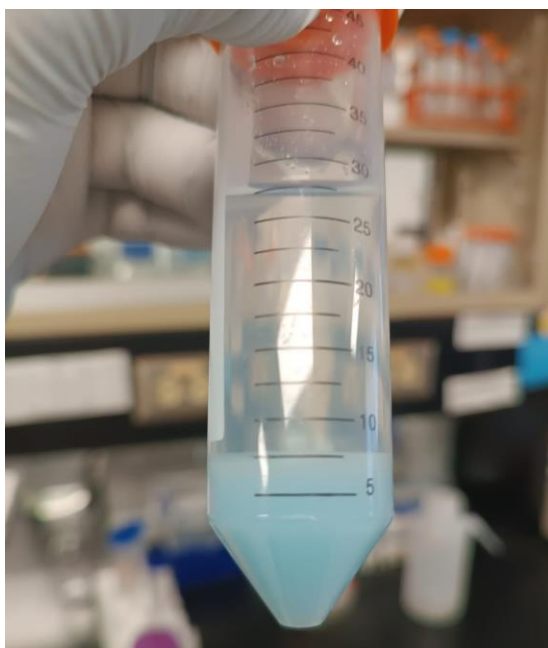


**Figura 1. Interacción entre una proteína recombinante con 6His y un ion de  $\text{Ni}^{2+}$  inmovilizado en NTA [22].**

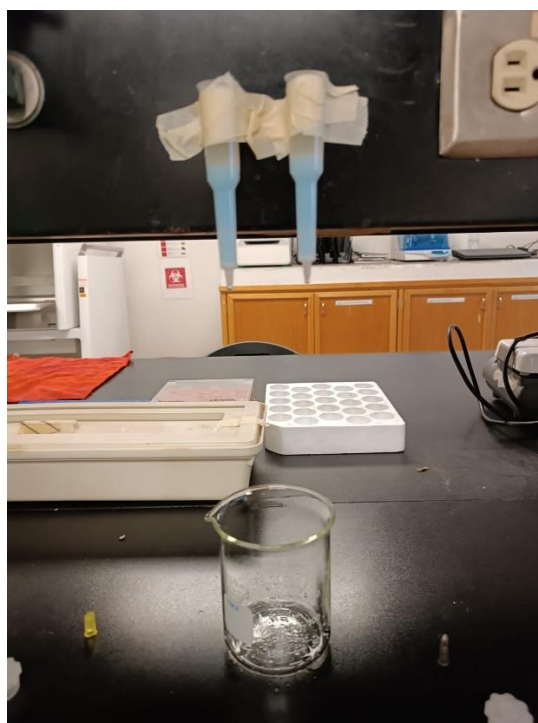
#### *Preparación de la resina de $\text{Ni}^{2+}$ y NTA (NiNTA)*

Se recolectó un volumen aproximado de 7.5 mL de una resina NiNTA almacenada en varias columnas de cromatografía por afinidad con capacidad de 10 mL de Bio-Rad en un refrigerador farmacéutico Haier Bio-Medical a 4 °C (Figura 2). Esta se dividió en dos

columnas para darle el tratamiento necesario para su empleo en procesos de purificación (Figura 3). Dicho tratamiento inició con un lavado utilizando 7 volúmenes de columna (1 volumen de columna es el volumen de resina con el que se trabaja) de *stripping* buffer (NaPO<sub>4</sub> 20mM, NaCl 0.5 M, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 50 mM, pH = 7.4). Para acelerar el procedimiento se hizo uso de una bomba peristáltica de la marca Intllab, gracias a la cual se logró que el flujo a través de la columna fuera más rápido. Después, se pasaron 7 volúmenes de buffer de unión (NaPO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 0.5 M, imidazol 40 mM, pH = 7.4) y luego 7 volúmenes de agua destilada. Posteriormente, se realizó la limpieza de la columna. Primero, se removieron las proteínas unidas iónicamente haciendo pasar 7 volúmenes de NaCl 1.5 M seguidos de 10 volúmenes de agua destilada. Después se eliminaron las proteínas precipitadas, las unidas hidrofóbicamente y las lipoproteínas dejando la resina en contacto con NaOH 1 M durante dos horas, tras lo cual se pasaron 10 volúmenes de buffer de unión y 7 volúmenes de agua destilada. La remoción de las proteínas unidas hidrofóbicamente y de las lipoproteínas, además de la de los lípidos, se continuó con 7 volúmenes de isopropanol al 30% y 10 volúmenes de agua destilada. Finalmente, la resina se recargó con 2.5 mL de NiSO<sub>4</sub> 0.1 M, lavándose de forma posterior con 5 volúmenes de agua destilada y con 5 volúmenes de buffer de unión. El almacenamiento se hizo en etanol al 20% a 4 °C.



**Figura 2. Resina NiNTA recolectada de varias columnas de cromatografía.**



**Figura 3. Preparación de la resina NiNTA.**

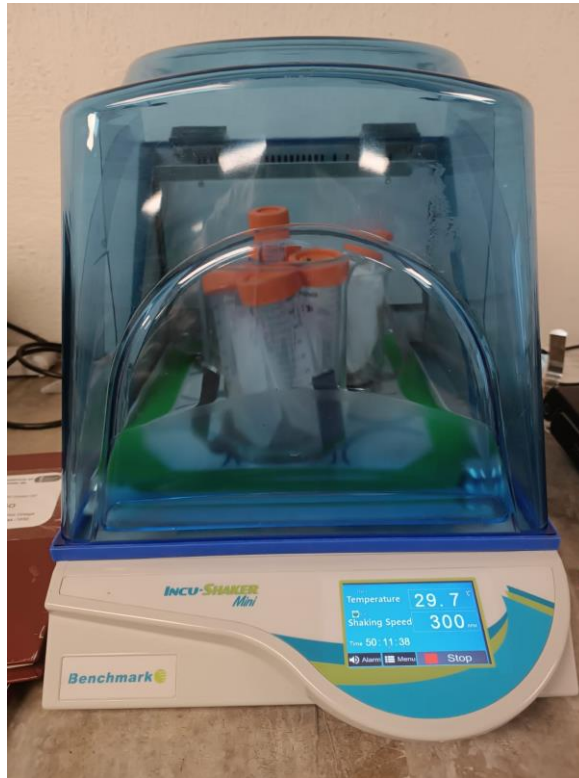
*Rompimiento celular de pastillas de E. coli BL21 provenientes de cultivos realizados en 30 mL de medio de cultivo*

Se tomaron pastillas celulares de *E. coli* BL21 que se encontraban almacenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un congelador Frigidaire Gallery y que eran resultado de la expresión de los vNARs quiméricos en un volumen de cultivo de 30 mL en medio *Terrific Broth* (TB), el cual es especial para el cultivo de bacterias. Es necesario mencionar que se trabajó con dos construcciones diferentes: una con sentido TGF- $\beta$ -TNF- $\alpha$  (sentido A) y otra con sentido TNF- $\alpha$ -TGF- $\beta$  (sentido B), ambas con la etiqueta 6His. Se tuvieron entonces cinco pellets distintos: sentido A inducido con IPTG, sentido A no inducido, sentido B inducido con IPTG, sentido B no inducido y *E. coli* no transformada. Se dejaron descongelando a temperatura ambiente por 15 min (Figura 4) y de manera posterior se les agregaron a cada uno 5 mL de buffer de lisis ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM, Tris-Base 10 mM, urea 8 M, pH = 8). Se llevaron a una incubadora con agitación Incu-shaker Mini de Benchmark Scientific durante 1 h a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 300 rpm (Figura 5). Luego de verificar con base en el aspecto de los pellets que la lisis

efectivamente había sucedido (Figura 6) se llevaron las muestras a una centrífuga Sorvall Legend XTR de Thermo Fisher Scientific a 10 000 rpm por 10 min, la que además se había enfriado previamente a 4 °C. Por último, se recolectaron los sobrenadantes para almacenarlos a -20 °C y se descontaminaron los debris celulares con NaClO al 6%.



**Figura 4. Pastilla proveniente de un volumen de cultivo de 30 mL descongelada.**



**Figura 5. Lisis de las pastillas provenientes de un volumen de cultivo de 30 mL.**



**Figura 6. Pastilla lisada proveniente de un volumen de cultivo de 30 mL.**

### *Separación de proteínas a través de electroforesis SDS-PAGE*

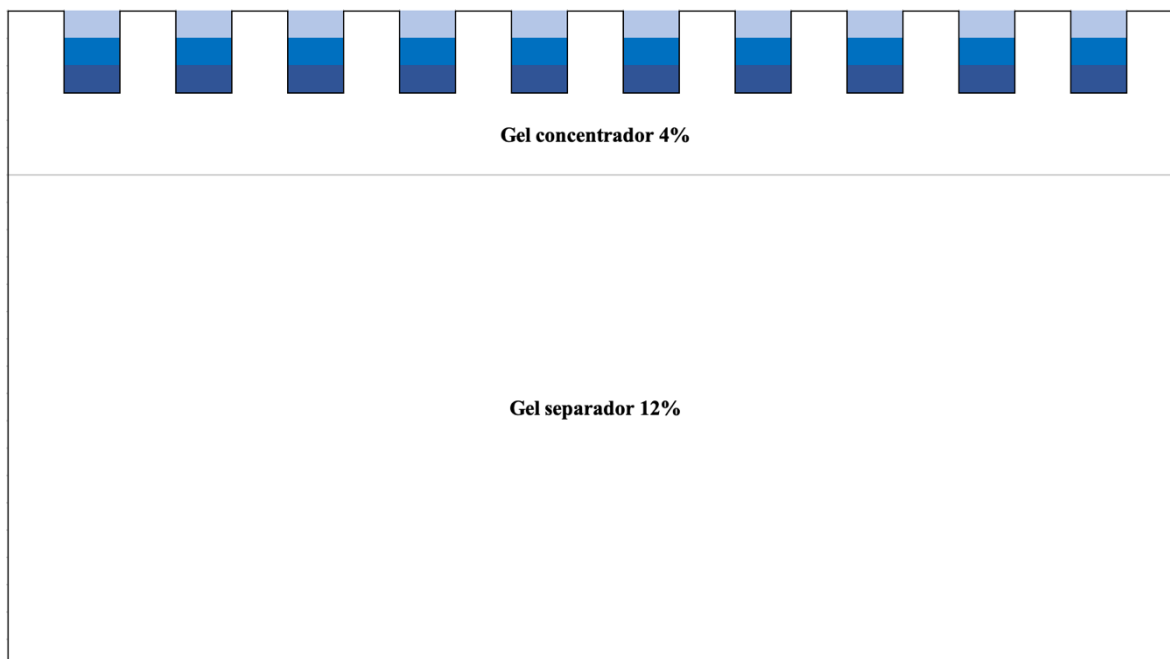
La electroforesis en gel es una técnica que permite la separación y purificación de ADN, ácido ribonucleico (ARN) y proteínas y representa, probablemente, el método físico más utilizado en biología molecular. Ya que se fundamenta en la carga eléctrica intrínseca, su realización requiere el uso de dos electrodos, uno positivo y otro negativo, conectados a una fuente de poder de alto voltaje. Así, las moléculas con carga positiva se mueven hacia el electrodo negativo y viceversa [23].

A diferencia de las electroforesis de ácidos nucleicos en las que se emplean geles de agarosa, las electroforesis de proteínas se efectúan en geles del polímero sintético poliacrilamida. Esto se debe a que las proteínas son en promedio mucho más pequeñas que el ADN y el ARN y los geles de poliacrilamida presentan poros más pequeños en su estructura. Por otro lado, es necesario hacer una desnaturalización de las proteínas antes de someterlas a una electroforesis en gel de poliacrilamida, puesto que su carga eléctrica neta depende de la carga mayoritaria en su secuencia de aminoácidos (los cuales pueden contar con carga neutra, positiva o negativa). De esta forma, para romper la estructura tridimensional que otorgan las estructuras secundaria y terciaria se recurre al calentamiento de la proteína mezclada con el detergente SDS, cuya molécula posee una cola hidrofóbica con una carga negativa al final que envuelve a la proteína. Así, la proteína termina cubierta de moléculas de SDS que le confieren una carga neta negativa, por lo que se movera hacia el electrodo positivo al momento de ejecutar la electroforesis (Figura 7). Además, para la ruptura de los enlaces disulfuro que contribuyen a la estructura terciaria o a la unión de las subunidades de la proteína se adiciona un agente sulfhidrilo de bajo peso molecular, generalmente  $\beta$ -mercaptoetanol [23]. Este es el método denominado SDS-PAGE.



Para desnaturalizar las proteínas precipitadas se suspendieron en una mezcla de 10  $\mu$ L de buffer de carga 2X y 10  $\mu$ L de agua destilada. Para preparar dicho buffer de carga se mezclaron 2 mL de TRIS-HCl 1 M pH = 6.8, 1.6 mL de glicerol, 3.2 mL de SDS 10% y 0.4 mL de azul de bromofenol 1%; para luego dividir esta mezcla en alícuotas de 900  $\mu$ L a las que se les agregaron 100  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol. Las muestras se llevaron entonces al termoblock a 95 °C durante 5 min para su desnaturalización y se almacenaron a -20 °C.

*SDS-PAGE de los extractos proteicos obtenidos de pastillas de E. coli BL21 provenientes de cultivos realizados en 30 mL de medio de cultivo* El gel de poliacrilamida empleado se dividía en dos partes de diferente composición: una denominada gel separador con una concentración de poliacrilamida al 12% y otra llamada gel concentrador de poliacrilamida al 4% cuya función es, valga la redundancia, la concentración de las muestras al moverse más rápido a través del gel debido al mayor tamaño de sus poros; para que así la separación en el otro gel pueda ocurrir de forma correcta. La Figura 8 ilustra la estructura del gel formado por estas dos partes o gel discontinuo. Las composiciones completas de cada parte se muestran en la Tabla 4. Asimismo, el orden en que deben añadirse a la mezcla es el mismo que se ve en esta tabla. Cabe mencionar que los volúmenes indicados en la tabla anterior permitían que un pequeño remanente de las mezclas quedara en el tubo en el cual se habían hecho para de esta manera observar el proceso de polimerización y saber cuándo había terminado.



**Figura 8. Ilustración de un gel de poliacrilamida conformado por una parte separadora (12%) y una concentradora (4%). Los pocillos del gel se observan ya con las muestras cargadas.**

**Tabla 4. Composiciones de los geles separador y concentrador utilizados.**

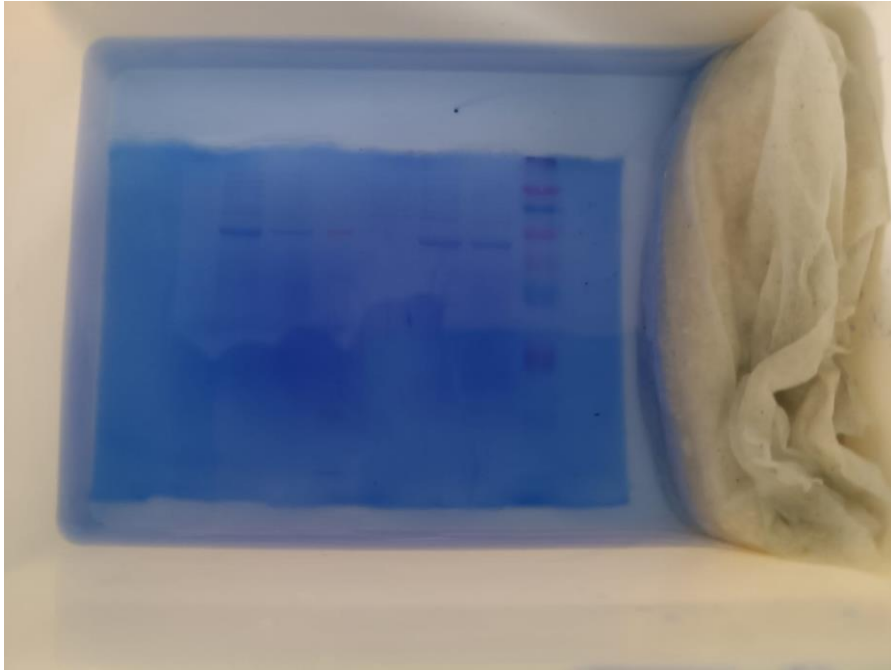
Componente	Gel separador (12%)	Gel concentrador (4%)
Agua destilada	1.65 mL	1.1 mL
TRIS-HCl 1.5 M pH = 8.8	1.25 mL	---
TRIS-HCl 1 M pH = 6.8	---	188 µL
Acrilamida 30%	2 mL	200 µL
SDS 20%	25 µL	7.5 µL
Persulfato de amonio (PSA) 10%	50 µL	15 µL
N, N, N', N'- Tetrametiletilenediamina (TEMED)	5 µL	1.5 µL
<b>Volumen final</b>	<b>5 mL</b>	<b>1.5 mL</b>

La polimerización se llevó a cabo en vidrios de 0.75 mm de un kit para SDS-PAGE de Bio-Rad. Primero se colocó la mezcla del separador, el cual abarcaba la mayor parte del espacio

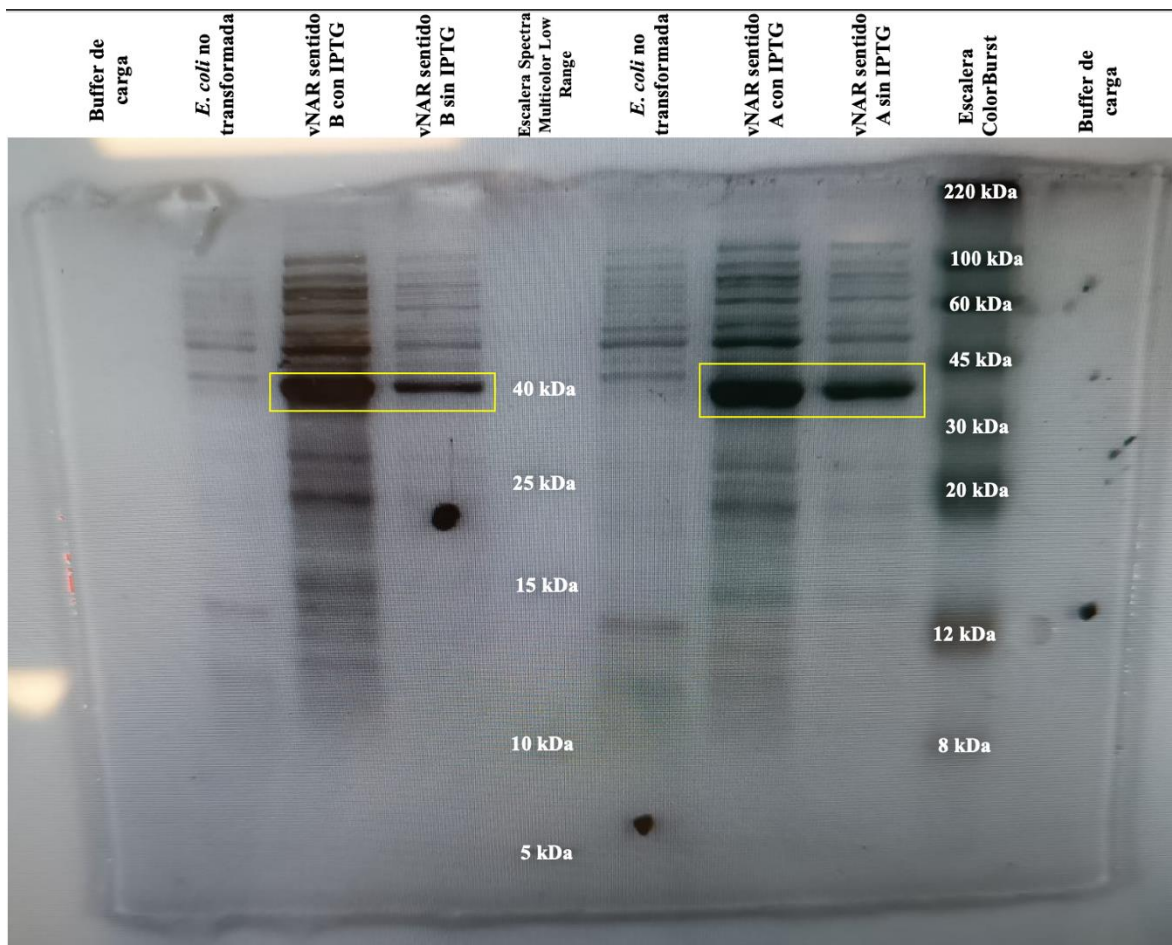
entre los vidrios. Para que este no tuviera un borde superior irregular se llenó el resto del espacio con etanol al 70% (esta solución no se mezcla con los componentes del gel). Una vez que el gel estuvo listo se retiró el alcohol y se introdujo la mezcla del gel concentrador hasta llenar completamente el espacio entre los vidrios y colocando un peine del tamaño correspondiente para formar los pocillos.

Ya listo el gel concentrador se llevó el gel completo a la celda de electroforesis, la cual se llenó totalmente con buffer nuevo TRIS/Glicina/SDS 1X (TRIS-Base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%, pH = 8.3). La celda se puso en la cámara de electroforesis y en esta última se vertió buffer TRIS/Glicina/SDS 1X de reuso hasta la marca indicada. Se colocaron entonces 10  $\mu$ L de las muestras de extracto previamente homogenizadas que estaban almacenadas a -20 °C. Además, en uno de los pocillos se pusieron 20  $\mu$ L del marcador de peso molecular ColorBurst de Sigma-Aldrich; y en otro, 10  $\mu$ L del marcador de peso molecular Spectra Multicolor Low Range de Thermo Fisher Scientific. Finalmente, la cámara se conectó a la fuente de poder y se inició la electroforesis con un voltaje de 160 V que se suministró por 5 min. Esta primera etapa del proceso tuvo como propósito la concentración de las muestras en el gel de poliacrilamida al 4%. Pasados los 5 min se comenzó una segunda etapa con 120 V durante 1 h.

Terminado el procedimiento de electroforesis se separaron los vidrios que contenían el gel y se cortó la parte concentradora, para después poner el gel separador en un recipiente con solución de tinte durante 1 h. Dicha solución de tinte se hizo mezclando 250 mL de metanol, 1 g de azul de Coomassie, 50 mL de ácido acético glacial y 200 mL de agua bidestilada. Transcurrido este tiempo se recuperó la solución de tinte para reusarla en futuros procedimientos y se cubrió el gel con solución de destintado (40% metanol, 10% ácido acético glacial, 50% agua destilada) hasta que el gel se destintara lo suficiente. Para acelerar este proceso se colocó en el recipiente un papel secante que absorbiera el colorante (Figura 9). Se retiró entonces la solución de destintado y se almacenó el gel en agua destilada para posteriormente tomar una fotografía en un fotodocumentador GelDoc Go de Bio-Rad. La Figura 10 corresponde a dicha fotografía. En esta se indica a qué corresponde cada carril, así como los pesos moleculares de cada banda de las escaleras utilizadas.



**Figura 9. Gel de poliacrilamida siendo desteñido. Se observa que las bandas comienzan a ser claras.**



**Figura 10.** Fotografía tomada en el fotodocumentador GelDoc Go de Bio-Rad del gel con las muestras de extractos proteicos obtenidos de pastillas de *E. coli* BL21 provenientes de cultivos realizados en 30 mL de medio de cultivo tras el proceso de electroforesis. Se resaltan con rectángulos amarillos las bandas que se plantearon eran las construcciones de vNARs expresadas.

Como puede observarse en la Figura 10, cada uno de los carriles que corresponden a extractos en los que se expresaron los vNARs presenta una banda notablemente más intensa que las demás. Dado que el análisis *in silico* hecho de modo previo al inicio del presente PAP reveló un peso molecular aproximado de 35 kDa para ambas proteínas biespecíficas, se pudo plantear que muy probablemente estas bandas se trataran de las proteínas de interés.

*IMAC del extracto proteico con el vNAR sentido A inducido con IPTG y obtenido de la pastilla de E. coli BL21 proveniente del cultivo realizado en 30 mL de medio de cultivo*

Para realizar la IMAC del extracto proteico con el vNAR sentido A inducido con IPTG y obtenido de la pastilla de *E. coli* BL21 proveniente del cultivo realizado en 30 mL de medio de cultivo se llenó una columna de cromatografía de afinidad de Bio-Rad con 1 mL de la resina NiNTA previamente preparada y almacenada a 4 °C en buffer de lisis. Empleando la bomba peristáltica de la marca Intllab (Figura 11) se pasaron 10 volúmenes de buffer de lisis para equilibrar la columna y después pasar seis veces el extracto con el propósito de que el vNAR sentido A se adsorbiera. Luego, se redujo la molaridad de la urea presente en la columna pasando cinco mezclas de buffer de lavado (20 mM Tris-Base, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, 6 M urea, 1 mM β-mercaptoetanol, pH = 8) y buffer de replegado (20 mM Tris-Base, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, 1 mM β-mercaptoetanol, pH = 8), cada una con un volumen de 3 mL. La Tabla 5 muestra la composición de cada mezcla, siendo el orden en el que aparecen el mismo en el cual se fueron pasando. Una vez que la urea se redujo totalmente se hicieron pasar 10 volúmenes de buffer de lavado 2 (50 mM imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-Base, pH = 8). Por último, se agregaron 800 μL de buffer de elución (300 mM imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-Base, pH = 8) y se dejaron reposar durante 5 min para eluir el vNAR sentido A de la columna NiNTA. Este volumen se colectó y el proceso se repitió otras cuatro veces para obtener cinco muestras en total, las cuales se almacenaron a -20 °C. Además, a lo largo del procedimiento se colectaron otras dos muestras: 800 μL del extracto tras haber sido pasado seis veces a través de la columna y 800 μL del lavado que se realizó con el buffer de lavado 2.

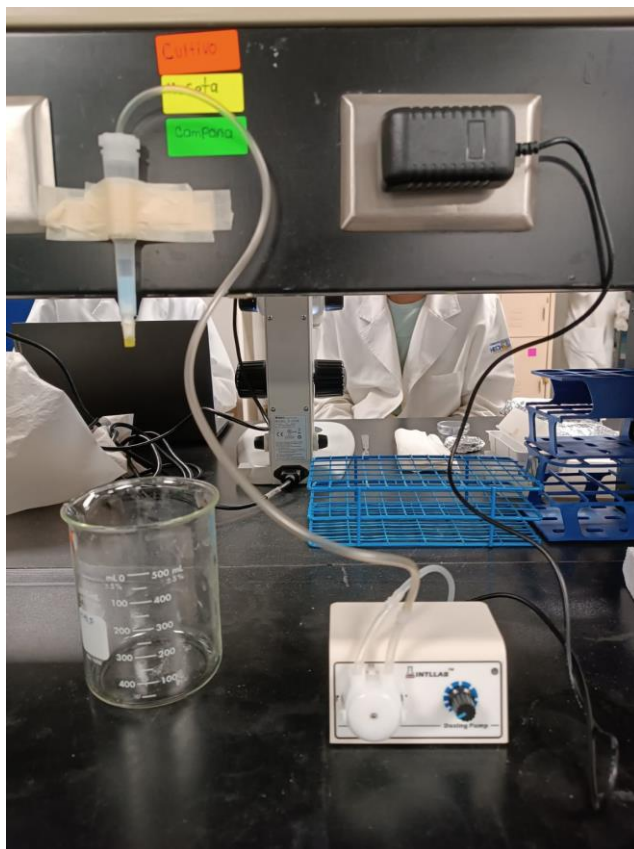


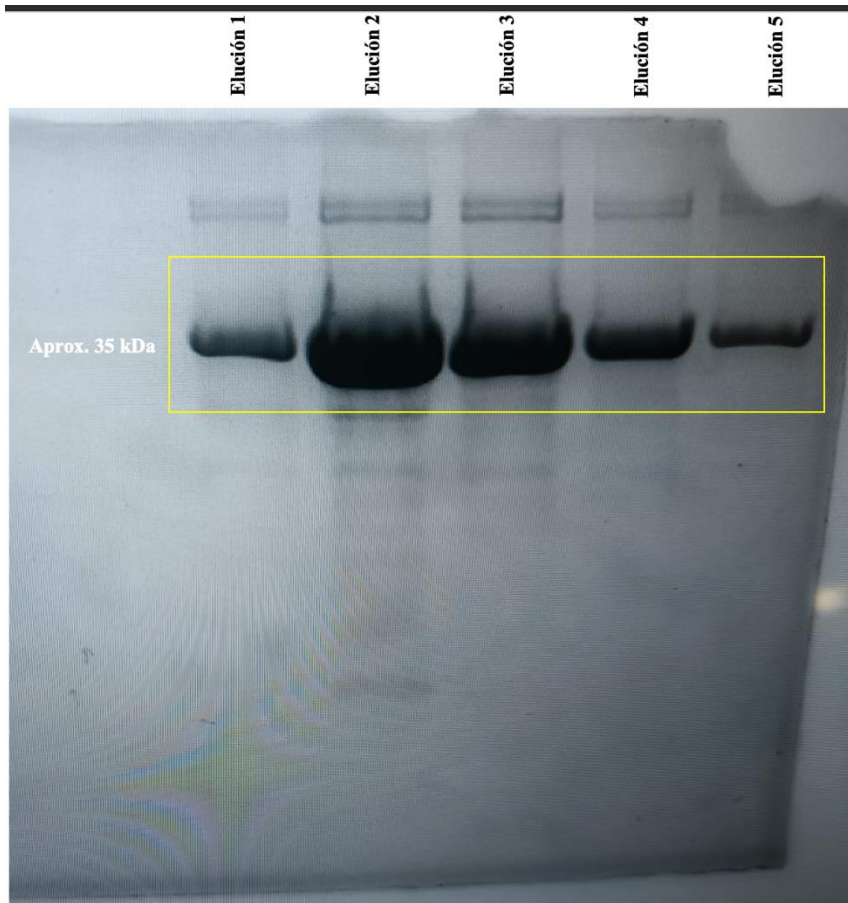
Figura 11. Sistema IMAC que se montó para la purificación de los vNARs.

Tabla 5. Mezclas utilizadas para reducir el gradiente de urea durante el proceso de purificación.

Orden	Buffer de lavado (mL)	Buffer de replegado (mL)
1	2	1
2	1.5	1.5
3	1	2
4	0.5	2.5
5	0	3

*Precipitación, desnaturalización y SDS-PAGE de las eluciones de vNAR sentido A obtenidas de la purificación del extracto proteico de la pastilla de E. coli BL21 proveniente del cultivo realizado en 30 mL de medio de cultivo*

Los procedimientos para llevar a cabo la precipitación, la desnaturalización y la SDS-PAGE de las eluciones de vNAR sentido A obtenidas de la purificación del extracto proteico de la pastilla de *E. coli* BL21 proveniente del cultivo realizado en 30 mL de medio de cultivo fueron los mismos que se efectuaron para el caso de los extractos proteicos no purificados. El gel resultante de la electroforesis se muestra en la figura 12. Aquí se puede observar claramente la presencia de la proteína de interés en los carriles correspondientes a las eluciones, en particular en los carriles de la segunda y tercera elución. De hecho, cualitativamente se puede decir que la presencia de esta es muy grande.

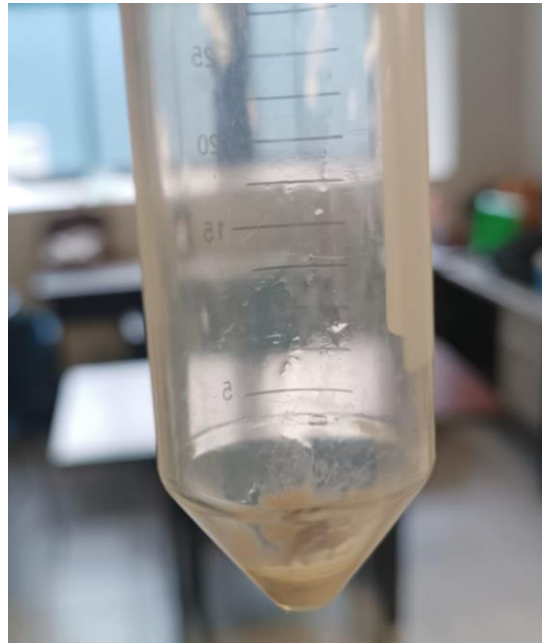


**Figura 12. Fotografía tomada en el fotodocumentador GelDoc Go de Bio-Rad del gel con las muestras de las eluciones de vNAR sentido A obtenidas de la purificación del extracto proteico de la pastilla de *E. coli* BL21 proveniente del cultivo realizado en 30 mL de medio de cultivo tras el proceso de electroforesis. Se resaltan con un rectángulo amarillo las bandas que se plantearon eran la construcción de vNAR sentido A expresada.**

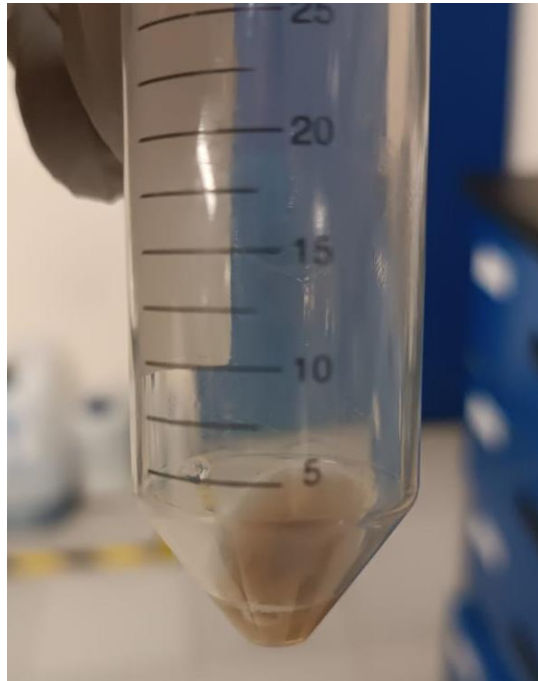
Si bien la existencia de otras bandas evidenció la presencia de otras proteínas en las eluciones, dichas bandas se observan en menor cantidad y con menor intensidad que las de la Figura 10, siendo la banda correspondiente al vNAR sentido A mucho más notable que estas.

*Rompimiento celular de una pastilla de E. coli BL21 proveniente de un cultivo realizado en 100 mL de medio de cultivo en el que se expresó el vNAR sentido A*

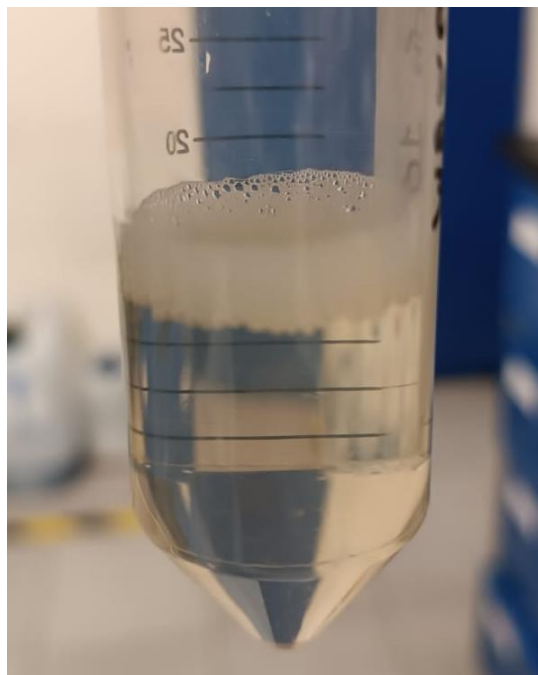
Se tomó una pastilla celular de *E. coli* BL21 que estaba almacenada a -20 °C, la cual se había conseguido de la expresión inducida con IPTG del vNAR sentido A en un volumen de cultivo de 100 mL de medio TB (Figura 13). El procedimiento para llevar a cabo la lisis fue el mismo que se realizó para las pastillas provenientes de cultivos en 30 mL de medio de cultivo, con la diferencia de que el volumen de buffer de lisis agregado fue de 15 mL. La Figura 14 muestra el lisado; y la Figura 15, el extracto proteico.



**Figura 13. Pastilla descongelada con expresión del vNAR sentido A inducida con IPTG proveniente de un volumen de cultivo de 100 mL.**



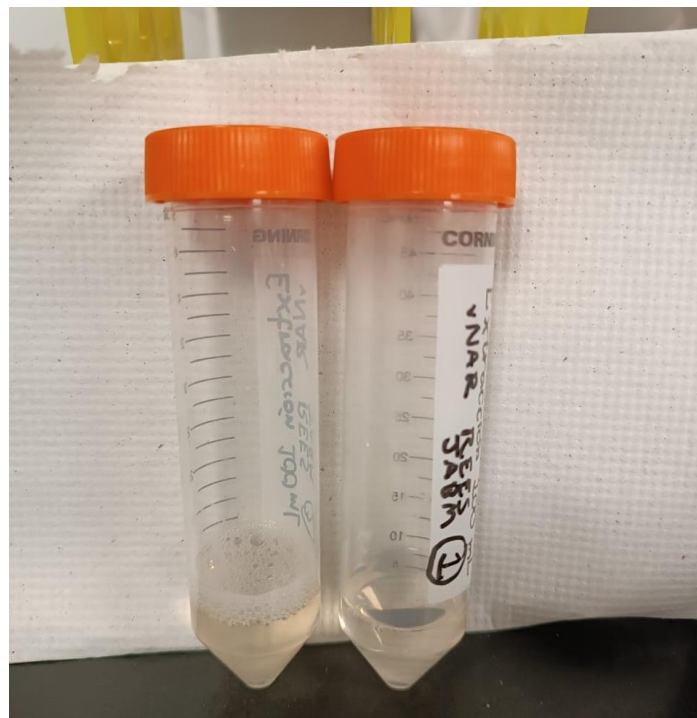
**Figura 14. Pastilla lisada proveniente de un volumen de cultivo de 100 mL en el que se indujo con IPTG la expresión del vNAR sentido A.**



**Figura 15. Extracto proteico con el vNAR sentido A inducido con IPTG en un cultivo de 100 mL.**

*IMAC del extracto proteico con el vNAR sentido A inducido con IPTG y obtenido de la pastilla de E. coli BL21 proveniente del cultivo realizado en 100 mL de medio de cultivo*

Previamente al inicio de la IMAC el extracto proteico se dividió en dos tubos, cada uno con 7.5 mL. Se llenó la columna de cromatografía de afinidad con 1.6 mL de la resina NiNTA y se procedió a llevar a cabo la metodología de purificación de la misma forma en que se hizo para el extracto proteico con el vNAR sentido A obtenido de la pastilla que provenía del cultivo en 30 mL de medio de cultivo. La única diferencia fue que las eluciones se hicieron con volúmenes de 1.5 mL de buffer de elución. El proceso se hizo dos veces para purificar el extracto de ambos tubos. La Figura 16 muestra una comparación entre las dos partes del extracto cuando una de ellas ya había sido pasada por la columna de cromatografía.



**Figura 16. Comparación entre las dos partes en que se dividió el extracto proteico obtenido de la pastilla proveniente del cultivo en 100 mL. Puede notarse como el extracto de la izquierda, que corresponde a una muestra todavía no purificada, presenta un color más opaco que el de la derecha, que es un extracto ya purificado.**

*Precipitación y desnaturalización de las eluciones de vNAR sentido A obtenidas de la purificación del extracto proteico de la pastilla de E. coli BL21 proveniente del cultivo realizado en 100 mL de medio de cultivo*

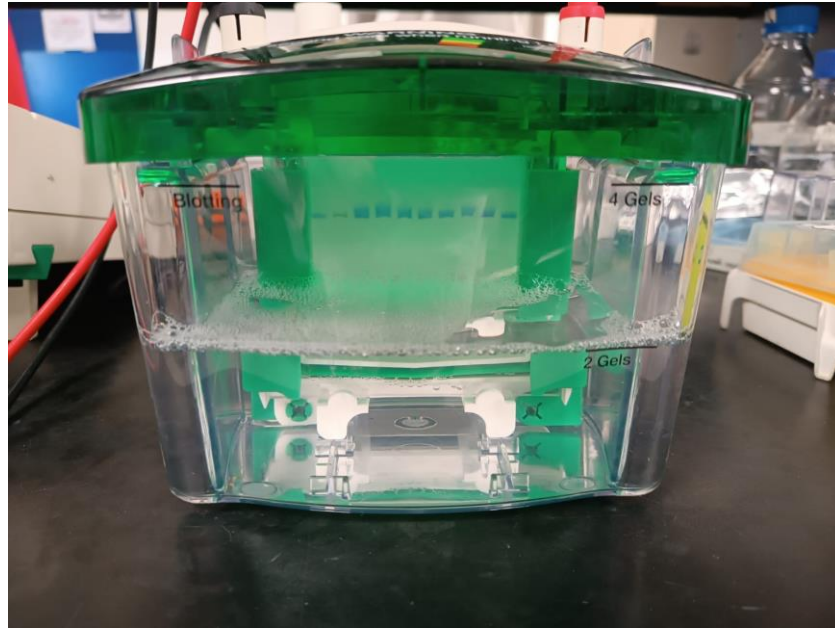
Los procedimientos para llevar a cabo la precipitación y la desnaturalización de las eluciones de vNAR sentido A obtenidas de la purificación del extracto proteico de la pastilla de *E. coli* BL21 proveniente del cultivo realizado en 100 mL de medio de cultivo fueron los mismos que se efectuaron anteriormente en el presente PAP. Es necesario mencionar que cuando se descongelaron las muestras se vio que la proteína de la elución 1 se había precipitado (Figura 17).



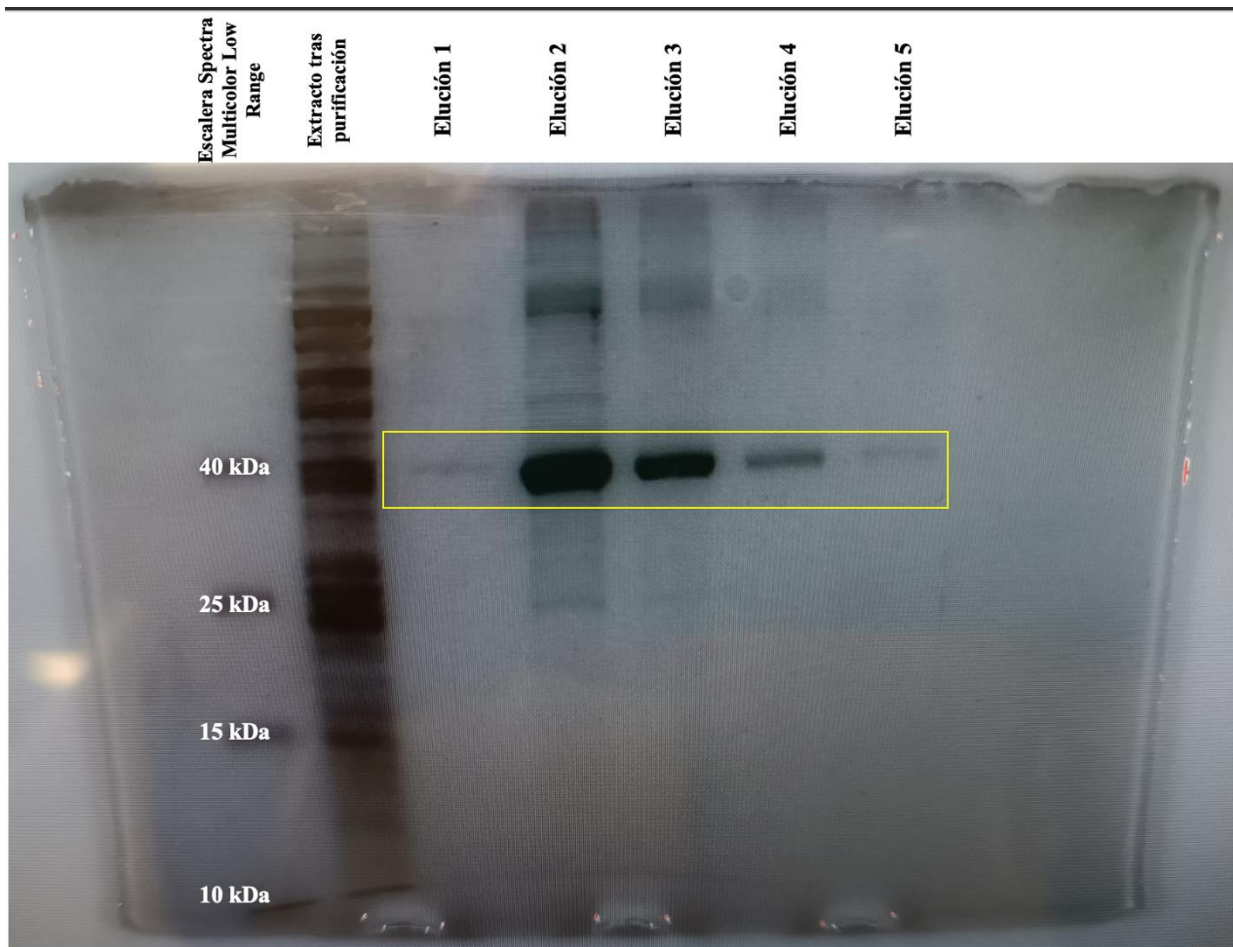
**Figura 17. Elución 1 del vNAR sentido A obtenida de la purificación del extracto proteico de la pastilla de *E. coli* BL21 proveniente del cultivo realizado en 100 mL de medio de cultivo. Se observa que la proteína se precipitó antes de realizar el procedimiento para ello.**

*SDS-PAGE de las eluciones de vNAR sentido A obtenidas de la purificación del extracto proteico de la pastilla de E. coli BL21 proveniente del cultivo realizado en 100 mL de medio de cultivo*

El procedimiento para la SDS-PAGE fue el mismo que se efectuó anteriormente en el presente PAP (Figura 18). La Figura 19 muestra el gel teñido con azul de Coomassie, en cuyos carriles correspondientes a las muestras de las eluciones se observaron bandas como las que ya también se habían visto en las Figuras 10 y 12; por lo que pudo plantearse nuevamente que estas corresponden a la construcción de vNAR sentido A.



**Figura 18. SDS-PAGEs en proceso.**



**Figura 19.** Fotografía tomada en el fotodocumentador GelDoc Go de Bio-Rad del gel con muestras de las eluciones de vNAR sentido A obtenidas de la purificación del extracto proteico de la pastilla de *E. coli* BL21 proveniente del cultivo realizado en 100 mL de medio de cultivo tras el proceso de electroforesis. Se resaltan con un rectángulo amarillo las bandas que se plantearon eran las construcciones de vNARs sentido A expresadas.

### *Western Blot*

La técnica de *Western Blot* se utiliza para cuantificar el nivel de expresión de una proteína y sus modificaciones. Para su realización la proteína debe ser desnaturalizada y posteriormente separada en función de su peso molecular a través de una SDS-PAGE. Tras esto, la proteína es transferida a una membrana de nitrocelulosa que se incuba en presencia de un anticuerpo cuyo parátipo se une al epítipo del antígeno que en este caso es la proteína analizada, o bien, sus modificaciones químicas como las glicosilaciones y fosforilaciones. El complejo antígeno-anticuerpo es visualizado entonces por medio de un ensayo de quimioluminiscencia y de un sistema de documentación de geles [24].

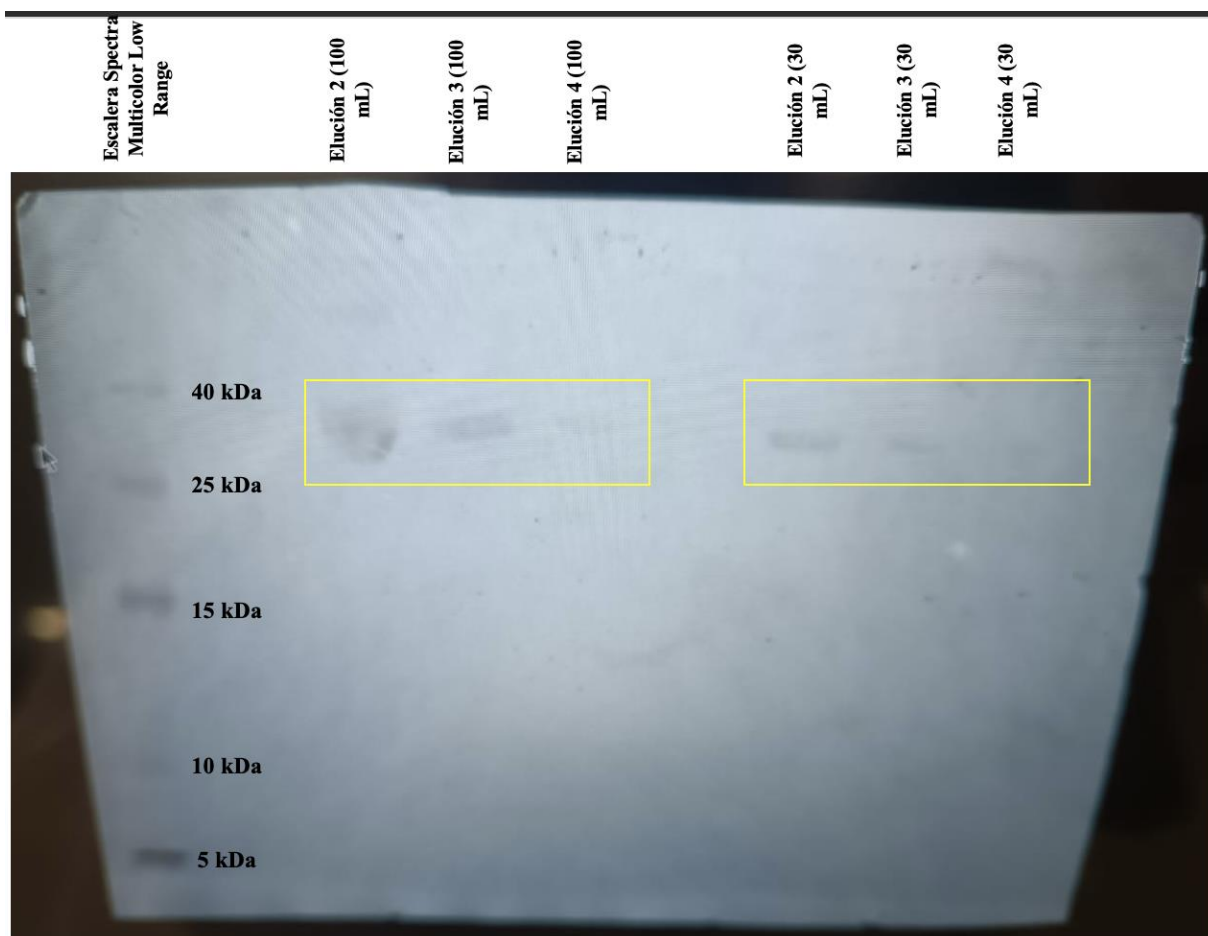
Es importante mencionar que luego de efectuar la transferencia de la proteína a la membrana se debe bloquear para que no se produzcan uniones inespecíficas del anticuerpo de detección empleado. Para ello puede hacerse uso de albúmina de suero bovino (BSA) al 3% o de leche en polvo derivada desnatada diluida en TBST al 5% [24]. De la misma manera, una vez hecho el bloqueo y la incubación con el anticuerpo se tiene que hacer el revelado del complejo antígeno-anticuerpo. Una forma de realizarlo es añadiendo 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidino (TMB), que es un sustrato cromogénico para colorimetría; el cual puede ser oxidado por la peroxidasa de rábano (HRP) que está conjugada con el anticuerpo de detección. Cabe mencionar que cuando se realiza un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA), el TMB oxidado soluble tiene una coloración azul con picos de absorbancia en 370 nm y 650 nm. La oxidación puede ser detenida con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, lo cual ocasiona un cambio de color a amarillo; presentando ahora el pico de absorbancia en 450 nm [25].

*Western Blot de las eluciones de vNAR sentido A obtenidas de las purificaciones de los extractos proteicos de las pastillas de E. coli BL21*

Con el objetivo de confirmar que, en efecto, las bandas resaltadas en las Figuras 10, 12 y 19 correspondían a construcciones de vNARs, se ejecutó la técnica de *Western Blot*; en específico, un tipo de *Western Blot* con transferencia semi-seca. Para esto, primeramente se activaron una membrana de nitrocelulosa y el gel de poliacrilamida resultante de la SDS-PAGE sumergiéndolos en buffer de transferencia (Tris-Base 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0.04%, metanol 10%) durante 10 min y 5 min, respectivamente. Así mismo, también se introdujeron en este buffer seis papeles de transferencia. Tres de estos se colocaron en la cámara de transferencia eliminando las burbujas que se formaban entre ellos. Después, la membrana ya activada se puso encima y el gel activado, a su vez, se colocó sobre la membrana. Luego se colocaron los otros tres papeles filtro encima del gel y se eliminaron las burbujas. Se cerró entonces el equipo, se conectó a la fuente de poder y se inició la transferencia a 200 mA constantes por 1 h. Transcurrido este tiempo, la membrana se colocó en BSA diluida al 3% en buffer fosfato salino (PBS) 1X durante 1 h para realizar el bloqueo.

Luego, se retiró la solución de bloqueo y se incubó con un anticuerpo anti-His (esto debido a la presencia de la 6His) a 37 °C durante 2 h. Posteriormente se retiró el anticuerpo y se hicieron tres lavados con PBS-Tween 0.05% y, por último, se añadió TMB como revelador.

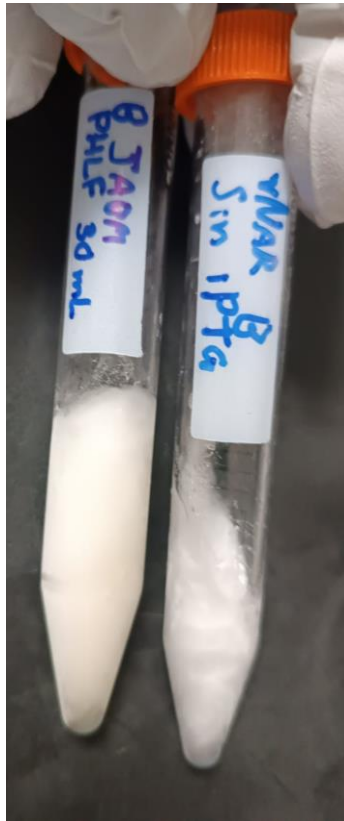
Se llevó entonces la membrana al fotodocumentador para obtener una imagen de ella (Figura 20). En esta se ve que, efectivamente, se revelaron bandas que indican la presencia de las construcciones de vNARs sentido A en las eluciones conseguidas tras las IMACs.



**Figura 20. Fotografía tomada en el fotodocumentador GelDoc Go de Bio-Rad de la membrana con muestras de las eluciones de vNAR sentido A tras el proceso de transferencia semi-seca. Se resaltan con un rectángulo amarillo las bandas que indican la presencia de la 6His y, por consiguiente, de las construcciones de vNARs sentido A.**

*IMAC del extracto proteico con el vNAR sentido B inducido con IPTG y obtenido de la pastilla de E. coli BL21 proveniente del cultivo realizado en 30 mL de medio de cultivo*

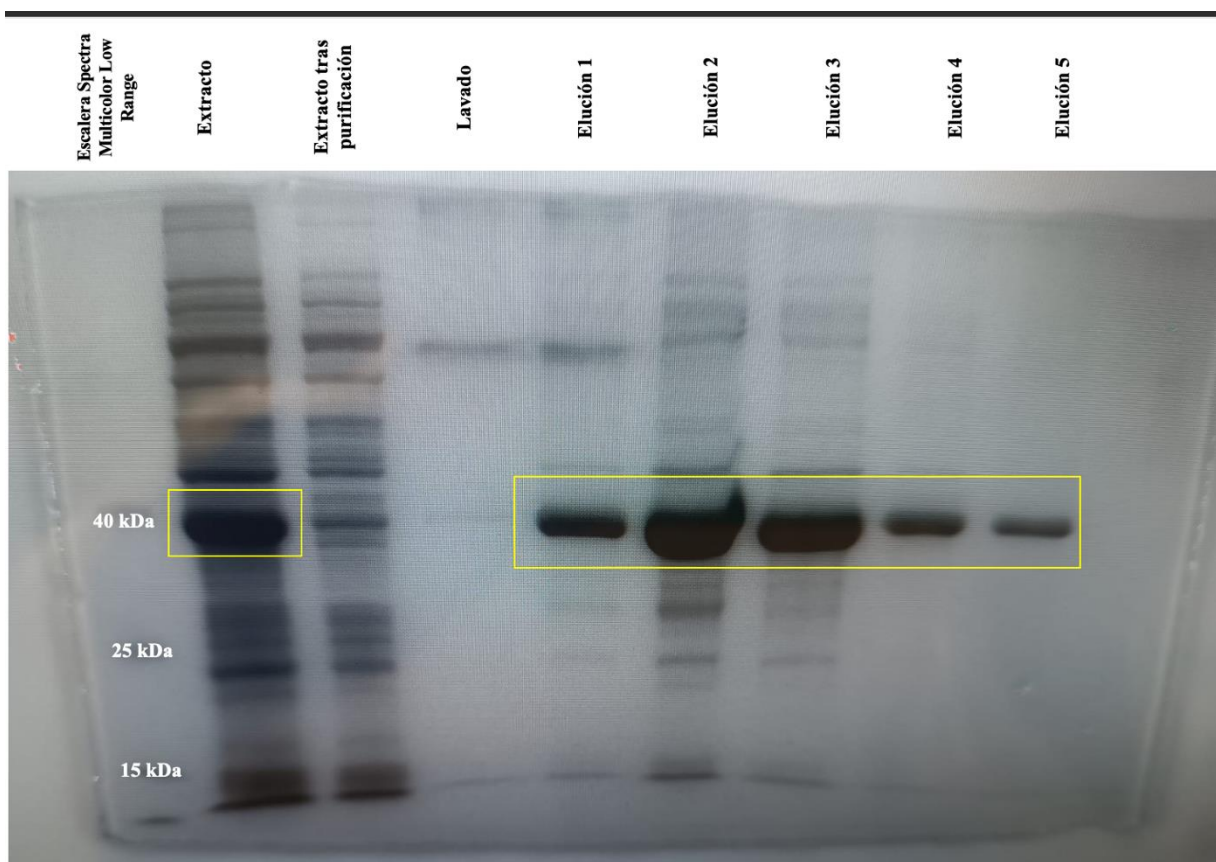
Para llevar a cabo la purificación del extracto proteico con el vNAR sentido B inducido con IPTG y obtenido de la pastilla de *E. coli* BL21 proveniente del cultivo realizado en 30 mL de medio de cultivo (Figura 21) se siguió el mismo procedimiento que se ha indicado de manera previa en el presente PAP. En este caso, se usó 1 mL de resina NiNTA y se colectaron 800  $\mu$ L de cada elución.



**Figura 21. Extractos proteicos con el vNAR sentido B inducido con IPTG (izquierda) y no inducido (derecha) obtenidos de la pastilla de *E. coli* BL21 proveniente del cultivo realizado en 30 mL de medio de cultivo.**

*Precipitación, desnaturalización y SDS-PAGE de las eluciones de vNAR sentido B obtenidas de la purificación del extracto proteico de la pastilla de E. coli BL21 proveniente del cultivo realizado en 30 mL de medio de cultivo*

Las metodologías para realizar la precipitación, la desnaturalización y la SDS-PAGE de las eluciones de vNAR sentido B obtenidas de la purificación del extracto proteico de la pastilla de *E. coli* BL21 proveniente del cultivo realizado en 30 mL de medio de cultivo fueron las mismas anteriormente expuestas en el presente PAP. La Figura 22 muestra el gel de poliacrilamida tras la electroforesis. Aquí se pueden ver bandas como las que se identificaron como el vNAR sentido A mediante el *Western Blot* de la Figura 20, por lo que se puede plantear que estas corresponden al vNAR sentido B.



**Figura 22.** Fotografía tomada en el fotodocumentador GelDoc Go de Bio-Rad del gel con muestras de las eluciones de vNAR sentido B obtenidas de la purificación del extracto proteico de la pastilla de *E. coli* BL21 proveniente del cultivo realizado en 30 mL de medio de cultivo tras el proceso de

**electroforesis. Se resaltan con rectángulos amarillos las bandas que se plantearon eran las construcciones de vNARs sentido B expresadas.**

### *Banco maestro y bancos de trabajo*

Como ya se ha mencionado, para producir una proteína recombinante primeramente debe identificarse el gen que la produce y luego insertarlo en un plásmido que se introduce en un hospedero como lo puede ser una bacteria, levadura o célula animal. Tras esto, deben aislarse aquellas células que expresen la proteína recombinante y, una vez hecho esto, subcultivarse las que generen dicha proteína en mayor cantidad. Las células subcultivadas se almacenan en crio-viales a -80 °C o en nitrógeno líquido, creándose lo que se denomina como banco maestro (BM). Cuando los viales de este banco maestro se subcultivan se constituye un banco de trabajo (BMT) [26], cuyas células se emplean para la producción de la proteína recombinante.

### *Creación de un banco maestro de E. coli BL21 transformada*

Se preparó medio LB con 1.4 % p/v de agar bacteriológico, el cual se esterilizó en una autoclave a 121 °C y 15 psi por 20 min. Se preparó entonces una campana de flujo laminar Telstar Bio II Advance Plus desinfectando su superficie con etanol al 70% v/v e irradiándola con luz UV durante 15 min. Ya en las condiciones de asepsia que este equipo brinda, se agregó kanamicina al medio de cultivo de tal manera que la concentración de este antibiótico quedó de 50 µg/mL. Una vez homogenizado el medio de cultivo se vertió este en cajas Petri, las que se dejaron gelificar para después almacenarse a 4 °C.

Luego, se tomaron dos placas Petri elaboradas de modo previo al inicio del presente PAP, las que también tenían medio LB y que igualmente se encontraban almacenadas a 4 °C. Una presentaba crecimiento de *E. coli* BL21 transformada con la construcción de vNAR sentido A; y la otra, células transformadas con la construcción de vNAR sentido B. Así, una de las cajas que se habían preparado recientemente fue sembrada por estriado en una de sus mitades

con células transformadas con el vNAR sentido A y en la otra con células transformadas con el vNAR sentido B. Se dejó incubando a 37 °C por 24 h en una incubadora Fisher Scientific.

Tras el periodo de incubación, y bajo condiciones de asepsia, se tomaron colonias de cada una de las mitades que fueron colocadas en microtubos de 1.5 mL con 1 mL de glicerol al 10% estéril como crioprotector.

### 1.6. Valoración de productos, resultados e impactos

Los resultados evidenciados en los geles de poliacrilamida de las Figuras 10, 12 y 19, así como en la membrana de nitrocelulosa de la Figura 20 indican que, en efecto, la expresión del vNAR sentido A ocurrió en una medida bastante considerable al hacer la inducción de la expresión de este en *E. coli* BL21 con IPTG. Además, el gel de la Figura 10, junto con el de la Figura 22, también permite plantear que muy probablemente sucedió lo mismo con el vNAR sentido B. Esto sugiere que los protocolos de extracción y de purificación que se realizaron son efectivos. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por [27], quienes trabajaron con dos dominios vNARs de *Ginglymostoma cirratum* que denominaron D1 y C4 y que fueron fusionados por medio de un *linker* flexible GlySer para constituir los dímeros D1-C4 y D1-D1. Todos los constructos de vNAR que crearon fueron purificados por medio de una IMAC con la etiqueta de polihistidinas. Al realizar la SDS-PAGE, los dominios monoméricos, expresados en *E. coli* inducida con IPTG, resultaron en bandas cercanas a los 15 kDa, lo cual se encuentra en el rango de pesos moleculares de los vNARs; mientras que la construcción D1-C4, expresada en *Pichia pastoris*, resultó en una banda de alrededor de los 35 kDa, lo que es similar al constructo trabajado en el presente PAP. Además, es necesario mencionar que el gel de poliacrilamida mostraba una única banda por carril, lo que puede interpretarse como el resultado de una purificación adecuada. De esta manera, si bien el método de extracción aplicado en las células de *E. coli* fue distinto (se usó una mezcla de reactivos), se tiene otro caso en el que la IMAC es un proceso de purificación adecuado para construcciones de vNARs.

Otro caso es el de [28], en el que a través de una tecnología de despliegue en fagos se aisló un vNAR de *H. francisci* que neutralizaba TNF- $\alpha$  humano recombinante. En este trabajo,

después de llevar a cabo el rompimiento celular mediante un choque osmótico, se recurre a la IMAC seguida de una diálisis para la purificación. Si bien la cromatografía de estos autores difería de la que se efectuó en el presente PAP, la SDS-PAGE y el *Western Blot* que se realizaron mostraron la presencia del vNAR con un peso molecular aproximado de 15 kDa. Así, se vuelve a corroborar la utilidad del método para la purificación de los dominios biespecíficos trabajados en el presente PAP.

Las características de los resultados obtenidos en el presente PAP contribuyen entonces al avance del proyecto “Evaluación del Efecto de Dominios Biespecíficos vNAR en un Modelo 3D de Artritis Reumatoide” al demostrar la expresión, al menos, del vNAR sentido A en los sistemas de inducción con IPTG. Este avance, a su vez, conlleva un impulso al desarrollo de alternativas biotecnológicas para el tratamiento de padecimientos con alto impacto a nivel nacional e internacional como lo es la artritis reumatoide.

A lo largo de la realización del presente PAP se logró entonces estandarizar un proceso para el lisado celular y extracción de dominios biespecíficos de vNAR a partir del trabajo realizado con las pastillas celulares provenientes de las inducciones en 30 mL de medio de cultivo que luego se aplicó en una pastilla generada en una inducción en 100 mL de medio de cultivo. También, se estandarizó el proceso de purificación mediante IMAC comenzando igualmente con pastillas de inducciones en volúmenes de 30 mL. Los análisis de los resultados de estos procedimientos se hicieron por medio de SDS-PAGE, cuyo gel resultante era teñido con azul de Coomassie o utilizado para *Western Blot* con transferencia semi-seca; siendo estas las técnicas que permitieron determinar el éxito de las extracciones y purificaciones. Además de todo esto, también fue posible establecer el banco maestro de las células de *E. coli* BL21 productoras de la construcción de vNAR sentido A, así como de las células productoras de la construcción de vNAR sentido B.

De los aspectos que quedaron sin resolver están la extracción y purificación, así como su análisis por SDS-PAGE de las pastillas correspondientes a los cultivos productores de vNAR sentido B en volúmenes de 100 mL. De la misma forma, para un siguiente trabajo podría realizarse una cromatografía líquida de proteínas de alta velocidad (FPLC, por sus siglas en

inglés) para implementarlo como otro método de purificación de los dominios biespecíficos de vNAR, así como un ensayo de inmuoadsorción ligado a enzima (ELISA, por sus siglas en inglés) con el fin de comprobar la afinidad de los vNARs. Además, también debe mencionarse que sería muy relevante llevar a cabo ensayos *in vitro* para estudiar la acción del vNAR en un ambiente con células, ya sean estos en 2D (monocapa) o en 3D (con scaffolds, esferoides, etc.); teniendo los segundos mayor pertinencia fisiológica.

### 1.7. Bibliografía y otros recursos

- [1] CIATEJ, «Historia del CIATEJ 46 años,» 24 August 2022. [En línea]. Available: <https://www.facebook.com/watch/?v=1208021196644514>. [Último acceso: 1 September 2023].
- [2] CIATEJ, «Ciencia y Tecnología para el Desarrollo Sostenible,» CIATEJ, 2023. [En línea]. Available: <https://ciatej.mx/el-ciatej/quienes-somos>. [Último acceso: 1 September 2023].
- [3] CIATEJ, «Biotecnología Médica y Farmacéutica,» CIATEJ, 2023. [En línea]. Available: <https://ciatej.mx/investigacion/biotecnologia-medica>. [Último acceso: 1 September 2023].
- [4] Encyclopædia Britannica, "Immune system," Encyclopædia Britannica, [Online]. Available: <https://academic-eb-com.ezproxy.iteso.mx/levels/collegiate/article/immune-system/109569>. [Accessed 28 September 2023].
- [5] M. A. Mir, S. S. Hamdani, U. Mehraj, H. Qayoom, B. A. Sheikh, S. Nisar and B. A. Bhat, "Antigens and Immunogens," in *Basics and Fundamentals of Immunology*, New York, Nova Medicine and Health, 2020, pp. 77-116.
- [6] P. J. Delves, S. J. Martin, D. R. Burton and I. M. Roitt, *Roitt's Essential Immunology*, Hoboken: Wiley-Blackwell, 2011.
- [7] J. A. Badillo-Mata, T. A. Camacho-Villegas and P. H. Lugo-Fabres, "3D Cell Culture as Tools to Characterize Rheumatoid Arthritis Signaling and Development of New Treatments," *Cells*, vol. 11, no. 21, p. 3410, 2022.
- [8] P. Seo, *Oxford American Handbook of Rheumatology*, Oxford: Oxford University Press, 2013.
- [9] B. C. Facinelli, «Preface,» de *Immunotherapy: Activation, Suppression and Treatments*, New York, Nova Science Publishers, Inc., 2010, p. vii.
- [10] P. Parham, *El Sistema Inmune*, Ciudad de México: El Manual Moderno, 2011.
- [11] W. S. Cheong, C. Y. Leow, A. B. A. Majeed y C. H. Leow, «Diagnostic and therapeutic potential of shark variable new antigen receptor (VNAR) single domain antibody,» *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 147, pp. 369-375, 2020.

- [12] CIATEJ, «Sede Guadalajara,» CIATEJ, 2023. [En línea]. Available: <https://ciatej.mx/el-ciatej/sede/guadalajara>. [Último acceso: 29 September 2023].
- [13] S. Koarada, N. Ono y Y. Tada, «Basic Knowledge of Rheumatoid Arthritis,» de *Rheumatoid Arthritis: A Systematic Approach*, Sharjah, Bentham Science Publishers, 2018, pp. 1-3.
- [14] G. N. Arenaza-Corona, B. Corina-Sosa y H. Mendieta-Zerón, «Inmunología y papel de la fototerapia en artritis reumatoide y embarazo,» *Investigación Clínica Mexiquense*, vol. 1, n° 1, pp. 26-35, 2022.
- [15] A. Movasat Hajkhan, A. Turrión Nieves, C. Bohorquez Heras y A. Pérez Gómez, «Tratamiento de la artritis reumatoide,» *Medicine*, vol. 12, n° 28, pp. 1626-1638, 2017.
- [16] O. Cabanillas-Bernal, S. Dueñas, M. Ayala-Avila, A. Rucavado, T. Escalante y A. F. Licea-Navarro, «Synthetic libraries of shark vNAR domains with different cysteine numbers within the CDR3,» *PLoS One*, vol. 14, n° 6, 2019.
- [17] A. Tejeda Mansir, R. M. Montesinos Cisneros y R. Guzmán Zamudio, *Bioseparaciones*, Hermosillo: Pearson, 2011.
- [18] J. G. Carrillo Soto, *Proyectos de las sublíneas de investigación que conforman la unidad de Biotecnología vegetal.*, Caborca: Universidad de Sonora, 2012.
- [19] S. Ijaz and I. U. Haq, *Recombinant DNA Technology*, Newcastle upon Tyne: Cambridge Scholars Publishing, 2019.
- [20] D. S. T. Nicholl, *An Introduction to Genetic Engineering*, Cambridge: Cambridge University Press, 2008.
- [21] S. Dobres, G. Mula, J. Sauer y D. Zhu, «Applications of 3D printed chimeric DNA biomaterials,» *Engineered Regeneration*, vol. 3, n° 1, pp. 13-23, 2022.
- [22] A. R. Márquez Ipiña, *Establecimiento de un Método de Purificación de Proteínas Recombinantes, Basado en Etiquetas de Histidina, Producidas en Pichia Pastoris*, Monterrey: Universidad Autónoma de Nuevo León, 2011.
- [23] D. P. Clark, *Molecular Biology*, Amsterdam: Academic Cell, 2005.
- [24] S. N. Rai, M. R. Gedda, W. Zahra, H. Birla, S. S. Singh, P. Singh, N. Tiwari, R. K. Singh and S. P. Singh, "A Modified Western Blot Protocol for Enhanced Sensitivity in the Detection of a Tissue Protein," in *Protocols Used in Molecular Biology*, Bentham Science Publishers Ltd, 2020, pp. 35-36.
- [25] A. Ntoukas, A. Niarchos, A. C. Tsika, S. Mantzoukas, G. A. Spyroulias y K. Poulas, «A quantitative western blot technique using TMB: Comparison with the conventional technique,» *ELECTROPHORESIS*, vol. 42, n° 6, pp. 786-792, 2021.
- [26] R. A. Gamboa y M. A. Trujillo-Roldán, «Un acercamiento a la producción de proteínas recombinantes terapéuticas de uso humano,» *El Residente*, vol. 4, n° 3, pp. 87-91, 2009.
- [27] O. C. Ubah, J. Steven, M. Kovaleva, L. Ferguson, C. Barelle, A. J. R. Porter y C. J. Barelle, «novel, anti-hTnF- $\alpha$  Variable new antigen receptor Formats with enhanced neutralizing Potency and Multifunctionality, generated for Therapeutic Development,» *Frontiers in Immunology*, vol. 8, pp. 1-13, 2017.

[28] T. Camacho-Villegas, T. Mata-Gonzalez, J. Paniagua-Solis, E. Sanchez y A. Licea, «Human TNF cytokine neutralization with a vNAR from *Heterodontus francisci* shark: A potential therapeutic use,» *mAbs*, vol. 5, n° 1, pp. 80-85, 2013.

### 1.8. Anexos generales

No se cuenta con anexos.

## 2. Productos

El producto del presente PAP es el RPAP mismo, para el cual se realizaron procedimientos experimentales que permitieron estandarizar las metodologías y condiciones de extracción y purificación de dominios biespecíficos de vNARs en dos sentidos distintos; lo cual forma parte del proyecto “Evaluación del Efecto de Dominios Biespecíficos vNAR en un Modelo 3D de Artritis Reumatoide” perteneciente al CIATEJ. La tabla 6 es la ficha del producto.

**Tabla 6. Ficha del producto.**

<b>Nombre y código del PAP</b>	4G03A PROGRAMA DE APOYO A CENTROS DE INVESTIGACIÓN EXTERNOS II
<b>Nombre del proyecto</b>	Expresión y Caracterización de un vNAR Biespecífico
<b>Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):</b>	Este RPAP contiene las metodologías necesarias para la extracción y purificación de los dominios biespecíficos de vNARs con las que se trabaja en el proyecto “Evaluación del Efecto de Dominios Biespecíficos vNAR en un Modelo 3D de Artritis Reumatoide”, así como el proceso que se siguió para estandarizarlas. Además, también describe el procedimiento que se siguió para crear un banco maestro de las cepas productoras. Fue elaborado para el CIATEJ bajo la dirección de la Dra. Tanya Amanda Camacho Villegas y la asesoría de la M. C. Jessica Andrea Badillo Mata.
<b>Autores:</b>	Ramón Efrén Espinoza Sosa

## 3. Reflexión crítica y ética de la experiencia

El RPAP tiene también como propósito documentar la reflexión sobre los aprendizajes en sus múltiples dimensiones, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto para compartir una comprensión crítica y amplia de las problemáticas en las que se intervino.

### 3.1 Sensibilización ante las realidades

La realización del presente PAP me permitió abordar la problemática de salud que representa la artritis reumatoide, enfermedad que incide de manera importante a nivel nacional e internacional y cuya naturaleza autoinmune provoca afectaciones crónicas en la salud de los pacientes que la padecen. Más precisamente, me involucré en esto a través de una potencial alternativa generada desde las áreas de la biotecnología médica y de la biotecnología marina: las construcciones biespecíficas de dominios vNARs. Asimismo, lo ya mencionado, junto con la revisión bibliográfica que hice para elaborar el presente RPAP, me permitió sensibilizarme respecto a la situación que atraviesan las personas que sufren de artritis reumatoide.

En general, puse en juego las aptitudes y actitudes requeridas por un ingeniero en biotecnología. De esta manera, pude percatarme del papel y de la responsabilidad que tendré como profesionista de contribuir a la solución de distintos problemas desde diferentes áreas de acción como lo es la biotecnología médica y farmacéutica. También fui capaz de observar como los mismos recursos con los que se cuenta en la región o país en el que se desenvuelve el biotecnólogo pueden ser aprovechados para la creación de nuevas tecnologías, puesto que *H. francisci* es una especie de tiburón que se encuentra en aguas marinas mexicanas y cuya capacidad de generar IgNARs se aprovechó de forma previa al presente PAP para producir proteínas recombinantes terapéuticas.

Además delo anterior, mi participación en el Festival Papirolas 2023 como parte del taller “Descubre las Maravillas Marinas a través de la Ciencia” realizado por el CIATEJ, específicamente en el día correspondiente a “Biofarmacia Marina” en el que se habló a 346 niños acerca de los vNARs de tiburones y mantarrayas y de las conotoxinas obtenidas de caracoles marinos me permitió ser parte de un medio de divulgación de la ciencia; algo que tiene una gran relevancia para que las infancias mexicanas se acerquen a la ciencia de una forma didáctica, adecuada a su edad y divertida.

## 3.2 Aprendizajes logrados

Al momento de iniciar el presente PAP me encontraba familiarizado con el fundamento teórico de varias de las técnicas que empleé. Sin embargo, prácticamente ninguna de ellas la había realizado en el laboratorio. La extracción de una proteína de interés, la IMAC, la preparación de geles de poliacrilamida, la SDS-PAGE, el *western blot*, la siembra por estriado, el aislamiento de colonias y la creación de un banco maestro son procedimientos que nunca o casi nunca había llevado a cabo. Por ejemplo, en la asignatura de Ingeniería Metabólica y Biocatálisis tuve una práctica en la que se hacía una SDS-PAGE. No obstante, el gel ya se encontraba hecho y cada persona solo cargó un pocillo.

Otro caso es el de las prácticas de la materia de Laboratorio de Microbiología, en las que en una ocasión sembré por estriado, pero desde ese entonces no lo había vuelto a hacer y, debido a la contingencia por COVID-19 que inició cuando estaba cursando esa clase no me fue posible realizar en ese momento un aislamiento de colonias. Por su parte, en las prácticas de la asignatura de Bioseparaciones llevé a cabo la extracción de carotenoides y una cromatografía de capa fina para su purificación, pero no había efectuado la extracción de una proteína y desconocía la IMAC.

Además de los aprendizajes técnicos, durante el desarrollo del presente PAP me fue posible darme cuenta de la importancia que tienen el trabajo colaborativo y el asesoramiento para que los objetivos de un proyecto puedan alcanzarse. Para mí fue muy importante recibir el apoyo de mi directora, de mi asesora y de otros estudiantes que forman parte del mismo equipo en el que trabajé. Dado el desconocimiento que tenía de la mayor parte de los procedimientos me resultó esencial contar con la ayuda de otros para entenderlos y efectuarlos del modo correcto. Asimismo, me pareció que trabajar con distintas personas resulta enriquecedor y permite ampliar la forma de pensar y de trabajar.

## 3.3 Inventario de competencias Inicial (ingreso del PAP) e Inventario de competencias Final (salida al PAP).

Competencia	Evidencia	Relevancia/Fortaleza*	Competencias potencializadas	Competencias adquiridas	
Conocimientos	Empleo de material y equipo de laboratorio.	Trabajo llevado a cabo en distintas asignaturas y proyectos.	Para la ejecución de un proyecto de tipo experimental es indispensable conocer la manera correcta de utilizar el equipo y los materiales para obtener resultados fiables, evitar su desperdicio y daño, optimizar el tiempo y garantizar la seguridad de los usuarios.	Aumenté mi experiencia en el manejo de varios materiales y equipos de laboratorio. Reforcé la preparación de buffers y medios de cultivo. Aprendí a hacer una SDS-PAGE de manera correcta. Hice una interpretación de resultados mucho más formal, consciente y acertada. Colaboré bastante con otras personas. Esta colaboración fue esencial para desarrollar el PAP.	Preparación de geles de poliacrilamida. Extracción de proteínas recombinantes y purificación a través de IMAC. Realización de <i>western blot</i> . Creación de bancos maestros. Mejora continua del trabajo por medio de la retroalimentación entre pares. Preparación de material para la divulgación de la ciencia a niños.
	Trabajo bajo técnicas de asepsia.	Trabajo llevado a cabo en distintas asignaturas y proyectos.	Cualquier procedimiento de cultivo de células, ya sean estas de origen microbiano, vegetal o animal, requiere mantener condiciones de asepsia para evitar la contaminación.		
	Realización de cultivos biológicos.	Trabajo llevado a cabo en distintas asignaturas y proyectos.	Los cultivos de células o tejidos constituyen una de las piezas fundamentales de una gran cantidad de trabajos de laboratorio y de la industria al permitir, por ejemplo, la generación de metabolitos o biomasa y la evaluación de productos destinados a su uso en humanos.		
	Preparación de soluciones y medios de cultivo.	Trabajo llevado a cabo en distintas asignaturas y proyectos.	En el laboratorio es necesario preparar soluciones de distintos solutos como sales inorgánicas, ácidos y bases para la realización de diferentes metodologías. Por su parte, los medios de cultivo deben cumplir con los requerimientos nutricionales que demanda el microorganismo, célula o tejido por cultivar.		
	Clonación <i>in silico</i> .	Trabajo realizado en las asignaturas de <i>Biología Molecular</i>	El proceso de clonación de genes <i>in silico</i> permite simular el		

		<i>Aplicada, Ingeniería Genética y Regulación e Ingeniería Metabólica y Biocatálisis.</i>	proceso que se llevaría a cabo para expresar un gen en un organismo diferente y así determinar si se trata de un proceso factible de ejecutar en laboratorio.		
	Realización de electroforesis	Trabajo realizado en las asignaturas de <i>Biología Molecular Aplicada, Ingeniería Genética y Regulación e Ingeniería Metabólica y Biocatálisis.</i>	La electroforesis en geles de agarosa y de poliacrilamida hace posible detectar la presencia ácidos nucleicos y de proteínas, respectivamente.		
	Realización de bioseparaciones a nivel laboratorio.	Aprobación de la asignatura de <i>Bioseparaciones</i> , en la que se diseñó y simuló por computadora el <i>downstream</i> de la producción de estreptomycin; a la par que se efectuó el proceso de separación de astaxantina a nivel laboratorio.  Purificación de la proteína GFP en una práctica de laboratorio incluida en la asignatura <i>Ingeniería Genética y Regulación.</i>	Los procesos de separación correctos que no dañen la funcionalidad del producto son esenciales para concluir un bioproceso de manera exitosa.		
<b>Habilidades</b>	Planteamiento de diseños experimentales.	Aprobación de la asignatura <i>Diseño de Experimentos</i> y proyectos.	Plantear un diseño experimental es uno de los puntos de partida más importantes para el inicio de muchas investigaciones.		
	Interpretación de resultados de laboratorio.	Trabajo llevado a cabo en distintas asignaturas y proyectos.	Hacer una correcta interpretación de los resultados experimentales posibilita darle sentido al trabajo realizado, compararlo y hacer conclusiones.		
	Comparación del trabajo realizado con la bibliografía.	Trabajo llevado a cabo en distintas asignaturas y proyectos.	La comparación permite ubicar el trabajo realizado respecto a lo ya		

			existente y obtener conclusiones como lo que realmente se está aportando, si los resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores, si hay la posibilidad de haber encontrado algo nuevo, etc.		
	Planeación de actividades y toma de decisiones.	Trabajo llevado a cabo en distintas asignaturas y proyectos.	Realizar una planeación adecuada es fundamental para optimizar tiempo y recursos y para asignarle a cada actividad el tiempo que necesita para llevarse a cabo. Por otro lado, la toma de decisiones fundamentada y rápida es necesaria, sobre todo cuando se presenta alguna situación o dificultad relacionada con el proyecto.		
Actitudes	Responsabilidad .	Trabajo llevado a cabo en distintas asignaturas y proyectos.	Hacerse responsable por el trabajo que se realiza es de suma importancia para llegar a obtener resultados y para evitar el desperdicio de recursos y tiempo.		
	Colaboración.	Trabajo llevado a cabo en distintas asignaturas y proyectos.	La disposición y apertura al trabajo conjunto es imprescindible tanto para desarrollar el trabajo propio como para que los otros logren desarrollar el suyo. Esto se evidencia más en trabajos que se deben hacer en equipo.		
	Convivencia sana.	Trabajo llevado a cabo en distintas asignaturas y proyectos.	Mantener un buen ambiente de trabajo favorece que las actividades planeadas puedan ejecutarse de acuerdo con lo planeado y con menor cantidad de obstáculos.		
	Empatía.	Trabajo llevado a cabo en distintas	La empatía forma parte de los elementos de inteligencia emocional		

		asignaturas y proyectos.	que contribuyen al desarrollo de actividades en equipo.		
	Respeto.	Trabajo llevado a cabo en distintas asignaturas y proyectos.	El respeto hacia las demás personas, así como hacia su trabajo y tiempo, es de gran importancia para el desarrollo del trabajo en conjunto.		

El presente PAP me permitió fortalecer las competencias relacionadas con el manejo de equipo y material de laboratorio que ya conocía y las referentes al trabajo dentro de este lugar. Por otro lado, pude adquirir las competencias implicadas en la realización de las técnicas y procedimientos que llevé a cabo, así como las competencias relacionadas con una mayor colaboración entre pares.