

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería



**Producción de anticuerpos policlonales mono-específicos
dirigidos contra la proteína PDIA1 de humano y evaluación de
su efecto sobre la actividad reductasa**

T E S I S

que para obtener el título de

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

presenta

Jessica Valeria González Gómez

Tijuana, B.C.

Febrero de 2017.

Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

"2017 Año del 60 Aniversario de la Universidad Autónoma de Baja California"

FOLIO No. 006

Tijuana, B. C., a 03 de febrero de 2017.

C. Jessica Valeria Gonzalez Gómez
Pasante de Químico Farmacobiólogo
Presente

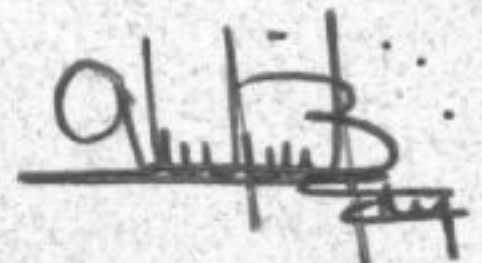
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción Tesis

Es propuesto, por el Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra y la M.C. Patricia Lilian Alejandra Muñoz Muñoz, quienes serán los responsables de la calidad de trabajo que usted presente, referido al tema "Producción de anticuerpos policlonales mono-específicos dirigidos contra la proteína PDIA1 de humano y evaluación de su efecto sobre la actividad reductasa" el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- INTRODUCCIÓN
- II.- OBJETIVOS
- III.- MATERIALES Y MÉTODOS
- IV.- RESULTADOS Y DISCUSIONES
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- BIBLIOGRAFÍA



Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra
Co- Director de Tesis



M.C. Patricia Lilian Alejandra Muñoz Muñoz
Co-Directora de Tesis



Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director



Dr. José Luis González Vázquez
Subdirector

González Gómez, Jessica Valeria

Producción de anticuerpos policlonales mono-específicos dirigidos contra la proteína PDIA1 de humano y evaluación de su efecto sobre la actividad reductasa

Tesis de licenciatura

Todos los derechos sobre los datos y resultados, derivados de la investigación realizada, contenidos en este documento son propiedad de los autores y de las instituciones donde se realizó el estudio. Por tal motivo, se prohíbe la reproducción, distribución, publicación, traducción, y cualquier otro uso o adaptación (total o parcial) de la información, por cualquier medio o forma de difusión.

La prohibición anterior no tendrá validez, de forma exclusiva y limitada, cuando el uso o adaptación de la información cumpla los siguientes requisitos:

- 1) el material o medio de difusión sea utilizado sólo para fines académicos, no lucrativos ni comerciales;
- 2) incluir la siguiente cita: “González Gómez, Jessica Valeria. Producción de anticuerpos policlonales mono-específicos dirigidos contra la proteína PDIA1 de humano y evaluación de su efecto sobre la actividad reductasa. Tesis de licenciatura. Programa Educativo de Químico Farmacobiólogo, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California. Febrero de 2017.”
- 3) enviar un correo electrónico a mramos@uabc.edu.mx, solicitando anuencia y dando aviso de qué datos se van a utilizar y cuál es el propósito de su uso.

Lo anterior no otorga derecho o licencia alguna, respecto a la información utilizada.

Para cualquier otro asunto relacionado, contactar a mramos@uabc.edu.mx.

D.R. © González Gómez, Jessica Valeria. Tesista.

D.R. © Ramos Ibarra, Marco Antonio. Director de tesis.

D.R. © Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Unidad Académica de la UABC.

D.R. © Universidad Autónoma de Baja California. Institución de Educación Superior.

©2017.

Tesis: Producción de anticuerpos policlonales mono-específicos dirigidos contra la proteína PDIA1 de humano y evaluación de su efecto sobre la actividad reductasa.

Grado: Licenciatura, Programa Educativo de Químico Farmacobiólogo.

Sustentante: González Gómez, Jessica Valeria.

Fecha: Febrero de 2017.

El presente proyecto de investigación fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC, bajo la co-dirección de los profesores Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra y M.C. Patricia Lilián Alejandra Muñoz Muñoz, con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT): Fondo Sectorial SEP-CONACYT para Investigación en Ciencia Básica (apoyo 155714) y Fondo Sectorial SSA/IMSS/ISSSTE para Investigación en Salud (apoyo 161544), otorgados al Dr. Ramos Ibarra; y de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC): Primera Convocatoria Interna Especial para Proyectos de Investigación (apoyo 300/2/N/112/1), otorgado a la M.C. Muñoz Muñoz.

Los resultados correspondientes fueron presentados en el 4to. Encuentro Estatal de Jóvenes Investigadores en Baja California 2016, llevado a cabo los días 29 y 30 de septiembre de 2016, en el Centro de Innovación y Tecnología de Baja California (BIT Center, Tijuana). La asistencia y participación en el evento académico fue apoyada por la Dirección de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC.

Tesis: Producción de anticuerpos policlonales mono-específicos dirigidos contra la proteína PDIA1 de humano y evaluación de su efecto sobre la actividad reductasa.

Grado: Licenciatura, Programa Educativo de Químico Farmacobiólogo.

Sustentante: González Gómez, Jessica Valeria.

Fecha: Febrero de 2017.

El presente manuscrito de tesis fue revisado y aprobado por un comité académico,
conformado por los profesores:

Mares Alejandre Rosa Elena, Dra. (Presidenta)
Muñoz Muñoz Patricia Lilián Alejandra, M.C. (Secretaria)
Minchaca Acosta Alexis Zarahy, QFB (Sinodal)
Ramos Ibarra Marco Antonio, Dr. (Sinodal)

Agradecimientos

A Dios por haberme puesto en este camino y permitirme conocer a tantas personas admirables como es la familia biotec.

A mis padres por todo su apoyo.

A los doctores por haberme dado la oportunidad de ser parte del laboratorio de biotecnología y poder hacer este proyecto, por sus consejos y enseñanzas.

A mis amigos Kat por su apoyo y su amistad, Jorge y Aldo que siempre sabían que decir para subir mis ánimos. Gracias por todos esos momentos en el pasillo comiendo, discutiendo que pudimos haber hecho mal en los experimentos, por sus consejos y experiencias.

A mis amigos Alexis por sus enseñanzas y por los momentos divertidos, profesora Lilián por sus consejos y porque siempre tuvo tiempo para escuchar y resolver mis inquietudes, Álvaro por haberme apoyado con mis conejos y también por sus consejos.

A mis conejos Lanre y Lyra ya que sin ellos esto no hubiera sucedido

Dedicatoria

A mis padres y mi hermana

Cuando sientas que vas a rendirte, piensa en porque empezaste

Contenido

Agradecimientos	5
Dedicatoria	6
Contenido	7
Índice de Figuras y Tablas	9
Abreviaturas.....	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Plegamiento de proteínas	11
1.1.1. Plegamiento en el retículo endoplásmico	12
1.1.2. Plegamiento en citosol	13
1.1.3. Plegamiento en mitocondria	14
1.2. Plegamiento de proteínas en humanos y su asociación en patologías	15
1.3. PDI como plegasa y chaperona	16
1.3.1. PDI de humano.....	16
1.3.2. Bioquímica y genética de PDIA1	16
1.3.3. Moduladores e inhibidores	19
1.4. PDIA1 como diana terapéutica	20
1.5. Anticuerpos como agentes terapéuticos	20
1.5.1. Inmunología y anticuerpos	20
1.5.2. Anticuerpos terapéuticos exitosos	23
1.5.3. Anticuerpos comerciales anti-HuPDIA1	23
1.6. Potencial de los anticuerpos como alternativa para la modulación de las funciones de HuPDIA1	23
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. Objetivo general	25
2.2. Objetivos específicos	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1. Reactivos biológicos y químicos	26
3.2. Reserva de reactivos biológicos (laboratorio de biotecnología, FCQI-UABC).....	26
3.2.1. pQHuPDI.....	26
3.2.2. Escherichia coli SHuffle® Express	26
3.3. Equipo y programas computacionales	27
3.4. Protocolos generales	27
3.4.1. Expresión y purificación de HuPDIA1 recombinante	27
3.4.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida	28
3.4.3. Cuantificación de proteínas mediante micro-Bradford	28
3.4.4. Inmunoensayo tipo ELISA.....	28

3.5. Producción de anticuerpos policlonales anti-HuPDIA1	29
3.5.1. Animales de experimentación.....	29
3.5.2. Obtención de suero pre-inmune	29
3.5.3. Preparación del antígeno.....	30
3.5.4. Protocolo de inmunización y seguimiento.....	30
3.5.5. Obtención de suero híper-inmune	30
3.6. Purificación de anticuerpos policlonales mono-específicos anti-HuPDIA1	30
3.6.1. Diálisis de proteínas	30
3.6.2. Derivatización de sefarosa-4B-CNBr	31
3.6.3. Cromatografía de afinidad negativa	31
3.6.4. Cromatografía de afinidad a antígeno (inmunoafinidad)	31
3.6.5. Regeneración y preservación de resinas de afinidad.....	31
3.6.6. Cuantificación proteínas séricas y anticuerpos	32
3.7. Determinación de CE_{50} y K_D	32
3.7.1. CE_{50} mediante ELISA indirecto	32
3.7.2. K_D mediante ELISA indirecto competitivo.....	32
3.8. Determinación de efecto modulador	32
3.8.1. Ensayo típico de actividad reductasa.....	32
3.8.2. Ensayo de actividad reductasa competitivo	33
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	34
4.1. Obtención de la proteína HuPDIA1 recombinante	34
4.2. Obtención de suero híper-inmune anti-HuPDIA1.....	34
4.3. Purificación de anticuerpos policlonales mono-específicos anti-HuPDIA1	35
4.4. Los anticuerpos anti-HuPDIA1 exhiben una afinidad por el antígeno.....	36
4.5. Los anticuerpos mono-específicos exhiben un efecto modulador positivo sobre la actividad reductasa de HuPDIA1	37
5. CONCLUSIONES.....	38
6. BIBLIOGRAFÍA.....	39

Índice de Figuras y Tablas

Figura 1. Acción de una chaperona durante la traducción.	11
Figura 2. Translocación post-traduccional de las proteínas hacia el lumen de RE.	12
Figura 3. Plegamiento por encapsulación del sistema GroEL/GroES.	13
Figura 4. Acción de las chaperonas Hsp70 y Hsp60.	14
Figura 5. Estructura de PDIA1, en sus estados reducido (A) y oxidado (B).	17
Figura 6. Diagrama de la formación de enlaces disulfuro en ER de células eucariotas y las reacciones redox de PDI.	18
Figura 7. Representación esquemática de la estructura típica de una inmunoglobulina de mamíferos.	21
Figura 8. Purificación de la HuPDIA1 recombinante: SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie.	34
Figura 9. Producción de anticuerpos policlonales mono-específicos dirigidos contra HuPDIA1.	35
Figura 10. Título de anticuerpos anti-HuPDIA1 en suero híper-inmune (■) y fracción purificada (□).	35
Figura 11. Determinación de la K_D aparente para el antígeno (rHuPDIA1).	36
Figura 12. Efecto de la concentración de anticuerpos mono-específicos purificados sobre la actividad reductasa de la proteína HuPDIA1 recombinante.	37
Tabla 1. Resultados globales de producción y purificación de anticuerpos anti-HuPDIA1.	36

Abreviaturas

A	Absorbancia
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
AR	Actividad reductasa
BSA	Albumina sérica de bovino (<i>bovine serum albumin</i>)
CD	Crónico-degenerativas
CE ₅₀	Concentración media efectiva
DPBS	Solución PBS, modificación de <i>Dulbecco</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Ensayo inmuno-adsorbente ligado a enzima
ERAD	Degradación de proteínas asociada al RE
Fig	Figura
K _D	Constante de disociación
ND	Neuro-degenerativas
p.ej.	Por ejemplo
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos-salina
PDIA1	Proteína disulfuro isomerasa A1
POD	Peroxidasa de rábano (<i>horseradish peroxidase</i>)
RE	Retículo endoplásmico
RER	RE rugoso
rHuPDIA1	PDIA1 de humano recombinante
SI	Sistema inmune
TA	Temperatura ambiente
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
UPR	Respuesta a proteínas no plegadas

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Plegamiento de proteínas

Para que las proteínas sean funcionalmente activas, es necesario que su estructura tridimensional esté correctamente plegada. Los experimentos de Anfinsen demostraron que la secuencia de aminoácidos contiene toda la información requerida (propiedades químicas) para que

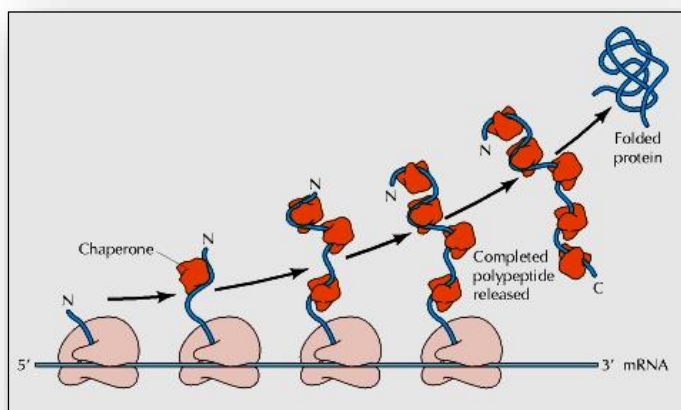


Figura 1. Acción de una chaperona durante la traducción.

Imagen tomada de Cooper (2000). El texto permanece en el idioma original de la referencia.

el polipéptido pueda conformarse (plegarse) adecuadamente [Vabulas *et al.*, 2010]. Aunque la estructura de las proteínas está determinada por los grupos R de los aminoácidos, existe un grupo de moléculas, llamadas chaperonas, que asisten el plegamiento y favorecen la conformación nativa (funcionalmente activa), principalmente evitando las interacciones no deseadas, las cuales pueden favorecer la formación de agregados proteicos (Fig. 1) [Baynes y Dominiczak, 2011]. Además del plegamiento, las proteínas necesitan de diferentes interacciones químicas para estabilizar su estructura; p. ej., interacciones hidrofóbicas, interacciones iónicas, puentes de hidrogeno, y enlaces disulfuro, las cuales pueden ser intra- o inter-catenarios [Benham *et al.*, 2013].

1.1.1. Plegamiento en el retículo endoplásmico

En células eucarióticas, el retículo endoplásmico (RE) es el compartimiento subcelular más abundante. Estructuralmente, puede subdividirse en liso o rugoso, siendo este último (RER) el principal encargado de la biosíntesis, plegamiento, secreción y degradación de proteínas. Por tal motivo, el RE es considerado un componente importante en la proteostasis celular [Perri *et al.*, 2016]. Como el RER contiene ribosomas unidos a su membrana, los polipéptidos nacientes, que

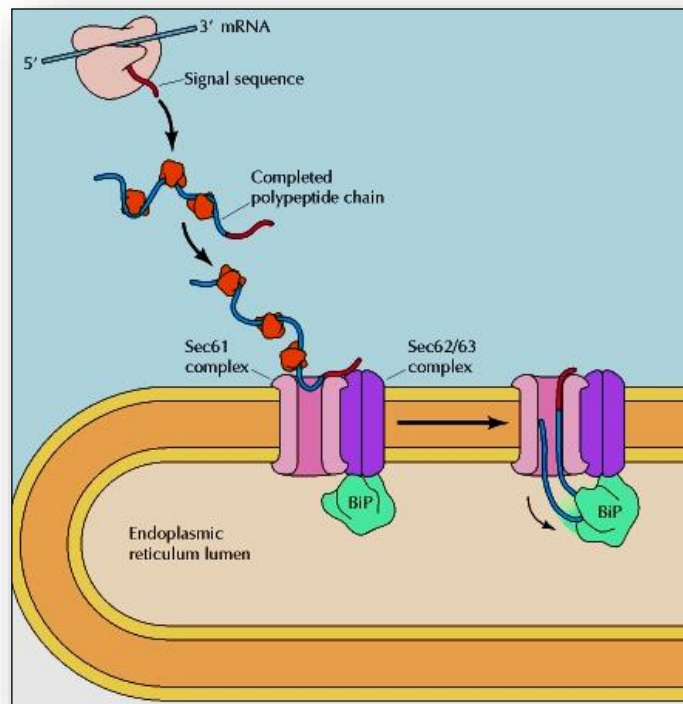


Figura 2. Translocación post-traduccional de las proteínas hacia el lumen de RE.

Imagen tomada de Cooper (2000). El texto permanece en el idioma original de la referencia.

seguirán la vía de secreción, son translocados hacia el lumen del RE a través de un canal, formado por el complejo de proteínas denominadas Sec61. La translocación puede llevarse de manera co- o post-traduccional. Durante la co-traduccional, el complejo ARNm/ribosoma/polipéptido es transportado por la partícula de reconocimiento de la secuencia señal (SRP) hacia el RE. En tanto, durante la post-traduccional, las chaperonas citosólicas mantienen al polipéptido desplegado y lo conducen al RE. En ambos procesos, la chaperona BiP asiste el plegamiento (Fig. 2).

Por otro lado, cabe mencionar que el plegamiento asistido requiere energía (hidrólisis de ATP) y que el ambiente redox (mayormente oxidativo) favorece la formación de enlaces disulfuro [Cooper, 2000]. Además de BiP, existen otras chaperonas dentro del RE; como GRP94 (miembro de la familia Hsp90), que es otra chaperona que actúa en conjunto con BiP. Además, las lectinas calreticulina y calnexina también funcionan como chaperonas, a la vez que participan en el mecanismo de degradación de proteínas asociado al RE (ERAD) [Gidalevitz *et al.*, 2013]. Por otro lado, las oxidorreductasas Ero1 y PDI, residentes del RE, aprovechan el ambiente redox del compartimiento y catalizan la formación de enlaces disulfuro en polipéptidos nacientes [Benham

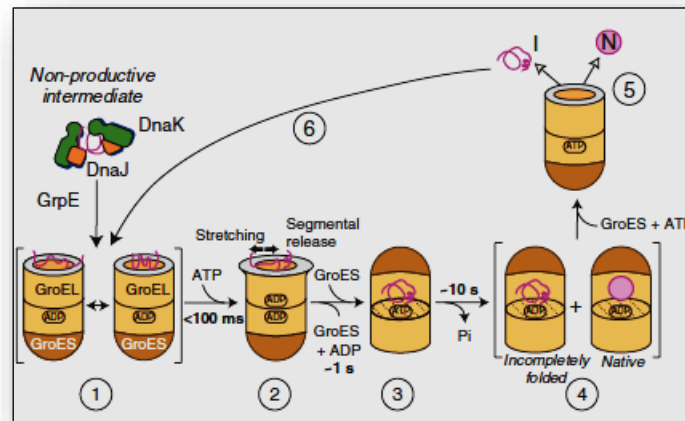


Figura 3. Plegamiento por encapsulación del sistema GroEL/GroES.

Imagen tomada de Vabulas (2000). El texto permanece en el idioma original de la referencia.

et al., 2013]. Interesantemente, PDI es necesaria para la proteostasis celular, ya que participa en el mantenimiento del equilibrio redox ditiol-disulfuro. Solo las proteínas de secreción poseen enlaces disulfuro, otras (p. ej., citosólicas) dependen de otro tipo de interacciones para estabilizar su estructura [Lodish *et al.*, 2000].

1.1.2. Plegamiento en citosol

El citosol posee proteínas que proveen estabilidad estructural a la célula; sin embargo, algunas proteínas son procesadas en este espacio. Al igual que el RE, el citosol también posee

chaperonas, conocidas como proteínas de choque térmico (p. ej., Hsp70 y Hsp60, Hsp10), ya que originalmente fueron identificadas en condiciones de alta temperatura. Sin embargo, hoy se sabe que pueden ser expresadas en condiciones normales (no estresantes), participando en el plegamiento de proteínas [Vabulas *et al.*, 2010]. Hsp70 es una chaperona citosólica que reconoce a cadenas polipeptídicas ricas en residuos no polares y se encarga de mantenerlas desplegadas en tanto son sintetizadas en los ribosomas libres, para así (después) ser transportadas hacia el RE o la mitocondria, por ejemplo [Cooper, 2000]. En bacterias, el complejo Hsp60/Hsp10, también llamadas chaperoninas GroEL y GroES respectivamente, asiste el plegamiento a través de la encapsulación de la proteína. Las proteínas procesadas por esta vía deben tener un tamaño de

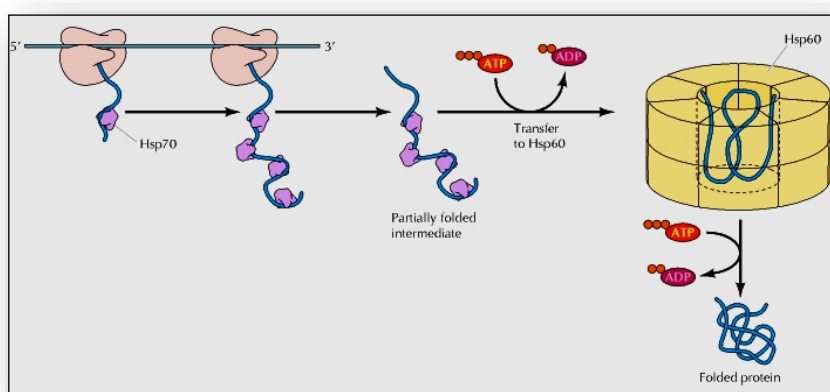


Figura 4. Acción de las chaperonas Hsp70 y Hsp60.

Imagen tomada de Vabulas (2000). El texto permanece en el idioma original de la referencia.

aprox. 60 kDa. El plegamiento demora entre 10 y 15 segundos, pudiendo entrar y salir de la capsula hasta encontrar su estructura correcta (Fig. 3). Otras proteínas pueden unirse a Hsp60 sin necesidad de la encapsulación [Vabulas, 2010]. Se ha observado que el proceso de plegamiento por parte de Hsp70 y Hsp60 procede de forma secuencial, con Hsp70 actuando como estabilizador y Hsp60 asistiendo al plegamiento (Fig. 4).

1.1.3. Plegamiento en mitocondria

Aunque la mitocondria es conocida por su función metabólica en las células eucariotas, una pequeña parte de las proteínas sintetizadas en RE terminan de procesarse dentro de este

organelo. Existen algunos equivalentes de la familia Hsp en mitocondria, como la mtHsp70, trasporta a la cadena polipeptídica a través de las dos membranas, y las mtHsp60 y mtHsp10, que asisten el plegamiento dentro el lumen (como sucede en citosol). Por otro lado, la mitocondria posee su propio mecanismo de respuesta a proteínas no plegadas (UPR), ya que el aumento de su concentración de proteínas no activa el UPR del RE [Baker *et al.*, 2011], descrito a continuación.

1.2. Plegamiento de proteínas en humanos y su asociación en patologías

El funcionamiento de la célula depende de la proteostasis. Al ocurrir la acumulación de proteínas no plegadas o mal plegadas se genera un proceso denominado estrés del RE, que a su vez activa el mecanismo UPR [Greek y Twonsend, 2014]. El propósito del UPR es la reducción de la concentración proteica asistido por chaperonas, incluyendo BiP y PDI, entre otras. Sin embargo, una estimulación crónica de ese mecanismo puede resultar en la muerte de la célula [Perri *et al.*, 2016]. En humanos, la activación del UPR junto a una acumulación de proteínas no plegadas da origen a enfermedades neurodegenerativas (ND), como Alzheimer, Parkinson, y Huntington; y crónico-degenerativas (CD), como aterosclerosis e isquemia, cardiopatías, hepatopatías, y diabetes mellitus, entre otras [Greek y Twonsend, 2014]. Aunque las enfermedades ND son diferentes clínicamente, todas presentan una acumulación de proteínas dentro del tejido afectado, volviéndose un biomarcador útil para su diagnóstico [Parakh y Atkin, 2015].

Cuando las proteínas no están correctamente plegadas, algunas de sus regiones hidrofóbicas se exponen e interaccionan entre sí, favoreciendo la formación de agregados proteicos. En humanos, algunas mutaciones en los genes codificantes para proteínas del sistema nervioso ocasionan mal plegamiento y acumulación de polipéptidos, lo que genera una estimulación crónica del UPR y conduce a una pérdida neuronal; es decir, neurodegeneración, lo que compromete las funciones (motoras o memoria) del individuo afectado. Por ejemplo, en Alzheimer existe una mutación del precursor de la proteína β -amiloide que genera un depósito proteico (placa amiloide); en Huntington ocurre una mutación en el gen Htt dando lugar a una cadena larga de glutamina que provoca la agregación proteica. Aunque se desconoce qué proteína se acumula en Parkinson, en el año 2005 se demostró que tanto BiP como los sensores del UPR están incrementados de forma significativa.

El mal plegamiento de las proteínas ocurre normalmente en la célula; sin embargo, el riesgo de que ocurra aumenta conforme a la edad, conjuntamente con la reducción de la eficiencia funcional de las chaperonas (acelerando la acumulación de agregados proteicos) [Perri *et al.*, 2016]. Adicionalmente, el RE no es el único relacionado con la neurodegeneración; esto es, sí la

mitocondria es dañada, puede liberar factores pro-apoptóticos que conducen a la muerte celular en el sistema nervioso [Baker *et al.*, 2011].

1.3. PDI como plegasa y chaperona

1.3.1. PDI de humano

La plegasa PDIA1, también conocida como PDI, es una ditiol-disulfuro oxidoreductasa con actividad chaperona que asiste el plegamiento oxidativo de polipéptidos sustrato. Como forma parte del complejo prolin-4-hidroxilasa, como subunidad β , también se le denomina P4HB. Es la proteína más abundante en el RE, representando casi el 1% del contenido total de proteínas celulares [Parakh y Atkin, 2015]. Descubierta en 1963, forma parte de una familia de 21 miembros con estructuras, funciones y ubicaciones distintas. A la fecha, es la proteína PDI más estudiada y mejor caracterizada, incluso se le considera como clásica o canónica (estructuralmente) [Lodish *et al.*, 2000]. Aunque predomina en el RE, ha sido encontrada en otros compartimientos celulares, como el citosol (donde generalmente no es estable) y la cara extracelular de la membrana plasmática (para reducir la agregación de proteínas) [Parakh y Atkin, 2015].

1.3.2. Bioquímica y genética de PDIA1

PDIA1 exhibe funciones tanto enzimáticas (oxidasa, reductasa, e isomerasa) como de asistencia (chaperona) sobre otros polipéptidos que requieren de enlaces disulfuro para su correcto plegamiento. Estructuralmente, es una enzima de 508 residuos de aminoácidos, conformada por cuatro dominios parecidos a tiorredoxina (*abb'a'*); donde los dominios *a* contienen la secuencia CGHC que les confiere su actividad catalítica, mientras que los dominios *b* participan en la unión al sustrato.

Los cuatro dominios adoptan la forma de herradura, con los dominios *a* ubicados uno frente al otro. Además, los dominios *a'* y *b'* se encuentran unidos por un segmento de 20 residuos, denominado *x-linker*, responsable de la flexibilidad para unirse a los sustratos. Por otro lado, un quinto dominio, designado como *c* y ubicado en el extremo C-terminal, se le atribuye la capacidad de unirse a Ca^{+2} . Finalmente, posee dos señales que le dirigen y retienen en el RE, una secuencia señal (en el N-terminal) y el tetra-péptido KDEL (en el C-terminal) [Bastos *et al.*, 2014].

Interesantemente, su arreglo estructural le permite conformarse en dos estados (Fig. 5): abierto, cuando se encuentra oxidada (40.3Å), permitiendo que los dominios *b* expongan sus regiones hidrofobias; y cerrado, cuando se reduce (27.6Å), permitiendo la interacción *a'* con *b'* y

x-linker, favoreciendo las funciones catalíticas. Gracias a este cambio conformacional, la proteína es capaz de cumplir sus acciones como chaperona [Flaumenhaft *et al.*, 2015; Mares *et al.*, 2015].

A pesar de que PDIA1 posee una etiqueta molecular que le retiene en el RE, ha sido localizada en otros compartimientos. Para explicar esto, existen algunas hipótesis; p. ej., cuando el RE se satura de proteínas, cabe la posibilidad de que algunas de las chaperonas se fuguen como

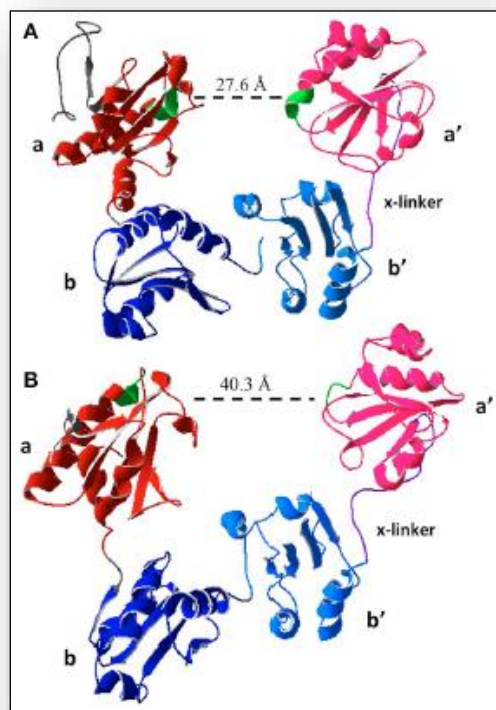


Figura 5. Estructura de PDIA1, en sus estados reducido (A) y oxidado (B).

Imagen tomada de Ali Khan (2014). El texto permanece en el idioma original de la referencia.

parte de un mecanismo de alivio, o lo abandonen conformando complejos multiméricos. En algunos tipos celulares, como hepatocitos, células pancreáticas, células endoteliales, tirocitos, y plaquetas, ha sido localizada en compartimientos de la vía de secreción (p. ej., aparato de Golgi y vesículas de secreción) o en superficie celular. Además, se ha reportado localización mitocondrial; aunque esta observación aún es motivo de debate, ya que no coincide con el peso molecular y no

es reconocida por anticuerpos específicos, aun cuando muestra la actividad catalítica típica. Por otro lado, también ha sido detectada en núcleo, en conjunto con ERp57 (un parólogo de la familia PDI) [Turano *et al.*, 2002]. Ante la falta de una señal de localización mitocondrial o nuclear, es factible suponer que las evidencias que la ubican fuera la vía de secreción corresponden a artefactos experimentales.

La función de PDIA1 depende de su estado redox, el cual es asistido por la proteína Ero1. La formación de enlaces disulfuro depende de la forma oxidada, mientras que la ruptura es catalizada por la forma reducida. La actividad isomerasa (Fig. 6) consiste en intercambiar los

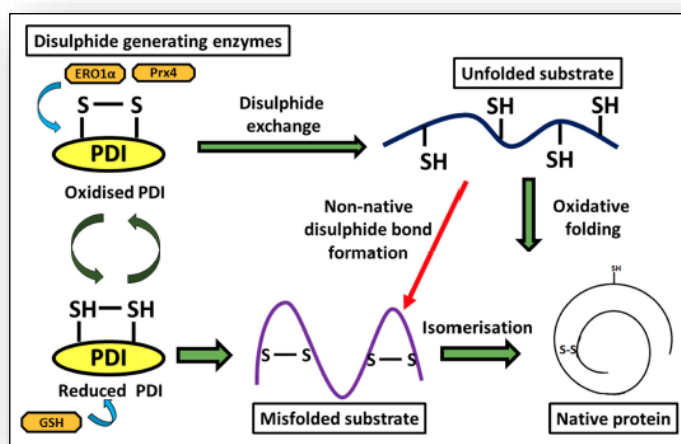


Figura 6. Diagrama de la formación de enlaces disulfuro en ER de células eucariotas y las reacciones redox de PDI.

Imagen tomada de Parakh (2015). El texto permanece en el idioma original de la referencia.

enlaces disulfuro incorrectamente oxidados de proteínas mal plegadas. Durante la formación de enlaces disulfuro (oxidación o isomerización), los residuos de cisteína vecinos en el sitio activo ($C^N-X-X-C^C$) realizan reacciones secuenciales de oxidación y reducción. Se ha propuesto que el dominio α oxidado cataliza la oxidación de sustratos reducidos, y durante el proceso se reduce. El residuo C^N reacciona con el sustrato para formar un enlace disulfuro heterodimérico PDI-sustrato en tanto el residuo C^C libera el sustrato. Enseguida, el dominio α es re-oxidado mediante la acción oxidativa del dominio α' , a través de una reacción intramolecular. Finalmente, la re-oxidación del

dominio *a'* es catalizada por la proteína Ero1, y durante el proceso se reduce O₂ para producir H₂O₂ [Grek y Twonsend, 2014; Ali Khan y Mutus, 2014].

PDIA1 es capaz de distinguir entre proteínas no plegadas, parcialmente desplegadas, y plegadas, presentando una alta afinidad por aquellas mal plegadas; es decir, total o parcialmente desplegadas, ya que las regiones hidrofóbicas expuestas le facilitan la interacción con el sustrato, habilidad que le confiere importancia, específicamente cuando el mecanismo UPR es activado, favoreciendo la degradación de las proteínas (irreparables) mediante el proceso ERAD. Adicionalmente, mantiene la estructura nativa de la enzima prolil-4-hidroxilasa, involucrada en la síntesis del colágeno [Parakh y Atkin, 2015]. *In vitro*, PDIA1 es capaz de formar dímeros, a través de interacciones hidrofóbicas de sus dominios *b*, lo cual pudiera ser el mecanismo de regulación de la actividad oxidasa: bloqueando los sitios de unión a sustrato cuando prevalecen bajas concentraciones [Bastos-Aristizabal *et al.*, 2013].

1.3.3. Moduladores e inhibidores

Por más de dos décadas, el antibiótico *bacitracina* ha sido utilizado ampliamente como inhibidor de enzimas PDI [Mandel *et al.*, 1993; Dickerhof *et al.*, 2011]. Hoy en día, se sabe que es una mezcla de polipéptidos cíclicos con capacidad de inhibir algunas funciones bioquímicas asociadas; p. ej., sus actividades enzimáticas. Sin embargo, por ser un producto de origen natural, existe el riesgo de contaminación por proteasas (durante su extracción), por lo que aún se debate su especificidad [Karala y Ruddock, 2010]. Otros antibióticos, como *vancomicina*, *gentamicina*, y *ribostamicina*, también son capaces de unirse e inhibir a PDIA1, pero solo a altas concentraciones [Horibe *et al.*, 2002].

La hormona tiroidea y algunos estrógenos también han mostrado capacidad de unirse a PDI, con una afinidad en el orden micro/nanomolar [Tsibris *et al.*, 1989; Guthapfel *et al.*, 1996]. Sin embargo, estas moléculas (o sus derivados) son inaceptables como inhibidores, debido a sus efectos sistémicos colaterales, los cuales ocurren en el orden nanomolar. Por otro lado, el flavonoide quercetin-3-O-rutinósido, también llamado *Rutina* o *Soforina*, ha demostrado tener una alta actividad inhibitoria, por lo que se han desarrollado y probado diferentes derivados de esa molécula. Interesantemente, los resultados más recientes indican que sólo los análogos que poseen un carbohidrato en la posición 3' del anillo son capaces de inhibir a PDI. [Flaumenhaft *et al.*, 2015].

En los últimos años, varios moduladores sintéticos han sido desarrollados. Sin embargo, a pesar de que exhiben una mayor potencia y selectividad *in-vitro*, con respecto a *bacitracina*, la carencia de ensayos que demuestren su eficiencia en sistemas biológicos y la prevalente amenaza de toxicidad representan una preocupación constante para su inclusión en protocolos clínicos [Xu *et al.*, 2014; Flaumenhaft *et al.*, 2015; Kaplan *et al.*, 2015].

1.4. PDIA1 como diana terapéutica

Varias son las evidencias biológicas que han establecido el potencial de PDIA1 como diana terapéutica para el desarrollo de moléculas dirigidas a controlar enfermedades que afectan a la población actual. Por un lado, se ha distinguido su participación (como disulfuro reductasa en membrana celular) durante la infección del VIH (favoreciendo la interacción de receptores de membrana de los linfocitos T4 con la proteína viral gp120), ya que esta puede ser bloqueada mediante el uso de agentes anti-PDI [Ryser *et al.*, 1994; Papandréou *et al.*, 2010]. Por otro lado, se ha demostrado que interacciona con los depósitos amiloides del páncreas, los cuales representan el componente principal de los islotes β en pacientes diabéticos tipo 2; cuya agregación, además, puede conducir a la disfunción celular y, finalmente, a la muerte. Inclusive, se ha reportado que su sobre-expresión intrínseca, inducida por glucosa y palmitato, es capaz de contrarrestar los efectos de la disfunción celular, aumentando la velocidad de secreción de insulina y reestableciendo los niveles de tal hormona a valores basales [Montane *et al.*, 2015]. En otro escenario, un estudio pre-clínico reciente mostró la viabilidad de utilizar a quercetin-3-O-rutinósido como agente anti-trombótico [Flaumenhaft *et al.*, 2015].

1.5. Anticuerpos como agentes terapéuticos

1.5.1. Inmunología y anticuerpos

La función principal del sistema inmune (SI) es defender al organismo de cualquier agente considerado como extraño, pudiendo distinguir entre lo propio y lo ajeno. De acuerdo a su ubicación, se subdivide en dos compartimientos: linfoide y retículo endotelial. El SI linfoide es capaz de proveer protección con alta especificidad contra agentes extraños, gracias a tres tipos de células: (i) linfocitos T, que participan en la respuesta humoral y celular; (ii) linfocitos B, que se diferencian en las células plasmáticas, secretan anticuerpos, y participan en el procesamiento de proteínas y presentación de antígenos; y (iii) células NK, que atacan y destruyen algunos tipos células tumorales [Goldman y Prabhakar, 1996].

Al ser estimulados por un antígeno, los linfocitos B se diferencian produciendo un gran número de inmunoglobulinas. Cuando han madurado, pero no han sido estimulados, pueden expresar algunas inmunoglobulinas (p. ej., IgM) y varias proteínas de membrana (p. ej., MHC clase II, CD19, y CD20), y representan un porcentaje significativo (15-20%) del total de linfocitos circulantes. Como diferentes antígenos pueden contener una amplia gama de determinantes antigénicos (epítopes), la respuesta específica puede ser: (i) monoclonal, cuando exhibe sólo un epítope (induciendo la diferenciación y

proliferación de un linaje celular B), o (ii) policlonal, cuando presenta más de un epítope (promoviendo el desarrollo y diferenciación de varios linajes celulares B) [Alberts *et al.*, 2002].

Las inmunoglobulinas (Ig), o anticuerpos, son proteínas solubles y secretadas que pertenecen a la respuesta humoral del SI, constituyen el 20% del contenido plasmático, y su función es unirse a agentes patógenos (p. ej., bacterias o virus) o tóxicos para distinguirlos y, así, ser neutralizados (o eliminados) por otros componentes del SI [Lehninger *et al.*, 2006]. Durante las primeras etapas de la estimulación, el primer anticuerpo formado es transportado hacia la membrana plasmática, donde

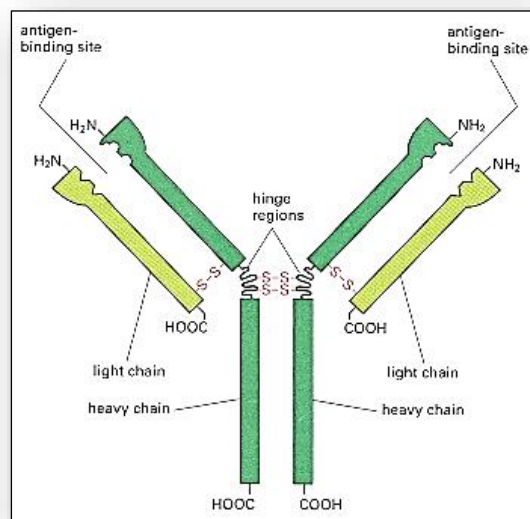


Figura 7. Representación esquemática de la estructura típica de una inmunoglobulina de mamíferos.

Imagen tomada de Alberts (2002). El texto permanece en el idioma original de la referencia.

funciona como receptor del antígeno. Inmediatamente después de la activación, estas células B (de memoria) proliferan y se diferencian hacia células efectoras, las cuales producen y secretan anticuerpos con sitios específicos de reconocimiento a un solo antígeno.

La estructura básica de un anticuerpo (Fig. 7) consiste en una forma Y, con dos sitios idénticos de unión al antígeno (divalente), situados en la región N-terminal de la región variable. La eficiencia de unión al antígeno se incrementa gracias a una región flexible (bisagra) presente en las dos cadenas pesadas. La unión antígeno-anticuerpo es reversible, siendo mediada por fuerzas

no covalentes (p. ej., puentes de hidrogeno, fuerzas de *Van Der Waals*, e interacciones iónicas) que sólo son efectivas si ambas moléculas se encuentran lo suficientemente cerca como para permitir que las regiones complementarias interactúen. Por lo tanto, la afinidad se corresponde a la fuerza de unión entre un epítipo y un sitio de unión a antígeno, dependiente de la variedad y del número de fuerzas no covalentes que deben ser quebrantadas simultáneamente para disociar el complejo [Alberts *et al.*, 2002]. Los mamíferos poseen cinco clases de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, cada uno con propiedades estructurales y funcionales únicas.

IgA es el anticuerpo mayor de algunas secreciones corporales (p. ej., leche materna, saliva, lágrimas, y secreciones respiratorias e intestinales. En sangre, se encuentra en forma de monómero (con cuatro cadenas); en tanto que, en secreciones, como dímero (con ocho cadenas) [Alberts *et al.*, 2002]. Es un activador poco eficiente del complemento, ya que actúa en las superficies epiteliales (donde el complemento y los fagocitos no se localizan habitualmente) [Janeway *et al.*, 2001].

IgG es el anticuerpo más abundante en la sangre, compuesto por 4 cadenas (monómero), que se produce en grandes cantidades durante la respuesta secundaria al antígeno. Existen cuatro subtipos de esta inmunoglobulina: IgG1, que neutraliza toxinas y es la más abundante en sangre (70%); IgG2, que se une a polisacáridos; IgG3, que reconoce a partículas virales; e IgG4, que difícilmente se ha logrado establecer su función, ya que se encuentra en bajas proporciones séricas (2%) [Goldman y Prabhakar, 1996]. Por su capacidad de difusión a través de fluidos extracelulares y su alta afinidad, IgG representan un excelente sistema de defensa contra toxinas presentes en tejidos, ya que son anticuerpos capaces de activar el complemento [Janeway *et al.*, 2001].

IgM es el primer anticuerpo producido por linfocitos B, más no el primero en aparecer en su superficie, secretado en respuesta a la primera exposición al antígeno. Estructuralmente, es un pentámero con 10 sitios de unión al antígeno, exhibiendo mayor avidéz (fuerza total de unión entre dos moléculas polivalentes) y convirtiéndose en la inmunoglobulina más efectiva durante la respuesta primaria [Alberts *et al.*, 2002]. Aparece en sangre entre los 3-5 días posteriores a la primera exposición al antígeno, con un pico máximo de expresión a los 10 días, el cual puede persistir por varias semanas. Además, también es capaz de activar la cascada del complemento [Goldman y Prabhakar, 1996].

IgE (monómero de 4 cadenas) es un anticuerpo presente en bajas cantidades, tanto en sangre como fluidos extracelulares, que se une a mastocitos presentes tanto en piel y mucosas como vasos sanguíneos del tejido conectivo. Durante infecciones, la unión de este anticuerpo al antígeno provoca la liberación de mediadores químicos (por parte de los mastocitos) que inducen tos, estornudo, y vómito, favoreciendo la expulsión del agente infeccioso [Janeway *et al.*, 2001].

IgD (monómero de 4 cadenas) es un anticuerpo presente en bajas cantidades en la sangre (<1%) y, por ende, sus funciones aún no han sido claramente definidas [Alberts *et al.*, 2002].

1.5.2. Anticuerpos terapéuticos exitosos

Además de sus aplicaciones clásicas en el diagnóstico clínico, los anticuerpos (o sus derivados) han sido propuestos como alternativas de tratamiento para diferentes enfermedades en humanos (p. ej., autoinmunes, cardiovasculares, y cáncer, entre otras), debido a su gran capacidad de unión y afinidad hacia un antígeno específico. Por referir algunos: (i) Etanercept (*Enbrel*[®]; *Amgen, Pfizer*), un derivado de anticuerpos que consiste de la fusión del dominio de unión a ligando del receptor TNFR con el fragmento Fc de una IgG1 [Peppel *et al.*, 1991], se une específicamente a TNF y es utilizado en el tratamiento de diferentes enfermedades autoinmunes, incluyendo artritis reumatoide [Spencer-Green, 2000]; (ii) Adalimumab (*Humira*[®]; *AbbVie*), un anticuerpo monoclonal, se une específicamente a TNF y es utilizado en el tratamiento de enfermedad de Crohn [Rubin *et al.*, 2011]; (iii) Omalizumab (*Xolair*[®]; *Novartis*), un anticuerpo recombinante humanizado, se une a la inmunoglobulina IgE y es utilizado en el tratamiento de asma [Baker *et al.*, 2016]; y (iv) Cetuximab (*Erbix*[®]; *Merck KGaA, Bristol-Myers Squibb, Eli Lilly*), un anticuerpo monoclonal quimérico humano-murino, se une al receptor EGFR y es utilizado en el tratamiento de diferentes tipos de tumores [Tseng *et al.*, 2015].

1.5.3. Anticuerpos comerciales anti-HuPDIA1

Actualmente, existe una amplia variedad de anticuerpos anti-PDI disponibles comercialmente, tanto de origen monoclonal como policlonal. *Abcam* (<http://www.abcam.com>), *BD Biosciences* (<http://www.bdbiosciences.com>), *Enzo Life Sciences* (<http://www.enzolifesciences.com>), y *Santa Cruz Biotechnology* (<https://www.scbt.com>) comercializan varios anticuerpos que reconocen a HuPDIA1 (como marcador del RE) y que son utilizados en ensayos inmunoquímicos, inmunoprecipitación, y citometría de flujo.

1.6. Potencial de los anticuerpos como alternativa para la modulación de las funciones de HuPDIA1

Como se ha descrito, la plegasa PDIA1 es una proteína multifuncional que participa en diferentes mecanismos celulares de importancia fisiológica y de impacto clínico. Por ejemplo, en

enfermedades neurodegenerativas, donde se acumulan agregados proteicos que potencialmente pueden inducir muerte celular, se ha observado que esta plegasa puede interaccionar con polipéptidos mal plegados, evitando su acumulación [Conway y Harris, 2015; Bechtel y Weerapana, 2016]. En consideración a que las moléculas inhibitorias actualmente disponibles han mostrado limitada probabilidad de transferencia a protocolos clínicos, los anticuerpos representan una alternativa viable para la regulación de las funciones fisiológicas de la PDIA1 humana, ya que ofrecen: (i) alta especificidad, aumentando el índice terapéutico; (ii) mayor número de dianas potenciales, ya que algunos antígenos pueden ofrecer más de un epítipo; y (iii) beneficio de terapia a largo plazo [Imai y Takaoka, 2006; Chames *et al.*, 2009].

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Determinar la capacidad moduladora de anticuerpos anti-HuPDIA1 sobre la actividad reductasa de esa plegasa, mediante ensayos de unión y competencia, para demostrar su aplicabilidad como reguladores de la actividad enzimática.

2.2. Objetivos específicos

1. Obtener un suero policlonal dirigido contra la proteína PDIA1 de humano (HuPDIA1) mediante el desarrollo de un protocolo típico de producción en conejo.
2. Obtener la fracción de anticuerpos policlonales mono-específicos anti-HuPDIA1 mediante un protocolo de aislamiento a través de cromatografía de inmuno-afinidad.
3. Determinar la K_D aparente de los anticuerpos mono-específicos anti-HuPDIA1 mediante un ensayo inmuno-enzimático competitivo.
4. Determinar el efecto modulador de los anticuerpos mono-específicos anti-HuPDIA1 sobre la actividad reductasa de la proteína recombinante mediante un ensayo enzimático competitivo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos biológicos y químicos

Los reactivos de grado biotecnología (*Biochem/MoBio*) fueron adquiridos de distintos proveedores: *10X BLOK™ BSA* (*BSA* al 10% en solución 10X de *PBS*) [*G-Biosciences*]; *1X Dulbecco's-modified PBS (DPBS)* [*CellGro*]; anticuerpo (IgG) de cabra anti-Fc de conejo conjugado a peroxidasa [*Boehringer Mannheim*]; *BSA* a 10 mg/mL [*New England Biolabs*]; estuche *CellLytic® B Plus*; *Tween®-20*, adyuvantes de *Freund* (completo e incompleto), isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG), imidazol, ampicilina, β -mercaptoetanol (BME) [*Sigma*]; *1-Step™ Ultra TMB-ELISA Substrate Solution* [*Thermo Scientific*]; sefarosa-(4B)-CNBr [*GE Health Care*]; metanol, membrana tubular para diálisis 3.5K [*Spectrum*]; agarosa-NTA-Ni [*Qiagen*]; solución de acrilamida, agarosa, N,N,N',N'-tetra-metil-etilendiamina (TEMED), azul brillante de *Coomassie* R250, reactivo de *Bradford* [*Biorad*]; tris[hidroximetil]aminometano (Tris), dodecil sulfato de sodio (SDS), glicerol, ditiotreitól (DTT) [*IBI*]; ácido acético, bicarbonato de sodio (NaHCO_3) [*JT Baker*]; ácido etilendiamino-tetra-acético (EDTA) [*Pierce*]; isopropanol [Prod. Quím. Monterrey]; extracto de levadura, triptona [*Becton Dickinson*]; cloruro de sodio (NaCl) [*Amresco*]; glicina [*MP Biomedicals*]; etanol [*Fermon*].

3.2. Reserva de reactivos biológicos (laboratorio de biotecnología, FCQI-UABC)

3.2.1. pQHuDPI

Plásmido derivado del vector pQE30 (*Qiagen*). La secuencia codificante para el péptido maduro de la proteína PDIA1 de humano fue amplificada mediante PCR, usando dos oligonucleótidos sintéticos, específicos para el ADN complementario del gen *pdia1/p4hb*, como iniciadores y el plásmido pCMV6-XL4/NM_000918.2 (*Origene*) como molde. En condiciones de expresión típicas, la proteína HuPDIA1 recombinante se produce como polipéptido activo etiquetado con un hexámero de histidinas en el extremo amino-terminal [Mares *et al.*, 2011].

3.2.2. *Escherichia coli* SHuffle® Express

La cepa bacteriana *SHuffle® Express* (*fhuA2* [*lon*] *ompT* *abpC* *gal* λ att::pNEB3-r1-cDsbC (*Spec^R*, *lacI^q*) Δ *trxB* *sulA11* *R*(*mcr-73::miniTn10--Tet^R*)2 [*dcm*] *R*(*zgb-210::Tn10--Tet^R*) *endA1* Δ *gor* Δ (*mcrC-mrr*)114::IS10), obtenida de *New England Biolabs*, expresa eficientemente a proteínas con enlaces disulfuro en su citosol.

3.3. Equipo y programas computacionales

Las células bacterianas fueron cultivadas a 37 °C con agitación constante (300 rpm) en una incubadora de ambiente controlado *Incubator Shaker Series 25* (New Brunswick Sci. Co.). Las incubaciones en microtubos se realizaron en un termobloque (*VWR Dry Block Heater*). La separación celular se llevó a cabo en las centrifugas *Allegra™ X-22R* (Beckman Coulter), *Biocentrifuge Fresco* (Heraeus), y *MiniSpin® Plus* (Eppendorf), considerando el volumen requerido. Las lecturas de absorbancia en los micro-ensayos fueron registradas en un lector de microplacas *Microplate Reader 680* (Biorad). El programa de análisis bioestadístico *Graphpad™ Prism® v4.0* para *Windows®* fue empleado para el tratamiento de datos.

3.4. Protocolos generales

3.4.1. Expresión y purificación de HuPDIA1 recombinante

Expresión. Un cultivo semilla fue preparado inoculando 0.06 mL de una suspensión de *E. coli SHuffle® Express* portadora de pQHUPDI en 6 mL de medio LB (triptona al 1%; NaCl al 1%; extracto de levadura al 0.5%) suplementado con ampicilina [0.15 mg/mL]. La proliferación bacteriana fue favorecida durante la noche. 5 cultivos a media escala fueron preparados inoculando 1 mL del cultivo semilla en 100 mL de medio LB suplementado con ampicilina. Estos fueron incubados durante 2 h (pre-inducción), inducidos con IPTG (0.1 mM), e incubados durante 4 h (sobre-expresión). Las pastillas bacterianas fueron separadas mediante centrifugación (10 min a 9,500 rpm; 10 °C) y conservadas en congelación (-20 °C) hasta su uso.

Lisis bacteriana. Cada pastilla celular fue descongelada a temperatura ambiente (TA) y resuspendida en 5 mL de reactivo *CellLytic® B*. La lisis fue favorecida mediante la adición de 0.1 mL de lisozima a 10 mg/mL, 250 U de benzonasa, y 0.05 mL de una mezcla 100X de inhibidores de proteasas. Después 10 min de agitación leve a TA, la fracción soluble (lisado bacteriano total, LBST) fue obtenida mediante centrifugación (9,500 rpm; 15 min). El LBST fue clarificado mediante una segunda centrifugación (14,500 rpm; 15 min) y conservado en refrigeración (12-14 °C) hasta su uso.

Purificación. Una columna para cromatografía de afinidad a metales (colchón de 1 mL, resina de agarosa-NTA-Ni) fue preparada y lavada con 5 mL de solución BW (300 mM de NaCl; 100 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 20 mM de imidazol, pH 8.0). El LBST clarificado fue mezclado con 1 volumen de solución BW y lentamente cargado en la columna. Después de tres pasadas, la columna fue lavada con 15 mL de solución BW. La proteína rHuPDIA1 fue separada mediante la adición de 7 mL de solución E (300 mM de NaCl; 100 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 250 mM de

imidazol, pH 8.0) y colectada en fracciones de 1 mL. Las fracciones de mayor concentración proteica fueron identificadas, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, agrupadas y mezcladas. La cuantificación de proteínas fue determinada mediante un micro-ensayo de *Bradford*, siguiendo un protocolo estándar de laboratorio.

3.4.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las muestras fueron preparadas mezclando 1 volumen de solución proteica con 1 volumen de solución 2X para cargado de proteínas (glicerol al 10%; SDS al 2.5%; BME al 5%; azul de bromofenol al 0.002%; 50 mM de Tris-HCl, pH 6.8) y desnaturalizadas a $T = 95-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. Las proteínas contenidas en 0.01 mL de muestra fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% [Laemmli, 1970]. El gel fue preparado siguiendo el protocolo estándar de laboratorio. La separación fue realizada a 80 V durante 15-20 min y, posteriormente, a 120 V durante 60-90 min. Las proteínas fueron teñidas con solución CBB (isopropanol al 25%; ácido acético al 10%; azul de brillante de *Coomassie* R250 al 0.2%) durante 1-2 h, y destañadas con solución DS (isopropanol al 10%; ácido acético al 10%) durante la noche.

3.4.3. Cuantificación de proteínas mediante micro-*Bradford*

La concentración de proteínas fue determinada espectrofotométricamente mediante la adaptación de un micro-ensayo del método de Bradford [Zor y Selinger, 1996]. Una solución a 0.05 mg/mL de *BSA* fue preparada, usando agua destilada como diluyente. En una placa de microtitulación, se prepararon mezclas patrón (0.05 mL) conteniendo 0, 10, 20, 30, 40, y 50 $\mu\text{g/mL}$ de *BSA*, y la dilución de la proteína de interés (1:50 o 1:100; 0.05 mL; por duplicado). Dos volúmenes (0.1 mL) de reactivo de *Bradford* fueron añadidos a cada pocillo y fueron mezclados por pipeteo. Después de 5 min de incubación a temperatura ambiente (TA), los valores de absorbancia a 595 y 450 nm (A_{595} y A_{450}) fueron registrados, usando un lector de microplacas. La concentración fue calculada interpolando el resultado de la relación A_{595}/A_{450} dentro del intervalo lineal de una curva estándar de *BSA* ($r^2 > 0.99$).

3.4.4. Inmunoensayo tipo ELISA

Sensibilización y bloqueo. En una placa de microtitulación, cada pocillo fue sensibilizado con 500 ng de antígeno, añadiendo 0.1 mL de una solución de antígeno a 5 $\mu\text{g/mL}$ en 100 mM de NaHCO_3 . Después de incubar durante la noche a TA, la solución fue removida y cada pocillo fue bloqueado con 0.2 mL de solución B (1X del reactivo *BLOK™ BSA*). Después de 2 h de

incubación a TA, la solución fue removida y cada pocillo fue lavado 3 veces con 0.2 mL de solución W (50 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 150 mM de NaCl; *Tween*[®]-20 al 0.05%).

Reconocimiento primario. En placa, se realizaron diluciones seriadas base 3 a partir de una dilución 1:50 de la muestra (suero/anticuerpo) a valorar. Para esto, 0.1 mL de solución R (50 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 500 mM de NaCl; *Tween*[®]-20 al 0.05%) fueron añadidos a cada pocillo. Paralelamente, la dilución 1:50 de la muestra fue preparada en solución R. La primera dilución (1:150) fue realizada en los pocillos correspondientes a la columna 1, mezclando 0.05 mL de la muestra (1:50) con el volumen (0.1 mL) de solución R. Las diluciones posteriores (1:450-1:2,952,450) fueron realizadas en los pocillos correspondientes (columnas 2-10) de igual manera, pero tomando 0.05 mL de la dilución previa para la mezcla. Después de 1 h de incubación a TA, la solución fue removida y cada pocillo fue lavado como antes.

Reconocimiento secundario. En un microtubo, se preparó una dilución 1:5,000 del anticuerpo (IgG) de cabra anti-Fc de conejo conjugado a peroxidasa, usando solución R como diluyente. Inmediatamente, 0.1 mL de esa dilución fue añadido a cada pocillo de las columnas 1-11. Después de 1 h de incubación a TA, la solución fue removida y cada pocillo fue lavado como antes.

Revelado y determinación del título. El inmunoreconocimiento fue revelado usando la solución de sustrato para peroxidasa (*1-Step[™] Ultra TMB-ELISA Substrate Solution*), añadiendo 0.1 mL a cada pocillo. Después de 30 min de incubación a TA, la reacción fue parada con 0.1 mL de solución de paro (2 M de H₂SO₄). La absorbancia a 450 nm (A_{450}) fue registrada usando un lector de microplacas. El título del inmunoreconocimiento fue determinado mediante un ajuste de los mínimos cuadrados utilizando un modelo de regresión no lineal de una curva sigmoidea dosis-respuesta, dependiente de la dosis, graficando la A_{450} contra el valor logarítmico de la dilución.

3.5. Producción de anticuerpos policlonales anti-HuPDIA1

3.5.1. Animales de experimentación

Dos conejos albinos no tipificados fueron obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina y Psicología (FMP) de la UABC. El protocolo de experimentación fue aprobado por el comité de ética en investigación de la misma unidad académica.

3.5.2. Obtención de suero pre-inmune

Una muestra (0.5 mL) de sangre periférica fue obtenida mediante punción de la vena central de la oreja. Después de 1 h de incubación a 37 °C, el suero fue separado mediante centrifugación (10

min a 14,500 rpm) y analizado mediante ELISA para cuantificar el título de anticuerpos contra el antígeno (rHuPDIA1) en estado pre-inmune.

3.5.3. Preparación del antígeno

El antígeno (0.1 mg) fue administrado utilizando una emulsión como sistema de liberación sostenida. Todas las emulsiones fueron preparaciones frescas, mezclando 1 mL de rHuPDIA1 (0.2 mg/mL en DPBS) con 1 mL de adyuvante de *Freund* (AF). La emulsión para la primera administración (inmunización inicial) fue preparada usando AF completo; en tanto, las posteriores fueron con AF incompleto.

3.5.4. Protocolo de inmunización y seguimiento

El antígeno fue administrado vía subcutánea, con intervalos de 10 días, durante 3 meses. El esquema de inmunización consideró la inoculación del antígeno en dos diferentes puntos de la región dorsal del animal de experimentación. A los 25 y 35 días, muestras sanguíneas analíticas (1-2 mL) fueron obtenidas para valorar el título de anticuerpos circulantes. A los 45, 55, y 65 días, muestras sanguíneas preparativas (15-30 mL) fueron obtenidas para fines de purificación de anticuerpos. Al final del protocolo de inmunización, los animales de experimentación fueron puestos a disposición del personal del bioterio.

3.5.5. Obtención de suero híper-inmune

Las muestras sanguíneas fueron incubadas a 37 °C durante 1 h y mantenidas en refrigeración (12-14 °C) durante 30 min. El suero fue separado mediante centrifugación a 9,500 rpm durante 10 min. Dependiendo de la cantidad, el suero fue transferido a microtubos o tubos cónicos (15 mL). Adicionalmente, el suero fue clarificado mediante centrifugación a 13,000 rpm (microtubo) o 9,500 (tubo cónico) durante 10 min. El suero clarificado fue transferido a tubos limpios y conservado en congelación (- 20 °C) hasta su uso.

3.6. Purificación de anticuerpos policlonales mono-específicos anti-HuPDIA1

3.6.1. Diálisis de proteínas

Una solución conteniendo 3-5 mg de proteína (rHuPDIA1 pura o LBST de *E. coli* hospedera) fue dializada contra 0.1 M de NaHCO₃ usando una membrana tubular 3.5K como sistema semi-permeable para intercambio de solución amortiguadora (3 cambios de 0.5 L).

3.6.2. Derivatización de sefarosa-4B-CNBr

La resina sefarosa-4B-CNBr (0.5 g) fue inicialmente resuspendida en 50 mL de una solución 1 mM de HCl. Después de 15-30 min de activación (reposo a TA), la resina fue filtrada mediante vacío y lavada (50 mL, 1 mM de HCl). La resina activada fue inmediatamente transferida a un tubo cónico (15 mL) conteniendo la solución de proteína (3-5 mg en 0.1 M de NaHCO₃). La derivatización fue favorecida durante la noche (agitación leve a TA). La eficiencia de la reacción fue determinada calculando el porcentaje de derivatización utilizando la siguiente formula:

$$\text{Derivatización (\%)} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \cdot 100$$

Donde A₁ y A₂ corresponden a las unidades de absorbancia a 280 nm antes y después de la reacción de derivatización, respectivamente. Una vez alcanzado el valor máximo de derivatización, típicamente mayor al 90%, los grupos cianato remanentes fueron bloqueados con Tris (1 M, pH 8.0), adicionando una décima parte del volumen de reacción; es decir, 0.1 mL por cada 1 mL. La resina fue preservada con azida de sodio (NaN₃) al 0.02% (final) y mantenida en refrigeración (12-14 °C) hasta su uso.

3.6.3. Cromatografía de afinidad negativa

Una columna para cromatografía de afinidad negativa (colchón de 1 mL, resina de sefarosa-4B acoplada a proteínas de *E. coli*) fue preparada y lavada con 5 mL de DPBS. La muestra de suero hiper-inmune (1 mL) fue diluida 1:10, utilizando DPBS como diluyente, y cargada lentamente en la columna. Después de tres pasadas, el efluente (suero libre de anticuerpos contra proteínas de *E. coli*) fue colectado y conservado en refrigeración (12-14 °C) hasta su uso.

3.6.4. Cromatografía de afinidad a antígeno (inmunofinidad)

Una columna para cromatografía de inmunofinidad (colchón con 1 mL, resina de sefarosa 4B-acoplada a rHuPDIA1) fue preparada y lavada consecutivamente con 10 mL de DPBS, 10 mL de 0.1 M de ácido acético, y 10 mL de DPBS. El suero libre de anticuerpos contra proteínas de *E. coli* fue cargado lentamente en la columna. Después de tres pasadas, el efluente fue descartado y la columna fue lavada con 10 mL de DPBS. Los anticuerpos mono-específicos fueron obtenidos mediante elución con 10 mL de 0.1 M de ácido acético, colectados en fracciones de 1 mL, y recibidos en microtubos conteniendo 0.2 mL de solución 1 M de Tris-HCl (pH 8.0) como neutralizante.

3.6.5. Regeneración y preservación de resinas de afinidad

Las resinas fueron regeneradas mediante lavados consecutivos con 10 mL de DPBS, 10 mL de 0.1 M de ácido acético, y 10 mL de DPBS. Para conservar la resina a largo plazo, 3 mL de DPBS

suplementado con NaN_3 al 0.02% fueron añadidos a la columna y, posteriormente, preservada en refrigeración (12-14 °C).

3.6.6. Cuantificación proteínas séricas y anticuerpos

El contenido de proteínas totales presentes en el suero hiper-inmune y en la muestra de anticuerpos purificados fue cuantificado mediante micro-*Bradford*.

3.7. Determinación de CE_{50} y K_D

3.7.1. CE_{50} mediante ELISA indirecto

La concentración efectiva media (CE_{50}) de anticuerpos mono-específicos anti-HuPDIA1, requerida para reconocer el 50% de las moléculas de antígeno inmovilizadas en placa de micro-titulación, fue determinada mediante un ELISA indirecto.

3.7.2. K_D mediante ELISA indirecto competitivo

La constante de disociación (K_D) fue estimada mediante el análisis de competencia entre antígeno soluble (variable) e inmovilizado (constante) frente al reconocimiento del anticuerpo mono-específico (constante) en un ensayo de ELISA indirecto. La placa de micro-titulación fue sensibilizada y bloqueada siguiendo el protocolo típico de ELISA. Cada pocillo fue suplementado con 0.1 mL de una dilución 1:8,090 (equivalente al valor de CE_{50} calculado) del anticuerpo mono-específico anti-HuPDIA1 (usando solución R como diluyente). Desde la columna 1 hasta la 10, se prepararon diluciones seriadas 1:3 a partir de dos soluciones de prueba: (1) rHuPDIA1 a 13.13 $\mu\text{g/mL}$ [231.6 nM]; y (2) *BSA* a 0.1 mg/mL, como control negativo de reconocimiento primario. La competencia fue permitida durante 1 h a TA. El reconocimiento secundario y el revelado fueron realizados de acuerdo al protocolo estándar. El valor aparente de K_D fue calculado a partir de un ajuste de los mínimos cuadrados, usando un modelo de regresión no lineal de una curva sigmoidea dosis-respuesta (dependiente de la dosis), graficando la A_{450} contra el valor logarítmico de la dilución de rHuPDIA1 soluble.

3.8. Determinación de efecto modulador

3.8.1. Ensayo típico de actividad reductasa

La actividad disulfuro reductasa de la proteína rHuPDIA1 fue determinada mediante un ensayo turbidimétrico estándar de reducción de insulina (como sustrato) [Holmgren, 1979; Ramos *et al.*, 2011]. Las mezclas de reacción (0.2 mL) fueron preparadas en una placa de microtitulación,

conteniendo 400 picomoles de rHuPDIA1 y 20 nanomoles de insulina (*Humulin® R, Lilly*) en solución amortiguadora de fosfatos-EDTA (pH 7.0). La reacción fue iniciada mediante la adición del 60 nanomoles del agente reductor (DTT). Las concentraciones finales fueron 2 μ M de rHuPDIA1, 0.1 mM de insulina, y 0.3 mM de DTT en solución 100 mM de NaH_2PO_4 - 2 mM de EDTA. Una reacción carente de rHuPDIA1 y DTT fue utilizada como blanco; en tanto, otra carente de rHuPDIA1 como control de reducción química. La reducción de insulina fue monitoreada durante 90 min, registrando la A_{655} cada 5 min ($T = 24 \pm 1$ °C). A partir de la gráfica de resultados (A_{655} contra tiempo), la actividad reductasa fue determinada a partir del incremento lineal de la absorbancia con respecto al tiempo (m), después de una fase lag inicial (X_0), usando la siguiente fórmula:

$$AR [\Delta A_{655} \text{min}^{-2}] = \frac{m}{X_0}$$

3.8.2. Ensayo de actividad reductasa competitivo

El efecto modulador de los anticuerpos mono-específicos anti-HuPDIA1 sobre las propiedades catalíticas de HuPDIA1 fue determinado (a TA) evaluando la actividad reductasa después de un periodo de interacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). A fin de mejorar la eficiencia del reconocimiento, los anticuerpos fueron concentrados mediante ultrafiltración (*Microsep™ 3K, Pall Corp.*); obteniéndose una solución a 15.415 μ g/mL (102.77 nM; usando el peso molecular teórico de 150 kDa). Las mezclas de interacción (0.09 mL) fueron preparadas conteniendo 400 picomoles de rHuPDIA1 y diferentes cantidades (2.57, 4.11, 5.65, y 7.19 picomoles) de anticuerpos anti-HuPDIA1. Después de 30 min, las mezclas fueron adicionadas a pocillos de una placa de micro-titulación conteniendo 0.1 mL de una solución 2X de sustrato (0.2 mM de insulina en 200 mM de NaH_2PO_4 - 4 mM de EDTA, pH 7.0). La reacción fue iniciada mediante la adición de 60 nanomoles del agente reductor (0.01 mL de una solución 6 mM de DTT). Las concentraciones finales de anti-HuPDIA1 fueron 12.8, 20.6, 28.3, y 36 nM. Una reacción conteniendo sólo solución de sustrato (1X) fue utilizada como blanco; en tanto, otra carente de mezcla de interacción fue considerada control de reducción química. La reducción de insulina fue monitoreada durante 60 min, registrando la A_{655} cada 5 min ($T = 24 \pm 1$ °C). La actividad reductasa fue calculada usando la fórmula del ensayo típico. El efecto modulador fue determinado considerando la siguiente fórmula:

$$\text{Efecto modulador (\%)} = \frac{AR_x}{AR_0} \cdot 100$$

Donde AR_0 y AR_x representan la actividad reductasa basal de rHuPDIA1 (en ausencia de anticuerpos) o modulada por interacción con X concentración de anticuerpos mono-específicos, respectivamente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Obtención de la proteína HuPDIA1 recombinante

A partir de lisados bacterianos obtenidos en condiciones nativas, la proteína HuPDIA1 recombinante (rHuPDIA1) fue purificada siguiendo un protocolo típico de cromatografía de afinidad a níquel. Como se observa en la Fig. 8, una proteína de 56 kDa (tamaño esperado) fue obtenida, con una pureza >95%. Adicionalmente, fue desalada mediante cromatografía de exclusión molecular y cuantificada mediante un ensayo de *Bradford*. Para cumplir los objetivos del presente

estudio, se utilizaron dos lotes de rHuPDIA1: (i) 5.82 mg/mL (102.6 μ M), obtenido de la reserva de reactivos biológicos del laboratorio de biotecnología de la FCQI-UABC; y (ii) 1.31 mg/mL (23.2 μ M), producida durante el desarrollo experimental con apoyo del personal en servicio social. La molaridad fue determinada utilizando el peso molecular teórico calculado de 56,692 g/mol.

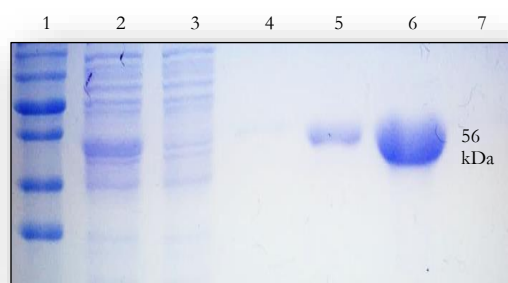


Figura 8. Purificación de la HuPDIA1 recombinante: SDS-PAGE al 12% teñido con azul de *Coomassie*.

Análisis de las fracciones obtenidas durante la cromatografía de afinidad a níquel. Carriles: (1) marcador de peso molecular; (2) lisado bacteriano soluble total; (3) fracción no pegada; (4) lavado; (5-7) eluciones 1, 2, y 3.

4.2. Obtención de suero híper-inmune anti-HuPDIA1

Antes de iniciar el protocolo de inmunización, una muestra analítica de suero (pre-inmune) fue obtenida para determinar la presencia de anticuerpos inespecíficos que reconozcan al antígeno. Los resultados de una micro-titulación inmunoenzimática (ELISA) demostraron la ausencia de inmunoglobulinas anti-HuPDIA1, indicando que el sistema inmune de los animales de experimentación se encontraba en estado *naive* contra ese antígeno. La producción de anticuerpos policlonales en conejo fue llevada a cabo empleando un protocolo típico de inmunización (0.1 mg de antígeno, cada 10 días). Después de 25 días de reto inmunológico, el título de anticuerpos anti-HuPDIA1 fue evaluado, obteniéndose un valor >1:70,000 (Fig. 9, sangrado analítico 1), el cual fue considerado como aceptable para los fines del presente estudio.

Ante esto, el protocolo procedió sin cambios durante 3 meses. Interesantemente, el mayor título fue obtenido en el sangrado analítico 2 (día 35, >1:120,000), seguido de un ligero descenso (indicativo de maduración de la respuesta inmune), y permaneciendo en niveles >1:75,000 durante el resto del procedimiento; mostrando que HuPDIA1 es un antígeno con alto potencial inmunogénico. Después de 1.5 meses de reto inmunológico, se realizaron sangrados preparativos (10-25 mL) con el fin de obtener suficiente suero híper-inmune. Un lote único fue preparado mezclando todas las muestras séricas obtenidas. El suero híper-inmune fue titulado (Fig. 10), obteniéndose un título de 1:202,795 (anti-HuPDIA1).

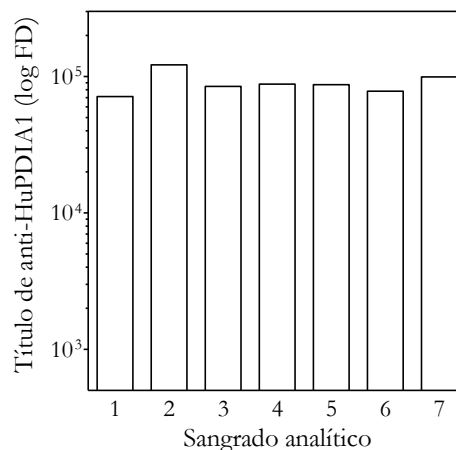


Figura 9. Producción de anticuerpos policlonales mono-específicos dirigidos contra HuPDIA1.

Verificación de la respuesta inmunológica durante el protocolo de inmunización. FD representa la dilución (CE_{50}).

4.3. Purificación de anticuerpos policlonales mono-específicos anti-HuPDIA1

Con fines analíticos, se realizó una corrida de purificación de anticuerpos mono-específicos, a partir de 1 mL de suero híper-inmune, mediante dos procesos de separación consecutivos: una cromatografía de afinidad negativa (para eliminar anticuerpos dirigidos contra proteínas de *E. coli*) seguida de una cromatografía de inmunoafinidad (para asilar los anticuerpos mono-específicos anti-HuPDIA1). El título de los anticuerpos puros fue determinado mediante ELISA (Fig. 10), demostrando un 50% de reconocimiento a una dilución de 1:8,090; que corresponde a una CE_{50} de 0.94 ng/mL (6.2 pM). La Tabla 1 muestra los resultados globales del proceso de

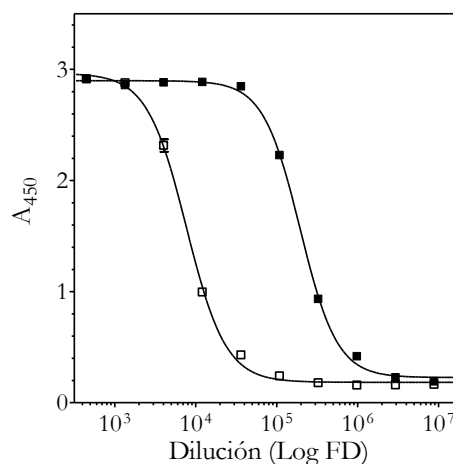


Figura 10. Título de anticuerpos anti-HuPDIA1 en suero híper-inmune (■) y fracción purificada (□).

Verificación de la respuesta inmunológica durante el protocolo de inmunización. FD representa la dilución (CE_{50}).

Tabla 1. Resultados globales de producción y purificación de anticuerpos anti-HuPDIA1.

Muestra	Volumen (mL)	Proteína		Título (CE ₅₀)
		(mg/mL)	(mg)	
Suero hiper-inmune	1	77.10	77.10	202,795
Suero libre de anticuerpos anti-bacteria (<i>E. coli</i>)	8	8.62	68.96	12,945
Anticuerpos mono-específicos puros (anti-HuPDIA1)	10.8	7.62x10 ⁻³	0.082	8,090

producción y purificación de los anticuerpos policlonales mono-específicos dirigidos contra HuPDIA1.

4.4. Los anticuerpos anti-HuPDIA1 exhiben una afinidad por el antígeno

La afinidad y estabilidad del complejo Ag-Ac fue estimada mediante un ELISA en condiciones competitivas para el antígeno inmovilizado. En este ensayo, al momento del reconocimiento primario se incluyeron diferentes cantidades de rHuPDIA1, estableciendo una competencia entre el antígeno soluble y el inmovilizado. De esta manera, una alta concentración de antígeno soluble reduce la probabilidad de reconocimiento del equivalente inmovilizado, rindiendo un valor bajo de absorbancia; por el contrario, una baja concentración del mismo aumenta la probabilidad de reconocimiento hacia el inmovilizado, produciendo un valor alto de absorbancia.

Como se observa en la Fig. 11, el ensayo mostró una tendencia sigmoidea típica, calculándose una K_D

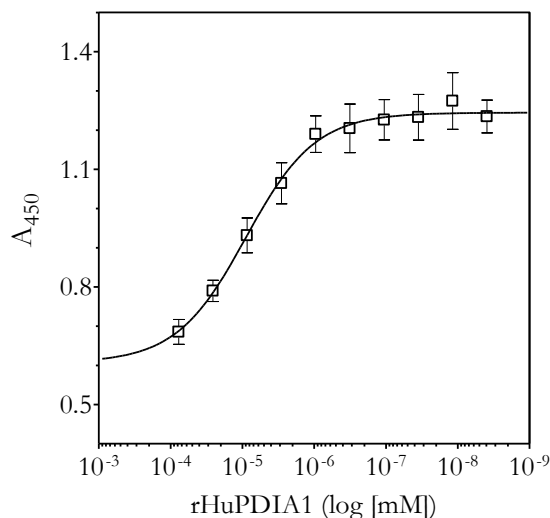


Figura 11. Determinación de la K_D aparente para el antígeno (rHuPDIA1).

Verificación de la respuesta inmunológica durante el protocolo de inmunización. FD representa la dilución (CE₅₀).

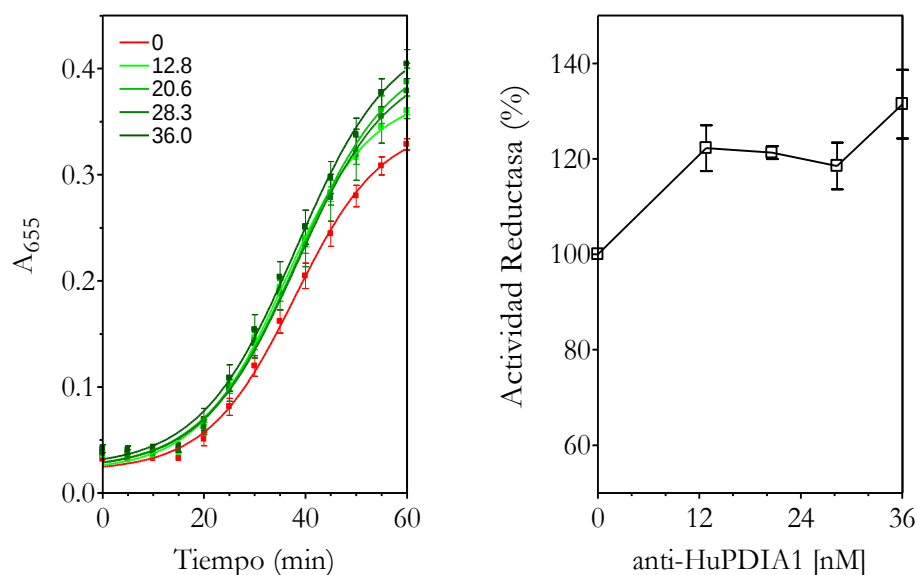


Figura 12. Efecto de la concentración de anticuerpos mono-específicos purificados sobre la actividad reductasa de la proteína HuPDIA1 recombinante.

Izquierda: Cinética de reducción de insulina en presencia de diferentes concentraciones [nM] de anticuerpos anti-HuPDIA1. Derecha: Dependencia de la actividad reductasa a la concentración de anticuerpos.

de aparente en el orden nanomolar (8.8 nM), indicativo de una alta afinidad y estabilidad del complejo Ag-Ac.

4.5. Los anticuerpos mono-específicos exhiben un efecto modulador positivo sobre la actividad reductasa de HuPDIA1

El efecto de la interacción Ag-Ac sobre la actividad reductasa de HuPDIA1 fue evaluado utilizando un ensayo de reducción de insulina asistido por la proteína rHuPDIA1. Previo a la evaluación de la actividad reductasa, la interacción Ag-Ac fue permitida durante 30 min a TA. El efecto de la concentración de anticuerpo fue valorado preparando diferentes mezclas de interacción. Como se puede apreciar en la Fig. 12, la actividad reductasa aumentó con respecto al incremento de la concentración de anticuerpos, distinguiéndose un cambio significativo a partir de 12.8 nM. Cabe destacar que se esperaba un efecto negativo (inhibidor); sin embargo, sorpresivamente se observó lo contrario, lo que puede ser interpretado como un efecto modulador positivo (activación), promovido por la interacción Ag-Ac, lo cual, a su vez, favorece un aumento de la habilidad catalítica de HuPDIA1.

5. CONCLUSIONES

La proteína HuPDIA1 recombinante (rHuPDIA1) fue obtenida de forma soluble y activa, a partir de extractos bacterianos, mediante un protocolo típico de purificación de proteínas recombinantes expresadas en el citosol de la bacteria *Escherichia coli*.

La proteína rHuPDIA1 fue utilizada como antígeno en un protocolo de inmunización estándar, usando conejos como animales de experimentación, mostrando un elevado potencial inmunogénico e induciendo altos niveles de producción de anticuerpos policlonales.

Los anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína rHuPDIA1 fueron purificados, a partir de suero híper-inmune, mediante dos procedimientos típicos de separación consecutiva: una cromatografía de afinidad negativa y otra de afinidad a antígeno.

Los anticuerpos policlonales anti-HuPDIA1 purificados mostraron un 50% de reconocimiento efectivo a una concentración de 0.94 ng/mL ($CE_{50} = 6.2$ pM), sugiriendo una significativa especificidad por el antígeno. Además, exhibieron una constante de disociación en el orden nanomolar ($K_D = 8.8$ nM), evidenciando una alta afinidad y estabilidad del complejo antígeno-anticuerpo.

Finalmente, los anticuerpos policlonales mono-específicos purificados presentaron un efecto modulador positivo (activador) sobre la actividad reductasa de la proteína recombinante, demostrando el potencial de los anticuerpos como posibles reguladores de las actividades enzimáticas de la proteína HuPDIA1.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts B, Johnson A, *et al.* Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.
- Ali Khan H, Mutus B. Protein disulfide isomerase a multifunctional protein with multiple physiological roles. *Front Chem.* 2014; 2: 70.
- Baker DL, Nakamura GR, *et al.* Evaluation of IgE antibodies to Omalizumab (Xolair®) and their potential correlation to anaphylaxis. *The AAPS Journal.* 2015; 18(1): 115–123.
- Baker MJ, Tatsuta T, Langer T. Quality control of mitochondrial proteostasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 2011; 3(7): a007559.
- Bastos-Aristizabal S, Kozlov G, Gehring K. Structural insight into the dimerization of human protein disulfide isomerase. *Protein Science.* 2014; 23(5): 618–626.
- Baynes JW, Dominiczak MH. *Bioquímica Médica.* 3ra. Edición. Editorial Elsevier. España. 2011.
- Bechtel TJ, Weerapana E. From structure to redox: The diverse functional roles of disulfides and implications in disease. *Proteomics.* 2016; 1600391.
- Benham AM, van Lith M, *et al.* Ero1-PDI interactions, the response to redox flux and the implications for disulfide bond formation in the mammalian endoplasmic reticulum. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2013; 368(1617): 20110403.
- Chames P, Van Regenmortel M, *et al.* Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British Journal of Pharmacology.* 2009; 157(2): 220–233.
- Conway ME, Harris M. S-nitrosylation of the thioredoxin-like domains of protein disulfide isomerase and its role in neurodegenerative conditions. *Frontiers in Chemistry.* 2015; 3: 27.
- Dickerhof N, Kleffmann T, *et al.* Bacitracin inhibits the reductive activity of protein disulfide isomerase by disulfide bond formation with free cysteines in the substrate-binding domain. *FEBS Journal.* 2011; 278(12): 2034–2043.
- Flaumenhaft R, Furie B, Zwicker JI. Therapeutic implications of protein disulfide isomerase inhibition in thrombotic disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2015; 35(1): 16–23.
- Gidalevitz T, Stevens F, Argon Y. Orchestration of secretory protein folding by ER chaperones. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1833(11): 2410–24.
- Goldman AS, Prabhakar BS. Immunology Overview. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology.* 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 1.
- Grek C, Townsend DM. Protein disulfide isomerase superfamily in disease and the regulation of apoptosis. *Endoplasmic Reticulum Stress Dis.* 2014; 1(1): 4–17.
- Guthapfel R, Gueguen P, Quemeneur E. Reexamination of hormone-binding properties of protein disulfide-isomerase. *European Journal of Biochemistry.* 1996; 242(2): 315–319.
- Holmgren A. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J Biol Chem.* 1979; 254(19): 9627–32.
- Horibe T, Nagai H, *et al.* Aminoglycoside antibiotics bind to protein disulfide isomerase and inhibit its chaperone activity. *The Journal of Antibiotics.* 2002; 55(5): 528–530.
- Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2006; 6(9): 714–727.
- Janeway CA Jr, Travers P, *et al.* *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.* 5th edition. New York: Garland Science; 2001. The distribution and functions of immunoglobulin isotypes.
- Kaplan A, Gaschler MM, *et al.* Small molecule-induced oxidation of protein disulfide isomerase is neuroprotective. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2015; 112(17): E2245–E2252.
- Karala A-R, Ruddock LW. Bacitracin is not a specific inhibitor of protein disulfide isomerase. *FEBS Journal.* 2010; 277(11): 2454–2462.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680–5.
- Lehninger AL, Cox MM. (2006). *Principios de Bioquímica.* Barcelona: Omega (pp 178–182).
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL. *Molecular Cell Biology.* 4th Edition. New York: W.H. Freeman. 2000.
- Mandel R, Ryser HJ, *et al.* Inhibition of a reductive function of the plasma membrane by bacitracin and antibodies against protein disulfide-isomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 1993; 90(9): 4112–4116.
- Mares RE, Minchaca AZ, *et al.* PDIA1/P4HB as model of enzyme with molecular chaperone function. In: *New Research on Molecular Chaperones.* Edition: 1. Chapter: 2. Publisher: Nova Science Publishers, Inc. 2015: 35–55.
- Montane J, de Pablo S, Obach M. Protein disulfide isomerase ameliorates β -cell dysfunction in pancreatic islets overexpressing human islet amyloid polypeptide. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2015; 420: 57–65.
- Papandréou MJ, Barbouche R, Fenouillet E. Mapping of domains on HIV envelope protein mediating

- association with calnexin and protein-disulfide isomerase. *J Biol Chem*. 2010; 285: 13788-13796.
- Parakh S, Atkin JD. Novel roles for protein disulphide isomerase in disease states: a double edged sword? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2015; 3: 30.
- Peppel K. A tumor necrosis factor (TNF) receptor-igG heavy chain chimeric protein as a bivalent antagonist of TNF activity. *Journal of Experimental Medicine*. 1991; 174(6): 1483–1489.
- Perri ER, Thomas CJ, *et al*. The unfolded protein response and the role of protein disulfide isomerase in neurodegeneration. *Front Cell Dev Biol*. 2016; 3: 80.
- Ramos MA, Mares RE, *et al*. *Entamoeba histolytica*: biochemical characterization of a protein disulfide isomerase. *Exp Parasitol*. 2011; 128(1): 76-81.
- Rubin DT, Panaccione R, *et al*. A practical, evidence-based guide to the use of adalimumab in Crohn's disease. *Current Medical Research and Opinion*. 2011; 27(9): 1803–1813.
- Ryser HJ, Levy EM, *et al*. Inhibition of human immunodeficiency virus infection by agents that interfere with thiol-disulfide interchange upon virus-receptor interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1994; 91(10): 4559-4563.
- Spencer-Green G. Etanercept (Enbrel): update on therapeutic use. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2000; 59(Suppl 1): i46-i49.
- Tebbey PW, Varga A, *et al*. Consistency of quality attributes for the glycosylated monoclonal antibody Humira® (adalimumab). *mAbs*. 2015;7(5):805–811.
- Tseng S-H, Chou M-Y, Chu I-M. Cetuximab-conjugated iron oxide nanoparticles for cancer imaging and therapy. *International Journal of Nanomedicine*. 2015; 10: 3663-3685.
- Tsibris JC, Hunt LT, *et al*. Selective inhibition of protein disulfide isomerase by estrogens. *J Biol Chem*. 1989; 264(24): 13967-70.
- Turano C, Coppari S, *et al*. Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J Cell Physiol*. 2002 Nov;193(2):154-63.
- Vabulas RM, Raychaudhuri S, *et al*. Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010; 2(12): a004390.
- Xu S, Sankar S, Neamati N. Protein disulfide isomerase: a promising target for cancer therapy. *Drug Discov Today*. 2014; 19(3):222-40.