



**Casa abierta al tiempo**

**Universidad Autónoma Metropolitana  
Unidad Iztapalapa**

Maestría en Biología Experimental

***“Desarrollo y caracterización de un minianticuerpo (scFv) que reconoce al  
Receptor de Transferrina 1 (TfR1) en células de Linfoma”***

TESIS QUE PRESENTA

Biol. Exp. Carlos Alberto Aguilar González

PARA OBTENER EL GRADO DE

Maestro en Biología Experimental

CVU: 718359

Matricula: 2153803833

Beca: 593011

Lugar donde se realizó la Tesis:

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa  
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Febrero 2018



Posgrado en  
**Biología Experimental**



**“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.**

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo con número de registro 593011 de la beca otorgada por CONACYT.

Este trabajo fue desarrollado en la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, del Hospital Infantil de México Federico Gómez, con el financiamiento de los proyectos CONACYT Ciencia Básica convocatoria 2013 con registro 222446, e Infraestructura 2015 con registro 255341 y de Fondos Federales con registro HIM-2015-002 SSA 1189.



### Miembros del jurado

---

**Dra. Laura Josefina Pérez Flores**

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana

[laujperez@yahoo.com.mx](mailto:laujperez@yahoo.com.mx)

**Dra. Roxana Uri Miranda Labra**

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana

[roxml@xanum.uam.mx](mailto:roxml@xanum.uam.mx)

**Dra. Guillermina Juliana Baay Gúzman**

Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas

Hospital Infantil de México Federico Gómez

[guillebaay@hotmail.com](mailto:guillebaay@hotmail.com)

**M. en C. Gabriela Antonio Andrés**

Unidad de investigación en Enfermedades Oncológicas

Hospital infantil de México Federico Gómez

[gabya\\_24@yahoo.com.mx](mailto:gabya_24@yahoo.com.mx)



## Comité Tutorial

---

Co-director externo:

**Dr. Rosendo Luria Pérez**

Investigador en Ciencias Médicas D

Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas

Hospital Infantil de México Federico Gómez

[rluria@himfg.edu.mx](mailto:rluria@himfg.edu.mx), [rluria@protonmail.com](mailto:rluria@protonmail.com)

52289917 ext:4401

Co-director interno:

**Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz.**

Profesor Titular Investigador

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Departamento Ciencias de la Salud.

[legq@xanum.uam.mx](mailto:legq@xanum.uam.mx)

55-5804-4730

Asesor:

**Dr. Gustavo Ulises Martínez Ruiz**

Hospital Infantil de México Federico Gómez



Posgrado en  
**Biología Experimental**

División de Investigación, Facultad de Medicina, UNAM

[gmartinez@himfg.edu.mx](mailto:gmartinez@himfg.edu.mx)

52289917



## **Dedicatorias**

Le dedico esta tesis a mis padres que son una bendición en mi vida, siempre apoyan cada paso que doy en mi camino, porque han creído en mi, en mis decisiones y me han dejado ser el hombre que deseo. Gracias por su amor, comprensión y el esfuerzo que cada día me brindan, los amo.

A mi abuela Cristina Bravo, que siempre me trato con ternura, en tu memoria.

A mi abuelo, Raimundo González, que siempre me dio ánimos para salir adelante.

También se la dedico a mis amigos, primos y hermanos del alma, porque me entregan parte de su tiempo para darme ánimo y llenarme de energía en las buenas y en las malas.



## **Agradecimientos**

---

Al Dr. Rosendo Luria por haberme aceptado como parte de su equipo de trabajo, por la paciencia y todas las enseñanzas tanto como maestro así como amigo.

Al Dr. Luis Gómez Quiroz por sus grandes enseñanzas, haber creído en mi y haberme apoyado en mi formación hasta estos días.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Mónica Torres, Mónica Arteaga, Raquel Acevedo, Ana Lázaro, Marilú Rodríguez, Jonathan Bautista, Mayra Montecillo, Esteban Rodríguez, Daniel Cueto, Cesar Bermudez, Ariel Vilchis, Mario Morales Anaid Rivas y Berenice Camacho, por los grandes momentos que vivimos dentro y fuera del laboratorio.

A mis compañeros del grupo de maestría Luis, Alejandra, Abril, Rebeca, Alejandro, Paola, Ignacio, Jeshermi, Rafael y Angeles por acompañarnos y hacer un gran equipo al salir adelante en esta etapa de la vida.

A compañeros Paola Muñoz, Armando Mateos, Omar Ugarte y Daniel Duarte, personas invaluable que ahora son mis grandes amigos para esta etapa de mi vida, porque me ayudaron a salir delante de todos los baches dentro y fuera del laboratorio.

A mis hermanos del alma Adriana Genis, Narensy Sepúlveda, Norma Moreno, Blanca López, Yheran Muñoz y Alan Perea, porque me han acompañado en los momentos mas importantes, para bien y para mal siempre.



A mis primos Paloma Aguilar, Guillermo Castillo, Pablo Aguilar, Paulina Aguilar, Rodrigo Castillo y mi familia en general porque siempre han creído en mi, me han tratado con amor y me han arropado para todos mis grandes y pequeños momentos, los amo.

A Sandra Morales por haberme acompañado en gran parte de este momento y apoyarme dándome consejos y ánimos.



## Resumen

Los Linfomas forman parte de las neoplasias hematopoyéticas que se presentan en la población infantil a nivel mundial, cuyo número de casos anuales incrementa considerablemente; en la actualidad se han descrito varios factores involucrados en el desarrollo de estas neoplasias, dentro de los cuales se encuentran factores ambientales, físicos, químicos, mutaciones genéticas, entre otros. Estos factores pueden promover diversas alteraciones celulares como la desregulación en la tasa de proliferación y muerte celular, las cuales son características asociadas a células cancerosas. Las células transformadas presentan cambios en la expresión y el funcionamiento de diversas moléculas que intervienen en estos procesos, como el Receptor de Transferrina 1 (TfR1). TfR1 es una proteína que participa en la entrada de hierro al citosol, el cual es utilizado en la respiración celular y replicación del DNA. La sobre-expresión de esta proteína se ha asociado con los Linfomas de mayor agresividad como los no Hodgkin. No obstante que los tratamientos contra este tipo de neoplasias permiten una supervivencia del 85-90% a 5 años, existe una población (10-15%) que presenta fallas al tratamiento por diversas causas. Esto permite seguir buscando nuevas alternativas terapéuticas más efectivas contra este tipo de neoplasias hematopoyéticas. Una de estas alternativas es el empleo de anticuerpos contra distintos marcadores de membrana propios de las células cancerosas, que promueven la apoptosis, como el TfR1.

En este trabajo reportamos el desarrollo y la caracterización de un minianticuerpo de una sola cadena (scFv) anti-receptor de transferrina 1.



## Summary

Lymphomas are part of the hematopoietic neoplasms that occurs in childhood around the world, whose annual number of cases increases considerably; Nowadays, several factors involved in the development of these neoplasms have been described, including environmental, physical, chemical factors, genetic mutations, among others. These factors can promote various cellular alterations that involves dysregulation in the rate of proliferation and cell death, characteristics associated with cancer cells. Transformed cells show changes in the expression and functioning of various molecules involved in these processes, such as the transferrin receptor 1 (TfR1). TfR1 is a protein that participates in the iron uptake into cells, this iron is critical for DNA replication and cellular respiration. Over-expression of this protein has been associated with more aggressive lymphomas such as non-Hodgkin's. Although the treatments against this type of neoplasm allow a survival of 85-90% at 5 years, there is a population (10-15%) that has failures to treatment for various reasons. This allows us to continue looking for new therapeutic alternatives more effective against this type of hematopoietic neoplasms. One of these alternatives is the use of antibodies against different membrane markers characteristic of cancer cells, which promote apoptosis, such as TfR1.

In this work we report the development and characterization of a single chain antibody (scFv) anti-transferrin receptor 1.



## Índice

---

Resumen .....	1
Summary .....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.2. Linfomas en población pediátrica.....	6
1.3. Tratamiento de linfoma no hodgkin.....	7
1.4. Expresión del Receptor de Transferrina 1 (TfR1 ó CD71) en neoplasias hematopoyéticas.....	8
1.5. Anticuerpos anti Receptor de Transferina 1 como tratamiento contra el cáncer... 9	
1.5.1. Minianticuerpo de cadena sencilla (scFv) contra las neoplasias hematológicas. ....	11
1.5.2. scFv contra el Receptor de Transferrina 1. ....	12
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. ....	13
3. JUSTIFICACIÓN. ....	14
4. OBJETIVOS DEL PROYECTO. ....	15
4.1. Objetivo general.....	15
4.2. Objetivos particulares.....	15
5. HIPÓTESIS. ....	16
6. MATERIAL Y MÉTODOS. ....	16



6.1 Sistema pMAL 5X. ....	18
6.2. Técnicas del ADN recombinante.....	20
6.3. PCR para la obtención del scFv anti-TfR1.....	20
6.4. Construcción de los plásmidos pMAL c5X scFv Anti-TfR1 y pMAL p5X scFv Anti-TfR1.....	21
6.5. Transformación de bacterias por choque térmico.....	23
6.6. Cultivo de bacterias.....	23
6.7. Análisis de restricción.....	24
6.8. Condiciones de inducción.....	24
6.9. Condiciones de sonicación.....	25
6.10. Cuantificación de proteína.....	26
6.11. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE).....	26
6.12. Ensayo de Western Blot (WB).....	27
6.13. Ajuste MBP.....	28
6.14. Ensayos de ELISA.....	28
6.15. Ensayos de citometría de flujo.....	30
6.16. Cromatografía de afinidad.....	30
7. RESULTADOS.....	31
7.1. Obtención del fragmento que codifica para el minianticuerpo (scFv) Anti-TfR1..	31
7.2. Obtención del plásmido pMAL c5X scFv Anti-TfR1 que codifica para la proteína MBP-scFv anti-TfR1 expresada en el citosol bacteriano.....	35



7.3. Obtención del plásmido pMAL p5X scFv Anti-TfR1 que codifica para la proteína MBP-scFv anti-TfR1 expresada en el periplasma bacteriano. ....	38
7.4. Análisis de expresión de la proteína MBP-scFv anti-TfR1 citosólica ó periplásmica.....	41
7.5. La proteína MBP-scFv anti-TfR1 citosólica ó periplásmica se une al TfR1.....	44
7.6. Purificación de la proteína de fusión .....	50
8. DISCUSIÓN.....	51
9. CONCLUSIÓN.....	55
10. BIBLIOGRAFÍA.....	55



## **1. INTRODUCCIÓN.**

### **1.1. Epidemiología de las neoplasias hematopoyéticas.**

El cáncer representa un gran problema de salud pública con una mortalidad anual de más de siete millones de personas en el mundo. A nivel mundial, las enfermedades oncológicas se ubican dentro de las primeras causas de muerte solo por debajo de las enfermedades cardiovasculares (Gomez-Dantes, Lamadrid-Figueroa et al. 2016), y se ha documentado que la frecuencia de cáncer en niños menores de 14 años ha aumentado de forma progresiva, actualmente representan el 11.4% de casos de cáncer a nivel mundial (Juarez-Ocana, Gonzalez-Miranda et al. 2004), colocándose dentro de las principales causas de muerte en la población de niños de 1 a 14 años (Chatenoud, Bertuccio et al. 2010). Con base en estudios reportados en distintas instituciones del sector salud, como el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) (Medina-Sanson, Martinez-Avalos et al. 2002) son consistentes con reportes recientes de las frecuencias de neoplasias malignas en niños derechohabientes del IMSS, en donde las Leucemias tienen una frecuencia de 46.1%, los tumores del sistema nervioso central 12% y los linfomas 10.8%. En este último grupo la mayor frecuencia fue para los Linfomas no Hodgkin con 62.7% (Fajardo-Gutierrez, Rendon et al. 2011).

### **1.2. Linfomas en población pediátrica.**

Los Linfomas, constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias del tejido linfoide, con frecuencia invaden la médula ósea y se presentan en sitios extra-ganglionares. Los linfomas se clasifican en dos grandes grupos: los linfomas de Hodgkin (LH) y los no



Hodgkin (LNH), siendo las variantes más agresivas los que pertenecen al segundo grupo. Los LNH representan el 90% de todos los linfomas, de los cuales el 85-90% provienen de linfocitos B y el resto son de Linfocitos T o NK (Sankari, Masthan et al. 2012). Los LNH presentan menor variabilidad en pacientes pediátricos que en adultos y la mayoría de las neoplasias linfoides que se presentan en menores de 17 años son: linfoma/leucemia de Burkitt (LB) con el 40% de los casos, linfoma difuso de células grandes de B (LDCGB) con el 30% de los casos; leucemia/linfoma linfoblástico (LL) con aproximadamente el 25% de los casos y linfoma anaplásico de células grandes (LACG) este último pertenece a la categoría de neoplasias de células T y NK y puede presentarse entre el 10 al 30% de los casos (Campo, Swerdlow et al. 2011).

### **1.3. Tratamiento de linfoma no hodgkin**

El tratamiento de elección de estas neoplasias es la quimioterapia con múltiples medicamentos (Pizzo and Poplack 2006). Actualmente existen diversos protocolos de tratamiento que permiten una supervivencia global del 80 al 90%. Los fármacos que presentan una mayor efectividad son: ciclofosfamida, adriamicina, metotrexate y vincristina para el linfoma de Burkitt. En el caso del linfoma linfoblástico se ha demostrado mejor respuesta con los protocolos que incluyen: vincristina, elaspar, dexametasona, adriamicina, metotrexate y 6-mercaptopurina (Sandlund, Downing et al. 1996) (Link, Shuster et al. 1997). La mayoría de los pacientes con LNH responden adecuadamente al esquema de tratamiento arriba mencionado, sin embargo, una respuesta parcial indica que el tumor tiene resistencia primaria, por lo tanto la



continuidad del mismo tratamiento tiene pocas probabilidades de éxito. En estos casos las opciones terapéuticas son pocas, como el trasplante de médula osea (Bosly, Coiffier et al. 1992) y la administración de anticuerpos monoclonales contra antígenos en linfocitos B (Rituximab, anti CD20) (Attias and Weitzman 2008) (Cheson and Leonard 2008) que han demostrado utilidad en algunos casos. De tal manera que una de las limitantes para el éxito completo del tratamiento por quimioterapia, está asociada al desarrollo de resistencia a los fármacos administrados (Blom and Spits 2006) (Shankland, Armitage et al. 2012).

Por este motivo es importante buscar alternativas terapéuticas más efectivas para los pacientes con linfoma no Hodgkin que presentan falla al tratamiento. Una de estas alternativas es el empleo de anticuerpos que promueven la apoptosis de las células tumorales, como los anticuerpos anti-Receptor de transferrina 1 (TfR1).

#### **1.4. Expresión del Receptor de Transferrina 1 (TfR1 ó CD71) en neoplasias hematopoyéticas.**

El transporte de hierro dentro de las células es realizado a través de la adquisición de su proteína acarreadora, Transferrina (Tf), y es llevada a las vesículas de reciclaje ácidas vía el Receptor de Transferrina tipo 1 (TfR1 ó CD71) (Ponka and Lok 1999) (Daniels, Delgado et al. 2006). El transporte subsecuente del hierro hacia las vesículas ácidas dentro del citoplasma es realizado por el transportador de metal divalente 1 (DMT1), mientras que el complejo apo-Tf-TfR es regresado a la superficie celular (Larrick, Enns et al. 1985) (Ponka and Lok 1999). La expresión del TfR1 se asocia con



la disponibilidad del hierro para la síntesis de las moléculas del grupo Hemo, y de muchos procesos metabólicos necesarios para el crecimiento y la proliferación celular. El patrón de expresión del TfR1 es muy limitado en tejido normal (Gatter, Brown et al. 1983) (Brandt, Baird et al. 1988), pero se encuentra elevado en células activadas como los linfocitos B y T, células NK, monocitos y macrófagos (Daniels, Delgado et al. 2006); esta sobre-expression también ha sido documentada en diversas neoplasias (Gatter, Brown et al. 1983) para satisfacer su alta demanda de hierro y mantener su alto grado de proliferación además se ha asociado con el grado de malignidad y progression (Larrick, Enns et al. 1985). La sobre-expresión de TfR1 se ha observado en pacientes con Leucemias linfoblásticas agudas y leucemias linfocíticas crónicas (Barnett, Wilson et al. 1987) (Płoszyńska, Ruckemann-Dziurdzińska et al. 2012). En los linfomas de Hodgkin y no Hodgkin la sobre-expresión de TfR1 correlaciona con los linfomas de mayor agresividad (Habeshaw, Lister et al. 1983) y representa un marcador importante para realizar diagnóstico de linfomas clásicos y para el diagnóstico diferencial entre el Linfoma de Burkitt y el Linfoma difuso de células B grandes CD10+ (Fromm, Thomas et al. 2009).

### **1.5. Anticuerpos anti Receptor de Transferina 1 como tratamiento contra el cáncer.**

TfR1 es un blanco atractivo para los agentes anti-tumorales, como los anticuerpos, especialmente aquellos que ayudan a inducir deprivación letal de hierro inhibiendo el crecimiento celular ó induciendo apoptósis en células hematopoyéticas malignas



(Crepin, Goenaga et al. 2010) (White, Taetle et al. 1990) (Ng, Dela Cruz et al. 2002) (Daniels, Delgado et al. 2006) (Crepin, Goenaga et al. 2010). A principio de los noventas se documentó el uso de un anticuerpo murino 42/6 específico para TfR1 humano, el cual la FDA recomendó su uso para investigaciones clínicas de fase II (Brooks, Taylor et al. 1995). Recientemente se ha desarrollado un anticuerpo quimérico ratón/humano con la región constante de la IgG3 humana y la región variable de un anticuerpo monoclonal de ratón específico para TfR1 humana (ch128.1) (White, Taetle et al. 1990, Ng, Helguera et al. 2006). Este anticuerpo fue fusionado genéticamente a la avidina de pollo a través de su extremo carboxilo-terminal (ch128.1Av) e indujo una gran toxicidad en una amplia variedad de células hematopoyéticas malignas (Ortiz-Sanchez, Daniels et al. 2009) (Ng, Helguera et al. 2006) (Ng, Dela Cruz et al. 2002, Daniels, Ng et al. 2007). Es importante notar que los anticuerpos ch128.1Av y ch128.1 no inhiben la unión de Transferrina al receptor TfR1 (Ng, Helguera et al. 2006, Rodríguez, Helguera et al. 2007), e inhiben la función de TfR1 por inducción de su secuestro, degradación y reducción de la adquisición de Tf a largo plazo, lo cual induce privación letal de hierro en diversas células de neoplasias hematopoyéticas malignas agresivas e incurables (Daniels, Ortiz-Sanchez et al. 2011) (Rodríguez, Luria-Perez et al. 2011).

Aunque estos anticuerpos han mostrado resultados prometedores en el tratamiento de las neoplasias hematológicas, aun requieren mayor investigación para resolver problemas como la baja capacidad de penetración que presentan los anticuerpos



completos para alcanzar las neoplasias sólidas ó semisólidas como los Linfomas, e incluso en Leucemias donde se forman nódulos o acumulaciones de células en la médula ósea u otros tejidos (Ball and Broome 2010). Una alternativa que permite mejorar la penetración de los anticuerpos en la zona tumoral, ha sido el desarrollo de los fragmentos de anticuerpos generados por proteólisis o ingeniería genética, uno de estos fragmentos con tamaños de 25 KDa son los fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) ó también llamados “minianticuerpos de cadena sencilla”, dado que estos fragmentos no poseen fracción constante (Fc), inducen menos efectos secundarios sobre las células que no expresan el antígeno y que tienen receptores Fc y además son moléculas de vida media corta (Ball and Broome 2010) (Ricart 2011).

### **1.5.1. Minianticuerpo de cadena sencilla (scFv) contra las neoplasias hematológicas.**

Los minianticuerpos de cadena sencilla (scFv), consisten de la región variable constante (VH) del anticuerpo unido por un péptido corto [(Gly4Ser)<sub>3</sub>] a la región variable ligera (VL). Los scFv representan el fragmento más pequeño del anticuerpo que aun tiene la propiedad de unirse al antígeno y es estable (Accardi L 2010).

El desarrollo de scFv ha ampliado el panorama de los tratamientos en los pacientes con linfomas y leucemias. Los scFv derivados de anticuerpos monoclonales y acoplados a moléculas inmunomoduladoras o citotóxicas han mostrado resultados muy alentadores en las neoplasias hematológicas (Accardi L 2010) (Kontermann 2012). Ejemplo de ello son los scFv contra el antígeno CD7 unido al ligando de Fas (FasL) para el tratamiento



de Leucemias (Bremer, ten Cate et al. 2006); el scFv contra el antígeno CD19 para el tratamiento de los padecimientos de leucemia/linfomas (Vallera, Chen et al. 2009); el scFv contra CD20 para el para el tratamiento de linfomas y leucemias (Geng, Feng et al. 2006); scFv contra el antígeno CD22 para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica y el scFv contra el antígeno CD33, el antígeno mas asociado a leucemia mielode aguda, este scFv fue acoplado a la molécula de TRAIL, y se ha sugerido su aplicación en las leucemias que son CD33 positivas (Bremer, ten Cate et al. 2006).

### **1.5.2. scFv contra el Receptor de Transferrina 1.**

Existen pocos reportes de scFv contra TfR1. En el año 2002, el grupo de Liang Xu y cols., reportó que un scFv con especificidad contra el receptor de transferrina acoplado químicamente a inmunoliposomas que contenían el gen de la proteína p53, ayudó a acarrear el gen de interés y aumento la eficiencia de su transfección en modelos tumorales humanos en ensayos in vitro e in vivo (Xu, Huang et al. 2002). En 2008, Jing Liu y cols., describieron la construcción de un scFv contra el receptor de transferrina el cual mantuvo la capacidad de unirse a células K562 (eritroleucemia crónica humana) y células HepG2 (hepatocarcinoma humana) y células mononucleares de sangre periférica (Liu, Xiao et al. 2008), y más recientemente, Crépin y cols., reportaron que un scFv contra el receptor de transferrina antagonizó el crecimiento de líneas celulares de linfomas y leucemias, y la administración de este scFv a un modelo de eritroleucemia en raton desnudo redujo la masa tumoral. En conjunto, estos datos sugieren que los scFv contra el receptor de transferrina representan una alternativa novedosa para el



tratamiento de tumores cuya proliferación depende de las altas concentraciones de receptor de transferrina y la adquisición de hierro, como es el caso de los linfomas (Crepin, Goenaga et al. 2010).

Considerando que en los linfomas existe sobre-expresión del receptor de transferrina, y que esta sobre-expresión está asociada a la resistencia a los tratamientos, nosotros proponemos construir un minianticuerpo con especificidad contra el receptor de transferrina, con la finalidad de inducir su degradación y eliminar a la célula por privación de hierro, este minianticuerpo también podría ser empleado para transportar moléculas citotóxicas o inductoras de apoptosis hacia la célula tumoral.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

El tratamiento de elección de los linfomas pediátricos es la quimioterapia con múltiples agentes. En la actualidad existen diversos protocolos de tratamiento que logran una supervivencia global del 80 al 90%. Sin embargo, la falla al tratamiento mediada entre otras causas por la resistencia a la quimioterapia, es de mal pronóstico para la enfermedad y evidencia la necesidad de desarrollar nuevas alternativas terapéuticas para eliminar a las células tumorales resistentes.

Diversos mecanismos condicionan la falla al tratamiento, entre ellos la sobre-expresión de moléculas como el Receptor de Transferrina 1 que participa en procesos importantes como el crecimiento y la proliferación celular y que está asociado a los linfomas de mayor agresividad.



Nuestra propuesta, es que las células de los LNH, que sobre-expresan al receptor de transferrina, sean reconocidos por el minianticuerpo anti-TfR1 e induzcan su muerte por privación de hierro. El abordaje científico de esta propuesta nos proveerá de una alternativa terapéutica que permitirá mejorar la calidad de vida de los pacientes pediátricos con linfomas.

### **3. JUSTIFICACIÓN.**

Los Linfomas son neoplasias que afectan los tejidos linfoides; de ellos, los LNH son los más agresivos y constituyen un serio problema de salud pública en nuestro país. El Hospital Infantil de México Federico Gómez recibe a través de su servicio de Hemato-Oncología un promedio de 250-300 casos nuevos de cáncer al año y mantiene en tratamiento alrededor de 750 pacientes según archivos del Departamento de Hemato-Oncología del HIMFG; de los pacientes que se reciben al año, aproximadamente el 12% pertenecen al grupo de los linfomas, y el 58 % de ellos son diagnosticados como LNH. Actualmente los esquemas convencionales de quimioterapia para el tratamiento de niños con LNH han logrado una importante mejoría en la supervivencia; sin embargo, el desarrollo de resistencia de las células tumorales continua siendo una de las principales causas de falla en los tratamientos, a tal grado que del total de pacientes con LNH que se reciben al año, aproximadamente el 10% presenta resistencia al régimen de quimioterapia inicial, asociándose en la mayoría de los casos con un mal pronóstico para la vida.



La generación de un minianticuerpo anti-TfR1 que elimine a la célula tumoral por privación de hierro nos proveerá la posibilidad de la generación de una alternativa terapéutica que permitirá revertir la resistencia de los agentes quimioterapéuticos en los pacientes con LNH refractarios, lo cual tendría un serio impacto en la práctica clínica y en la supervivencia de los pacientes.

#### **4. OBJETIVOS DEL PROYECTO.**

##### **4.1. Objetivo general.**

Desarrollar y caracterizar un minianticuerpo (scFv) que reconoce al receptor de transferrina 1 (TfR1) en células de Linfoma.

##### **4.2. Objetivos particulares.**

- 1.- Diseñar el minigen que codifica para el minianticuerpo (scFv) anti-TfR1.
- 2.- Construir el plásmido pMAL-p5X/c5X-scFv anti-TFR1, que contiene la secuencia que codifica para el minianticuerpo acoplado a la proteína de unión a maltosa.
- 3.- Evaluar la expresión en *Escherichia coli* de la proteína de fusión que contiene el minianticuerpo Anti- TFR1 y el reconocimiento a su antígeno específico.



## 5. HIPÓTESIS.

El minianticuerpo recombinante anti-TfR1 reconocerá a su antígeno en la superficie de células de linfoma.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS.

**Tabla 1. Cepas bacterianas.**

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) DH5 $\alpha$	<i>Sup E44 <math>\Delta</math>lac 169 <math>\phi</math>lacZ<math>\Delta</math>M15 hsdR17 recA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) BL21 (DE3)	<i>E. coli str. B F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-) <math>\lambda</math>(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(<math>\lambda</math>S)</i>	New England BioLabs

**Tabla 2. Líneas celulares.**

LÍNEA CELULAR	PROPIEDADES	REFERENCIA
Ramos (RA 1) (ATCC® CRL-1596™)	<i>Células derivadas de un linfoma de Burkitt que no posee el genoma del virus de Epstein Barr (EBV), son linfocitos de estirpe B.</i>	New England BioLabs

**Tabla 3. Primers y secuencias utilizadas.**

NOMBRE	SECUENCIA	CARACTERÍSTICAS
<i>scFv anti-TfR 1</i>	5'GAGGTT CAGTTGCAACAATCAGGCCAGAACTGGT CAAGCCAGGTGCTTCCATGAAAATCTCCTGTAAAGC AAGTGGCTATAGTTTTACAGGGTATACTATGAATTGG GTAAAGCAATCACACGGCGAGA ACTTGGAGTGGATT GGTCGTATCAACCCTCATAACGGGGGGACTGATTAC AATCAAAAGTTCAAAGACAAGGCTCCCTAACAGTGG ACAAATCATCTAACACCGCTTACATGGAGCTGTTGTC GTTGACCTCAGGGGACTCCGCCGTATACTACTGTGC GCGTGGGTACTACTATTATAGCTTGGACTATTGGGG	Minigen que codifica para el scFv, consta de 750 pares de bases.



	GCAGGGAACAAGTGTTACTGTAAGTGGTTCGGGATC TGGAGGCAGCGGAAGTGGCGGCAGTGGATCTCAGA TTGTACTIONACAGAGCCCCGCAATCATGAGTGCA GCCCCGGGGAGAAAGTCACCATGACTTGCTCGGCC TCGTTCGAGTATTCGCTATATCCATTGGTATCAACAAC GCCCCGGAACGTCACCAAAACGCTGGATTTATGACA CTTCTAATCTTGCATCTGGAGTGCCCGCACGTTTTAG TGGATCGGGTTCGGGTACCTCTTATTCGCTGACGAT TAGTTCAATGGAGGCGGAAGACGCGGCTACGTACTA TTGTCACCAACGTAATTCTTACCCTTGGACATTCCGGT GGGGGCACTCGCCTGGAATCCGTTAA3'	
<i>scFvF</i>	5'ACACGCGT <u>CGAC</u> GAGGTTTCAGTTGCAACAATCAGG C3'	Oligonucleótido sentido. Contiene el sitio de restricción Sall, consta de 36 pares de bases.
<i>scFvR</i>	5'CGCCGCGGATCCTTAACGGATTTCCAGGCGAGTG CC3'	Oligonucleótido anti-sentido. Contiene el sitio de restricción BamHI, consta de 36 pares de bases.

**Tabla 4. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos scFv Anti-TfR1.**

<b>scFv Anti-TfR1 nucleótidos (subunidad VH-(Linker GS)-VL)</b>
5'GAGGTTTCAGTTGCAACAATCAGGCCCGAGAACTGGTCAAGCCAGGTGCTTCCATGAAAATCTCCTGT AAAGCAAGTGGCTATAGTTTTACAGGGTATACTATGAATTGGGTAAAGCAATCACACGGCGGAGAACTT GGAGTGGATTGGTCGATCAACCCTCATAACGGGGGGACTGATTACAATCAAAAGTTCAAAGACAAG GCTCCCTTAACAGTGGACAAATCATCTAACACCGCTTACATGGAGCTGTTGTCGTTGACCTCAGGGG ACTCCGCCGTATACTACTGTGCGCGTGGTACTACTATTATAGCTTGGACTATTGGGGGCAGGGAAC AAGTGTTACTGTAAGTGGTTCGGGATCTGGAGGCAGCGGAAGTGGCGGCAGTGGATCTCAGATTGT ACTTACACAGAGCCCCGCAATCATGAGTGTGAGCCCCGGGGAGAAAGTCACCATGACTTGCTCGGC CTCGTCGAGTATTCGCTATATCCATTGGTATCAACAACGCCCGGAACGTCACCAAAACGCTGGATTT ATGACACTTCTAATCTTGCATCTGGAGTGCCCGCACGTTTTAGTGGATCGGGTTCGGGTACCTCTTAT TCGCTGACGATTAGTTCAATGGAGGCGGAAGACGCGGCTACGTACTATTGTCACCAACGTAATTCTT ACCCTTGGACATTCCGGTGGGGGCACTCGCCTGGAATCCGTTAA3'
<b>scFv Anti-TfR1 aminoácidos</b>
EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWWKQSHGENLEWIGRINPHNGGTDYDYNQKFKDKA PLTVDKSSNTAYMELLSLTSGDSAVYYCARGYYYYSLDYWGQGTSTVTV <b>SGSGSGSGSGSGS</b> QIVLT QSPAIVSVSPGKVTMTCSASSSIRYIHQYQRRPGTSPKRWIYDTSNLAGVSPARFSGSGSGTSSYSLTIS SMEAEDAATYYCHQRNSYPWTFGGGTRLEIR*



**Tabla 5. Plásmidos.**

<b>NOMBRE VECTOR</b>	<b>DEL</b>	<b>PROTEINA</b>	<b>CARACTERISTICAS</b>
pMAL-c2X Anti-TfR1	scFv	MBP-scFv Anti-TfR1	Este plásmido se obtuvo de la empresa IDT, consta de 7356 pares de bases (bp). La secuencia que codifica para el scFv Anti-TfR1 se encuentra en el sitio de multiclonación flanqueado por los sitios SacI en posición 5' y por el sitio BamHI en posición 3'. Esta proteína se traduce unida a la Proteína de Unión a Maltosa (MBP) codificada en el gen <i>malE</i> , la cual se encuentra río arriba de la secuencia que codifica para el scFv Anti-TfR1. La traducción de esta proteína quimérica está bajo el promotor <i>lac</i> .
pMAL-c5X		MBP	Plásmido comercial (New England BioLabs) utilizado para la expresión y purificación de proteínas recombinantes. Contiene el promotor " <i>lac</i> ", el gen <i>malE</i> y un sitio de multiclonación (MCS), donde puede ser introducido el gen de interés. Este vector permite la expresión citoplásmica de la proteína. El vector está constituido de 5677 pb.
pMAL-p5X		MBP	Plásmido comercial (New England BioLabs) utilizado para la expresión y purificación de proteínas recombinantes. Contiene el promotor " <i>lac</i> ", el gen <i>malE</i> y un sitio de multiclonación (MCS), donde puede ser introducido el gen de interés. Este vector permite la expresión periplásmica de la proteína. El vector está constituido de 5752 pb.
pMAL-c5X Anti-TfR1	scFv	MBP-scFv Anti-TfR1	Este plásmido fue construido en esta tesis. La secuencia que codifica para el scFv Anti-TfR1 (714pb) fue clonada en el MCS, flanqueado por los sitios Sall en posición 5' y por BamHI en posición 3'. Este plásmido consta de 6391 pb.
pMAL-p5X Anti-TfR1	scFv	MBP-scFv Anti-TfR1	Este plásmido fue construido en esta tesis. La secuencia que codifica para el scFv Anti-TfR1 (714pb) fue clonada en el MCS, flanqueado por los sitios Sall en posición 5' y por BamHI en posición 3'. Este plásmido consta de 6466 pb.

### **6.1 Sistema pMAL 5X.**

El sistema de purificación de proteínas pMAL 5X (Kit New England BioLabs pMAL Protein Fusion & Purification System) proporciona un método para la expresión y purificación de una proteína producida a partir de un gen clonado o un marco de lectura



abierto. El gen clonado se inserta río abajo del gen *malE* de *Escherichia coli*, dando como resultado la expresión de una proteína de fusión MBP. El MBP en estos vectores ha sido diseñado para una unión más estricta a la amilosa. Este sistema emplea el promotor "*lac*" y la secuencia de inicio de traducción de *malE* para proporcionar una expresión de alto nivel de las secuencias clonadas y una purificación en una etapa de la proteína de fusión usando la afinidad de MBP por la maltosa. Los vectores expresan el gen *malE* (con o sin su secuencia señal) seguido de un sitio de clonación múltiple y codones de paro en los tres marcos de lectura. Los vectores pMAL-c5X expresan la fusión de MBP en el citoplasma. En el vector pMAL-p5X, el péptido señal en pre-MBP dirige las proteínas de fusión al periplasma, esto permite el plegamiento y la formación de enlaces disulfuro en el periplasma de *E. coli*, además de permitir la purificación de la proteína del periplasma. Los vectores llevan el gen *lacI<sup>q</sup>*, que codifica el represor de Lac. Esto mantiene la expresión de  $P_{tac}$  baja en ausencia de inducción de IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido). Los vectores pMAL-5 también contienen la secuencia que codifica el sitio de reconocimiento de una proteasa específica, ubicada en las posición 5' de los sitios de inserción del MCS. Esto permite que MBP se escinda de la proteína de interés después de la purificación. Los vectores pMAL-c5X y pMAL-p5X que se incluyen en el sistema codifican el sitio para el Factor Xa. El factor Xa escinde después de su secuencia de reconocimiento de cuatro aminoácidos, de modo que pocos o ningún residuo derivado del vector se unen a la proteína de interés, dependiendo del sitio utilizado para la clonación (Kit New England BioLabs pMAL Protein Fusion & Purification System).



## **6.2. Técnicas del ADN recombinante.**

La preparación del ADN, manipulación genética, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), transformación bacteriana, electroforesis en geles de poliacrilamida y Western Blot (WB) se realiza de acuerdo a las especificaciones y protocolos del manual de laboratorio de clonación molecular (Joseph Sambrook and David W. Russell. Molecular cloning. Third ed. 2001.) y de acuerdo a las especificaciones de los “kits” comerciales empleados. Para la purificación del ADN plasmídico se emplean los sistemas Plasmid Midiprep Plus (Qiagen), Plasmid Miniprep System (Qiagen), los productos de digestiones enzimáticas empleados como vectores son purificados a través de columnas sílica-gel PureLink® Quick Gel Extraction Kit, (Invitrogen™). Las enzimas de restricción utilizadas fueron de: New England Biolabs e Invitrogen™ y los oligonucleótidos sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT®).

## **6.3. PCR para la obtención del scFv anti-TfR1.**

Para generar el fragmento codificante para el scFv anti-TfR1, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando el ADN del plásmido pMAL-c2X scFv Anti-TfR1 como molde. Considerando el volumen final de 20  $\mu$ L, se adiciona en un tubo para PCR: 1  $\mu$ g de DNA molde, 200  $\mu$ M de cada uno de los dNTP's (Boheringer Mannheim, Roche), 1 pMol de cada primer (scFvF y scFvR, Tabla 3), 1.5 mM de MgSO<sub>4</sub> (Invitrogen), 1 U de Pfx DNA polimerasa (Invitrogen) y 1X de amortiguador de



enzima Pfx DNA polimerasa (Invitrogen). La reacción de PCR fue realizada bajo las siguientes condiciones (Tabla 6).

**Tabla 6. Condiciones de amplificación PCR.**

Evento	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Preamplificación	94°C	1´	1
Desnaturalización	95°C	15´´	30
Alineamiento	58°C	30´	
Extensión	72°C	1´	
Extensión	72°C	10´	1
Enfriamiento	4°C	Ilimitado	

#### **6.4. Construcción de los plásmidos pMAL c5X scFv Anti-TfR1 y pMAL p5X scFv Anti-TfR1.**

Las construcciones de los plásmidos que codifican para la proteína de fusión MBP-scFv-Anti-TfR1 fueron realizadas como se muestra en la figura 2. Se realizó la amplificación del fragmento que codifica para el scFv Anti-TfR1, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) antes descrita, a partir del plasmido pMAL c2X scFv Anti-TfR1, este fragmento fue sometido a una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% y la banda correspondiente al scFv fue cortada y purificada empleando el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Posteriormente este fragmento fue sometido a una doble digestión enzimática para la generación de los extremos cohesivos con las enzimas Sall y BamHI. Este fragmento se purificó mediante el kit para purificación de



PCR de Jena Bioscience y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Por otra parte, los vectores pMAL c5X y pMAL p5X por separado fueron sometidos a una doble digestión con las enzimas Sall y BamHI, posteriormente fueron sometidos a una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, los vectores abiertos fueron purificados usando el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) y almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. La ligación del fragmento que codifica para el scFv Anti-TfR1 con los vectores pMAL c5X y pMAL p5X digeridos con las enzimas Sall y BamHI fue realizada en un volumen de 15  $\mu\text{L}$  empleando 1  $\mu\text{L}$  de la enzima T4 DNA ligasa (New England BioLabs) e incubada a  $16^{\circ}\text{C}$  toda la noche. Posteriormente bacterias *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  fueron transformadas con esta ligación y cultivadas toda a noche a  $37^{\circ}\text{C}$  en placas de agar BHI en presencia de ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). De las colonias obtenidas se aisló el ADN plasmídico y se sometió a un análisis de restricción enzimática para confirmar el ingreso del fragmento del scFv Anti-TfR1 a los vectores pMAL c5X y pMAL p5X. El plásmido pMAL-c5X scFv Anti-TfR1 codifica para la proteína de fusión MBP-scFv Anti-TfR1 expresada en el citosol de la bacteria y el plásmido pMAL-p5X scFv Anti-TfR1 codifica para la proteína de fusión MBP-scFv Anti-TfR1 expresada en el periplasma de la bacteria. El fragmento del scFv anti-TfR1 fue clonado en ambos vectores (pMAL-c5X y pMAL-p5X) con la finalidad de evaluar en cuál de las dos alternativas de expresión de la proteína de fusión se obtiene mejor cantidad de proteína funcional.



### **6.5. Transformación de bacterias por choque térmico.**

Las Bacterias competentes comerciales (DH5 $\alpha$  y BL21-DE3) se dejaron en contacto con los 15  $\mu$ L de la reacción de ligación (scFv Anti-TfR1 y los plásmidos pMAL c5X y pMAL p5X) y se incubaron por 30 min a 4°C. Posteriormente esta mezcla fue sometida a 42 °C por 1 minuto 30 segundos, e inmediatamente incubada en hielo durante 3 min. Finalmente, a la mezcla se le adicionó 200  $\mu$ L de medio de caldo superóptimo con represión por catabolito (S.O.C., ThermoFisher) y se incubó durante 2 hrs en una incubadora (Enviro Shaker, Lab-Line) con agitación a 200 rpm a 37°C, posteriormente la mezcla fue distribuida en placas de agar con medio BHI con 100  $\mu$ L/mL de ampicilina y se incubó a 37°C toda la noche (Enviro Shaker, Lab-Line). Todo el procedimiento fue realizado en condiciones de esterilidad.

### **6.6. Cultivo de bacterias.**

Las clonas obtenidas de la transformación se expandieron en placas de agar de medio infusión cerebro corazón (BHI) con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina como marcador de selección (debido a que todos los plásmidos contienen un gen de resistencia a ampicilina), posteriormente una asada fue cultivada en caldo BHI (5 mL) con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina, en tubos cónicos de 15 mL estériles (Falcon), este cultivo fue incubado durante toda la noche a 37°C en una incubadora (Enviro Shaker, Lab-Line) con agitación a 200 revoluciones por minuto (RPM).



### **6.7. Análisis de restricción.**

Los análisis de restricción enzimática se realizaron con el fin de determinar la inserción adecuada del fragmento que codifica para el scFv Anti-TfR1 a los plásmidos pMAL c5X y pMAL p5X evidenciado por la pérdida o ganancia de los sitios de restricción enzimáticos dentro de los plásmidos construidos. Cada enzima reconoce un sitio específico de la secuencia de ADN plasmídico, al estar en contacto la enzima con su sitio de unión, corta en uno o más fragmentos del ADN. La escisión enzimática se identifica en el gel de agarosa por la presencia de una sola banda en comparación con el control del plásmido sin digerir el cual presenta al menos tres isoformas del ADN (relajado, enrollado y súper enrollado). Las enzimas que se utilizaron fueron Sall, BamHI y KpnI (obtenidas de New England BioLabs) bajo las condiciones sugeridas por la compañía. A corde con la tabla 7, el sitio Sall se encuentra rio arriba de la secuencia que codifica para el scFv Anti-TfR1 y BamHI rio abajo de esta secuencia. Es importante mencionar que dentro de la secuencia que codifica para el scFv previo al sitio BamHI se localiza un sitio KpnI que también se emplea en el análisis de restricción.

### **6.8. Condiciones de inducción.**

Las bacterias transformadas con las construcciones pMAL-c5X scFv Anti-TfR1 (produce la proteína MBP-scFv Anti-TfR1 en el citosol), pMAL-p5X scFv Anti-TfR1 (produce la proteína MBP-scFv Anti-TfR1 en el periplasma), se cultivaron a 37 °C toda la noche en 5 mL de medio BHI con 100 µg/mL de ampicilina. Para activar el promotor de *lac* que induce la expresión del gen *malE*, se tomó 1mL de dicho cultivo y se



transfirió en 50 mL de BHI con ampicilina (100  $\mu$ l /mL) suplementado con 0.2% de glucosa y 0.5% de NaCl en un matraz Erlen Meyer de 250mL en condiciones de esterilidad. Posteriormente se incubó a 37°C en agitación a 200 rpm (Enviro Shaker, Lab-Line) hasta alcanzar una D.O. igual a 0.5 a 550 nm y se agregó el inductor IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) a concentración de 1mM y se incubó por 2 hrs más. Finalmente, el cultivo se dejó reposar durante 12 hrs a temperatura ambiente sin agitación.

Los cultivos bacterianos inducidos se transfirieron a tubos cónicos Falcon de 50 mL y se centrifugaron a 6000 rpm para retirar el medio de cultivo, se lavó una vez con buffer de fosfatos (PBS 1X, pH de 7.4), posteriormente el botón bacteriano fue resuspendido en 5 mL de buffer de columna (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1mM EDTA) y se congelaron a -20°C aproximadamente 12 hrs o hasta su uso.

#### **6.9. Condiciones de sonicación.**

Las bacterias en buffer de columna congeladas a -20°C, descritas previamente, fueron sometidas a sonicación usando un sonicador Sonics Vibracell VCX 130 con una sonda de 3mm, el cual tiene una frecuencia de 20 kHz, usando el 95% de la potencia, colocando la muestra en un tubo de 5 mL en cámara fría (hielo), con 15 ciclos por 30 seg y 30 seg de reposo. Los extractos fueron fraccionados en tubos de 1.5 mL y se centrifugaron a 13000 rpm por 15 min y el sobrenadante fue congelado a -20°C hasta su uso.



#### **6.10. Cuantificación de proteína.**

Los extractos fueron sometidos a una cuantificación de proteína por medio del Kit Pierce™ BCA Protein Assay de Thermofisher. El fundamento de este Kit es la detección del  $\text{Cu}^{1+}$  por medio del ácido bicinconínico (BCA) el cual es un reactivo cromogénico. La determinación fue realizada a corde a las instrucciones de la casa comercial empleando curvas estándar de BSA (albúmina sérica bovina) y realizando diluciones de 1:4 y 1:8 de nuestra proteína por triplicado. Las muestras fueron procesadas en placas de 96 pozos y el resultado fue leído a 562 nm en el lector de placas EnSpire Multimode Plate Reader (PerkinElmer).

#### **6.11. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE).**

Para evidenciar la expresión de la proteína quimérica MBP-scFv Anti-TfR1 en los cultivos inducidos, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE) siguiendo el método descrito por Laemmli (Gallagher 2006). Se tomaron  $3 \times 10^9$  bacterias ó 50  $\mu\text{g}$  de la proteína total de cada muestra, cada una fue aforada a 50  $\mu\text{L}$  de PBS y fueron diluidas con 50  $\mu\text{L}$  de Laemmli buffer en condiciones desnaturizantes (0.5 M de Tris pH6.8, 2% SDS, 140 mM de 2-mercaptoetanol, 0.1% de azul de bromofenol), posteriormente las muestras se llevaron a 94 °C por 10 min. Las proteínas fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% siguiendo el método descrito por Laemmli (Karlsson, Ostwald et al. 1994) y se tiñeron con azul de coomasie o se electrotransfirieron a una membrana



de nitrocelulosa. Para la electroforesis se empleó una cámara de electroforesis vertical (BioRad), se emplearon 10  $\mu$ L de muestra en cada carril y se aplicó una corriente de 100 volts por aproximadamente 2 h.

### **6.12. Ensayo de Western Blot (WB).**

Las proteínas en los geles de acrilamida se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad), en el equipo de Trans-Blot® Turbo™ (BioRad) por 8 minutos. Posteriormente se bloqueó con una solución de leche descremada al 5% en PBS 1X durante una hora. Se realizó 1 lavado en PBS-Tween (Tween al 0.05% en PBS 1X) seguido de 3 lavados con PBS 1X.

Para la inmunodetección de las proteínas recombinantes con la proteína MBP se empleó el anticuerpo monoclonal anti-MBP inducido en ratón diluido 1:1000 (Kit New England BioLabs pMAL Protein Fusion & Purification System) en buffer PBA 1X (albúmina sérica bovina al 1% en PBS 1X). Se incubó durante toda la noche a 4°C en agitación suave (GyroTwister de la marca LABnet). Posteriormente se realizó un lavado con PBS-Tween, dos lavados con PBS 1X, y se incubó durante 1 hora en oscuridad con anticuerpo anti-IgG de ratón inducido en cabra (Abcam) acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) diluido 1:1000 en PBA 1X. Como solución reveladora se empleó una mezcla que consta de 34 mL de PBS 1X pH 7.4, 15 mL de metanol absoluto que contiene 30 mg de cromógeno 4-cloro- $\alpha$ -naftol, y 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%. La membrana se sumergió en esta solución por un tiempo aproximado de 1 a 5 min.



### **6.13. Ajuste MBP.**

Partiendo de la proteína total cuantificada de los extractos que contienen a las proteínas MBP-scFv Anti-TfR1 (de origen citosólico o periplásmico) se prepararon alícuotas con una concentración de 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Se procedió a realizar una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% de estas muestras, colocando 10  $\mu\text{L}$  de proteína (5  $\mu\text{g}$  de proteína total) en cada pozo, los geles fueron realizados por duplicado. Posteriormente uno de los geles fue teñido con azul de coomasie y el otro fue empleado para realizar un WB siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Al gel teñido con azul de Coomasie se le realizó una densitometría en el equipo Gel Doc EZ Imager de BioRad utilizando el software Image Lab Software 6.0 para determinar la proporción de proteína MBP presente en la proteína total de cada uno de los extractos. Empleando como referencia la banda de la proteína MBP control (que proviene la expresión de los plásmidos PMAL c5X ó PMAL p5X) y las bandas de las proteínas de fusión MBP-scFv Anti-TfR1 que provienen de la expresión de los plásmidos pMAL-c5X scFv Anti-TfR1 y pMAL-p5X scFv Anti-TfR1.

### **6.14. Ensayos de ELISA.**

Con la finalidad de determinar si el minianticuerpo mantienen la especificidad por el receptor de transferrina humana 1, se realizaron ensayos de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA). Los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos para ELISA (Corning). Las placas fueron sensibilizadas con 100  $\mu\text{L}$  por pozo de la proteína recombinante TfR1 (Abnova corporation) a una concentración de 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en buffer de



carbonatos (bicarbonato de sodio 0.1 M y carbonato ácido de sodio 0.1 M) y se incubó toda la noche a 4°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-Tween y un lavado con PBS 1X (todos los lavados se realizaron bajo las mismas condiciones). Se procedió a agregar los extractos que contienen a la proteína MBP, MBP-scFv Anti-TfR1 y demás controles, ajustados a un total de 25 µg de MBP por pozo según se describió anteriormente. Una vez agregados los extractos se incubó la placa por 3 hrs a temperatura ambiente en agitación (200 RPM). Posteriormente se realizaron los lavados requeridos y se agregaron 100 µL del anticuerpo monoclonal anti-MBP inducido en ratón (Kit New England BioLabs pMAL Protein Fusion & Purification System) en PBA 1X (albúmina sérica bovina al 1% en PBS 1X) a una dilución 1:2000 y se incubó por 30 min en agitación a temperatura ambiente. Se realizaron los lavados correspondientes y posteriormente se agregaron 100 µL de un anticuerpo anti-IgG de ratón inducido en cabra (abcam), acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) diluido 1:2000 en PBA 1X y se incubó en oscuridad por 30 min a temperatura ambiente. Después de realizar los lavados se agregaron 50 µL del sustrato TBM substrate reagent set (BD PharMigen) y la reacción fue detenida con 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N. El resultado fue analizado a 450 nm en un lector de placas EnSpire Multimode Plate Reader (PerkinElmer). Se empleó como control positivo un anticuerpo anti-TfR1 inducido en conejo (GeneTex) en una dilución 1:2000 en PBA 1X y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a HRP inducido en burro (Santa Cruz) en una dilución 1:2000 en PBA 1X.



### **6.15. Ensayos de citometría de flujo.**

300 000 células Ramos (que expresan el TfR1) fueron tratadas con el equivalente de 25  $\mu$ g de proteína MBP, MBP-scFv Anti-TfR1 y demás controles y se incubó por 2 hrs a 4°C. Se realizaron 2 lavados con PBS 1X (todos los lavados se realizaron bajo este mismo esquema) y se agregó el anticuerpo monoclonal anti-MBP inducido en ratón (Kit New England BioLabs pMAL Protein Fusion & Purification System) en PBA 1X en una proporción 1:200 y se incubó a 37°C por una hora. Realizando los lavados correspondientes se agregó un anticuerpo anti-IgG de ratón inducido en cabra (abcam), acoplado a FITC diluido 1:200 en PBA 1X y se incubó a 4 °C en oscuridad por una hora. Se realizaron lavados y las células fueron fijadas con 50  $\mu$ L FixFACS (*p*-formaldehído al 1% en PBS 1X) y se mantuvieron a 4°C hasta su lectura y análisis en el citómetro (CytoFLEX, Beckman Coulter). Como control positivo se empleó un anticuerpo anti-TfR1 inducido en conejo con una dilución 1:200 en PBA 1X y como secundario un anticuerpo anti-IgG de conejo inducido en cabra acoplado a FITC en una dilución 1:200 en PBA 1X. Ambos anticuerpos se incubaron bajo las mismas condiciones descritas para los demás anticuerpos.

### **6.16. Cromatografía de afinidad.**

Para la purificación de la proteína de fusión MBP-scFv Anti-TfR1 y controles, la cromatografía de afinidad fue realizada empleando 1.5 mL de resina de amilosa (Kit New England BioLabs pMAL Protein Fusion & Purification System) en una columna para cromatografía de afinidad de 10 mL (BioRad), la resina es capaz de soportar de 6



a 8mg de proteína por cada mL. El extracto obtenido de la sonicación, previamente descrito, se disolvió en 5 volúmenes de buffer de columna y se dejó pasar por gravedad a través de la columna con la resina de amilosa, posteriormente la resina fue lavada con 18 mL de buffer de columna y para eluir la proteína MBP-scFv Anti-TfR1 se empleó Maltosa al 10 mM en buffer de columna, obteniendo de 10 a 12 fracciones en tubos de 2 mL. Estas fracciones fueron congeladas a -20°C para su posterior análisis.

## **7. RESULTADOS.**

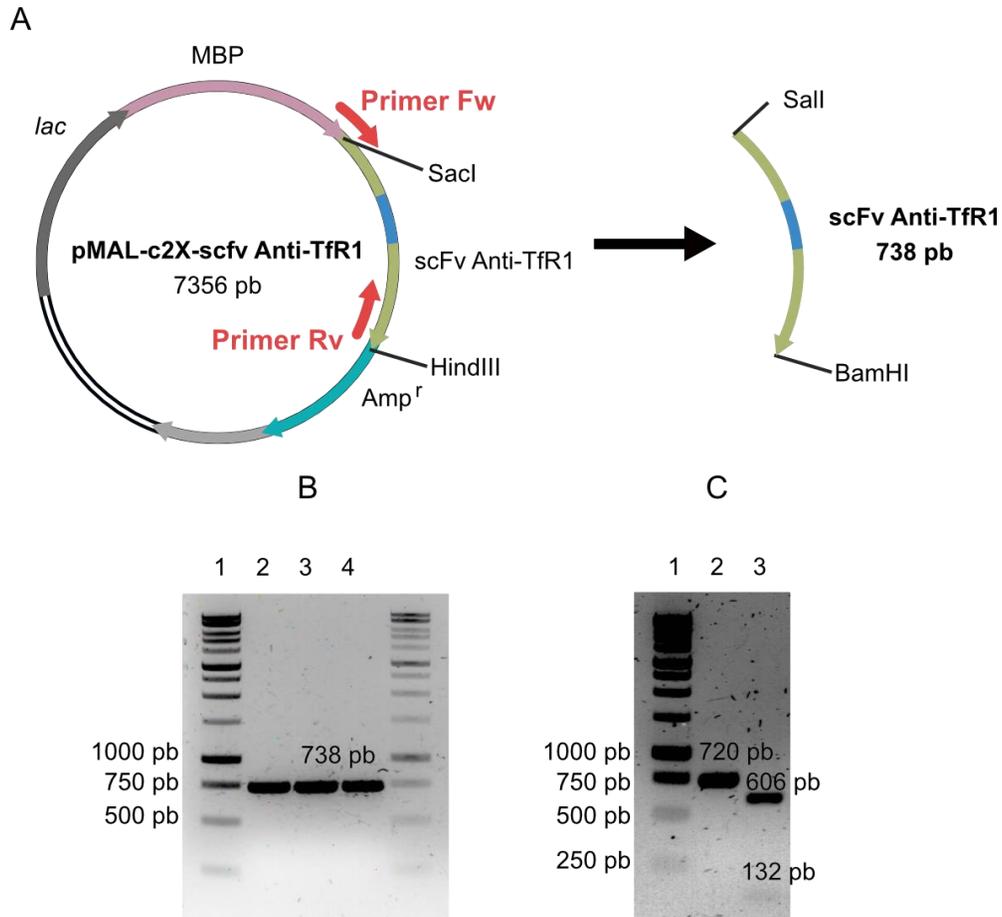
### **7.1. Obtención del fragmento que codifica para el minianticuerpo (scFv) Anti-TfR1.**

Mediante análisis bioinformáticos se diseñó la secuencia que codifica para el scFv Anti-TfR1 (tabla 3) y posterior a su síntesis fue clonada en los plásmidos pMAL c5X y pMAL p5X. Para lograr esto, la secuencia de la cadena variable pesada (VH) y variable ligera (VL) del scFv Anti-TfR1 fue obtenida de la secuencia del anticuerpo ch128.1 (Anti-TfR1), reportada en la patente US 6,329,508 B1 (Fridden 2001). En nuestro diseño la secuencia que codifica para el dominio VH está unido a la secuencia del dominio VL por una secuencia que codifica para una cadena de glicinas y serinas: SGSGSGSGSGSGS (tabla 4) (Accardi L 2010). La secuencia fue sintetizada como un minigen (Integrated DNA Technologies) y clonada en el plásmido pMAL c2X, dando origen al plásmido pMAL c2X scFv Anti-TfR1 (Integrated DNA Technologies). Dentro de la secuencia del plásmido pMAL c2X scFv Anti-TfR1, el minigen que codifica para el scFv Anti-TfR1 se encuentra flanqueado por los sitios de restricción SacI en posición 5' y por HindIII en posición 3'. Para poder obtener el fragmento que codifica para el scFv



anti TfR1 con los sitios de restricción Sal I y BamH I que nos permitirá insertarlo en los plásmidos PMAL p5X y PMAL c5X, se realizó una PCR con los primers descritos en la tabla 3. El fragmento resultante de 738 pares de bases, estaba flanqueado por los sitios de restricción Sal I en posición 5' y por BamHI en posición 3' (figura 1 A).

El producto de la PCR se fue analizado en una electroforesis en gel de agarosa al 1% a 80 mV por aproximadamente 1 hrs, posteriormente se localizó la banda en el gel de agarosa (figura 1 B), fue cortada y purificada por medio del kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). El producto de la purificación fue digerido con las enzimas de restricción Sal I y BamH I (New England BioLabs), con el fin de generar los sitios cohesivos, y se utilizó la enzima Kpn I para caracterizar el fragmento (todas las enzimas se utilizaron bajo las condiciones sugeridas por la compañía) (figura 1 c), posteriormente se purificó por medio del kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) y se almacenó a -20°C hasta su uso.



**Figura 1. Obtención del fragmento scFv Anti-TfR1.** **A.** Representación gráfica de la estrategia de amplificación de la secuencia que codifica para el scFv Anti-TfR1 proveniente del plásmido pMAL c2X scFv Anti-TfR1 flanqueada con los nuevos sitios de restricción. **B.** Resultado de la amplificación mediante PCR del fragmento que codifica para el scFv Anti-TfR1. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, Carril 1, marcador de número pares de bases, carril 2, 3 y 4, scFv Anti-TfR1 amplificado mediante PCR. **C.** Carril 1, marcador de pares de bases, carril 2, scFv Anti-TfR1 digerido con las enzimas Sal I y BamH I, Carril 3, scFv Anti-TfR1 digerido con la enzima Kpn I.

La secuencia obtenida por medio de la amplificación consta de aproximadamente 738 pares de bases (pb), y la digestión con la enzima Kpn I genera dos fragmentos una de aproximadamente 606 pb y otra de aproximadamente 132 pb, en la tabla 7 se muestra la secuencia del scFv Anti-TfR1 con los sitios de restricción señalado en letras



minúsculas subrayadas que corresponden a los sitios Sall en posición 5' y BamHI en posición 3'. Existe además otro sitio de restricción el cual fue empleado para el análisis de restricción, KpnI, se encuentra con letras negritas. Por otro lado las letras en color azul representan la secuencia de unión entre las dos cadenas del scFv, quedando de esta forma 5' – Sall – subunidad VH – secuencia de unión (GS) – subunidad VL – BamHI – 3' (tabla 7).

**Tabla 7. Secuencia utilizada del scFv flanqueada por los nuevos sitios de restricción**

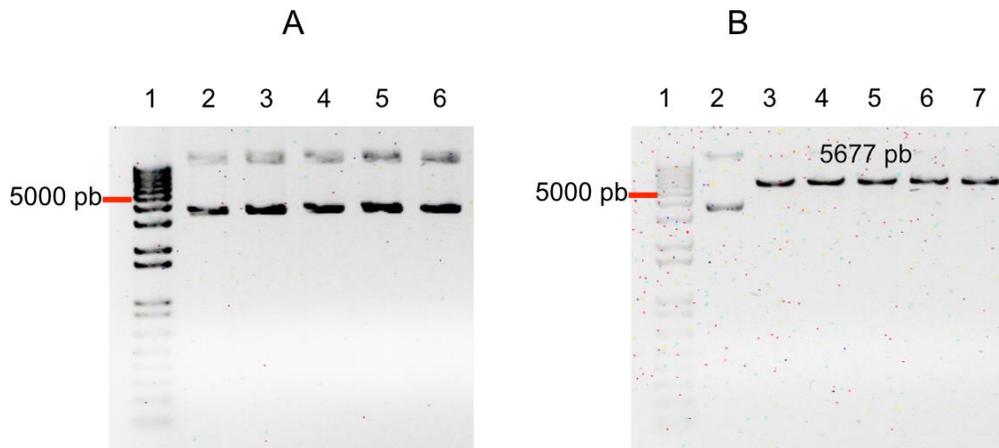
<p><b>scFv Anti-TfR1 nucleótidos a clonar</b> 5'–Sall–subunidad VH–<b>secuencia de unión (GS)</b>–subunidad VL–BamHI–3'</p>
<p>ACACGC<u>gtcgac</u>GAGGTTCAAGTTGCAACAATCAGGCCAGAACTGGTCAAGCCAGGT GCTTCCATGAAAATCTCCTGTAAAGCAAGTGGCTATAGTTTTACAGGGTATACTATG AATTGGGTAAAGCAATCACACGGCGAGAACTTGGAGTGGATTGGTCGTATCAACCC TCATAACGGGGGGACTGATTACAATCAAAGTTCAAAGACAAGGCTCCCTTAACAG TGGACAAATCATCTAACACCGCTTACATGGAGCTGTTGTCGTTGACCTCAGGGGAC TCCGCCGTATACTACTGTGCGCGTGGGTACTACTATTATAGCTTGGACTATTGGGG GCAGGGAACAAGTGTTACTGTA<b>AGTGGTTCGGGATCTGGAGGCAGCGGAAGTGG</b> <b>CGGCAGTGGATCT</b>CAGATTGTACTTACACAGAGCCCCGCAATCATGAGTGTCAGC CCCGGGGAGAAAGTCACCATGACTTGCTCGGCCTCGTTCGAGTATTCGCTATATCCA TTGGTATCAACAACGCCCGGAACGTCACCAAACGCTGGATTTATGACACTTCTA ATCTTGCATCTGGAGTGCCCGCACGTTTTAGTGGATCGGGTTCC<b>GGTACCT</b>CCTTAT</p>



```
TCGCTGACGATTAGTTCAATGGAGGCGGAAGACGCGGCTACGTA  
CTATTGTCACCA  
ACGTAATTCTTACCCTTGGACATTCGGTGGGGGCACTCGCCTGGAAATCCGTTAAg  
gatccGCGGCG
```

## **7.2. Obtención del plásmido pMAL c5X scFv Anti-TfR1 que codifica para la proteína MBP-scFv anti-TfR1 expresada en el citosol bacteriano.**

El sistema pMAL c5X es un plásmido que permite la expresión citosólica y purificación de proteínas del gen clonado en el marco abierto de lectura río debajo del gen *malE* que codifica para la proteína de unión a maltosa (MBP) (figura 8 A), esto genera una proteína de fusión de la MBP con el minianticuerpo (MBP-scFv Anti-TfR1) (figura 8 A). El gen *malE* se encuentra bajo el promotor “*lac*”, las señales de traducción de la proteína promueven la alta expresión de la proteína de fusión. Las bacterias competentes DH5 $\alpha$  fueron transformadas con el plásmido comercial pMAL c5X, con la finalidad de expandirlo y obtener grandes cantidades para los ensayos de clonación. De las colonias obtenidas se realizó la extracción del ADN plasmídico por medio del Kit Plasmid Midiprep Plus (Qiagen). El plásmido obtenido fue analizado en una electroforesis en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, y sometido a un análisis de restricción con las enzimas Sal I y BamH I para la caracterización del plásmido, y con el fin de estandarizar las condiciones de las digestiones enzimáticas (Figura 2).

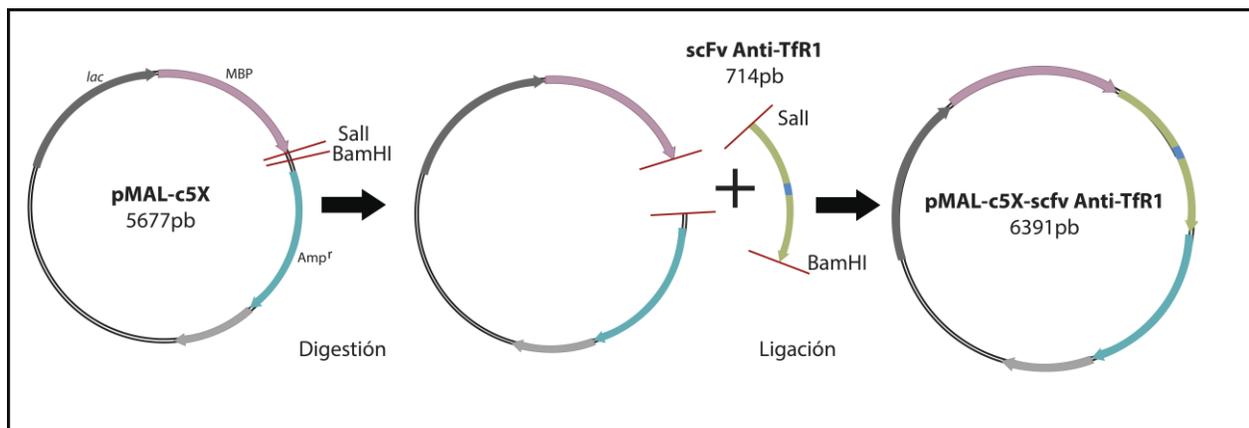


**Figura 2. Caracterización del plásmido pMAL c5X.** **A.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%, Carril 1, marcador de pares de bases, carril 2, plásmido comercial pMAL c5X, carriles 3, 4, 5 y 6 plásmido obtenido a partir de las clonas 1, 2,3,4. **B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%, Carril 1, marcador de pares de bases, carril 2, plásmido comercial pMAL c5X no digerido, carril 3, plásmido comercial pMAL c5X digerido con la enzima Sal I, carril 4 y 5, plásmido de la clona 1 digerido con las enzimas Sal I y BamH I respectivamente, los carriles 6 y 7 plásmido de la clona 2 digerido con las enzimas Sal I y BamH I respectivamente.

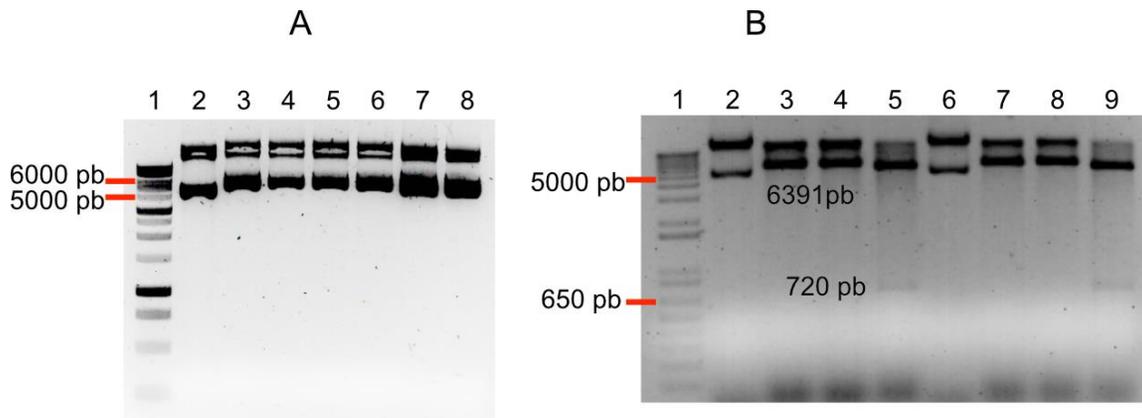
Una vez realizado este análisis, el plásmido obtenido de una de la clonas fue sometido a una doble digestión enzimática con las enzimas Sal I y BamH I, esta digestión fue sometida a una electroforesis en gel de agarosa al 1%, posteriormente el fragmento que corresponde al plásmido linearizado fue cortado y purificado con el apoyo del kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). El producto de la purificación se puso en contacto con el fragmento purificado del scFv Anti-TfR1 obtenido de la PCR (previamente digerido con las enzimas Sal I y BamH I, y sometido a purificación) para realizar la reacción de ligación con ayuda de la enzima T4 DNA Ligasa (Invitrogen) (figura 3). Bacterias DH5 $\alpha$  competentes fueron transformadas con el producto de la ligación y cultivadas por toda la noche. De las clonas resultantes, se extrajo el ADN plasmídico



empleando el Kit Plasmid Miniprep Plus (Qiagen), estos plásmidos fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 1% con la finalidad de analizar el patrón de corrimiento de los plásmidos, el retraso en el corrimiento en alguno de los plásmidos obtenidos sugiere la posible inserción de nuestro fragmento de interés (figura 4 A). Con el fin de confirmar la incorporación del gen que codifica para el scFv anti-TfR1 al plásmido pMAL c5X, el ADN de algunas clonas obtenidas fueron sometidas a un análisis de restricción con las enzimas Sal I y BamH I, además de una doble digestión con estas mismas enzimas. De esta manera se puede observar el tamaño del plásmido linearizado pMAL c5X scFv Anti TfR1 (6391 pb) y el fragmento correspondiente al scFv Anti-TfR1 de aproximadamente 720 pb (figura 4 B).



**Figura 3. Estrategia de clonación del scFv en el plásmido pMAL c5X.** En este esquema se puede observar como por medio de la digestión en los sitios de restricción del plásmido pMAL c5X se generan los sitios donde fue clonada la secuencia que codifica para el scFv Anti-TfR1.



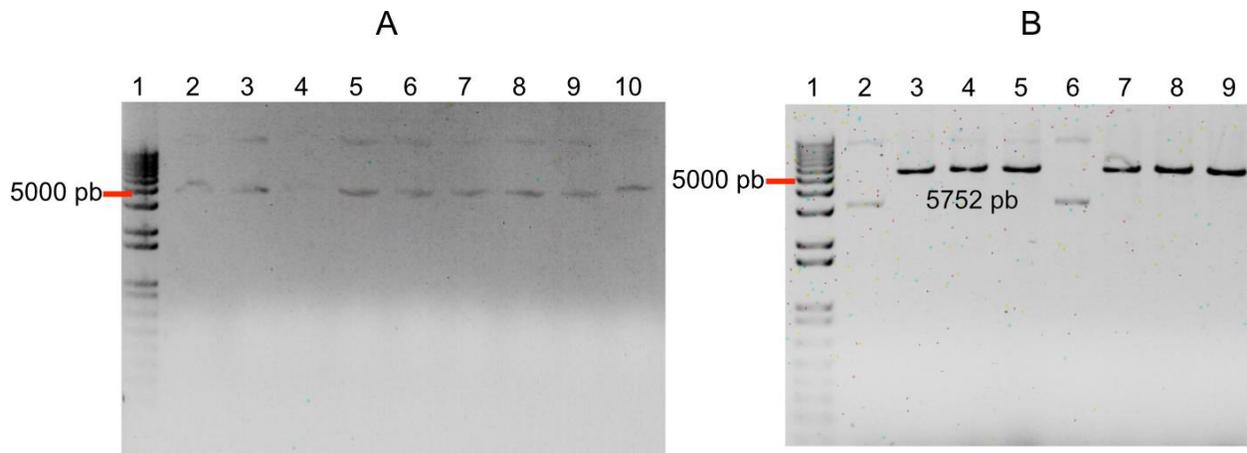
**Figura 4. Caracterización del vector pMAL c5X scFv Anti-TfR1.** **A.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%, Carril 1, marcador de pares de bases, carril 2, plásmido comercial pMAL c5X, carriles 3 al 8, ADN plasmídico obtenido de las clonas producto de la ligación. **B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%, Carril 1, marcador de pares de bases, carril 2, plásmido sin digerir de la clona 1 pMAL c5X scFv Anti-TfR1, carril 3, 4 y 5, plásmido digerido de la clona 1 pMAL c5X scFv Anti-TfR1 con las enzimas Sal I, BamH I y la doble digestión respectivamente, los carriles 6 al 9 corresponden al mismo análisis efectuado con la clona 2 pMAL c5X scFv Anti-TfR1. En los carriles que corresponden a las dobles digestiones se puede observar el fragmento correspondiente a la secuencia del scFv Anti-TfR1 de aproximadamente 720 pb.

### **7.3. Obtención del plásmido pMAL p5X scFv Anti-TfR1 que codifica para la proteína MBP-scFv anti-TfR1 expresada en el periplasma bacteriano.**

El vector pMAL p5X es una variante del plásmido pMAL c5X, la diferencia es que este promueve la expresión periplásmica de la proteína de fusión. Bacterias competentes DH5 $\alpha$  fueron transformadas con el plásmido comercial pMAL p5X y fueron cultivadas, de las clonas obtenidas se realizó la extracción del plásmido por medio del Kit Plasmid Miniprep Plus (Qiagen), y fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1% (figura 5 A). Posteriormente, los plásmidos obtenidos fueron sometidos a un análisis de



restricción para confirmar la presencia de los sitios de restricción para Sal I y BamH I en estos plásmidos (figura 5 B).

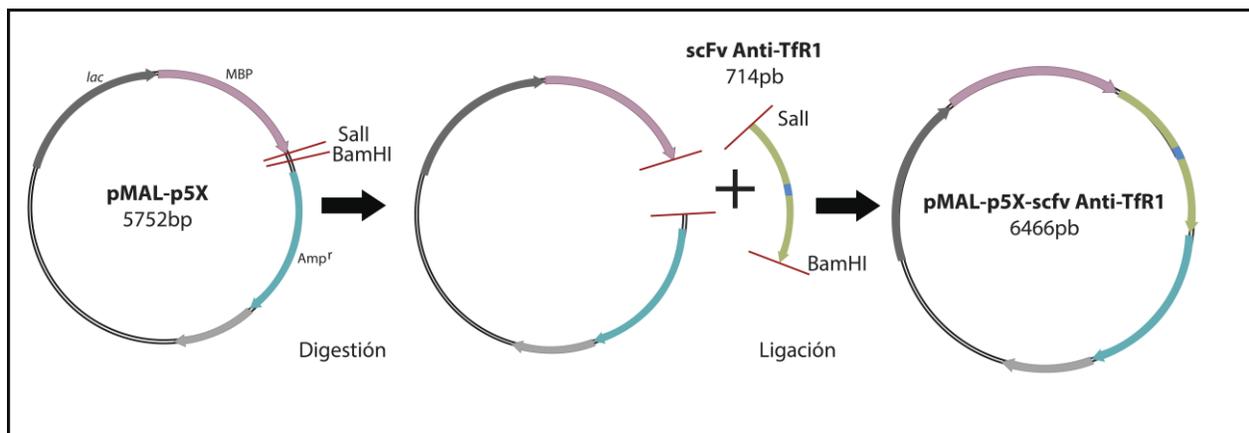


**Figura 5. Caracterización del plásmido pMAL p5X. A.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%, Carril 1, marcador de pares de bases, carril 2, plásmido comercial pMAL p5X, carriles 3, 4, 5 y 6 plásmido obtenido de las clonas 1, 2,3, 4 con el vector pMAL p5X. **B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%, Carril 1, marcador de pares de bases, carril 2 y 6, plásmido comercial pMAL p5X no digerido, carril 3 y 7, plásmido comercial pMAL p5X digerido con la enzima Sal I, carril 4 y 5, plásmido extraído de la clona 1 y digerido con las enzimas Sal I y BamH I respectivamente, los carriles 8 y 9 plásmido obtenido de la clona 2 digerido con las enzimas Sal I y BamH I respectivamente.

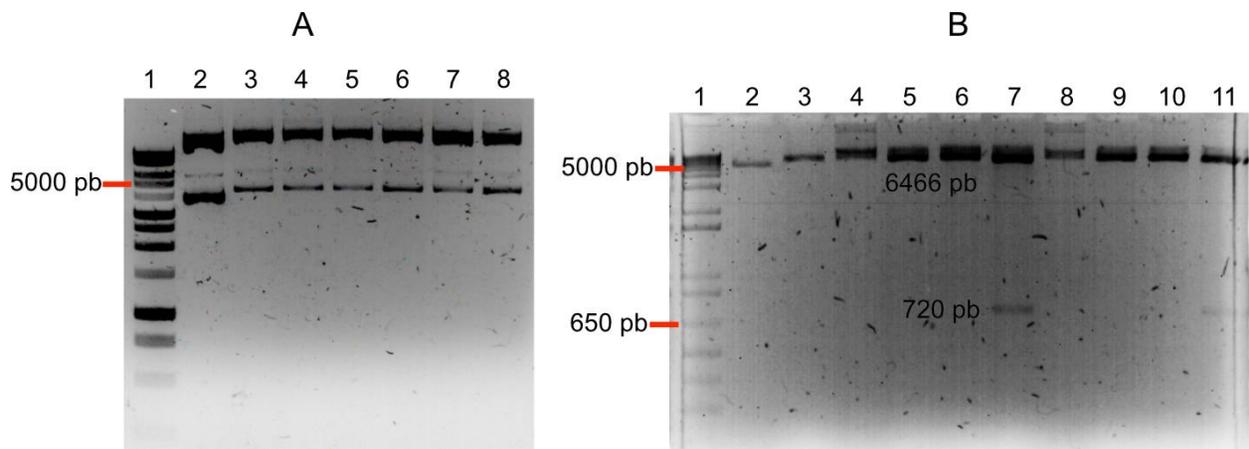
El plásmido pMAL p5X de alguna de la clona 1 fue digerido con las enzimas Sal I y BamH I para formar los sitios cohesivos, el producto de la digestión fue separado en una electroforesis en gel de agarosa al 1% para posteriormente se purificado por medio del kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). El producto de la purificación se empleó en una reacción de ligación con la secuencia del scFv Anti-TfR1 previamente digerida con las enzimas Sal I y BamH I. La reacción de ligación fue catalizada por la enzima T4 DNA Ligasa (invitrogene) (figura 6). Bacterias competentes DH5 $\alpha$  fueron transformadas



con el producto de la ligación y cultivadas toda la noche en placas con agar BHI suplementadas con ampicilina, se seleccionaron clonas y posteriormente se extrajo el ADN plasmídico (figura 7 A). Se realizó el análisis de restricción de dos clonas para realizar la caracterización de la inserción del fragmento del scFv anti TfR1 al plásmido pMAL p5X (figura 7 B). Las clonas fueron congeladas hasta su uso.



**Figura 6. Estrategia de clonación del scFv en el plásmido pMAL p5X.** En este esquema se puede observar como por medio de la digestión en los sitios de restricción del vector pMAL p5X se genera el sitio donde fue clonada la secuencia que codifica para el scFv Anti-TfR1 por medio de ligación.





**Figura 7. Caracterización del plásmido pMAL p5X scFv Anti-TfR1.** **A.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%, Carril 1, marcador de pares de bases, carril 2, plásmido comercial pMAL p5X, carriles 3 al 8, plásmido obtenido de las clonas transformadas con el producto de la ligación. **B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%, Carril 1, marcador de pares de bases, carril 2, plásmido sin digerir de la clona 1 pMAL p5X scFv Anti-TfR1 no digerido, carril 3, 4 y 5, plásmido digerido de la clona 1 pMAL p5X scFv Anti-TfR1 con la enzima Sal I, BamH I y la doble digestión respectivamente, los carriles 6 al 9 corresponden al mismo análisis efectuado con la clona 2 pMAL p5X scFv Anti-TfR1. En los carriles que corresponden a las dobles digestiones se puede observar el fragmento correspondiente a la secuencia del scFv Anti-TfR1 de aproximadamente 720 pb.

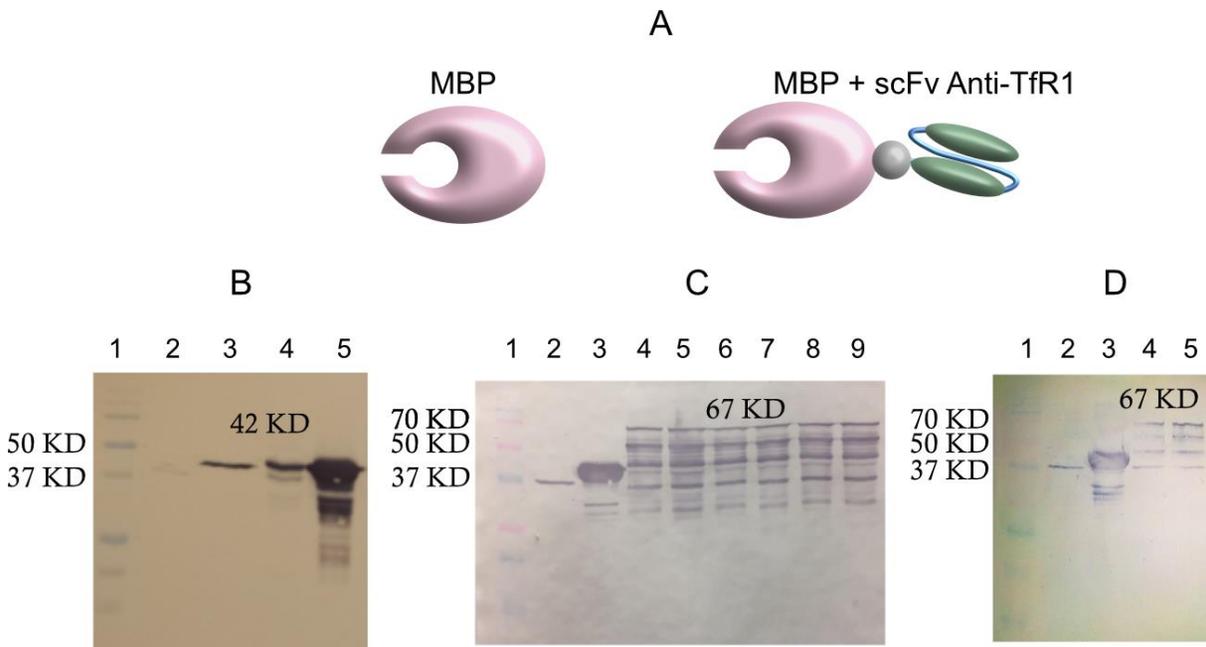
#### **7.4. Análisis de expresión de la proteína MBP-scFv anti-TfR1 citosólica ó periplásmica.**

Con el fin de llevar a cabo la expresión de las proteínas de fusión, bacterias competentes BL21 (DE3) fueron transformadas con los plásmidos pMAL p5X, pMAL c5X, pMAL p5X scFv anti-TfR1, pMAL c5X scFv anti-TfR1, que codifican para las proteínas MBP citosólica, MBP periplásmica, MBP-scFv anti-TfR1 citosólica y MBP-scFv anti-TfR1 periplásmica respectivamente, debido a que esta cepa bacteriana se caracteriza en tener una alta capacidad para la expresión de proteínas. Las bacterias se sometieron a inducción para la expresión de la proteína de fusión, para ello se realizó un cultivo en 50 mL de medio BHI con ampicilina (100 µl /mL) suplementado con 0.2% de glucosa y 0.5% de NaCl en un matraz Erlen Meyer de 250mL, se incubó hasta llegar a una D.O. de 500nm y posteriormente se agregó IPTG 1mM el cual promueve la activación del promotor *lac* presente en el sistema pMAL 5X que conforman la estructura de los plásmidos construidos. La inducción se llevó en dos fases, una a 37°C por 2 hrs seguido de una fase de reposo a temperatura ambiente por toda la noche. A las bacterias inducidas se centrifugaron para eliminar el medio de cultivo y se les



agregó buffer de columna para ser sometidas a sonicación en frío en un sonicador Sonics Vibracell VCX 130 con una sonda de 3mm, el cual tiene una frecuencia de 20 kHz, usando el 95% de la potencia, con 15 ciclos durante 30 seg por 30 seg de reposo, posterior a una centrifugación, los sobrenadantes fueron congelados hasta su uso. El sobrenadante producto de la sonicación fue descongelado y se le realizó una cuantificación de proteínas por medio de la reacción del ácido bicinoninico (BCA).

Una vez cuantificada la proteína de cada uno de los extractos se procedió a realizar el análisis de la expresión de la proteína el cual se inició realizando electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% y el análisis de Western blot en membranas de nitrocelulosa de las proteínas totales de las clonas transformadas con los plásmidos pMAL c5X y pMAL p5X por medio de la detección de la proteína MBP, esto con la finalidad de establecer las condiciones de inducción apropiadas. Por medio de estos ensayos se pudo observar que la expresión de la proteína MBP (aproximadamente 42 KDa), era mayor en las bacterias transformadas con el vector pMAL c5X (figura 8B carril 5) a diferencia de aquellas que estaban transformadas con el vector pMAL p5X (figura 8B carril 4), esto se debe a que el vector pMAL p5X es periplásmica, lo que la lleva a tener un proceso más largo de maduración de las proteínas.



**Figura 8. Expresión de proteínas de las proteínas de fusión. A.** Esquema representativo de las proteínas MBP y MBP-scFv Anti-TfR1. **B.** Western blot, carril 1, marcador de peso molecular, carril 2, proteína de la bacteria BL21 (DE3), carriles 3, proteína MBP (New England BioLabs), carriles 4 y 5, proteína extraída de las bacterias transformadas con los vectores pMAL p5X y pMAL c5X respectivamente. **C.** Western blot, carril 1, marcador de peso molecular, carril 2, proteína de la bacteria BL21 (DE3), carril 3, proteína extraída de las bacterias transformadas con el vector pMAL c5X, carril 4 al 9 proteína extraída de las clonas transformadas con el plásmido pMAL c5X scFv Anti-TfR1. **D.** Western blot, carril 1, marcador de peso molecular, carril 2, proteína de la bacteria BL21 (DE3), carril 3, proteína extraída de las bacterias transformadas con el vector pMAL p5X, carril 4 y 5 proteína extraída de las clonas transformadas con el plásmido pMAL p5X scFv Anti-TfR1.

Posteriormente se realizó el análisis por Western blot de la expresión de la proteína de fusión por medio de la detección de la proteína MBP de las clonas transformadas con los plásmidos pMAL c5X scFv Anti-TfR1 y pMAL p5X scFv Anti-TfR1 (figura 8, B y C). Se pudo observar que la expresión de la proteína de fusión en las bacterias transformadas con el plásmido pMAL c5X scFv Anti-TfR1 (codifica para MBP-scFv anti-



TfR1 citosólico, 67 KDa) era mayor respecto a las bacterias transformadas con el plásmido pMAL p5X scFv Anti-TfR1 (codifica para MBP-scFv anti-TfR1 periplásmico, 67 KDa), este resultado está acorde con lo ya observado en el kit comercial de los vectores de pMAL 5X. Por otro lado, en el Western blot también logra apreciarse otras bandas aparte de la de 67 KDa a la que corresponde nuestra proteína de fusión (figura 8 C y D).

### **7.5. La proteína MBP-scFv anti-TfR1 citosólica ó periplásmica se une al TfR1.**

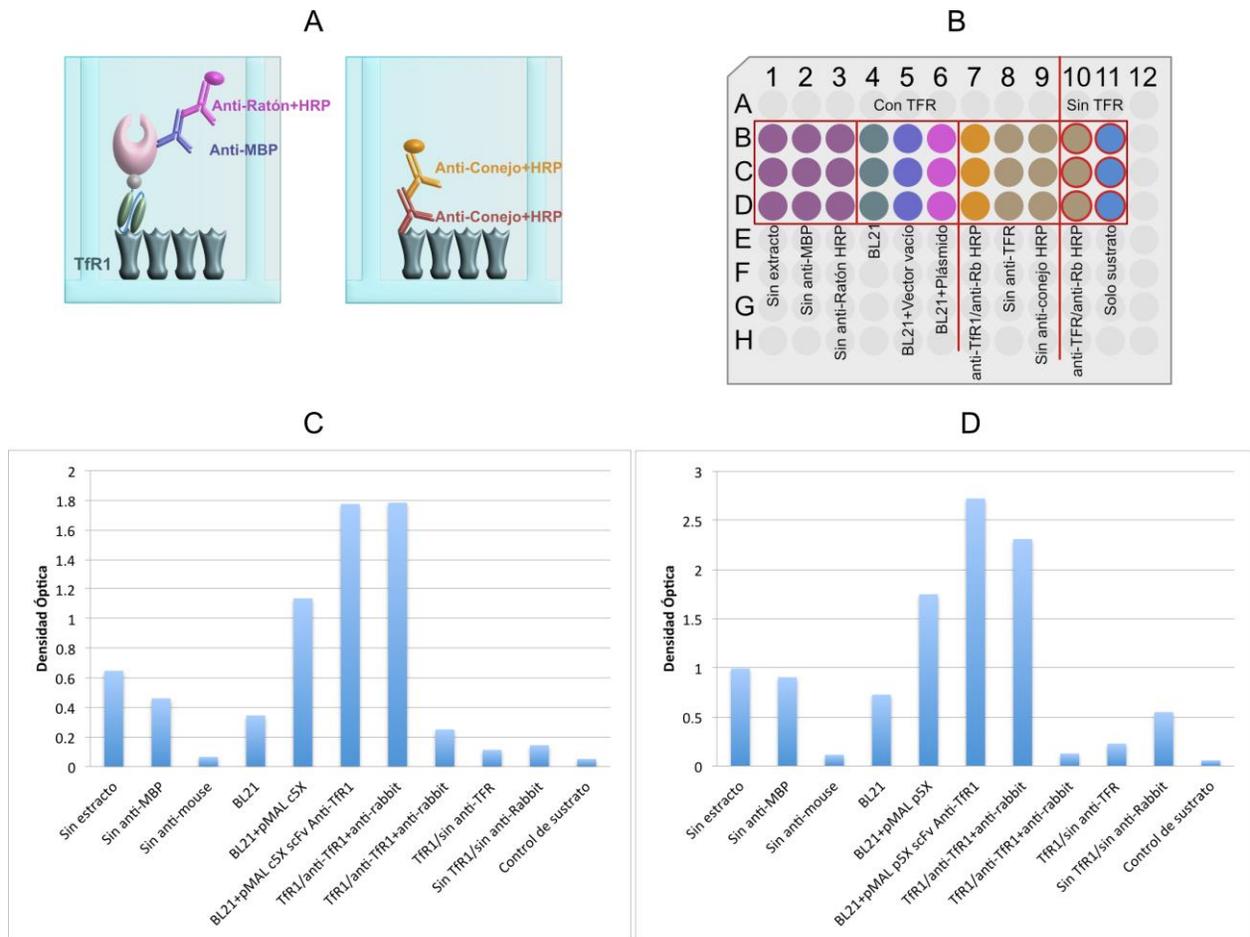
Una vez confirmada la adecuada expresión de las proteínas de fusión, nos preguntamos si el scFv Anti-TfR1 de la proteína MBP-scFv anti-TfR1 citosólica ó periplásmica, tiene la capacidad de unirse a su antígeno el TfR1, para contestar esta pregunta se realizaron ensayos de ELISA empleando a la proteína recombinante de TfR1 y ensayos de citometría de flujo empleando células Ramos que sobre-expresan este receptor. Considerando que en este paso aun el scFv anti-TfR1 está anclado a la proteína MBP, empleamos como control del sistema a la proteína MBP obtenida de las bacterias transformadas con los plásmidos pMAL c5X y pMAL p5X, de tal manera que la concentraciones de proteínas controles y proteínas de fusión adicionadas en los experimentos estas ajustadas de tal manera que tienen la misma concentración de MBP, con ello tratamos de eliminar el fondo que podría estar dada por la proteína MBP que tiene la capacidad de unirse a ciertos polisacáridos. Esto se logró por medio de análisis de densitometría en los geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie y corroborando las bandas detectadas por el anticuerpo contra MBP en los Western blot.



Una vez realizado el ajuste de proteína MBP como se describe en material y métodos, las proteínas ajustadas fueron sometidos a ensayos de ELISA, para ello se emplearon placas de 96 pozos, las cuales fueron sensibilizadas con la proteína recombinante TfR1 human (Abnova) en buffer de carbonatos durante toda la noche en frío (4°C). Para este ensayo se emplearon los extractos de las bacterias sin transformar como control negativo (BL21), los extractos de las bacterias transformadas con los plásmidos vacíos (BL21+pMAL c5X y BL21+pMAL p5X) como referencia por la inespecificidad generada por la proteína MBP, y los extractos de las bacterias con los plásmidos construidos (BL21+pMAL c5X scFv Anti-TfR1 y BL21+pMAL p5X scFv Anti-TfR1) como problema y como control positivo la detección directa con anticuerpos que reconocen al TfR1 (anti-TfR1) (figura 9 B). En cada pozo se empleó el volumen equivalente a 25 µg de proteína de MBP de los extractos y se incubaron por 3 horas a temperatura ambiente en agitación. Para la detección de la proteína de fusión en el ensayo se utilizó como anticuerpo primario un anticuerpo monoclonal anti-MBP inducido en ratón diluido 1:2000 (Kit New England BioLabs pMAL Protein Fusion & Purification System) en PBA 1X incubado por 30 min a temperatura ambiente en agitación, y como anticuerpo secundario un anti-IgG de ratón inducido en cabra (abcam), acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) diluido 1:2000 en PBA 1X y se incubó en oscuridad por 30 min a temperatura ambiente en agitación. Para la detección del TfR1, se empleó un anticuerpo anti-TfR1 inducido en conejo (GeneTex) en una dilución 1:2000 y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a HRP inducido en burro (Santa Cruz) en una dilución 1:2000 (ambos fueron empleados bajo las mismas condiciones que



los anteriores) (figura 9 A y B), el resultado fue analizado en un lector de placas EnSpire Multimode Plate Reader (PerkinElmer). En los resultados se puede observar que la proteína de fusión reconoce al TfR1, ya que los pozos en los cuales se empleó el extracto de las clonas transformadas con los plásmidos pMAL c5X scFv Anti-TfR1 y pMAL p5X scFv Anti-TfR1 presentan una mayor D.O. con respecto a los pozos control (BL21, BL21+pMAL c5X y BL21+pMAL p5X) y han tenido una señal similar al control positivo (anti-TfR1). El extracto obtenido de las bacterias transformadas con los vectores vacíos (BL21+pMAL c5X y BL21+pMAL p5X) presentan una señal por encima del control negativo, esto podría deberse a la unión no específica de la proteína MBP a artefactos (Figura 9 C y D). También se emplearon controles de los distintos anticuerpos utilizados e incluso del propio sustrato con la finalidad de observar la señal de fondo que se pudiera generar de cada uno de los componentes utilizados en el ensayo (figura 9 B). Estos ensayos sugieren un mejor reconocimiento de la proteína MBP-scFv Anti-TfR1 periplásmica comparada con la proteína citosólica.

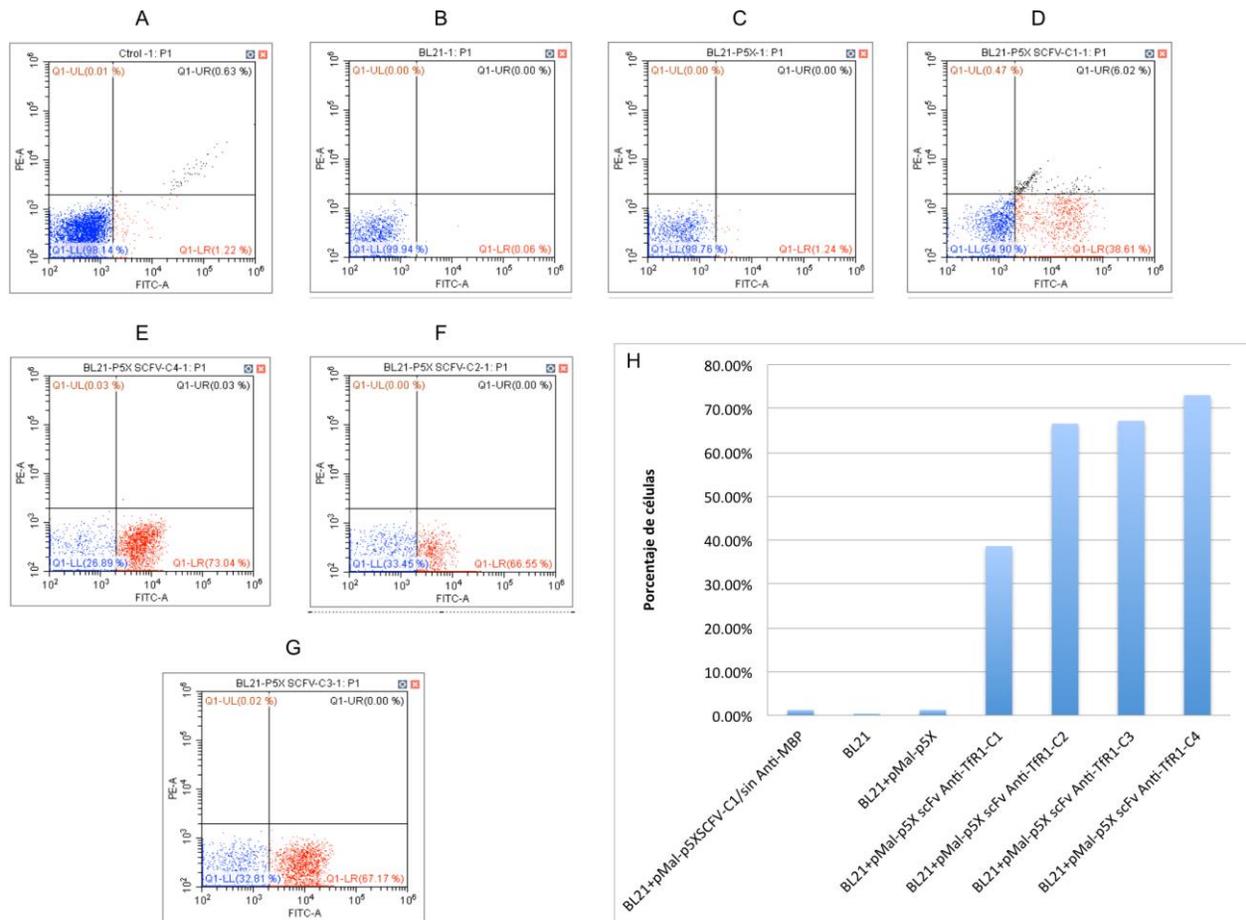


**Figura 9. Ensayos de reconocimiento del antígeno: ELISA.** Ensayo de ELISA empleando los extractos de las clonas transformadas. **A.** Esquema de componentes utilizados e interacciones en el ensayo. **B.** Mapa de combinación de los componentes del ensayo en la placa. **C.** Gráfica de los resultados de la densidad óptica obtenida del reconocimiento del Tfr1 con los extractos obtenidos de las clonas transformadas con el vector pMAL c5X y el plásmido pMAL c5X scFv Anti-Tfr1 y los controles correspondientes. **D.** Gráfica de los resultados de la densidad óptica obtenida del reconocimiento del Tfr1 con los extractos obtenidos de las clonas transformadas con el vector pMAL p5X y el plásmido pMAL p5X scFv Anti-Tfr1 y los controles correspondientes. Ensayo representativo de al menos dos experimentos.

Una vez que se observaron los resultados de la unión de la proteína de fusión (MBP + scFv Anti-Tfr1) al Tfr1 por ensayos de ELISA, se procedió a confirmar estos



resultados por ensayos de Citometría de Flujo. Esto se logró empleando células Ramos que sobre-expresan el receptor de Transferrina 1 (TfR1), para ello se emplearon 300 000 células en PBS 1X en un tubo de 1.5 mL para los controles problemas y se realizó por triplicado para cada condición, el procedimiento se realizó en frío (4°C). Las células se pusieron en contacto con los extractos empleando un equivalente de 25 µg de proteína MBP para cada tubo y se incubaron por 3 horas a 4°C. Posteriormente se realizó el reconocimiento de la proteína de fusión (MBP-scFv Anti-TfR1 periplasmica) y de la proteína MBP periplasmica por medio de un anticuerpo monoclonal anti-MBP inducido en ratón diluido 1:200 (Kit New England BioLabs) y se incubó por una hora, como anticuerpo secundario se empleó un anti-IgG de ratón inducido en cabra (Abcam), acoplado a FITC diluido 1:200 en PBA 1X y se incubó a 4°C en oscuridad por una hora.

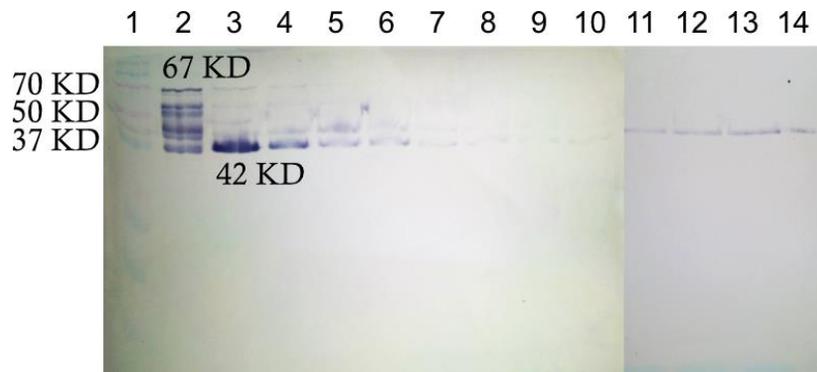


**Figura 10. Reconocimiento de la proteína TfR1 en células Ramos por la proteína de fusión MBP-scFv Anti-TfR1: Citometría de Flujo.** Citometría de flujo efectuada en células Ramos en contacto con los extractos de las bacterias transformadas con el plásmido pMAL p5X scFv Anti-TfR1 y controles. **(A)**, Control de células sin tratamiento. **(B)**, Control células tratadas con bacteria BL21 no transformada en contacto con los anticuerpos primario y secundario. **(C)** Control de células tratadas con la bacteria BL21 transformada con el vector vacío (pMAL p5X) en contacto con los anticuerpos primario y secundario y **(D, E, F y G)** Células tratadas con clones de la bacteria BL21 transformada con el plásmido (pMAL p5X scFv Anti-TfR1) en contacto con los anticuerpos primario y secundario. **(H)** Histograma de los porcentajes de células Ramos que son reconocidas específicamente por la proteína MBP-scFv Anti-TfR1.



### 7.6. Purificación de la proteína de fusión

Para la purificación de la proteína de fusión (MBP-scFv Anti TfR1) bacterias BL21 (DE3) fueron transformadas con el plásmido pMAL p5X scFv Anti-TfR1 y fueron inducidas con IPTG 1 mM, fueron sonicadas y el sobrenadante fue congelado por toda la noche. Posteriormente el sobrenadante descongelado fue disuelto en 5 volúmenes de buffer de columna y se dejó pasar por gravedad a través de una columna de cromatografía de afinidad con resina de amilosa, la resina fue lavada con 5 volúmenes de buffer de columna y se colectaron 11 fracciones empleando maltosa 10 mM en buffer de columna para la elución de la proteína. El contenido de las fracciones fue analizado por medio de western blot, lo cual reveló la proporción de proteína obtenida en cada fracción. Se puede observar que en la primera fracción se obtienen todas las variantes de la proteína de fusión y la señal más baja continúa por las siguientes dos fracciones (figura 11). Las proteínas obtenidas en las fracciones serán purificadas y empleadas para confirmar los ensayos de unión al TfR1 aquí expuestos.





**Figura 11. Purificación de la proteína MBP-scFv Anti-TfR1.** Membrana de nitrocelulosa del western blot de las fracciones obtenidas de la cromatografía del extracto de las bacterias transformadas con el plásmido pMAL p5X scFv Anti-TfR1. En el carril 1, marcador de peso molecular, carril 2 al 14, fracciones 1 a la 13, respectivamente.

## **8. DISCUSIÓN.**

El cáncer es un problema de salud pública a nivel mundial, es la segunda causa de muerte más importante en la población general. En este contexto, los linfomas constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias del tejido linfoide, en donde el Linfoma no Hodgkin (LNH) contribuye con al menos el 50% de las causas de muerte por cáncer en personas de entre 5 a 19 años de edad, y aunque existen diversos esquemas de tratamiento efectivos, entre el 10-15 % presenta falla al tratamiento, con pocas posibilidades de sobrevivir. Este panorama hace necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas para estos pacientes refractarios a los tratamientos habituales.

Desde hace algunos años la inmunoterapia en cáncer ha cobrado mucha importancia y el uso de anticuerpos que reconocen antígenos asociados a tumores o específicos de tumores, han dado resultados alentadores en los estudios preclínicos y clínicos. Recientemente se ha desarrollado un anticuerpo quimérico ratón/humano con la región constante de la IgG3 humana y la región variable de un anticuerpo monoclonal de ratón específico para TfR1 humana (ch128.1) (White, Taetle et al. 1990, Ng, Helguera et al. 2006), el receptor de Transferrina 1 (TfR1) es una proteína que se encuentra sobre-expresada en algunos tipos de LNH, y que es necesaria para mantener la tasa de replicación de las células tumorales. El anticuerpo ch128.1 no inhibe la unión de



Transferrina al receptor TfR1 (Ng, Helguera et al. 2006, Rodriguez, Helguera et al. 2007), pero inhibe la función de TfR1 por inducción de su secuestro, degradación y reducción de la adquisición de Tf a largo plazo, lo cual induce deprivación letal de hierro en diversas células de neoplasias hematopoyéticas malignas agresivas e incurables (Daniels, Ortiz-Sanchez et al. 2011) (Rodriguez, Luria-Perez et al. 2011). Aunque estos anticuerpos han mostrado resultados prometedores en el tratamiento de las neoplasias hematológicas, aun requieren mayor investigación para resolver problemas como la baja capacidad de penetración que presentan los anticuerpos completos para alcanzar las neoplasias sólidas ó semisólidas como los Linfomas (Ball and Broome 2010). Una alternativa que permite mejorar la penetración de los anticuerpos en la zona tumoral, ha sido el desarrollo de los fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) ó también llamados “minianticuerpos de cadena sencilla”, dado que estos fragmentos no poseen fracción constante (Fc), inducen menos efectos secundarios sobre las células que no expresan el antígeno y que tienen receptores Fc y además son moléculas de vida media corta (Ball and Broome 2010) (Ricart 2011). En este trabajo desarrollamos un minianticuerpo (scFv) que reconoce al receptor de Transferrina 1 (TfR1), el desarrollo de este minianticuerpo constituido por la cadena pesada (VH) y ligera (VL) de la región variable del anticuerpo conectada por un linker de Glicinas y Serinas lo que permite el plegamiento necesario para mantener la capacidad de reconocimiento del antígeno, representa una opción para la producción en grandes cantidades de estas moléculas con bajos costos y mejor penetración al microambiente tumoral.



Para lograr esto, la secuencia de la cadena variable pesada (VH) y variable ligera (VL) del scFv Anti-TfR1 fue obtenida de la secuencia del anticuerpo ch128.1 (Anti-TfR1), reportada en la patente US 6,329,508 B1 (Fridden 2001). En nuestro diseño la secuencia que codifica para el dominio VH está unida a la secuencia del dominio VL por una secuencia que codifica para una cadena de glicinas y serinas: SGSGSGGSGSGGSGS (tabla 4) (Accardi L 2010). Esta secuencia descrita en la tabla 7, fue clonada en el sistema de expresión de proteínas pMAL 5X en sus versiones citoplasmica y periplasmica (figura 3 y figura 6), lo cual da como resultado una proteína de fusión denominada MBP-scFv anti-TfR1 esquematizada en la figura 8 A. La clonación de la secuencia en el vector pMAL c5X (citosolico) nos permite obtener una gran cantidad de proteína de fusión, en función de que las señales de traducción del promotor promueven la alta expresión de la proteína, sin embargo, si la proteína requiere de plegamientos especiales para su funcionalidad el uso de este vector podría ser una desventaja. Por otro lado el uso del vector pMAL p5X (periplásmico) nos permite tener una expresión de la proteína de mejor calidad porque se favorecen los plegamientos especiales que ocurren a nivel de periplasma, aun cuando genere una menor cantidad de proteína. Por esto se decidió trabajar a la par con ambos vectores y generar dos plásmidos: pMAL c5X scFv Anti-TfR1 y pMAL p5X scFv Anti-TfR1. Los ensayos de Western blot confirmaron la expresión de la proteína tanto en la versión que se expresa en el citosol como en la versión que se expresa el periplasma, con un peso aproximado de 67 KDa acorde a lo esperado y además se puede apreciar la diferencia en la expresión de la proteína de fusión MBP-scFv anti-TfR1 tanto en citosol (figura 8 C)



como en periplasma (figura 8D). Los ensayos de la capacidad de la proteína MBP-scFv anti-TfR1 de unirse al TfR1 en los ensayos de ELISA, muestran una mejor unión de la proteína obtenida en el periplasma (figura 9) comparada con la que se expresa en citosol. Estos resultados fueron confirmados por citometría de flujo de la proteína expresada en el periplasma y en donde se logra apreciar unión específica de la proteína MBP-scFv anti-TfR1 al receptor de transferrina 1 entre un 50 y 70% de las células de linfoma no Hodgkin que expresan este receptor (Figura 10), estos ensayos fueron realizados a 4 °C para evitar la internalización del TfR1 una vez que se uniera al anticuerpo. En los ensayos de ELISA y citometría de flujo, las proteínas fueron ajustadas a la cantidad de MBP presente tanto en los controles como en la proteína de fusión para restar la unión inespecífica que podría ocurrir por la acción de la unión del MBP al disacárido  $\alpha$ -D-glucopiranosil (1-4)-D-glucopiranososa y con una menor afinidad a la amilosa, la cual es un polisacárido muy similar. Estos glúcidos pueden estar presentes en una gran variedad de componentes celulares. Finalmente, en este trabajo se iniciaron los procesos de purificación de la proteína de fusión MBP-scFv anti-TfR1 expresada en el periplasma mediante ensayos de cromatografía de afinidad, a través del método sugerido por el Kit New England BioLabs pMAL Protein Fusion & Purification System, empleando resina de amilosa, acorde con los resultados del Western blot realizados a las fracciones obtenidas, la proteína de fusión se obtuvo en mayor cantidad en las tres primeras fracciones (figura 11). De estas fracciones se procederá a purificar mediante diálisis, a la proteína de fusión MBP-scFv anti-TfR1 para posteriormente someterla a la digestión enzimática que liberará al scFv anti-TfR1 y con



ella realizar los ensayos de unión al antígeno y de la probable inducción de muerte por privación de hierro de las células de linfoma no Hodgkin.

## 9. CONCLUSIÓN.

Con base en estos resultados podemos concluir que hemos desarrollado una proteína de fusión MBP-scFv anti-TfR1, que contiene al minianticuerpo scFv Anti-TfR1 que reconoce al receptor de transferrina 1 en células de linfoma no Hodgkin, y este reconocimiento se ve favorecido si la expresión de esta proteína de fusión ocurrió en el periplasma bacteriano.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Accardi L, D. B. P. (2010). "Antibodies in single-chain format against tumour-associated antigens: present and future applications." Curr Med Chem **17**(17): 1730 - 1755.
2. Attias, D. and S. Weitzman (2008). "The efficacy of rituximab in high-grade pediatric B-cell lymphoma/leukemia: a review of available evidence." Curr Opin Pediatr **20**(1): 17-22.
3. Ball, E. D. and H. E. Broome (2010). "Monoclonal antibodies in the treatment of hematologic malignancy." Best Pract Res Clin Haematol **23**(3): 403-416.



4. Barnett, D., G. A. Wilson, A. C. K. Lawrence and G. A. Buckley (1987). "Transferrin receptor expression in the leukaemias and lymphoproliferative disorders." Clinical & Laboratory Haematology **9**(4): 361-370.
5. Blom, B. and H. Spits (2006). "Development of human lymphoid cells." Annu Rev Immunol **24**: 287-320.
6. Bosly, A., B. Coiffier, C. Gisselbrecht, H. Tilly, G. Auzanneau, F. Andrien, R. Herbrecht, M. Legros, Y. Devaux, J. Jaubert and et al. (1992). "Bone marrow transplantation prolongs survival after relapse in aggressive-lymphoma patients treated with the LNH-84 regimen." J Clin Oncol **10**(10): 1615-1623.
7. Brandt, J., N. Baird, L. Lu, E. Srour and R. Hoffman (1988). "Characterization of a human hematopoietic progenitor cell capable of forming blast cell containing colonies in vitro." J Clin Invest **82**(3): 1017-1027.
8. Bremer, E., B. ten Cate, D. F. Samplonius, L. F. de Leij and W. Helfrich (2006). "CD7-restricted activation of Fas-mediated apoptosis: a novel therapeutic approach for acute T-cell leukemia." Blood **107**(7): 2863-2870.
9. Brooks, D., C. Taylor, B. Dos Santos, H. Linden, A. Houghton, T. Hecht, S. Kornfeld and R. Taetle (1995). "Phase Ia trial of murine immunoglobulin A antitransferrin receptor antibody 42/6." Clinical Cancer Research **1**: 1259-1265.
10. Campo, E., S. H. Swerdlow, N. L. Harris, S. Pileri, H. Stein and E. S. Jaffe (2011). "The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications." Blood **117**(19): 5019-5032.



11. Chatenoud, L., P. Bertuccio, C. Bosetti, F. Levi, E. Negri and C. La Vecchia (2010). "Childhood cancer mortality in America, Asia, and Oceania, 1970 through 2007." Cancer **116**(21): 5063-5074.
12. Cheson, B. D. and J. P. Leonard (2008). "Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma." N Engl J Med **359**(6): 613-626.
13. Crepin, R., A. L. Goenaga, B. Jullienne, H. Bougherara, C. Legay, K. Benihoud, J. D. Marks and M. A. Poul (2010). "Development of human single-chain antibodies to the transferrin receptor that effectively antagonize the growth of leukemias and lymphomas." Cancer Res **70**(13): 5497-5506.
14. Daniels, T. R., T. Delgado, G. Helguera and M. L. Penichet (2006). "The transferrin receptor part II: targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells." Clin Immunol **121**(2): 159-176.
15. Daniels, T. R., P. P. Ng, T. Delgado, M. R. Lynch, G. Schiller, G. Helguera and M. L. Penichet (2007). "Conjugation of an anti transferrin receptor IgG3-avidin fusion protein with biotinylated saporin results in significant enhancement of its cytotoxicity against malignant hematopoietic cells." Mol Cancer Ther **6**(11): 2995-3008.
16. Daniels, T. R., E. Ortiz-Sanchez, R. Luria-Perez, R. Quintero, G. Helguera, B. Bonavida, O. Martinez-Maza and M. L. Penichet (2011). "An antibody-based multifaceted approach targeting the human transferrin receptor for the treatment of B-cell malignancies." J Immunother **34**(6): 500-508.



17. Fajardo-Gutierrez, A., M. Rendon and J. Mejía-Aranguré (2011). [Cancer epidemiology in Mexican children. Overall results].
18. Fridden, P. (2001). Transferrin receptor reactive chimeric antibodies. United States, Alkermes, Inc.: 142.
19. Fromm, J. R., A. Thomas and B. L. Wood (2009). "Flow cytometry can diagnose classical hodgkin lymphoma in lymph nodes with high sensitivity and specificity." Am J Clin Pathol **131**(3): 322-332.
20. Gallagher, S. R. (2006). "One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins." Curr Protoc Immunol **Chapter 8**: Unit 8 4.
21. Gatter, K. C., G. Brown, I. S. Trowbridge, R. E. Woolston and D. Y. Mason (1983). "Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance." Journal of Clinical Pathology **36**(5): 539-545.
22. Geng, S., J. Feng, Y. Li, Y. Sun, X. Gu, Y. Huang, Y. Wang, X. Kang, H. Chang and B. Shen (2006). "Binding Activity Difference of Anti-CD20 scFv-Fc Fusion Protein Derived from Variable Domain Exchange " Cellular & Molecular Immunology **3**(6): 439-443.
23. Gisselbrecht, C., N. Schmitz, N. Mounier, D. Singh Gill, D. C. Linch, M. Trneny, A. Bosly, N. J. Milpied, J. Radford, N. Ketterer, O. Shpilberg, U. Dührsen, H. Hagberg, D. D. Ma, A. Viardot, R. Lowenthal, J. Briere, G. Salles, C. H. Moskowitz and B. Glass (2012). "Rituximab maintenance therapy after autologous stem-cell transplantation in patients with relapsed CD20(+) diffuse



- large B-cell lymphoma: final analysis of the collaborative trial in relapsed aggressive lymphoma." J Clin Oncol **30**(36): 4462-4469.
24. Gomez-Dantes, H., H. Lamadrid-Figueroa, L. Cahuana-Hurtado, O. Silverman-Retana, P. Montero, M. C. Gonzalez-Robledo, C. Fitzmaurice, A. Pain, C. Allen, D. J. Dicker, H. Hamavid, A. Lopez, C. Murray, M. Naghavi and R. Lozano (2016). "The burden of cancer in Mexico, 1990-2013." Salud Publica Mex **58**(2): 118-131.
25. Habeshaw, J. A., T. A. Lister, A. G. Stansfeld and M. F. Greaves (1983). "Correlation of Transferrin Receptor Expression with Histological Class and Outcome in Non-Hodgkin Lymphoma." The Lancet **321**(8323): 498-501.
26. Juarez-Ocana, S., G. Gonzalez-Miranda, J. M. Mejia-Arangure, M. E. Rendon-Macias, C. Martinez-Garcia Mdel and A. Fajardo-Gutierrez (2004). "Frequency of cancer in children residing in Mexico City and treated in the hospitals of the Instituto Mexicano del Seguro Social (1996-2001)." BMC Cancer **4**: 50.
27. Karlsson, J. O., K. Ostwald, C. Kabjorn and M. Andersson (1994). "A method for protein assay in Laemmli buffer." Anal Biochem **219**(1): 144-146.
28. Kontermann, R. E. (2012). "Antibody-cytokine fusion proteins." Arch Biochem Biophys **526**(2): 194-205.
29. Larrick, J. W., C. Enns, A. Raubitschek and H. Weintraub (1985). "Receptor-mediated endocytosis of human transferrin and its cell surface receptor." J Cell Physiol **124**(2): 283-287.



30. Link, M. P., J. J. Shuster, S. S. Donaldson, C. W. Berard and S. B. Murphy (1997). "Treatment of children and young adults with early-stage non-Hodgkin's lymphoma." N Engl J Med **337**(18): 1259-1266.
31. Liu, J., D. Xiao, X. Zhou, X. Wen, H. Dai, Z. Wang, X. Shen, W. Dai, D. Yang and G. Shen (2008). "Preparation and identification of scFv and bsFv against transferrin receptor." J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci **28**(6): 621-625.
32. Ng, P. P., J. S. Dela Cruz, D. N. Sorour, J. M. Stinebaugh, S. U. Shin, D. S. Shin, S. L. Morrison and M. L. Penichet (2002). "An anti-transferrin receptor-avidin fusion protein exhibits both strong proapoptotic activity and the ability to deliver various molecules into cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10706-10711.
33. Ng, P. P., G. Helguera, T. R. Daniels, S. Z. Lomas, J. A. Rodriguez, G. Schiller, B. Bonavida, S. L. Morrison and M. L. Penichet (2006). "Molecular events contributing to cell death in malignant human hematopoietic cells elicited by an IgG3-avidin fusion protein targeting the transferrin receptor." Blood **108**(8): 2745-2754.
34. Ortiz-Sanchez, E., T. R. Daniels, G. Helguera, O. Martinez-Maza, B. Bonavida and M. L. Penichet (2009). "Enhanced cytotoxicity of an anti-transferrin receptor IgG3-avidin fusion protein in combination with gambogic acid against human malignant hematopoietic cells: functional relevance of iron, the receptor, and reactive oxygen species." Leukemia **23**(1): 59-70.



35. Płoszyńska, A., K. Ruckemann-Dziurdzińska, A. Józwik, A. Mikosik, K. Lisowska, A. Balcerska and J. M. Witkowski (2012). "Cytometric evaluation of transferrin receptor 1 (CD71) in childhood acute lymphoblastic leukemia." Folia Histochemica et Cytobiologica **50**(2): 304-311.
36. Ponka, P. and C. N. Lok (1999). "The transferrin receptor: role in health and disease." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **31**(10): 1111-1137.
37. Ricart, A. D. (2011). "Immunoconjugates against solid tumors: mind the gap." Clin Pharmacol Ther **89**(4): 513-523.
38. Rodriguez, J. A., R. Luria-Perez, H. E. Lopez-Valdes, D. Casero, T. R. Daniels, S. Patel, D. Avila, R. Leuchter, S. So, E. Ortiz-Sanchez, B. Bonavida, O. Martinez-Maza, A. C. Charles, M. Pellegrini, G. Helguera and M. L. Penichet (2011). "Lethal iron deprivation induced by non-neutralizing antibodies targeting transferrin receptor 1 in malignant B cells." Leuk Lymphoma **52**(11): 2169-2178.
39. Sandlund, J. T., J. R. Downing and W. M. Crist (1996). "Non-Hodgkin's lymphoma in childhood." N Engl J Med **334**(19): 1238-1248.
40. Sankari, S. L., K. M. K. Masthan, N. A. Babu, T. Bhattacharjee and M. Elumalai (2012). "Apoptosis in Cancer - An Update." Asian Pacific Journal of Cancer Prevention **13**(10): 4873-4878.
41. Shankland, K. R., J. O. Armitage and B. W. Hancock (2012). "Non-Hodgkin lymphoma." Lancet **380**(9844): 848-857.



42. Shankland, K. R., J. O. Armitage and B. W. Hancock (2012). "Non-Hodgkin lymphoma." The Lancet **380**(9844): 848-857.
43. Vallera, D. A., H. Chen, A. R. Sicheneder, A. Panoskaltsis-Mortari and E. P. Taras (2009). "Genetic alteration of a bispecific ligand-directed toxin targeting human CD19 and CD22 receptors resulting in improved efficacy against systemic B cell malignancy." Leuk Res **33**(9): 1233-1242.
44. White, S., R. Taetle, P. Seligman, M. Rutherford and I. Trowbridge (1990). "Combinations of Anti-Transferrin Receptor Monoclonal Antibodies Inhibit Human Tumor Cell Growth in Vitro and in Vivo: Evidence for Synergistic Antiproliferative Effects." Cancer Research **50**: 7.
45. Xu, L., C. Huang, W. Huang, W. Tang, A. Rait, Y. Yin, I. Cruz, L. Xiang, K. Pirollo and E. Chang (2002). "Systemic Tumor-targeted Gene Delivery by Anti-Transferrin Receptor scFv-Immunoliposomes 1." Molecular Cancer Therapeutics **1**(5): 337-346.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00186

Matrícula: 2153803833

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN MINI-ANTICUERPO (scFv) QUE RECONOCE AL RECEPTOR DE TRANSFERRINA 1 (TfR1) EN CÉLULAS DE LINFOMA

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 23 del mes de febrero del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. LAURA JOSEFINA PEREZ FLORES  
DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA  
M. EN C. GABRIELA ANTONIO ANDRES  
DRA. GUILLERMINA JULIANA BAAY GUZMAN

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: CARLOS ALBERTO AGUILAR GONZALEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

**A PROBAR**

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



CARLOS ALBERTO AGUILAR GONZALEZ

ALUMNO

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. LAURA JOSEFINA PEREZ FLORES

VOCAL

DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA

VOCAL

M. EN C. GABRIELA ANTONIO ANDRES

SECRETARIA

DRA. GUILLERMINA JULIANA BAAY GUZMAN