



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE LA MICROALGA VERDE  
*Chlamydomonas reinhardtii* CON EL GEN *mNb6-tri* QUE CODIFICA  
PARA UN NANOANTICUERPO TRIVALENTE QUE NEUTRALIZA AL  
VIRUS SARS-CoV-2**

Tesis que presenta

**SANDY GISELLE REYES SOLIAN**

En opción al título de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2022



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



### RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Sandy Giselle Reyes Solian titulado Transformación genética de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* con el gen *mnb6-tri* que codifica para un nanoanticuerpo trivalente que neutraliza al virus SARS-CoV-2 **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** fue realizado en la Unidad de Biotecnología, Laboratorio de Biotecnología de Microalgas y Cultivos Tropicales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de los Dres. Santy Peraza Echeverría y Carlos Alberto Puch Hau, dentro de la opción de Ciencias Biológicas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

---

Dra. Cecilia Hernández Zepeda  
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a de de 2022

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



---

Sandy Giselle Reyes Solian

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado Transformación genética de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* con el gen *mnb6-tri* que codifica para un nanoanticuerpo trivalente que neutraliza al virus sars-cov-2 en el que participé bajo la asesoría de los Dres. Santy peraza Echeverria y Carlos Alberto Puch Hau.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis asesores el Dr. Santy Peraza Echeverria y el Dr. Carlos Alberto Puch Hau, por su guía a través del tiempo transcurrido durante la maestría.

A mis sinodales del comité tutorial, el Dr. Santy Peraza Echeverria, Dr. Carlos Alberto Puch Hau, Dra. Ileana Echevarría Machado y Dr. Gabriel Lizama Uc, por el tiempo invertido en la lectura de esta tesis, así como sus aportes a lo largo de mis exámenes tutoriales.

A la Dra. Virginia Herrera Valencia por su asesoría respecto a diversos temas que se presentaron en la realización del proyecto, así como sus interesantes cuestionamientos durante mis seminarios de investigación que me ayudaron a enriquecer este proyecto de investigación por compartir sus conocimientos conmigo.

A la técnica académica Q.B.A Ileana C. Borges Argáez por compartirme su conocimiento respecto a la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* y haberme apoyado con las dudas que tuve a lo largo de mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. Marta Guadalupe Lizama García por su colaboración en diversas de las técnicas presentadas en esta tesis de maestría, y amablemente apoyarme con las dudas que surgían a lo largo del proyecto.

A la técnica académica Q.B.B. Leticia Peraza Echeverria por su colaboración en el desarrollo de la técnica Southern Blot que fue de gran relevancia para identificar líneas transgénicas en este proyecto.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán por haberme permitido desarrollar el proyecto de investigación presentado en esta tesis a través del uso de sus instalaciones, equipos de laboratorio y el conocimiento de sus docentes, pero, sobre todo por darme la oportunidad de formar parte de su prestigiado posgrado. Me permito agradecer, en especial al Laboratorio de Biotecnología de Microalgas y Cultivos Tropicales.

Al Departamento de Recursos del Mar, CINVESTAV, Unidad Mérida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca de maestría No. 1077225, y por el financiamiento del proyecto No. A1-S-36206. que permitió la realización de esta tesis.

## **DEDICATORIAS**

A mi familia, por su amor y apoyo incondicional durante toda mi vida; por siempre motivarme a seguir mi pasión no importa que tan lejos este. Gracias por brindarme las herramientas para mantenerme firme en el camino para lograr mis metas de vida, en especial, a mi abuelita que, felizmente me vio iniciar mi maestría y aunque ya no se encuentra con nosotros se que estaría muy orgullosa de verme cumplir otra de mis metas.

A mis amigas, por brindarme su cariño y por siempre recordarme lo valiosa que soy en los momentos en los que se me olvida.

---

---

## INDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPITULO I</b> .....	<b>3</b>
<b>1. ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
1.1 Generalidades de SARS-CoV-2.....	3
1.1.1 Estructura.....	5
1.1.2 Mecanismo de infección .....	6
1.2 Anticuerpos.....	7
1.3 Nanoanticuerpos.....	10
1.3.1 Propiedades de los nanoanticuerpos.....	11
1.3.2 Mecanismo de producción.....	13
1.3.3 Aplicaciones de los nanoanticuerpos en la medicina. ....	15
1.3.4 Nanoanticuerpos contra SARS-CoV-2.....	17
1.3.5 Nanoanticuerpo mNb6-tri. ....	20
1.4 Sistemas de expresión de proteínas recombinantes.....	22
<b>JUSTIFICACION</b> .....	<b>26</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>27</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>27</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>27</b>
<b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>28</b>
<b>CAPITULO II</b> .....	<b>29</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
2.1 Cepa y cultivo de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	29
2.1.1 Conteo celular de <i>C. reinhardtii</i> .....	29
2.2 Vectores de transformación. ....	30
2.2.1 Vector <i>pmNb6tri</i> .....	30
2.2.2 Vector <i>aadA</i> .....	31
2.3 Verificación de las construcciones de expresión .....	32
2.4 Transformación del núcleo de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	32
2.5 Extracción de ADN genómico. ....	33
2.6 Diseño de iniciadores.....	34
2.7 Amplificación de mNb6tri por PCR.....	34
2.8 Detección de transgen <i>mNb6tri</i> en líneas de <i>C. reinhardtii</i> .....	35

---

---

<b>CAPITULO III.....</b>	<b>36</b>
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
3.1. Clonación de las construcciones <i>mNb6tri</i> y <i>aadA</i> en el plásmido pUC18.....	36
3.2 Verificación de los vectores de transformación pmNb6tri y aadA. ....	37
3.2.1 Vector aadA. ....	37
3.2.2 Vector <i>pmNb6tri</i> .....	38
3.3 Transformación de <i>C. reinhardtii</i> mediante biobalística.....	39
3.3.1 Tranformación de <i>C. reinhardtii</i> con <i>aadA</i> .....	39
3.3.2 Transformación de <i>C. reinhardtii</i> con <i>pmNb6tri</i> .....	40
3.3.3 Confirmación de la transformación de <i>C. reinhardtii</i> .....	41
3.4. Análisis de colonias transformadas mediante Southern blot. ....	42
<b>CAPITULO IV. ....</b>	<b>43</b>
<b>4.DISCUSIÓN.....</b>	<b>43</b>
<b>CAPITULO V .....</b>	<b>46</b>
<b>5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>46</b>
5.1 CONCLUSIONES .....	46
5.2. PERSPECTIVAS .....	46
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>47</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>60</b>
<b>I. MEDIO DE CULTIVO TAP.....</b>	<b>60</b>
<b>I. MEDIO DE CULTIVO LB.....</b>	<b>60</b>

---

---

## LISTADO DE FIGURAS.

<b>Figura 1. 1</b> A) Figura representativa 3D del virus SARS-CoV-2.....	5
<b>Figura 1. 2</b> Mecanismo de infección de SARS-CoV-2 en la célula huésped.....	6
<b>Figura 1. 3</b> Representación del mecanismo de acción del sistema inmune contra antígenos....	7
<b>Figura 1. 4</b> Estructura de un anticuerpo convencional. ....	8
<b>Figura 1. 5</b> A) Estructura de un anticuerpo de cadena pesada de camélido .....	10
<b>Figura 1. 6</b> Diferentes configuraciones en las que se pueden encontrar los nanoanticuerpos..	11
<b>Figura 1. 7</b> Diferentes adaptaciones de los nanoanticuerpos.....	13
<b>Figura 1. 8</b> Esquema donde se representa el proceso de producción de nanoanticuerpos a partir de la inmunización de camélidos .....	14
<b>Figura 1. 9</b> A) Representación gráfica del nanoanticuerpo mNbb6-tri.....	21
<b>Figura 1. 10.</b> Figura esquemática de la microalga verde <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	<b>¡Error!</b>
<b>Marcador no definido.</b>	
<b>Figura 1. 11</b> Estrategia experimental empleada para la transformación genética de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	28
<b>Figura 2. 1</b> Esquema gráfico del ensamblado de las construcciones de expresión mNb6tri y aadA para dar lugar al plásmido pmNb6tri..	31
<b>Figura 2. 2</b> Esquema de la construcción de expresión aadA. ....	31
<b>Figura 3. 1</b> Resultados de la clonación de las construcciones de expresión de mNb6-tri y aadA..	36
<b>Figura 3. 2</b> Verificación de la construcción de expresión aadA en el plásmido pUC18. ....	37
<b>Figura 3. 3</b> Verificación del ensamblado de las construcciones de expresión pmNb6tri y aadA en el plásmido pUC18.....	38
<b>Figura 3. 4</b> Transformación de <i>C. reinhardtii</i> con el gen aadA utilizando la técnica de biobalística.....	39
<b>Figura 3. 5</b> Transformación de <i>C. reinhardtii</i> con el vector pmNb6tri utilizando la técnica de biobalística.....	40
<b>Figura 3. 6</b> ADNg y confirmación de colonias transformadas con el casete de expresión pmNb6tri.....	41
<b>Figura 3. 7</b> Evaluación de la incorporación del transgen mNb6tri en el genoma de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . ....	42

---

---

**LISTADO DE TABLAS.**

**Tabla 1. 1** Nanoanticuerpos con diferentes aplicaciones médicas .....15

**Tabla 1. 2** Nanoanticuerpos contra el virus SARS-cov-2 causante de la enfermedad COVID 19.  
.....17

**Tabla 1. 3** Comparación de las características entre diferentes plataformas de expresión de  
proteínas recombinantes. ....23

---

---

## RESUMEN

La pandemia del COVID-19 ocasionada por el virus del SARS-CoV-2, ha provocado un gran número de pérdidas humanas y afectado la economía mundial. A pesar de que inicio en marzo del 2020, sigue siendo una pandemia en curso con casos que siguen en aumento. El desarrollo de tecnologías para la producción rápida de vacunas (como las basadas en el ARNm y adenovirus) y los anticuerpos monoclonales, han permitido reducir el número de defunciones y la gravedad de los síntomas. En paralelo, han surgido los nanoanticuerpos como una alternativa terapéutica para el tratamiento de la COVID-19. Breve descripción de un nanoanticuerpo. Uno de los casos más notables por su efectividad es el nanoanticuerpo trivalente *mNb6-tri* que tiene la capacidad de neutralizar al virus del SARS-CoV-2. La búsqueda de opciones para la producción de este nanoanticuerpo a bajo costo y a escala industrial, es un requerimiento que será indispensable para su producción masiva y adquisición accesible por parte de la población. En este sentido, la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* se ha usado con éxito para producir proteínas terapéuticas funcionales a bajo costo, por lo que resulta una gran opción para producir nanoanticuerpos contra el SARS-CoV-2. En este trabajo se planteo como objetivo principal la transformación genética del genoma de *C. reinhardtii* con un cassette de expresión que contiene al gen *mNb6tri* en configuración trivalente y el promotor *RIA3/PROMC* inducible por salinidad. Los resultados obtenidos revelaron la integración exitosa del transgen en células de *C. reinhardtii* y se identificaron por southern blot seis diferentes líneas transgénicas; interesantemente, una de ellas presento un alto número de copias en su genoma. El desarrollo de estas líneas transgénicas nos permitiría analizar posteriormente los niveles de expresión de *mNb6tri* y su afinidad de unión al virus del SARS-CoV-2.

---

---

---

## ABSTRACT

The pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus has generated millions of human losses and significantly affected the world economy and the lifestyle to which society was accustomed, however, thanks to technological advances it has been possible to obtain treatments to reduce the severity of the symptoms caused by the virus. Among these are mainly RNA vaccines and monoclonal antibody cocktails that have proven to be quite useful in treating the disease, another example being nanoantibodies derived from camelids, whose physical and chemical characteristics give them advantages over conventional antibodies, in addition, their production is less expensive. One of the most prominent nanobodies recently developed is *mNb6tri* which has the ability to neutralize the SARS-CoV-2 virus. On the other hand, the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* has been successfully used to produce functional therapeutic proteins at low cost, making it a great option for producing nanoantibodies against SARS-CoV-2. Through transformation by biobalistics, in this project the genome of *C. reinhardtii* was genetically modified with an expression cassette containing the *mNb6tri* gene in trivalent configuration and for its expression the promoter inducible to salinity *RIA3/PROMC*. 6 transgenic lines were identified through southern blot, confirming the integration of transgene in *C. reinhardtii* cells. The largest number of copies was identified in the L2 line, however, the level of expression of *mNb6tri* in the transgenic lines will be analyzed later by RT-qPCR as well as the binding capacity of recombinant *mNb6tri* to its target by ELISA.

---



## INTRODUCCIÓN

El síndrome respiratorio agudo severo por Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), es capaz de infectar al ser humano ocasionando una enfermedad definida como “COVID-19”. Esta enfermedad ha infectado a 585.1 millones de personas y ocasionado la muerte de 6.4 millones de personas a nivel mundial. En México se han registrado 6.8 millones de personas infectadas y la muerte de 328,437 (WHO, 2022). La alta tasa de infección ha ocasionado el surgimiento de una serie de variantes clasificadas como Variantes de preocupación (“VOC”, por sus siglas en inglés) donde se encuentran las variantes Omicron (B.1.1.529), Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1) y Delta (B.1.617.2), que han demostrado su aumento en la capacidad de transmisión, de virulencia y/o han presentado un cambio en la clínica de la enfermedad (WHO, 2022). Actualmente, las alternativas terapéuticas disponibles para hacer frente a esta pandemia son las vacunas, los anticuerpos monoclonales, así como, la píldora PAXLOVID desarrollada por Pfizer, para uso en casos de emergencia (Díaz & Toro, 2020; Pfizer, 2022). Sin embargo, la aparición constante de nuevas mutaciones podría dar lugar a una mayor transmisibilidad y potencial de resistencia a los métodos terapéuticos disponibles (Callaway, 2022). En este sentido, la generación de nuevas terapias como los nanoanticuerpos podrían representar una alternativa útil para el tratamiento del SARS-CoV-2 (Huo et al., 2020; Wrapp et al., 2020). Los nanoanticuerpos presentan numerosas ventajas, entre ellas, la capacidad de acceder a nuevos epitopos en regiones que de otra manera no podrían alcanzarse, dicha actividad es importante ya que generalmente estas regiones participan en inhibición de enzimas o neutralización de receptores (Desmyter et al., 2015).

Recientemente se han reportado dos nanoanticuerpos denominados H11-H4 y SARS-VHH72 que tienen una alta afinidad hacia el dominio de unión al receptor de la proteína espiga S del SARS-CoV-2 (Huo et al., 2020; Wrapp et al., 2020). H11-H4 se une a través de las regiones determinantes de complementariedad uno, dos y tres (CDR1, CDR2 y CDR3) de la proteína espiga S bloqueando la unión a la Enzima Convertidora de Angiotensina II (ACE2) y neutralizando al virus (Huo et al., 2020). Por su parte, VHH-72 es capaz de bloquear la interfaz de unión al receptor de ACE2 impidiendo el ingreso del virus a la célula de una manera eficiente (Wrapp et al., 2020). Sí bien, los estudios sugieren que el uso de los nanoanticuerpos de manera independiente son prometedores para el tratamiento del SARS-CoV-2, se ha demostrado que, el uso de nanoanticuerpos trivalentes es una opción mucho más potente. Este es el caso del

nanoanticuerpo trivalente mNb6tri, que demostró unirse al virus causante de la enfermedad del COVID-19 en tres epitopes, proporcionándole más estabilidad y una acción ultrapotente, por lo tanto, resulta bastante interesante estudiar su producción como proteína recombinante (Schoof et al., 2020).

Para la producción de nanoanticuerpos se utilizan diferentes plataformas de expresión que van desde bacterias hasta sistemas de expresión algal. Estos sistemas basados en el uso de microalgas representan una gran alternativa a las plataformas convencionales, pues a pesar de que es un procedimiento en desarrollo presenta numerosas ventajas tales como costos bajos de producción, un sistema optimizado para la selección y expresión de proteínas y es fácilmente escalable (Sarsaiya et al., 2019).

Entre los sistemas de producción algal se encuentra *Chlamydomonas reinhardtii*, una microalga biflagelada que ha demostrado ser un modelo ideal para la producción de proteínas recombinantes de interés industrial; además, puede ser empleada para la producción de enzimas, biocombustibles y co-productos nutracéuticos (Scranton et al., 2015). En temas de productos terapéuticos, Jarquín-Cordero et al. (2020) demostraron el potencial biomédico de esta microalga para el tratamiento de hipoxia tisular aguda y crónica, expresando factores de crecimiento (hVEGF-165, hPDGF-B y hSDF-1) promoviendo la idea de utilizar algas transgénicas para enfoques de cicatrización de heridas, por otro lado, en 2019 Pang et al. publican un estudio donde demuestran que *C. reinhardtii* tiene la capacidad de expresar la glicoproteína lactoferrina (LF), proteína de defensa contra microorganismos presente en el lactosuero de la leche humana, de manera factible, proponiendo como alternativa la producción comercial de lactoferrina a través de un sistema comestible utilizando *C. reinhardtii*.

*C. reinhardtii* no requiere de tierras cultivables, crece fotosintéticamente usando energía luminosa y CO<sub>2</sub> como fuente de carbono, aunque también puede utilizar acetato, además posee un riesgo nulo de contaminación viral o por endotoxinas bacterianas (Scaife et al., 2015). Su sencilla manipulación ha permitido la transformación genética exitosa del núcleo, cloroplastos y mitocondrias a través de diferentes métodos como transformación por biobalística, electroporación, perlas de vidrio y la mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Kumar et al., 2004; Neupert et al., 2012; Economou et al., 2014; León et al., 2007). En este sentido, *C. reinhardtii* es una excelente alternativa para la producción de nanoanticuerpos que neutralicen el virus del SARS-CoV-2. Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo fue la transformación genética de *C. reinhardtii* con *mNb6-tri* que codifica para un nanoanticuerpo ultrapotente que neutraliza al virus del SARS-CoV-2 fusionado al promotor *RIA3/PromC* inducible por salinidad (Beltran et al., 2019).

## CAPITULO I

### 1. ANTECEDENTES

#### 1.1 Generalidades de SARS-CoV-2

En diciembre de 2019, surge una enfermedad desconocida en Wuhan, Hubei, China, específicamente en un mercado local de mariscos, identificada en ese momento como “neumonía atípica”. El agente causante fue identificado y caracterizado en primera instancia en enero de 2020 por Zhou et. al (2020), después de haberse confirmado 2,794 casos, 80 muertes y 33 casos registrados en 10 diferentes países. A partir de una serie de análisis de secuenciación de muestras de ADN de pacientes diagnosticados con “neumonía atípica” se demostró que el patógeno pertenecía a las especies de SARS-CoV, el cual fue denominado coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave(SARS-CoV-2). Este virus fue catalogado como parte de una familia de virus conocida como coronavirus, el séptimo coronavirus en infectar a humanos. Estas cepas pueden causar una serie de síntomas que van desde el resfriado común hasta enfermedades con un mayor grado de complicación como tromboembolia y/o la insuficiencia multiorgánica que pueden llevar a la muerte (WHO, 2020). SARS-CoV es responsable de un síndrome respiratorioagudo severo y MERS-CoV causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio, alcanzaron una cifra de 8098 infectados y 774 muertes en el año 2002, respectivamente. Estos virus tienen en común que son altamente patógenos para los humanos y sus reservorios originales son los murciélagos (Oliva, 2020).

El genoma de SARS-CoV-2 es de 29,891 pb, consiste de seis marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés); dos tercios de su ARN viral lo abarcan ORF1a y ORF1b que corresponden al gen de la replicasa viral. Estos dos marcos de lectura codifican dos poliproteínas de gran tamaño llamadas pp1a y pp1ab que posteriormente serán transformadas proteolíticamente para producir 16 proteínas no estructurales. El resto del genoma codifica para cuatro proteínas estructurales de gran importancia: 1) la glicoproteína espiga (S), 2) la proteína de membrana (M), 3) las proteínas de nucleocápside (N) y 4) las proteínas de envoltura (E) (Zhou et. al., 2020; Oliva, 2020).

Cuando se realizó la descripción del genoma del SARS-CoV-2, la gran parte de la población

---

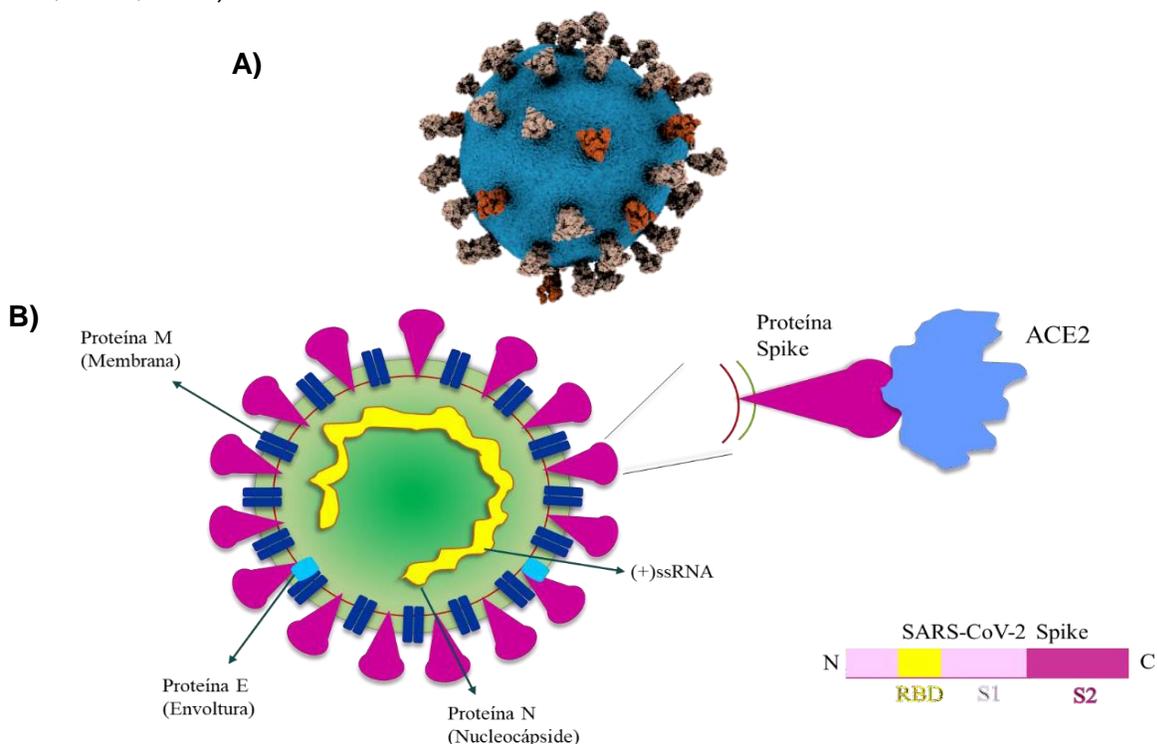
---

infectada compartía la misma información genética de la cepa original (identificada por primera vez en Wuhan, China) (Winger y Caspari, 2021), sin embargo, conforme la pandemia fue avanzando, se descubrieron a finales de 2020 una serie de modificaciones en el genoma del virus alterando algunas de sus características que impactaron en la afinidad e interacción con el huésped (Harvey et. al., 2021) resultando en el surgimiento de las variantes de preocupación y las variantes de interés, clasificadas así por la Organización Mundial de Salud; las VOC se distinguen por generar cambios en la epidemiología del COVID-19, así como un aumento de la virulencia que repercute en la eficacia tanto de las vacunas disponibles como de las medidas de salud pública (WHO, 2022), entre estas se encuentran, la variante Alpha localizada por primera vez en Reino Unido, se identificaron 23 mutaciones aumentando su porcentaje de transmisión en un 56% con respecto a las demás variantes y en un 61% el riesgo de muerte, además, demostró resistencia ante algunos anticuerpos monoclonales dirigidos al dominio de unión al receptor (“RBD”, por sus siglas en inglés) y al dominio N terminal de la proteína espiga (Jogalekar et al. 2021), por otra parte, la variante Beta contiene 21 mutaciones con un porcentaje de transmisión de aproximadamente 50% más que otras variantes, fue identificada por primera vez en Sur África, y en un estudio Wang et al. (2021) evidenció la capacidad de esta variante para neutralizar la mayoría de los anticuerpos monoclonales disponibles. La variante Gamma se estima que es 2.6 veces más transmisible que el resto de las variables con 21 mutaciones en la proteína espiga y fue detectada por primera vez en Brasil en noviembre del 2020 (Boehm et al., 2021), mientras que la variante Delta fue identificada por primera vez en India con 21 mutaciones y ha demostrado disminuir la eficacia de las vacunas disponibles hasta el momento (Dhawan et al., 2022). Todas estas variantes se han visto opacadas por la aparición de la variante Omicron reportada por primera vez en Sur África, sin embargo, desde su primer reporte, se esparció a otros países y regiones, superando el número de casos de cualquier otra variante gracias a sus más de 60 mutaciones identificadas siendo las más destacadas en la proteína espiga del SARS-CoV-2 (He et al., 2021).

Las variantes de interés son aquellas que pueden aumentar la gravedad de la enfermedad, y son caracterizadas por causar transmisiones comunitarias significativas, un ejemplo de esta fue la variante Epsilon identificada por primera vez en Estados Unidos en 2020, sin embargo, según la Organización Mundial de la Salud actualmente no se encuentra circulando ninguna variante de interés (WHO,2022)

### 1.1.1 Estructura

El SARS-CoV-2 es considerado un beta coronavirus (Fig 1.1A) que contiene un ARN de cadena sencilla (ssRNA, por sus siglas en inglés) de aproximadamente 27-30 kb (Wang et al., 202), rodeado por “puntas” que correspondan a las glicoproteínas espiga S (o proteínas Spike) con una longitud aproximada de 8 a 12 nm y un total de 1273 aminoácidos (Fig 1.1B). Esta proteína es responsable de la unión y fusión del virus con las membranas celulares del huésped. La distribución de las proteínas S alrededor del virus lo asemeja a una corona, motivo por el cual es conocido como coronavirus. La proteína S se encuentra conformada por una subunidad S1 N-terminal que contiene el dominio de unión al receptor (RBD, por sus siglas en inglés) y una unión S2 C-terminal que contiene la proteína de fusión, dichas subunidades son indispensables para la interacción virus-hospedero (Huang et al., 2020) (Fig 1.1B). Por otra parte, la proteína M es responsable del transporte transmembranal de nutrientes, liberación de partículas virales y la eventual formación de la envoltura del virus. Las proteínas N protegen el material genético viral mientras que la proteína E participa en el ensamblaje y liberación del virus (Fig 1.1B) (Pastrian, 2020; Oliva, 2020).

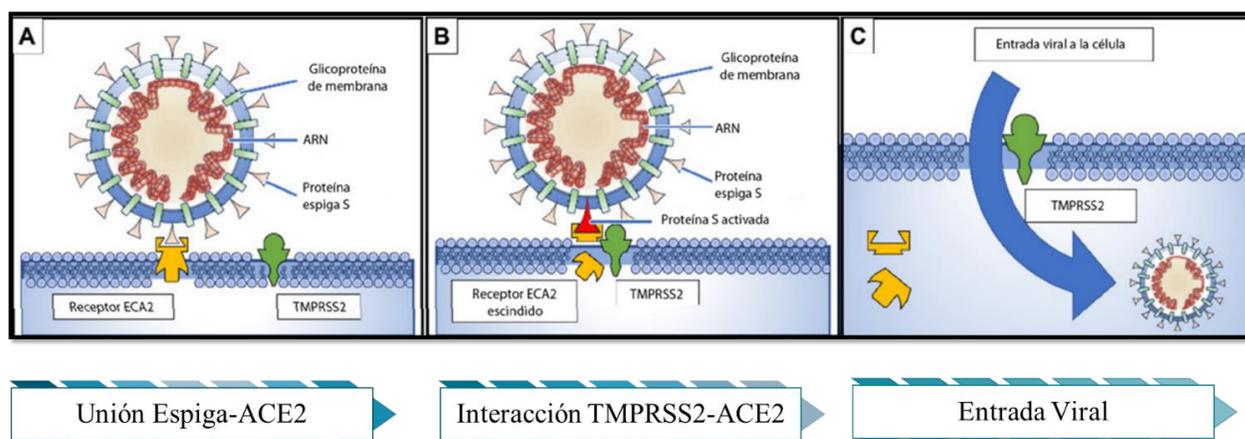


**Figura 1. 1** A) Figura representativa 3D del virus SARS-CoV-2 (Tomado del National Institute of Health, Model ID: 3DPX-013323) B) Estructura del SARS-CoV-2 que comprende las proteínas de membrana (M), nucleocápside (N), envoltura (E), proteína espiga (S) y una cadena de ARN sencilla; además, se presenta la estructura detallada de la proteína espiga compuesta por la subunidad S1 y S2 que incluye el dominio de unión al receptor (Adaptado de Oliva,2020).

### 1.1.2 Mecanismo de infección

Para que el virus pueda entrar a la célula huésped es necesario que la proteína S encuentre un sitio que le permita unirse a la superficie de la célula diana, en este caso, serían los receptores de ACE-2, la enzima convertidora de angiotensina que es expresada en los pulmones, arterias, corazón, riñones e intestino (Escobar et al, 2021). De esta manera, una vez que la proteína se une a ACE-2, un complejo proteolítico denominado Proteasa Transmembranal de Serina 2 (TMPRSS2) que se encuentra asociada a la superficie de la célula huésped, procesa el complejo llevando a la escisión de ACE-2 y a la posterior activación de la proteína espiga lo que facilita el ingreso del virus al huésped (Figura 1.2) (Rabi et.al.,2020).

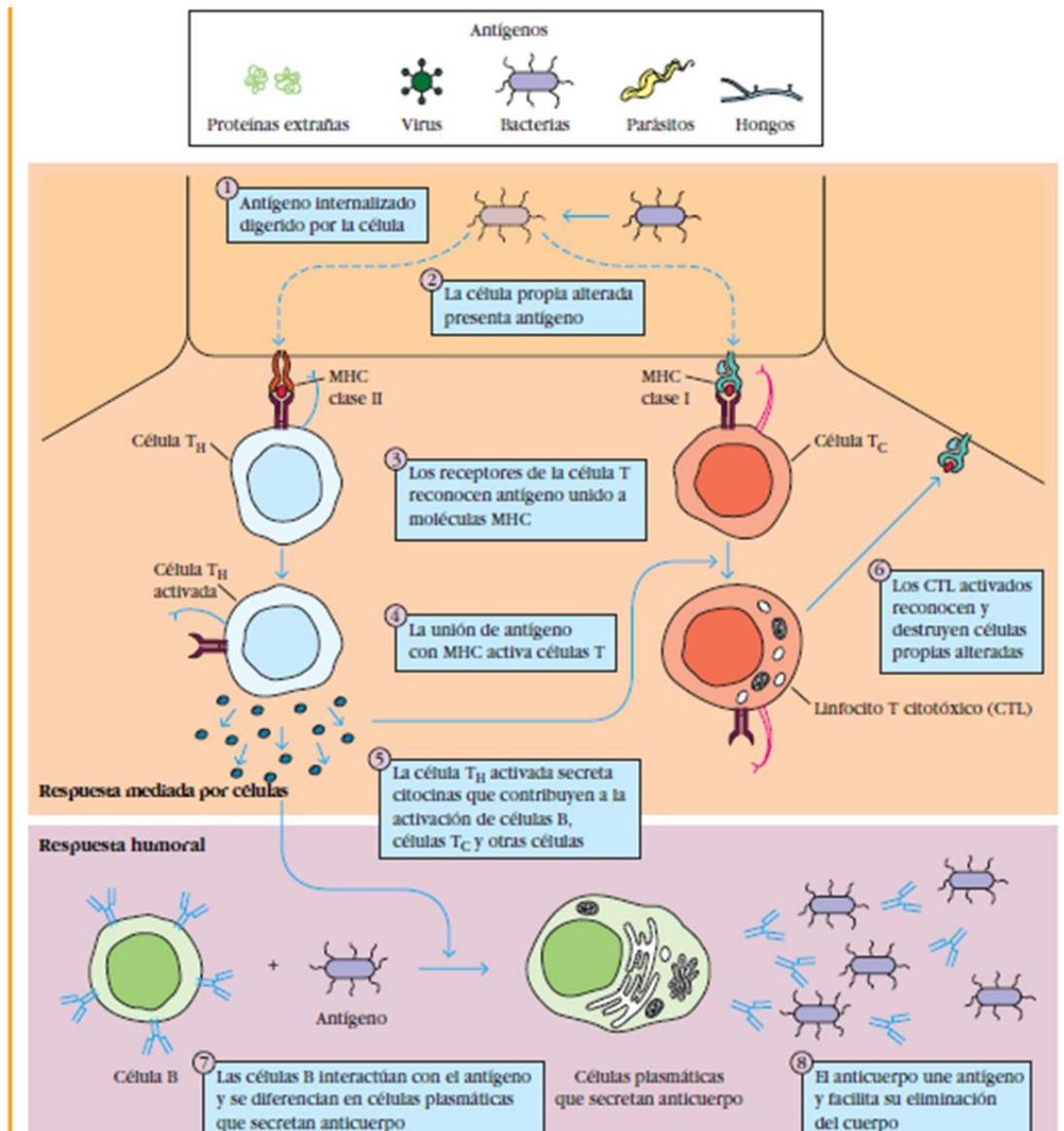
La entrada viral y la infección celular desencadenan la respuesta inmune del huésped ocasionando que las células presentadoras de antígeno (APC) interioricen al virus ya sea por



**Figura 1. 2** Mecanismo de infección de SARS-CoV-2 en la célula huésped. A) Reconocimiento de la proteína espiga con ACE-2. B) Escisión de ACE-2 a través de la proteasa transmembranal de serina 2. C) Entrada viral gracias a la activación de la proteína espiga. Tomada de Rabi et al., 2020.

fagocitosis o endocitosis, posteriormente, el antígeno (virus) es presentado al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II. De esta manera, los linfocitos T-helper (Th) interactúan con el complejo de antígeno-MHC en la membrana de APC produciendo una señal que conduce a la activación de la célula Th (Sebina y Pepper., 2018). El objetivo de este mecanismo es activar a las células T-citotóxicas que reconocerán y destruirán células alteradas; por otro lado, promoverán la secreción de citosinas para contribuir a la activación de células B que al interactuar con el antígeno pueden diferenciarse en células plasmáticas que secretan anticuerpos. Dichos anticuerpos se unen al antígeno y facilitan su eliminación del cuerpo (Fig 1.3). (Kindt et al., 2007;

Rabi et. al., 2020).



**Figura 1. 3** Representación del mecanismo de acción del sistema inmune contra antígenos. (Tomado de Kindt et al., 2007)

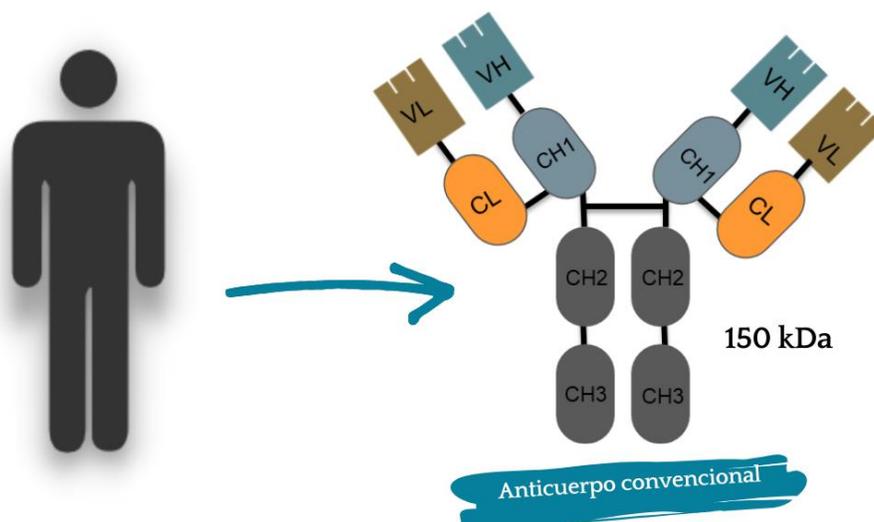
## 1.2 Anticuerpos

Los anticuerpos son glicoproteínas solubles que juegan un papel importante en la respuesta inmune, esta es la razón por la cual se han utilizado por muchos años para el tratamiento de diferentes enfermedades como el anticuerpo Trastuzumab que ataca células HER2 encontradas

en cáncer de mama (Slamon et al, 2001), el anticuerpo Alemtuzumab ataca células CD52 en leucemia crónica (Lundin et al., 2002) ,y el anticuerpo Rituximab que se utiliza como terapia contra el Linfoma no Hodgkin(McLaughlin et al., 1998). Estos son algunos que se destacan en la larga lista de tratamientos contra tumores cancerígenos. La conformación de un anticuerpo convencional consta de dos cadenas pesadas (denominadas dominios variables VH y constantes CH) y dos cadenas ligeras idénticas (dominio variable VL y constante CL) unidas mediante enlaces disulfuro (Jovčevska y Muyldermans, 2019). La parte estructural que permite que se lleve a cabo la unión al antígeno está conformada por los dominios VH y VL unidos por un enlace disulfuro (Fig. 1.4) (Khodabakhsh et al., 2019).

A pesar de sus numerosas aplicaciones, los anticuerpos convencionales tienen una serie de limitantes debido a que proceden de células murinas. Entre estos inconvenientes se encuentra la activación de una respuesta inmunogénica en los pacientes que ocasiona su neutralización; además, su gran tamaño (14.2 nm x 8.2 nm x 3.8nm, 150 kDa) limita su penetración hacia el tejido tumoral (Awwad y Angkawinitwong, 2018). Las únicas vías de administración intravenosa y subcutánea también son una limitante (Jones y Martino, 2016)

Uno de los problemas más grandes en torno al sistema de los anticuerpos es que solo pueden ser expresados en células de mamíferos lo que se traduce en costos de producción altos y por consecuencia, su poca accesibilidad por parte de la población.



**Figura 1. 4** Estructura de un anticuerpo convencional, conformado por dos cadenas pesadas ( dominios variables: VH y constantes: CH) y dos cadenas ligeras (dominios variables: VL y constantes: CL) unidas mediante puentes disulfuro. Tamaño de 150 kDa.

---

---

### 1.2.1 Los anticuerpos como agentes terapéuticos complementarios a las vacunas

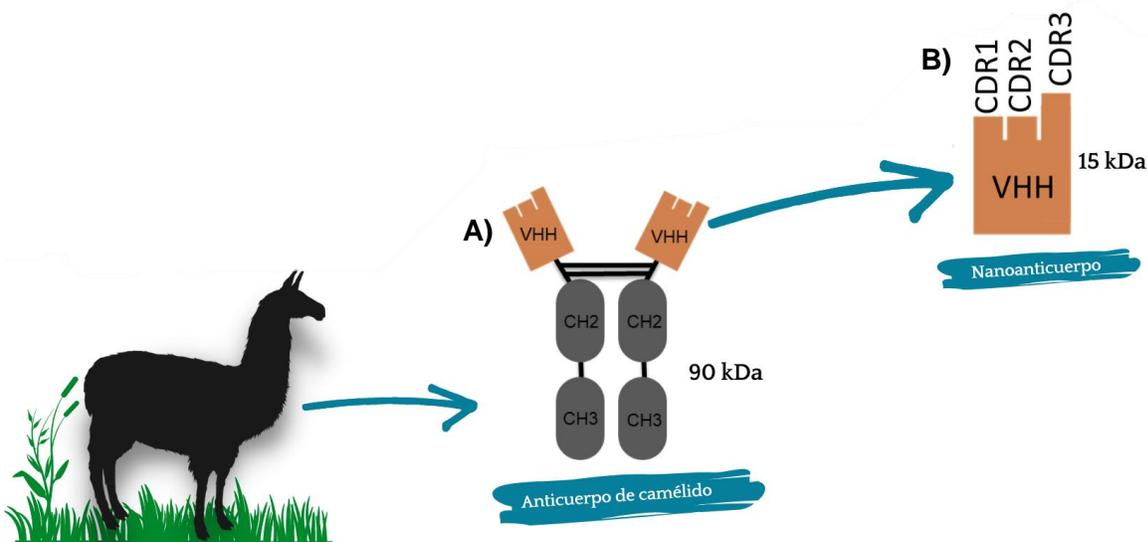
Los anticuerpos tienen el potencial para convertirse en una herramienta importante en el combate contra enfermedades infecciosas que normalmente se tratan con vacunas. Aunque las vacunas cumplen su objetivo de fortalecer el sistema inmunológico, no es una acción instantánea ni rápida debido a que se necesitan algunos días para generar una respuesta; incluso, en algunos casos es necesaria la administración de múltiples dosis para alcanzar una respuesta inmune eficaz (WHO, 2021). Es aquí en donde los anticuerpos se vuelven de interés pues mientras la vacuna actúa, la terapia con anticuerpos podría ayudar a eliminar el virus debido a que brindan una protección rápida (Li et al., 2022). La tecnología de los anticuerpos puede utilizarse en personas inmunodeprimidas, niños pequeños y personas mayores, que en ocasiones no pueden generar una respuesta efectiva a la vacunación, además, de que algunas vacunas son contraindicadas para ellos (Casadevall, 2002).

El hecho de que los anticuerpos presenten una toxicidad mínima, no formen agregados y no reaccionen contra los tejidos del huésped representan una gran alternativa para los tratamientos convencionales. Los anticuerpos pueden administrarse como plasma o suero ya sea animal o humano, intravenoso o intramuscular (Keller y Stiehem, 2000). Uno de los ejemplos más actuales y de gran interés es el uso de los anticuerpos monoclonales contra el COVID-19, actualmente, numerosas alternativas se encuentran disponibles comercialmente y otros en ensayos clínicos; entre los ya aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) se encuentran Bamlanivimab y Etesevimab desarrollados por Eli Lilly y Tixagevibam desarrollado por AstraZeneca, estas terapias se han indicado para el tratamiento de pacientes con síntomas graves de COVID-19 (Kumar et al., 2021).

Por otra parte, Alsoussi y colaboradores (2021), presentaron un estudio donde se realizó la generación y caracterización de un panel de anticuerpos monoclonales de murinos, entre los que se destacó 2B04, con una capacidad de neutralizar al virus del SARS-CoV-2 con una concentración inhibitoria máxima media de  $< 2$  ng/mL y que actualmente se encuentra en la fase III de ensayos clínicos.

### 1.3 Nanoanticuerpos

A partir de las limitantes presentadas por los anticuerpos monoclonales, los nanoanticuerpos (Nbs, por sus siglas en inglés) surgen como una alternativa terapéutica contra diferentes enfermedades, incluyendo la actual pandemia de la COVID-19. Proviene de una única región variable “VHH” en el sitio de unión de antígeno que forma parte de los anticuerpos de cadena pesada de camélidos (HCAbs, por sus siglas en inglés) (Fig 1.5A) (Nguyen et al., 2002). Están formados por aproximadamente 120 aminoácidos, sus dimensiones comprenden entre 4 nm x 2.5 nm x 3 nm, y comúnmente se encuentran con un peso de 12 a 15 kDa (Fig 1.5B). Cuentan con un sitio hidrofílico que corresponde a la cadena ligera de los dominios “VH” brindándoles estabilidad y una mayor solubilidad. En cada región variable presentan cuatro regiones marco y tres regiones determinantes de complementariedad en contraste con las 6 regiones presentadas por los anticuerpos convencionales (Zimmermann et al., 2020). La región CDR3 de los nanoanticuerpos es fundamental para la unión antígeno-anticuerpo pues contribuye a la diversidad y especificidad de la molécula. CDR3 está formado por alrededor de 18 aminoácidos, más largo que los presentados por los anticuerpos provenientes de murinos cuya longitud es de 12 a 14 aminoácidos. Por otra parte, CDR1/2 asiste en la unión anticuerpo. La forma alargada del CDR3 les permite alcanzar cavidades en antígenos diana inaccesibles para los anticuerpos convencionales (Bannas et al., 2020).

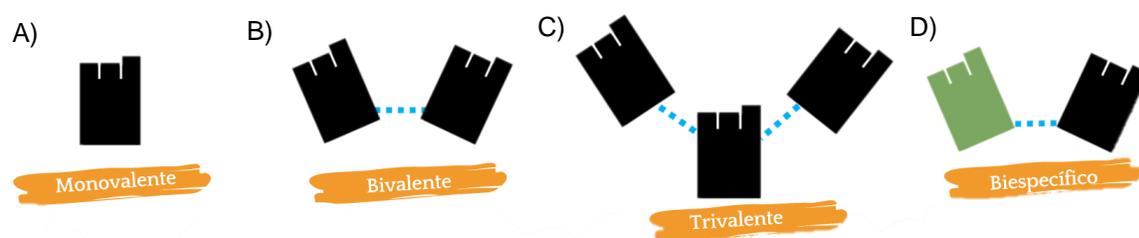


**Figura 1. 5** A) Estructura de un anticuerpo de cadena pesada de camélido de aproximadamente 90kDa. B) Estructura de un nanoanticuerpo que corresponde a la región variable (VHH) de un anticuerpo de camélido con un peso de aproximadamente 15 kDa.

### 1.3.1 Propiedades de los nanoanticuerpos.

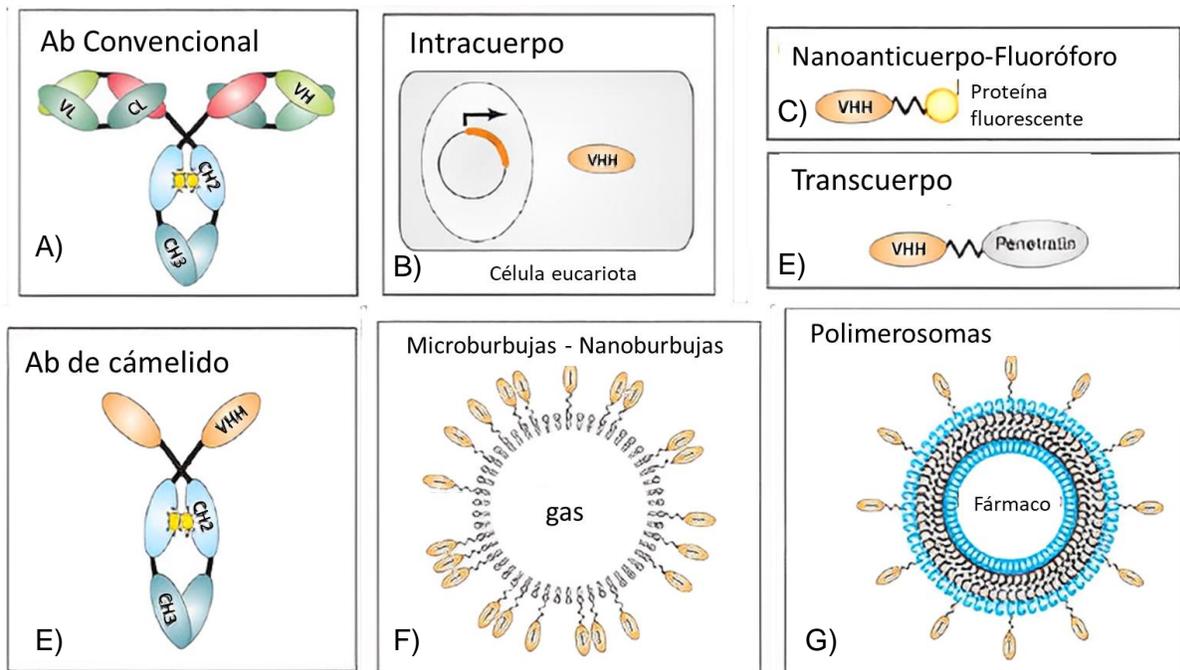
Además de sus ventajas estructurales frente a los anticuerpos convencionales, los nanoanticuerpos cuentan con una serie de propiedades físicas y químicas que los hacen destacarse, cuentan con una vida útil prolongada hasta 4°C (Muyldermans, 2013). Debido a su contenido de aminoácidos hidrofílicos tienen una buena solubilidad en agua, tolerancia al aumento de temperaturas (60-80°C y varias semanas a 37°C), resistencia a la degradación proteolítica, exposición a un rango de pH de 3.0 – 9.0, soporta presiones elevadas (500 – 750 MPa) y a la desnaturalización química (p.ej. urea 6– 8 M) (Khodabakhsh et al., 2019; Bannas et al., 2020).

En términos de producción, debido a su estructura monomérica y al hecho de que no necesitan modificaciones post-traduccionales, es posible su expresión en sistemas microbianos como *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* (Brunner y Schenck, 2020; Yang y Shah, 2020). Por otra parte, es posible producirlos en cantidades que van desde 25 y 200 µg/mL (Iwaki et al., 2020) esto permite que la manufactura tenga bajos costos y exista una disponibilidad constante de producto (Hassanzadeh-Ghassabeh et al., 2013). Otras de las propiedades de los nanoanticuerpos es que pueden ser administrados en diferentes vías ya que tienen la capacidad de pasar la barrera sangre-cerebro y migrar a sitios donde los anticuerpos convencionales no pueden acceder, por otra parte, los nanoanticuerpos son bastante modulares, esto permite generar varias configuraciones de ellos ya sea en configuración bivalente o trivalente que reconocen el mismo epítipo para aumentar su afinidad (Fig 1.6) o bien se pueden unir otras moléculas efectoras (Bannas et al., 2020).



**Figura 1. 6** Diferentes configuraciones en las que se pueden encontrar los nanoanticuerpos. A) monovalente, un solo nanoanticuerpo, B) bivalente, dos nanoanticuerpos idénticos unidos, C) Trivalente, tres nanoanticuerpos idénticos unidos, D) Biespecífico, unión de dos nanoanticuerpos diseñados para reconocer dos antígenos diferentes.

Diferentes modificaciones de los nanoanticuerpos han sido actualmente generadas. Un ejemplo son los intracuerpos que tienen la capacidad de plegarse en diferentes entornos intracelulares como el núcleo o el citosol (Figura 1.7B) (Stocks, 2004). Otra de las modificaciones ha llevado a la creación de transcuerpos (Figura 1.7D) que puede ser considerada como una alternativa para tratamientos debido a que el nanoanticuerpo será capaz de cruzar la membrana celular para funcionar intracelularmente, este se encontrara unido a productos que penetran la célula como el sistema de secreción bacteriano tipo III. Los chromobodies (Figura 1.7C) son otra de las tecnologías de gran interés debido a que tienen la característica de estar unidas a proteínas fluorescentes, que pueden ser utilizadas para visualización en tiempo real de estructuras celulares endógenas o procesos celulares (Steeland, 2016). Las microburbujas o nanoburbujas son estructuras conformadas por una capa de lípidos o proteínas capaz de contener gas, y pueden unirse a nanoanticuerpos para utilizarse como agente de contraste para la obtención de imágenes por ultrasonido, un ejemplo de esto es, una nanoburbuja unida al nanoanticuerpo Anti-PSMA (antígeno membrana prostático específico) que ha facilitado la visualización de imágenes relacionadas con el cáncer de próstata (Fan et al., 2015) (Figura 1.7F). Una de las tecnologías más prometedoras de este enfoque son los polimerosomas, vesículas esféricas huecas con un núcleo acuoso hidrófilo rodeado por una membrana anfífilica, es decir que es capaz de ser soluble en agua (hidrófila) y a la vez tiene un lado hidrófobo que rechaza el agua, por lo que resultan altamente estables, en dicha membrana se pueden unir nanoanticuerpos (Figura 1.7G), es así, como en 2015, Zou et al., unieron a los nanoanticuerpos anti-HER2 y anti-GFP a polimerosomas, demostrando que el polimerosoma unido a anti-HER2 puede unirse con gran especificidad a células de cáncer de seno que expresan receptores HER2, representando una gran opción como herramienta de diagnóstico médico. En la figura 1.5 se puede observar la representación esquemática de los constructos mencionados.



**Figura 1. 7** Diferentes adaptaciones de los nanoanticuerpos. A) estructura de un anticuerpo convencional B) Intrabody, C) Chromobody unido a proteínas fluorescentes, D) Estructura de un transcbody E) estructura de un anticuerpo de cadena pesada de camélido, F) Nanoanticuerpos unidos a nanoburbujas G) Nanoanticuerpos unidos a un polimerosoma. (Adaptado de Steeland et al., 2016).

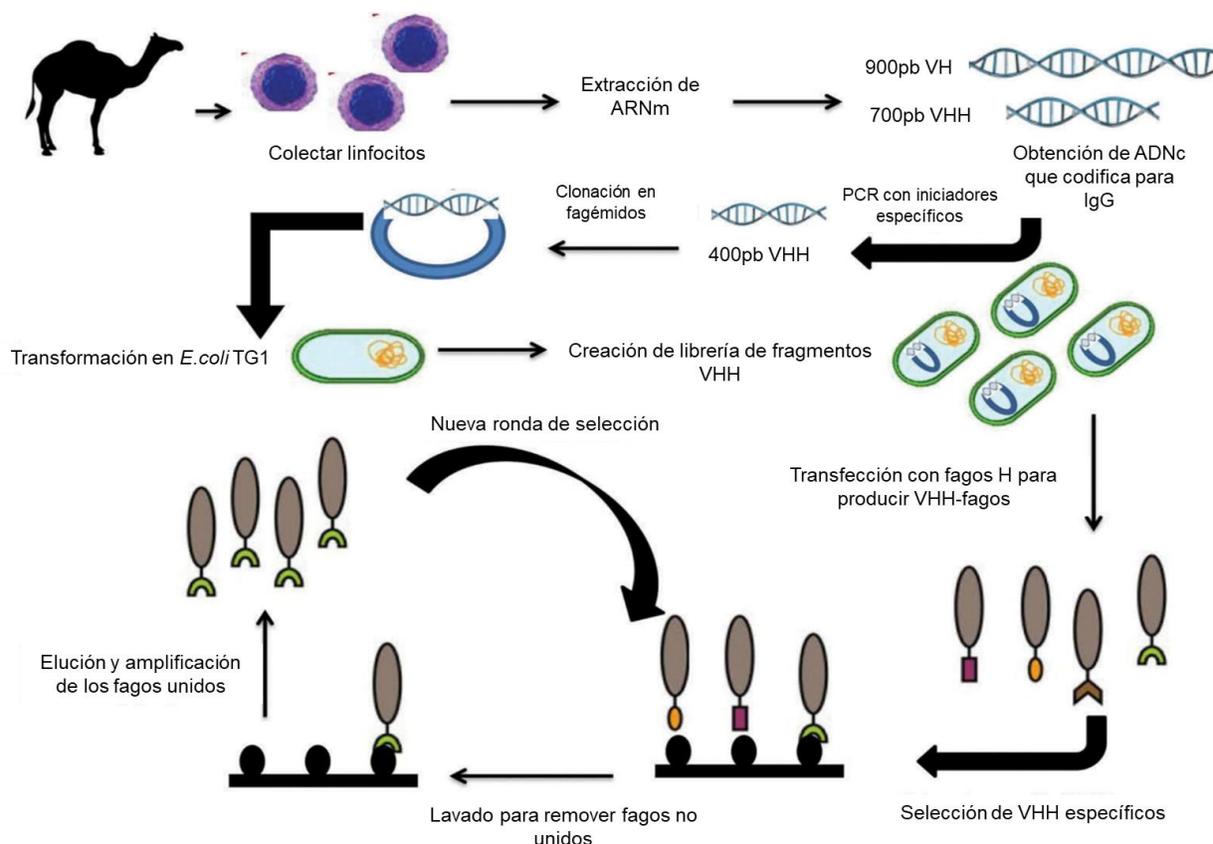
### 1.3.2 Mecanismo de producción.

La clonación en fagos es la metodología que permite clonar nanoanticuerpos para su posterior expresión; para ello, se genera una librería de “VHHs” (nanoanticuerpos) y se da el proceso de biopanning (técnica de selección por afinidad) para posteriormente introducirse en sistemas de expresión adecuados (Deffar et al., 2009).

Para iniciar con la construcción de la librería es necesaria la inmunización de camélidos, que comprenden alpacas, llamas o camellos. Estos últimos son la opción de preferencia debido a su alta proporción de anticuerpos de cadena pesada en comparación con los anticuerpos normales (Sanaei et al., 2019). La inmunización se da siguiendo un protocolo de 5 o 6 inyecciones, una por semana de aproximadamente 0.5 mg de proteína (Desmyter et al., 2015). El objetivo de la inmunización es obtener linfocitos como fuente de ARNm que podrá ser utilizado para preparar ADNc. Una vez extraído el ARNm, se delimita la región de interés “VHH” con primers específicos para distinguirlos de los “VH” de los anticuerpos convencionales, una tarea sencilla ya que estos son más largos que los contenidos por los Nbs. Se realiza la técnica de PCR obteniendo

secuencias de 400 pb que corresponden a los nanoanticuerpos, que serán las que se introducirán al vector de clonación adecuado, en este caso son los fagos el vector más utilizado y transformados en células de *E. coli* (Sanaei et al., 2019). Es posible realizar un análisis de la biblioteca para identificar la presencia de aglutinantes específicos de antígenos a través de rastreo directo de colonias mediante el cribado o “biopanning”, permitiendo una selección con un alto grado de afinidad y una selección de los mejores clones expresados por la bacteria (Figura 1.8) (Deffar et al., 2009).

Debido a que los nanoanticuerpos se expresan a través de un solo gen, no requieren de modificaciones post-traduccionales; por lo tanto, hay numerosos sistemas de expresión que pueden ser utilizados para obtener una gran cantidad de Nbs (Sanaei et al., 2019). Debido a que este proceso es fácilmente escalable, abre la oportunidad a otro tipo de sistemas de expresión como las levaduras y hongos para aumentar el nivel de producción. Aunque los sistemas mencionados anteriormente pueden ser prometedores, también presentan algunos inconvenientes como ciertos niveles de degradación de productos (Deffar et al., 2009).



**Figura 1. 8** Esquema donde se representa el proceso de producción de nanoanticuerpos a partir de la inmunización de camélidos. (Tomado de Sanaei, et al., 2019).

### 1.3.3 Aplicaciones de los nanoanticuerpos en la medicina.

Debido a las numerosas propiedades y características estructurales de los nanoanticuerpos, tienen un sin fin de aplicaciones biotecnológicas y clínicas, entre las que destacan las terapias contra enfermedades infecciosas, venenos y toxinas, cáncer, enfermedades crónicas, enfermedades degenerativas e incluso como herramientas de diagnóstico a manera de marcadores. Actualmente algunos de estos nanoanticuerpos ya se encuentran en fases clínicas para su posterior comercialización (Tabla 1.1) y otros ya se encuentran a la venta como Caplacizumab® de la compañía Sanofi, fue el primer nanoanticuerpo comercial para tratar la enfermedad Púrpura Trombocitopénica Trombótica (PTT), entre otros se encuentra Alexa Fluor® de la compañía ThermoFisher Scientific que se utiliza en microscopía de fluorescencia.

**Tabla 1. 1** Nanoanticuerpos con diferentes aplicaciones médicas

Aplicación	Nanoanticuerpo	Target	Enfermedad	Referencia
<b>Terapia contra enfermedades infecciosas</b>	VHH batch 203027	Rotavirus	Diarrea	Sarker et al. (2013)
	Nano-85; Nano-25	dominio VP1	Norovirus	Garaicoechea et al. (2015)
	H5-VHHb	Hemaglutinina H5	H5N1 Influenza	Ibanez et al. (2011)
	αNP-VHHs	Nucleoproteína	Influenza A	Ashour et al. (2015)
	aHA-7	Hemaglutinina HA1	H5N2 Influenza	Tillib et al. (2013)
	Vobarilizumab ALX-0171	RSV	Infecciones respiratorias agudas	Detalle et al. (2016)
<b>Terapia contra venenos y toxinas</b>	F7Nb	HNc	Envenenamiento de escorpión	Yardehnavi et al. (2014)
	VHH2-Fc; C2; and C20	α-Cobratoxin	Veneno de <i>Naja kaouthia</i>	Richard et al. (2013)
	JKH-C7; JIK-B8; and VNA2-PA	Anthrax	<i>Bacillus anthracis</i>	Moayeri et al. (2015)
	DF5; DA5; DA2; A18; H7/B5	Neurotoxina botulinica A - E	Botulismo	Baghban et al. (2014)

	A4.2, A5.2, A20.1, and A26.8	Toxina CDTa	<i>Clostridium difficile</i>	Hussack, G. et al. (2011)
<b>Terapia contra enfermedades degenerativas y crónicas</b>	Ozoralizumab ATN-103	TNF	Artritis reumatoide	Kratz y Elsadek (2012)
	Vobarilizumab ALX-0061	IL6	Artritis reumatoide	Van Roy et al. (2015)
	Vobarilizumab ALX-0761	IL17A, IL17F, IL17A/F	Psoriasis	Svecova et al. (2019)
	Caplacizumab ALX-0681 ALX-0081	Factor de Von Willebrand	Púrpura trombocitoénica trombótica	Scully et al. (2019)
	$\alpha$ -ADAMTS-5 nanobody M6495	ADAMTS-5	Osteoartritis	Pereira et al. (2018)
	Vobarilizumab ALX-0061	IL6	Lupus eritematoso sistémico	Van Roy et al. (2015)
	5F7GCC	Proteína M	Mieloma múltiple	
<b>Terapia contra el cancer</b>	cAb-CEA5- $\beta$ -lactamase	CEA	Cancer de colon	Cortez-Retamozo et al. (2004)
	68-GaNOTA-anti-HER2 VHHI	HER2	Metástasis cerebral en cáncer de mama	Xavier et al. (2013)
	[131I]-SGMIB anti-HER2 VHHI	HER2	Cáncer de mama	Pruszynski et al. (2013)
	[213Bi]Bi-DTPA-sdAb	HER 2	Cáncer de ovario	Dekempeneer et al. (2020)
	Bispecific nanobody-derived CAR-T cells	CD19/CD20	Linfoma B	Xing et al. (2017)
<b>Visualización de biomarcadores</b>	2Rs15d	HER 2	Tumores HER1	Vaneycken et al. (2011)
	5F7	HER 2	Tumores HER2	Rakovich et al. (2014)

sdAb 4.43	IGFBP7	Tumores cerebrales	Iqbal et al. (2011)
1E2; 6E10	HGF	Tumores que expresan HGF	Lemaire et al. (2014)

### 1.3.4 Nanoanticuerpos contra SARS-CoV-2.

Ante la necesidad de disponer de diferentes alternativas terapéuticas, se han desarrollado varios nanoanticuerpos con la capacidad de neutralizar al SARS-CoV-2. Estos nanoanticuerpos presentan diferentes conformaciones tales como monoméricos, homotriméricos, heterobivalentes, triméricos y bivalentes. Han sido expresados exitosamente en diferentes sistemas que van desde bacterias (*E. coli*), líneas celulares (Línea celular Expi 293) hasta levaduras (*Pichia pastoris*). Su concentración inhibidora media máxima (IC<sub>50</sub>) varía en cada uno de ellos, con concentraciones que van de 120 pM a 540 nM, dicha concentración indica la cantidad necesaria de nanoanticuerpo que se necesita para inhibir, en este caso, el virus del SARS-CoV-2 en un 50%, así como también, varía la afinidad de unión a RBD en concentraciones que van de <1 pM a 60 nM, la diferencia entre este valor y el IC<sub>50</sub> reside en que el primero mide la afinidad de unión del inhibidor y no depende de la concentración del blanco, mientras que, el segundo es la concentración necesaria para reducir la actividad del blanco a la mitad por lo que la concentración si es un factor relevante, además, que este no funciona como un indicador directo de afinidad (Burlingham y Widlanski, 2003) (Tabla 1.2).

**Tabla 1. 2** Nanoanticuerpos contra el virus SARS-cov-2 causante de la enfermedad COVID 19.

Nanoanticuerpo	Afinidad de unión a RBD	(IC <sub>50</sub> )	Sistema de expresión	Conformación	Referencia
Nb11-59	21nM	36.7 nM	<i>Pichia pastoris</i>	Monomérico	Gai et al. (2020)
S14	4.6 pM	4.93 ng/mL	<i>E. coli</i>	Monomérico	Jiang-Fan et al. (2021)

Ty1	5-10 nM	54nM	<i>E. coli BL21</i>	Monomérico	Hanke et al. (2020)
SP1B4	39.5 nM	0.33 nM	Linea celular Expi 293F	Monomérico	Stefan et al. (2021)
SP1D9	8.9 nM	0.45 nM	Linea celular Expi 293F	Monomérico	
Nb12	<0.0012 nM	11.7 nM	Linea celular Expi 293	Monomérico	Jiangliang et al. (2021)
Nb15	8.5 nM	0.4 nM	Linea celular Expi 293	Monomérico	
Nb17	5.59 nM	0.6 nM	Linea celular Expi 293	Monomérico	
Nb19	4.72 nM	0.3 nM	Linea celular Expi293	Monomérico	
Nb30	6.55 nM	6.9 nM	Linea celular Expi293	Monomérico	
Nb56	3.26 nM	0.9 nM	Linea celular Expi293	Monomérico	
VHH-72	~39nM	ND	<i>P. pastoris</i>	Monomérico	Wrapp et al. (2020)
Re6B06	12 nM	50nM	<i>E. coli</i>	Monomérico	Güttler et al. (2021)
Re9F06	4nM	17nM	<i>E. coli</i>	Monomérico	
Re5D06	2pM	50 pM	<i>P. pastoris</i>	Monomérico	
Re9B09	≤ 1pM	167 pM	<i>E. coli</i>	Monomérico	
Re6H06	≤ 1 pM	50 pM	<i>P. pastoris</i>	Monomérico	
Re5F10	29 pM	10 nM	<i>E. coli</i>	Monomérico	
Re9H01	10pM	167pM	<i>E. coli</i>	Monomérico	
Re9H03	24pM	167pM	<i>E. coli</i>	Monomérico	
H11-D4	39 nM	ND	Linea celular Expi293 y <i>E.coli</i>	Monomérico	
H11-H4	12 nM	ND	Linea celular Expi293 y <i>E.coli</i>	Monomérico	

VHH-E	1.86 nM	60 nM	<i>E. coli</i>	Monomérico	Koenig et al. (2021)
Nbs 89	108 pM	0.133 nM	<i>E. coli</i>	Monomérico	
Nbs 20	10.4 pM	0.102 nM	<i>E. coli</i>	Monomérico	Xiang et al. (2020)
Nbs 21	< 1 pM	0.045 nM	<i>E. coli</i>	Monomérico	
Sb23	ND	40 nM	<i>E. coli</i>	Monomérico	Tania et al. (2021)
n3021	0.63 nM	ND	<i>E. coli</i>	Monomérico	Wu et al. (2020)
Sb15	24 nM	ND	Linea celular Expi293	Monomérico	Walter et al. (2020)
Sb68	37 nM	ND	Linea celular Expi294	Monomérico	
Nb11	60 nM	540 nM	<i>E. coli</i>	Monomérico	Schoof et. al. (2020)
Nb6	41 nM	370 nM	<i>E. coli</i>	Monomérico	
Nb12	ND	0.7 nM	Linea celular Expi 293	Bivalente	
Nb15	ND	0.3 nM	Linea celular Expi 293	Bivalente	
Nb17	ND	79 pM	Linea celular Expi 293	Bivalente	Jiangliang et al. (2021)
Nb19	ND	66 pM	Linea celular Expi293	Bivalente	
Nb30	ND	1.9 nM	Linea celular Expi293	Bivalente	
VHH-72-Fc	ND	0.2 ug/L	<i>P. pastoris</i>	Bivalente	Wrapp et al. (2020)
H11-D4-Fc	ND	22 nM	Linea celular Expi293 y E.coli	Bivalente	Huo et al. (2020)
H11-H4-Fc	ND	6nM	Linea celular Expi293 y E.coli	Bivalente	
Nb56	ND	0.1 nM	Linea celular Expi293	Bivalente	Jiangliang et al. (2021)
aRBD-2-5	59.2 pM	~0.043 nM	Linea celular Expi 293F	Heterobivalente	Ma et al. (2021)
aRBD-2-7	0.25 nM	~0.11 nM	Linea celular Expi 293F	Heterobivalente	

3F-1B-2A	~0.047 nM	0.71 nM	<i>E. coli</i>	Trimérico	Dong et al. (2020)
1B-3F-2A	~ 0.095 nM	0.74 nM	<i>E. coli</i>	Trimérico	
Nb12	30 nM	65 pM	Linea celular Expi 293	Trimérico	Jiangliang et al. (2021)
Nb17	<0.0012nM	18 pM	Linea celular Expi 293	Trimérico	
Nb19	0.0351 nM	9pM	Linea celular Expi293	Trimérico	
Nb30	0.820 nM	1.8 nM	Linea celular Expi293	Trimérico	
Nb56	0.0382 nM	55 pM	Linea celular Expi293	Trimérico	
Tri-VHH-E	ND	0.17 nM	<i>E.coli</i>	Trimérico	Koenig et al. (2021)
Nb15	<0.016 nM	0.1 nM	Linea celular Expi 293	Trimérico	Jiangliang et al. (2021)
mNb6tri	<1 pM	120 pM	<i>E. coli</i>	Trimérico	Schoof et. al. (2020)

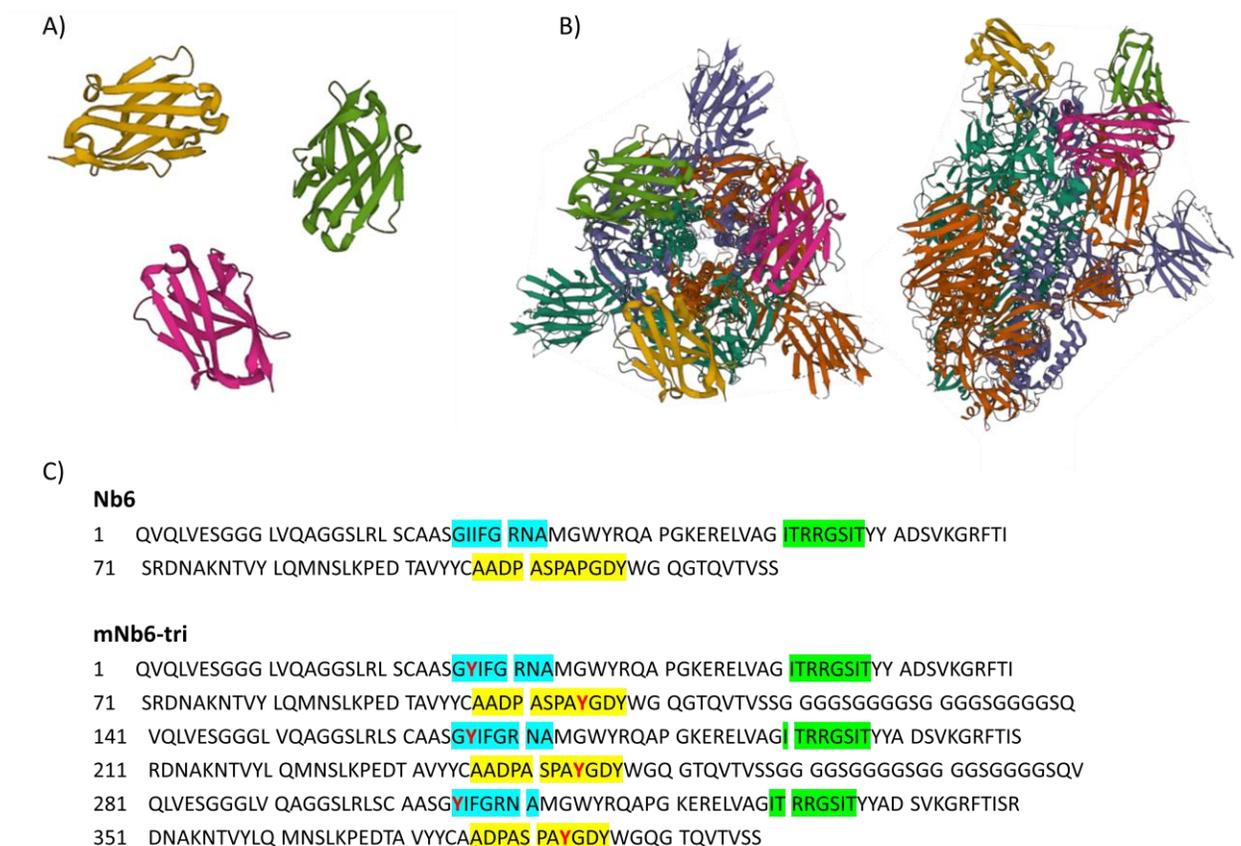
\***IC50**: Capacidad de neutralización

\* **ND**: No determinado.

### 1.3.5 Nanoanticuerpo mNb6-tri.

El nanoanticuerpo *mNb6-tri* tiene la particularidad de tener una conformación trivalente esto quiere decir que al ser trimérico (estar formado por tres moléculas idénticas del mismo nanoanticuerpo) (Figura 1.9A) formara tres enlaces con la proteína spike, lo que hace que sea mucho más potente que cualquier otro nanoanticuerpo estudiado hasta el momento. *mNb6-tri* es capaz de evitar la unión de ACE2 obstruyendo el sitio de unión y bloqueando los RBD en una conformación inactiva, este tipo de conformación hace referencia a los diferentes estados en los que se puede encontrar los RBD: de forma activa o inactiva(Figura 1.9B). Esta acción resulta interesante, ya que para otro tipo de nanoanticuerpo no había sido tan efectiva la unión durante

el estado inactivo (Schoof et al., 2020). *mNb6-tri* es una modificación del nanoanticuerpo monovalente Nb6 a través de la edición por mutagenesis de los aminoácidos I27Y (Ile27 → Tyr) en CDR1 y P105Y (Pro<sup>105</sup> → Tyr) en CDR3 (Fig. 1.9C) . Esta conformación permitió su unión a la proteína spike sin disociarse por 10 minutos; además, mantuvo la inhibición de SARS-CoV-2 después de la aerosolización, liofilización o tratamiento con calor por 1 hora a 50°C. Estas son de las características que lo hacen una de las mejores opciones para confrontar a este nuevo coronavirus, pues se ha demostrado la gran afinidad que tiene por su objetivo convirtiéndolo en un nanoanticuerpo ultra potente de acuerdo a Schoof y colaboradores, (2020).



**Figura 1. 9** A) Representación gráfica del nanoanticuerpo mNbb6-tri. B) Representación gráfica de la unión entre mMb6-tri y la proteína espiga del virus del SARS-CoV-2. C) Secuencia del nanoanticuerpo monovalente Nb6 comparada con la secuencia del nanaanticuerpo mNb6-tri, en color azul se observa CDR-1, en color verde CDR-2 y en color amarillo CDR-3. En la secuencia de mNb6-tri en rojo se observan los cambios de aminoácidos que se realizaron durante la técnica de mutagenesis. Tomado de schoof et al.,2020

#### 1.4 Sistemas de expresión de proteínas recombinantes.

Una proteína recombinante (PR) es aquella que, a diferencia de las proteínas de origen natural, pueden ser producidas en un organismo diferente al nativo o que haya sido introducida al organismo mediante la tecnología de DNA recombinante. Las PR pueden ser producidas en grandes cantidades, lo que las posiciona como una gran alternativa para la producción de biofármacos en el área médica (Serrano et al., 2006).

Para la expresión de proteínas recombinantes, como lo son los nanoanticuerpos, los sistemas bacterianos suelen ser los más utilizados, ya que las condiciones de cultivo resultan muy simples, es muy fácil su escalamiento, además, la purificación y aislamiento de producto reducen el costo de producción. El modelo más utilizado es *E. coli* debido al gran conocimiento de las funciones y características de dicha bacteria, la desventaja se encuentra en que muchas proteínas se vuelven insolubles como cuerpos de inclusión y para tratarse, es necesario el uso de reactivos agresivos y procedimientos de replegamiento de proteínas (Serrano et. al., 2006). , Recientemente se han obtenido concentraciones de nanoanticuerpos en bacterias como *E. coli* de aproximadamente 25 y 200 µg/mL obteniendo 1.67-13.33 mg de proteína por cada litro de cultivo (Iwaki et al.,2020)

Los sistemas de expresión de levaduras como *S. cerevisiae* y *P. pastoris* representan un gran valor industrial debido a los medios definidos en los que se producen y no es necesario remover endotoxinas bacterianas, lo que logra una reducción del costo de producción (Serrano et. al., 2006); sin embargo, en ocasiones los productos modificados no son aptos para el consumo humano ya que algunas modificaciones alteran los epitopos de las proteínas dando como resultado la reducción de la vida media de la proteína lo que disminuye su actividad terapéutica (Akbari et al., 2014). La producción de nanoanticuerpos también ha sido posible en levaduras como *Pichia pastoris*, obteniendo un rendimiento de 51.71 mg/L después de 96 h de cultivo (Chen et al., 2019).

Las líneas celulares de mamíferos suelen utilizarse como sistema de expresión para proteínas glicosiladas humanas, pues, resultan ser más estables y eficientes obteniendo proteínas con un rendimiento de alto nivel. A pesar de sus numerosas ventajas, el mantenimiento de la producción de proteínas en este sistema es más costoso comparado con el resto de los sistemas; además, el mantenimiento de las condiciones de producción resulta complicadas debido a los requerimientos nutrimentales, niveles de oxígeno y alta sensibilidad al estrés (Serrano et al, 2006;

Akbari et al., 2014).

La producción de PR en insectos es similar a los sistemas de mamíferos y tiene la ventaja de realizarse en cultivos estáticos o en suspensión. Aunado a esto, poseen una alta tolerancia a cambios de osmolaridad; sin embargo, tiene la limitante de las proteasas endógenas que llevan a una disminución de las concentraciones de producción (Ikonomou et al., 2003). Se han reportado rendimientos de proteínas recombinantes producidas en células S2 de insecto que van de 0.1-20 mg/L de cultivo. (Kollewe y Vilcinskas, 2013).

En cuanto a los sistemas basados en algas, estos resultan ser menos costosos comparados con las líneas celulares o de insectos, se tiene un excelente control experimental, con rápido crecimiento, un gran potencial para realizar modificaciones post traduccionales, y los costos de producción resultan más económicos en comparación a las plataformas antes mencionadas. En cuanto a las desventajas, son una tecnología naciente a diferencia de las otras plataformas (Akbari et al., 2014). Se ha reportado la producción de proteínas recombinantes en microalgas que van desde los 250-350 mg/L. (Franklin y Mayfield, 2005) En la tabla 1.3 se presenta una comparación de algunas características de los diferentes sistemas de expresión de proteínas recombinantes.

**Tabla 1. 3** Comparación de las características entre diferentes plataformas de expresión de proteínas recombinantes.

Características					
Plataforma de expresión	Costo de producción	Tiempo de producción	Capacidad de escalamiento	Capacidad de glucosilación	Riesgo de contaminación
Bacterias	Bajo	Corto	Alto	No	Endotoxinas
Levaduras	Medio	Medio	Alto	Si	Bajo
Células de mamíferos	Alto	Largo	Muy bajo	Si	Virus-Pirones
Células de insectos	Alto	Medio	Medio	Si	Alto
Microalgas	Muy bajo	Corto	Alto	Núcleo: Si Cloroplasto: No	Bajo

---

---

### 1.5 *Chlamydomonas reinhardtii* como modelo para la producción de nanoanticuerpos.

Las microalgas se han posicionado como un modelo de producción de proteínas recombinantes altamente viable (Scaife et al., 2015). Entre las microalgas, se encuentra *Chlamydomonas reinhardtii*, una microalga eucarionte fotosintética en donde se ha llevado a cabo la transformación y expresión de transgenes que codifican para anticuerpos monoclonales, antígenos para vacunas y proteínas terapéuticas. *C. reinhardtii* presenta una morfología ovoide de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  x 3  $\mu\text{m}$ , es biflagelada lo que le permite desplazarse y reproducirse. El 40% de su espacio intracelular lo ocupa un único cloroplasto con forma de copa (Fig 1.10). Puede ser cultivada heterotróficamente (en oscuridad con acetato como fuente de carbono), mixotróficamente (luz más acetato como fuente de carbono) y fototróficamente (con luz más  $\text{CO}_2$  como fuente de carbono). Crece a gran velocidad y tiene la capacidad de duplicar el número de células en un período de 8 hrs bajo condiciones de fotoperiodo de 12 hrs de luz y 12 hrs de oscuridad. Es capaz de ser transformada genéticamente en el núcleo, cloroplasto y mitocondrias a través de biobalística, electroporación o *Agrobacterium tumefaciens*. *C. reinhardtii* representa una opción altamente viable como plataforma de producción de proteínas recombinantes ya que es una plataforma segura “GRAS” (Generally Regarded As Safe, por sus siglas en inglés) lo que indica que está libre de contaminación viral o endotoxinas bacterianas (Rivera et al., 2011; Yusibov et al., 2016; Beltran et al., 2019). Algunas de las proteínas recombinantes que se han producido en *C. reinhardtii* abarcan la eritropoyetina para el tratamiento de la anemia, la aloficocianina contra el cáncer e incluso anticuerpos convencionales, como el 83K7C contra PA83 de *Bacillus anthracis* responsable del ántrax (Yusibov et al., 2016). En cuanto a los nanoanticuerpos únicamente se ha reportado un estudio donde se expresaron tres antitoxinas en el cloroplasto de *C. reinhardtii*. Estas antitoxinas se acumulan como proteínas solubles capaces de unirse y neutralizar la neurotoxina botulínica. La tecnología de transformación se realizó a través de biobalística utilizando microproyectiles de oro que fueron recubiertos con ADN plasmídico. (Barrera et al., 2015).

---

---

### 1.5.1 El promotor RIA3/PromC de la microalga *C. reinhardtii*.

El uso de promotores involucrados en la respuesta a condiciones de estrés en *C. reinhardtii*, es de gran utilidad para incrementar la expresión de proteínas recombinantes en el núcleo. En este sentido, Beltran et al. (2019) desarrollaron el promotor inducible por salinidad denominado RIA3/Promc C. Este promotor es quimérico, es decir, se encuentra compuesto PromC que comprende alpromotor Core y la región no traducida 5' (UTR) con un total de 938 pb así como a RIA3 de 577 pb que contiene elementos de respuesta a salinidad.

Posteriormente en 2020, se realizó un estudio por los mismos investigadores donde se puso a prueba el promotor quimérico RIA3/PromC, obteniendo aproximadamente 1.6 mg/g de biomasa fresca que representa el 17% del total de proteína celular por la línea transgénica inducido bajo tratamientos de NaCl y KCl, demostrando que es posible que un cultivo de *C. reinhardtii* produzca proteína recombinante nuclear a concentraciones altas además de no presentar actividad tóxica o efectos pleiotrópicos, además, se revelaron niveles más altos de actividad GUSPlus a concentraciones de 5 mM y 100 mM KCl, considerando que en otros estudios se han reportado un 21% de producción de proteínas a través del cloroplasto.

La importancia del promotor RIA3/PromC reside en que puede aumentar los niveles de expresión de proteínas en el núcleo; por lo tanto, puede ser fundamental para potenciar la producción de nanoanticuerpos en *C. reinhardtii* contra el SARS-COV-2.

## JUSTIFICACION

Los nanoanticuerpos son una gran herramienta ¿cual es la gran herramienta, la producción de nanoanticuerpos o los nanoanticuerpos? para la industria farmacéutica y un gran avance en el ámbito de la biotecnología, cuyo papel en la solución de problemas actuales se hace cada vez más visible e indispensable. Se ha reconocido el uso de los nanoanticuerpos para abordar diferentes aspectos del tratamiento y diagnóstico de numerosas enfermedades como las ocasionadas por los virus. Los nanoanticuerpos proporcionan una protección rápida son una gran alternativa para personas mayores, niños y personas inmunodeprimidas, donde una vacuna puede comprometer su salud; además, sus costos de producción resultan ser menores a otro tipo. Debido a las ventajas en la producción de los nanoanticuerpos, estos se convierten en una opción viable, adicional a las vacunas, para combatir la pandemia del SARS-CoV-2.

La mayoría de las proteínas recombinantes son expresadas en sistemas bacterianos, la plataforma mejor caracterizada hasta el momento; sin embargo, plataformas alternas que resulten viables económicamente, con mejores rendimientos y con menos potencial de contaminación, son deseables. Es por ello que, *C. reinhardtii* representa un sistema de expresión ideal para la producción de nanoanticuerpos ultrapotentes como *mNb6-tri* que bloquea al SARS-CoV-2. La producción de nanoanticuerpos en *C. reinhardtii* ya ha sido previamente reportada, lo que indica que dicho proceso es posible en esta microalga.

## **HIPÓTESIS**

La construcción de expresión *pmNb6-tri* ingresará a la célula de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* mediante la tecnología de biobalística y se integrará al genoma en múltiples copias

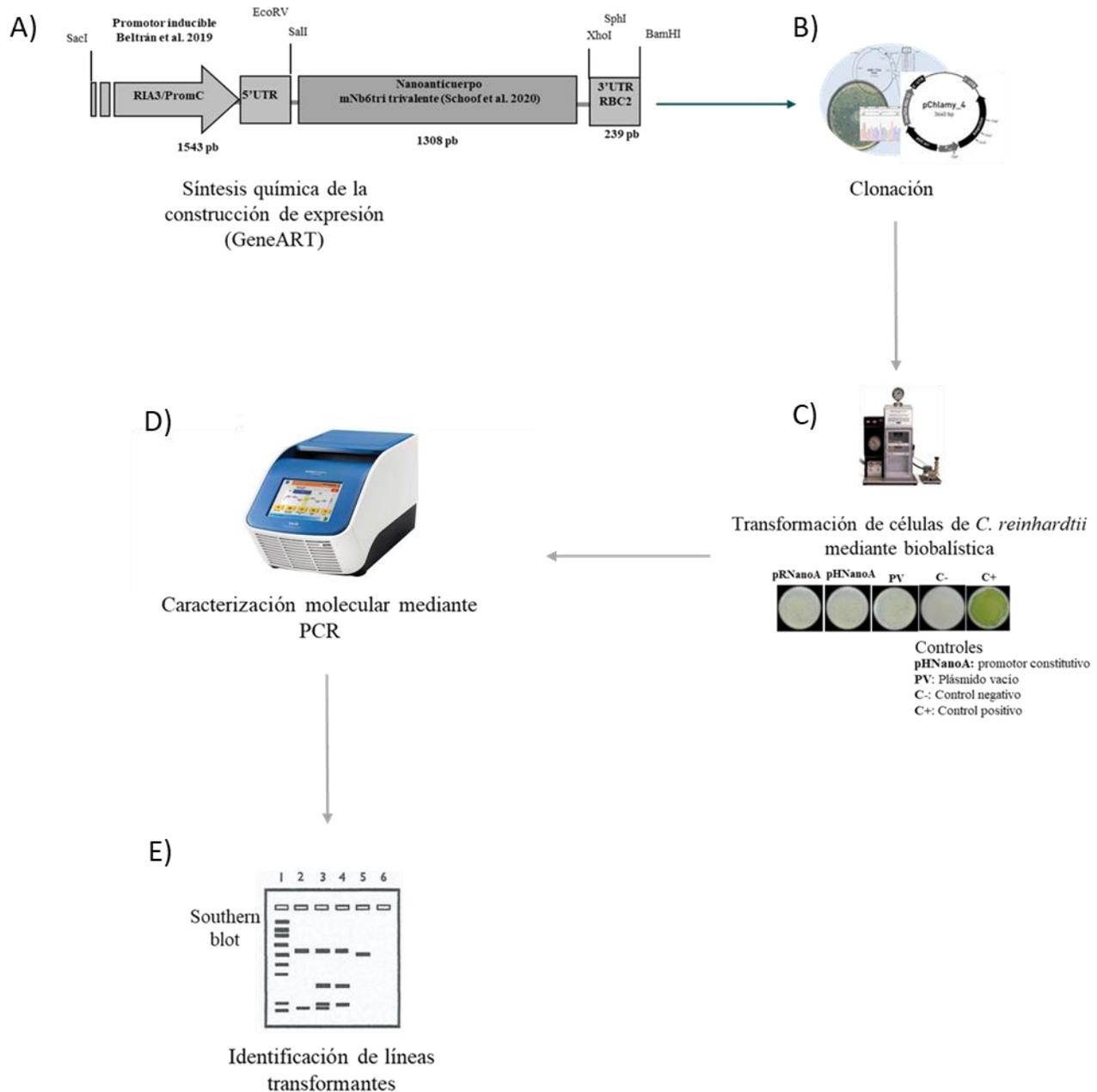
## **OBJETIVO GENERAL**

Transformar genéticamente a la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* con la construcción *pmNb6-tri* para la generación de diferentes líneas transgénicas

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Clonar la construcción de expresión *pmNb6-tri* en el vector pUC18 y validar sus componentes mediante análisis de restricción.
2. Detectar colonias transformadas de *C. reinhardtii* con la construcción de expresión *pmNb6-tri* en medio de selección y por PCR.
3. Evaluar la integración y el número de copias de *mNb6-tri* en *C. reinhardtii* para identificar diferentes líneas transgénicas.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



**Figura 1. 10** Estrategia experimental empleada para la transformación genética de *Chlamydomonas reinhardtii*. A) Estructura del constructo para la expresión de *pmNb6tri* generado por GeneART, B) Clonación de plásmido, C) Transformación de *C. reinhardtii* mediante biobalística, D) Caracterización molecular de colonias posiblemente transformadas a través de PCR D) Identificación de líneas transformantes por Southern Blot.

---

---

## CAPITULO II

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 Cepa y cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii*

La cepa silvestre 137c mt+ de *C. reinhardtii*, aislada en 1945 en Amherst, MA, fue utilizada y cultivada en condiciones de fotoperiodo de 16 hrs de luz/8hrs de oscuridad a 25°C en medio Tris-acetato-fosfato (TAP) líquido (Gorman & Levine, 1965, ANEXO I). Se creció el cultivo en matraces de 250 mL con un volumen de 50 mL de medio líquido TAP en agitación constante. Para el cultivo de *C. reinhardtii* en medio sólido se suministraron 25 mL de medio TAP con agar bacteriológico al 1.5%. Ambos medios de cultivo fueron previamente esterilizados a 121°C y 15 lb de presión por 12 minutos.

El antibiótico espectinomicina fue adicionado al medio de cultivo TAP a una concentración de 100 µg/ml como agente de selección. Todo el proceso previamente descrito fue llevado a cabo en condiciones asépticas en una campana de flujo laminar.

##### 2.1.1 Conteo celular de *C. reinhardtii*.

El conteo celular se realizó en un hemocitómetro partiendo de 900 µl del cultivo celular en condiciones estériles. Posteriormente se agregaron 100 µl de yoduro de potasio para la fijación de la muestra, después de 5 minutos se tomaron 15 µl de la muestra fijada y se procedió con el conteo.

El conteo consistió en determinar el número de células dentro de los cinco campos visuales en la cuadrícula pequeña, siguiendo el sentido de las manecillas del reloj. Se realizaron dos conteos por muestra, se obtuvo el promedio y se realizaron los cálculos para determinar el número de células por mL de cultivo y el número de células totales en un volumen de 50 ml de cultivo.

Para este procedimiento empleamos las siguientes formulas:

$$1) \quad C = (P) (50,000)$$

Donde,

---

C, es la cantidad de células/mL.

P, el promedio de número de células contadas.

## 2. CT: (C)(VT)

Donde,

CT, son las células totales.

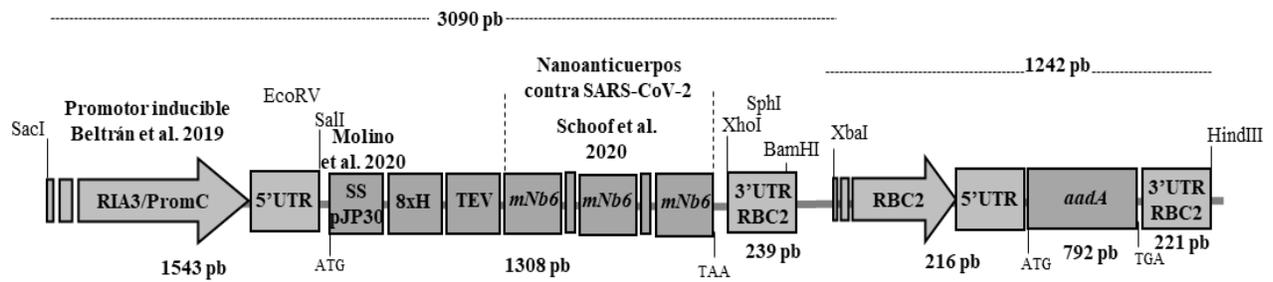
C, la cantidad de células/ml.

VT, el volumen total del cultivo.

### 2.2 Vectores de transformación.

#### 2.2.1 Vector *pmNb6tri*

Para la construcción del vector *pmNb6tri* se realizó la ligación del plásmido pUC18 de 2,685 pb con resistencia a ampicilina (Addgene) al casete de expresión que contenía al gen del nanoanticuerpo *mNb6tri*, sintetizado por la compañía GeneArt; una vez ligado el casete de expresión al plásmido pUC18, este quedó conformado de la siguiente manera: El promotor inducible RIA3/PromC (Beltrán et al., 2019), la región 5' UTR, el gen que codifica para el nanoanticuerpo *mNb6tri* con el uso de codón del ADN nuclear de *C. reinhardtii*. A este gen se le incorporó una secuencia para un péptido señal de secreción (Molino et al., 2020), una secuencia para una etiqueta de purificación de histidinas (8xH) y un sitio para una proteasa de cisteína (TEV). Esta construcción terminó con el 3' UTR de la subunidad RBC2 del núcleo de *C. reinhardtii*. Seguida a esta construcción de expresión se incorporó la construcción de expresión que contiene al gen *aadA* que codifica una nucleotidiltransferasa que confiere resistencia a los antibióticos espectinomicina y estreptomycin (Guzman et al., 2016). El esquema de la construcción con sus sitios de restricción se muestra en la figura 2.1.

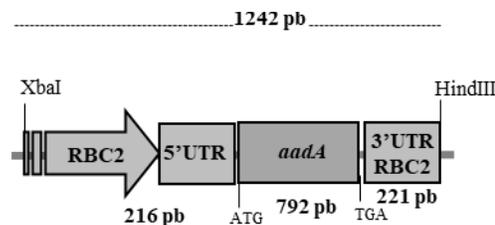


### *pmNb6tri chlamy*

**Figura 2. 1** Esquema gráfico del ensamblado de las construcciones de expresión *mNb6tri* y *aadA* para dar lugar al plásmido *pmNb6tri*. Las líneas verticales continuas señalan los sitios de restricción para las enzimas SacI, EcoRV, Sall, XhoI, SphI, BamHI, XbaI y HindIII. Las líneas discontinuas verticales indican el sitio donde se ubica el nanoanticuerpo trivalente *mNb6tri*, mientras que las líneas discontinuas horizontales indican el tamaño de las diferentes secciones.

#### 2.2.2 Vector *aadA*

El vector *aadA* fue ensamblado también en el plásmido pUC18, con la región 5'UTR de la subunidad RBC2 del núcleo de *C. reinhardtii*, la secuencia que codifica al gen de resistencia *aadA* y la región 3'UTR de la subunidad RBC2 del núcleo de *C. reinhardtii*. En la figura 2.2 se muestra el esquema de la construcción de expresión *aadA* con sus sitios de restricción.



**Figura 2. 2** Esquema de la construcción de expresión *aadA*. Las líneas verticales continuas señalan los sitios de restricción de las enzimas XbaI y HindIII. Las líneas discontinuas horizontales indican el tamaño de la sección

Para la clonación de cada plásmido se utilizó a la bacteria *E. coli* cepa DH5a siguiendo el método descrito por Bobe y Kent (1996), modificando el tiempo de choque termico a 45 seg.

---

### 2.3 Verificación de las construcciones de expresión

Para verificar que las construcciones de expresión fueron generadas de manera correcta, se realizó su verificación a través de una digestión enzimática. El ADN plasmídico se cuantificó con un Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, DE, USA). La digestión del plásmido se llevó a cabo en un tubo Eppendorf de 1.5 ml con los siguientes componentes: 1 µg de ADN plasmídico, 3 µL del buffer cutsmart de NEB, 1 µL de la enzima de restricción, y H<sub>2</sub>O (grado biología molecular) para llegar a un volumen final de 30 µL. Seguidamente, se realizó una incubación a 37°C por 2 horas en un ThermoStat plus marca Eppendorf. Las enzimas de restricción que se utilizaron fueron XbaI, HindIII, SacI, BamHI, SacI y HindII. Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (90V por 30 minutos) para fraccionar el ADN digerido. El gel se preparó con 30 mL de buffer TAE 1X, 0.3 g de agarosa y 3 µL de bromuro de etidio al 1%. Para determinar el tamaño de los fragmentos se utilizó un marcador de peso molecular GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

### 2.4 Transformación del núcleo de *Chlamydomonas reinhardtii*

Para la transformación genética de *C. reinhardtii* mediante biobalística se realizó un conteo celular de un cultivo de la cepa 137mt+ en medio TAP líquido con 7 días de crecimiento (ver sección 2.1.1). Se utilizaron 100 millones de células para cada caja petri conteniendo 25 mL de medio sólido TAP. Con un asa acodada se dispersaron las células en el centro de la caja y se dejaron secar por aproximadamente 30 min.

En total 11 cajas de petri fueron empleadas, cinco para los experimentos de bombardeo con el plásmido pmNb6tri, tres para el control positivo y tres para el negativo. El control positivo del crecimiento de las células fue la cepa 137mt+ sin bombardear y en medio sin antibiótico, y el control negativo consistió de la misma cepa sin bombardear pero con la aplicación del antibiótico. El bombardeo de las células se llevó a cabo con micropartículas de oro de 0.6 µm recubiertas con el plásmido que contiene al nanoanticuerpo *pmNb6tri*. Previo al proceso de transformación, las micropartículas se mezclaron usando un vortex y se adicionó una cantidad de plásmido correspondiente a 5 µg más 50 µl de CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O(2.5M), y espermidina (0.1M), esta mezcla se incubó en hielo por 20 minutos, mezclando cada 4 minutos con ayuda del vortex. Al

---

transcurrir el tiempo de incubación se añadieron 200  $\mu$ l de etanol absoluto, se centrifugó 1 min a 13,000 rpm y se descartó el sobrenadante; se repitió este último paso hasta completar 5 lavados, finalmente, la pastilla se re suspendió en 30  $\mu$ l de etanol al 100% y se mantuvo en hielo hasta su uso. Posteriormente, 5  $\mu$ l de la suspensión (partículas de oro más el plásmido) fueron depositados en las membranas macroacarreadoras y se secaron en papel estéril. Una membrana macroacarreadora fue requerida por cada disparo. El bombardeo se realizó en una cámara de biobalística de BioRad a una presión de vacío de 29 in Hg con membranas de ruptura de 1100 psi utilizando helio (He) como gas acarreador para generar una presión de 1300 psi, según las instrucciones del manual de BioRad. Las cajas bombardeadas y los controles, se incubaron a 25°C en luz indirecta por aproximadamente 1 día para darles un periodo de recuperación. Una vez transcurrido el periodo de recuperación, se procedió al lavado de las cajas utilizando 2000  $\mu$ L de medio TAP líquido, los cultivos recuperados fueron plaqueados en cajas de petri con medio TAP sólido y espectinomicina a una concentración de 100  $\mu$ g/ml. Tanto los controles como las cajas bombardeadas se separaron en una concentración de aproximadamente 50 millones de células por caja de Petri. Las condiciones de cultivo fueron de 16 hrs luz/8 hrs de oscuridad y 25°C de temperatura.

Transcurridos aproximadamente 21 días, las colonias que se observaron mejor definidas en las cajas bombardeadas fueron cultivadas en matraces de 50 mL con 10 mL de medio líquido TAP y espectinomicina (50  $\mu$ g/ml) con agitación constante (100 rpm) por aproximadamente 7 días. Una muestra del cultivo fue tomada después de los 7 días y se plaqueo en medio TAP sólido con espectinomicina a 100  $\mu$ g/mL para resguardar a 16°C. La parte restante se resguardo a -20°C para llevar a cabo una extracción de DNA genómico.

## **2.5 Extracción de ADN genómico.**

La extracción del ADN genómico (ADNg) se realizó en 11 muestras putativamente transformadas con *pmNb6tri* utilizando el kit comercial Illustra DNA Extraction Kit PHYTOPURE de GE Healthcare. El ADN genómico fue resuspendido en un volumen final de 80  $\mu$ L de Buffer TE y un tratamiento con RNasa A a 37°C por 20 minutos fue posteriormente aplicado. La integridad de las muestras fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñida con bromuro de etidio; la electroforesis se realizó a 90V por 40 minutos. La concentración de ADN en ng/ $\mu$ L fue determinada con el Espectrofotómetro NanoDrop Lite de Thermo Scientific.

## 2.6 Diseño de iniciadores

Un juego de iniciadores específicos para el gen *mNb6tri* fue diseñado y sintetizado por la compañía Sigma-Aldrich. Las características de los oligonucleótidos se presentan en el cuadro 2.1. Estos iniciadores fueron empleados para la identificación de colonias de *C. reinhardtii* genéticamente modificadas.

**Tabla 2. 1.** Características de los iniciadores diseñados y utilizados para la PCR.

Nombre del Oligo	T <sub>m</sub>	GC%	Secuencia	Tamaño del amplicón
mNb6tri (F)	71.3	60	TACATCTTCGGCCGGAACGC	220 pb
mNb6tri (R)	67.1	65	GGTCCGCAGCGCAGTAGTAG	

## 2.7 Amplificación de mNb6tri por PCR

Para la confirmación de las colonias transformadas genéticamente con mNb6tri, se realizó una PCR usando los iniciadores previamente descritos. Para cada reacción de PCR se utilizó 1 µg de ADN<sub>g</sub>, en una mezcla de reacción que contenía 5 µL de Buffer (10x), 3 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µL de dNTP's (10mM), 1 µL de cada oligo (sentido y antisentido, 10 µM), 33.8 µL de H<sub>2</sub>O ultra pura y 0.2 µL de Taq Polimerasa, obteniendo un volumen final de 50 µl por reacción. Como control negativo se utilizó H<sub>2</sub>O ultra pura y como positivo ADN plasmídico (pmNb6tri). Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador Veriti 96-Well thermal Cycler de Applied Biosystems, con las siguientes condiciones: una predesnaturalización a 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, una alineación a 60°C por 30 segundos y una elongación a 72°C por 30 segundos. Una etapa final de elongación de 5 minutos a 72°C fue adicionada. El producto amplificado fue observado en una electroforesis en gel de agarosa al 1% (A 90 V por 40 minutos) teñido con bromuro de etidio. El tamaño esperado del producto amplificado fue estimado en relación al marcador de peso molecular 1 Kb plus.

## 2.8 Detección de transgen *mNb6tri* en líneas de *C. reinhardtii*

A partir de 10 µg de ADN genómico de colonias transformadas y de la cepa silvestre, se realizó una triple digestión con las enzimas de restricción Bam HI/StuI/NruI en un volumen de 0.5 µL, 1 µL y 0.5µL, respectivamente. Se emplearon 3 µL de Buffer 3.1 de la marca NEB; y H<sub>2</sub>O ultra pura para obtener un volumen final de 30 µL. Para el control positivo se utilizaron aproximadamente 2 µg de ADN plásmido en una reacción que contenía 0.5 µL de la enzima Eco RV, 3 µL del Buffer 3.1 de la marca NEB y H<sub>2</sub>O ultra para obtener un volumen final de 30 µl. Posterior a la digestión, con la finalidad de detectar el transgen *mNb6tri* en colonias transformadas de *C. reinhardtii* fue necesario el marcaje de una sonda de ADN por PCR, donde, se utilizó la polimerasa termoestable “Taq Expand Long Template” que permite la incorporación de desoxinucleótidos de uracilo marcados con digoxigenina “DIG-dUTP” (ROCHE) conforme se amplifica la región que corresponde al gen *mNb6tri*. La reacción se llevó a cabo de la siguiente manera: 5 µL del plásmido *pmNb6tri* (1 ng), 1 µL de cada iniciador (tabla 2.1), 2 µL de buffer de reacción expand 10X, 2 µL de la mezcla de dNTP's (2.0 mM de dGTP, dCTP, dATP, 1.3 mM dTTP y 0.7 mM DIG-dUTP), 0.3 µL de Taq Expand Long Template (1.5U), y se utilizó agua ultra pura para obtener volumen de reacción final de 20 µl. El programa de PCR empleado fue el siguiente: un ciclo de pre-desnaturalización de 3 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineación a 60°C por 30 segundos, elongación a 68°C por 30 segundos y una etapa final de elongación a 72°C por 5 minutos.

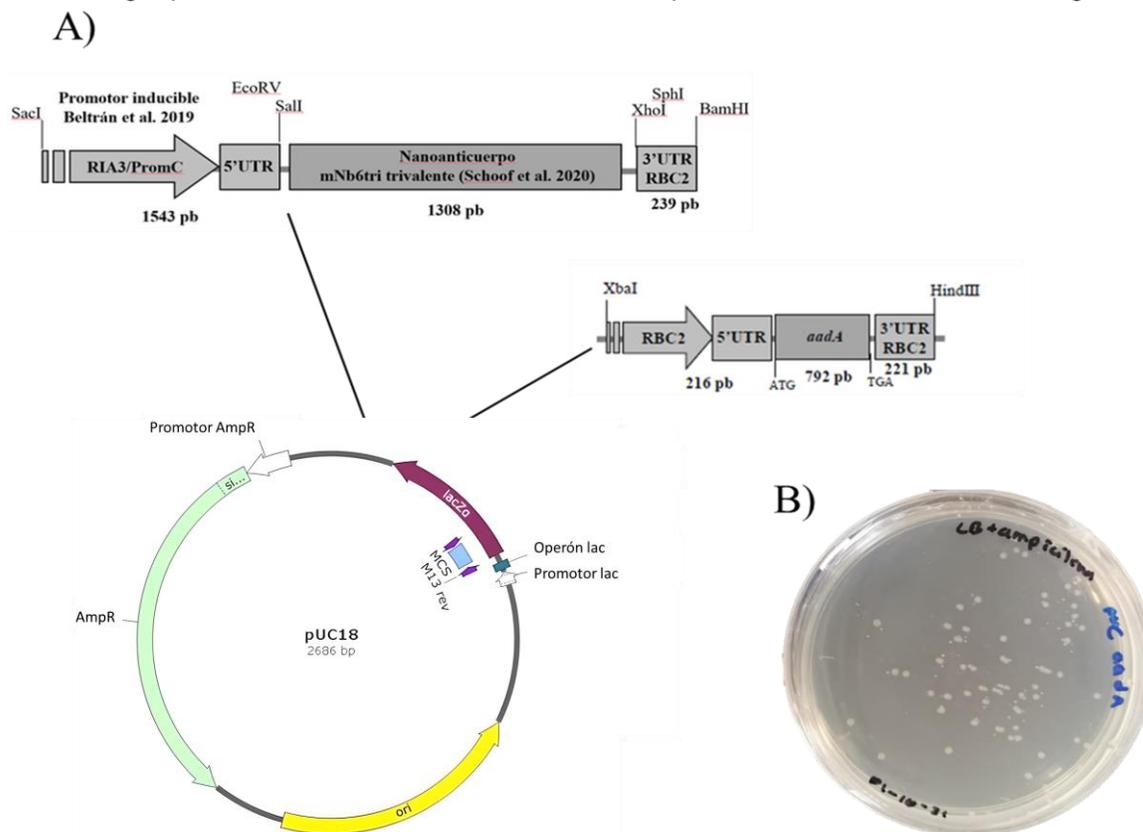
El volumen total de la reacción (20 µl) fue visualizado en un gel de agarosa al 1% a 90V por 30 minutos. La banda obtenida fue purificada utilizando el kit “QIAquick Gel Extraction” (QIAGEN, Hilden, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El producto purificado fue resuspendido en un volumen final de 53 µL de buffer de elución EB proporcionado en el kit de QIAGEN. Posteriormente, fue cuantificado utilizando el NanoDrop Lite (Thermo Scientific) y verificado en un gel de agarosa al 1% a 90V por 30 minutos, utilizando 2µl del producto de PCR. Una vez obtenida la sonda, se procedió a llevar a cabo la técnica de southern blot siguiendo el “DIG Application Manual for filter Hybridization” de ROCHE.

## CAPITULO III

## 3. RESULTADOS

3.1. Clonación de las construcciones *mNb6tri* y *aadA* en el plásmido pUC18.

La clonación de las construcciones *mNb6tri* y *aadA* en el plásmido pUC18 fue logrado de manera exitosa al obtener colonias de células blancas en las cajas Petri. Las colonias blancas contienen el plásmido recombinante donde se insertó exitosamente el fragmento de interés y se interrumpió el gen *lacZ*; por lo tanto, fueron incapaces de producir a la enzima  $\beta$ -galactosidasa que hidroliza al sustrato X-gal presente en el medio. Dichas colonias pueden ser observadas en la figura 3.1.

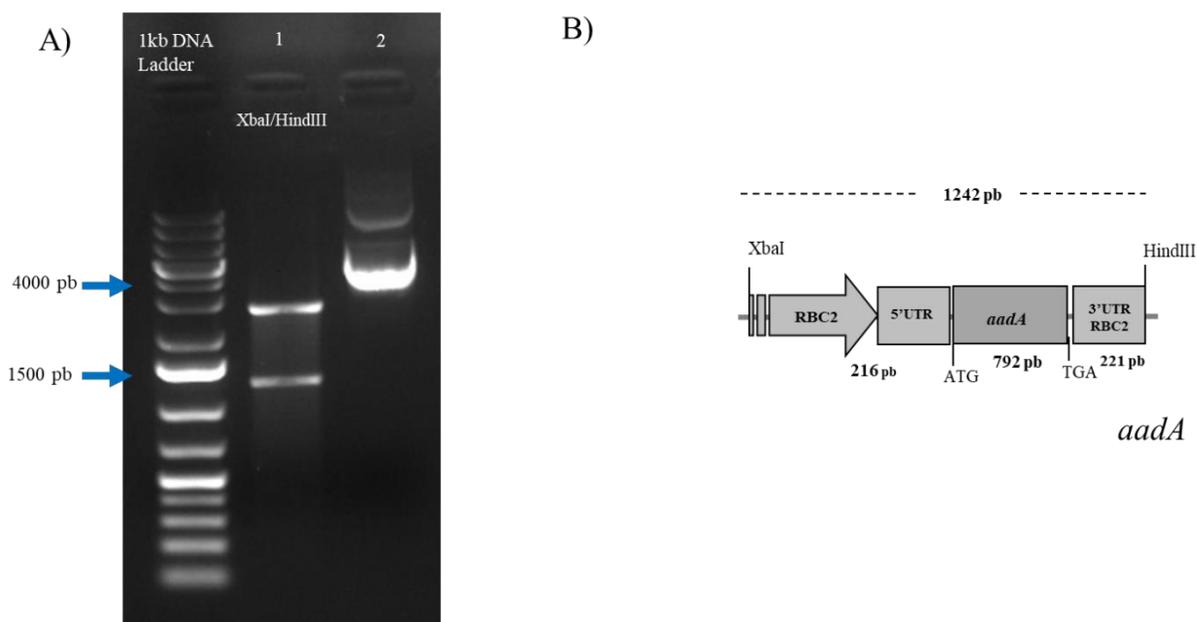


**Figura 3. 1** Resultados de la clonación de las construcciones de expresión de *mNb6-tri* y *aadA*. A) Esquema de las construcciones de expresión *mNb6-tri* y *aadA* que fueron ligados al plásmido pUC18. B) Resultados de la transformación del plásmido recombinante en *E. coli* DH10B. El gen *aadA* codifica para la enzima adenyltransferasa que confiere resistencia al antibiótico espectinomocina. Las colonias blancas indican posibles eventos de transformación.

### 3.2 Verificación de los vectores de transformación pmNb6tri y *aadA*.

#### 3.2.1 Vector *aadA*.

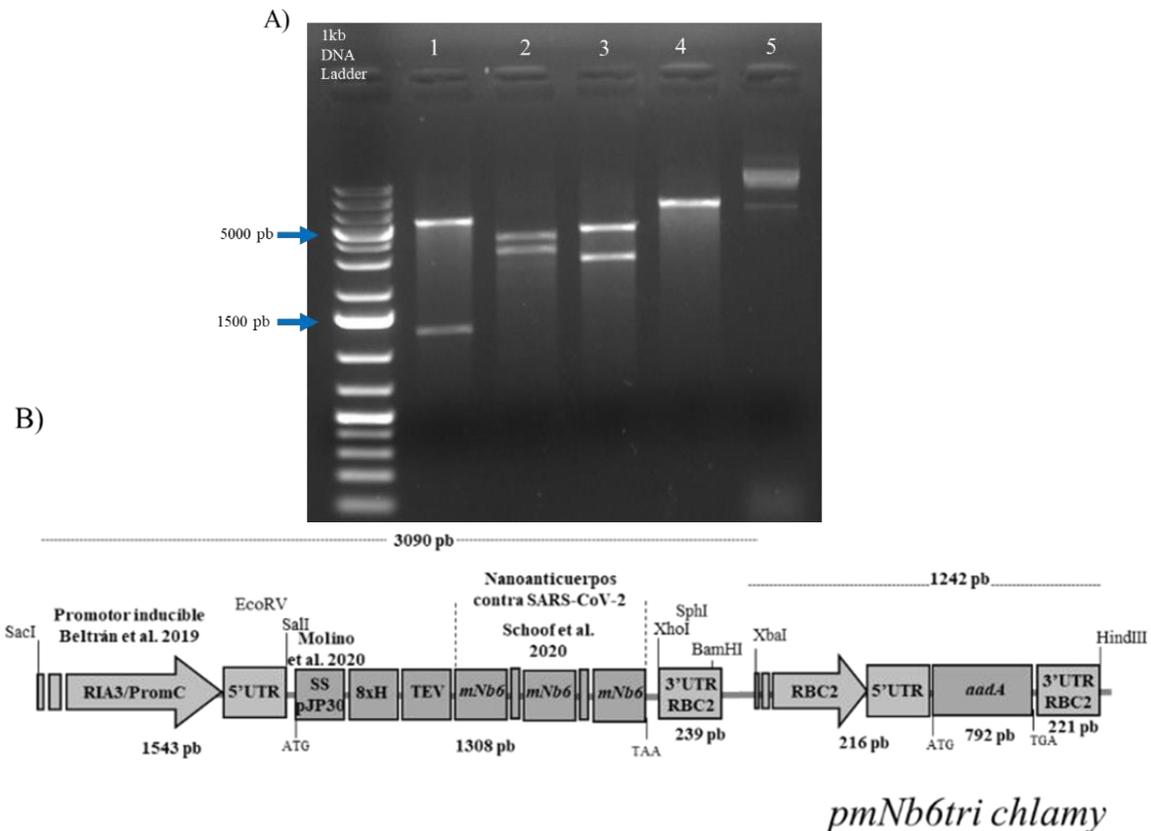
En la figura 3.2A, se muestra el resultado de la verificación del vector de transformación *aadA* a través de digestiones enzimáticas con XbaI y HindIII. En el carril número 1 se observan dos bandas, una de ellas corresponde al plásmido pUC 18 con un tamaño de 2,686 pb, mientras que la otra, al constructo de expresión *aadA*, con un tamaño de 1,242 pb. Estos resultados confirmaron la integración exitosa del gen *aadA* al vector pUC 18. Respecto al carril número 2, se observa las bandas correspondientes al plásmido circularizado sin digerir con un tamaño de 3,915 pb. La imagen 3.2 B, representa las partes que conforman la construcción del vector *aadA*, su tamaño y sitios de restricción.



**Figura 3. 2** Verificación de la construcción de expresión *aadA* en el plásmido pUC18. A) Electroforesis en gel de agarosa de la digestión del plásmido recombinante pUC18-*aadA* con las enzimas XbaI/HindIII. Carril 1: el fragmento de 2686 pb corresponde al plásmido pUC18, mientras que el fragmento de 1242 pb, al gen *aadA*. Carril 2: plásmido pUC18+*aadA* sin digerir. B) Esquema de la construcción de expresión *aadA* que representa su conformación, sitios de restricción y tamaño.

### 3.2.2 Vector *pmNb6tri*

Con respecto a la verificación del ensamblado del vector *pmNb6tri*, los resultados se presentan en la figura 3.3A. En el carril 1 se muestra la digestión de *pmNb6tri* con las enzimas XbaI/HindIII, las bandas corresponden a la construcción de expresión *aadA* con un tamaño de 1,242 pb y la banda de 5,776 pb corresponde al plásmido pUC18 y al constructo de expresión *mNb6tri* de 3,090 pb que se puede observar en el esquema de la figura 3.3B. En el carril número 2 se comprobó que el constructo de expresión *mNb6tri* estuviera presente en el vector realizandouna digestión con las enzimas SacI y BamHI. Las bandas resultantes corresponden a *mNb6tri* con un tamaño de 3,090 pb y al resto del vector pUC18 que contiene el constructo de expresión *aadA* con un tamaño de 3928 pb. En el carril número 3 se realizó la verificación con las enzimas SacI y HindIII, cuyos sitios de corte comprende a las construcciones de expresión *mNb6tri* y *aadA* con un



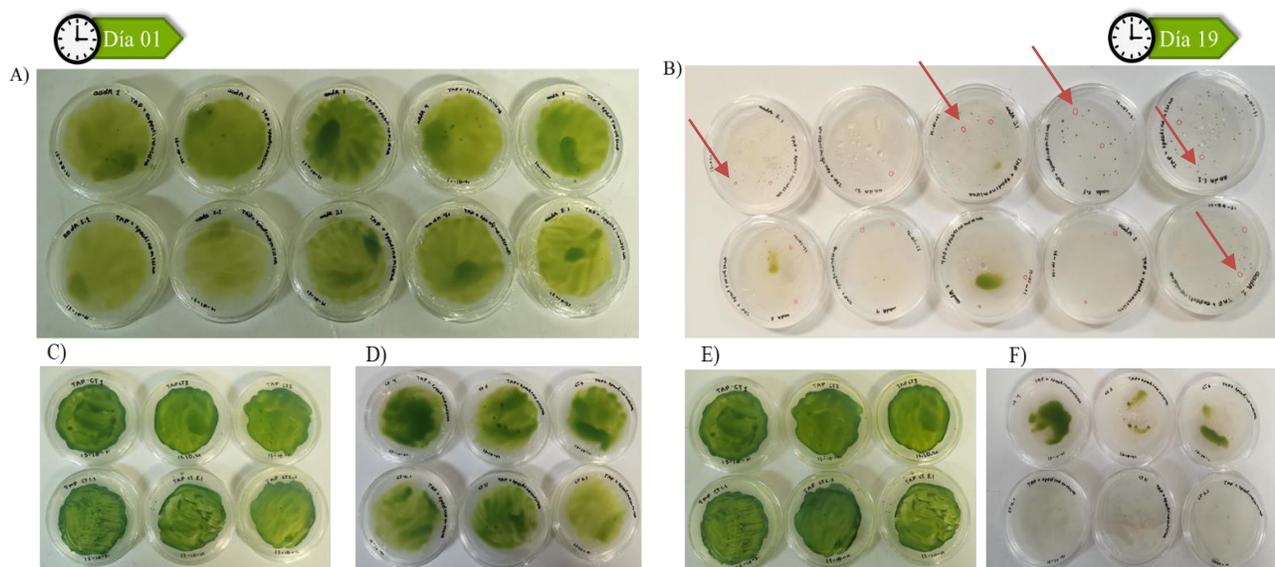
**Figura 3. 3** Verificación del ensamblado de las construcciones de expresión *pmNb6tri* y *aadA* en el plásmido pUC18. A) Electroforesis en gel de agarosa de diferentes digestiones del vector *pmNb6tri chlamy*. Carril 1: digestión del plásmido pUC18 con XbaI/HindIII. Carril 2: digestión de pUC18 con SacI/BamHI. Carril 3: digestión del plásmido pUC18 con SacI/HindIII. Carril 4: digestión del plásmido pUC18 con SacI. Carril 5: plásmido pUC18 sin digerir. B) Esquema del ensamblaje de las construcciones de expresión *mNb6tri* y *aadA* para dar lugar al plásmido *pmNb6tri* y que incluyen los incluyendo sitios de restricción y los tamaños de diferentes secciones.

tamaño de 4,332 pb, mientras que la segunda banda corresponde al plásmido pUC18 con 2,686 pb. En el carril número 4 se observa una única banda que corresponde a la digestión de *pmNb6tri* con la enzima *SacI*, finalmente, en el carril número 5, la banda corresponde a *pmNb6tri* sin digerir con un tamaño de 7,018 pb.

### 3.3 Transformación de *C. reinhardtii* mediante biobalística.

#### 3.3.1 Transformación de *C. reinhardtii* con *aadA*.

Después de confirmar el ensamblado correcto de cada uno de los vectores, se procedió con la transformación de *C. reinhardtii*. En la figura 3.4A se pueden observar células de *C. reinhardtii* bombardeadas al primer día. Las primeras colonias posiblemente transformadas después de transcurridos 10 días a partir del bombardeo. En la figura 3.4B se presentan las cajas bombardeadas después de 19 días, donde se lograron identificar colonias mucho más definidas. En la figura 3.4C se observan los controles positivos que después de 19 días (figura 3.4E) se puede confirmar que continuaron con su crecimiento usual, mientras que las células de la cepa silvestre de los controles negativos (Figura 3.4D, 3.4F) al transcurso de los 19 días fueron muriendo debido al contenido de antibiótico en el medio. Para comprobar la transformación

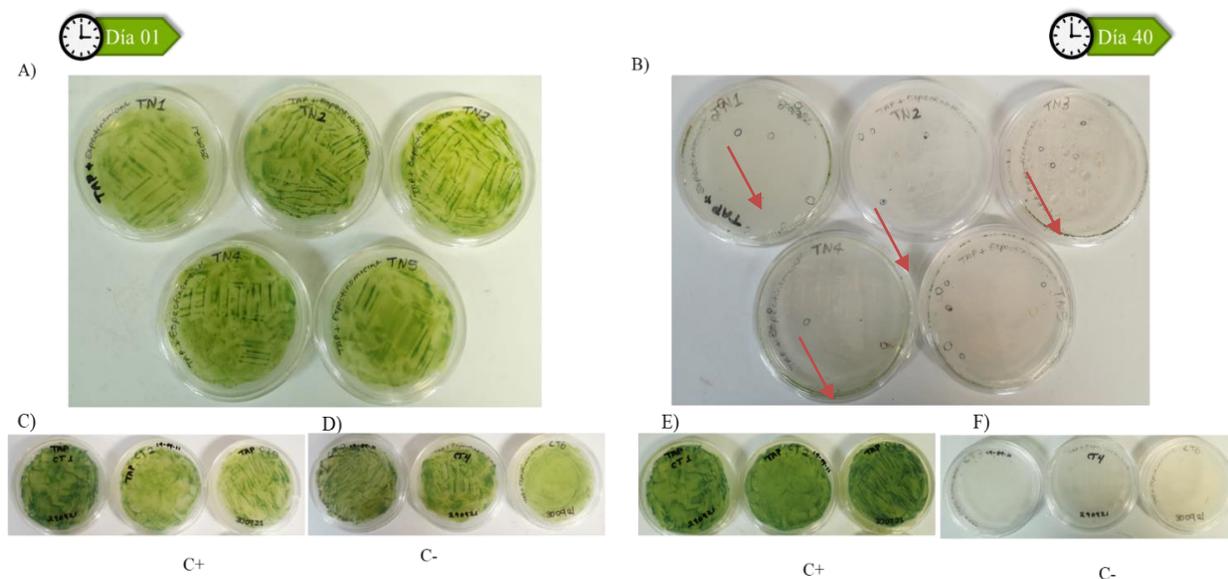


**Figura 3. 4** Transformación de *C. reinhardtii* con el gen *aadA* utilizando la técnica de biobalística. A) Células de *C. reinhardtii* en medio TAP suplementado con espectinomycin después de 1 día y B) 19 días del proceso de transformación. C+: control positivo (cepa silvestre en medio TAP sin antibiótico) C-: control negativo (cepa silvestre en medio TAP con antibiótico). Las flechas en la figura indican algunas de las colonias posiblemente transformadas.

exitosa de las colonias se tomaron dos colonias de cada caja de Petri, y se sembraron en medio TAP con espectinomicina (50 µg/ml). Transcurridos aproximadamente 7 días, se realizó la colecta y la extracción de ADNg.

### 3.3.2 Transformación de *C. reinhardtii* con *pmNb6tri*

En la figura 3.5A se observa la transformación de *C. reinhardtii* con el plásmido *pmNb6tri*, en este caso, se observaron algunas colonias posiblemente transformadas aproximadamente después de 40 días a partir del bombardeo (figura 3.5B), mientras que el crecimiento de las células de la cepa silvestre de los controles positivos (figura 3.5C, 3.5BE) se dio de la manera esperada, en los controles negativos (figura 3.5D-, 3.5BF) se observa claramente que las cajas petri que contenían las células silvestre en medio TAP adicionado con antibiótico murieron durante el transcurso de los 40 días, al igual que en la transformación con el vector *aadA*, se seleccionaron colonias posiblemente transformadas y se crecieron en medio TAP liquido con espectinomicina

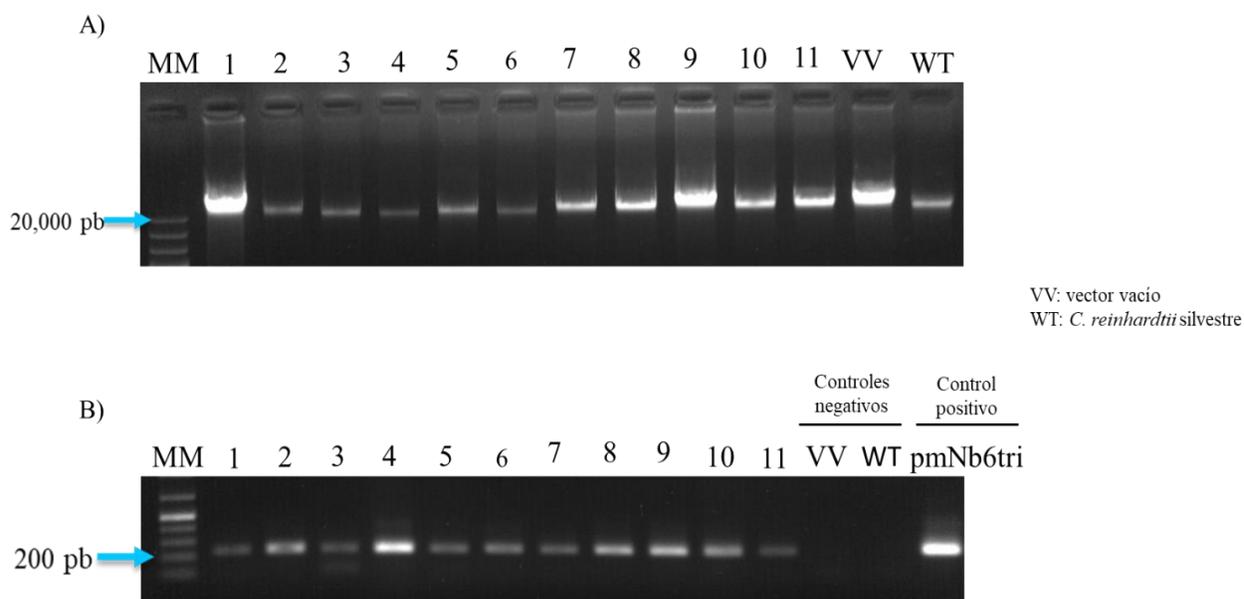


**Figura 3. 5** Transformación de *C. reinhardtii* con el vector *pmNb6tri* utilizando la técnica de biobalística. A) Células de *C. reinhardtii* en medio TAP suplementado con espectinomicina después de 1 día y B) 40 días del proceso de transformación. C+: control positivo (cepa silvestre en medio TAP sin antibiótico) C-: control negativo (cepa silvestre en medio TAP con antibiótico). Las flechas en la figura indican algunas de las colonias posiblemente transformadas.

### 3.3.3 Confirmación de la transformación de *C. reinhardtii*

Se seleccionaron 11 colonias a partir de la transformación con biobalística y se cultivaron en medio TAP líquido, después de 7 días, se colectaron las células y se realizó la extracción de ADN genómico de las 11 muestras posiblemente transformadas con *pmNb6tri*, así mismo se incluyó una muestra de células posiblemente transformadas con el vector *aadA* (Vector vacío, "VV") y de la cepa silvestre de *Chlamydomonas reinhardtii* (Wild type "WT"). Como se puede observar en la figura 3.6A, el ADN extraído de las 11 muestras tuvo muy buena integridad.

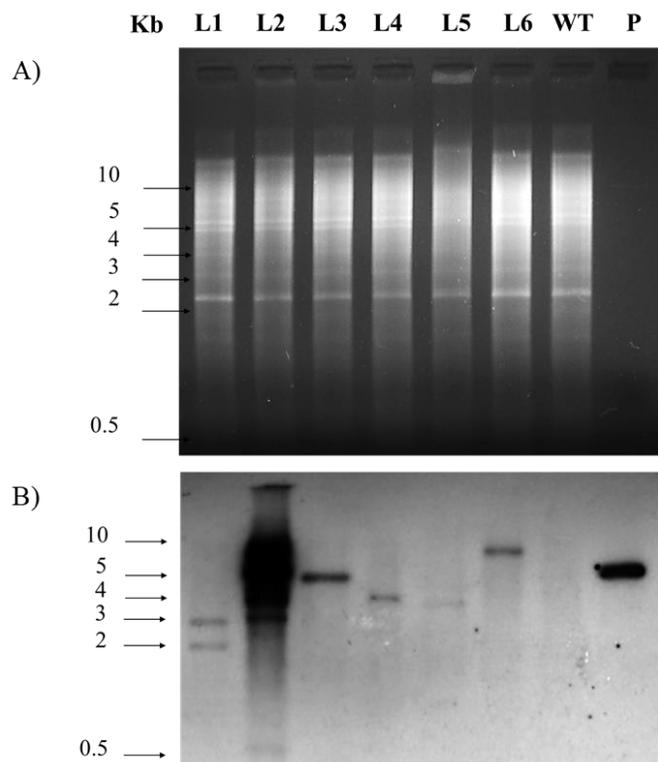
Con la finalidad de determinar la presencia del transgen *mNb6tri* en las colonias de *C. reinhardtii* crecidas en el medio de selección, se realizó una PCR con iniciadores específicos para *mNb6tri*. Los resultados revelaron un fragmento de aproximadamente 220 pb en las 11 muestras analizadas (figura 3.6B).



**Figura 3. 6** ADNg y confirmación de colonias transformadas con el casete de expresión *pmNb6tri*. A) ADNg obtenido de células de *C. reinhardtii* sometidas al proceso de transformación B) Detección por PCR de colonias de *C. reinhardtii* transformadas con el gen *mNb6tri*. La flecha azul indica el amplicón de aproximadamente 220 pb del gen *mNb6tri*. VV: vector vacío que carece de la construcción *mNb6tri*; WT: cepa silvestre sin bombardear. \**pmNb6tri*: vector de transformación.

### 3.4. Análisis de colonias transformadas mediante Southern blot.

Para la detección del transgen *mNb6tri* se seleccionaron y evaluaron por Southern blot seis clonas previamente confirmadas por PCR. En la figura 3.7A se observa el resultado de la digestión con las enzimas BamHI/StuI/NruI del ADNg de las clonas confirmadas por PCR. En el carril 1 al 6 se presenta la digestión de las 6 clonas, en el carril 7 se encuentra la cepa silvestre digerida con EcoRV como control negativo, ya que al no estar transformada genéticamente no se debería de observar ninguna banda en dicho carril al momento de obtener los resultados del para southern blot y por último en el carril 8, se encuentra la digestión del plásmido *pmNb6tri* (P) como control positivo de la técnica. Los resultados revelaron seis líneas transgénicas diferentes, siendo la línea 2 (L2) la que presentó mayor número de copias incorporadas en su genoma, seguida de la línea 1 (L1) con dos copias y las líneas 3, 4, 5 y 6 (L3-L6) con al menos una copia (Fig. 3.7B). Siguiendo el patrón de bandas obtenidas en el southern blot se puede inferir que cada clona proviene de un evento único de transformación; por lo tanto, se pueden denominar líneas transgénicas independientes (Fig. 3.7B).



**Figura 3. 7** Evaluación de la incorporación del transgen *mNb6tri* en el genoma de *Chlamydomonas reinhardtii*. A) Resultado de la digestión con las enzimas BamHI/StuI/NruI del ADNg de seis líneas transgénicas. B) Southern blot que muestra el número de copias de *mNb6Tri* en las seis líneas transgénicas evaluadas. WT: *C. reinhardtii silvestre*; P, plásmido *pmNb6Tri* digerido con EcoRV

## CAPITULO IV.

### 4.DISCUSIÓN.

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación se logró confirmar que a través de biobalística la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* es capaz de integrar en su genoma nuclear múltiples copias de la construcción de expresión *pmNb $\delta$ tri* que codifica para un nanoanticuerpo trivalente.

A pesar de que la modificación genética de *C. reinhardtii* para la producción de proteínas recombinantes es más común en el cloroplasto (Torres et al.,2022), se han reportado diversos estudios donde se ha logrado exitosamente la transformación del núcleo para obtener diversas proteínas recombinantes como el antígeno P24-HIV (Barahimipor et al., 2016), el péptido antimicrobial 3xMytichitin-A (Dong et al.,2017) y el interferón alfa 2a (IFN-a2a) (El-ayouty et al., 2019), demostrando que a través de la modificación genética nuclear, *C. reinhardtii* es capaz de ser utilizada como una biofábrica para la obtención de diversas proteínas de interés biotecnológico.

Para la expresión de proteínas recombinantes, los sistemas que suelen utilizarse son las bacterias, levaduras, plantas y células de mamífero (Kögler et al., 2020; Puthenveetil et al., 2020; García-Suárez et al., 2021; Schillberg y Spiegel, 2022), sin embargo, estas tecnologías suelen presentar algunas desventajas y limitaciones que en ocasiones dificultan su producción. Por ejemplo, en el caso de las bacterias, son incapaces de realizar modificaciones postraduccionales, por lo que suelen tener problemas para producir proteínas eucariotas (Zhang et al., 2021) , mientras que, las levaduras a pesar de tener la ventaja de realizar dichas modificaciones; los niveles expresión de proteínas recombinantes suele ser baja (Baghban et al., 2019). Por otra parte, las células de mamífero al tener la maquinaria ideal para la modificación de proteínas, podría ser la alternativa perfecta para su producción; sin embargo, su cultivo es complejo, lo que ocasiona que los costos de producción se eleven en comparación con otras plataformas de expresión (Gray, 2001). Las plantas también ofrecen la posibilidad de producir proteínas recombinantes a menor costo; sin embargo, debido a sus largos ciclos de crecimiento pueden llevar meses antes de ser capaces de obtener la proteína deseada (Chen y Davis, 2016). Las microalgas surgen como una opción viable gracias a su rápida división celular y crecimiento fotosintético. Estas ventajas permiten escalar fácilmente la producción de proteínas

recombinantes a bajos costos y con bajo riesgo de contaminación por endotoxinas, virus o pirones (Scaife et. al, 2015). Su capacidad de mantener el cultivo bajo condiciones controladas asegura que no haya contaminación cruzada con cultivos alimentarios, que es una de las principales preocupaciones en cuanto a la producción de plantas transgénicas (Manuell et al., 2007).

El cassette de expresión sintético incluye el gen *mNb6tri*, las secuencias 5'UTR y la región 3'UTR del gen nuclear RBCS2 de *C. reinhardtii*; el uso del codón optimizado para el núcleo es de gran importancia ya que anteriormente se ha descrito que la expresión de proteínas en el núcleo de *C. reinhardtii* comparada con la expresión en cloroplasto resulta ser más baja; sin embargo, se demostró en diferentes estudios que el uso de codones optimizados para el núcleo de esta microalga puede mejorar la traducción de los transgenes a proteínas, según lo reportado por Ramos y colaboradores (2017) se mejoró la concentración de proteína aproximadamente 12 veces más pasando de obtener 1.3mg/L a 15 mg/L con el uso del codoón optimizado además de otras etiquetas (Shao y Bock, 2008, Ruecker et al, 2008 ), ya que, hace que coincida el contenido de GC del genoma nuclear de *chlamydomonas reinhardtii* en aproximadamente un 62% (Lauersen et al., 2012), concordando con la información reportada por Zhang et al. en 2020 donde se describe el aumento de la eficiencia de transformación y la traducción de transgenes a proteínas utilizando promotores quiméricos con RBCS2, mejorando la eficiencia de transformación 8 veces, y obteniendo niveles de expresión de la GFP tres veces mayor comparado al uso de otros promotores.

Además de este codón optimizado, el cassette de expresión *pmNb6tri* contiene una secuencia que codifica para un péptido señal de secreción "pJP30" reportada por Molino et al. (2018). Una de las estrategias para aumentar la expresión de genes ha sido el uso de etiquetas de secreción al espacio extracelular o periplásmico ya que se disminuye la posibilidad de exponer a la proteína a proteasas y actividad inhibitoria durante los procesos de expresión (Lauersen et al, 2012). La posibilidad de secretar proteínas recombinantes al medio permite que los procesos de recuperación y purificación sean más sencillos, por lo tanto, menos costosos pues suele representar el 12% del costo de producción (Molino et al., 2018).

Existen diferentes métodos para la transformación genética del núcleo *C. reinhardtii*, entre los que se incluyen electroporación, perlas de vidrio, transformación mediada por *Agrobacterium* y biobalística (Mini et al, 2018; Kim et al., 2019; Barjona do Nascimento Coutinho et al., 2019). Anteriormente ya se han publicado una serie de investigaciones donde se ha modificado de

---

manera exitosa el núcleo de *C. reinhardtii* a través de biobalística como es el caso de EL-Sheekh y colaboradores (2019) que demostraron la transformación genética estable del núcleo de *Chlamydomonas reinhardtii* con el plásmido pBI221aadAGUS que contenía los genes GUS y *aadA*.

En cuanto a nanoanticuerpos producidos en *C. reinhardtii* hasta el momento el único artículo publicado ha sido el de Barrera y colaboradores (2015) mencionado en el capítulo I de este trabajo, lo que indica que el proyecto presentado en esta tesis podría ser el primero orientado para la producción de un nanoanticuerpo contra el SARS-CoV-2 a través de la transformación genética del núcleo de *Chlamydomonas reinhardtii*.

En este estudio, se logró caracterizar 6 líneas transgénicas a través de southern blot donde se observó la presencia de una a más de tres copias incorporadas del transgen en el genoma de las diferentes líneas transgénicas. La determinación del número de copias de transgenes suele ser de gran importancia para entender los cambios fenotípicos y de expresión de proteínas en las plataformas de expresión (Ringel et al., 2018). Anteriormente se ha reportado la caracterización de líneas transgénicas en *C. reinhardtii* a través de southern blot como es el caso de las líneas transgénicas (CrB-1, CrP-6, CrP-13, CrX-3, CrX-9) expresando el gen *ptxD* reportadas por Loera et al. (2016), sin embargo, ninguna de estas líneas mostró diferencias en la morfología, tamaño y forma en comparación con la cepa silvestre. Rohr y colaboradores (2004) determinaron líneas transgénicas (1,7,13,2,8,12) integrando al transgen *ble-RbcS*, en este caso, los resultados del southern blot mostraron la integración del transgen en la línea 2, sin embargo, se reportó silenciamiento en la expresión del transgen.

Esta diferencia de copias incorporadas en el genoma de las líneas transgénicas pudiera ser ocasionada debido al método de transformación utilizado, ya que se han reportado estudios donde se menciona que la transformación por biobalística puede incorporar múltiples insertos con copias de transgen a las células (Angaji et al., 2010). Como consecuencia de esta diferencia podría especularse que la expresión del nanoanticuerpo *mNb6tri* esté relacionada al número de copias de cada línea transgénica. Se tiene reportes que un número alto de copias podría conducir a una mayor expresión del transgen (Bradeen et al, 2009; Kong et al., 2009, sin embargo, en otros casos un número alto de copias del transgen puede conducir a un silenciamiento génico (Tang et al., 2006.; Strathdee et al., 2006; Ziemienowics et al., 2012). por lo que es necesario caracterizar a varias líneas transgénicas para identificar cual de ellas presenta niveles altos de expresión del transgen de estudio y niveles altos de la proteína recombinante correspondiente.

## CAPITULO V

### 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

#### 5.1 CONCLUSIONES

1. La transformación genética del núcleo de *C. reinhardtii* fue logrado por primera vez y de manera exitosa con la construcción *pmNb6-tri*, la cual codifica para un nanoanticuerpo ultrapontente que bloquea al virus del SARS-COV-2.
2. Se confirmó la integración del gen *mNb6-tri* en el genoma de *C. reinhardtii* y se reveló la presencia de seis líneas transgénicas con diferentes números de copias.

#### 5.2. PERSPECTIVAS

Este estudio tiene como perspectivas la cuantificación de la expresión del gen *mNb6tri* bajo el control del promotor *RIA3/PROMC* a través de RT-qPCR. De esta manera podríamos conocer si el número de copias detectado por la técnica de Southern blot está relacionada con el nivel de expresión del transgen y la producción de la proteína recombinante. También se contempla incluir a otros promotores para conducir la expresión del gen *mNb6tri* con fines comparativos, como es el caso del promotor quimérico Hsp70A/RbcS2 del vector pChlamy 4.

Por otra parte, se pretende evaluar la unión del nanoanticuerpo recombinante con el dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína espiga del virus SARS-CoV-2. Esto, nos permitirá identificar la capacidad que tiene *mNb6tri* producido en *C. reinhardtii* para neutralizar al virus responsable por la pandemia del COVID-19.

Los resultados obtenidos a través de estos experimentos nos permitirán decidir si es viable realizar pruebas de neutralización con ratones infectados en colaboración con laboratorios que realicen este tipo de investigaciones. De esta manera se podrá proceder a realizar pruebas de unión con el dominio al RBD de las nuevas variantes del virus, y de ser exitosa, se llevará a cabo la producción a una mayor escala.

## REFERENCIAS

Akbari, F., Eskandani, M., & Khosroushahi, A. Y. (2014). The potential of transgenic green microalgae; a robust photobioreactor to produce recombinant therapeutic proteins. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(11), 2783-2796.

<https://doi.org/10.1007/s11274-014-1714-0>

Angaji S., Hedayati S., Poor R. , Poor S., Shiravi S., Madani S., (2010) Application of RNA interference in plants. *Plant Omics* 3, 77-84.

Alsoussi, W. B., Turner, J. S., Case, J. B., Zhao, H., Schmitz, A. J., Zhou, J. Q., Chen, R. E., Lei, T., Rizk, A. A., McIntire, K. M., Winkler, E. S., Fox, J. M., Kafai, N. M., Thackray, L. B., Hassan, A. O., Amanat, F., Krammer, F., Watson, C. T., Kleinstein, S. H., . . . Ellebedy, A. H. (2020). A Potently Neutralizing Antibody Protects Mice against SARS-CoV-2 Infection. *The Journal of Immunology*, 205(4), 915–922. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000583>

Ashoor, D., Marzouq, M., Trabelsi, K., Chlif, S., Abotalib, N., Khalaf, N. B., Ramadan, A. R., & Fathallah, M. D. (2022). How concerning is a SARS-CoV-2 variant of concern? Computational predictions and the variants labeling system. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.868205>

Awwad, S., & Angkawitwong, U. (2018). Overview of Antibody Drug Delivery.

*Pharmaceutics*, 10(3), 83. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030083>

Bannas, P., Hambach, J., & Koch-Nolte, F. (2017). Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics. *Frontiers in Immunology*, 8, 1-13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01603>

Baral, T.N. et al. (2006) Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor. *Nat.Med.* 12, 580–584

- Barrera, D. J., Rosenberg, J. N., Chiu, J. G., Chang, Y.-N., Debatis, M., Ngoi, S.-M., ... Mayfield, S. P. (2014). Algal chloroplast produced camelid VHH antitoxins are capable of neutralizing botulinum neurotoxin. *Plant Biotechnology Journal*, 13(1), 117-124. <https://doi.org/10.1111/pbi.12244>
- Bedoya-Sommerkamp, M., Medina-Ranilla, J., Chau-Rodríguez, V., Li-Soldevilla, R., Vera-Albújar, L., & García, P. J. (2021). Variantes del SARS-CoV-2: epidemiología, fisiopatología y la importancia de las vacunas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 38(3), 442–451. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2021.383.8734>
- Beltran, A., Peraza, S., López, L., Borges, I., & Herrera, V. (2019). A novel salt-inducible CrGPDH3 promoter of the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* for transgene overexpression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(8), 3487-3499. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09733-y>
- Pope B. y Kent M. (1996). High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. *Nuc Acids*, vol. 24 no 3, pp 536-537.
- Boehm, E., Kronig, I., Neher, R. A., Eckerle, I., Vetter, P., & Kaiser, L. (2021). Novel SARS-CoV-2 variants: the pandemics within the pandemic. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(8), 1109–1117. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.05.022>
- Bradeen, J. M., Iorizzo, M., Mollov, D. S., Raasch, J., Kramer, L. C., Millett, B. P., Austin-Phillips, S., Jiang, J. & Carputo, D. (2009). Higher Copy Numbers of the Potato RB Transgene Correspond to Enhanced Transcript and Late Blight Resistance Levels. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 22(4), 437-446. <https://doi.org/10.1094/mpmi-22-4-0437>
- Brunner, J.D., Schenck, S. (2020). Production and Application of Nanobodies for Membrane Protein Structural Biology. In: Perez, C., Maier, T. (eds) *Expression, Purification, and Structural Biology of Membrane Proteins. Methods in Molecular Biology*, vol 2127. Humana, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0373-4\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0373-4_12)
- Burlingham, B. T., & Widlanski, T. S. (2003). An Intuitive Look at the Relationship of Ki

- 
- and IC50: A More General Use for the Dixon Plot. *Journal of Chemical Education*, 80(2), 214. <https://doi.org/10.1021/ed080p214>
- Cai, X. H., Brown, C., Adhiya, J., Traina, S. J., and Sayre, R. (1999) Growth and heavy metal binding properties of transgenic *Chlamydomonas* expressing a foreign metallothionein gene. *Int. J. Phytorem.* 1, 53–65
- Callaway, E. (2022). Fast-Evolving COVID variants complicate vaccine updates. *Nature*, 607. [d41586-022-01771-3.pdf \(nature.com\)](https://doi.org/10.1038/d41586-022-01771-3)
- Carpentier F., Lemaire S. , Danon A. (2019). When Unity Is Strength: The Strategies Used by *Chlamydomonas* to Survive Environmental Stresses. *Cells*, MDPI, 8, <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03030993>
- Casadevall, A. (2002). Passive Antibody Administration (Immediate Immunity) as a Specific Defense Against Biological Weapons. *Emerging Infectious Diseases*, 8(8), 833-841. <https://dx.doi.org/10.3201/eid0808.010516>.
- Chávez, M. N., Schenck, T. L., Hopfner, U., Centeno-Cerdas, C., Somlai-Schweiger, I., Schwarz, C., Machens, H. G., Heikenwalder, M., Bono, M. R., Allende, M. L., Nickelsen, J., & Egaña, J. T. (2016). Towards autotrophic tissue engineering: Photosynthetic gene therapy for regeneration. *Biomaterials*, 75, 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.014>
- Chen Q, Zhou Y, Yu J, Liu W, Li F, Xian M, Nian R, Song H, Feng D. An efficient constitutive expression system for Anti-CEACAM5 nanobody production in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 2019 Mar;155:43-47. doi: 10.1016/j.pep.2018.11.001
- Davey J.A. & Wilson C.J. (2020). Engineered signal-coupled inducible promoters: measuring the apparent RNA-polymerase resource budget, *Nucleic Acids Research*, Volume 48, Issue 17, 25 September 2020, Pages 9995–10012, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa734>
- Deffar, K., Shi, H., Li, L., Wang, X., & Zhu, X. (2009). Nanobodies - the new concept in antibody engineering. *African Journal of Biotechnology*, 8(12), 2645-2652. Recuperado de <http://www.academicjournals.org/AJB>

- Dekempeneer, Y., Caveliers, V., Ooms, M., Maertens, D., Gysemans, M., Lahoutte, T., Xavier, C., Lecocq, Q., Maes, K., Covens, P., Miller, B. W., Bruchertseifer, F., Morgenstern, A., Cardinaels, T., y D'Huyvetter, M. (2020). Therapeutic efficacy of 213Bi-labeled sdAbs in a preclinical model of ovarian cancer. *Molecular Pharmaceutics*, 17, 3553–3566. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00580>
- Desmyter, A., Spinelli, S., Roussel, A., & Cambillau, C. (2015). Camelid nanobodies: killing two birds with one stone. *Current Opinion in Structural Biology*, 32, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.01.001>
- Díaz, F., & Toro, A. (2020). SARS-CoV-2/COVID-19: el virus, la enfermedad y la pandemia. *Medicina y Laboratorio*, 24(3), 183-205. <https://doi.org/10.36384/01232576.268>
- Economou, C., Wannathong, T., Szaub, J., & Purton, S. (2014). A Simple, Low-Cost Method for Chloroplast Transformation of the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Methods in Molecular Biology*, 401–411. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-995-6\\_27](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-995-6_27)
- EL-Sheekh, M. M., Almutairi, A. W., & Touliabah, H. E. (2019). Construction of a novel vector for the nuclear transformation of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and its stable expression. *Journal of Taibah University for Science*, 13(1), 529–535. <https://doi.org/10.1080/16583655.2019.1603574>
- Escobar Domingo MJ, Escobar Domingo DP, Moreno Correa S. Mecanismos fisiopatológicos relacionados con la infección por SARS-CoV-2 en las personas expuestas durante 2019 y 2020. *Univ. Med.* 2021;62(3). <https://doi.org/10.11144/Javeriana.umed62-3.mfri>
- Fan, X., Wang, L., Guo, Y., Tu, Z., Li, L., Tong, H., Xu, Y., Li, R., & Fang, K. (2015). Ultrasonic Nanobubbles Carrying Anti-PSMA Nanobody: Construction and Application in Prostate Cancer-Targeted Imaging. *PLOS ONE*, 10(6), e0127419. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127419>
- Harvey, W.T., Carabelli, A.M., Jackson, B. et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat Rev Microbiol* 19, 409–424 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00573-0>
- Hassanzadeh-Ghassabeh, G., Devoogdt, N., de Pauw, P., Vincke, C., & Muyldermans,

- S. (2013). Nanobodies and their potential applications. *Nanomedicine*, 8(6), 1013–1026. <https://doi.org/10.2217/nnm.13.86>
- He X, Hong W, Pan X, Lu G, Wei X. SARS-CoV-2 Omicron variant: Characteristics and prevention. *MedComm* (2020). 2021 Dec 16;2(4):838-845. doi: 10.1002/mco2.110. PMID: 34957469; PMCID: PMC8693031.
- Hernández, E., López, A., Jiménez, L., & Sotelo, R. (2013). PERSPECTIVAS ACTUALES DEL USO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y SU IMPORTANCIA EN LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA E INDUSTRIAL. *BIOtecnia*, 15(3), 8-16. <https://doi.org/10.18633/bt.v15i3.152>
- Huang, Y., Yang, C., Xu, Xf. et al. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol Sin* 41, 1141–1149 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
- Huo, J., Le Bas, A., Ruza, R., Duyvesteyn, H., Mikolajek, H., Malinauskas, T., ... Naismith, J. (2020). Neutralizing nanobodies bind SARS-CoV-2 spike RBD and block interaction with ACE2. *Nature Structural & Molecular Biology*, 27(9), 846-854. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0469-6>
- Ikonomou, L., Schneider, Y.-J., & Agathos, S. N. (2003). Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(1), 1-20. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1223-9>
- Iwaki, T., Hara, K. & Umemura, K. (2020, junio). Nanobody production can be simplified by direct secretion from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 170, 105607. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105607>
- Jackson, C.B., Farzan, M., Chen, B. et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23, 3–20 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>
- Jarquín-Cordero, M., Chávez, M.N., Centeno-Cerdas, C. et al. Towards a biotechnological platform for the production of human pro-angiogenic growth factors in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 104, 725–739 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10267-6>
- Jones RG, Martino A. Targeted localized use of therapeutic antibodies: a review of non-systemic, topical and oral applications. *Crit Rev Biotechnol*.

- 2016;36(3):506-20. doi: 10.3109/07388551.2014.992388. Epub 2015 Jan 20. PMID: 25600465.
- Joglekar, M. P., Veerabathini, A., & Gangadaran, P. (2021). SARS-CoV-2 variants: A double-edged sword? *Experimental Biology and Medicine*, 246(15), 1721–1726. <https://doi.org/10.1177/15353702211014146>
- Jovčevska, I., & Muyldermans, S. (2019). The Therapeutic Potential of Nanobodies. *BioDrugs*, 34(1), 11-26. <https://doi.org/10.1007/s40259-019-00392-z>
- Keller, M. A., & Stiehm, E. R. (2000). Passive immunity in prevention and treatment of infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 13(4), 602–614. <https://doi.org/10.1128/cmr.13.4.602-614.2000>
- Kindt, T., Goldsby, R., Osborne, B., & Martínez, R. (2007). *Inmunología de Kuby* (6.ª ed.). New York, Estados Unidos: McGraw-Hill Education.
- Khodabakhsh, F., Behdani, M., Rami, A., & Kazemi-Lomedasht, F. (2018). Single-Domain Antibodies or Nanobodies: A Class of Next-Generation Antibodies. *International Reviews of Immunology*, 37(6), 316-322. <https://doi.org/10.1080/08830185.2018.1526932>
- Kollewe, C y Vilcinskas, A. (2013). PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEINS IN INSECT CELLS. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 9(3), 255-271. <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2013.255.271>
- Kong, Q., Wu, M., Huan, Y., Zhang, L., Liu, H., Bou, G., Luo, Y., Mu, Y. & Liu, Z. (2009). Transgene Expression Is Associated with Copy Number and Cytomegalovirus Promoter Methylation in Transgenic Pigs. *PLoS ONE*, 4(8), e6679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006679>
- Kumar, S. V., Misquitta, R. W., Reddy, V. S., Rao, B. J., & Rajam, M. V. (2004). Genetic transformation of the green alga—*Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*, 166(3), 731–738. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.11.012>

- Kumar, S., Chandele, A., & Sharma, A. (2021). Current status of therapeutic monoclonal antibodies against SARS-CoV-2. *PLOS Pathogens*, 17(9), e1009885. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009885>
- Lauersen, K.J., et al., Efficient recombinant protein production and secretion from nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biotechnol.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.10.010>
- León, R., Cejudo, G. A., & Fernández, E. (2007). *Transgenic Microalgae as Green Cell Factories*: 616 (2007 ed.). Springer.
- Li, B., Qin, X., & Mi, L. Z. (2022). Nanobodies: from structure to applications in non-injectable and bispecific biotherapeutic development. *Nanoscale*, 14(19), 7110–7122. <https://doi.org/10.1039/d2nr00306f>
- Loera-Quezada, M. M., Leyva-González, M. A., Velázquez-Juárez, G., Sanchez-Calderón, L., Do Nascimento, M., López-Arredondo, D. & Herrera-Estrella, L. (2016, 28 mayo). A novel genetic engineering platform for the effective management of biological contaminants for the production of microalgae. *Plant Biotechnology Journal*, 14(10), 2066-2076. <https://doi.org/10.1111/pbi.12564>
- Lundin, J. et al. Phase II trial of subcutaneous antiCD52 monoclonal antibody alemtuzumab (Campath1H) as first-line treatment for patients with b-cell chronic lymphocytic leukemia (b-CLL). *Blood* 100, 768–773 (2002).
- McLaughlin, P. et al. (1998) Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J. Clin. Oncol.* 16, 2825–2833
- Manish D., Abhilasha S.P, Nanamika T., Tridib K.R & Om P.C., (2022) Delta variant (B.1.617.2) of SARS-CoV-2: Mutations, impact, challenges and possible solutions, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 18:5, DOI: 10.1080/21645515.2022.2068883
- Manuell, A. L., Beligni, M. V., Elder, J. H., Siefker, D. T., Tran, M., Weber, A., McDonald, T. L., & Mayfield, S. P. (2007). Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas* chloroplast. *Plant Biotechnology Journal*, 5(3), 402–412. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00249.x>
- Mathieu-Rivet, E., Lerouge, P., & Bardor, M. (2017). *Chlamydomonas reinhardtii*:

- Protein Glycosylation and Production of Biopharmaceuticals. *Chlamydomonas: Biotechnology and Biomedicine*, 45–72. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-66360-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-66360-9_3)
- Molino, J.V.D, Carvalho J.C.M, Mayfield M., Comparison of secretory signal peptides for heterologous protein expression in microalgae: expanding the secretion portfolio for *Chlamydomonas reinhardtii*, *PLoS ONE*. 13 (2018) e0192433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192433>
- Muyldermans, S. (2013). Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annual Review of Biochemistry*, 82(1), 775–797. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>
- Neupert J., Shao N., Lu Y., Bock R. (2012) Genetic Transformation of the Model Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. In: Dunwell J., Wetten A. (eds) *Transgenic Plants. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 847. Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-558-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-558-9_4)
- Nguyen VK, Su C, Muyldermans S, van der Loo W. Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation. *Immunogenetics*. 2002 Apr;54(1):39-47. doi: 10.1007/s00251-002-0433-0. Epub 2002 Feb 26. PMID: 11976790.
- Oliva Marín, J. E. (2020). SARS-CoV-2: origen, estructura, replicación y patogénesis. *Alerta, Revista científica del Instituto Nacional de Salud*, 3(2), 79-86. <https://doi.org/10.5377/alerta.v3i2.9619>
- Organización panamericana de la Salud. (2020). COVID-19: Materiales de comunicación. Recuperado 8 de diciembre de 2020, de <https://www.paho.org/es/covid-19-materiales-comunicacion>
- Pang, X., Tong, Y., Xue, W., Yang, Y. F., Chen, X., Liu, J., & Chen, D. (2019). Expression and characterization of recombinant human lactoferrin in edible alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 83(5), 851–859. <https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1569498>
- Pastrian, S. Bases genéticas y moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). (2020). Mecanismos de patogénesis y de respuesta inmune. *Int. J. Odontostomat.*,

---

14(3):331-337

- Rabi, F. A., Al Zoubi, M. S., Kasasbeh, G. A., Salameh, D. M., & Al-Nasser, A. D. (2020). SARS-CoV-2 and Coronavirus Disease 2019: What We Know So Far. *Pathogens*, 9(3), 2-15. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030231>
- Ramos-Martinez, E. M., Fimognari, L., & Sakuragi, Y. (2017). High-yield secretion of recombinant proteins from the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnology Journal*, 15(9), 1214–1224. <https://doi.org/10.1111/pbi.12710>
- Ringel, M., Schwindinger, W., Saji, M., Zeiger, M., & Levine, M. (1998). Determination of Transgene Copy Number and Expression Level Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *BioTechniques*, 24(1), 126–131. <https://doi.org/10.2144/98241st06>
- Rivera, R., Peraza S., Herrera, V. (2011). La microalga verde: *Chlamydomonas reinhardtii*: una nueva alternativa para la producción de proteínas recombinantes de interés médico. *Rev. Ciencia*. 1-9.
- Rohr, J., Sarkar, N., Balenger, S., Jeong, B. R. & Cerutti, H. (2004, 27 septiembre). Tandem inverted repeat system for selection of effective transgenic RNAi strains in *Chlamydomonas*. *The Plant Journal*, 40(4), 611-621. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2004.02227.x>
- Ruecker, O., Zillner, K., Groebner-Ferreira, R. and Heitzer, M. (2008) GaussiaLuciferase as a sensitive reporter gene for monitoring promoter activity in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Gen. Genom.* 280, 153–162.
- Sasso S., Stibor H., Mittag M., Grossman A., (2018) The Natural History of Model Organisms: From molecular manipulation of domesticated *Chlamydomonas reinhardtii* to survival in nature *eLife* 7:e39233. <https://doi.org/10.7554/eLife.39233>
- Sarsaiya, S., Shi, J., & Chen, J. (2019). Bioengineering tools for the production of pharmaceuticals: current perspective and future outlook. *Bioengineered*, 10(1), 469-492. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1682108>
- Sanaei, M., Setayesh, N., Sepehrizadeh, Z., Mahdavi, M., & Yazdi, M. H. (2019).

- 
- Nanobodies in Human Infections: Prevention, Detection, and Treatment. *Immunological Investigations*, 49(8), 875-896.  
<https://doi.org/10.1080/08820139.2019.1688828>
- Scaife, M., Nguyen, G., Rico, J., Lambert, D., Helliwell, K., & Smith, A. (2015). Establishing *Chlamydomonas reinhardtii* as an industrial biotechnology host. *The Plant Journal*, 82(3), 532-546. <https://doi.org/10.1111/tpj.12781>
- Schoof M. et al. (2020) An ultrapotent synthetic nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by stabilizing inactive Spike. *Science* 370(6523).
- Scranton, M., Ostrand, J., Fields, F., & Mayfield, S. (2015). *Chlamydomonas* as a model for biofuels and bio-products production. *The Plant Journal*, 82(3), 523-531.  
<https://doi.org/10.1111/tpj.12780>
- Sebina, I., & Pepper, M. (2018). Humoral immune responses to infection: common mechanisms and unique strategies to combat pathogen immune evasion tactics. *Current Opinion in Immunology*, 51, 46–54.  
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.02.001>
- Serrano, M., & Sainz, T. (2006). Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(1), 38-44.  
Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57937106>
- Shao, N., Bock, R. (2008) A codon-optimized luciferase from *Gaussia princeps* facilitates the in vivo monitoring of gene expression in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet.*, 53, 381–388.
- Slamon, D. J. et al. (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* 344, 783–792
- Steeland, S., Vandenbroucke, R. E., & Libert, C. (2016). Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies. *Drug Discovery Today*, 21(7), 1076-1113.  
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.04.00>

- 
- Stocks, M. R. (2004). Intrabodies: production and promise. *Drug Discovery Today*, 9(22), 960–966. doi:10.1016/s1359-6446(04)03269-6
- Strathdee, D., Ibbotson, H. & Grant, S. G. N. (2006, 20 diciembre). Expression of Transgenes Targeted to the Gt(ROSA)26Sor Locus Is Orientation Dependent. *PLoS ONE*, 1(1), e4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000004>
- Tang, W., Newton, R. J. & Weidner, D. A. (2006, 6 diciembre). Genetic transformation and gene silencing mediated by multiple copies of a transgene in eastern white pine. *Journal of Experimental Botany*, 58(3), 545-554. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl228>
- Tu, Y., Chien, C., Yarmishyn, A., Lin, Y., Luo, Y., Lin, Y., ... Chiou, S. (2020). A Review of SARS-CoV-2 and the Ongoing Clinical Trials. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2-19. <https://doi.org/10.3390/ijms21072657>
- Wang P, Nair MS, Liu L, Iketani S, Luo Y, Guo Y, Wang M, Yu J, Zhang B, Kwong PD, Graham BS, Mascola JR, Chang JY, Yin MT, Sobieszczyk M, Kyratsous CA, Shapiro L, Sheng Z, Huang Y, Ho DD (2021). Antibody Resistance of SARS-CoV-2 Variants B.1.351 and B.1.1.7., *Nature*.;593(7857):130-135. 10.1101/2021.01.25.428137
- Wang, M. Y., Zhao, R., Gao, L. J., Gao, X. F., Wang, D. P., & Cao, J. M. (2020). SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.587269>
- World Health Organization. (2022). Coronavirus (CoV) GLOBAL. Recuperado 6 de agosto de 2020, de [https://www.who.int/es/health-topics/coronavirus#:~:text=Los%20coronavirus%20\(CoV\)%20son%20una,severo%20\(SRAS%2DCoV\).](https://www.who.int/es/health-topics/coronavirus#:~:text=Los%20coronavirus%20(CoV)%20son%20una,severo%20(SRAS%2DCoV).)
- Winger, A.; Caspari, T., (2021) The Spike of Concern—The Novel Variants of SARS-CoV-2. *Viruses*, 13, 1002. <https://doi.org/10.3390/v13061002>
- World Health Organization. (2022). WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. Recuperado 1 de enero de 2021, de <https://covid19.who.int/>
-

- 
- World Health Organization. (2022). Tracking SARS-CoV-2 variants. [Previously circulating VOIs \(who.int\)](#) [Acceso 05 agosto 2022]
- World Health Organization. Vaccine efficacy, effectiveness and protection. WHO. <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/vaccine-efficacy-effectiveness-and-protection> [ Acceso 08 julio 2022].
- Wrapp, D., De Vlieger, D., Corbett, K., Torres, G., Wang, N., Van Breedam, W., ... McLellan, J. (2020). Structural Basis for Potent Neutralization of Betacoronaviruses by Single-Domain Camelid Antibodies. *Cell*, 181(5), 1004-1015. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.031>
- Xu, J., Xu, K., Jung, S., Conte, A., Lieberman, J., Muecksch, F., Lorenzi, J. C. C., Park, S., Schmidt, F., Wang, Z., Huang, Y., Luo, Y., Nair, M. S., Wang, P., Schulz, J. E., Tessarollo, L., Bylund, T., Chuang, G. Y., Olia, A. S., . . . Casellas, R. (2021). Nanobodies from camelid mice and llamas neutralize SARS-CoV-2 variants. *Nature*, 595(7866), 278–282. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03676-z>
- Yang, E. Y., & Shah, K. (2020). Nanobodies: Next Generation of Cancer Diagnostics and Therapeutics. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01182>
- Yusibov, V., Kushnir, N., & Streatfield, S. J. (2016). Antibody Production in Plants and Green Algae. *Annual Review of Plant Biology*, 67(1), 669-701. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111812>
- Zimmermann, I., Egloff, P., Hutter, C.A.J. et al. (2020). Generation of synthetic nanobodies against delicate proteins. *Nat Protoc* 15, 1707–1741. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0304-x>
- Ziemienowicz, A., Shim, Y. S., Matsuoka, A., Eudes, F. & Kovalchuk, I. (2012, 30 enero). A Novel Method of Transgene Delivery into Triticale Plants Using the Agrobacterium Transferred DNA-Derived Nano-Complex. *Plant Physiology*, 158(4), 1503-1513. <https://doi.org/10.1104/pp.111.192856>
- Zhang, M. P., Wang, M., & Wang, C. (2021). Nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*: A review. *Biochimie*, 181, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.11.016>
- Zhou, P., Yang, X., Wang, X., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., ... Shi, Z.-L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin.
-

Nature, 579(7798), 270-273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>

Zou, T., Dembele, F., Beugnet, A., Sengmanivong, L., Trepout, S., Marco, S., Marco, A. D., & Li, M. H. (2015). Nanobody-functionalized PEG-b-PCL polymersomes and their targeting study. *Journal of Biotechnology*, 214, 147–155.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.09.034>

**ANEXOS.****I. MEDIO DE CULTIVO TAP.****TAP medium for 1 L (adjust final pH to 7.0)**

- 1M Tris base (e.g. Trizma) 20.0 ml
- Phosphate Buffer II 1.0 ml
- Solution A 10.0 ml
- Hutner's trace elements 1.0 ml
- Glacial acetic acid 1.0 ml

\*For Tris-minimal medium omit the acetic acid and titrate the final solution to pH 7.0 with HCl

**Phosphate Buffer II (for 100 ml)**

- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10.8 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5.6 g

**Solution A (for 500 ml)**

- NH<sub>4</sub>Cl 20 g
- MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5 g
- CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2.5 g

**Solution Hutner's trace elements (for 500 ml)**

- H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 5.7 g
- ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 11 g
- MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 2.53 g
- FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.495 g
- CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.805 g
- CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.785 g
- Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>·H<sub>2</sub>O 0.5 g

**I. MEDIO DE CULTIVO LB.**

- Medio sólido:

Se pesan 40 g de LB agar (Sigma) por litro de medio, se disuelve parte del medio en la mitad de la cantidad deseada de agua destilada, una vez disuelto, se afora hasta el volumen deseado y se esteriliza en autoclave a 15 lb/cm<sup>2</sup>, 121°C por 12 min.

En baño María a 50°C se atempera el medio de cultivo, y se adiciona ampicilina como antibiótico, se agita por inversión y se dosifica en cajas de Petri.

- Medio líquido.

Se pesan 25 g de LB (sigma) por litro de medio, se disuelve el medio en la mitad del volumen deseado de agua destilada, posteriormente, se afora al volumen deseado, y se esteriliza en autoclave con las mismas condiciones que el medio sólido, se le agrega ampicilina una vez se encuentre a temperatura ambiente, y se dosifica según la cantidad deseada en tubos.