



Facultad de Ciencias de la Vida

Modelo de diagnóstico mediante el uso de nanoanticuerpos para la detección de la proteína NS1 del virus de Zika.

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Biólogo

Presentado por:

Tommy Idrovo Hidalgo

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2019

AGRADECIMIENTOS

La generación del presente documento tuvo colaboraciones especiales de parte de distintas personas.

A mis padres y mis abuelos, quienes han sido el principal soporte a lo largo de toda mi vida, con sus innumerables enseñanzas, cuidados y confianza, celebramos juntos la finalización de mi etapa universitaria.

A mis verdaderas amistades, sus palabras de aliento, apoyo y momentos amenos han facilitado y envuelto de alegría los momentos más complicados a lo largo de mi carrera.

Al Laboratorio para Investigaciones Biomédicas y a todos sus integrantes, quienes me abrieron las puertas para adquirir experiencia en el área de trabajo que más me apasiona; en especial al Ph.D. Washington Cárdenas y a la Ph.D. Fernanda Bertuccez, quienes guiaron y motivaron activamente la preparación de este documento.

A la Ph.D. Itatí Ibáñez, a quien más que mi tutora durante las pasantías, considero una brillante y valiosa persona y amiga. Bajo su eficaz y proactiva tutela, pude lograr todos los objetivos propuestos al inicio de la estancia de investigación.

A mis amigos becarios doctorales del CEVAN-Milstein, quienes hicieron de mi experiencia internacional una verdadera y gratificante aventura, me llevo en el corazón los mejores recuerdos de Argentina gracias a ustedes.

Finalmente, a la ESPOL, por inculcar en mí la excelencia académica durante estos 5 años de carrera y permitirme vivir la experiencia de cursar pasantías de alto nivel en el exterior, enriqueciendo así el componente teórico-práctico y fomentando mi formación integral como profesional.

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, me corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; Yo, *Tommy Idrovo Hidalgo* doy mi consentimiento para que la ESPOOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”

Tommy Idrovo Hidalgo

EVALUADORES

.....
M.Sc. Diego Arturo Gallardo Pólit
PROFESOR DE LA MATERIA

.....
Ph.D. Fernanda Bertuccez Cordeiro
PROFESOR TUTOR

RESUMEN

El virus de Zika es un problema crónico de salud pública en Ecuador y Sudamérica. Es transmitido por el mosquito *Aedes aegypti*, cuya distribución geográfica expone a riesgos a más de la mitad de la población mundial. La infección viral se ha asociado a malformaciones congénitas en fetos o al desarrollo del síndrome de Guillain-Barré, captando la atención de organismos locales e internacionales de salud pública. En la actualidad, la detección oportuna y diferencial del virus es esencial para evitar complicaciones en pacientes. Sin embargo, la complejidad y costo de las técnicas utilizadas para determinar la presencia de Zika impiden un correcto diagnóstico y tratamiento a los habitantes de zonas de bajo nivel socioeconómico o alejadas de los centros de diagnóstico. En el presente documento se propone un método rápido, altamente específico, accesible y de bajo costo para el diagnóstico de la enfermedad, basado en la producción de nanoanticuerpos (NAcs) provenientes de camélidos, capaces de detectar la proteína NS1, un conservado marcador temprano de infección en la familia de los flavivirus. Para ello, se experimentó de manera preliminar con el clonado, expresión y purificación del antígeno en cultivo celular y posteriormente se evaluó la capacidad de reconocimiento en un set de NAcs diseñados contra la NS1 de otro virus con alta homología al Zika. Que derivó en la obtención del modelaje de una estrategia factible de detección del virus mediante NAcs, así como el establecimiento de un protocolo para la producción de clones específicos para el diagnóstico diferencial de Zika.

Palabras Clave: Camélidos, Diagnóstico, Nanoanticuerpos, NS1, Zika.

ABSTRACT

Zika virus is a chronic public health problem in Ecuador and South America. It is transmitted by the Aedes aegypti mosquito, whose geographical distribution exposes more than half of the world's population to infection risk. The disease has been associated with congenital malformations in fetuses or the development of Guillain-Barré syndrome, attracting the attention of local and international public health organizations. Currently, early and differential detection of the virus is essential to avoid complications in patients. However, the complexity and cost of the techniques used to determine the presence of Zika hinders a correct diagnosis and treatment of the population in areas of low socioeconomic status or distant from diagnostic centers.

This document proposes a fast, highly specific, accessible and low-cost method for the diagnosis of the disease, based on the production of nanobodies from camelids, capable of detecting the NS1 protein, a preserved early marker of infection in the flavivirus family. To do this, the cloning, expression and purification of the antigen in cell culture was preliminary tested and subsequently, a set of nanobodies produced against the NS1 protein of another flavivirus with high homology to Zika, was evaluated.

Finally, the modeling of a feasible virus detection strategy using nanobodies was obtained, as well as the establishment of a protocol to produce specific clones for the differential diagnosis of Zika.

Key Words: *Camelids, Diagnosis, Nanobodies, NS1, Zika.*

ÍNDICE GENERAL

Tabla de contenido

RESUMEN.....	I
<i>ABSTRACT</i>	II
ÍNDICE GENERAL	III
ABREVIATURAS.....	VII
SIMBOLOGÍA.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
CAPÍTULO 1.....	1
1. Introducción	1
1.1 Descripción del problema	4
1.2 Justificación del problema.	5
1.3 Objetivos	6
1.3.1 Objetivo General.....	6
1.3.2 Objetivos Específicos.....	6
1.4 Marco teórico.....	6
1.4.1 Virus de Zika.	6
Generalidades del virus de Zika.	6
Estructura genética del Zika	7
Mecanismo de replicación viral.....	9
Proteína no estructural NS1.....	10
Reactividad cruzada.	10
Diagnóstico.	11
Tratamiento y expectativas.	12
1.4.2 Nanoanticuerpos.....	12

Historia.....	12
Estructura.	12
Ventajas sobre los anticuerpos monoclonales.....	13
Generación de nanoanticuerpos.....	14
Aplicaciones.....	15
Comparación entre los principales métodos de detección de Zika y propuesta de nanoanticuerpos.	16
CAPÍTULO 2.....	19
2. Materiales y métodos.....	19
2.1 Materiales.....	19
2.1.1 Anticuerpos.....	19
2.1.2 Bacteriófagos.....	19
2.1.3 Cepas bacterianas y líneas celulares.	19
2.1.4 Enzimas.....	20
2.1.5 Equipos.....	20
2.1.6 Primers.	21
2.1.7 Reactivos, Solución Buffers y medios.....	22
2.1.8 Vectores.....	26
2.2 Métodos.....	30
2.2.1 Preparación de inmunógeno.....	30
2.2.2 Inmunización de camélidos.....	31
2.2.3 Construcción de librerías inmunológicas de NAcS.....	32
Procesamiento de linfocitos a partir de sangre total y extracción de ARN.....	32
Síntesis de ADNc a partir de ARN.....	33
Amplificaciones por nested PCR.	33
Purificación de producto de la segunda PCR.	36

Digestión de vector y ligación con inserto.....	36
Preparación de células competentes.....	38
Comprobación de inserto por Colony PCR y determinación de eficiencia.....	39
2.2.4 <i>Panning</i> de clones específicos para antígeno.....	39
Re-amplificación.....	40
ELISA de enriquecimiento.....	40
Comprobación de inserto por PCR de colonias.....	40
Digestión con HinfI de clones positivos.....	40
2.2.5 Ensayo de diagnóstico.....	41
Teórico propuesto.....	41
Práctico realizado.....	41
CAPÍTULO 3.....	44
3. Resultados esperados.....	44
3.1 Producción de antígeno e inmunizaciones.....	44
Clonado de antígeno NS1.....	44
Expresión de antígeno NS1 en células eucariotas y comprobación por <i>Western blot</i> .	47
Producción de antígeno a gran escala y purificación.....	50
Determinación del título de anticuerpos por inmunización de llama.....	52
Separación de linfocitos.....	52
3.2 Construcción de librería inmune.....	53
Amplificación de NAcS.....	53
Ligación de NAcS.....	55
Transformación bacteriana.....	56
Análisis de clones con inserto de tamaño apropiado.....	57
3.3 <i>Panning</i> de fagos.....	57

<i>Screening</i> por ELISA.....	59
Digestión con <i>Hinf</i> I.....	61
3.4 Modelo de diagnóstico por ELISA.....	61
3.5 Análisis de costos.....	62
CAPÍTULO 4.....	68
4. Conclusiones y recomendaciones	68
4.1 Conclusiones.....	68
4.2 Recomendaciones.....	69
BIBLIOGRAFÍA.....	70
ANEXOS.....	76
ANEXO A.....	76
Preparación de soluciones y buffers – Tomado de Ibáñez, I.	76
ANEXO B.....	77
Protocolo base para generación de NAcS – Adaptado de Ibañez, I.....	77

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN complementario.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: ARN Mensajero

BSA: Albúmina de suero bovino.

CH: Dominio constante de cadena pesada.

CL: Dominio constante de cadena liviana.

CMSP: Células mononucleares de sangre periférica.

DC-SIGN: *Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecular 3-Grabbing Nonintegrin.*

DENV: Dengue virus.

DEPC: Dietil pirocarbonato.

dNTPs: Deoxinucleósidos trifosfatos.

DTT: Ditiotreitól.

ECL: Sustrato electroquimoluminiscente.

ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas.

Fv: Fracción variable.

GFP: Proteína verde fluorescente.

HRP: Peroxidasa de rábano.

Ig: Inmunoglobulina

mAbs: Anticuerpos monoclonales.

NACs: Nanoanticuerpos.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PDR: Pruebas de diagnóstico rápido.

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real.

RdRP: ARN Polimerasa Dependiente de ARN.

RT-LAMP: La amplificación isotérmica mediada por bucle de transcripción inversa.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.

SCZ: Síndrome congénico por Zika.

SDS: Dodecil sulfato de sodio.

SGB: Síndrome de Guillain-Barré.

TIM: Inmunoglobulina de las células T

UFC: Unidad Formadora de Colonia

UTR: Región no traducida.

VH: Región variable de la cadena pesada de los anticuerpos.

VHH: Fragmento de reconocimiento de antígeno de anticuerpos de solo cadena pesada.

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana.

VL: Región variable de la cadena liviana de los anticuerpos.

WB: *Western Blot*.

YFV: Virus de la fiebre amarilla.

ZIKV: Virus del Zika.

SIMBOLOGÍA

μg : microgramo.

μL : microlitro.

EtOH: etanol.

g: gramo.

H: hora.

HCl: ácido clorhídrico.

KCl: cloruro de potasio.

kDa: kilodalton.

KH_2PO_4 : fosfato monopotásico.

L: litro.

M: molar.

mg: miligramo.

mL: mililitro.

mM: milimolar.

Na_2HPO_4 : fosfato de disodio.

NaCl: cloruro de sodio.

NaOH: hidróxido de sodio.

nm: nanómetro.

pb: par de bases.

pH: potencial de hidrógeno.

U: unidad enzimática.

μM : micromolar.

V: voltio.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Descripción de proteínas virales de Zika y sus funciones.	8
Tabla 1.2. Cuadro comparativo entre nanoanticuerpos y anticuerpos convencionales.	14
Tabla 1.3. Aplicaciones actuales y potenciales de nanoanticuerpos.	15
Tabla 1.4. Cuadro comparativo entre técnicas de diagnóstico actuales para ZIKV.	16
Tabla 2.1. Cronograma y volúmenes de inmunización utilizados.	31
Tabla 3.1. Valores de absorbancia obtenidos de la prueba ELISA para enfrentamiento entre NAcS anti-NS1-DENV1 contra distintos tratamientos.	59
Tabla 3.2. Costos asociados a reactivos generales en el proyecto.	62
Tabla 3.3. Costos asociados a enzimas de restricción.	66
Tabla 3.4. Costos asociados a síntesis de oligonucleótidos.	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.1. Organización genómica del virus de Zika.	7
Fig. 1.2. Ciclo de replicación viral del Zika.	10
Fig. 1.3. Diferencia estructural entre anticuerpos convencionales y de cadena pesada.	13
Fig. 1.4. Esquema general de producción de nanoanticuerpos.	15
Fig. 2.1. Esquema de distribución de clones NAcs-antígenos en placa para ensayo ELISA.	43
Fig. 3.1. Electroforesis de amplificación de fragmento NS1 Zika.	44
Fig. 3.2. Simulación de digestión de vector base para clonado.	45
Fig. 3.3. UFCs crecidas en la placa de cultivo.	45
Fig. 3.4. Simulación de cortes y patrones de bandas esperados con <i>NcoI</i> en colonias bacterianas con posible inserto.	46
Fig. 3.5. Comprobación de colonias por restricción con <i>NcoI</i> .	46
Fig. 3.6. Segundo análisis de restricción de UFCs.	47
Fig. 3.7. Distribución de células y plásmidos transfectados en placa de 12 pocillos.	48
Fig. 3.8. Expresión del control de transfección NS1-DENV2-GFP.	48
Fig. 3.9. Western Blot de pellet con presencia de proteínas detectadas por anticuerpo anti-6His-HRP.	49
Fig. 3.10. Western Blot de sobrenadante de células.	49
Fig. 3.11. Imagen del WB de sobrenadante con modificaciones de contraste e intensidad.	50
Fig. 3.12. Western Blot de expresión de NS1-ZIKV a gran escala	51
Fig. 3.13. Coomassie blue de purificación de proteína NS1-ZIKV	51
Fig. 3.14. Gráfico de tendencia de inmunoglobulinas G totales y G1, G2.	52
Fig. 3.15. Sitios de anillado de primers utilizados para la amplificación.	54
Fig. 3.16. Resultados esperados de la primera PCR.	54

Fig. 3.17. Resultados esperados de la segunda PCR.	55
Fig. 3.18. Vector pMECS con inserto de secuencia de VHH.	56
Fig. 3.19. Simulación de electroforesis para comprobación de inserto a partir de colonias.	57
Fig. 3.20. Proceso de <i>panning</i> para selección de nanoanticuerpos específicos contra la proteína NS1 de Zika.	58
Fig. 3.21. Gráfico de barras comparativo con la diferencia de interacción antígeno-anticuerpo entre tratamientos para cada clon.	60
Fig. 3.22. Digestión con <i>HinfI</i> de clones positivos.	61
Fig. 3.23. Esquema de diagnóstico por ELISA <i>Sandwich</i> .	62

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

El virus del Zika (ZIKV), pertenece al género *Flavivirus* dentro de la familia *Flaviviridae*. Esta familia de virus es conocida por incluir patógenos de gran impacto para la salud humana, como lo son: Dengue (DENV); Virus de la fiebre amarilla (YFV); Virus del Nilo Occidental (WNV); Virus de la Encefalitis Japonesa (JEV); entre otros [1][2].

Se transmite principalmente por la picadura de mosquitos hembra del género *Aedes* y posiblemente de mosquitos de los géneros: *Culex*; *Anopheles*; *Eretmapodites* y *Mansonia*, sin embargo, es necesario mencionar que el virus también puede infectar por transmisiones no vectoriales, siendo probable el contagio perinatal, por transfusiones sanguíneas [3] o por vía sexual al mantener contacto sin protección con fluidos del aparato reproductor masculino o femenino [2], así como por saliva o leche materna de una persona infectada por ZIKV [4].

La infección por Zika es sintomática solo en el 20% de los casos, con manifestaciones patológicas típicas de enfermedades tropicales, como: fiebre; dolor articular; conjuntivitis; diarrea; deshidratación y cefalea. No obstante, la infección por este virus no se encuentra asociada con altas tasas de mortalidad [5].

Desde la fecha de su descubrimiento, que data de 1947, los problemas por Zika se mantuvieron desapercibidos, quedando únicamente confinados a pequeños brotes locales en África y Asia que no recibieron mayor atención por su asociación con sintomatología leve, sin consecuencias mortales [2]. No obstante, durante la última década el virus ha ampliado su distribución geográfica, provocando un fuerte brote en Sudamérica en 2015, reportado en primer lugar por Brasil y extendido luego hacia otros países de América del Sur y América Central [6][7].

A raíz del gran brote en Brasil, donde se presentaron alrededor de 1.5 millones de casos, un reporte describió la relación entre la infección con el virus del Zika y la microcefalia en neonatos, cuya afección se denominó: “Síndrome congénito por Zika (SCZ)”, información que atrajo la atención del mundo entero [3].

Diferente a la transmisión usual del ZIKV a través de sus vectores, el SCZ es resultado de una transmisión de tipo vertical del virus de Zika, desde una mujer infectada durante el embarazo, hacia el feto [8].

Este síndrome posee ciertas características principales, dentro de las cuales se incluyen: microcefalia severa con colapso parcial del cráneo, disminución de tejido en el cerebro, acompañado de daño cerebral y afectación a la parte posterior del globo ocular [8].

Sin embargo, no solo los fetos son un grupo de riesgo durante el padecimiento por el virus. En casos extremos, la infección por Zika puede provocar una severa complicación clínica, como lo es el Síndrome de Guillain-Barré (SGB), que comprende una polineuropatía autoinmune con prevalencia principalmente en adolescentes y adultos [8]. El SGB, se manifiesta comúnmente mediante una debilidad progresiva, comenzando por las extremidades inferiores y derivando en disfunción motora y parálisis al cabo de unas semanas, pudiendo desarrollarse también desórdenes de los nervios craneales en los pacientes [9].

Por los motivos descritos, el virus de Zika se ha convertido en un patógeno con implicaciones significativas en la salud humana, con diversas presentaciones clínicas, ausencia de diagnósticos con nivel alto de especificidad para la enfermedad y un vacío en la comprensión de los mecanismos patogénicos de este virus [1], sugiriendo la necesidad del desarrollo de nuevas estrategias para su diagnóstico, tratamiento y prevención.

Estas nuevas estrategias a desarrollar, deben considerar que se pueda extender su aplicación a sitios de difícil acceso o de recursos limitados, por lo cual un punto clave de estos nuevos métodos es la accesibilidad para la población en general [10].

En la actualidad, una de las técnicas ampliamente utilizadas con versatilidad para distintos fines clínicos, son los anticuerpos monoclonales (mAbs), que desencadenaron una revolución en tópicos biotecnológicos [11], por su alta afinidad y especificidad, han sido utilizados para detectar y marcar diversos antígenos [12].

Los anticuerpos, también llamados inmunoglobulinas, son glicoproteínas presentes en el suero sanguíneo, involucradas directamente en la respuesta inmune como mecanismo de defensa ante estímulos externos provocados por antígenos. Están comprendidos por cuatro cadenas polipeptídicas que le dan la estructura característica en forma de "Y" [12]. Dentro de la estructura de esta biomolécula, ha sido posible identificar la función de ciertos fragmentos, como lo son el paratopo, la fracción variable y la fracción constante [12].

En base a ello, los anticuerpos constituyen una de las herramientas analíticas primarias, utilizados para adherirse a antígenos de interés en un amplio rango de investigaciones y diagnósticos clínicos, incluyendo los ensayos ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), inmunocitoquímica e inmunoprecipitación.

Por tales motivos, los anticuerpos monoclonales son utilizados actualmente como uno de los principales recursos para el diagnóstico de enfermedades infecciosas como la malaria, VIH, dengue, señalización de oncoproteínas en cáncer, entre otras aplicaciones [12][13][14][15].

Pero, a pesar de su versatilidad, los anticuerpos monoclonales también poseen limitaciones. Y es que su larga vida media, que puede comprender hasta 4 semanas, es contraproducente durante procesos de imagen molecular, en los cuales puede causar ruido de fondo, en adición, el hospedero suele producir una respuesta inmune ante los anticuerpos monoclonales [16]. Además, el gran tamaño de las inmunoglobulinas monoclonales, y el clonado de los fragmentos que las conforman, son un problema debido a alta tasa de expresión deficiente o baja viabilidad funcional [11].

En consecuencia, el enfoque tradicional en cuanto a los anticuerpos monoclonales ha cambiado y ahora está centrado en el descubrimiento de que la familia *Camelidae*, produce un tipo particular de anticuerpos o inmunoglobulinas, denominados nanoanticuerpos (NAcs) [13][17]. Estos se componen de las regiones variables de los anticuerpos de cadenas pesadas.

Los NAcs poseen diversas características que le confieren ventajas sobre los anticuerpos monoclonales, como lo son: baja inmunogenicidad; fuerte estabilidad; fácil manipulación genética; fácil expresión y buena solubilidad; producción eficiente y de bajo costo en bacterias, además de ser los fragmentos más pequeños capaces de unirse a un antígeno [17].

Se han utilizado ampliamente en estudios clínicos, siendo eficaces en cruzar la barrera hematoencefálica, adhiriéndose a tumores, en el desarrollo de sensores biológicos [18], como agentes de liberación controlada de drogas, estudio de función proteica intracelular, capacidad para detectar biomarcadores del cáncer y desarrollo de nuevas técnicas terapéuticas [16][19][20][21].

En consecuencia, en este trabajo se busca proponer un modelo versátil, de detección rápida, precisa y de bajo costo utilizado a gran escala para el diagnóstico temprano del Zika, explotando las novedosas características de los NACs.

1.1 Descripción del problema

La infección por ZIKV es un problema de salud pública en las regiones tropicales del mundo, con gran potencial para brotes en regiones que no son comúnmente afectadas. El alto riesgo epidémico está asociado con la adaptación del virus a un ciclo urbano o periurbano, donde existe una fácil transmisión mediante *Aedes aegypti* u otros mosquitos de distinto género. Además, actualmente más de la mitad de la población mundial vive en áreas que presentan infestaciones con estos vectores [22]. A su vez, la creciente urbanización aporta a la aparición del virus en nuevas poblaciones, y las expone al desarrollo de síndromes peligrosos como el SGB o SCZ [23]. El mayor grupo de riesgo se ubica en las mujeres embarazadas, pues la infección por el virus puede desencadenar partos de bebés con microcefalia [24][25].

Desde el primer reporte del virus en Ecuador en 2016, hasta 2018, se han confirmado 5125 casos [26]. Dentro de los cuales, en 2017 se registraron 7 casos de síndrome congénito por Zika en bebés, de un total de 912 pacientes embarazadas con diagnóstico positivo para la enfermedad [24].

La incidencia se encuentra favorecida por las condiciones climáticas de la región costera del país y por los frecuentes eventos sísmicos, que crean las condiciones propicias para la proliferación del vector [27].

Actualmente, las estrategias utilizadas para la detección del Zika poseen dos enfoques: uno basado en la amplificación de ARN viral mediante RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) y otro basado en la determinación de la presencia de IgM e IgG producidas contra el virus. Sin embargo, existen ciertas desventajas en cuanto a estos diagnósticos, donde el tiempo es el principal factor limitante [28], y la complejidad de las técnicas una causa.

En el caso de los anticuerpos, es necesario esperar de 1 a 14 días para detectar su presencia, impidiendo un diagnóstico rápido [28], mientras que la RT-PCR puede ser inespecífica, pudiendo resultar en falsos positivos, debido a la similitud molecular de las proteínas de Zika con otros flavivirus, como el dengue [29] o en falsos negativos por la

baja carga viral en los primeros días post-infección, además de la necesidad de equipamiento costoso y personal altamente capacitado para llevar a cabo un correcto diagnóstico, lo cual es difícil de encontrar en zonas de bajo nivel de desarrollo socioeconómico.

1.2 Justificación del problema.

La principal estrategia de combate contra el Zika actualmente se basa en la capacitación de los habitantes de zonas de alto riesgo para evitar la proliferación del vector, principalmente en áreas rurales. A pesar de ello, las medidas de respuesta ante un posible caso de la enfermedad siguen siendo poco eficientes [30].

Los errores en diagnóstico, la similitud de síntomas, la falta de presupuesto y equipos en zonas periurbanas dificultan aún más la reacción oportuna de los organismos de salud, aumentando así el riesgo de complicaciones en la población.

Por tal motivo, la generación de una herramienta de diagnóstico rápido, específico, accesible y de bajo costo colaboraría en gran medida a la mejora del nivel de respuesta terapéutica de las instituciones de salud en el país.

Para ello, los NAcS se perfilan como excelentes candidatos para el desarrollo de nuevas tecnologías de diagnóstico, al ser altamente versátiles y de producción fácil y económica en bacterias [12]. Pueden también adaptarse a técnicas basadas en el ensayo de ELISA, o en otros formatos de pruebas de rápido diagnóstico (PDR), mismas que no requieren de equipos sofisticados, metodologías complejas ni de personal altamente especializado en la técnica [21], volviéndolo accesible y asequible para su implementación tanto en áreas urbanas como rurales [31].

Adicionalmente, la posibilidad de realizar diagnósticos en una placa de ELISA permite no solo una reducción en el tiempo requerido para la lectura del resultado, sino también el análisis de hasta 96 muestras de distintos pacientes, una por cada pocillo de la placa. Finalmente, la producción de nanoanticuerpos que posean potencial de diagnóstico para una detección temprana del Zika es altamente factible, debido a que la generación de NAcS que tengan como diana la proteína NS1 de un flavivirus ya se ha probado con éxito [32].

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

- Modelar una estrategia basada en la aplicación de inmunoensayos con el uso de nanoanticuerpos de camélidos para la detección de la proteína NS1 del virus de Zika.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Establecer un protocolo de generación de NAcS específicos para el diagnóstico de Zika.
- Producir la proteína recombinante NS1-Zika para futuras inmunizaciones.
- Evaluar la afinidad de un set de NAcS generados contra dengue, frente a la proteína NS1 de Zika y dengue mediante un ensayo ELISA, con el fin de determinar la especificidad de la interacción.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Virus de Zika.

Generalidades del virus de Zika.

El virus Zika pertenece a la familia *Flaviviridae*, al igual que el virus del dengue, fiebre amarilla y virus del Nilo occidental.

Se aisló originalmente en 1947, proveniente de un mono macaco *Rhesus* febril, hallado en el bosque Zika de Uganda. Posteriormente, la identificación del virus se confirmó en los mosquitos de la especie *Aedes africanus* del mismo bosque [33].

Los primeros casos reportados en humanos datan de 1954, cuando la infección se pudo confirmar en tres pacientes. A partir de dicha fecha, apenas doce casos benignos de ZIKV se registraron en Asia y África, hasta el año 2007, cuando se reportó el primer brote causado por el virus fuera de los continentes asiático y africano, situado en la Isla Yap, Micronesia. A raíz de ello, un nuevo brote apareció en el Pacífico, focalizándose en Polinesia Francesa entre los años 2013-2014. En dicho brote, se reportó una pequeña fracción de casos asociados con complicaciones neuronales [34]. Después, en mayo del 2015 la Organización Mundial de la Salud (OMS), reportó la

primera transmisión local del virus en América, en Brasil, país donde posteriormente se estimó la existencia de alrededor de 440.000 a 1'300.000 casos sospechosos durante el transcurso del año antes mencionado [35], posible situación precursora para la dispersión del virus hacia otros países de América del sur y América central.

Estructura genética del Zika

El virus de Zika posee un genoma de ARN positivo monocatenario, con alrededor de 10,8 kb que codifican para 3,419 aminoácidos. Posee dos regiones no codificantes denominadas 5'UTR y 3'UTR, que flanquean un marco abierto de lectura que codifica una poliproteína que eventualmente se secciona en la cápside, precursor de membrana, envoltura, y siete proteínas no estructurales [33].

La región 5' UTR, posee una estructura metilada en su porción 5', mientras que la región 3'UTR no posee cola poli-A y termina en una horquilla conservada de ARN [36].

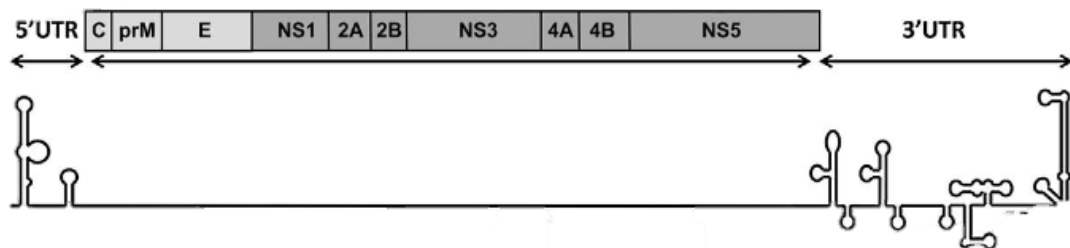


Fig. 1.1. Organización genómica del virus de Zika. Adaptado de Göertz et al, 2018 [36].

Las funciones de cada proteína del genoma de Zika se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 1.1. Descripción de proteínas virales de Zika y sus funciones.

Proteína.	Función.
C	Proteína estructural que forma la cápside, consiste en cuatro hélices alfa conservadas y un dominio hidrofóbico interno [37]. Posiblemente coopera con la proteína E para la fusión de membranas y liberación del genoma al citosol. Adicionalmente, subunidades de proteína C se ensamblan para formar nucleocápsides que engloban el material genético viral [38] [39].
prM	Glicoproteína membranal precursora de proteína M, se compone de 178 aminoácidos y forma una parte integral de la envoltura en los flavivirus. Es posible que coopere en el pliegue estructural de la proteína E, el cual es mediado por chaperonas [37] [39].
E	Mayormente involucrado en la fusión de membranas y reconocimiento inmune del huésped, posee tres dominios que le otorgan funciones de organización estructural de la envoltura, unión a receptores celulares e interacción monomérica [40] [39].
NS1	Se asocia con lípidos y es necesaria para la replicación viral e infección, se secreta hacia el espacio extracelular para evadir la respuesta inmune mediante la interacción con los componentes de la respuesta innata y adaptativa del huésped. Es el mayor marcador antigénico para las infecciones por flavivirus, sirviendo como biomarcador para la detección temprana [40] [39].
NS2A	Proteína polifuncional asociada a membrana, participa en la replicación de ARN, uniéndose a la región 3' UTR del material genético del virus y a otros complejos de replicación. Además, inhibe la respuesta interferón del huésped y regula la secreción de partículas virales desde la célula [39].
NS2B	Proteína no estructural hidrofóbica, su función se asocia a la formación de complejos de replicación viral en la membrana del retículo endoplasmático, y colabora con NS3 para formar el complejo de serina proteasa encargada de cortar la poliproteína viral [39]
NS3	Posee dos dominios funcionales: dominio de helicasa y dominio de proteasa. Encargada del procesamiento de la poliproteína [40] [39].

NS4A	Proteína involucrada en patogénesis e interferencia de cascadas de señalización celular [41]
NS4B	Proteína integral de membrana de naturaleza hidrofóbica, es altamente conservada en la familia de flavivirus. Su principal función es la de inducir arreglos en la membrana del retículo endoplasmático, para formar paquetes vesiculares necesarios para la replicación [39][42].
NS5	Posee dos dominios claves para la replicación genómica. El dominio MTasa (N-Terminal metiltransferasa), responsable de la estructura de la región 5' UTR del genoma, que asegura la traducción eficiente y evasión de la respuesta inmune del huésped, y el dominio C-terminal que consiste en una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP), encargada del proceso de replicación viral [40] [39].

Mecanismo de replicación viral.

El mecanismo de replicación viral del Zika comienza por la unión del virus a un receptor celular, que pueden ser: receptores de la familia TAM (*Tyros3/Axl/Mer*), dominio de mucina e inmunoglobulina de las células T (TIM), y DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific intercelular adhesion molecular 3-grabbing nonintegrin*). Todos ellos receptores tanto de células neuronales como no neuronales. Una vez el virus se ha unido a un receptor, se internaliza mediante endocitosis mediada por clatrin, y se dirige a los endosomas por la actina celular y microtúbulos [43].

Al ingresar, el virus libera al citoplasma su material genético de polaridad positiva al fusionar su envoltura con la membrana endosomal, favoreciéndose de la naturaleza ácida del ambiente. Seguido, el ARN liberado actúa como ARNm, para sintetizar la cadena viral complementaria que, a su vez, dirigirá la síntesis de más cadenas de polaridad positiva [43].

La estructura 5' UTR del virus, actúa como "cap" cuando el material genético es liberado al citoplasma, permitiendo la traducción directa del marco abierto de lectura en el ribosoma [44].

Posterior a la traducción, con las proteínas producidas en el ribosoma, el material genético forma viriones inmaduros envueltos en el retículo endoplasmático, estos

viriones envueltos, entran a la vía secretoria y justo antes de la salida del virus, la proteína prM se corta para formar el virión maduro que será liberado de la célula [43].

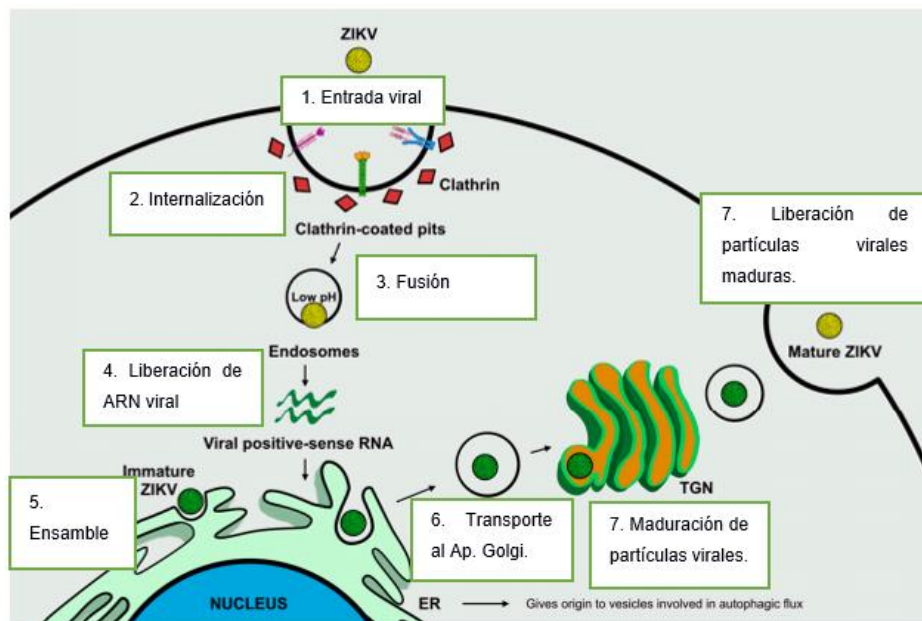


Fig. 1.2. Ciclo de replicación viral del Zika. Adaptado de Gratton et al, 2019 [45].

Proteína no estructural NS1.

La proteína NS1, altamente conservada en los flavivirus, posee alrededor de 352 aminoácidos. Dentro de sus principales funciones en la replicación viral, se le atribuye el rol de evasor del sistema inmune, atenuando la activación del sistema complemento [46].

Adicionalmente, se considera un biomarcador importante para el diagnóstico viral, debido a su presencia en el suero de pacientes infectados con flavivirus aún en etapas tempranas de la patología, haciendo posible la detección del virus durante la primera semana de la aparición de los síntomas asociados [47].

Reactividad cruzada.

El dengue y Zika son virus que comparten una alta homología en estructura y proteínas. Pero, mientras el dengue posee cuatro serotipos circulantes, el Zika solo posee uno.

Sin embargo, esta homología supone un problema, principalmente debido a la reactividad cruzada de los anticuerpos ante infecciones con estos virus.

La diana principal de la respuesta inmune humoral contra los flavivirus es la proteína estructural E, cuya similitud entre ambos virus va desde el 60% al 75%. De manera opuesta, la respuesta de las células T contra la infección por DENV o ZIKV, se dirige principalmente a las proteínas no estructurales, que se encuentran altamente conservadas entre la familia *Flaviviridae* [48].

No obstante, esta reactividad cruzada no es favorable desde el punto de vista de protección inmune, debido al riesgo de que una segunda infección por flavivirus sea capaz de provocar una respuesta inmunológica ineficiente por la memoria celular. Esto se debe a la preferencia en producir células T que reconozcan el epítipo con reactividad cruzada, antes que la generación de células T que sean capaces de unirse a un nuevo epítipo, desencadenando así la circulación de células con capacidad sub-neutralizante que se ligan al virus, pero no son capaces de eliminarlo.

Es necesario resaltar que la reactividad cruzada también complica los diagnósticos inmunológicos de rutina, que normalmente se realizan por detección de IgM mediante el ensayo de ELISA, debido a que la detección de las inmunoglobulinas únicamente aportan datos sobre la existencia de una infección por flavivirus y no diferencian entre un virus específico y otro, siendo el ensayo de reducción por placa (PRNT) el más adecuado para un diagnóstico diferencial [49].

Diagnóstico.

El diagnóstico por laboratorio posee como herramienta principal la detección de ARN viral durante la fase aguda de la infección, predominando la RT-PCR como método predilecto, sin embargo, la detección del material genético viral solo es posible en suero hasta el séptimo día después del inicio de la sintomatología, por lo cual una vez ha transcurrido este tiempo, es recomendado utilizar el ensayo de neutralización por reducción en placas, que cuantifica la cantidad de anticuerpos neutralizantes presentes en el suero sanguíneo de un paciente [52]. Otros métodos de detección incluyen: aislamiento del virus y ELISA por inmunoglobulinas G y M.

Tratamiento y expectativas.

No existe actualmente modalidad terapéutica o vacuna que pueda proteger o atenuar los efectos de la infección por el virus de Zika, no obstante, la enfermedad puede ser tratada de acuerdo a los síntomas manifestados [53].

1.4.2 Nanoanticuerpos.

Historia.

Un trabajo publicado en 1993 por Hamers-Casterman, titulado “*Naturally occurring antibodies devoid of light chains*” describió por primera vez la incidencia de una clase novedosa de anticuerpos en camélidos. Estos anticuerpos representaban alrededor del 50% del total de anticuerpos funcionales en el animal, pero carecían de cadenas livianas [20].

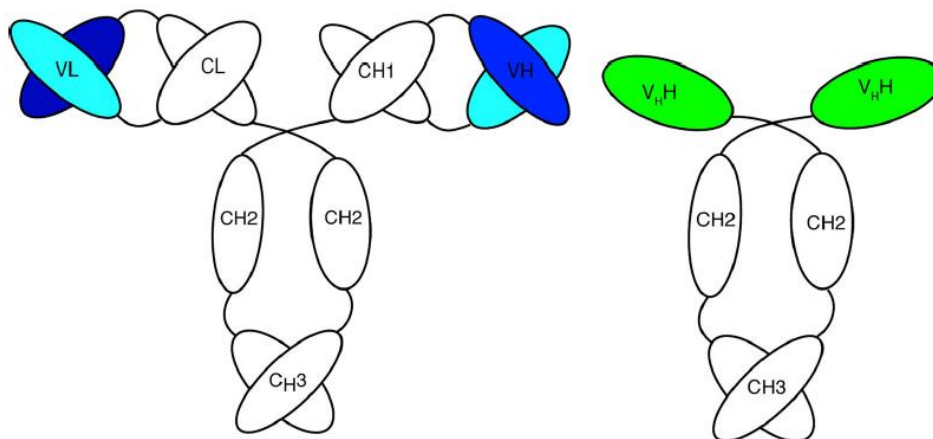
Tras diversos ensayos para descartar que la ausencia de cadenas livianas era consecuencia de las técnicas utilizadas, se ratificó que todos los camélidos mostraban inmunoglobulinas conformadas solo por cadenas pesadas. Se comprobó que estos anticuerpos presentaban una delección completa del dominio CH1, así como la capacidad de estos pequeños anticuerpos de generar un extenso repertorio de diversidad inmunológica [54]. Abriendo así un campo totalmente nuevo para la investigación y desarrollo de nuevas estrategias y metodologías inmunológicas.

Estructura.

La estructura general de las inmunoglobulinas convencionales (Fig. 1.3) se conforma por dos cadenas pesadas (H) idénticas, conjugadas con dos cadenas livianas (L) idénticas. Las cadenas livianas poseen dos dominios, mientras que las cadenas pesadas poseen cuatro. La interacción entre los dominios N terminales de ambas cadenas forma el fragmento variable (Fv), que es el encargado del reconocimiento antigénico (VL-VH), mientras que los dominios restantes son secuencias más conservadas (CH-CL), encargadas tanto de la conformación estructural del anticuerpo, como del reclutamiento de células del sistema inmune, el cual es mediado por los dominios CH3 [55].

Dentro de los isotipos de IgG en los camélidos, se encuentran los anticuerpos de solo cadenas pesadas, que carecen de cadenas livianas y del dominio CH1 de la cadena pesada. Estas inmunoglobulinas compuestas por solo cadenas pesadas, poseen un

fragmento de reconocimiento de antígeno formado por un único dominio variable, capaz de reconocer de manera efectiva compuestos inmunógenos, y de dirigir una respuesta inmune con la misma eficacia que los anticuerpos comunes [55]. A pesar de las vastas singularidades estructurales, los genes de los anticuerpos convencionales y de los anticuerpos de cadena pesada (que dan lugar a los nanoanticuerpos), poseen una organización idéntica de intrones, exones, motivos genéticos y sitios de poliadenilación alternativos. La diferencia radica en una mutación puntual en el exón CH1 de los genes codificantes para la producción de anticuerpos de cadena pesada. Esta mutación, interfiere con el sitio de empalme del ARNm, provocando la eliminación de la región CH1 al momento de la maduración [55].



A: Anticuerpo convencional.

B: Anticuerpo de cadenas pesadas.

Fig. 1.3. Diferencia estructural entre anticuerpos convencionales y de cadenas pesadas. Adaptado de Lafaye, 2018 [11].

Ventajas sobre los anticuerpos monoclonales.

Las características únicas de los NACs les confieren ventajas sobre los anticuerpos monoclonales comúnmente utilizados para distintos fines, un cuadro comparativo se muestra a continuación:

Tabla 1.2. Cuadro comparativo entre nanoanticuerpos y anticuerpos convencionales.

	Nanoanticuerpo.	Anticuerpo convencional.
Tamaño.	15k Da. [56]	150 k Da. [56]
Estructura.	Solo cadenas pesadas [17].	Cadenas pesadas y livianas [17].
Inmunogenicidad.	Baja, no requiere humanización [17].	Alta [17].
Expresión genética.	Sencilla, al ser un único marco abierto de lectura [17].	Complicada [17].
Costo.	Bajo, su producción se puede realizar en bacterias o cultivo celular [57].	Producción de anticuerpos monoclonales posee alto costo [57].
Alcance biológico.	Atraviesa la barrera hemato-encefálica y no es digerida por los jugos gástricos [12].	No atraviesa la barrera hemato-encefálica y se degrada en presencia de pH bajo.

Generación de nanoanticuerpos.

Los anticuerpos de dominio único, NAcS o nanoanticuerpos, pueden ser producidos naturalmente por organismos pertenecientes a la familia *Camelidae* ante la exposición a un antígeno. Por lo general, para inmunizar premeditadamente un animal con un inmunógeno, se inyecta una cantidad sustancial (alrededor de 250 µg) del elemento extraño para estimular la producción de anticuerpos, tanto de dominio simple como los convencionales. A continuación, los fragmentos de cadena pesada provenientes de los linfocitos son amplificados por técnicas convencionales de biología molecular, como la RT-PCR, para así ser introducidos en bacterias mediante el uso de vectores y así construir librerías genéticas de NAcS, con el fin de seleccionar aquellos capaces de adherirse al antígeno al someterse al ensayo de ELISA [18].

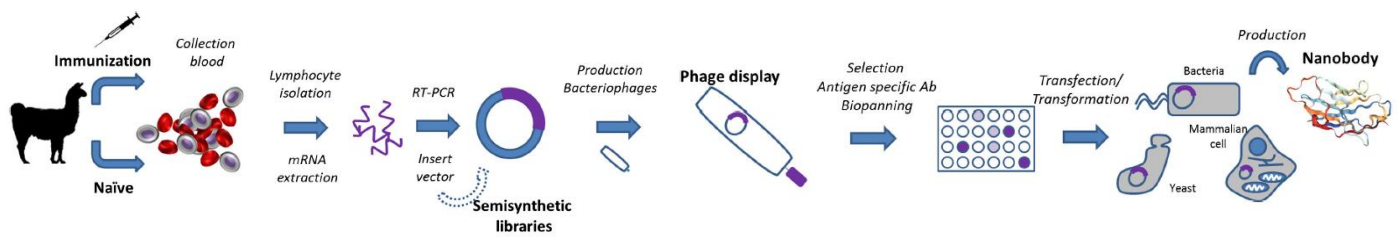


Fig. 1.4. Esquema general de producción de nanoanticuerpos. Modificado de Salvador et al, 2019 [12].

Aplicaciones.

Los NACs han sido probados como herramientas versátiles durante los últimos años, con diversos estudios validando su utilidad en distintos campos, como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 1.3. Aplicaciones actuales y potenciales de nanoanticuerpos.

<i>Aplicación</i>	<i>Utilidad.</i>
<i>Imágenes médicas in vivo.</i>	NACs conjugados con radionúclidos son empleados para la señalización de dianas específicas para tomar imágenes moleculares, principalmente de tumores [56].
<i>Combate de infecciones.</i>	Mediante la inhibición de receptores celulares, impidiendo la adhesión, ingreso o replicación de agentes patógenos a células del huésped [18][58].
<i>Agentes neutralizantes o detoxificantes.</i>	Los actuales tratamientos contra el envenenamiento se basan en fragmentos purificados de inmunoglobulinas. La sustitución de estos anticuerpos con NACs, pueden poseer mayor potencial neutralizante [18]
<i>Herramientas de diagnóstico.</i>	Muchos kits comerciales de diagnóstico, se basan en la detección de proteínas producidas durante la infección, por lo cual, debido a la alta capacidad de penetración y difusión de los NACs, pueden ser utilizados para la detección de antígenos específicos mediante ensayos de ELISA [12]

<i>Agentes de señalización para suministro efectivo de medicamentos.</i>	Los NAcS también pueden incorporarse químicamente a la superficie de sistemas de entrega de fármacos, para un efecto potenciado y específico por la afinidad de reconocimiento del NAc a las células diana del fármaco [56][58]
<i>Tratamientos contra desórdenes neurodegenerativos.</i>	El uso de NAcS para interactuar con moléculas precursoras o propensas a ser eliminadas en enfermedades neurodegenerativas, puede disminuir la sintomatología y efectos adversos asociados a males como Alzheimer o Parkinson [58].

Comparación entre los principales métodos de detección de Zika y propuesta de nanoanticuerpos.

Teniendo en cuenta las múltiples aplicaciones exitosas de los NAcS en el siguiente cuadro se realiza una comparación entre los métodos actuales para detección de Zika y la propuesta de diagnóstico por uso de NAcS.

Tabla 1.4. Cuadro comparativo entre técnicas de diagnóstico actuales para ZIKV y la posible detección por NAcS.

Técnica	Ventajas.	Desventajas.	Costo.	Entrenamiento requerido.
Aislamiento viral. [59]	-Replicación viral exitosa. -Realizable en cultivo celular.	-Requiere laboratorio especializado. -Aislamiento puede tomar varios días.	-Costo operativo de equipos y mantenimiento de células es elevado.	-Alto
ELISA IgM, IgG. [59][60]	-Resultados en 3 a 4 h.	-Reactividad cruzada con otros flavivirus.	-Producción y mantenimiento de anticuerpos monoclonales posee un alto costo.	-Bajo
Prueba de neutralización por reducción de placa. [59]	-Presenta menos reactividad cruzada que ELISA.	-Requiere alto esfuerzo. -Resultados disponibles en una semana.	-La prueba posee alto costo [61]	-Medio
Inmunoensayo multiplex de inmunofluorescencia. [59][62]	-Más sensible que ELISA de IgM. -Requiere poco volumen de muestra.	-Requiere laboratorio altamente especializado y apareamiento correcto de los anticuerpos.	-Bajo costo de ensayo, pero alto costo de equipos.	-Alto
RT-PCR [59]	-Detección rápida del genoma viral.	-Requiere instrumentos especializados.	-Costo de reactivos y de mantenimiento de equipos es elevado.	-Medio

qRT-PCR [59]	-Detección rápida del genoma viral con alta sensibilidad y especificidad.	-Requiere instrumentos especializados.	-Costo de reactivos y de mantenimiento de equipos es elevado.	-Alto
RT-LAMP [59][63]	-Elimina la necesidad de contar con equipos sofisticados.	-El producto acarrea contaminación.	-Bajo costo.	-Bajo
Nanoanticuerpos. [64]	-Puede ser fácilmente aplicable en áreas rurales, al no necesitar equipos altamente sofisticados. -Diagnóstico rápido en 3 h. -No presenta reactividad cruzada con otros flavivirus.	-Para obtener alta especificidad se requiere selección minuciosa de nanoanticuerpos.	-Bajo costo al ser producido por bacterias o levaduras.	-Bajo

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En las siguientes páginas se enlistan los materiales, reactivos y equipos necesarios para todos los procesos dentro de la obtención de NACs, con sus respectivos proveedores y sus números de catálogos.

2.1 Materiales.

2.1.1 Anticuerpos.

Anticuerpos.	Proveedor.
Mouse Anti-6X His tag® antibody	Abcam. Cat. ab18184
Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP)	Abcam. Cat. ab205719
Mouse Anti-HA tag antibody [HA.C5]	Abcam. Cat. ab18181
Mouse Anti-M13 antibody [B62-FE2] (HRP)	Abcam. Cat. ab50370

2.1.2 Bacteriófagos

	Descripción.	Proveedor
M13VCS Helper Fage.	Bacteriófago filamentoso derivativo de M13KO7, con gen de resistencia a kanamicina.	Agilent. Cat. 200251

2.1.3 Cepas bacterianas y líneas celulares.

Nombre.	Proveedor.
<i>Escherichia coli</i> DH5α	ThermoFisher Cat. 18265017
<i>E. coli</i> TG1	Lucigen Cat. 60502-2
<i>E. coli</i> WK6	ATCC® 47078™
Células HEK-293T	ATCC® CRL-3216™

2.1.4 Enzimas.

Nombre.	Proveedor.	Detalle.
PFU DNA Polymerase	Promega.	Cat. No. M7741
Taq DNA Pol	ThermoFisher Scientific.	Cat. 10342020
SuperScript™ III First-Strand Synthesis System	ThermoFisher Scientific.	Cat. 18080051
HinfI	New England BioLabs. Cat. R0155S	5'... G [▼] ANTC...3' 3'... CTNAG [▲] ...5'
BspEI	NEB. Cat. R0540S	5'... T [▼] CCGGA...3' 3'... AGGC [▲] T...5'
PstI	NEB. Cat. R0140S	5'... CTGCAG [▼] ...3' 3'... G [▲] ACGTC...5'
BglI	NEB. Cat. R0143S	5'... GCCNNNN [▼] GGC...3' 3'... CGGN [▲] NNNNCCG...5'
BglII	NEB. Cat. R0144S	5'... A [▼] GATCT...3' 3'... TCTAG [▲] A...5'
NotI	NEB. Cat. R0189S	5'... G [▼] CGGCCGC...3' 3'... CGCCGG [▲] CG...5'
BstEII	NEB. Cat. R0162S	5'... G [▼] GTNACC...3' 3'... CCANTG [▲] G...5'
EcoRI	NEB. Cat. R0101S	5'... G [▼] AATTC...3' 3'... CTTAAG [▲] ...5'
NcoI	NEB. Cat. R0193S	5'... C [▼] CATGG...3' 3'... GGTACC [▲] ...5'

2.1.5 Equipos.

Equipo.	Proveedor.
Centrífuga.	Eppendorf 5415-D
Cubetas para electroforesis y WB.	BioRad
Electroforesis horizontal	Bio-Rad (Mini-PROTEAN® Tetra System)
Termociclador	Ivema T18

Transiluminador UV.	<i>UVP Gel Doc- IT 300 motorized lens W/LMS-26 E 230 v -50Hz</i>
Espectrofotómetro.	<i>Thermo Scientific™ NanoDrop 2000</i>
ELISA Reader.	<i>Asys Expert Plus Microplate Reader UK – Biochrom Ltd.</i>
Micropipetas	<i>Gilson</i>
Revelador de gel de poliacrilamida.	<i>Equipo G-BOX Syngene</i>
Celda de transferencia electroforética.	<i>Bio-Rad Trans-blot SD Semi-dry Transfer Cell</i>

2.1.6 Primers.

Nombre.	Secuencia.	Descripción.
VHH_1raPC R_FW	5' GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG 3'	Primer Forward para primera amplificación de IgG totales.
VHH_1raPC R_RV	5' GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC 3'	Primer Reverse para primera amplificación de IgG totales.
VHH_2daP CR_FW	5' GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGG AGG 3'	Primer Forward segunda amplificación para NAcS únicamente.
VHH_2daP CR_RV	5' GGACTAGTGCGGCCGCTGGAGACGGT GACCTGGGT 3'	Primer Reverse segunda amplificación para NAcS únicamente.
VHH_COL_ FW	5' GGATAACAATTTACACACAGG 3'	Primer Forward para comprobación de inserto en <i>Colony</i> PCR.
VHH_COL_ RV	5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'	Primer Reverse para comprobación de inserto en <i>Colony</i> PCR.

VHH_RV_PI	5' CCACAGACAGCCCTCATAG 3'	Primer Reverse para comprobación de inserto en <i>Colony</i> PCR con PIII del fago.
II_(col)		
Fw-inf-	5'	Primer Forward para amplificación de NS1 de Zika.
ZikaNS1-BspEI	CAGCGCTTACTCCGGAGACGTGGGGT GCTCAGTG 3'	
Rv-inf-	5'	Primer Reverse para amplificación de NS1 de Zika.
ZikaNS1-BglII	AGAGGGAAAAAGATCTCTAGTGATGGT GATGGTGGTGGCTAGCCGCTGTCACC ATTGACCTCACT 3'	

2.1.7 Reactivos, Solución Buffers y medios.

Reactivos.	Composición/Proveedor.
Ampicilina (100mg/ml) stock.	Antibiótico provisto por Sigma (Merck). Cat # 10835242001
Kanamicina (10mg/ml) stock.	ThermoFisher Scientific. Cat # 11815024
Bromuro de Etidio	Utilizado a concentración 0.5 µg/ml
Cloroformo-Isoamil	12ml Cloroformo, 0,5 ml Isoamylalcohol. Sigma Aldrich.
Adyuvante de Freund Incompleto	Aceites no metabolizables. Sigma Aldrich.
Adyuvante de Freund Completo	Aceites no metabolizables de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> muerta. Sigma Aldrich.
Solución <i>Buffer</i> de bloqueo para ELISA	Leche 3 % en PBS + 0,1 % Tween-20
DTT	0,1 M Dithiothreitol. Sigma Aldrich.
Etanol 100%	100 % EtOH. Sigma Aldrich.
Solución salina, 0.9% NaCl	9g/L NaCl. Merck.

Solución <i>Buffer</i> de bloqueo para Western Blot	Leche 5 % en PBS + 0,1 % Tween-20
Solución <i>Buffer</i> de carga 5X Western Blot	Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 4 %, Glicerol 20 % v/v, DTT 200 mM, Azul bromofenol 0.02 %
Solución <i>Buffer</i> de corrida	Tris base 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1 %
Solución <i>Buffer</i> de elución en purificación	Imidazol 300 mM, Fosfato de sodio pH 8.0 50mM, Cloruro de sodio 300 mM.
Solución <i>Washing Buffer</i> en ELISA	Leche 1.5 % en PBS + 0.05 % Tween-20
Solución <i>Washing Buffer</i> para purificación	Imidazol 20 mM, Fosfato de sodio pH 8.0 50 mM, NaCl 300 mM.
Solución <i>Buffer</i> de lavado Western Blot	Leche 2.5 % en PBS + 0.05 % Tween-20
Agua DEPC	10uL DEPC en 10 ml H ₂ O. Sigma Aldrich.
Solución <i>Buffer</i> de separación Western Blot	Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8
Solución <i>Buffer</i> de transferencia	Metanol 20 % pH 9.2, Tris 48 mM, glicina 39 mM.
Solución <i>Buffer</i> de unión a resina para purificación 5X	Utilizado en purificación de NAcS. Imidazol 50 mM, fosfato de sodio 250 mM pH 8.0, NaCl 1.5 mM.
Solución <i>Buffer</i> Phosphate Buffer Saline 10X	NaCl 80 g; KCl 2 g; Na ₂ HPO ₄ 14.4 g; KH ₂ PO ₄ 2.4 g; H ₂ O a 1L.
Solución <i>Buffer Stacking Western Blot</i>	Tris-HCl 1 M, pH 6.8.
Solución <i>Buffer</i> TBE	Para preparación de gel de agarosa y electroforesis.

	Tris borato 45 mM pH 8.3, EDTA 2 mM.
<i>InFusion HD Cloning Kit.</i>	Clonado rápido y direccional de fragmentos genéticos.
Solución <i>Buffer</i> TES	Usado en purificación de nanoanticuerpos. Para 1 L: Tris 1 M pH 8.0 5 ml, EDTA 0.25 M 2 ml, NaCl 0.3 g; H ₂ O
<i>Kit TRizol Reagent</i>	Invitrogen
LeucoSep Tube	
Ácido Sulfúrico 1N	H ₂ SO ₄ para detener la reacción de TMB.
PBS-T	Phosphate Saline Buffer, 0,05% Tween-20, pH 7.4
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside 0.5 mM. Sigma Aldrich, Cat.# I6758
<i>Kit In-Fusion HD Cloning Plus</i>	Takara Cat #638920
Luria-Bertani agar	Medio LB + Agar agar 10 g/L
Medio Luria-Bertani (LB)	Para 1 L: Triptona 10 g; Extracto de levadura 5 g; NaCl 5 g
TB Medium (<i>Terrific Broth</i>)	Crecimiento de bacterias transformantes. Para 1 L: Triptona 12 g; Extracto de levadura 24 g; 4 ml de glicerol en un volumen de 900 ml y 100 ml de una solución de KH ₂ PO ₄ 0.17 M y K ₂ HPO ₄ 0.72 M
Reactivo TMB	Para revelado en ensayo ELISA. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidina BD (Catálogo # 555214)

Medio 2X YT	Para crecimiento de colonias WK6 electrocompetentes. Sigma Aldrich. Cat. #Y1003
Resina Amintra Ni-NTA	Para purificación de NAcS por cromatografía de afinidad. Thermo Fisher Scientific CAT # R 90115
Solución de acrilamida/bisacrilamida 30% Western Blot	Acrilamida 29 g; Bisacrilamida 1 g en 100 mL H ₂ O mQ
Solución de Coomassie <i>brillant</i> blue.	Coomassie R-250 0.1%, metanol 40 %, ácido acético 10 %, H ₂ O 50 %
APS (persulfato de Amonio) 10%	Utilizado en Western Blot. 10 %: persulfato de amonio 0.05 g en 0.5 mL de H ₂ O mQ
Solución 1 para <i>miniprep</i>	Para 1 L: Tris base 6.06 g; Na ₂ EDTA.2H ₂ O 3.72 g; 800 ml de H ₂ O; llevar a pH 8 con HCl.
Solución 2 para <i>miniprep</i>	Para 1 L: NaOH 8 g; 950 ml de H ₂ O. Disolver y agregar 50 ml de SDS 20 %
Solución 3 para <i>miniprep</i>	Para 1 L: CH ₃ CO ₂ K 294.5 g; 500 ml de H ₂ O. Ajustar el pH a 5.5 con ácido acético glacial.
Solución de desteñir	Metanol 40 %, CH ₃ COOH 10 %, H ₂ O 50 %
Solución SDS 10%	10 g de SDS en 100 mL H ₂ O mQ
Sustrato de Peroxidasas – Quimioluminiscencia.	Thermo Fisher Scientific, catálogo # 34580
<i>Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System</i>	Promega catálogo # A9282

<i>SigmaScreen™ Streptavidin High Capacity Coated Plates 96 well</i>	Sigma-Aldrich Cat. S6940-1EA
<i>HRP Conjugation Kit</i>	Abcam Cat. ab102890
<i>PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa</i>	Thermofisher Cat. 26620
<i>1 kb plus DNA Ladder</i>	Thermofisher Cat. 10787018
<i>SYBR Safe</i>	Thermofisher Cat. S33102
<i>UltraPure™ Agarose</i>	Invitrogen Cat. 16500500
<i>Polyacrilamide</i>	Sigma-Aldrich Cat. 92560-50G
<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>	Sigma-Aldrich Cat. L3771-500G
<i>Biotin Conjugation Kit (Fast, Type B)</i>	Abcam Cat. ab201796

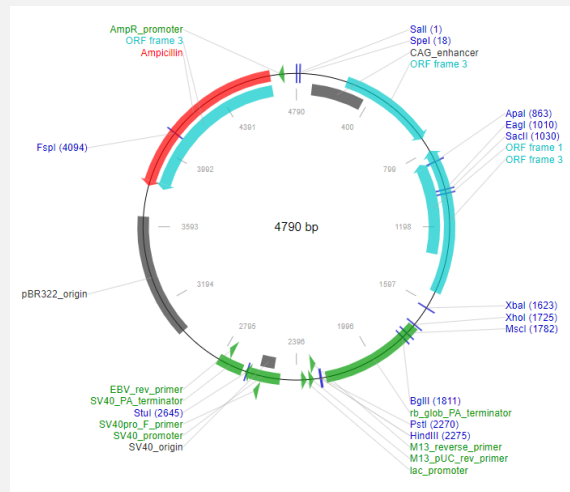
Síntesis de ADNc y PCRs.

Nombre.	Proveedor.
5X 1st Strand Buffer.	ThermoFisher Scientific. Cat. 18080051
0,1M DTT	ThermoFisher Scientific. Cat. 18080051
dNTPs	ThermoFisher Scientific. Cat. 18080051
10X PCR Buffer	ThermoFisher Scientific. Cat. 18067017

2.1.8 Vectores.

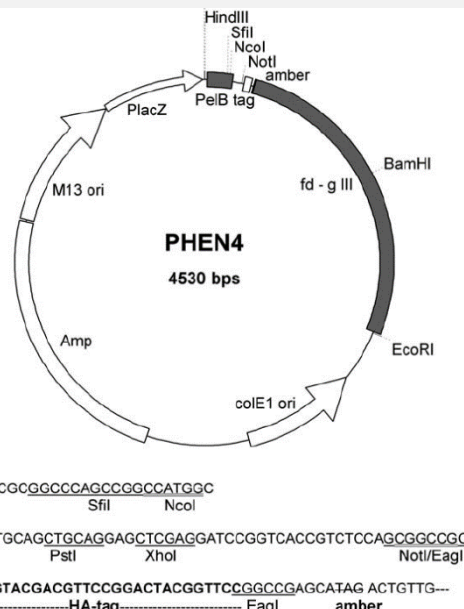
Vector. Mapa. Uso.

pCAGGs.



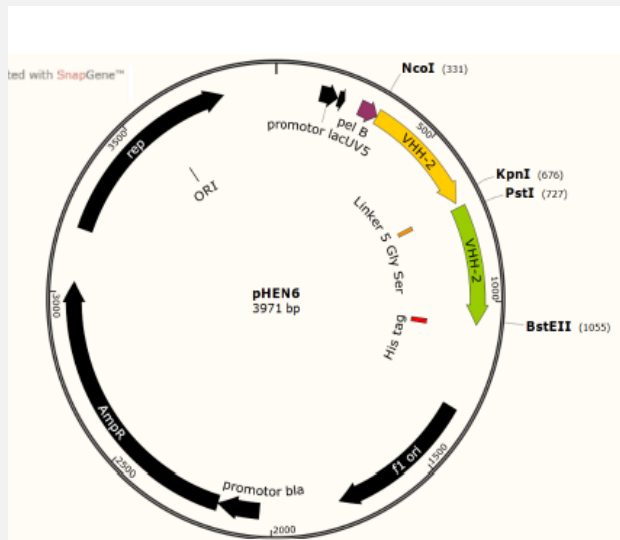
pCAGGS es un vector de expresión eucariótico, con resistencia bacteriana a ampicilina. Cuenta con promotores AG/CMV-IE/lac. Se utiliza para expresar la proteína antigénica para inmunización.

pHEN4.



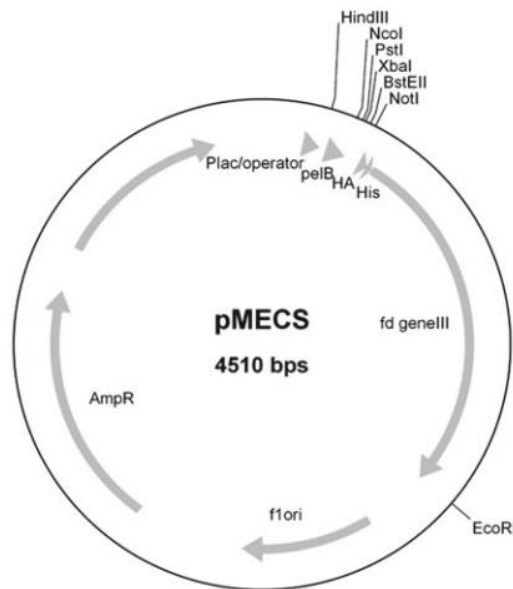
PHEN4 posee un tag de hemaglutinina para la detección mediante ELISA.

pHEN 6.



PHEN6 posee un tag de hexahistidina para la purificación eficiente de los nanoanticuerpos al pasar por resina.

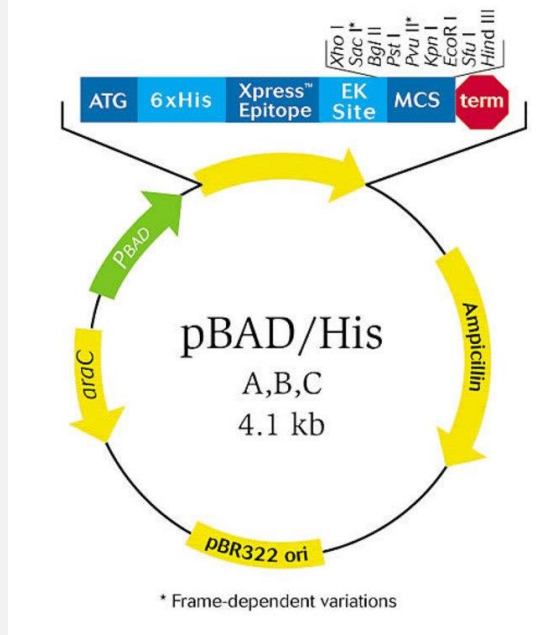
pMECS.



[65]

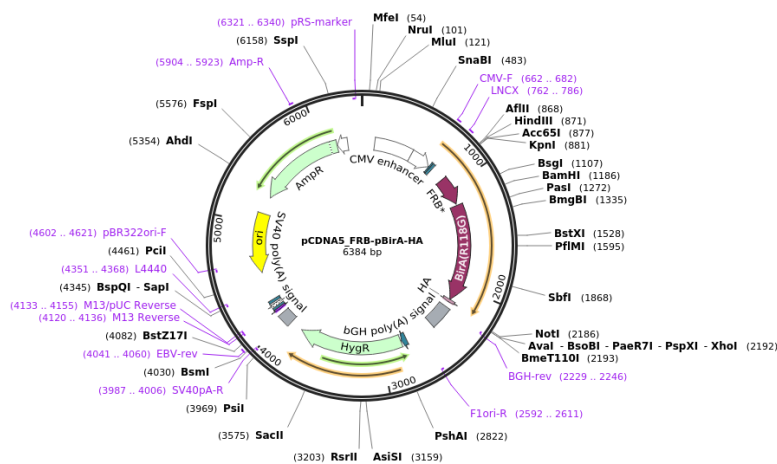
Vector fagémido derivado de pUC, utilizado para despliegue en fagos y producción eficiente de nanoanticuerpos solubles. Posee tag de hemaglutinina y tag de hexahistidina. Puede reemplazar funcionalmente a pHEN 4 y pHEN 6.

**pBAD
(Biotin
Aceptor
Domain)**



Vector que contiene un Dominio Aceptor de Biotinas, en presencia de otro plásmido con la secuencia codificante de la ligasa de la biotina, es capaz de conjugar biotina a los nanoanticuerpos [66]. Su uso puede sustituir al kit de biotilación.

pBir A



Permite la biotilación del NAc sin alterar la capacidad de reconocimiento al antígeno [67]. Su uso puede sustituir al kit de biotilación.

2.2 Métodos.

Los protocolos detallados de cada proceso a partir de la construcción de la librería inmune de NAcS, se encuentra en la sección de anexos. De estos protocolos, ciertas modificaciones se detallan en los siguientes puntos.

2.2.1 Preparación de inmunógeno.

La proteína utilizada para generar la respuesta inmune se obtuvo a partir de la expresión del antígeno NS1 en células HEK293-T, para ello se realizaron las siguientes acciones de manera secuencial (Las condiciones y reactivos utilizados para cada tarea se detallan en el Anexo 1):

1. Se digirió mediante las enzimas de digestión *Bgl*II y *Bsp*E I el vector de expresión pCAGGs NS-1-DENV2, dejándolo preparado para realizar la técnica *InFusion* con el inserto de NS1 Zika.
2. A partir de una muestra de ARN del virus de Zika, se sintetizó ADNc con el uso de transcriptasa reversa.
3. Una vez obtenido el ADNc, se procedió a amplificar con *primers* específicos la región correspondiente a la proteína viral NS1, agregándose a los extremos secuencias cortas para la técnica de *InFusion*.
4. Del ADN de la proteína NS1 amplificado, se cargó 5 µl en un gel de agarosa al 1% y se realizó electroforesis por 1h a 50V.
5. Una vez comprobada la presencia de la banda de tamaño esperado, se trató el resto del producto PCR con el reactivo *Cloning Enhancer* y se ligó por *InFusion* al vector de expresión previamente digerido.
6. Pasados 15 minutos de reacción *InFusion*, se procedió a realizar la transformación de bacterias competentes DH5α y se sembró la transformación en una placa de agar LB + ampicilina (0,1mg/ml), para incubarse a 37°C hasta el día siguiente.
7. Una vez comprobado el crecimiento de colonias en la placa, se procedió a picar 6 de ellas y cultivarlas en tubos falcon con 4ml de medio LB+Ampicilina (0,1mg/ml) a 37°C durante 16 h.
8. Al día siguiente, se comprobó que el medio se encuentre turbio y se realizó *Miniprep* de todos los tubos de colonias crecidas.

9. Finalmente se comprobó en dos etapas por digestión con enzimas de restricción. En primer lugar, se digirió 1µg de cada muestra con la enzima *Bgl*I y, en segundo lugar, con la enzima *Msp*I.
10. Las muestras se enviaron a secuenciar para comprobar el correcto clonado.
11. Subsecuentemente, se realizó transfección del plásmido recombinante en células HEK-293T.
12. Luego de 72 h post-transfección, se recolectó el sobrenadante del cultivo celular y se procedió a aislar y purificar la proteína NS1.
13. La proteína purificada se dividió por alícuotas de 100µg y se almacenó a -80°C.

2.2.2 Inmunización de camélidos.

Para la inmunización de camélidos, se aplicaron 7 inyecciones subcutáneas cerca de sitios de drenaje de los nódulos linfáticos. Todas las inmunizaciones se llevaron a cabo por personal cualificado y manteniendo los estándares de experimentación animal aprobados por los entes reguladores competentes.

Los tiempos y volúmenes utilizados en las inmunizaciones se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 2.1. Cronograma y volúmenes de inmunización.

Inmunización	Tiempo	Volumen de antígeno (1 mg/ml)	Volumen de Adyuvante.
Primera inyección	Día 0	250µL	250µL
1er refuerzo	Día 15	250µL	250µL
2do refuerzo	Día 30	200µL	200µL
3er refuerzo	Día 45	150µL	150µL
4to refuerzo	Día 60	100µL	100µL
5to refuerzo	Día 75	50µL	50µL
6to refuerzo	Día 90	50µL	50µL

2.2.3 Construcción de librerías inmunológicas de NAcS.

Esta fase permite la recuperación y clonado del mayor número posible de secuencias codificantes para NAcS, aumentando así las probabilidades de producir NAcS capaces de reconocer al antígeno de interés.

Procesamiento de linfocitos a partir de sangre total y extracción de ARN.

La finalidad de este procedimiento fue de extraer los linfocitos a partir de una muestra de sangre total, separando el resto de los componentes sanguíneos para obtener una posterior extracción de ARN específica de las células de interés.

Para ello, se sigue el protocolo descrito a continuación:

1. Aproximadamente 100 ml de sangre periférica se colectó cuatro días después del último refuerzo, en un tubo con EDTA (2g EDTA/100 ml sangre)
2. La sangre anticoagulada se diluyó en un volumen igual de cloruro de sodio 0,9%.
3. En tubos Leucosep, se colocó aproximadamente 30 ml de sangre diluida.
4. Los tubos se centrifugaron a temperatura ambiente por 20 minutos a 2000 x g.
5. Se preparó dos tubos BD de 15 ml por cada librería y al retirar las muestras de la centrífuga, se tomó 10 ml de la fase superior de cada tubo y se colocó en los BD para su almacenamiento a -20°C, para ser utilizados posteriormente en el fraccionamiento de IgGs.
6. Con la ayuda de una pipeta pasteur de vidrio, se tomó la interfase blanca de los tubos que salieron de la centrífuga, y se mezcló todas las alícuotas en un tubo BD de 50 ml, para estimar el volumen de linfocitos obtenido y subdividirlo en tubos BD de 50 ml con un máximo de 5ml por tubo.
7. A cada tubo de linfocitos, se agregó 10 volúmenes de PBS frío para su lavado.
8. Se centrifugó por 10 minutos a 2000 x g a temperatura de 4°C.
9. Se descargó el sobrenadante de cada tubo y los pellets se resuspendieron en 5 ml de PBS frío, para juntar todas las suspensiones en un mismo tubo y ser lavadas con PBS a un volumen de 50 ml.
10. El ARN total se extrajo mediante el uso del kit TRIzol.
11. La concentración del ARN debe medirse después por un espectrofotómetro UV.

Síntesis de ADNc a partir de ARN.

El paso siguiente a extraer el ARN total de los linfocitos, es el de sintetizar la primera cadena de ADNc, para ello:

1. Se desnaturalizó la estructura secundaria del ARN mediante incubación en el termociclador, por 10 minutos a 70°C con los siguientes componentes (Mix1):
 - ARN total (40 µg): x µL
 - Primer Oligo-dT (12-18): 11 µL (5.5 µg)
 - Agua DEPC: Hasta completar volumen de 126,5 µL.

El mix se dividió en alícuotas de 23 µL cada una y se incubó en termociclador.

2. Los 5 tubos con mix 1 se colocaron inmediatamente en hielo una vez transcurridos los diez minutos.
3. En un tubo de 200 µL se procedió a realizar el mix 2 para 5.5 reacciones, con los siguientes reactivos:
 - 5X 1st Strand Buffer: 44 µL
 - 0,1M DTT: 22 µL
 - dNTPs Mix (10mM cada uno): 11 µL
 - RNase Inhibitor (40U/µL): 5,5 µL
 - Transcriptasa Reversa (200U/µL): 11 µL

De este mix 2, se agregaron 17µL a cada tubo de la mezcla anterior.

4. Se colocó los tubos en el termociclador siguiendo el programa descrito a continuación:
 - 55 °C por 30 minutos.
 - 85 °C por 5 minutos.
5. Una vez concluido el programa de termociclado, se juntó en un mismo tubo todos los ADNc y se almacenó a -20 °C.

Amplificaciones por nested PCR.

Una vez obtenido el cDNA el siguiente paso es amplificar las secuencias correspondientes a las IgGs totales. Para ello, se preparan reacciones de la siguiente manera:

Mix de Primera PCR.

- H₂O: 954 µL.
- *Buffer* PCR 10X: 120 µL.
- dNTPs (10mM c/u): 24 µL.
- Primer VHH_1raPCR_FW (20µM): 24 µL.
- Primer VHH_1raPCR_RV (20µM): 24 µL.
- *Hi-Fi Taq Polymerase* (5U/µL): 6 µL.

Volumen total: 1152 µL.

Se alicuotó el mix en 24 tubos de 0,2 ml, colocando 48 µL por cada tubo y agregando ADNc de la siguiente manera:

(Se requiere diluir el ADNc colocando 10 µL ADNc template + 10 µL H₂O)

Set 1: 4 tubos con 48 µL de mix 1 y 1 µL de ADNc diluido.

Set 2: 4 tubos con 48 µL de mix 1 y 2 µL de ADNc diluido.

Set 3: 4 tubos con 48 µL de mix 1 y 2 µL de ADNc no diluido.

Set 4: 4 tubos con 48 µL de mix 1 y 3 µL de ADNc no diluido.

Set 5: 7 tubos con 48 µL de mix 1 y 4 µL de ADNc no diluido.

Control negativo: No agregar ADNc.

Termociclado:

- 95°C por 3 minutos.
 - 94°C por 1 minutos
 - 55°C por 1 minutos
 - 72°C por 1 minutos
 - 72°C por 10 minutos
 - 4°C – Infinito.
- } x32 ciclos

Una vez finalizada la PCR, se juntaron todos los tubos del mismo set y se cargó 8 de cada set de muestras en sus respectivos pocillos, así como 8 µL del control negativo y 5 µL de marcador de peso molecular. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% por 1 hora a 100V.

Concluida la electroforesis, se divisaron 2 bandas, una alrededor de 900-1000 pb que corresponde a los anticuerpos convencionales, y una banda de 700 pb que proviene de los NAcS. De las muestras que den un patrón correcto para NAcS, se mezcló los productos de la primera PCR y se realizó una nueva electroforesis, cargando 200 μ L del producto PCR pool, se cortó la banda de 700 pb y se purificó mediante el *kit Wizard SV Gel and PCR CleanUp System* (Eluir en 180 μ L de H₂O).

Mix de Segunda PCR.

- H₂O: 358 μ L.
- *Buffer* PCR 10X: 45 μ L.
- dNTPs (10mM c/u): 9 μ L.
- Primer VHH_2daPCR_FW (20 μ M): 9 μ L.
- Primer VHH_2daPCR_RV (20 μ M): 9 μ L.
- *Hi-Fi Taq Polymerase* (5U/ μ L): 2,25 μ L.

Volumen total: 432 μ L

Se dispensó 48 μ L de mix en 9 tubos de PCR.

Inmediatamente se agregó producto purificado de primera PCR como se detalla a continuación:

Set 1: 2 tubos con 1 μ L de la primera PCR purificada.

Set 2: 2 tubos con 2 μ L de la primera PCR purificada.

Set 3: 3 tubos con 3 μ L de la primera PCR purificada.

Control negativo: Sin templado.

Termociclado:

- 95°C por 3 minutos.
 - 94°C por 1 minutos
 - 55°C por 1 minutos
 - 72°C por 1 minutos
 - 72°C por 10 minutos
 - 4°C – Infinito.
- x17 ciclos

Purificación de producto de la segunda PCR.

Concluida la segunda PCR, los productos de la reacción siguieron el presente tratamiento:

1. Se controló la reacción de PCR corriendo 8 μ L de cada muestra y 8 μ L del control negativo en un gel de agarosa 1%, electroforesis 100V por 1 h.
2. Se constató las muestras que muestran un amplicón de aproximadamente 400 pb y realizar un pool con ellas, para correr en gel de electroforesis de la misma forma que se realizó previamente, cortar la banda correspondiente a los NAcS (400 pb) y purificarla por *Wizard SV Gel and PCR CleanUp System*.

Digestión de vector y ligación con inserto.

El producto purificado de la segunda PCR se digirió de la siguiente forma:

- Producto PCR: 450 μ L (Todo el volumen)
 - *Buffer* 3.1 NEB 10X: 50 μ L
 - *Pst*I (40U/ μ L): 5 μ L
 - *Not*I (40U/ μ L): 5 μ L
- Volumen total: 510 μ L

Y se incubó a 37°C hasta el día siguiente.

Posteriormente se purificó la digestión mediante columna (dividir la digestión en 3 columnas para la purificación) y se eluyó en un volumen final de 180 μ L de H₂O (60 por cada columna).

Se volvió a digerir bajo estas condiciones:

- Producto digerido: 176 μL (Todo el volumen)
 - *Buffer* 3.1 NEB 10X: 20 μL
 - *Pst*I (40U/ μL): 2 μL
 - *Not*I (40U/ μL): 2 μL
- Volumen total: 200 μL

Se permitió reposar 37°C hasta el día siguiente.

Se purificó el producto como se realizó anteriormente, pero esta vez utilizando 2 columnas, para finalmente eluir en 50 μL H₂O por cada columna y juntar el volumen de ambas eluciones.

Se midió la concentración y se almacenó a -20°C

De manera paralela, se digirió el vector pMECS de la siguiente forma:

- pMECS (500 ng/ μL): 120 μL
- H₂O: 680 μL
- *Buffer* 3.1 NEB 10X: 90 μL
- *Pst*I (40U/ μL) 9 μL
- *Not*I (40U/ μL): 9 μL
- Volumen total: 900 μL

Se incubó reacción *overnight* a 37°C

Se purificó el vector digerido repartiendo el volumen de digestión en 6 columnas por separado y se eluyó en 90 μL de agua por cada columna.

Se volvió a digerir los 540 μL de purificado con los siguientes parámetros:

- pMECS: 540 μL
- *Buffer* 3.1 NEB 10X: 60 μL
- *Pst*I (40U/ μL) 2 μL
- *Not*I (40U/ μL): 2 μL
- Volumen total: 600 μL

Se homogeneizó bien e incubó *overnight* a 37°C.

Se confirmaron las digestiones cargando en cuatro pocillos de gel de agarosa al 1%, colocando: 0,5 y 1 μL de producto PCR y de vector digerido.

Ligación.

Para determinar la relación óptima de vector: inserto, se probaron las siguientes concentraciones:

	<i>Tubo 1</i>	<i>Tubo 2</i>	<i>Tubo 3</i>
<i>pMECS</i>	4,4 μg	4,4 μg	4,4 μg
<i>Prod. De PCR</i>	1,7 μg	3,4 μg	5,1 μg

Y a cada tubo se agregó:

	<i>Tubo 1</i>	<i>Tubo 2</i>	<i>Tubo 3</i>
<i>H₂O</i>	77.6 μl	72.8 μl	67.8 μl
<i>Rapid LIG Buffer 10x</i>	15 μl	15 μl	15 μl
<i>pMECS (0,088 $\mu\text{g/l}$)</i>	50 μl	50 μl	50 μl
<i>frag de PCR (0,348 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)</i>	4.9 μl	9.7 μl	14.7 μl
<i>T4 DNA ligasa (5 u/μl)</i>	2.5 μl	2.5 μl	2.5 μl
<i>Total</i>	150 μl	150 μl	150 μl

Se mezcló e incubó a 16°C por 4 h.

Preparación de células competentes.

En este paso se preparan las células competentes TG1, preparadas con máximo una semana de antelación, para ello es necesario hacerlas crecer previamente en placas de Agar LB suplementado con 1ml de ampicilina (100 mg/ml en etanol 70% estéril) y 100 ml de glucosa 20%.

De esta placa, se prepararon dos pre-cultivos en tubos de 1,5 ml a partir de colonias individuales y se permitió crecer *overnight*, para a la mañana siguiente diluir los 1,5 ml en 330 ml de 2xTY e incubar a 37°C hasta obtener una densidad óptica de 0.8 – 1.

Posterior a ello, se pelletizó las bacterias y se prepararon los materiales para la transformación bacteriana, para la cual se utilizó el procedimiento por electroporación para incorporar el vector recombinante con la secuencia de nanoanticuerpos a las bacterias TG1.

Comprobación de inserto por Colony PCR y determinación de eficiencia.

De las colonias producto de la transformación, se realizó un análisis por PCR de varias colonias, a fin de visualizar posteriormente en un gel de agarosa la presencia de las bandas con tamaño esperado que confirmen la incorporación de los distintos vectores con secuencias de NAcS.

La determinación de la eficiencia se obtiene en este proceso, realizando un porcentaje de transformantes positivos para las secuencias de interés. Generalmente se requiere una eficiencia del 70% o mayor.

2.2.4 *Panning* de clones específicos para antígeno.

En esta etapa, se infectó a las bacterias preparadas con anterioridad (TG1) que poseen el vector recombinante pMECS, también llamado fagémido por poseer la secuencia codificante para la proteína PIII del fago, con el bacteriófago *helper* M13VCS.

Al infectar a las bacterias, el bacteriófago a su vez produjo viriones recombinantes dentro de ellas, que expresaron la proteína PIII combinada con el nanoanticuerpo, produciendo la expresión de los distintos nanoanticuerpos en la superficie de los nuevos viriones recombinantes.

Posteriormente se recolectaron los fagos y se sometieron a una selección por *panning* con el antígeno NS1. La prueba se desarrolló en placas ELISA, y su finalidad fue capturar a los bacteriófagos que contengan nanoanticuerpos específicos para la proteína de interés, purificándolos a partir de lavados que eliminan aquellos fagos inespecíficos sin afectar a los que se encuentran adheridos al antígeno.

Re-amplificación.

Los fagos que se adhirieron específicamente al antígeno son eluyeron y se agregaron a un volumen de 2ml de células TG1 en fase de crecimiento exponencial, en un tubo de 15 ml, estos fagos se replicaron con la secuencia de NAcS específicos unidos a su proteína PIII, por lo cual se generó una gran cantidad de fagos capaces de ligarse al antígeno NS1, quedando así listos para la siguiente ronda de selección por *panning*.

Seguido a cada re-amplificación, se debió almacenar 50 µl del volumen de fagos eluidos para realizar posterior ELISA confirmatorio de las rondas de enriquecimiento.

ELISA de enriquecimiento.

Se tomó 10 µl de los fagos eluidos en cada ronda de enriquecimiento para infectar 90 µl de bacterias TG1 de nuevo stock y posteriormente confirmar por ELISA si el título viral tras los enriquecimientos es mayor.

Comprobación de inserto por PCR de colonias.

Finalizado el último enriquecimiento, se plaqueó el cultivo bacteriano y se realizó una comprobación de inserto por PCR de colonias, utilizando los primers VHH_COL_FW y VHH_RV_PIII_(col), con el fin de verificar colonias con secuencias potencialmente distintas de NAcS mediante una electroforesis en gel de agarosa.

Digestión con *Hinfl* de clones positivos.

Una vez realizada la electroforesis, se seleccionó a las colonias potencialmente distintas y se inició una digestión con *Hinfl*; enzima de restricción de corte frecuente que permite analizar de mejor manera aún aquellas colonias que contienen el tamaño de banda confirmado por electroforesis del producto PCR. Para así seleccionar cuales colonias son aptas para secuenciación.

Los nanoanticuerpos obtenidos se almacenan en el plásmido pMECS y para su producción y purificación, se transforman en células WK6.

2.2.5 Ensayo de diagnóstico.

Una vez obtenidos y secuenciados los NAc, es necesario seleccionar dos de ellos que sean capaces de reconocer distintos epítomos de la proteína NS1 de Zika. Luego, se determina cuál será el NAc utilizado para la biotinylación, misma que se realiza mediante el kit *Biotin Conjugation Kit (Fast, Type B)*.

Al segundo NAc, se lo conjuga junto con la enzima HRP con el kit *HRP Conjugation Kit* de Abcam y se procede al ensayo.

Para la detección, se emplean las placas de 96 pocillos revestidas con estreptavidina y se añade 1 µg/ml de NAc biotinylados, para incubarse a temperatura ambiente por una hora. Después, se combinan distintas concentraciones (0, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000 ng/ml) de la proteína NS1 con muestra biológica negativa y se permite su incubación en los pocillos durante 2 h, y bloquear con BSA 5% por 1 h. Paralelamente, los NAc conjugados con HRP se diluyen en 5% BSA hasta llevarlos a una concentración de 1 µg/ml y se incuban con la proteína NS1 capturada durante 1 hora. Finalmente se utiliza el lector de placas ELISA para medir la reacción a 450 nm.

Teórico propuesto.

Los nanoanticuerpos que sean capaces de reconocer la proteína NS1 de Zika, se deben someter a su vez a ensayos contra NS1 de los 4 serotipos de dengue, con el fin de seleccionar únicamente a aquellos NAc que sean capaces de unirse específicamente a la proteína de Zika. Estas rondas de contraselección, se realizan en placas ELISA con las distintas proteínas NS1 a enfrentar.

Práctico realizado.

Debido al corto tiempo disponible, se probó un ensayo alternativo de *screening* por ELISA, en el cual se sometió un set existente de 18 clones de NAc contra DENV-1 ante la proteína NS1 de Zika, un control negativo compuesto por elementos de lisis celular y a la proteína NS1 del virus de dengue.

Para ello, fue necesario incubar ON las proteínas respectivas en sus pocillos correspondientes, distribuyéndose de la siguiente manera:

- Filas A y B, columnas 1 a 9: 100 μ L proteína NS1 DENV-1 proveniente de sobrenadante de células HEK transfectadas con vector de expresión para la proteína antes mencionada.
- Filas C y D, columnas 1 a 9: 100 μ L de componentes de lisis provenientes de células HEK sin transfectar.
- Filas E y F, columnas 1 a 9: 100 ng de proteína NS1-Zika purificada, proveniente de lisis de células HEK transfectadas con vector de expresión.

Paralelamente se creció un precultivo de *E. coli* en 500 μ L de medio 2xYT suplementado con 0,1 mg/ml de ampicilina y 0,1% de glucosa, en *shaker* a 37°C con vectores codificantes para los 18 clones de NAcS anti-DENV1 a probar, y al día siguiente se tomó 50 μ L de cada precultivo y se permitió crecer en un volumen de 3 ml de nuevo medio con la misma composición.

Al día siguiente, se extrajo el periplasma de cada cultivo bacteriano de la siguiente forma:

1. Se centrifugó la placa de 24w a 4500g, 4°C.
2. Se descartó sobrenadante y se resuspendió cada pellet bacteriano en 300 μ L de TES, para luego pasar el contenido total de cada pocillo a un respectivo tubo eppendorf de 1,5 ml.
3. Se agitó por 1 hora a 4°C.
4. Pasada la agitación, se centrifugó a 10.000 g por 10 min, a 4°C.
5. Se descartó el sobrenadante de cada tubo y se resuspendió con 180 μ L de TES/5 (Diluido en agua estéril).
6. Se agitó nuevamente por 1 hora a 4°C.
7. Finalmente se centrifugó a 10.000 g por 10 min a 4°C y se almacenó sobrenadante en nuevo tubo eppendorf.

Una vez listo el recubrimiento de la placa con las proteínas correspondientes y obtenido el periplasma bacteriano, se descartó el volumen de proteínas en la placa de 96 pocillos y se lavó 4 veces con 300 μ L de PBS 1X, para luego bloquear 1 hora a temperatura ambiente con 200 μ L de PBS-T 0,1% - Leche 3% por pocillo.

Después se incubó con 50 μ L de periplasma por 2 horas y se realizaron 3 lavados con 300 μ L de PBS-T 0,05%.

Pasados los lavados, se incubó 1 hora con anticuerpo Anti-HA (1/1000) para detectar el tag de hemaglutinina presente en cada NAcS expresado.

Finalmente se volvió a lavar 3 veces con PBS-T 0,05% y se reveló con TMB.

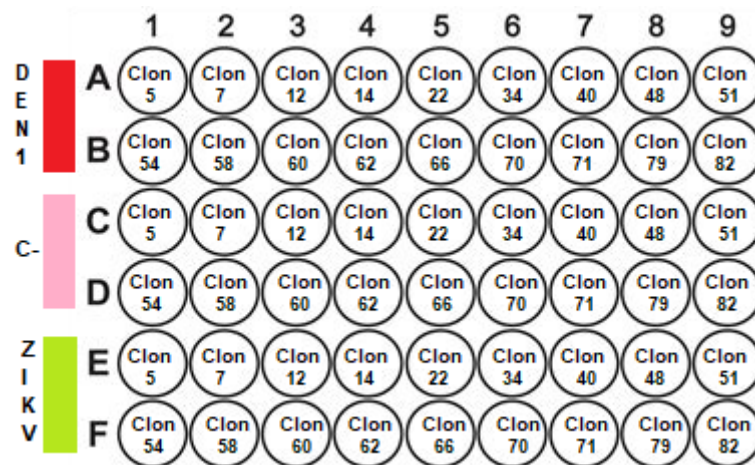


Fig. 2.1. Esquema de distribución de clones NAcS-antígenos en placa para ensayo ELISA.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS ESPERADOS

3.1 Producción de antígeno e inmunizaciones.

Clonado de antígeno NS1

La secuencia de NS1 del virus de Zika se amplificó con éxito, presentando el tamaño esperado de alrededor de 1115 pb. Por medio de los *primers* utilizados para la amplificación, se añadió a la secuencia NS1 el sitio de restricción *BspEI* al inicio de la secuencia y *BglII* al final, junto con una etiqueta de 6-Histidinas.

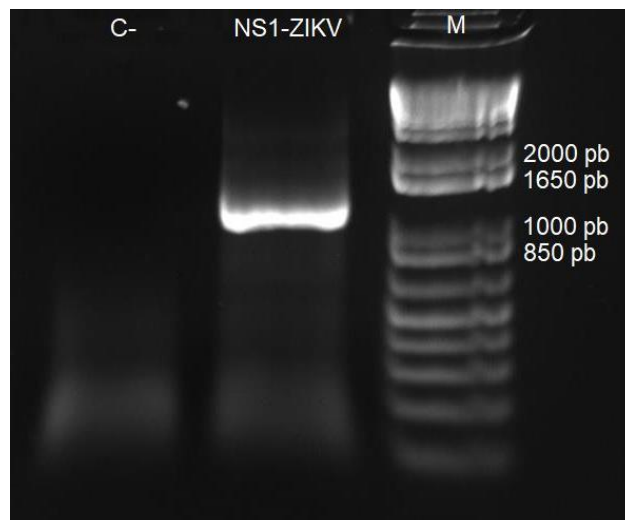


Fig. 3.1. Electroforesis de amplificación de fragmento NS1 Zika.

Paralelamente se confirmó la digestión del vector pCAGGs-NS1-DENV2 por electroforesis.

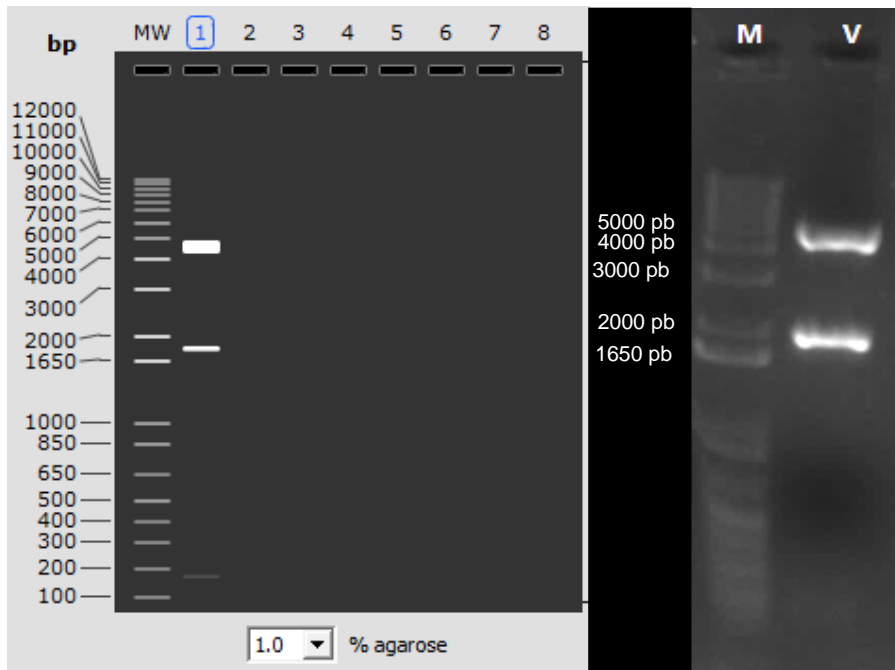


Fig. 3.2. Izq: Simulación en SnapGene del corte con *BspEI* y *BglI* II al vector pCAGGs-NS1-DENV2. Der: Electroforesis real del vector digerido.

Después, el vector e inserto unidos mediante *InFusion* se utilizó para transformar bacterias DH5 α en Agar LB + Ampicilina (0,1mg/ml), que incubado a 37°C por 16h, resultó en el crecimiento exitoso de UFCs portadoras del vector con resistencia al antibiótico.

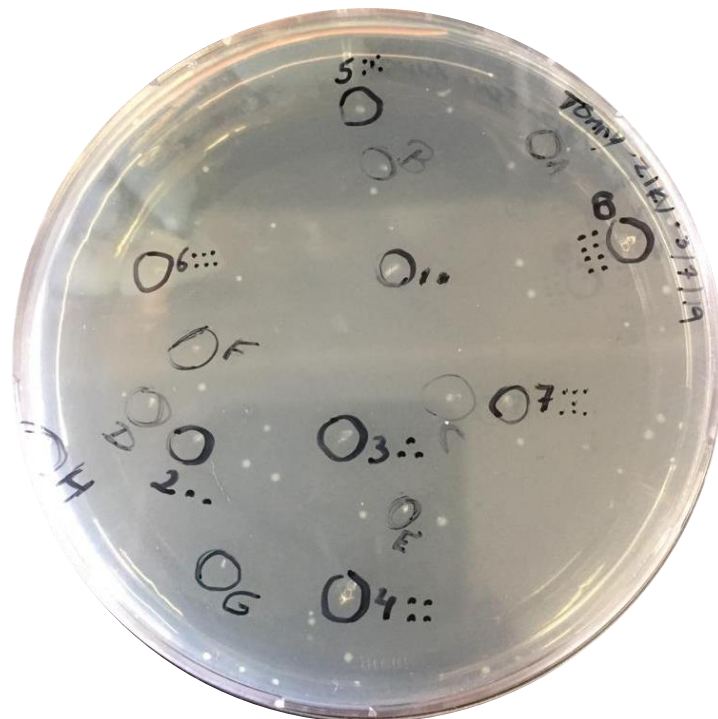


Fig. 3.3. UFCs crecidas en la placa de cultivo.

Ya comprobado el crecimiento bacteriano en la placa, se realizó análisis por restricción de 8 UFCs crecidas en medio de cultivo líquido.

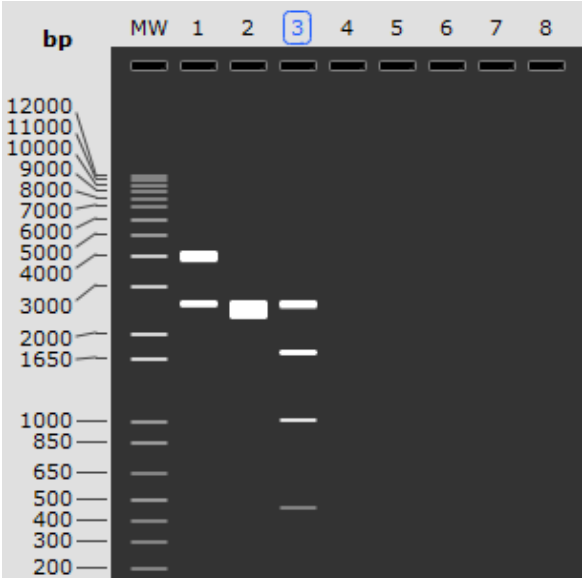


Fig. 3.4. Simulación de cortes y patrones de bandas esperados con *Nco*I en colonias bacterianas, donde: 1) pCAGGs NS1-DENV-2 como control negativo. 2) Vector digerido sin inserto NS1 Zika. 3) pCAGGs NS1-ZIKV

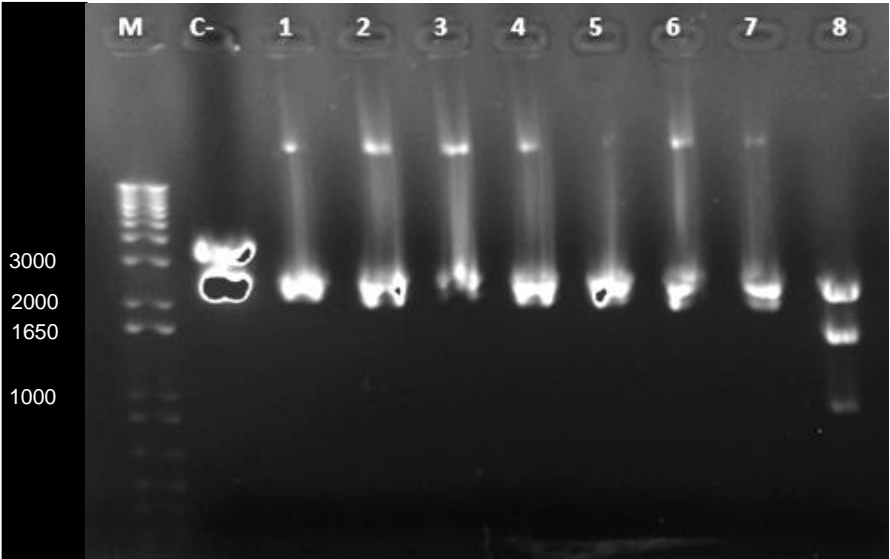


Fig. 3.5. Comprobación de colonias por restricción con *Nco*I.

Al obtener únicamente una UFC con el inserto, se procedió a seleccionar 8 nuevas UFCs para ser cultivadas en medio líquido y repetir el análisis de restricción, utilizando esta vez la colonia positiva como control.

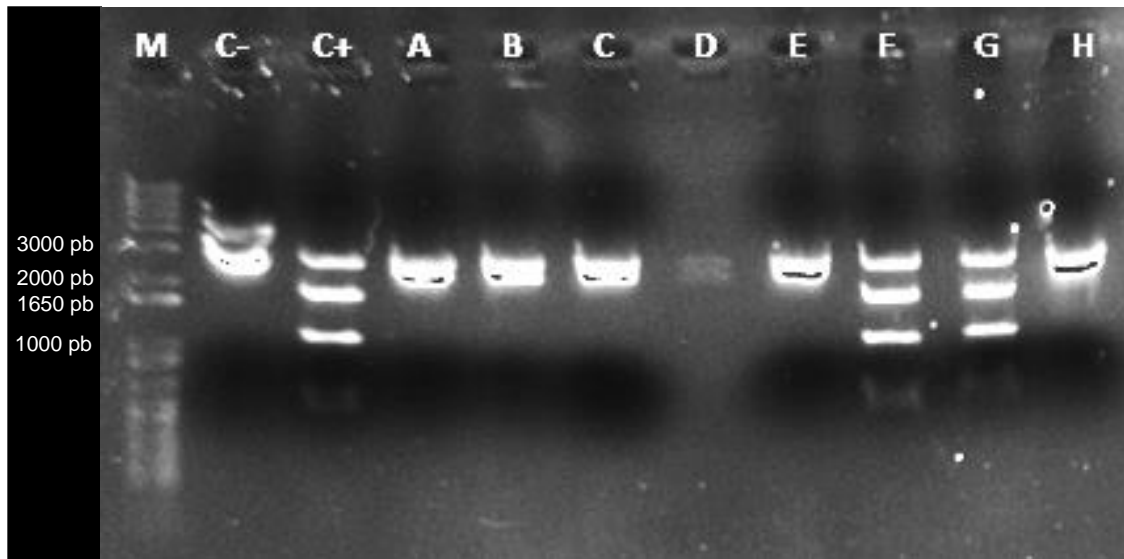


Fig. 3.6. Segundo análisis de restricción de UFCs.

En el segundo análisis por restricción, se pudo obtener dos UFCs con patrones de bandas adecuadas. Poseyendo en total 3 muestras de plásmidos positivos, denominados: C8, F, G.

Expresión de antígeno NS1 en células eucariotas y comprobación por *Western blot*.

De los 3 plásmidos obtenidos, se transfectó C8 y F por duplicado, y los plásmidos G y NS1-GFP-DENV-2 (como control) en pocillos únicos, debido al escaso volumen restante en los tubos.

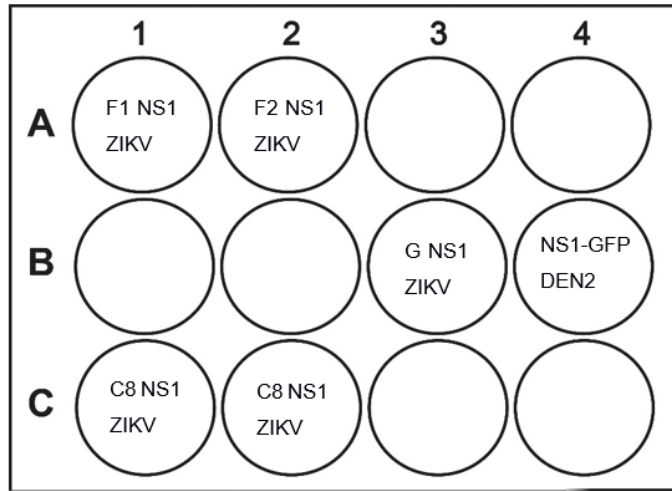


Fig. 3.7. Distribución de células y plásmidos transfectados en placa de 12 pocillos.

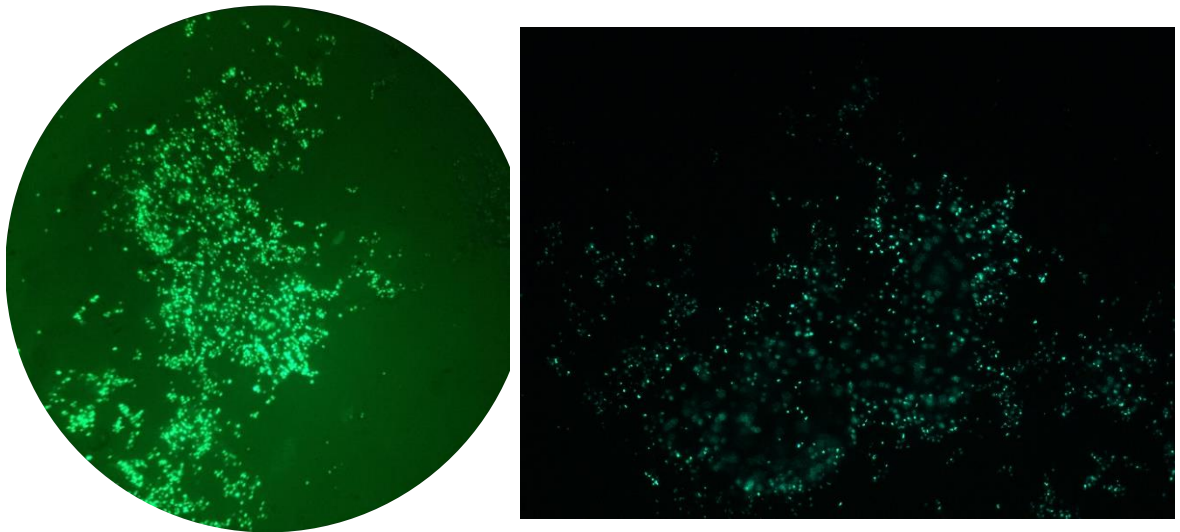


Fig. 3.8. Expresión del control de transfección NS1-DENV2-GFP. Se confirma la transfección por la señal fluorescente emitida por la proteína GFP.

En consecuencia, a partir de las células HEK-293T transfectadas, se separó sobrenadante y *pellet* de células para la detección del antígeno NS1 conjugado con la etiqueta de 6-His por WB.

Obteniéndose los siguientes resultados, donde es posible apreciar que la mayor cantidad de proteína se encuentra en el *pellet*, como se observa en la figura 3.9.

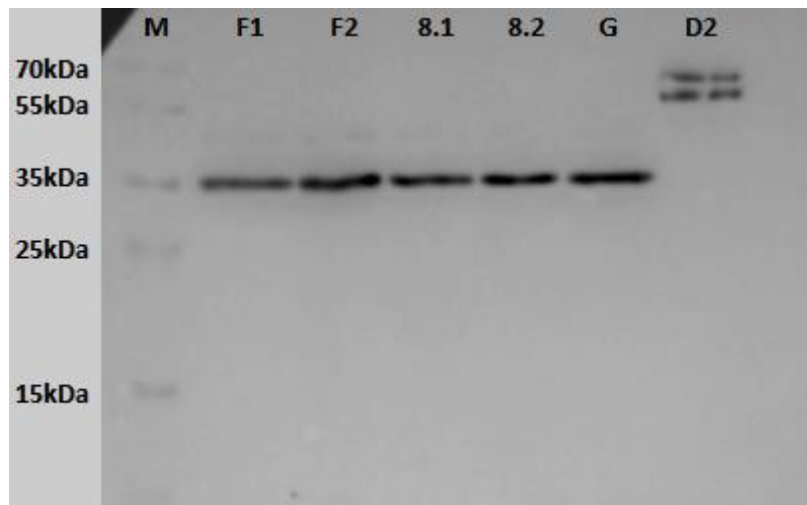


Fig. 3.9. Western Blot de pellet con presencia de proteínas detectadas por anticuerpo anti-6His-HRP. Las muestras F1, F2, 8.1, 8.2 y G, corresponden a los plásmidos transfectados con la secuencia de NS1 de Zika, mientras que D2 es el control negativo de transfección, con NS1-Dengue-GFP.

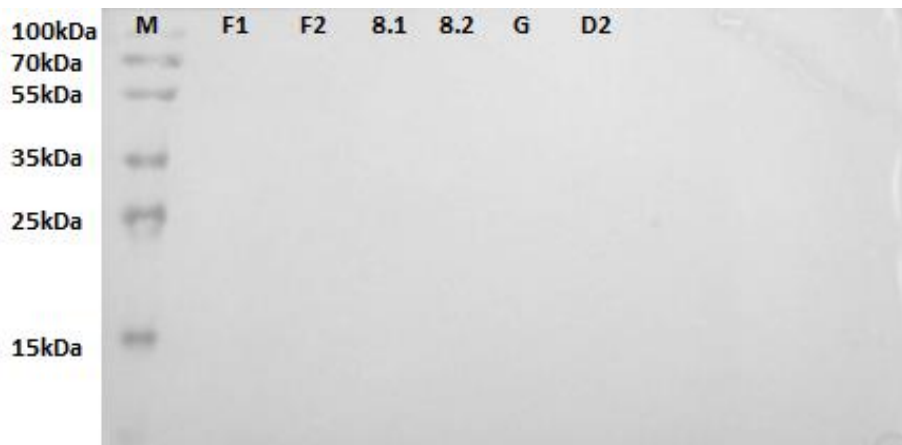


Fig. 3.10. Western Blot de sobrenadante de células, no se presentan bandas visibles.

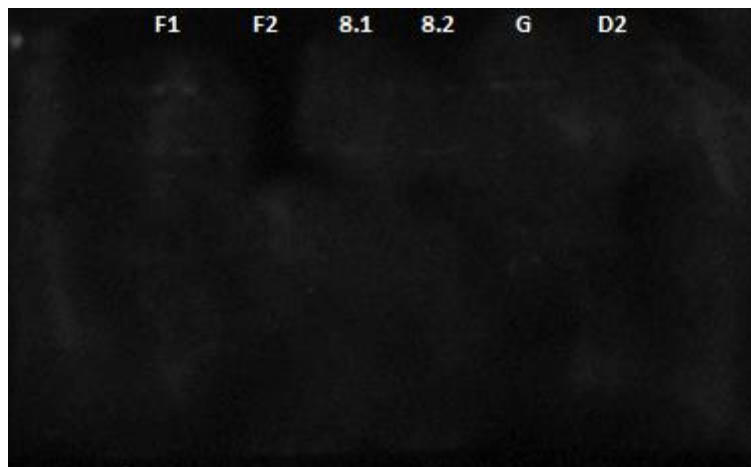


Fig. 3.11. Imagen del WB de sobrenadante con modificaciones de contraste e intensidad.

La mayor cantidad de proteínas se detectó en el pellet, siendo el producto mayoritario una proteína con tamaño aproximado de 35 kDa, y una segunda proteína alrededor de 40-45 kDa. El tamaño esperado para la NS1 de Zika es de 45 kDa, por lo cual los plásmidos F y C8 se secuenciaron, confirmando así el correcto clonado de la proteína NS1.

En el sobrenadante, aparentemente no se percibió la presencia de proteínas. No obstante, mediante modificaciones en la imagen se observó bandas tenues con tamaños similares a los presentados en el WB correspondiente a *pellet*, demostrando la existencia de las mismas proteínas en diferente concentración.

Producción de antígeno a gran escala y purificación.

Con el fin de producir la proteína NS1 para los ensayos de afinidad e inmunizaciones, se plaqueó células HEK en 3 platos de cultivo celular de 145 mm² y se transfectó el plásmido de expresión de la proteína de interés mediante el protocolo estándar usando lipofectamina. Posterior a ello, se recolectó el sobrenadante celular a los 3 días, y a los 6 días post-transfección, se procedió a recolectar sobrenadante y monocapa celular de todos los platos.

Para comprobar la presencia de la proteína de interés, se realizó un WB verificadorio con anticuerpo Anti-HisHRP.

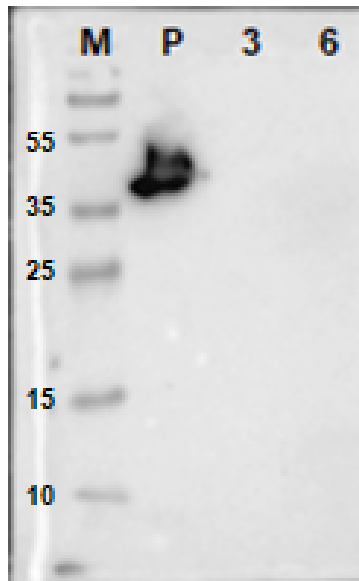


Fig. 3.12. WB de NS1-ZIKV. Mostrando la presencia de la proteína de interés únicamente en pellet, con tamaño aproximado de 40-45kDa. P: Pellet, 3: Sobrenadante de 3 días, 6: Sobrenadante de 6 días.

Una vez confirmada la expresión exitosa en el pellet, se purificó la proteína utilizando Nintá Agarose, y finalmente se tiñó con azul de Coomasie para verificar la pureza obtenida y cuantificar la proteína.

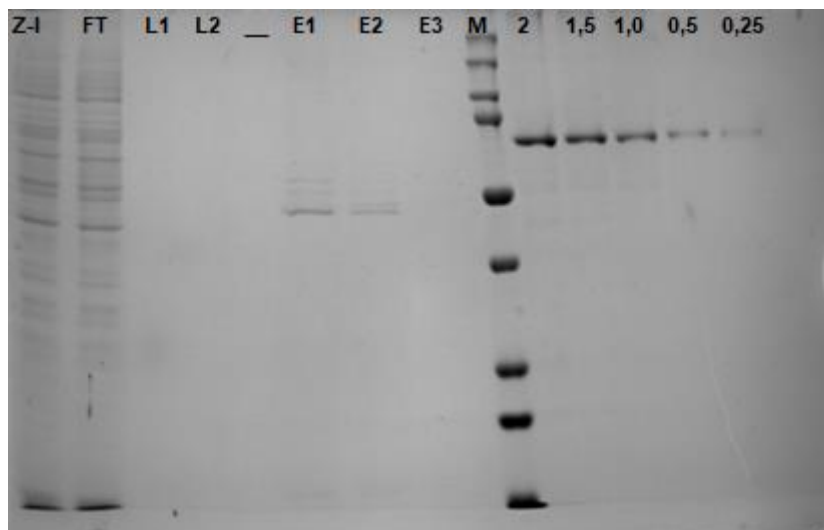


Fig. 3.13. Coomasie blue de NS1-ZIKV, con bandas de interés presentes en E1 y E2, con tamaño aproximado de 40-45 kDa. I: Inicial, FT: Flowthrough, L: Lavado, E: Elución. A la derecha del marcador, se encuentra BSA a distintas concentraciones en µg.

Determinación del título de anticuerpos por inmunización de llama.

Para el monitoreo de la respuesta inmune de la llama hacia el antígeno de interés, se extrajo sangre antes y después de cada inyección del inmunógeno, con el fin de constatar el aumento de IgGs totales e IgGs 2 y 3, correspondientes a los anticuerpos de solo cadena pesada mediante ensayos de ELISA. Con los datos, se construyó un gráfico de tendencia, que muestra el alza progresiva de la densidad óptica obtenida por la presencia de mayor número de inmunoglobulinas.

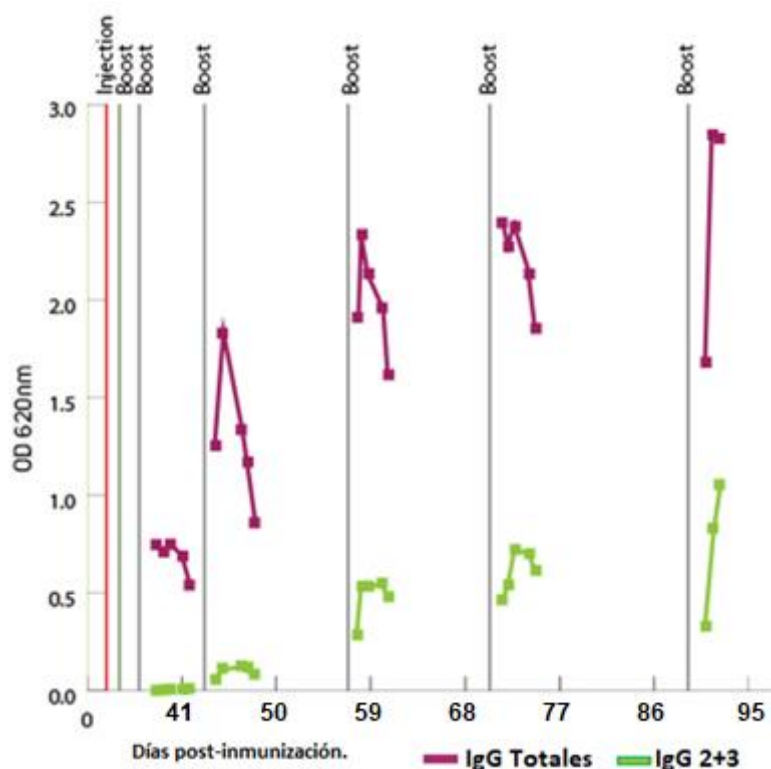
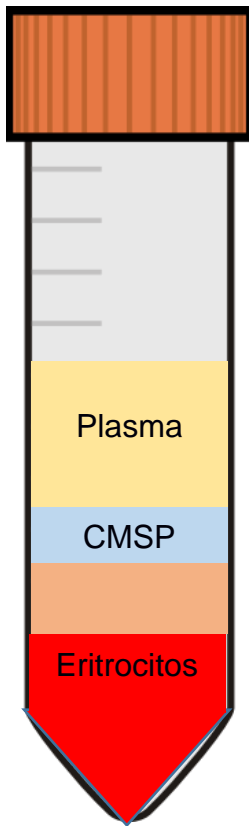


Fig. 3.14. Gráfico de tendencia de inmunoglobulinas G totales y G1, G2. Modificado de Jackson Immunoresearch [68].

Separación de linfocitos.

Concluida la recolección de sangre 4 días después del último refuerzo, y de la centrifugación en tubo Leucosep, se pueden distinguir las distintas fases:



Diferenciándose el plasma, las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y los eritrocitos. De este tubo, se extrae la fase correspondiente a las CMSP, donde se encuentran los linfocitos, que serán el material inicial para la obtención de las secuencias de anticuerpos de cadena pesada.

3.2 Construcción de librería inmune.

Amplificación de NAcS.

A partir del cDNA, utilizando los primers descritos en el capítulo 2, se obtienen exclusivamente amplicones correspondientes a las secuencias específicas para NAcS. Los primers utilizados están diseñados para anillarse en dominios conservados de las inmunoglobulinas. Después de realizada la 2da PCR, al comprobar su amplificación por electroforesis en gel de agarosa se confirma la presencia del tamaño de banda de interés (400 pb).

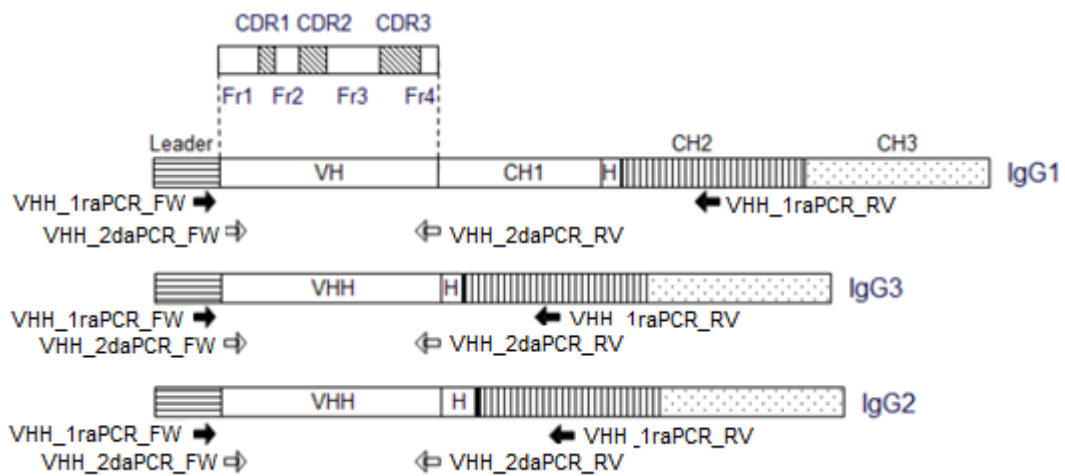


Fig. 3.15. Sitios de anillado de primers utilizados para la amplificación. Modificado de Pardon [69].

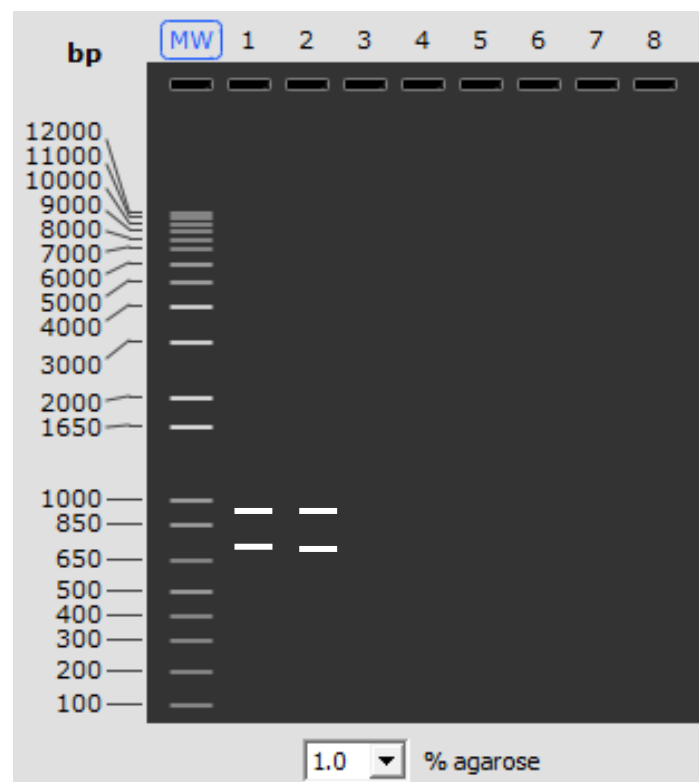


Fig. 3.16. Resultados esperados de la primera PCR, con amplicón de mayor tamaño correspondiente a IgG1 convencionales y amplicón de 700 pb de IgG2 e IgG3, carentes de CH1.

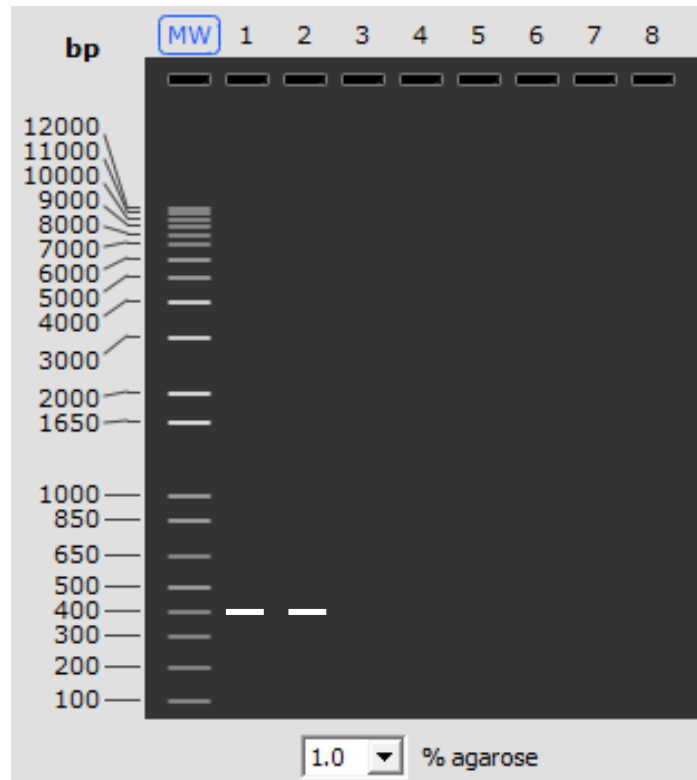


Fig. 3.17. Resultados esperados de la segunda PCR, con amplicón de 400 pb correspondiente únicamente a las secuencias NAcS de las IgG2 e IgG3.

Ligación de NAcS.

El producto de la 2da PCR, contiene sitios de restricción incluidos en los primers utilizados para la reacción. Al inicio de la secuencia de los NAcS se encuentra el sitio *Pst*I y al final el sitio *Not*I.

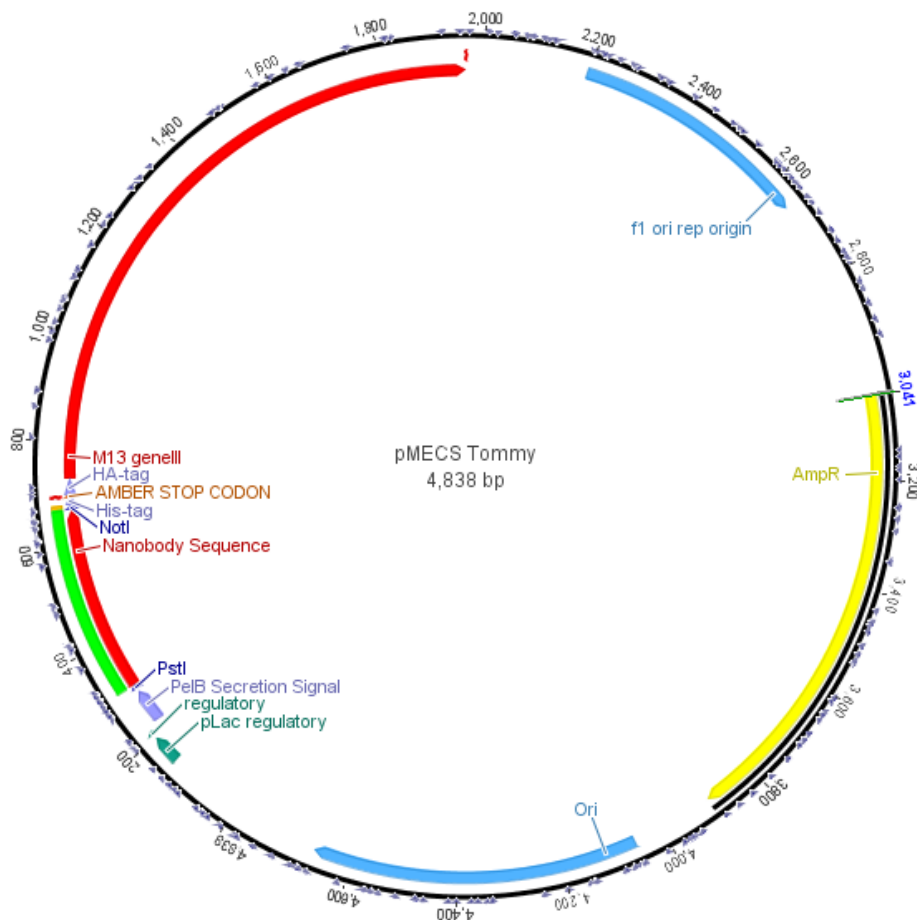


Fig. 3.18. Vector pMECS con inserto de secuencia de VHH.

El vector pMECS etiqueta al VHH con un tag de 6-His, y al ser transformado en bacterias TG-1 que suprimen el codón ámbar al final de la etiqueta de histidina, fusionan al nanoanticuerpo con la proteína PIII del fago VCSM13 en caso de requerirlo para la fase de *panning* de fagos, mientras que cuando son transformados en bacterias WK6, facilitan la expresión del nanoanticuerpo y su secreción al espacio periplásmico.

Transformación bacteriana.

Los plásmidos con las secuencias de NACs poseen el gen de resistencia a la ampicilina, por lo cual es el principal método de selección bajo el cual se rige el crecimiento bacteriano. Sin embargo, es posible que no todos los vectores transfectados posean la secuencia de algún VHH, por lo cual se realizan PCRs de las colonias para poder comprobar el tamaño de inserto apropiado, que es alrededor de 700 pb.

Análisis de clones con inserto de tamaño apropiado.

Con los primers VHH_COL_FW, VHH_COL_RV, se determina la presencia o ausencia del inserto esperado en las colonias crecidas a partir de la transformación. Las colonias positivas para el plásmido con la secuencia insertada de VHH, poseen alrededor de 700 pb, mientras que aquellas que contienen vector sin inserto, se sitúan con 300 pb. En este punto se determina la eficiencia de la transformación, la cual indica el porcentaje de colonias que contienen el inserto esperado, que debe ser mayor o igual al 70%.

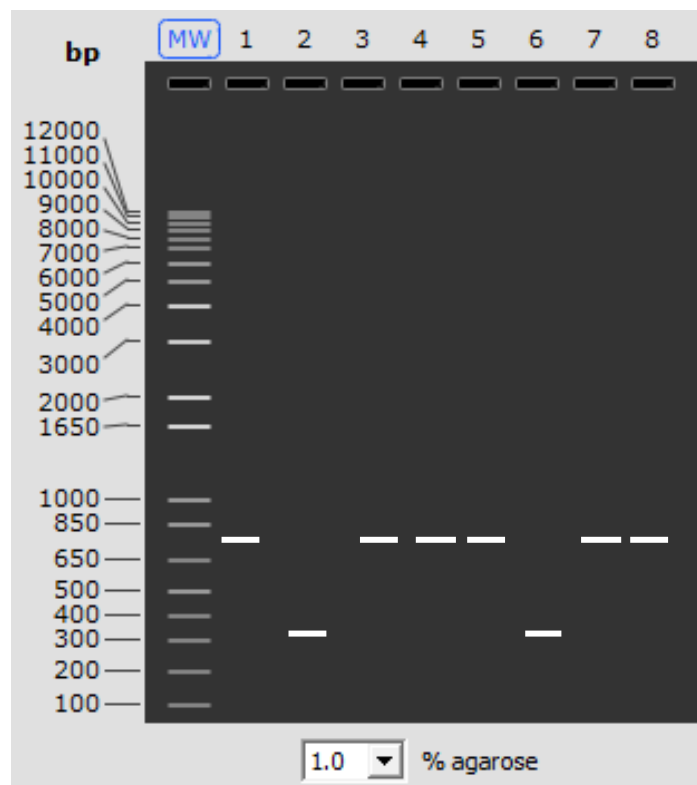


Fig. 3.19. Simulación de electroforesis para comprobación de inserto a partir de colonias.

3.3 Panning de fagos.

Aquellas colonias con el tamaño esperado para el inserto de NAc, son cultivadas en medio de crecimiento y posteriormente infectadas con el fago VCSM13, que, al comenzar su ensamblaje dentro de las bacterias, acarreará y expresará en su superficie la proteína recombinante PIII fusionada con el NAc. Así, los fagos recombinantes se enfrentan a ensayos ELISA con el antígeno NS1 de Zika, durante los cuales aquellos que no se unan

al antígeno se eliminan mediante lavados, mientras que los fagos que presenten NACs con afinidad por la proteína NS1, se eluyen e infectan a nuevas bacterias, que a su vez se cultivan en medio de crecimiento y se someten a una nueva ronda de *panning*, elevando así el número de nanoanticuerpos específicos eluidos tras cada ciclo completado.

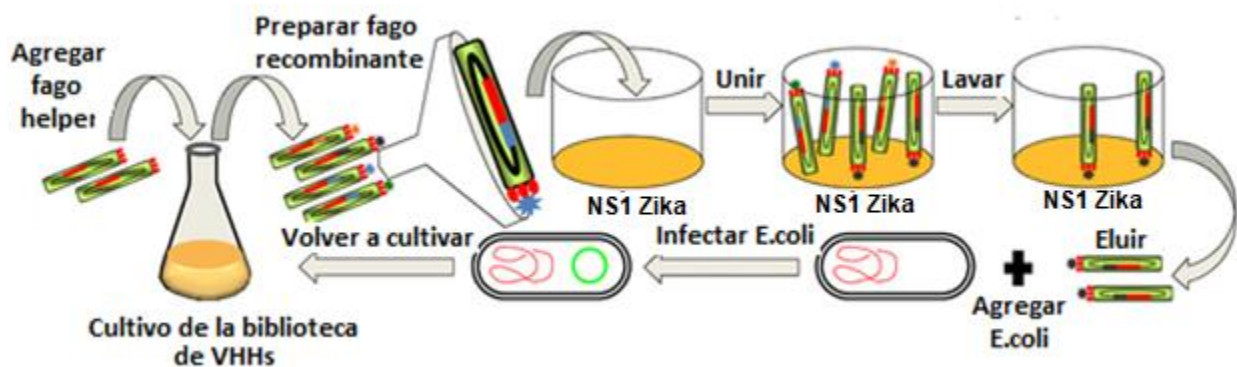


Fig. 3.20. Proceso de *panning* para selección de nanoanticuerpos específicos contra la proteína NS1 de Zika.

Concluidas las 3 rondas de *panning*, se extraen los nanoanticuerpos del periplasma de las bacterias y son purificados para su posterior utilización en los ensayos ELISA.

Screening por ELISA.

Los resultados de absorbancia de los clones respecto a cada tratamiento se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 3.1. Valores de absorbancia obtenidos de NAcS anti-NS1-DENV1 respecto a control negativo y NS1-ZIKV.

	Tratamientos (Absorbancia)		
	DENV-1-NS1	C-	ZIKV-NS1
<i>Clon 5</i>	0,093	0,020	0,024
<i>Clon 7</i>	0,507	0,017	0,014
<i>Clon 12</i>	1,337	0,029	0,020
<i>Clon 14</i>	1,239	0,015	0,012
<i>Clon 22</i>	0,990	0,024	0,026
<i>Clon 34</i>	0,460	0,020	0,017
<i>Clon 40</i>	0,834	0,020	0,023
<i>Clon 48</i>	1,050	0,017	0,013
<i>Clon 51</i>	0,374	0,014	0,014
<i>Clon 54</i>	0,675	0,028	0,059
<i>Clon 58</i>	0,019	0,015	0,019
<i>Clon 60</i>	0,221	0,021	0,018
<i>Clon 62</i>	0,832	0,022	0,030
<i>Clon 66</i>	0,918	0,016	0,019
<i>Clon 70</i>	0,065	0,015	0,018
<i>Clon 71</i>	0,669	0,030	0,038
<i>Clon 79</i>	0,314	0,023	0,016
<i>Clon 82</i>	0,246	0,023	0,020

Por los resultados se puede interpretar que los NAcS probados poseen alta especificidad por la proteína NS1 de DENV-1, situación esperada debido a que fueron obtenidos a partir de muestras de sangre de camélidos inmunizados contra dicha proteína. No obstante, se evidencia una baja o nula reactividad cruzada con la proteína NS1 de Zika, a pesar de su homología estructural.

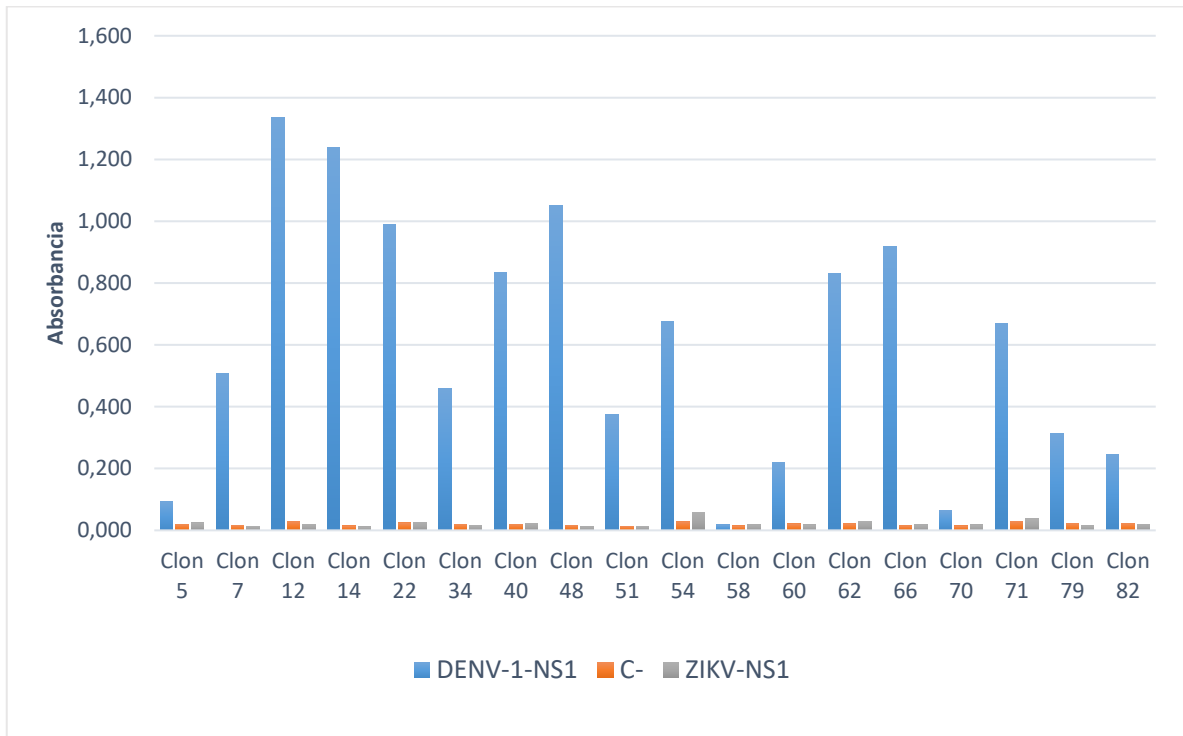


Fig. 3.21. Gráfico de barras comparativo con la diferencia de interacción antígeno-anticuerpo entre tratamientos para cada clon.

Digestión con *Hinfl*.

De los clones seleccionados a partir de las pruebas anteriores, se digirió cada vector candidato con la enzima de corte frecuente *Hinfl*, revelando potenciales diferencias genéticas en cada secuencia, para de esta manera secuenciar solo aquellos nanoanticuerpos con marcos abiertos de lectura distintos.

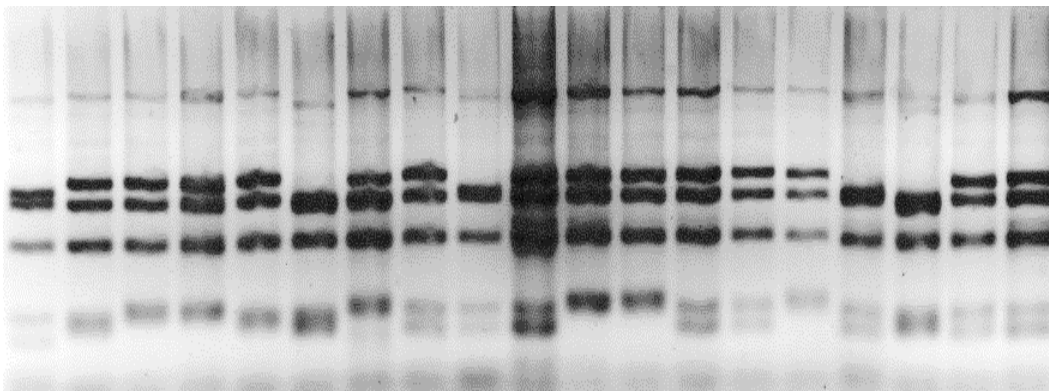


Fig. 3.22. Digestión con *Hinfl* de clones positivos. Las diferencias en tamaños de bandas dan indicio de la variabilidad genética entre cada NAc analizado. Fuente: Malnero, C; Ibañez, I [70]

3.4 Modelo de diagnóstico por ELISA.

En el modelo de diagnóstico, la estreptavidina se encuentra fija en la base de cada pocillo de la placa ELISA, seguido se le agrega el NAc primario o de captura, el cual al encontrarse biotinilado, es capaz de ligarse con gran afinidad a la estreptavidina sin interferir en la capacidad de reconocimiento antigénico. Posteriormente, al colocar una muestra positiva para NS1-ZIKV, el antígeno es capturado y queda unido al NAc tras los lavados, para ser reconocido con el NAc secundario conjugado a HRP, y así emitir la señal de quimioluminiscencia al entrar en contacto con el reactivo ECL.

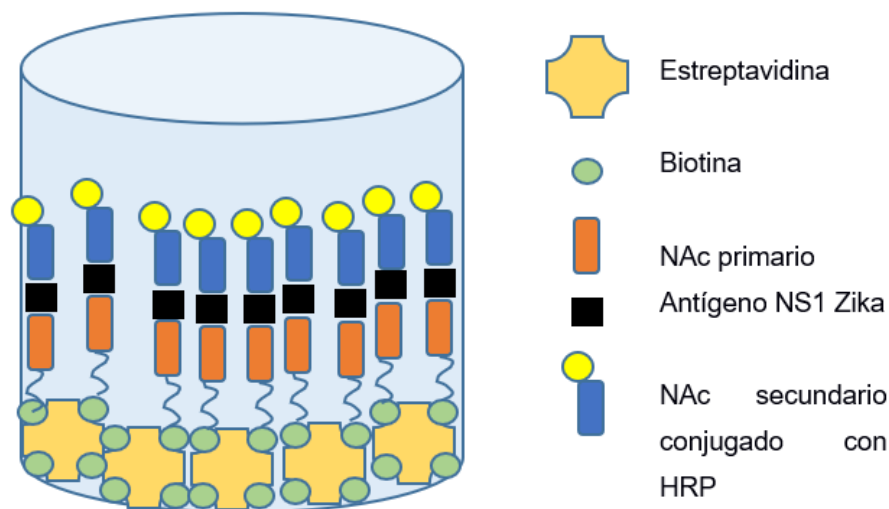


Fig. 3.23. Esquema de diagnóstico por ELISA Sandwich.

3.5 Análisis de costos.

Los costos analizados a continuación se basan en el listado de materiales mencionados en el artículo de Pardon, 2014 y comprenden a aquellos estimados para la generación de nanoanticuerpos en un laboratorio que posea equipos de uso rutinario, como centrífugas, cámaras de flujo laminar, micropipetas, termocicladores, incubadoras, espectrofotómetro, lector ELISA, cámaras de electroforesis y western blot. Con la mayor parte de costos propuestos, los correspondientes a reactivos por utilizar.

Tabla 3.2. Costos asociados a reactivos generales en el proyecto.

Reactivos	Valor aproximado (USD)
<i>Llamas immunization</i>	800,00
<i>Acetic acid, glacial (Sigma-Aldrich, Cat. No. A6283-500ML)</i>	44,89
<i>AEBSF protease inhibitor (Carl Roth, cat. no. 2931.3)</i>	163,74
<i>Biotin Conjugation Kit (Fast, Type B) – Abcam (ab201796)</i>	259
<i>Agarose MP (Roche, cat. no. 11 388 983 001)</i>	250,17
<i>AP-conjugate substrate: 4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate (DNPP, Sigma-Aldrich, cat. no. 71768)</i>	119,22
<i>CaCl₂·2H₂O (Merck, cat. no. 1023821000)</i>	75,00
<i>Chloroform (Merck, cat. no. 1024452500)</i>	86,88

<i>Citric acid·H₂O (Sigma-Aldrich, cat. no. C1909-1KG)</i>	104,25
<i>Biotin quantitation kit (Thermo Scientific, cat. no. 28005)</i>	194,17
<i>EDTA (Sigma-Aldrich, cat. no. E5134-250G)</i>	102,91
<i>Ethanol (Sigma-Aldrich, cat. No. 459844-2.5L)</i>	257,00
<i>Freund's Adjuvant, Incomplete (Sigma-Aldrich, cat. No. F5506-10X10ML)</i>	144,76
<i>Freund's Adjuvant, Complete (Sigma-Aldrich, cat. no. F5881-6X10ML)</i>	105,71
<i>Glycerol (VWR, cat. no. 24387.292)</i>	87,45
<i>Guanidine-HSCN (Sigma-Aldrich, cat. no. G9277-500G)</i>	360,23
<i>HRP-conjugate substrate: azino-bis (3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS, Sigma-Aldrich, cat. no. A1888-5G)</i>	246,89
<i>IPTG, dioxane-free (ThermoFisher Scientific, cat. no. R0392)</i>	188,00
<i>Isoamyl alcohol (Supelco, cat. no. 1009792500)</i>	160,01
<i>Taq DNA Polymerase Recombinant (ThermoFisher Scientific Cat. No. 10342020)</i>	369,36
<i>dNTP mix (Thermo Scientific, cat. no. R0192)</i>	218,00
<i>KCl (Sigma-Aldrich, cat. no. P9333-1KG)</i>	181,27
<i>KH₂PO₄ (Carl Roth, cat. no. 3904.1)</i>	48,85
<i>K₂HPO₄ (Carl Roth, cat. no. P749.2)</i>	46,56
<i>M13 helper phage: kanamycin-resistant VCSM13 (Stratagene, cat. no. 200251)</i>	268,00
<i>MgCl₂ (Sigma-Aldrich, cat. no. M8266-1KG)</i>	59,19
<i>MgSO₄·7H₂O (Sigma-Aldrich, cat. no. M7506-1KG)</i>	157,77
<i>NaCl (Carl Roth, cat. no. 3957.1)</i>	16,19
<i>Na₂HPO₄·H₂O (Merck, cat. no. 1065860500)</i>	124,80
<i>NaH₂PO₄·H₂O (Sigma-Aldrich, cat. no. S9638-1KG)</i>	201,41
<i>NH₄Cl (Sigma-Aldrich, cat. no. A9434-1KG)</i>	88,06
<i>NaHCO₃ (Merck, cat. no. 1063295000)</i>	113,16
<i>SigmaScreen™ Streptavidin High Capacity Coated Plates 96 well Cat. No. S6940-1EA</i>	184,47
<i>PEG6000 (Sigma-Aldrich, cat. no. 81260-1KG)</i>	73,74
<i>InFusion TaKaraBio Cloning (Cat. No. 638910)</i>	892,00
<i>RNaseOUT recombinant RNase inhibitor (Life Technologies, cat. no. 10777019)</i>	296,46
<i>Sodium acetate·3H₂O (Merck, cat. no. 1.06267.1000)</i>	86,28

Sucrose (Sigma-Aldrich, cat. no. S7903-1KG)	88,73
Pfu DNA Polymerase 5U/μl (incl. 10x Reaction Buffer MgCl ₂ FREE + 50mM MgCl ₂ solution - Biotools - Cat. No. 10.522-4556)	145,16
SuperScript II reverse transcriptase (SSII reverse transcriptase; Life Technologies, cat. no. 18064-014)	550,25
T4 DNA ligase, 1 U μl ⁻¹ (Thermo Scientific, cat. no. 15224-025)	267,00
Trizma (Tris) base (Sigma-Aldrich, cat. no. T6066-1KG)	173,44
Tri-sodium citrate·2H ₂ O (Sigma-Aldrich, cat. no. W302600-10KG)	251,76
Trypsin (Sigma-Aldrich, cat. no. T1426-250mg)	123,08
Ultrapure phenol:water (3.75:1 (vol/vol)) (Life Technologies, cat. no. 15594-047)	230,00
Kits de purificación de ADN	
PureYield plasmid miniprep system (Promega, cat. no. A1222)	92,80
QIAquick gel extraction kit (Qiagen, cat. no. 28706)	122,00
QIAquick PCR purification kit (Qiagen, cat. no. 28106)	226,00
Anticuerpos	
Goat anti-llama antibody, HRP-conjugated (Bethyl Laboratories, cat. no. A160)	209,00
Goat anti-mouse IgG, alkaline phosphatase-conjugated (Sigma-Aldrich, cat. no. A3562)	219,31
Anti-6X His tag® antibody (HRP) (Abcam- ab1187)	435,00
Antibióticos	
Ampicillin sodium salt (Carl Roth, cat. no. K029.2)	111,76
Kanamycin monosulfate (Duchefa, cat. no. K0126.0025)	86,37
Detergentes	
Lauroyl sarcosine (Sigma-Aldrich, cat. No. L9150-100G)	57,40
Tween20 (Sigma-Aldrich, cat. no. P2287-500ML)	59,75
Medios de cultivo y placas de crecimiento.	
Bacto tryptone (Duchefa, cat. no. T1332)	97,14
Glucose (Sigma-Aldrich, cat. no. G8270-5KG)	111,56
LB medium, high salt (Duchefa, cat. no. L1704.2500)	145,00
Micro agar (Duchefa, cat. no. M1002.1000)	116,51
Thiamine hydrochloride (Sigma-Aldrich, cat. no. T1270-100G)	111,56
Yeast extract (Duchefa, cat. no. Y1333.1000)	71,42

<i>E. coli</i> DH5 α	300,00
<i>E. coli</i> TG1 (Lucigen Cat. No. 60502-2)	331,00
<i>E. coli</i> WK6 (ATCC® 47078™)	305,00
Células HEK-293T (ATCC 12022001-1VL)	674,72
Cell scraper (Costar, cat. no. 3011)	50,00
Conical-bottom plates, 96 wells (Thermo Scientific, cat. no. 249944)	574,36
Falcon conical centrifuge tubes (15 ml and 50 ml)	309,31
Gene pulser electroporation cuvette, 0.1 cm gap (Bio-Rad, cat. no. 165-2089)	191,00
Maxisorp 96-well Immunoplates (Nunc, cat. no. 439454)	833,79
Multichannel pipettes: 30–300 μ l and 5–50 μ l	2000,00
Nunc microplate sealing tape 236366 (Thermo Scientific, cat. no. 10170671)	94,12
PCR tube strips (8-tube strips, Greiner Bio-One, cat. no. 673210; cap strips, Greiner Bio-One, cat. no. 373270)	318,00
Plates, 96 deep wells (Thermo Scientific, cat. no. AB-0932)	312,45
RNase-free microtubes (Eppendorf, cat. no. 0030 121.589)	84,42
Round-bottom tissue culture plates with lid, 96 wells (BD Biosciences, cat. no. 353077)	200,94
Square dishes, 245 x 245 x 25 mm (Thermo Scientific, cat no. 240835)	515,57
Sterile gas-permeable adhesive seal (Thermo Scientific, cat. no. AB-0718)	154,42
Sterilization filters, 0.22 μ m and 0.45 μ m (Sarstedt, cat. nos. 83-1826-001 and 83-1826)	122,25
Uni-SepMAXI+ lymphocyte separation tubes (Gentaur, cat. no. NVU16)	175,36
TOTAL: \$18208,16	

Tabla 3.3. Costos asociados a enzimas de restricción.

Enzimas de restricción	Valor aproximado (USD)
<i>Hinfl</i> (New England BioLabs. Cat. R0155S)	89,00
<i>BspEI</i> (NEB. Cat. R0540S)	98,21
<i>BglI</i> (NEB. Cat. R0143S)	85,94
<i>BglII</i> (NEB. Cat. R0144S)	85,94
<i>EcoRI</i> (NEB. Cat. R0101S)	67,15
<i>BstEII</i> (NEB. Cat. R0162S)	89,00
<i>NotI</i> (NEB. Cat. R0189S)	94,55
<i>NcoI</i> (NEB. Cat. R0193S)	90,55
<i>PstI</i> (NEB. Cat. R0140S)	87,33
<i>XbaI</i> (NEB. Cat. R0145S)	84,41
TOTAL: \$872,08	

Tabla 3.4. Costos asociados a síntesis de oligonucleótidos.

Primers	Valor aproximado (USD)
VHH_1raPCR_FW: 5'- GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG-3';	3,45
VHH_1raPCR_RV: 5'- GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC-3';	3,45
VHH-2daPCR_RV: 5'- GGACTAGTGCGGCCGCTGGAGACGGTGAC CTGGGT-3';	5,25

VHH-2daPCR_FW: 5'- GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG -3';	4,35
VHH_COL_FW: 5'- GGATAACAATTTACACAGG-3';	3,00
VHH_COL_RV: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT- 3'.	2,55
VHH_RV_PIII_COL: 5'- CCACAGACAGCCCTCATAG-3'	2,70
FW_INF_ZIKANS1_BSPEI: 5'- CAGCGCTTACTCCGGAGACGTGGGGTGCT CAGTG-3'	5,10
RV_INF_ZIKANS1_BGLII: 5'- AGAGGGAAAAAGATCTCTAGTGATGGTGAT GGTGGTGGCTAGCCGCTGTCACCATTGAC CTCACT-3'	9,90
	Total: \$39,75

El costo total del proyecto asciende a un valor de \$19119,99.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

Basado en los objetivos planteados al inicio del documento, se puede concluir que:

- Se pudo modelar una estrategia para la aplicación de NAcS en la detección de la proteína NS1 de Zika.
- Se estableció un protocolo de generación de NAcS específicos para el diagnóstico de Zika.
- Se produjo exitosamente la expresión y purificación de la proteína NS1 de Zika, encontrándose disponible para futuras inmunizaciones o ensayos *in vitro*.
- Se evaluó la afinidad de un set de NAcS contra DENV-1 generados en el Instituto de Ciencia y Tecnología: “Dr César Milstein” por la Dra. Itatí Ibáñez y el Lic. Cristian Malnero mediante un ensayo ELISA, sugieren que NAcS generados contra un virus específico, podrían tener baja o nula reactividad cruzada con otros virus a pesar de su homología estructural y filogénica.

Por lo cual en el presente trabajo se demuestra la factibilidad y aplicabilidad de la tecnología de generación de nanoanticuerpos en el Ecuador. Actualmente, no existe precedente en el país en torno a esta temática. No obstante, la presencia de camélidos en territorio nacional aporta el componente natural necesario para el inicio de investigaciones asociadas a NAcS, que, aunada al financiamiento para el desarrollo de la ciencia aplicada en este campo específico de la inmunología volvería altamente viable la consecución de resultados relevantes en torno a la tecnología de NAcS. Además, el precedente de generación exitosa de nanoanticuerpos contra dengue, proporciona un panorama favorable para la producción de NAcS que sean capaces de detectar el virus del Zika, abriendo paso a la innovación de un nuevo método de diagnóstico rápido y preciso de la enfermedad, como se propone en este documento.

4.2 Recomendaciones

La posibilidad de generar experimentalmente los NAcS propuestos en este documento, a su vez permite la apertura de nuevas oportunidades de investigación del potencial de estos anticuerpos de solo cadena pesada, como lo son:

- La posibilidad de inmunizar camélidos con distintas proteínas del virus de Zika, para someter a prueba la capacidad diagnóstica y antiviral de los NAcS producidos contra otras proteínas distintas a NS1.
- Utilizar modelos *in vitro* e *in vivo* para el análisis de la capacidad inhibitoria y/o terapéutica de los nanoanticuerpos generados para distintas proteínas del ZIKV.
- Considerar la posibilidad de disminuir el tiempo de diagnóstico del modelo propuesto, mediante la adaptación de los nanoanticuerpos a la técnica de inmunoensayos de flujo lateral.
- Creación de vectores universales y polifuncionales para el clonado de secuencias de NAcS contra cualquier antígeno.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] H. Lazear and M. Diamond, “Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere,” *J. Virol.*, vol. 90, no. 10, pp. 4864–4875, 2016.
- [2] C. Oeser, “An update on Zika Virus and Congenital Zika Syndrome,” *Paediatr. Child Health (Oxford)*, vol. 29, no. 1, pp. 34–37, 2018.
- [3] J. Moghadam, S. Bayrami, S. J. Moghadam, and R. Golrokhi, “Zika virus: A review of literature,” *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, vol. 6, no. 12, pp. 989–994, 2016.
- [4] J. L. Proenca-modena, G. Paier, M. Laura, C. C. Judice, and F. Trindade, “Zika virus : lessons learned in Brazil,” *Microbes Infect.*, vol. 20, pp. 661–669, 2018.
- [5] C. Padilla, A. Pan, A. Geller, and M. Zakowski, “Zika virus : review and obstetric anesthetic clinical,” *J. Clin. Anesth.*, vol. 35, pp. 136–144, 2016.
- [6] F. Krammer, “Dengue and Zika : The Complexities of Being Related,” *Trends in Immunology*, vol. 40, no. 6, Elsevier Ltd, pp. 467–469, 2019.
- [7] S. A. Rasmussen, D. J. Jamieson, M. A. Honein, D. Ph, and L. R. Petersen, “Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality,” *N. Engl. J. Med.*, pp. 1–7, 2016.
- [8] S. Reid, “Zika Virus and Neurologic Disease,” *Neurol. Clin. NA*, vol. 36, no. 4, pp. 767–787, 2018.
- [9] S. C. Weaver *et al.*, “Zika virus : History , emergence , biology , and prospects for control,” *Antiviral Res.*, vol. 130, pp. 69–80, 2016.
- [10] N. Kyllilis *et al.*, “A LOW-COST BIOLOGICAL AGGLUTINATION ASSAY FOR MEDICAL DIAGNOSTIC APPLICATIONS,” *Prepr. Sci. Rep.*, 2018.
- [11] P. Lafaye and T. Li, “Use of camel single-domain antibodies for the diagnosis and treatment of zoonotic diseases,” *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 60, no. June, pp. 17–22, 2018.
- [12] J. Salvador, L. Vilaplana, and M. Marco, “Nanobody : outstanding features for diagnostic and therapeutic applications,” 2019.
- [13] S. Li, W. Zhang, K. Jiang, H. Shan, M. Shi, and B. Chen, “Nanobody against the E7 oncoprotein of human papillomavirus 16,” *Mol. Immunol.*, vol. 109, no. February, pp. 12–19, 2019.
- [14] M. Stone *et al.*, “Comparison of Detection Limits of Fourth- and FifthGeneration

- Combination HIV Antigen-Antibody, p24 Antigen, and Viral Load Assays on Diverse HIV Isolates,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 56, no. 8, pp. 1–12, 2018.
- [15] D. A. Muller, A. C. I. Depelsenaire, and P. R. Young, “Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection,” *J. Infect. Dis.*, vol. 215, no. Suppl 2, pp. 89–95, 2017.
- [16] I. Van Audenhove and J. Gettemans, “Nanobodies as Versatile Tools to Understand , Diagnose , Visualize and Treat Cancer,” *eBiomedicine*, vol. 8, pp. 40–48, 2016.
- [17] W. Xue, Q. Zhao, P. Li, R. Zhang, J. Lan, and J. Wang, “Identification and characterization of a novel nanobody against duck hepatitis A virus type 1,” *Virology*, vol. 528, no. August 2018, pp. 101–109, 2019.
- [18] A. Bhaskaran, K. Pramod, K. C. Ajithkumar, and U. S. Jijith, “Application of nanobodies in medical and applied sciences 1,” *Sci. Tech*, vol. 8, no. 3, pp. 150–154, 2016.
- [19] E. Beghein and J. Gettemans, “Nanobody Technology : A versatile Toolkit for Microscopic imaging , Protein – Protein interaction Analysis , and Protein Function exploration Primary Detection Reagents in,” *Front. Immunol.*, vol. 8, no. July, pp. 1–14, 2017.
- [20] A. Aghebati-maleki, “Nanobodies : emerging tools for clinical applications,” *Int. J. Res. Appl. Basic Med. Sci.*, vol. 4, no. 2, pp. 81–90, 2018.
- [21] Y. Sheng *et al.*, “Nanobody - horseradish peroxidase fusion protein as an ultrasensitive probe to detect antibodies against Newcastle disease virus in the immunoassay,” *J. Nanobiotechnology*, pp. 1–15, 2019.
- [22] D. Musso, C.-L. Van Mai, and D. J. Gubler, “Zika virus : following the path of dengue and chikungunya ?,” *Lancet*, vol. 386, no. 9990, pp. 243–244, 2015.
- [23] L. Petersen, D. Jamieson, A. M. Powers, and M. A. Honein, “Zika Virus,” *N. Engl. J. Med.*, no. March 2015, 2016.
- [24] S. L. Casapulla, G. Aidoo-frimpong, T. B. Basta, and M. J. Grijalva, “Zika virus knowledge and attitudes in Ecuador,” *AIMS Public Heal.*, vol. 5, no. November 2017, pp. 49–63, 2018.
- [25] R. Noor and T. Ahmed, “Zika virus : Epidemiological study and its association with public health risk,” *J. Infect. Public Health*, vol. 11, no. 5, pp. 611–616, 2018.

- [26] V. Cevallos *et al.*, “Zika and Chikungunya virus detection in naturally infected *Aedes aegypti* in Ecuador,” *Acta Trop.*, vol. 177, no. October 2017, pp. 74–80, 2018.
- [27] D. Vasquez *et al.*, “Impact of the 2016 Ecuador Earthquake on Zika Virus Cases,” *AJPH Res.*, vol. 107, no. 7, pp. 1137–1142, 2017.
- [28] N. H. Ahmed and S. Broor, “Comparison of NS1 antigen detection ELISA , real time RT-PCR and virus isolation for rapid diagnosis of dengue infection in acute phase,” *J. Vector Borne Dis.*, no. September, pp. 194–199, 2014.
- [29] A. M. Faria and T. Mazon, “Early diagnosis of Zika infection using a ZnO nanostructures-based rapid electrochemical biosensor,” *Talanta*, vol. 203, no. January, pp. 153–160, 2019.
- [30] UNICEF, “Sistematización de la estrategia de combate al Zika: Ecuador.” 2018.
- [31] C. H. Leow, K. Fischer, C. Leow, Q. Cheng, C. Chuah, and J. McCarthy, “Single Domain Antibodies as New Biomarker Detectors,” *Diagnostics*, 2017.
- [32] A. Fatima *et al.*, “Development of VHH Antibodies against Dengue Virus Type 2 NS1 and Comparison with Monoclonal Antibodies for Use in Immunological Diagnosis,” *PLoS One*, vol. 9, no. 4, pp. 1–12, 2014.
- [33] A. R. Plourde and E. M. Bloch, “A Literature Review of Zika Virus,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 22, no. 7, pp. 1185–1192, 2016.
- [34] B. Song, S. Yun, M. Woolley, and Y. Lee, “Zika virus : History , epidemiology , transmission , and clinical presentation,” *J. Neuroimmunol.*, vol. 308, pp. 50–64, 2017.
- [35] M. Hennessey, M. Fischer, and J. E. Staples, “Zika Virus Spreads to New Areas — Region of the Americas , May 2015 – January 2016,” 2016.
- [36] G. P. Göertz, S. R. Abbo, J. J. Fros, and G. P. Pijlman, “Functional RNA during Zika virus infection,” *Virus Res.*, vol. 254, no. August 2017, pp. 41–53, 2018.
- [37] J. A. Roby, Y. X. Setoh, R. A. Hall, and A. A. Khromykh, “Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins,” *J. Gen. Virol.*, no. 2015, pp. 1551–1569, 2019.
- [38] E. R. A. Oliveira, R. Mohana-borges, R. B. De Alencastro, and B. A. C. Horta, “The flavivirus capsid protein: Structure , function and perspectives towards drug design,” *Virus Res.*, vol. 227, pp. 115–123, 2017.
- [39] F. Javed *et al.*, “Zika virus : what we need to know ?,” *J. Basic Microbiol.*, no.

September, 2017.

- [40] Y. Shi and G. F. Gao, "Structural Biology of the Zika Virus," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 42, no. 6, pp. 443–456, 2017.
- [41] Q. Liang, Z. Luo, J. Zeng, W. Chen, and S. Foo, "Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy," *Cell Stem Cell*, vol. 19, no. 5, pp. 663–671, 2017.
- [42] X. Xie, J. Zou, Q. Wang, and P. Shi, "Targeting dengue virus NS4B protein for drug discovery," *Antiviral Res.*, vol. 118, pp. 39–45, 2015.
- [43] J. Saiz, N. Jiménez, A. Blázquez, E. Escribano, and M. Martín, "Host-Directed Antivirals : A Realistic Alternative," *Viruses*, 2018.
- [44] W. C. Ng, R. Soto-acosta, S. S. Bradrick, M. A. Garcia-blanco, and E. E. Ooi, "The 5' and 3' Untranslated Regions of the Flaviviral Genome," *Viruses*, pp. 1–14, 2017.
- [45] R. Gratton, A. Agrelli, P. M. Tricarico, L. Brand, and S. Crovella, "Autophagy in Zika Virus Infection : A Possible Therapeutic Target to Counteract Viral Replication," *Int. J. Mol. Sci.*, 2019.
- [46] M. Lorch *et al.*, "Production of recombinant NS1 protein and its possible use in encephalitic flavivirus differential diagnosis," *Protein Expr. Purif.*, vol. 153, no. July 2018, pp. 18–25, 2019.
- [47] J. Cecchetto *et al.*, "The capacitive sensing of NS1 Flavivirus biomarker," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 87, no. August 2016, pp. 949–956, 2017.
- [48] J. Wen and S. Shresta, "Antigenic cross-reactivity between Zika and dengue viruses : is it time to develop a universal vaccine ?," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 59, pp. 1–8, 2019.
- [49] S. Beltrán, S. Chacón, E. Moreno, and J. Pereyra, "Clinical and differential diagnosis : Dengue , chikungunya and Zika," *Rev. Médica del Hosp. Gen. México*, vol. 81, no. 3, pp. 146–153, 2018.
- [50] A. Sharma and S. K. Lal, "Zika Virus : Transmission , Detection , Control , and Prevention," *Front. Microbiol.*, vol. i, no. February, pp. 1–14, 2017.
- [51] G. Amaral and F. Barreto, "Zika virus infection : epidemiology , clinical manifestations and diagnosis," *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2016.
- [52] M. L. Landry and K. S. George, "Laboratory Diagnosis of Zika Virus Infection," *Arch.*

- Pathol. Lab. Med.*, vol. 141, no. January, 2017.
- [53] M. C. Marquezan *et al.*, "Ocular effects of Zika virus a review," *Surv. Ophthalmol.*, vol. 63, no. 2, pp. 166–173, 2017.
- [54] C. Hamers-Casterman *et al.*, "Naturally occurring antibodies devoid of light chain," *Lett. to Nat.*, 1993.
- [55] S. Muyldermans, "Nanobodies : Natural Single-Domain Antibodies," *Annu. Rev. Biochem.*, no. March, pp. 1–23, 2013.
- [56] C. R. Mackenzie, "Nanobody-Based Delivery Systems for Diagnosis and Targeted Tumor Therapy," vol. 8, no. November, 2017.
- [57] K. M. Chow *et al.*, "Immunization of Alpacas (*Lama pacos*) with Protein Antigens and Production of Antigen-specific Single Domain Antibodies," *J. Vis. Exp.*, no. January, pp. 1–7, 2019.
- [58] S. Steeland, R. E. Vandenbroucke, and C. Libert, "Nanobodies as therapeutics : big opportunities for small antibodies," *Drug Discov. Today*, vol. 21, no. 7, pp. 1076–1113, 2016.
- [59] R. K. Singh, K. Dhama, K. Karthik, and R. Tiwari, "Advances in Diagnosis , Surveillance , and Monitoring of Zika Virus : An Update," *Front. Microbiol.*, vol. 8, no. January, pp. 1–17, 2018.
- [60] S. Hansen *et al.*, "Diagnosing Zika virus infection against a background of other flaviviruses : Studies in high resolution serological analysis," *Sci. Rep.*, no. October 2018, pp. 1–10, 2019.
- [61] N. P. Lindsey *et al.*, "Ability To Serologically Confirm Recent Zika Virus Infection in Areas with Varying Past Incidence of Dengue Virus Infection in the United States and U . S . Territories in 2016," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 56, no. 1, pp. 1–6, 2018.
- [62] S. J. Wong *et al.*, "A Multiplex Microsphere Immunoassay for Zika Virus Diagnosis," *EBioMedicine*, vol. 16, pp. 136–140, 2017.
- [63] T. Castro, M. Sabalza, C. Barber, W. Abrams, A. Charlys, and D. Costa, "Rapid diagnosis of Zika virus through saliva and urine by Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)," *J. Oral Microbiol.*, vol. 10, 2018.
- [64] C. Henry and R. G. Stabeli, "Camelid Single-Domain Antibodies As an Alternative to Overcome Challenges Related to the Prevention , Detection , and Control of neglected Tropical Diseases," *Front. Immunol.*, vol. 8, no. June, pp. 1–8, 2017.

- [65] C. Vincke, C. Gutiérrez, U. Wernery, N. Devoogdt, G. Hassanzadeh-ghassabeh, and S. Muyldermans, *Generation of single domain antibody fragments derived from camelids and generation of manifold constructs.*, no. May 2014. 2012.
- [66] M. Li, M. Zhu, C. Zhang, X. Liu, and Y. Wan, "Uniform Orientation of Biotinylated Nanobody as an Affinity Binder for Detection of *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1Ac Toxin," *Toxins (Basel)*., pp. 3208–3222, 2014.
- [67] M. Zhu, X. Gong, Y. Hu, W. Ou, and Y. Wan, "Streptavidin-biotin-based directional double Nanobody sandwich ELISA for clinical rapid and sensitive detection of influenza H5N1," *J. Transl. Med.*, pp. 1–10, 2014.
- [68] Jackson ImmunoResearch, "Anti-Camelid Secondary Antibodies," 2018. [Online]. Available: <https://www.jacksonimmuno.com/technical/products/groups/whole-igg/Anti-Camelid>.
- [69] E. Pardon *et al.*, "A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology," *Nat. Protoc.*, 2014.
- [70] C. Malnero and L. I. Ibañez, "Nanoanticuerpos con potencial de diagnóstico contra los 4 serotipos de DENV.," 2019.

ANEXOS

ANEXO A.

Preparación de soluciones y buffers – Tomado de Ibáñez, I.

El detalle para la preparación de las distintas soluciones utilizadas se describe en los siguientes párrafos.

1. DEPC- H_2O .

Para la preparación de este reactivo, todos los materiales utilizados se mantuvieron libres de ARNasas (incluyendo puntas).

En una cámara de flujo laminar, se colocó DEPC a una relación de 0,2% con agua desionizada, se permitió reposar durante un día con agitaciones cada 3 h.

Finalmente se dejó incubando en una cámara caliente a 37°C durante dos h para luego ser esterilizado en autoclave.

2. Cloruro de sodio 0,9%.

Se agregó 9 g de cloruro de sodio por cada litro de agua de-ionizada y se esterilizó en autoclave.

3. HEPES 1mM.

Se añadió 0,2 g de HEPES por litro, para obtener una solución a concentración 1mM, después se esterilizó en autoclave.

4. Placas Petri con agar LB (Suplementado con glucosa y ampicilina).

Para preparar, se dispuso 15 g de agar en 900 ml de medio LB estéril, para calentarse y suplementarse con 100 ml de glucosa al 20% y 1 ml de Ampicilina (100µg/ml).

Finalmente se dispensó el medio líquido en placas Petri.

ANEXO B.

Protocolo base para generación de NAcS – Adaptado de Ibañez, I.

Construcción y panning de una librería inmune de VHHs

I-Construcción de una librería inmune de VHHs

- A-Preparación de buffers
- B-Preparación de linfocitos desde sangre y extracción de RNA
- C-Preparación de cDNA desde RNA
- D-Primera y segunda PCR
- E-Purificación del producto de la segunda PCR
- F-Digestión del vector y ligación
- G-Preparación de células competentes
- H-Transformación
- I-Colony PCR para determinar el porcentaje de colonias de la librería que poseen insertos de tamaño correcto

II-Panning de clones específicos de antígenos

- A-Preparación de fagos y medio
- B-Enriquecimiento
- C-Re-amplificación
- D-ELISA de enriquecimiento
- E-Elisa de extracto periplasmático
- F-Colony PCR y digestión con Hinf de clones positivos

I-Construcción de la librería inmune de VHH

A)-Preparación de soluciones

DEPC-Agua

Usar guantes y tips libres de RNAsas. Se pueden usar botellas esterilizadas por calor (ON a 180°C, tapados con una hoja de aluminio).

Poner 0,2% de DEPC en agua desionizada (trabajar en flujo laminar usando guantes), mezclar bien. Dejar un día y agitar de vez en cuando. Poner a 37°C por 2 hs o a RT ON. Autoclavar para destruir el DEPC tóxico.

Buffer de lisis A

Trabajar en condiciones libres de RNAsas.

Materiales (todos deben ser libres de RNAsas):

- Guantes
- Agua DEPC
- Tiocianato de Guanidina
- Acido cítrico
- Lauril sacosina
- Botella esterilizada de 500 ml (ON a 180°C)
- 2 tubos falcon estériles
- Pipetas de 10 ml estériles
- Pipetboy
- NaOH y HCl + indicador de pH.

Preparación:

Para 100 ml de buffer de lisis A se pesan distribuido en 2 tubos falcon:

Tiocianato de guanidina	47.20 g
.....	
Ácido cítrico	0.74 g
.....	

Lauril	sarcosina	0.5 g
.....		

Vaciar los tubos cuidadosamente en una botella esterilizada, para evitar salpicar usar un papel limpio bajo la botella.

Agregar agua DEPC, 60 ml en total, usando el tubo falcon usado para pesar. Disolver los productos tanto como sea posible, agitar manualmente o con un imán libre de RNAsas (tratado con una solución para remover RNAsas) sin tocar el cuello de la botella.

Ajustar el pH a 7 usando NaHO o HCl (preparado con agua DEPC preferentemente, aunque con agua sin tratar también está bien). El pH esperado cuando todos los componentes están disueltos es 4. Medir el pH agregando gotas en el papel indicador usando un tip estéril. Un pH menor a 7 puede provocar autólisis del RNA.

Medir el volumen final usando tubos falcon.

Ajustar el volumen a 100 ml agregando agua DEPC.

Controlar el pH de nuevo luego del agregado de agua DEPC.

Dividir el volumen del buffer de lisis en tubos de 15 ml, libres de RNAsas. Poner 9 ml en cada tubo usando pipetas de 10 ml estériles. Cerrar firmemente y rotular con la fecha. Guardar a -20°C.

Antes de usar agregar β-mercaptoetanol hasta una concentración de 1% (90 µl en 9 ml de buffer).

NaCl 0,9%

Poner 9 g de NaCl por litro de agua de-ionizada. Autoclavar.

1mM HEPES

MW= 238.31 g/mol

1mM= 0,2 g por litro. Ajustar a pH 7. Autoclavar.

Placas de LB-agar con Glucosa y Ampicilina

Materiales:

- 900 ml LB
- 15 g Agar
- 100 ml de glucosa 20%
- 1 ml de Ampicilina (100 µg/ml)

Preparación:

Poner 15 g/l de agar en un litro de agua. Mezclar correctamente, no agitar para no formar burbujas. Poner en las placas de Petri y eliminar las burbujas con un tip. Después de ± 1 h cerrar las placas y guardar a 4°C.

B)-Preparación de Linfocitos desde sangre y extracción del RNA

“Controlar con suficiente anticipación que estén todos los materiales necesarios”

Día 1

Materiales:

- Guantes
- Sangre fresca anticoagulada
- Solución 0.9% de NaCl
- Lymphoprep (Nycomed), mantener en oscuridad
- PBS frío
- Buffer de lisis A: agregar β-mercaptoetanol antes de usar.
- Agua DEPC
- Tubos BD de 50 ml
- Aguja 19G y 23G ó 25G, una aguja por librería.
- Jeringa de 10 ml, una por librería.
- Acetato de Na 2M, pH 4 (libre de RNAsas)
- Fenol (saturado con agua)
- Cloroformo:isoamilico (24:1): 12 ml Cloroformo + 0,5 ml de Isoamilico.

- 100% etanol
- Hielo
- Eppendorfs de 1 ml, tubos de 15 y 50 ml (resistentes a cloroformo y a centrifugación, que no pierdan) tips, pipetas de 10 y 25 ml, pipetas pasteur de vidrio, pipetboy.
- Eppendorf de 0,5 ml, tips con filtro y pipetas libres de RNAsas
- Centrifuga grande y pequeña.
- Máquina de PCR
- Nanodrop
- Vortex

Protocolo:

“Usar guantes y guardapolvo para trabajar con sangre”

Las cantidades de este protocolo están calculadas para un volumen de **50 ml de sangre no diluida**.

Tomar la sangre fresca desde el hielo y estimar el volumen.

Diluir la sangre 2 veces: 25 ml de sangre + 25 ml de 0,9% NaCl.

-Colocar 15 ml de lymphoprep (Nycomed) por tubo de 50 ml. Se debe formar un gradiente.

Mantener el tubo en un ángulo de 30 grados. Agregar lentamente 30 ml de sangre diluida utilizando una pipeta de 25 ml de modo que la sangre se quede en la parte superior del Nycomed.

Centrifugar por 20 min a 2000 rpm a RT. **No usar acelerador ni freno.**

Preparar 2 tubos de 15 ml BD por librería para el suero. Preparar las agujas y jeringas.

Sacar los tubos lentamente de la centrifuga. Evitar el mezclado. Pre-enfriar la centrifuga a 4°C para la próxima ronda de centrifugación.

Tomar dos veces 10 ml de la fase superior (suero) preferentemente desde dos tubos de 50 diferentes, congelarlos a -20°C. Van a ser usados para fraccionar IgGs.

Luego tomar de todos los tubos, con una pipeta pasteur de vidrio, incluidos los dos usados para muestras de suero, la interfase blanca que contiene los linfocitos, colocar todas las alícuotas juntas en un falcon BD de 50 ml por librería. Tener cuidado de no tomar mucho de la fase superior (suero) o de la fase inferior (lymphoprep).

Estimar el volumen total recolectado y dividir en tubos de BD de 50 ml (poner como máximo 5 ml/tubo).

Agregar preferentemente al menos 10 volúmenes de PBS frío para lavar los linfocitos.

Centrifugar a 4°C 10 min a 2000 rpm para peletear las células (**con aceleración y freno**, usar esta condición de aquí en adelante).

Desde este momento trabajar en condiciones libres de RNAsas, con guantes, tips, pipetas, eppendorf y reactivos libres de RNAsas.

Preparar un tubo falcon de 15 ml resistente a cloroformo por cada 50 ml de sangre no diluida, conteniendo 400 µl de Acetato de Na 2M pH 4 (ayuda a precipitar y permanece disuelto en la fase acuosa) + 4 ml de fenol (usar sólo la capa inferior) + 2 ml de cloroformo/isoamílico (24:1).

Luego que la centrifuga ha parado tomar los tubos y descartar el sobrenadante. Dejar escurrir sobre papel. Resuspender las células en 5 ml de PBS usando una pipeta hasta disolverlas, continuar con el siguiente tubo hasta que todas las células de una librería estén resuspendidas en 5 ml de PBS. Recolectar en un tubo BD de 50 ml. Tomar de nuevo 5 ml de PBS y volver a

levantar las células que quedan en cada uno de los tubos de la librería, agregar a los primeros 5 ml de células. Llevar a un volumen de 50 ml con PBS frío. Mezclar bien.

Dividir el volumen en 1-3 tubos, dependiendo del volumen original de sangre no diluida, de manera de tener las células de 50 ml de sangre no diluida en un tubo. Poner las células en hielo.

Centrifugar nuevamente a 4°C 10 min a 2000 rpm.

Descartar el sobrenadante cuidadosamente, poner los tubos boca abajo sobre un papel, dejar escurrir por 1 min.

Resuspender las células obtenidas a partir de 50 ml de sangre no diluida en 4 ml de *buffer* de lisis A al cual se le ha agregado previamente β-mercaptoetanol. En este paso las células comenzarán a romperse y a liberar el DNA cromosomal lo que hará al medio más viscoso. Para romper completamente las células usar una aguja 19G (5-6 veces). Para romper el DNA cromosomal se utiliza una aguja 23G o 25G otras 5-6 veces hasta que no haya fricción.

Posteriormente transferir el lisado celular de 4 ml a un tubo de 15 ml libre de RNAsas preparado con de Acetato de Na 2M que ayudará a la precipitación, fenol y cloroformo/isoamílico. Mezclar bien agitando enérgicamente sin vortexear (el vortex puede romper el RNA).

Incubar en hielo por 10 min, mezclar nuevamente por un momento.

Preparar un tubo de 15 ml resistente a cloroformo por cada 50 ml de sangre no diluida con 4 ml de fenol (saturado en agua) y 2 ml de cloroformo/isoamílico (24:1). No agregar acetato de Na (se encuentra ya en la fase superior), mezclar bien.

Centrifugar los tubos que estuvieron en hielo a 4°C 10 min a 4000 rpm.

Transferir cuidadosamente la fase superior (que contiene RNA + Acetato de Na) a los tubos preparados con fenol + cloroformo/isoamílico. Evitar tomar el material de la interfase que contiene proteínas y sales, etc.

Incubar por 10 min en hielo, agitar bien cada 2 minutos para evitar la separación.

Preparar otro tubo de 15 ml por cada 50 ml de sangre no diluida con 3 ml de etanol 100% frío. Preparar también 7 epps libres de RNAsas por librería, poner en hielo.

Centrifugar los tubos que estuvieron en hielo a 4°C 10 min a 4000 rpm.

Transferir cuidadosamente la fase superior (±4 ml) con un tip libre de RNAsas a los 3 ml de etanol frío. Mezclar manualmente y dividir en los 7 epps (1 ml en cada uno).

Guardar a -80°C al menos 30 min ya que las bajas temperaturas incrementan la precipitación del RNA.

Centrifugar los epps a 4°C 10 min a 14000 rpm, en una centrifuga de mesada.

Descartar el sobrenadante con la ayuda de un tip de 1000 µl y posteriormente con un tip de 20 µl, hacer un spin para bajar el resto que pueda haber quedado en las paredes y tomarlo con la pipeta, secar el pellet bajo flujo.

Preparar un epp con 100 µl de agua DEPC.

Disolver cada pellet en 10 µl de los 100 µl de agua DEPC.

Dejar por 2 min en la mesada para permitir que el pellet se rehidrate.

Poner a 65°C por 5-10 min, vortexear suavemente para no romper el RNA.

Centrifugar brevemente, 2 min a 14000 rpm.

Juntar todos los pellets en un eppendorf. Poner nuevamente en hielo.

Medir la concentración con nanodrop, OD₂₆₀ (la relación 260/280 tiene que ser al menos 1.7). Si hay más de una muestra, medir un blanco entre ellas. Guardar a -80°C.

C)-Preparación del cDNA desde RNA

Materiales:

- Oligo(dT)
- agua DEPC
- 5x 1st single strand *buffer*
- 0.1 M DTT
- 10 mM dNTPs: 10 mM cada uno
- Inhibidor de RNAsas HPRI (40 u/μl)
- Superscript reverse transcriptase (200 u/μl)

Protocolo

“Realizar este paso en un flujo laminar y usar material libre de RNAsas”

Síntesis de cDNA

Premix 1 para 5.5 tubos (cada tubo 23 μl)

RNA	total	x μl (40 μg)
.....		
Oligo(dT)		11 μl (5.5 μg)
.....		
Agua	DEPC	csp 126,5 μl
.....		

Mezclar bien y hacer un spin. Alicuotar de a 23 μl en tubos de 0,5 ml.

Incubar a 70°C por 10 min.

Poner inmediatamente en hielo por 5 min.

Premix 2 para 5.5 tubos (cada tubo 17 μl):

5x 1 st strand <i>buffer</i>	44 μl
0.1 M DTT	22 μl
dNTP (10 mM cada uno)	11 μl
Inhibidor de RNAsas (40 u/μl)	5.5 μl
Transcriptasa Reversa (200u/μl)	11 μl
Total.....	93,5 μl

Mezclar bien y hacer un spin. Agregar 17 μl a cada tubo, volver a hacer un spin.

Programa de PCR:

- 42°C por 1 h
- 45°C por 20 min
- 70°C por 15 min
- 4°C ON

Juntar todos los cDNA y guardar a -20°C, rotular adecuadamente como cDNA, nombre de la librería y fecha.

Día 2

D)-Primera y segunda PCR

Primera PCR

Materiales:

- Agua estéril
- *Buffer* de PCR 10x (Fast Start Taq DNA polymerase)

- dNTPs 10 mM cada uno
- *Primer call01 GTG CTG GCT GCT CTT CTA CAA GG*
- *Primer call02 GGT ACG TGC TGT TGA ACT GTT CC*
- Fast Start Taq DNA polymerase
- Tubos de PCR de paredes delgadas
- Máquina de PCR
- Centrifuga
- Gel de agarosa 1% en TBE
- TBE
- Cuba de electroforesis
- Marker
- Qiagen gel extraction and purification kit.

Protocolo:

Premix para 24 tubos

H ₂ O				954 μl	
.....					
<i>Buffer</i>	de	PCR	10x	120 μl	
.....					
dNTP	(10	mM	cada	uno)	24 μl
.....					
<i>Primer</i>		call01		(20	24 μl
μM).....					
<i>Primer</i>		call02		(20	24 μl
μM).....					
Taq					6 μl
.....					
Volumen			total		1152 μl
.....					

Alicuotar la premix en 24 tubos de PCR, 48 μl por tubo.

Templado para agregar a las alícuotas de premix:

Preparar 20 μl cDNA diluido (10 μl cDNA + 10 μl H₂O)

- Set 1: 4 tubos c/u con 1 μl de cDNA diluido
- Set 2: 4 tubos c/u con 2 μl de cDNA diluido
- Set 3: 4 tubos c/u con 2 μl de cDNA no diluido
- Set 4: 4 tubos c/u con 3 μl de cDNA no diluido
- Set 5: 7 tubos c/u con 4 μl de cDNA no diluido
- Control negativo: no agregar templado.

Si se trabaja simultaneamente con una librería no inmune y una inmune, hacer primero la PCR de la librería no inmune (para evitar contaminación con la inmune).

Programa de PCR:

- Pre-ciclo 95°C por 3 min
 - 94°C por 1 min
 - 55°C por 1 min
 - 72°C por 1 min
 - Post-ciclo: 72°C por 10 min
 - Mantener a 4°C
- } Repetir 32 ciclos

Juntar las PCRs de un mismo set.

Cargar 8 μl de cada grupo de muestras, 8 μl del control negativo y 5 μl de marker en un gel de agarosa 1%. Correr a 100V por 1 h.

Se espera ver 2 (o varios) fragmentos si las condiciones son correctas. El fragmento VH mayor es de aproximadamente 900-1000 pb, proviene de los anticuerpos convencionales; y 2-3 fragmentos más pequeños de aprox. 700 pb que provienen de los VHHs en los cuales falta el dominio CH1.

Si todas las condiciones dan buenos resultados las muestras se pueden juntar, de lo contrario trabajar unicamente con los sets que funcionaron.

Centrifugar brevemente. Guardar las muestras a -20°C correctamente rotuladas como primera PCR, nombre de la libreria y fecha. Cargar 200 µl del producto de la primera PCR en un mini gel (1% agarosa en TBE, un pocillo grande), correr 1 h a 100V. Cortar la banda correspondiente a los VHHs (aprox. 700 pb). Pesar en un eppendorf pre-pesado.

Purificar la banda usando el kit the Qiagen para extracción desde geles (usar suficientes columnas para poner como máximo 400 mg por columna).

Fundir la agarosa vortexeando adecuadamente cada 2 min. Eluir el producto de PCR en un volumen total de 180 µl de H₂O (considerando todas las columnas usadas). No eluir la columna con menos de 45 µl.

Cargar 2-4 µl del producto de PCR purificado + 8-6 µl de H₂O en un gel 1% para controlar la purificación. Medir la concentración en nanodrop.

Segunda PCR

Materiales:

- Tips libres de RNAsas
- Guantes
- dNTPs
- Agua DEPC
- Buffer de PCR 10x para Fast Start Taq
- Fast Start Taq Polimerase (5u/µl)
- dNTPs (10 mM c/u)
- **Primer A6E GAT GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGA/G GGA GG**
- **Primer 38 GGA CTA GTG CGG CCG CTG GAG ACG GTG ACC TGG GT**
- Fast Start Taq (ROCHE)
- Flujo laminar
- Máquina de PCR.

Protocolo

“Trabajar en flujo laminar y en condiciones libres de RNAsas”

Poner la mix de PCR en un epp, agregar templado a todos los tubos menos al control.

Mix para 9 tubos.

H ₂ O	358 µl
.....	
Buffer de PCR 10x	45 µl
.....	
dNTP (10 mM cada uno)	9 µl
.....	
Primer A6E (20 µM)	9 µl
.....	
Primer 38 (20 µM)	9 µl
.....	
Taq (5u/µl)	2.25 µl
.....	
Volumen total	432 µl
.....	

Mezclar y centrifugar. Poner 48 µl de mix por tubo de PCR de paredes delgadas.

Set 1: 2 tubos, c/u con 1 µl de la primera PCR purificada

Set 2: 2 tubos, c/u con 2 µl de la primera PCR purificada

Set 3: 3 tubos, c/u con 3 µl de la primera PCR purificada

Control negativo: sin templado.

Programa de PCR:

Pre-ciclo 95°C por 3 min	} Repetir 17 ciclos
94°C por 1 min	
55°C por 1 min	
72°C por 1 min	
Post-ciclo: 72°C por 10 min	
Mantener a 4°C	

Controlar que la reacción de PCR haya funcionado corriendo 8 µl de la reacción y 8 µl del control en un gel 1% en TBE.

Juntar las muestras que funcionaron y mantener a 4°C.

Escalado de la segunda PCR

La cantidad a usar del primer producto de PCR es determinada por las condiciones que funcionaron mejor, la pre-mix es adaptada convenientemente. Primer producto de PCR: número de la condición que funciona mejor (1-3 µl) multiplicado por 50, es el número de µl tomados.

Ejemplo si la tercera condición es la mejor: tomar 150 µl de la primera PCR purificada para amplificación.

Para 150 µl hacer la siguiente mix:

H ₂ O	1937.5 µl
.....	
Buffer de PCR 10x	250 µl
.....	
dNTP (10 mM cada uno)	50 µl
.....	
Primer A6E (20 µM)	50 µl
.....	
Primer 38 (20 µM)	50 µl
.....	
Taq (5u/µl)	12.5 µl
.....	
Volumen total	2500 µl
.....	

Programa de PCR:

Pre-ciclo 95°C por 3 min	} Repetir 17 ciclos
94°C por 1 min	
55°C por 1 min	
72°C por 1 min	
Post-ciclo: 72°C por 10 min	
Mantener a 4°C	

Correr 8 µl de la segunda PCR más el control negativo.

Purificar el fragmento con el kit de purificación de productos de PCR de Qiagen

E)-Purificación del producto de la segunda PCR desde gel

Materiales:

- Kit para purificación
- Eppendorfs
- Tubos de 15 ml
- Centrifuga
- Baño termostático

Protocolo:

Medir el volumen de los productos de PCR previamente juntados usando de una pipeta y agregar 5 volúmenes de *binding buffer* por volumen de producto de PCR. Ej: 2,5 ml de producto de PCR + (5 x 2,5) ml = 15 ml en total. Usar un tubo falcon de 15 ml.

Colocar el número necesario de columnas de purificación para agregar 800 µl de la solución por columna. Por ejemplo tomar 5-6 columnas y repetir el cargado de la columna 3-4 veces de la siguiente manera:

Agregar el DNA, centrifugar 1 min a máxima velocidad. Descartar el *flow-trough*, volver a colocar la columna y agregar nuevamente DNA, volver a centrifugar.... Etc., hasta que todo el volumen haya pasado por la columna.

Lavar la columna con 750 µl de *buffer* PE (al cual se le ha agregado previamente etanol), lavar 2 veces ya que se filtra una gran cantidad de producto de PCR (para eliminar sales de la reacción de PCR). Centrifugar 1 min a máxima velocidad. Descargar el *flow-trough*. Es importante hacer una centrifugación adicional por 2 min para eliminar el resto de etanol (ya que este interfiere con el *buffer* de elución y previene que el DNA sea extraído desde el filtro).

Eluir el DNA agregando 30-80 µl de *buffer* de elución o agua (según la concentración esperada). Dejar por 1 min y centrifugar 2 min a máxima velocidad. El *buffer* de elución tiene una concentración de sales diferente que despega el DNA de la columna (no funciona si hay restos de etanol).

Medir la concentración en nanodrop.

Correr un gel para comprobar que la PCR funcionó correctamente.

Marcar los tubos como segunda PCR, nombre de la librería y fecha, guardar a -20°C.

Día 3

F)-Preparación de la ligación y digestión del vector

Digerir el producto de la segunda PCR de la siguiente manera:

Producto de la 2 ^{da} PCR.....	450 µl (todo)
<i>Buffer</i> H (Roche) 10x	50 µl
PstI (Roche 40 u/ µl)	5 µl
NotI (Roche 40 u/ µl)	5 µl
Volumen total	510 µl

Mezclar brevemente y hacer un spin, incubar ON a 37°C.

Purificar el producto de digestión (usando por ejemplo Qiagen Quick Purification Kit), usar 3 columnas del kit. Eluir en un volumen final de 180 µl de H₂O (60 µl por columna).

Volver a digerir de la siguiente manera:

Producto digerido anteriormente.....	176 µl (todo)
<i>Buffer</i> H (Roche) 10x	20 µl
PstI (Roche 40 u/ µl)	2 µl
NotI (Roche 40 u/ µl)	2 µl
Volumen total	200 µl

Mezclar y hacer un spin, incubar ON a 37°C.

Purificar el producto de digestión usando el mismo kit, usar 2 columnas. Eluir en un volumen final de 100 µl de H₂O (50 µl por columna). Juntar los eluidos, centrifugar a máxima velocidad por 3 min. Medir la concentración por nanodrop. Almacenar a -20°C.

Hacer la digestión del vector en paralelo, por ejemplo para pMECS.

pMECS (stock 500 ng/µl)	120 µl (todo)
H ₂ O	680 µl
<i>Buffer</i> H (Roche) 10x	90 µl
PstI (Roche 40 u/ µl)	9 µl
NotI (Roche 40 u/ µl)	9 µl
Volumen total	900 µl

Mezclar y hacer un spin, incubar ON a 37°C.

Purificar el vector digerido usando el kit de purificación, usar 6 columnas del kit. Eluir en un volumen final de 540 µl de H₂O (90 µl por columna).

Volver a digerir de la siguiente manera:

Vector digerido anteriormente	Todo (ej. 538 µl)
<i>Buffer</i> H (Roche) 10x	60 µl
PstI (Roche 40 u/ µl)	2 µl
NotI (Roche 40 u/ µl)	2 µl
Volumen total	600 µl

Mezclar y hacer un spin, incubar ON a 37°C.

Luego agregar 2 µl de XhoI (Roche 40 u/µl), mezclar, centrifugar e incubar a 37°C por 1 h. Purificar usando el ki de purificación, usar 4 columnas del kit.

Eluir en un volumen final de 300 µl de H₂O (75 µl por columna).

Juntar los eluidos, centrifugar a máxima velocidad por 3 min antes de usar. Guardar a -20°C.

Chequear en gel, cargar 0,5 y 1 µl del producto de PCR en paralelo con 0,5 y 1 µl del vector en un gel de agarosa 1%.

Hacer la ligación:

Preparar 3 tubos con las siguientes concentraciones de pMECS e inserto (del producto de la segunda PCR).

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
Vector	4,4 µg	4,4 µg	4,4 µg
Prod. De PCR	1,7 µg	3,4 µg	5,1 µg

Ejemplo:

	H ₂ O	72.8 µl	67.8 µl
<i>Buffer</i> de ligación 10x	77.6 µl	15 µl	15 µl
pMECS (0,088 µg/µl)	50 µl	50 µl	50 µl
frag de PCR (0,348 µg/µl)	4.9 µl	9.7µl	14.7µl
T4 DNA ligasa (5 u/µl)	2.5µl	2.5 µl	2.5 µl

Total 150 μ l | 150 μ l | 150 μ l

Calcular las cantidades de acuerdo a la tabla.

Mezclar brevemente y centrifugar. Incubar a 16°C por 4 hs.

Después de la incubación agregar a cada tubo 20-25 μ l de la siguiente pre-mix: calcular la cantidad necesaria para obtener aprox. 4,4 μ g de vector y 8,4 μ g de producto de PCR. Adaptar convenientemente la cantidad de *buffer* y agua. Ejemplo:

H ₂ O			0 μ l
.....			
Buffer	de	ligación	10x 8.5 μ l
.....			
pMECS	(0.088	μ g/ μ l)	50 μ l
.....			
Fragmento de PCR	(0,348	μ g/ μ l)	4.9 μ l
.....			
T4	DNA	ligasa	(5u/ μ l) 3 μ l
.....			
Volumen		total	85 μ l
.....			

Mezclar, centrifugar e incubar a 16°C ON.

Inactivar la ligasa calentando la reacción a 65°C por 10 min.

Juntar las tres ligaciones. Agregar 100 μ l de agua estéril para llegar a un volumen de 610 μ l. Agregar un volumen de fenol (610 μ l de la fase inferior de la botella de fenol), vortexear y centrifugar a máxima velocidad por 10 min.

Transferir la fase superior a un tubo fresco.

Agregar a la fase superior el mismo volumen (600 μ l) de cloroformo:isoamílico (24:1), centrifugar a máxima velocidad por 10 min.

Transferir a otro eppendorf y centrifugar nuevamente 2-3 min a 14000 rpm, dejar en el epp los últimos μ l.

Agregar 1 volumen de fenol (aprox. 610 μ l), vortexear, centrifugar 10 min a máxima velocidad.

Transferir la fase superior a un nuevo epp.

Agregar un volumen de cloroformo:isoamílico (24:1), vortexear, centrifugar a máxima velocidad 10 min.

Transferir la fase superior a otro epp, centrifugar 2-3 min a máxima velocidad, dejar en el epp los últimos μ l.

Transferir la fase superior a un tubo de 15 ml.

Agregar 1/10 volumen de Acetato de Na 3M, pH 5.

Agregar 3 volúmenes de etanol 100%.

Mezclar y alicuotar en epps para poder centrifugar luego.

Poner por al menos 30 min a -80°C.

Centrifugar a máxima velocidad por 20 min.

Remover el sobrenadante con una pipeta y centrifugar nuevamente para ayudar a eliminar el sobrenadante.

Secar el pellet.

Disolver el pellet en un volumen final de 150 μ l de H₂O (2x 75 μ l).

Medir la concentración en nanodrop.

Rotular adecuadamente, ej. Ligación lista para transformar.

G)-Preparación de células electrocompetentes

Materiales

- Glucosa 20% autoclavada

- LB-agar: 2 botellas por librería para preparar placas de agar: 900 ml de LB-agar, 1 ml de ampicilina 100 mg/ml + 100 ml de glucosa 20%
- HEPES 1 mM pH 7 autoclavado
- Glicerol 10% (autoclavado)
- Tubos de centrifuga.
- Bacha con hielo.
- Células TG1 o WK6 frescas, preparadas no hace más de una semana.

Protocolo:

Preparar HEPES y glicerol y almacenarlos a 4°C. Poner también a esta temperatura pipetas de 10 ml, tips azules y amarillos.

Placas de LB-agar: preparar 2 botellas con 900 ml de LB-Agar, autoclavar y poner en un baño termostático hasta llegar a 55°C, agregar 100 ml de glucosa 20% y 1 ml de ampicilina (stock 100 mg/ml en etanol 70% estéril). Preparar las placas en un flujo laminar.

Sacar las burbujas haciendo rodar la botella, preparar las placas. Dejarlas secar y guardarlas a 4°C.

Preparar 2 pre-cultivos de bacterias desde colonias individuales (placa preparada hace menos de una semana). Incubar junto a un control negativo de 5 ml de LB ON a 37°C.

A la mañana siguiente diluir el cultivo 1,5 ml en 330 ml de 2xTY (autoclavado directamente en el erlenmeyer usado para crecer las bacterias). Crecer a 37°C hasta llegar a una OD₆₀₀ de 0.8-1, más o menos luego de 3.30 hs. Hacer en paralelo un cultivo de bacterias en medio 2xTY agregando una cantidad proporcional de bacterias a las bacterias del cultivo grande. Ej: 33 ml 2xTY + 150 μ l de bacterias + 33 μ l de ampicilina.

Medir la OD después de crecer el cultivo. Poner 1 ml de medio como blanco en la cubeta.

Preenfriar al menos 2 horas en hielo 7 tubos de 50 ml, HEPES y glicerol.

Distribuir los 330 ml de cultivo en los 7 tubos preenfriados, dejar en hielo completamente cubiertos al menos 1 hora.

Preenfriar la centrifuga, centrifugar por 7 min a 3300 rpm.

Desde este paso trabajar rápidamente manteniendo todo el tiempo las muestras en frío.

Remover el sobrenadante invirtiendo los tubos.

Resuspender el pellet con 4 ml de HEPES 1 mM pH 7 por tubo, pipeteando muy lentamente. Agregar HEPES 1 mM hasta llegar al volumen original del cultivo.

Centrifugar 7 min a 3300 rpm en la centrifuga fría.

Remover el sobrenadante y resuspender el pellet en 10 ml de glicerol 10% por tubo, agregar nuevamente glicerol 10% lentamente, hasta llegar a la mitad del volumen original.

Centrifugar 7 min a 3300 rpm.

Remover el sobrenadante y resuspender todos los pellets en un volumen total de 20 ml de glicerol 10%, casi sin pipetear si es posible.

Centrifugar por 6 min a 3300 rpm.

Poner las cubetas de electroporación en hielo: 17-18 cubetas (para la transformación).

Remover el sobrenadante parcialmente hasta que queden aproximadamente 5 ml.

Centrifugar 5 min a 3300 rpm.

Preparar medio SOC desde el SOB y descongelar la ligación.

Resuspender en 1 ml de glicerol 10% (para 300 ml de cultivo original) con un tip de 1 ml. Usar las células recién preparadas para transformar con el material ligado. Mantener en hielo.

H) Transformación

Materiales:

- Cubetas de electroporación y electroporador.
- Medio SOC
- Células electrocompetentes.
- Tips preenfriados azules y amarillos
- Flujo laminar.

Protocolos:

Preparar medio SOC desde medio SOB.

Medio SOB, para 100 ml:

Peptona	2 g
Extracto de levaduras	0,5 g
NaCl 1M	0,5 ml
KCl 250 mM	1 ml

Alicuotar en tubos de 25 ml y autoclavar.

Medio SOC, agregar a 25 ml de SOB:

Glucosa 20%	500 µl
SO ₄ Mg 1M	250 µl
Cl ₂ Mg 2M	125 µl

Poner las cubetas en hielo.

Programar el voltaje de la máquina a 1.8.

Secar los electrodos de aluminio con papel, poner 50 µl de las células electrocompetentes como control, hacer el electroschock, agregar inmediatamente 400 µl de SOC en la cubeta para ayudar a recuperar las bacterias de los electrodos. Lavar varias veces.

Tomar 75 µl de la ligación (correctamente homogenizada) y agregar con un tip frío al resto de las bacterias competentes (aproximadamente 1 ml).

Agregar 65 µl de la mezcla (ligación + bacterias) en la electrocubeta. Después de lavar dos veces con SOC, el medio con las células transformadas es transferido a uno o varios tubos falcon de 15 ml. Hacer esto hasta que todas las bacterias competentes estén transformadas con el producto de la ligación. El volumen total se debe escribir para calcular el tamaño de la librería.

El/los falcon y el epp con las células control se incuban a 37°C por 45 min a 1 h para permitir la transcripción del gen de la ampicilina en las células transformadas.

Después de la incubación se hacen diluciones de las células transformadas:

Dil- 1.....	900 µl de SOC o LB + 100 µl de células transformadas
Dil- 2.....	900 µl de SOC o LB + 100 µl de la dilución -1
Dil- 3.....	900 µl de SOC o LB + 100 µl de la dilución -2
Dil- 4.....	900 µl de SOC o LB + 100 µl de la dilución -3

Las diluciones -3 y -4 son plaqueadas por triplicado en placas de Agar/Amp/Glu, 100 µl por placa. El resto de las bacterias transformadas son plaqueadas en placas grandes (2ml/placa) y se incuban a 37°C ON.

Para determinar el tamaño de la librería se cuenta el número de colonias en la dilución -4 y se hace un

promedio. Si no es posible hacer esto, contar la dilución -3.

Número de colonias en la dilución $-4 \times 10^4 \times$ volumen de células transformadas

Se multiplica por 10 para calcular las colonias en 1000 µl ya que se tomaron 100 µl para plaquear.

10⁴ es el factor de dilución, por eso si se usa la dilución -3 el factor es 10³.

“El tamaño de la librería tiene que ser al menos 10⁷, de lo contrario hay que hacer una nueva transformación”

Placas grandes

Por librería se preparan 4 tubos falcon de 50 ml y 20 epps, se marcan con la fecha y el nombre de la librería. Preparar LB y glicerol 100%.

Las colonias son raspadas de las placas usando un *scraper* y se transfieren a un falcon de 50 ml poniendo las bacterias en el borde del falcon. Cuando los bordes estén llenos golpear el fondo del tubo contra la mesada para hacer bajar la pasta de bacterias.

Luego que las bacterias de todas las placas estén recolectadas, lavar una placa con una pequeña cantidad de LB (ej 2 ml/placa). Distribuir el medio en la placa, tomarla y usarla para lavar otra placa, finalmente transferirlo al falcon. Lavar las placas de esta manera de a dos. Al final llevar a un volumen de 15 ml con LB. Cerrar el tubo firmemente y vortexear hasta disolver completamente, limpiar también el *scraper*.

Cuando las células están completamente disueltas el volumen será de unos 20 ml. Agregar 5 ml de glicerol 100%.

Mezclar bien agitando varias veces y vortexear por poco tiempo.

Alicuotar en 20 epps rotulados de a 800 µl/tubo, tener la precaución de agitar frecuentemente para que las bacterias no sedimenten.

Luego de preparar los 20 epps dividir el resto de las bacterias en dos falcon de 50 ml.

10 epps + los dos falcons de 50 ml son guardados a -80°C como *back-up*. Los 10 restantes se usan para *panning*.

I) Colony PCR para determinar el porcentaje de colonias de la librería que poseen el inserto de tamaño correcto.

Materiales:

- Tubos de PCR
- Buffer 10X (con Mag⁺⁺)
- dNTPs 10 mM
- Primer R_ColonyPCR (20 µM)
- Primer F_Colony PCR (20 µM)
- H₂O
- Taq
- Placa de agar/Amp/Glu

Protocolo:

Preparar una pre-mix de 32 tubos (cada uno con 24 µl), trabajar en hielo

H ₂ O	676 µl
.....
Buffer de PCR 10x	80 µl
.....
dNTP (10 mM cada uno)	8 µl
.....

PrimerF(20 µM).....	16 µl
PrimerR(20 µM).....	16 µl
Taq(5u/µl).....	4 µl
V total	800 µl

Alicuotar de a 24 µl (31 tubos), agregar a 30 tubos una colonia de las placas en las que se hicieron las diluciones de la librería. Dejar un tubo como control negativo.

Programa de PCR:

Pre-ciclo 95°C por 3 min
 94°C por 45 seg } Repetir 28 ciclos
 55°C por 45 seg }
 72°C por 45 seg }
 Post-ciclo: 72°C por 10 min
 Mantener a 4°C

Cargar 8 µl de cada tubo en un gel de agarosa 1% in TBE, correr en paralelo 5 µl de *marker*. Correr lo suficiente para ver las diferencias de tamaño de los fragmentos.

Contar el número de colonias que contienen la banda de 700 pb, (normalmente se obtiene un valor de un 70% o superior).

Problemas y soluciones

RNA:

Baja concentración: chequear la calidad de la sangre (evitar que haya lisis), se debe ver una clara interface blanca luego de la luego de la primera centrifugación. Asegurarse de usar materiales libres de RNAsas.

cDNA:

Baja concentración: poner la muestra en hielo suficiente tiempo después de calentarla para permitir renaturalización.

Baja elución desde el gel:

Prevenir la contaminación y la alta concentración de sales usando TBE fresco en una cuba limpia, evitar la precipitación de sales. Un pico de absorción a 230 nm en lugar de a 260 nm puede indicar una excesiva cantidad de sales o impurezas.

II)-Panning de librerías inmunes

A)-Preparación de Fagos Helper, medio y soluciones de trabajo

TB (Guardar a RT)	4 litros	5 litros
KH ₂ PO ₄	9.2 g	11.5 g
K ₂ HPO ₄	50.2 g	62.7 g
Tryptona/peptona	48 g	60 g
Extracto de Levaduras	96 g	120 g
Glicerol 100%	16 ml	20 ml
Glicerol 50%	32 ml	40 ml

LB (Guardar a RT)	1 litro
Tryptona/peptona	10 g
Extracto de Levaduras	5 g
NaCl	5 g

2xTY (Guardar a RT)	1 litro	3 litros
Tryptona/peptona	16 g	48 g
Yeast	10 g	30 g
NaCl	5 g	15 g

Fagos Helper

Medir la OD₂₆₀ de los fagos diluidos 1/50 y 1/25.

Calcular la concentración= {promedio 1/50 y [(1/25)/2] OD₂₆₀} * 1.5 * 10¹²

Poner los fagos en un volumen total de 25 ml de glicerol 10%. Distribuir de a 500 µl por tubo, usar una concentración arriba de 10¹² fagos.

Stock de ampicilina (100 mg/ml):

5 g en 50 ml de etanol 70%, filtrar con filtro de 0.22 µm.

Stock Kanamicina (70 mg/ml):

3.5 g en 50 ml de agua destilada. Filtrar con filtro de 0.22 µm

IPTG 1M:

7.15 g en 30 ml de agua destilada, filtrar con filtro de 0.22 µm

TES

EDTA 0.5 mM	2 ml
Tris.HCl pH8 0.2 M	400 ml
0.5 M sacarosa	342.3 g

Mantener en botellas color caramelo a 4°C.

TES/4

250 ml de TES en 750 ml de agua.

Mantener en botellas color caramelo a 4°C.

B)-Enriquecimiento

“Trabajar en flujo laminar y usar tips con filtro. Poner los tips usados en hipoclorito de Na. Limpiar la mesada antes y después del trabajar con hipoclorito de Na”

Materiales:

- PBST: 1 litro de PBS 10x autoclavado + 5 ml de Tween 20, llevar a 10 litros con H₂O destilada.
- 2xTY
- Glucosa 20%: 20 g de glucosa en 100 ml de agua
- Agua autoclavada
- Ampicilina (100 mg/ml) y kanamicina
- Solución de TEA: 70 µl 99% trietilaminia (sigma) en 5 ml de agua pH 10.
- Tris 1M (pH 7.4)
- PEG/NaCl
- Placas maxisorb de 96 pocillos.
- Tubos epps autoclavados, pipetas y tips con filtro.
- 100 µl de la librería.
- 100 µl de antígeno blanco

Día 0

a)-Inoculación

Agregar 100 µl de la librería (o sea células que contienen el vector pMECS con VHHs insertados) a 100 ml de 2xTY con 100 µl de ampicilina + 5 ml de glucosa 20%. En caso de que haya suficiente librería el contenido de un epp se agrega a 300 ml de 2xTY con 300 µl de ampicilina + 15 ml de glucosa 20%.

Crece a 37°C, 225 rpm por 2-3 hs (fase exponencial). Durante esta fase las bacterias contienen el F-pilus al cual los fagos serán atraídos.

Agregar aprox. 10¹² fagos M13K07, mezclar manualmente.

Incubar 20-30 min a RT sin agitar para permitir que los fagos inyecten el vector con el VHHs por medio del F-pilus.

Dividir en 2 tubos de 50 ml por cada 100 ml de cultivo celular infectado y centrifugar 10 min a 2700 rpm a 4°C.

Remover el sobrenadante y colocarlo en hipoclorito de Na.

Resuspender el pellet en 1 ml de los 300 ml de 2xTY + 300 µl de ampicilina + 300 µl de kanamicina del erlenmeyer.

Incubar en 300 ml de medio, ON a 37°C a 225 rpm.

b)-Preparación para *panning*

☼ Cubrir los *pocillos* de una placa maxisorb de 96 con 100 µl de antígeno por *pocillo*, incubar ON a 4°C. Dejar un *pocillo* sin antígeno ubicado lejos de los *pocillos* con antígeno para evitar contaminación y que permitirá cuantificar la cantidad de fagos unidos de manera inespecífica.

Plaquear células TG1 o WK6 en una placa de agar. Incubar ON a 37°C.

Día 1/2/3 (primera/segunda/tercera ronda de *panning*)

c)-Preparación de fagos y *panning* (selección de fagos que poseen VHHs con buena selectividad hacia los antígenos plaqueados)

☞ Centrifugar el cultivo del día 1 por 30 min a 8000 rpm 4°C.

Inocular una colonia de bacterias en 10-15 ml de LB por duplicado en tubos de 50 ml, se van a usar con los fagos eluidos. Crecer agitando a 37°C por 2-4 hs (fase exponencial).

☼ Remover la solución de *coating* que se dejó ON.

☼ Lavar los *pocillos* dos veces con PBST.

☼ Bloquear todos los *pocillos* con 200 µl de solución de bloqueo, 1h a RT.

☞ Trabajar en flujo laminar. Tomar los tubos de la centrifuga. Poner en tubos de 50 ml 4/5 (ej 40 ml) de sobrenadante con 1/5 (ej. 10 ml) de PEG/NaCl en hielo. Mezclar bien invirtiendo 4-5 veces. Mantener en hielo 30 min.

Centrifugar los tubos de 50 ml por 30 min a 4000 rpm 4°C.

Bajo flujo: poner el sobrenadante en hipoclorito de Na, poner los tubos boca abajo en papel, resuspender el pellet blanco de fagos en 500 µl de PBS por cada tubo de 50 ml, juntar las alícuotas y luego volver a lavar los tubos con 500 µl en el orden opuesto. Evitar la formación de espuma, transferir a un epp estéril. Centrifugar los epps en una centrifuga de mesada 2 min a 14000 rpm para precipitar el resto de los componentes bacterianos. Medir la OD si se tienen dudas de la concentración (una OD₂₆₀ de 1 = 3x10¹⁰ partículas/ml). Los fagos están ahora listos para la selección del antígeno.

☼ Lavar la solución de bloqueo 5 veces con PBST.

☼ **Panning:** agregar 10¹¹ fagos conteniendo los VHHs en su extremo a los *pocillos* “+” y “-” de la placa ya bloqueada, usualmente se agregan 100 µl pero depende de la concentración medida. Incubar al menos 1 h a RT para permitir el *binding* específico entre el antígeno y los VHHs-fagos. Tapar los *pocillos* para evitar contaminación del laboratorio con virus. Los 800 µl restantes son rotulados con el nombre de la librería y la fecha y se guardan a -80°C.

Después de permitir la unión a los antígenos por 1 h, remover las partículas de fagos no unidas descartándolos en el agua con hipoclorito.

Lavar 10 veces con PBST en la primera ronda de *panning*, 20-25 veces en la segunda y 20 veces en la tercera para eliminar los fagos pegados inespecíficamente. En el *pocillo* blanco estos lavados deberían eliminar todos los fagos.

Elución por pH: eliminar la unión entre el antígeno y los fagos pegados específicamente agregando 100 µl de solución de TEA pH 10. Después de un máximo de 10 min de incubación transferir los fagos disociados a un epp estéril que contiene 100 µl de TRIS 1M pH 7.4 o 8.4 para neutralizar la solución con los fagos eluidos (para evitar perder la infectividad de las muestras).

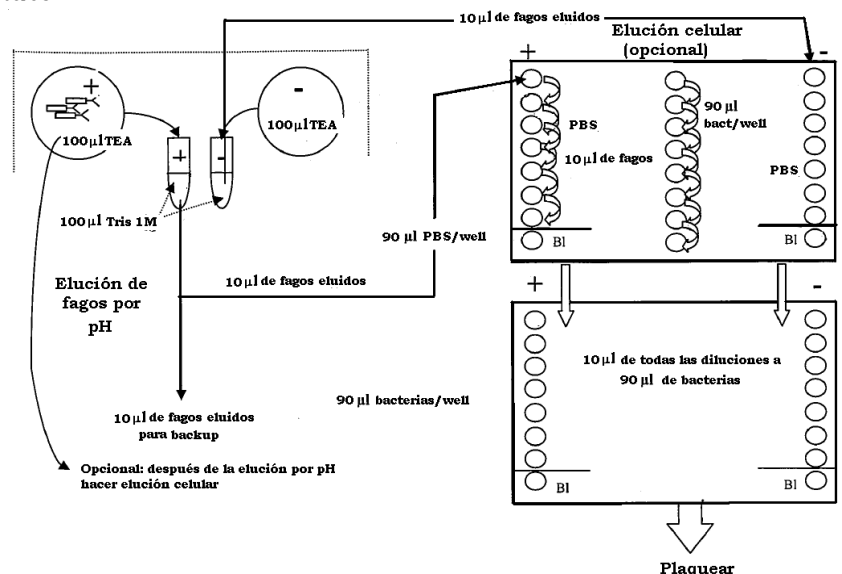
En este punto se pueden guardar las muestras por el fin de semana poniéndolas en un *freezer* de -80°C.

Preparar durante los 10 min de la incubación la “elución celular” y el “enriquecimiento” en placas de 96 *pocillos* en forma de U con tapa, rotular como “número de ronda de *panning*, nombre del antígeno y fecha”. Distribuir las muestras de la siguiente manera:

Elución por pH: llenar dos de las columnas externas de la placa con 90 µl de PBS por *pocillo*. Opcionalmente las filas del medio son llenadas para la elución celular con 90 µl de células TG1 o WK6. La elución celular se hace después de la elución por pH, se para el shock de pH lavando una vez con PBS o TRIS 1M. Se ponen 200 µl de bacterias en el *pocillo* “+” y se deja media hora a RT. Se cubre con una tapa para evitar contaminación. De esto se toman 10 µl para el primer *pocillo* de la elución celular.

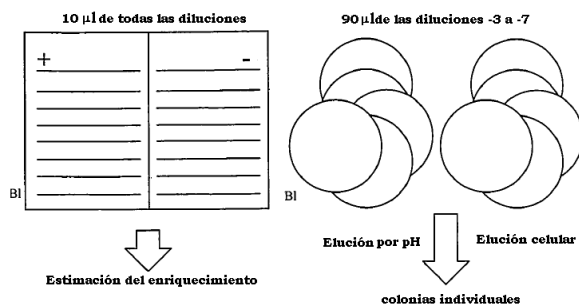
Placa de dilución de células TG1 o WK6: llenar las 2 columnas externas de la placa de 96 con 90 µl de células por *pocillo*.

Guardar 10 µl de los fagos no amplificados como *backup*. Agregar 10 µl de los fagos eluidos de los *pocillos* cubiertos con antígenos (+) a la parte superior de la primera columna. Agregar en paralelo 10 µl del *pocillo* blanco (-) en el primer *pocillo* de la última columna. Hacer diluciones 1/10 transfiriendo 10 µl del *pocillo* A al B. Mezclar bien unas 10 veces y transferir 10 µl al *pocillo* C, así sucesivamente. Dejar el último *pocillo* como blanco. Cambiar los tips después de cada dilución.



Agregar 10 µl de cada dilución de fagos a los 90 µl de células TG1 o WK6 de la placa de dilución de células. Dejar infectar las células TG1 con los fagos por al menos media hora a 37°C sin agitación. Plaquear 10 µl de cada dilución en una placa de agar/LB cuadrada con ampicilina y 1% de glucosa. Todas las diluciones + y - son aplicadas de una vez con una pipeta multicanal en una placa cuadrada de 10x10 cm distribuyendo la suspensión de células en la placa a una distancia de 3-4 cm moviendo la pipeta desde la izquierda hacia la derecha y vaciando lentamente el contenido de los tips. Dejar secar la placa y ponerla a 37°C.

En paralelo plaquear los 90 µl remanentes (diluciones -3 a -7) tanto de las eluciones de pH como de la elución celular (opcional) en placas de Petri con agar/LB, ampicilina y glucosa. Dejar secar e incubar a 37°C.



C)-Re-amplificación (preparación para la siguiente ronda de panning)

Agregar el resto de los fagos eluidos de la elución por pH, o sea unos 180 µl a 2 ml de células TG1 o WK6 que se encuentran en fase de crecimiento exponencial en un tubo de 15 ml. Se puede preparar esto mientras se preparan las TG1 para la placa de dilución. Incubar por al menos 30 min hasta 1 hora a 37°C, sin agitación para permitir la infección de las bacterias con los fagos eluidos.

Agregar (opcionalmente, 190 µl de la elución celular) 8 ml de 2xTY/amp/glu (100 ml de 2xTY + 100 µg/ml Amp + 5 ml de glucosa 20%) a los 2 ml de la suspensión de células TG1 infectadas. Incubar y agitar a 37°C por al menos 15-20 min (máximo 30).

Agregar $<10^7$ fagos helper M13K07 (7 a 10 µl) al tubo falcon y mezclar.

Incubar 20 min sin agitación a RT.

Centrifugar 10 min a 2000 rpm para remover glucosa residual.

Resuspender el pellet celular en 1 ml de 2xTY y poner a crecer en un erlenmeyer con 300 ml de medio con 300 µl de ampicilina y 300 µl de kanamicina.

Incubar ON a 37°C y a 225 rpm para amplificar las partículas de fagos eluidos.

D)-ELISA de fagos enriquecidos

El fin es controlar cuan fuerte fue el enriquecimiento mediante ELISA, esta técnica es más precisa que el plaqueo de diluciones en una placa cuadrada.

Materiales:

- Placas de 96 pocillos de fondo chato
- PBS
- PBDT (PBS + 0,05% Tween 20)
- ABTS/peróxido de hidrógeno
- Leche para bloqueo: 1% en PBS
- Antígeno como el usado para panning

Protocolo:

Día 0

Cubrir 4/5 pocillos (librería de fagos, fagos de la 1^{ra} ronda, 2^{da} ronda, 3^{ra} ronda y 4^{ta} ronda) en una placa de 96 pocillos con 1 µg/ml de antígeno. Cubrir con parafilm y poner ON a 4°C (opción 1).

Si se cubre la placa con pequeños péptidos: cubrir de acuerdo al protocolo de ELISA para péptidos biotinilados (opción 2).

Día 1

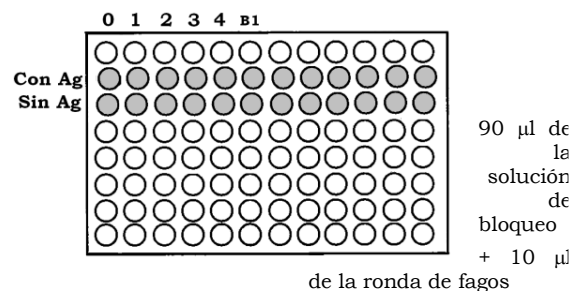
Si se cubren los pocillos como en la opción 1:

Remover el coating ON. Lavar 3 veces con PBST.

Bloquear los pocillos "+" y "-" con 200 µl de solución de bloqueo a RT por 1 h.

Sacar el bloqueo y lavar 3 veces con PBST.

Poner 90 µl de la solución de bloqueo y agregar 10^{10} fagos de la librería (ronda 0), ronda de panning 1, 2, 3 a los pocillos cubiertos y los no cubiertos



Si se cubren las placas como en la opción 2 remover el coating justo antes de poner los fagos, no es necesario volver a bloquear.

Lavar 3 veces con PBST.

Poner 90 µl de caseína 0.1% en cada pocillo y agregar 10^{10} fagos de la librería (ronda 0), ronda de panning 1, 2, 3 a los pocillos cubiertos y los no cubiertos.

-Para ambas opciones:

Dejar que los fagos se unan por 1h a RT, cubrir con una tapa bajo flujo.

Lavar 5 veces con PBST

Agregar 100 µl por pocillo de una dilución 1/2000 de anti-M13 HRP.

Dejar por 1h a RT.

Lavar 5 veces con PBST.

Revelar el ELISA.

E)-Screening de colonias únicas a través de ELISA extractos periplasmáticos

El fin es encontrar buenos binders para el antígeno plaqueado expresado por colonias únicas de las diferentes rondas de panning. Esto se puede visualizar por ELISA ya que los extractos periplasmáticos dan señal más fuerte en un pocillo cubierto con el antígeno que uno no cubierto (al menos dos veces la señal del background).

Materiales:

- TB + ampicilina 100 µg/ml
- Pipetas de 30 ml
- Pipetboy

- Placas de 96 chatas
- Placas de 24 pocillos
- PBS
- PBST
- TES y TES/4
- Buffer de blot
- Fosfatasa alcalina 2 mg/ml
- Anti -HA mAb 1/2000
- Anti mAb (PBS) AP conjugada
- Leche para bloqueo.

Protocolo:

Tratar de trabajar lo más rápido posible para tener tiempos de reacción iguales para los pocillos con antígenos y los sin antígenos. Tratar de mantener la temperatura baja tomando los reactivos desde la heladera justo antes de usarlos, poner las células a baja temperatura, etc.

Día 0

Llenar la placa de 24 pocillos con 1 ml de TB + ampicilina usando una pipeta de 30 ml.

Tomar una colonia individual desde la placa de *panning*, poner en una placa nueva con ampicilina y poner el tip en el pocillo correspondiente de la placa.

Crece a 37°C mientras se agita a 250-300 rpm (controlar visualmente, el tiempo de crecimiento es de unas 5 hs).

Agregar 10 µl del stock 100 mM de IPTG (concentración final 1mM) bajo flujo laminar. Poner a 37°C luego a 28°C ON con agitación.

Cubrir una placa de ELISA con antígenos a una concentración de 1 µg/ml y poner a 4°C.

Día 1

Centrifugar las placas de 24 pocillos por 12-13 min a 3200 rpm a 4°C para peletear las células.

Vaciar la placa de ELISA y lavarla 1-3 veces suavemente para no remover el antígeno con PBST.

Bloquear la placa de ELISA con 200 µl de solución de bloqueo 1 h a RT.

Vaciar nuevamente las placas con células, dejar escurrir boca abajo hasta que las células se empiecen a deslizar (se empieza a ver un agujero en la base)

Disolver el pellet en 200 µl de TES, poner en el shaker por 30 min a 4°C, 250-300 rpm.

Agregar 300 µl de TES/4 sobre el TES anterior.

Mantener a 4°C por 1 h en el shaker a 250-300 rpm.

Centrifugar las células 13-15 min a 3200 rpm a 4°C. El sobrenadante es el extracto periplasmático que contiene los VHHs.

Lavar las placas de ELISA bloqueadas 3 veces con PBST.

Poner 100 µl del extracto periplasmático y agregárselo a los pocillos bloqueados tanto de los cubiertos con antígenos como en los no cubiertos.

Poner 1 h a RT.

Lavar 5 veces con PBST.

Agregar 100 µl/pocillo de la dilución 1:2000 de anti-HA mab, dejar 1 h a RT.

Lavar 5 veces con PBST.

Agregar 100 µl/pocillo de una dilución 1:2000 de anti-mAb-AP.

Incubar 1 h a RT y lavar 5 veces con PBST.

Revelar el ELISA con 2mg/ml de sustrato.

F)-Colony-PCR y digestión con Hinf I de las colonias individuales

El fin es testear los *binders* que dieron positivo por ELISA con Hinf para poder separar grupos de *binders* con secuencias probablemente idénticas para reducir los costos de secuenciación. De cada grupo algunos productos de PCR purificados de una concentración mínima de 10 ng/µl se mandan a secuenciar.

Colony-PCR

Materiales:

- Tubos epps y tips
- Máquina de PCR
- Incubadora de 37°C
- Buffer 10 x (+Mg)
- 10 mM dNTPs
- 20 µM RP
- 20 µM GIII
- Agua estéril
- Taq
- Placas de agar + ampicilina

Protocolo:

Preparar una mix para el número total de colonias a ser analizadas, trabajar en hielo.

Poner por muestra:

H ₂ O	84 µl
Buffer de PCR 10x	10 µl
dNTP (10 mM cada uno)	1 µl
PrimerColonyR(20µM).....	2 µl
PrimerColonyF(20 µM).....	2 µl
Taq (5u/µl).....	0.3 µl
Volumen total	100 µl

Vortexear, Pipetear 96-97 µl en cada tubo de PCR, el resto se usa para control negativo.

Poner con un tip amarillo una parte de la colonia a ser digerida en una placa de LB-agar enumerada, el resto del tip es puesto en un tubo de PCR.

Dejar el tip en el tubo por 15 min. Después de girar el tip un par de veces descartarlo. Cerrar todos los tubos que quedan listos para la PCR.

Programa de PCR:

Pre-ciclo 95°C por 3 min	} Repetir 32 ciclos
94°C por 45 seg	
55°C por 45 seg	
72°C por 45 seg	
Post-ciclo: 72°C por 10 min	
Mantener a 4°C	

Poner la placa de agar en la estufa a 37°C.

Preparar un gel de agarosa 1% para chequear la reacción de PCR. Cargar 10 µl de muestra.

Hacer una restricción con Hinf si hay más de 20 muestras para analizar.

Análisis con HinfI:

El fin es hacer una subselección desde un gran grupo de clones.

Calcular la mix para el número de muestras: 1,1 µl de buffer R 10x (fermentas) y 0.5 ml de Hinf (10 u/µl).

Llenar los epps con 1.6 µl de la mix, poner 10 µl de la reacción de la colony PCR, previamente chequeada en un gel de agarosa 1%.

Incubar 1 h a 37°C. Después de la digestión cargar 10 µl de la muestra en un gel.

Agrupar las muestras en 4-5 grupos de acuerdo al patrón de digestión y preparar las muestras para secuenciación.

Exosap-it:

El fin es de limpiar los clones seleccionados para mandar a secuenciar.

10 µl del producto de PCR = 3 µl (mix 2 ml SAP + 1 µl EXOI, *E.coli*)

OR2.6 µl (comercialmente disponible) exosap-it

Programa:

37°C por 15 min

80°C por 15 min

Expresión y purificación de VHHs

Día 1

Inocular 10-20 ml de LB/Amp (100 µg/ml) + glucosa 1% con una colonia transformada recientemente.

Incubar a 37°C con agitación a 200-250 rpm (pre-cultivo).

Día 2

El medio ideal para la expresión de VHHs es TB:

Llenar un erlenmeyer de 1 L con 330 ml de TB y autoclavar. Se recomienda no autoclavar KH_2PO_4 y $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, estas soluciones se preparan, se filtran y se agregan al medio recientemente autoclavado.

Para obtener suficiente VHHs para posteriores análisis, se recomienda cultivar al menos un litro de cultivo por VHH (3 botellas), el rendimiento depende de cada clon, generalmente es entre 1 y 15 mg/L.

Agregar 1 ml de pre-cultivo a 330 ml de TB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina, 2 mM de MgCl_2 y 0,1% de glucosa, crecer a 37°C con agitación a 200-250 rpm hasta alcanzar una OD_{600} de 0,6-0,9.

Inducir la expresión del VHH con IPTG a una concentración de 1 mM.

Incubar ON a 28°C con agitación (16-18 hs).

Día 3

Extracción del VHH desde el periplasma de *E.coli*.

Soluciones necesarias:

- TES: 0,2 M
- TES/4: TES diluido 4 veces en agua.

Centrifugar los cultivos inducidos ON 8 min a 8000 rpm.

Resuspender el pellet de un litro de cultivo en 12 ml de TES usando una pipeta, agitar 1 hora en hielo.

Por cada 12 ml de TES usado, agregar 18 ml de TES/4 en incubar nuevamente en hielo por 1 hora con agitación.

Centrifugar por 30 min a 8000 rpm a 4°C.

Transferir el sobrenadante a tubos falcon (el sobrenadante contiene las proteínas extraídas del espacio periplásmico).

Purificación por IMAC

Soluciones necesarias:

- HIS-select (SIGMA)
- PBS
- Acetato de Na 50 mM pH 4,6

Equilibrar las resinas His-select con PBS: por cada periplasma derivado de un litro de cultivo agregar 1 ml de resina (aproximadamente 2 ml de solución His-select) a un tubo falcon de 50 ml, agregar PBS hasta un volumen final de 50 ml y mezclar.

Centrifugar a 2000 rpm por 2 min. Descartar el sobrenadante.

Lavar la resina con PBS de la misma manera dos veces más.

Agregar el extracto periplásmico a la resina e incubar 30 min a 1 hora a RT con agitación suave (incubaciones más largas podrían resultar en *binding* no específico).

Cargar la muestra en columnas PD-10 con un filtro en la base (GE healthcare, cat 17-0435-01).

Lavar con 50 a 100 ml de PBS (50 a 100 ml de PBS por 1 ml de resina usada).

Eluir 3 veces, cada vez con 1 ml de PBS/0,5 M imidazol por cada 1 ml de resina usada (para una eficiente elución resuspender las bolitas y dejar ON a 4°C con la base de la columna cerrada).

Dializar ON a 4°C contra PBS (*cut off* 3500 daltons) para remover el imidazol. Para una diálisis eficiente cambiar el *buffer* de diálisis (PBS) 2-3 veces.

Nota: en lugar de eluir con imidazol, los NBS unidos pueden ser eluidos con 10 ml de Acetato de Na 50 mM pH 4,6. En este caso hay que neutralizar los VHHs eluidos inmediatamente con 1M Tris pH 8,0 y no es necesario hacer diálisis.

La cantidad de proteína puede ser estimada en este punto midiendo las muestras eluidas a OD_{280} . El coeficiente extinción de cada clon puede ser determinado por herramientas proParam analizando la estructura primaria de los VHHs en el servidor proteómico Expasy. Purificaciones posteriores de los VHHs pueden llevarse a cabo por diferentes métodos, ej:

-si es necesario, concentrar la muestra (Vivaspin *cutoff* 5000 MW) centrifugando a 2000 rpm a 4°C hasta obtener un volumen apropiado para cargar en una columna Superdex 75 16/60 (máximo 4 ml).

-Cargar la muestra (concentrada) en una columna Superdex 75 16/60 equilibrada con PBS.

Combinar las fracciones y medir a OD_{280} para cuantificar (en general los NBS se eluyen luego de 85-95 minutos cuando se corre a 1 ml/min). Concentrar si es necesario, almacenar las alícuotas a -20°C a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml.