

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA

“ALBERTO CAZORLA TALLERI”



**MARCAJE CON BIOTINA DE ANTICUERPOS DE
DOMINIO ÚNICO QUE DETECTAN HISTONAS
NATIVAS DE *LEISHMANIA (V.) BRAZILIENSIS***

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

ROSA MARIA OSCANO AIDA

LIMA – PERÚ

2019

ASESOR

Dr. Jorge Arévalo Zelada

Laboratorio Patho-antígenos

JURADO CALIFICADOR

Presidenta: Dra. Manuela Verastegui Pimentel

Vocal: Dra. Patricia Sheen Cortavarria

Secretario: Dr. Holger Mayta Malpartida

Dedicatoria

A mis padres y hermano, por siempre apoyarme y alegrarme el día.

Agradecimientos

Al Dr. Jorge Arévalo, por darme la oportunidad de ser parte de un gran equipo de investigación y asesorarme en el desarrollo del trabajo.

A los integrantes del Laboratorio Patho-antígenos, en especial a Allison Aroni y Andrés Guillén por el entrenamiento inicial en la tecnología de sdAbs y por su apoyo en las técnicas. A Javier Enciso y Milagros Suárez por la ayuda en el manejo de cultivos. A la Dra. Vanessa Adai, Fabiola Valdivia y Marlene Jara, quienes nunca dudaron en compartir sus conocimientos y consejos.

Finalmente, a mis padres y hermano, por su apoyo constante en mi vida profesional y personal y por darme momentos de mucha felicidad.

Financiamiento

La presente tesis forma parte del proyecto financiado por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú) contrato N° C-148-2015.

Resumen

El sistema de biotina:(estrept-)avidina es uno de los sistemas de marcaje no radioactivos más sensibles utilizados en áreas de biotecnología y biología molecular. Esta tecnología es aplicada en el diseño de ensayos de detección de antígenos mediante la incorporación de biotina a anticuerpos, capaces de reconocer y unirse a un antígeno de interés. En el presente estudio se evaluó el marcaje químico con biotina de dos anticuerpos de dominio único (“sdAbs” por sus siglas en inglés) seleccionados en trabajos previos contra histonas del parásito tripanosomátido *Leishmania (Viannia) braziliensis* (*L. (V.) braziliensis*), principal agente etiológico causante de leishmaniasis tegumentaria americana (LTA). Estos sdAbs denominados “S4B1” y “AC10EX” reconocen histonas nativas del parásito *L. (V.) braziliensis* en ensayos de Western Blot. La incorporación del sistema biotina:(estrept-)avidina en los sdAbs busca reemplazar el sistema de detección clásico basado en dos anticuerpos secundarios por un sistema de detección basado en un conjugado (estreptavidina-HRP). De esta manera, la duración del inmunoensayo y el uso de reactivos son reducidos y el procedimiento experimental es simplificado. En este estudio, se optimizó el marcaje químico con biotina de ambos sdAbs y se evaluó el efecto de la biotinilación en su reconocimiento a histonas de *L. (V.) braziliensis* y del humano. Los resultados demuestran que el marcaje con biotina del S4B1 modificó su capacidad de detección específica hacia las histonas del parásito, mostrando reacción también hacia las histonas del humano. Por otro lado, el marcaje de AC10EX no alteró su reconocimiento hacia las histonas del parásito y del humano. De modo general, el estudio sugiere que el marcaje químico con biotina de sdAbs puede alterar su interacción con antígenos posiblemente debido a un incremento en hidrofobicidad.

Palabras claves

MARCAJE QUÍMICO, BIOTINA, ANTICUERPO DE DOMINIO ÚNICO, LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS

Abstract

The biotin:(strept-) avidin system is one of the most sensitive non-radioactive labeling systems used in biotechnology and molecular biology. This technique is applied in the design of antigen detection systems by the incorporation of biotin to antibodies, which are capable of recognizing and binding to a specific antigen. In the present study we evaluated the chemical labeling with biotin of two single domain antibodies (sdAbs) selected in previous works against histones of the trypanosomatid parasite *Leishmania (Viannia) braziliensis* (*L. (V.) braziliensis*), the main etiological agent causative of American Tegumentary Leishmaniasis (ATL). These sdAbs, termed “S4B1” and “AC10EX” recognize native *L. (V.) braziliensis* histones in Western Blots. The incorporation of the biotin:(strept-)avidin system on the sdAbs aims to replace the classic detection system based on two secondary antibodies for a single conjugate detection system (streptavidin-HRP). In this way, the duration of the immunoassay and the use of reagents are reduced and the experimental procedure is simplified. In this study, we optimized the chemical labeling with biotin of both sdAbs and evaluated the effect of biotinylation in the recognition of histones from *L. (V.) braziliensis* and human histones. The results show that chemical labeling with biotin of S4B1 modified its specific recognition towards the parasite’s histones. Meanwhile, the labeling of AC10EX did not alter its recognition to both the parasite and the human histones. Overall, the results suggest that chemical labeling with biotin of sdAbs can alter its antigen interaction possibly due to an increase in its hydrophobicity.

Key words

CHEMICAL LABELING, BIOTIN, SINGLE DOMAIN ANTIBODY, LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS

Índice de Figuras

Figura 1 Sistemas indicadores no radioactivos directos o indirectos.....	4
Figura 2. Imagen esquemática de una proteína desde una perspectiva de modificación química.....	5
Figura 3. Estructuras químicas del éster N-hidroxisuccinimida (NHS) y de su forma sulfatada (NHSS).....	6
Figura 4. Diseño de un agente básico de biotinilación.....	8
Figura 5. Reacción de biotinilación con agentes derivados de ésteres de biotina NHS..	10
Figura 6. Reacción de un agente sulfo NHS-LC-biotina con la amina primaria de una Lys de una proteína.	11
Figura 7. Modelo hipotético de la teoría de inmunogenicidad de los pan-antígenos durante una infección con <i>Leishmania</i>	15
Figura 8 Formatos de anticuerpos recombinantes más comunes.	17
Figura 9. Mapa del vector de la librería PREDATOR.	19
Figura 10. Grupos amino primarios de una inmunoglobulina G de humano.	23
Figura 11. Representación esquemática de la biotinilación enzimática por BirA.....	23
Figura 12. Flujograma de estudio.....	27
Figura 13. Purificación de los sdAbs AC10EX y S4B1. SDS-PAGE al 15% de las eluciones obtenidas en la purificación con resina Ni-NTA.....	35
Figura 14. Purificación de los sdAbs con filtro para centrifugación de 30 kDa y 3 kDa.	37
Figura 15. Análisis de las secuencias de aminoácidos de los sdAbs S4B1 y AC10EX..	38

Figura 16. Histonas extraídas de <i>L. (V) braziliensis</i> y de humano separadas por SDS-PAGE al 18% y teñidas con una solución de Coomassie Brilliant Blue.....	39
Figura 17. Análisis por Western Blot de la reactividad de los sdAbs S4B1 y AC10EX contra las histonas de <i>L. (V.) braziliensis</i> y de humano utilizando penta his-HRP.....	40
Figura 18. Análisis por Western Blot de la reactividad de los sdAbs S4B1 y AC10EX contra las histonas de <i>L. (V.) braziliensis</i> y de humano utilizando proteína A-HRP.	41
Figura 19. Análisis por Western Blot de la reactividad de los sdAbs S4B1 y AC10EX a una concentración de 0.2 μ M contra las histonas de <i>L. (V.) braziliensis</i> y de humano utilizando anti c-myc y anti IgG- HRP.....	42
Figura 20. Western Blot de los sdAbs biotinilados y no biotinilados a una concentración de 0.5 μ M contra histonas de <i>L. (V.) braziliensis</i> y de humano.	44
Figura 21. Western Blot del S4B1-btn, S4B1, AC10EX y el control de biotina a una concentración de 0.3 μ M contra histonas de <i>L. (V.) braziliensis</i> y de humano.....	47

Índice de Tablas

Tabla 1. Principales pares de unión biomolécula-agente de unión.	3
Tabla 2. Lista de algunos agentes biotinilantes disponibles comercialmente.	8
Tabla 3. Pesos moleculares de las histonas reconocidas por los sdAbs no biotinilados S4B1 y AC10EX	43
Tabla 4. Pesos moleculares de las histonas reconocidas por el sdAb S4B1 biotinilado y no biotinilado.....	45
Tabla 5. Pesos moleculares de las histonas reconocidas por el sdAb AC10EX biotinilado y no biotinilado.....	45
Tabla 6. Pesos moleculares de las histonas reconocidas por el sdAb S4B1 biotinilado, S4B1 no biotinilado y AC10EX no biotinilado.....	48

Contenido

1	Introducción	1
2	Marco teórico	3
2.1	Sistemas no radioactivos indicadores de biomoléculas	3
2.1.1	Clasificación de sistemas no radioactivos indicadores de biomoléculas	3
2.2	Marcaje no radioactivo de proteínas	4
2.2.1	Reacción de marcaje en proteínas mediante grupos amino	5
2.3	Sistema de biotina:(estrept-)avidina	6
2.3.1	Marcaje químico con biotina de proteínas	7
2.3.2	Reacción de biotinilación con agentes derivados de ésteres de biotina NHS 10	
2.4	Leishmaniasis	11
2.4.1	Epidemiología de la leishmaniasis	11
2.5	Métodos de diagnóstico de Leishmaniasis Tegumentaria Americana (LTA) ..	12
2.5.1	Método directo	12
2.5.2	Métodos indirectos	13
2.6	Proteínas antigénicas de Leishmania spp	14
2.7	Anticuerpos de dominio único (sdAbs)	16
2.8	Técnica de phage display para la producción de sdAbs	18
2.9	Librería sintética de sdAbs PREDATOR	18

2.10	Aplicación de los sdAbs para el diagnóstico de enfermedades	20
2.11	Estudios previos de sdAbs para el diagnóstico de LTA	20
2.12	Sistema de detección de anticuerpos basado en la interacción biotina:(estrept-)avidina.....	22
2.12.1	Biotinilación de anticuerpos	22
2.12.2	Biotinilación de sdAbs	23
3	Justificación del estudio	25
4	Objetivos	26
4.1	Objetivo general.....	26
4.2	Objetivos específicos	26
5	Materiales y métodos	27
5.1	Flujograma de estudio.....	27
5.2	Transformación de células E. coli BL21 Gold con el plásmido de expresión bacteriana pET-sdAb	28
5.3	Expresión y purificación del sdAb con resina Ni-NTA.....	28
5.4	Purificación del sdAb con filtro para centrifugación.....	29
5.5	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)	29
5.6	Marcaje con biotina del sdAb	29
5.7	Producción in vitro de promastigotes de L. (V.) braziliensis	30

5.8	Extracción de histonas nativas de promastigotes de L. (V.) braziliensis y de histonas de humano.....	30
5.9	Estimación de los MW de las histonas	31
5.10	Western Blot de los sdAbs y sdAbs-btn contra histonas nativas de L (V.) braziliensis y de humanos.....	32
5.10.1	Transferencia de los antígenos a membrana de nitrocelulosa	32
5.10.2	Incubación con el anticuerpo primario (sdAbs o sdAbs-btn).....	32
5.10.3	Incubación con los anticuerpos secundarios o con los conjugados.....	32
5.10.4	Revelado de la reacción.....	33
6	Resultados	34
6.1	Purificación de los sdAbs con resina Ni-NTA	34
6.2	Purificación de los sdAbs con filtros para centrifugación de 30 kDa y 3 kDa.....	36
6.3	Análisis de las secuencias de los sdAbs AC10EX y S4B1.....	38
6.4	Extracción de histonas nativas de L. (V.) braziliensis y de humano	39
6.5	Evaluación de la reactividad de los sdAbs hacia histonas de L.(V.) braziliensis y de humano.....	40
6.6	Evaluación de los sdAbs biotinilados y no biotinilados frente a las histonas nativas de L. (V.) braziliensis y de humano	43
6.7	Evaluación de posibles interacciones inespecíficas generadas por la biotina remanente en las soluciones de sdAb	46
7	Discusión.....	49
8	Conclusiones	53

9	Recomendaciones.....	53
10	Referencias bibliográficas.....	54
11	Anexos	65

1 Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad tropical desatendida causada por parásitos del género *Leishmania* (1). En Latinoamérica, la enfermedad se presenta como Leishmaniasis Tegumentaria Americana (LTA), síndrome que comprende a las manifestaciones de leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis mucocutánea (LMC) y leishmaniasis cutánea diseminada (LCD), entre otras (2). La especie más prevalente en la región es *Leishmania (Viannia) braziliensis* (1). En el Perú, las zonas geográficas más afectadas por LTA son los departamentos de la sierra y de la selva, siendo la mayoría de casos del tipo LC (3). Actualmente el diagnóstico de LTA se basa en una combinación de características clínicas, datos epidemiológicos y exámenes de laboratorio del paciente debido a que ninguno de los métodos de diagnóstico posee la sensibilidad y especificidad requerida para ser la prueba estándar (4–7).

Ante esta problemática persiste la necesidad de desarrollar métodos de diagnóstico de LTA que puedan ser utilizados en los centros primarios de salud de las zonas endémicas del Perú. Una alternativa para el desarrollo de reactivos de diagnóstico de la LTA consiste en utilizar anticuerpos recombinantes que detecten antígenos de *L. (V.) braziliensis* con una alta sensibilidad y especificidad. Dentro de la categoría de anticuerpos recombinantes destacan los anticuerpos de dominio único (sdAb) (8). Los sdAbs han sido estudiados como reactivos prometedores en el diagnóstico de enfermedades ya que detectan una variedad de antígenos (9–11), se pueden expresar como proteínas solubles de 15 kDa utilizando la tecnología de ADN recombinante (12) y poseen propiedades biofísicas destacables como alta solubilidad, alta estabilidad y carácter monomérico (13). Existen diversos métodos para aislar sdAbs específicos a moléculas blanco a partir de librerías, siendo la más utilizada la de *phage display* (14).

El Laboratorio Patho-antígenos de la Universidad Peruana Cayetano Heredia en colaboración con la Universidad de Aarhus, ha trabajado en la selección de sdAbs contra antígenos de *Leishmania* mediante la técnica de *phage display* a partir de la librería sintética de sdAbs PREDATOR desarrollada por Mandrup et al (2013) (15). En esta línea de investigación se desarrolla el proyecto financiado por Innóvate Perú “Identificación y producción por *phage display* de un panel de anticuerpos monoclonales de dominio único

para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea en centros de atención primaria de salud” (convenio N°148-PNICE-PIAP-2015) en el que se ha logrado seleccionar y caracterizar dos sdAbs que detectan histonas nativas de *L. (V.) braziliensis* en inmunoensayos (Western Blot y ELISA). Sin embargo, los sistemas de detección de sdAbs ensayados hasta la fecha no resultan apropiados para evidenciar la reactividad frente a los antígenos del parásito por dos razones: 1) la señal de detección es baja (sistemas de conjugados proteína A-HRP y pentahis-HRP) o 2) el procedimiento experimental resulta extenso y costoso (sistema de detección de dos anticuerpos secundarios: anti c-myc y anti IgG-HRP). En este sentido, es necesario evaluar la implementación de un sistema de detección alternativo que permita detectar la unión específica de los sdAbs seleccionados en el laboratorio hacia las histonas de *L. (V.) braziliensis* con simplicidad y una señal alta.

El sistema de detección de sdAbs se podría mejorar mediante el sistema biotina:(estrept-)avidina, el cual se basa en la unión de la biotina con las proteínas avidina y estreptavidina. Este sistema de marcaje no radioactivo se encuentra entre los más sensibles en áreas de biotecnología y biología molecular (16) y destaca porque la biotina tiene una afinidad muy alta con las proteínas avidina y estreptavidina, con una constante de disociación a pH 7 de 0.6×10^{-15} M y 4×10^{-14} M, respectivamente (17). La aplicación del sistema biotina:(estrept-)avidina en inmunoensayos se debe principalmente a que ofrece un incremento en la señal de detección porque permite que varias moléculas de biotina sean introducidas químicamente a una molécula de anticuerpo (18). De esta manera, más de un conjugado de avidina/estreptavidina unido a una enzima reportera como la peroxidasa Horseradish (HRP) puede unirse al anticuerpo (avidina-HRP o estreptavidina-HRP), lo que posibilita que la señal del sistema de detección del ensayo incremente (19).

La incorporación del sistema biotina:(estrept-)avidina en los sdAbs busca reemplazar el sistema de detección clásico basado en dos anticuerpos secundarios por un sistema de detección basado en un conjugado (estreptavidina-HRP). De esta manera, la duración del inmunoensayo y el uso de reactivos son reducidos, el procedimiento experimental es simplificado y la señal de detección se puede ver incrementada (en relación a un sistema de detección de un solo conjugado que detecta una etiqueta directa convencional).

2 Marco teórico

2.1 *Sistemas no radioactivos indicadores de biomoléculas*

Desde la década de los 90 se ha buscado reemplazar el uso de isótopos radioactivos en la detección de biomoléculas como proteínas y ácidos nucleicos por sistemas basados en un marcaje no radioactivo (20). Esto se debe principalmente a que, en comparación a los radioisótopos, los grupos de modificación no radioactivos son estables y su uso no genera la acumulación de desechos radioactivos (20,21). De esta manera, el marcaje no radioactivo resulta en técnicas más seguras y fáciles de realizar debido a que no requieren de ambientes específicos para el manejo de isótopos ni de personal entrenado para su eliminación (20).

Los sistemas indicadores no radioactivos se basan en la detección de biomoléculas blanco (analitos) mediante el uso de agentes que los reconocen específicamente (sondas) (20,22). Estas sondas son luego detectadas de manera directa o indirecta en el sistema. Existe una variedad de pares de unión biomolécula-agente utilizados para detectar diferentes analitos (Tabla 1).

Tabla 1. Principales pares de unión biomolécula-agente de unión.

Moléculas blanco (analito)	Agentes de unión (sondas)
Ácidos nucleicos	Sondas de ácidos nucleicos
Ácidos nucleicos	Proteínas que se unen a ácidos nucleicos
Proteínas	Anticuerpos
Glicoproteínas	Lectinas
Enzimas	Cofactores/efectores/inhibidores
Receptores	Metabolitos secundarios
Metabolitos secundarios	Anticuerpos

Adaptado de Kessler, 2000 (20)

2.1.1 *Clasificación de sistemas no radioactivos indicadores de biomoléculas*

Los sistemas indicadores no radioactivos se pueden clasificar en directos o indirectos (ver Figura 1). Ambos difieren en el número de componentes y por lo tanto en el número de pasos requeridos para la reacción de detección (20,22). Los sistemas no radioactivos directos o indirectos se pueden aplicar tanto a proteínas como a ácidos nucleicos.

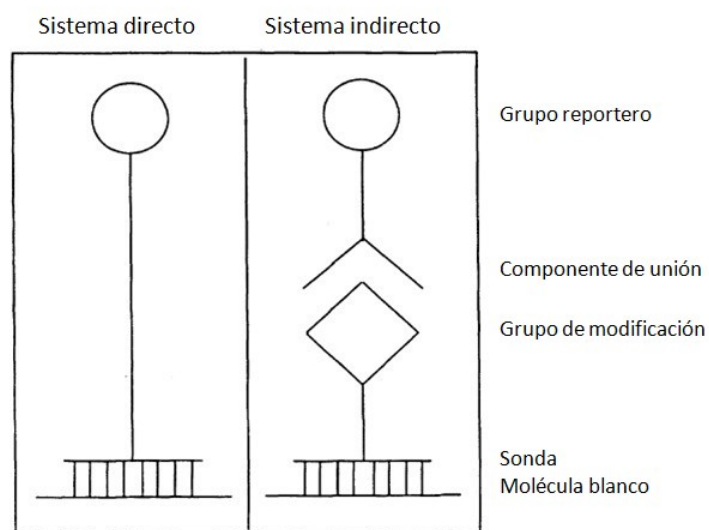


Figura 1 Sistemas indicadores no radioactivos directos o indirectos.

Adaptado de Kessler, 2000 (20)

En el caso de los **sistemas directos**, las sondas están unidas directamente y mediante un enlace covalente con un grupo reportero que genera la señal. Entre los grupos reporteros más usados se encuentran los tintes fluorescentes como la fluoresceína y las enzimas como la Fosfatasa Alcalina (AP) o la peroxidasa Horseradish (HRP) (20).

Por otro lado, los **sistemas indirectos** requieren de la alteración de la sonda mediante la introducción de un grupo de modificación particular. Este grupo de modificación es el que luego va a ser reconocido a través de una interacción no covalente adicional por otra molécula con un grupo reportero (20).

Dado que la presente tesis se enfoca en el marcaje de anticuerpos de dominio único, en el siguiente capítulo se abordará el marcaje no radioactivo de proteínas.

2.2 Marcaje no radioactivo de proteínas

De los veinte aminoácidos que conforman las proteínas, solo una porción de ellos posee cadenas laterales útiles para la conjugación con etiquetas. Este grupo está conformado por los aminoácidos lisina (Lys), cisteína (Cys), ácido aspártico (Asp) y ácido glutámico (Glu) (23) (Figura 2). Estos cuatro aminoácidos poseen grupos funcionales reactivos bajo condiciones estándares acuosas, por lo que la mayoría de reactivos comerciales de conjugación se dirigen hacia ellos (23).

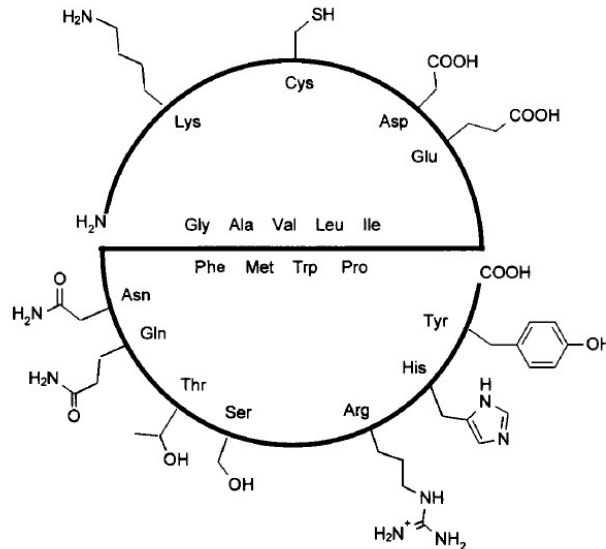


Figura 2. Imagen esquemática de una proteína desde una perspectiva de modificación química.

Los residuos en la mitad superior son apropiados para el marcaje y conforme se avanza en sentido horario se vuelven menos apropiados. En el centro se muestran aminoácidos no reactivos o que usualmente no se encuentran expuestos al solvente. Extraído de Garman, 1997 (23).

2.2.1 Reacción de marcaje en proteínas mediante grupos amino

El grupo funcional más conveniente y útil para el marcaje es el grupo amino primario que se encuentra en el grupo épsilon amino de la cadena lateral de la Lys y en el extremo N-terminal (23). Dentro de los agentes más recomendados se encuentran los ésteres N-hidroxisuccinimida (NHS) al igual que su forma sulfatada (NHSS) (Figura 3).

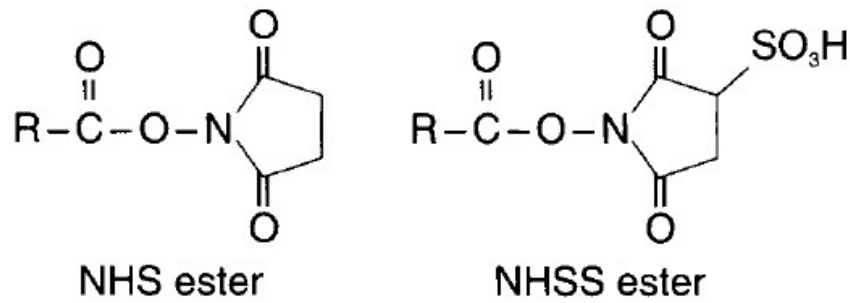


Figura 3. Estructuras químicas del éster N-hidroxisuccinimida (NHS) y de su forma sulfatada (NHSS).

Extraído de Garman, 1997 (23).

Estos agentes son estables y debido a su reactividad con los grupos amino de las proteínas, los tiempos de reacción son de tan solo 0.5-2 horas, además de encontrarse disponibles en una variedad de marcas comerciales (23).

2.3 Sistema de biotina:(estrept-)avidina

Entre los sistemas de marcaje no radioactivos más sensibles y ampliamente aplicados en el campo de la biotecnología se encuentra el sistema basado en la unión de la biotina con las proteínas avidina y estreptavidina (llamado también biotina:(estrept-)avidina) (16). La biotina tiene una afinidad muy alta con las proteínas avidina y estreptavidina, con una constante de disociación a pH 7 de 0.6×10^{-15} M y 4×10^{-14} M, respectivamente (17). Dada esta propiedad, el sistema biotina:(estrept-)avidina es utilizado en la conjugación de moléculas para inmunoensayos y en la hibridación de ácidos nucleicos (24).

La biotina es una molécula pequeña de 244.31 daltons (Da). Por su parte, la avidina es una glicoproteína que contiene cuatro subunidades idénticas de 16.4 kilodaltons (kDa), dando un peso molecular de aproximadamente 66 kDa (25). Cada subunidad tiene un sitio de unión a una molécula de biotina y una modificación de oligosacárido que se encuentra vinculada a la asparagina (Asn). El alto componente de oligosacáridos consiste principalmente en manosa y N-acetilglicosamina, por lo que puede interactuar inespecíficamente con cargas negativas, especialmente con las de superficies celulares y ácidos nucleicos (26). Por ejemplo, se ha reportado la unión no deseada de la avidina a lectinas endógenas que se encuentran asociadas a membranas (27).

Por estas razones, actualmente se suele emplear como conjugado la estreptavidina, que proviene de la bacteria *Streptomyces avidinii*. La estreptavidina es una proteína de 60 kDa que, al igual que la avidina, tiene la capacidad de unirse a cuatro moléculas de biotina por molécula de proteína (28). Se trata de una proteína no glicosilada de cuatro subunidades, cada una de 159 aminoácidos. Las dos proteínas tienen un 33% de homología en su secuencia y cuatro residuos de triptófano estarían involucrados en los sitios de unión a la biotina (17). En general, el uso de estreptavidina ocasiona una menor unión inespecífica que la avidina debido a que no presenta carbohidratos. Sin embargo, contiene una secuencia tripéptica de Arg-Tyr-Asp (RYD) que puede mimetizar la secuencia de unión de fibronectinas que es Arg-Gly-Asp (RGD), por lo que puede unirse inespecíficamente a integrinas y a receptores de fibronectinas bajo ciertas condiciones (29).

2.3.1 Marcaje químico con biotina de proteínas

Para la incorporación de biotina en proteínas, se utilizan derivados de biotina que contienen porciones reactivas capaces de unirse a determinados grupos funcionales en las proteínas. A través de esta modificación denominada *biotinilación*, se obtienen proteínas biotiniladas que contienen sitios de unión a la avidina/estreptavidina. Los agentes biotinilantes empleados son relativamente pequeños, por lo que los reactivos no deberían afectar significativamente las propiedades químicas y físicas de la molécula (30).

Un agente de biotinilación básico consiste en un anillo bicíclico con una cadena lateral de ácido valérico de la D-biotina en un extremo y un grupo reactivo en el otro extremo (Figura 4). La adición de un “brazo espaciador” entre ambos consiste en uno (X) o dos (XX) ácidos aminohexanoicos que otorgan cierta distancia entre la molécula modificada y el compuesto de biotina (19). Su función es mejorar la interacción con la avidina/estreptavidina, ya que los sitios de unión a biotina son bolsillos que se encuentran alrededor de 9 Å debajo de su superficie. Esta estructura permite que el grupo de biotina fusionado a la molécula de interés sea más accesible y se una mejor a los conjugados de avidina/estreptavidina (31).

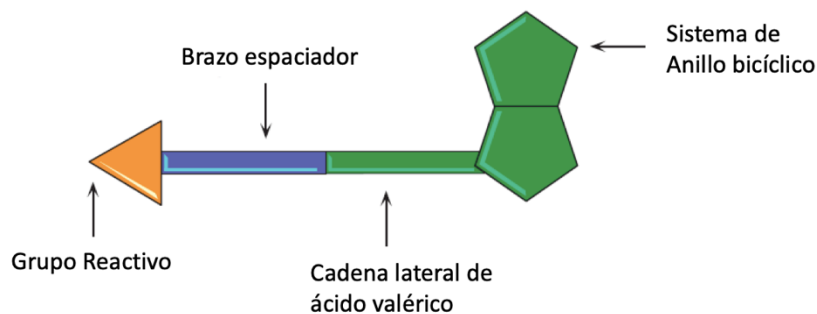


Figura 4. Diseño de un agente básico de biotinylation.

La estructura consiste en los anillos bicíclicos y el ácido valérico de la D-biotina ubicados en un extremo y un grupo reactivo en el otro extremo. También se suele incluir un brazo espaciador entre ambos. Extraído y traducido al español de Hermanson, 2013 (19)

En general, para la conjugación de proteínas con biotina se utilizan compuestos derivados de biotina, biotina-X y biotina-XX (32). Existe una variedad de agentes biotinylantes capaces de reaccionar con grupos lisil, cisteinil o carbohidratos (33) (Tabla 2).

Tabla 2. Lista de algunos agentes biotinylantes disponibles comercialmente.

Extraído y adaptado de Luna, 2001 (33).

Tipo de reacción	Reactivo	Proveedor	Peso molecular	Detalles
<i>Específico para reacción con aminas primarias</i>	NHS-biotina	Pierce, Sigma, Vector Labs	341.4	Soluble en DMF o DMSO; se debe mantener todos los reactivos a -20°C con un desecante
	Sulfo-NHS-biotina	Pierce, Sigma, Vector Labs	443.4	Soluble en agua
	NHS-LC-biotina	Pierce, Sigma, Vector Labs	454.5	Soluble en DMF o DMSO; brazo espaciador mejora la accesibilidad de la biotina unida a la proteína a las matrices de afinidad
	NHS-SS-biotina	Pierce	606.7	Soluble en DMF; escindible mediante reducción de disulfuro

	2-Iminobiotina-NHS	Calbiochem, Pierce	421.3	Soluble en DMF; unión a la avidina es sensible al pH
<i>Específico para reacción con sulfhidrilos</i>	Iodoacetil-LC-biotina	Pierce	510.4	Soluble en DMF o DMSO; reacciona con grupos amino por encima de un pH 7.5
	Biotina-LC-maleimida	Sigma	479.6	Soluble en DMF; reacciona con grupos amino por encima de un pH 7.5
	Maleimido-propionil biocitina	Molecular probes, Pierce	523.6	Soluble en DMF; reacciona con grupos amino por encima de un pH 7.5
	Biotina-HPDP	Pierce	539.8	Soluble en DMSO; escindible mediante reducción de disulfuro
<i>Específico para reacción con carbohidratos (oxidados)</i>	Biotina-LC-hidazida	Calbiochem, pierce, Vector Labs	258.3	Soluble en agua (hasta 5 mM) y en DMSO (hasta 50 mM)
	Biotina-hidrazida	Molecular Probes, pierce, Sigma	371.5	Soluble en agua (hasta 5 mM) y en DMSO (hasta 50 mM)

DMF: dimetilformamida, DMSO:dimetilsulfóxido.

2.3.2 Reacción de biotinilación con agentes derivados de ésteres de biotina NHS

La técnica más simple y utilizada para la biotinilación de proteínas consiste en utilizar el éster de biotina N-hidroxisuccinimida (NHS-biotina) (34). El NHS-biotina reacciona con los grupos épsilon amino de las cadenas laterales lisil en las proteínas y forma enlaces amida (34) (Figura 5). La biotinilación de las lisinas es un método popular ya que la Lys es un aminoácido abundante en las proteínas (aproximadamente conforman el <7% de los residuos de aminoácidos totales en una proteína promedio) (32).

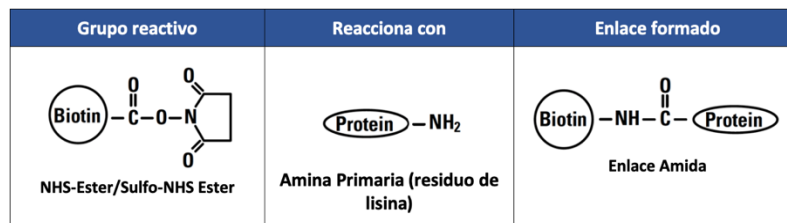


Figura 5. Reacción de biotinilación con agentes derivados de ésteres de biotina NHS.

Grupo reactivo NHS-Ester/Sulfo-NHS Ester reacciona con las aminas primarias en los residuos de Lys y forma un enlace amida (covalente). Extraído y adaptado al español de Thermo Scientific, 2009 (34)

Otro compuesto para la biotinilación que se encuentra disponible es la sulfo-NHS-biotina, un análogo al NHS-biotina que contiene un grupo sulfonato cargado en la estructura de anillo de NHS (34). La sulfo-NHS-biotina y sus derivados (como la sulfo NHS-LC-biotina) tienen la ventaja de ser solubles en agua por lo que no requieren una disolución previa en solventes orgánicos (19,34) (Figura 6).

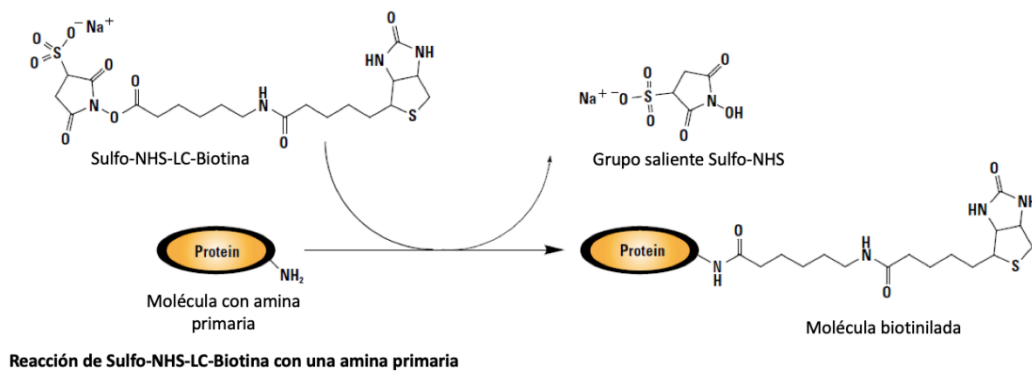


Figura 6. Reacción de un agente sulfo NHS-LC-biotina con la amina primaria de una Lys de una proteína.

El agente sulfo-NHS-LC-Biotina reacciona con la amina primaria de la proteína lo que conlleva a la biotinilación de la molécula. Extraído y adaptado al español de Thermo Scientific, 2009 (34)

2.4 *Leishmaniasis*

La leishmaniasis es una enfermedad tropical desatendida, causada por parásitos del género *Leishmania* transmitida a través de la picadura de mosquitos del género *Phlebotomus*, principal vector en el Viejo Mundo y *Lutzomyia*, principal vector en el Nuevo Mundo (1). Dependiendo de la especie del parásito y la respuesta inmune del paciente, la leishmaniasis puede tener tres manifestaciones clínicas: leishmaniasis cutánea (LC), mucocutánea (LMC) y visceral (LV) (35). La LC se caracteriza por la presencia de úlceras o nódulos en la piel. Si la enfermedad progresa e invade las mucosas, recibe la denominación de LMC, mientras que si se trata de una infección visceral sistémica se clasifica como LV (35).

2.4.1 *Epidemiología de la leishmaniasis*

La leishmaniasis es endémica en 98 países y se estima que 350 millones de personas se encuentran en riesgo. La incidencia anual es de 2 millones de casos (0.5 millones para LV y 1.5 para LC) (36). La manifestación clínica más prevalente es la LC y se estima que entre el 70-75% de la incidencia global proviene de solo diez países: Afganistán, Algeria, Colombia, Brasil, Irán, Siria, Etiopía, Sudán, Costa Rica y Perú (36). En Latinoamérica, la enfermedad se presenta como Leishmaniasis Tegumentaria Americana (LTA), síndrome que comprende a la LC, LMC y otras manifestaciones como la leishmaniasis

cutánea diseminada (LCD) (2). Los parásitos que causan LTA pueden ser del subgénero *Leishmania* o *Viannia*. La especie más prevalente en la región es *Leishmania (Viannia) braziliensis*, seguida de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* y *Leishmania (Viannia guyanensis)* (1).

En el Perú, las zonas geográficas más afectadas son los departamentos de la sierra y de la selva, donde hasta setiembre del 2017 se reportaron 4322 casos autóctonos de LC y 331 de LMC, con una incidencia acumulada de 13.58 y 1.04 por 100,000 habitantes, respectivamente (3)

2.5 Métodos de diagnóstico de Leishmaniasis Tegumentaria Americana (LTA)

Hasta la fecha, ningún examen de diagnóstico posee la precisión requerida para ser considerada la prueba estándar de LTA (4–7). Por esta razón, actualmente el diagnóstico de LTA se basa en la combinación de la información dada por las características clínicas, datos epidemiológicos y exámenes de laboratorio (4–7). Las técnicas empleadas para el diagnóstico pueden ser de dos tipos, directo o indirecto. El método directo consiste en la examinación del parásito ya sea por microscopía, histopatología o por cultivos (4). Mientras que el método indirecto incluye el diagnóstico serológico o molecular (4). La selección de la prueba de diagnóstico depende de la disponibilidad de infraestructura y recursos del centro de atención (6).

2.5.1 Método directo

2.5.1.1 Método parasitológico

La examinación directa del parásito mediante tinción de Giemsa suele ser el único método disponible en los centros de salud de las zonas endémicas (1). En el Perú, el diagnóstico definitivo de leishmaniasis requiere la demostración del parásito en forma de amastigote (en muestras procedentes de lesiones) y/o como promastigote (cuando son aislados de cultivos) (7). Para la detección de amastigotes se utiliza una muestra de la lesión del paciente obtenida a través de una biopsia, raspado o frotis con tinción de Giemsa (4). Esta técnica posee la ventaja de ser de bajo costo, sin embargo, posee una sensibilidad variable (entre el 50-80%) que depende de factores como el tiempo de la lesión y la destreza de la persona encargada de la lectura de la lámina (5,37–40). Según el MINSA, el examen de diagnóstico para leishmaniasis más utilizado es el basado en el frotis de la lesión (7). La

muestra para el frotis se obtiene a través de la escarificación de la superficie o del borde de la lesión, utilizando un bisturí, un palito de madera o mediante punción aspirativa (7). En un estudio realizado en 1997 por Davies et al., la técnica reportó una sensibilidad de tan solo 4.7% (41).

La detección directa puede combinarse con el cultivo *in vitro* o *in vivo* para incrementar la sensibilidad del diagnóstico (5). Para el cultivo *in vitro* se utilizan fases sólidas como el Neal, Novy, Nicolle (NNN) o medios líquidos como el Schneider's (5). La sensibilidad con el cultivo puede variar entre 40-85%, con una especificidad cercana al 100% ya que el promastigote posee una forma típica (5,38,40,42,43). No obstante, el manejo de cultivos requiere de personal técnico entrenado, además de demandar tiempo y cuidados para evitar su contaminación (6,40,43). Con respecto al cultivo *in vivo*, este consiste en la inyección de la muestra a animales susceptibles como hámsteres o ratones para la posterior recuperación del parásito. Debido a que requiere de una metodología compleja e implica riesgos por accidentes de inoculación, es una técnica que no se suele usar en el diagnóstico (5).

2.5.1.2 Métodos moleculares

Varias técnicas moleculares han sido desarrolladas para el diagnóstico de leishmaniasis que se basan en detectar ADN del parásito mediante una prueba convencional de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (44). Los blancos más utilizados son los mini círculos de ADN del kinetoplasto (kDNA) y genes del ARN ribosomal (rRNA) (44). El diagnóstico por PCR reporta valores de sensibilidad cercanos al 100% (4,38,45) y cuenta con una especificidad también elevada, entre el 65% y 100% (38,45). Además, la técnica permite detectar bajas cantidades de parásito en una infección (44). Si bien la técnica de PCR destaca por sus altos valores de sensibilidad y especificidad, su incorporación en los centros primarios de salud en las áreas endémicas no es viable debido a sus elevados costos y a sus requerimientos de infraestructura y de personal capacitado en técnicas moleculares (37,44,46).

2.5.2 Métodos indirectos

2.5.2.1 Métodos serológicos

Entre los métodos serológicos utilizados en el diagnóstico de LTA se encuentran el Ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y el Ensayo Inmunoabsorbente vinculado a Enzima (ELISA). Tanto el IFI como el ELISA se basan en la detección de anticuerpos contra el parásito circulantes en el suero del paciente. En Perú, el método serológico más empleado es el IFI, el cual posee una sensibilidad cercana al 70% en lesiones ulceradas por *L. (V.) braziliensis* (7). La sensibilidad reportada para las pruebas serológicas es variable y se han reportado cifras altas mayores al 90% (39,40). No obstante, la principal desventaja de estas técnicas es que puede presentar reacción cruzada (falsos positivos) en casos de otras enfermedades como la Enfermedad de Chagas y Malaria, las cuales también son prevalentes en las zonas endémicas (5,7).

2.5.2.2 Prueba de Montenegro o leishmanina de piel

La Prueba de Montenegro (abreviada como MST por sus siglas en inglés “Montenegro Skin Test”) es una técnica que evalúa una respuesta inmune celular, por lo que se suele utilizar en estudios epidemiológicos para determinar la prevalencia de infección (4). La prueba consiste en la inyección intradermal de una solución de antígenos de promastigotes (la especie de *Leishmania* y la preparación varía en diferentes países y laboratorios). La MST ha sido aplicada para el diagnóstico de leishmaniasis debido a que es fácil de utilizar y posee una sensibilidad alta de de 86.4-100 % (37,47). No obstante, los valores de especificidad para la MST son variables (se ha descrito valores desde 57% al 78%) (38,48), lo cual se debería a la reacción cruzada con la enfermedad de Chagas, micosis subcutáneas y tuberculosis (5). Otra desventaja de esta prueba es que no distingue entre una infección presente y una pasada (4). Por último, el MST requiere de infraestructura y facilidades para la producción del antígeno de MST, cuya preparación impacta la sensibilidad de la prueba (4).

2.6 Proteínas antigénicas de *Leishmania* spp

Con la finalidad de mejorar el serodiagnóstico de leishmaniasis, se han realizado estudios para identificar proteínas antigénicas de *Leishmania* con sueros de canes y humanos con LV. Los estudios realizados en la década de los 90 identificaron antígenos pertenecientes a proteínas del parásito evolutivamente conservadas, entre las que se encontraron

proteínas heat shock (HSPs), proteínas ribosomales y proteínas nucleosomales (49). Estas proteínas fueron agrupadas como “pan-antígenos” por Requena y colaboradores en el 2000 (49), quienes elaboraron la teoría de pan-antígenos para explicar su inmunogenicidad durante la infección con *Leishmania*.

El reconocimiento de estos antígenos en humanos y animales con leishmaniasis se debería principalmente a tres factores: su abundancia como complejos circulantes durante la infección, su estabilidad como partículas nucleoproteicas y su capacidad incrementada de ser procesadas por células presentadoras de antígeno (APCs) (Figura 7).

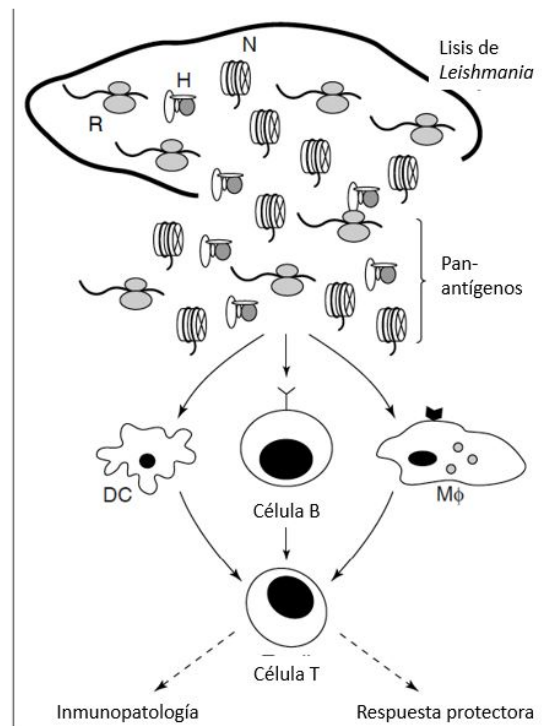


Figura 7. Modelo hipotético de la teoría de inmunogenicidad de los pan-antígenos durante una infección con *Leishmania*.

R: proteínas ribosomales, H: proteínas heat shock, N: proteínas nucleosomales. DC: células dendríticas, Mφ: macrófagos. Extraído y traducido al español de Requena et al, 2000 (49)

A pesar de que los pan-antígenos presentan secuencias y funciones conservadas, la respuesta inmunológica de los pacientes sería específica para las proteínas del parásito ya que en los estudios citados no se reporta reacción contra las proteínas del hospedero. Se hipotetizó que esto se debería a que se estarían reconociendo las regiones más divergentes de las proteínas. Esta idea fue apoyada por los estudios de mapeo de determinantes

antigénicos de las histonas H2A, H3, H2B y H4 de *L. infantum* realizadas por Soto y colaboradores (50–52).

Las histonas son una familia de proteínas estructurales importantes en la organización y función del ADN dentro de los núcleos de los eucariontes. Existen cinco clases principales de histonas denominadas H1, H2A, H2B, H3 y H4. Todas son ricas en aminoácidos básicos cargados positivamente que interactúan con los grupos fosfato cargados negativamente del ADN (53).

Las histonas de los tripanosomátidos se encuentran entre las más divergentes dentro del grupo de eucariotes (incluyendo a otros protozoarios). La diferencia en la secuencia se encuentra principalmente en los dominios N-terminales (54,55). Además de los estudios de Soto y colaboradores con las histonas de *L. infantum*, se ha reportado que tanto la histona H2B entera como la porción amino-terminal son reactivos con sueros de pacientes con LV (56).

En el caso de especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo, los estudios son más escasos. La histona H2B de *L. peruviana* ha sido reportada como antigénica con sueros de pacientes con LTA (57), al igual que la histona H1 de *L. (V.) braziliensis* (58). La información descrita sugiere que las histonas de *L. (V.) braziliensis* serían buenos candidatos a antígenos y se podrían utilizar para seleccionar anticuerpos específicos para proteínas del parásito que no muestren reacción cruzada con las del hospedero.

2.7 Anticuerpos de dominio único (sdAbs)

Además de los anticuerpos convencionales de cuatro cadenas polipeptídicas, existen anticuerpos compuestos solo de cadenas pesadas (HCAbs) producidos naturalmente por camélidos y peces cartilaginosos (59,60). Los HCAbs reconocen el antígeno por un único dominio que está unido al dominio Fc. El dominio variable se denomina VHH en camélidos, V-NAR en tiburones y, de manera más general, nanocuerpo o anticuerpo de dominio único (sdAb) (8).

Los sdAbs se pueden expresar de manera recombinante como proteínas solubles de 15 kDa utilizando la tecnología de ADN recombinante (12). Estos anticuerpos poseen propiedades biofísicas que las hacen más favorables en comparación a otros fragmentos

de anticuerpos tales como los fragmentos que se unen al antígeno (Fab) y los fragmentos de cadena simple variante (scFv) (60) (Figura 8).

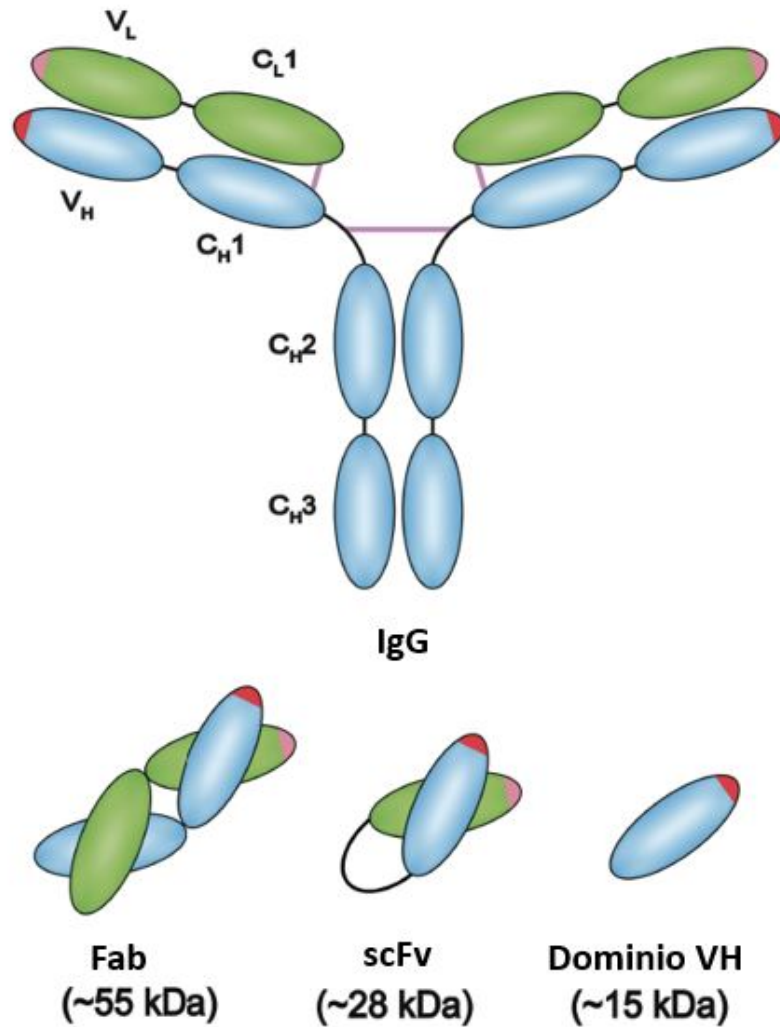


Figura 8 Formatos de anticuerpos recombinantes más comunes.

Se utilizan diferentes fragmentos de las inmunoglobulinas (IgG) en formato de anticuerpo recombinante. Los más comunes son los fragmentos que se unen al antígeno (Fab), los fragmentos de cadena simple variante (scFv) y el dominio variable de la cadena pesada o anticuerpo de dominio único (Dominio VH o sdAb). Extraído de Mandrup et al (2013) (15).

Entre las propiedades biofísicas destacables de los sdAbs se encuentra su alta solubilidad y estabilidad y su carácter monomérico (13). Además, existen diversos métodos para aislar sdAbs específicos a moléculas blanco a partir de librerías, siendo la más utilizada la de *phage display* (14).

2.8 Técnica de phage display para la producción de sdAbs

La técnica de phage display permite producir anticuerpos recombinantes, incluyendo a los sdAbs, como moléculas fusionadas a la proteína de cubierta pIII del bacteriófago filamentoso M13 (61). De esta manera es posible obtener fagos que expresan el sdAb conjuntamente con las proteínas de cubierta y, en este sistema, cada fago representa un determinado sdAb (fago-sdAb) según la secuencia que contiene (62,63). Para ello, se realiza la fusión del gen que codifica al sdAb con el gen de la proteína pIII del fago filamentoso en un plásmido denominado fagémido, el cual posee un origen de replicación fago fl (64). El fagémido es luego usado para transformar bacterias *E. coli*, sin embargo, para la producción de los fagos se requiere también de una infección con un fago cooperador (64). De esta manera se producirán diferentes fagos-sdAbs y, mediante procesos de selecciones basados en la afinidad de unión al antígeno de interés y en ciclos de biopanning, los sdAbs expuestos en los fagos pueden ser secuenciados e identificados (61).

2.9 Librería sintética de sdAbs PREDATOR

La librería PREDATOR es una librería sintética de sdAbs desarrollada por Mandrup et al (2013) (15) en el departamento de Ingeniería de la Universidad de Aarhus (Dinamarca). Esta librería se caracteriza por ser generada a partir del scaffold HEL4, un dominio VH de origen humano estudiado por Jespers et al en el 2004 (65). HEL4 tiene propiedades similares a las de VHH de camélido como alta solubilidad, estado monomérico, resistencia a la agregación y también se puede expresar de manera recombinante en *E. coli* (65). Esta librería de fagos-sdAbs se generó a partir de la transformación de bacterias *E. coli* TG1 con el fagémido PREDATOR y la infección con el fago cooperador KM13 (Figura 9).

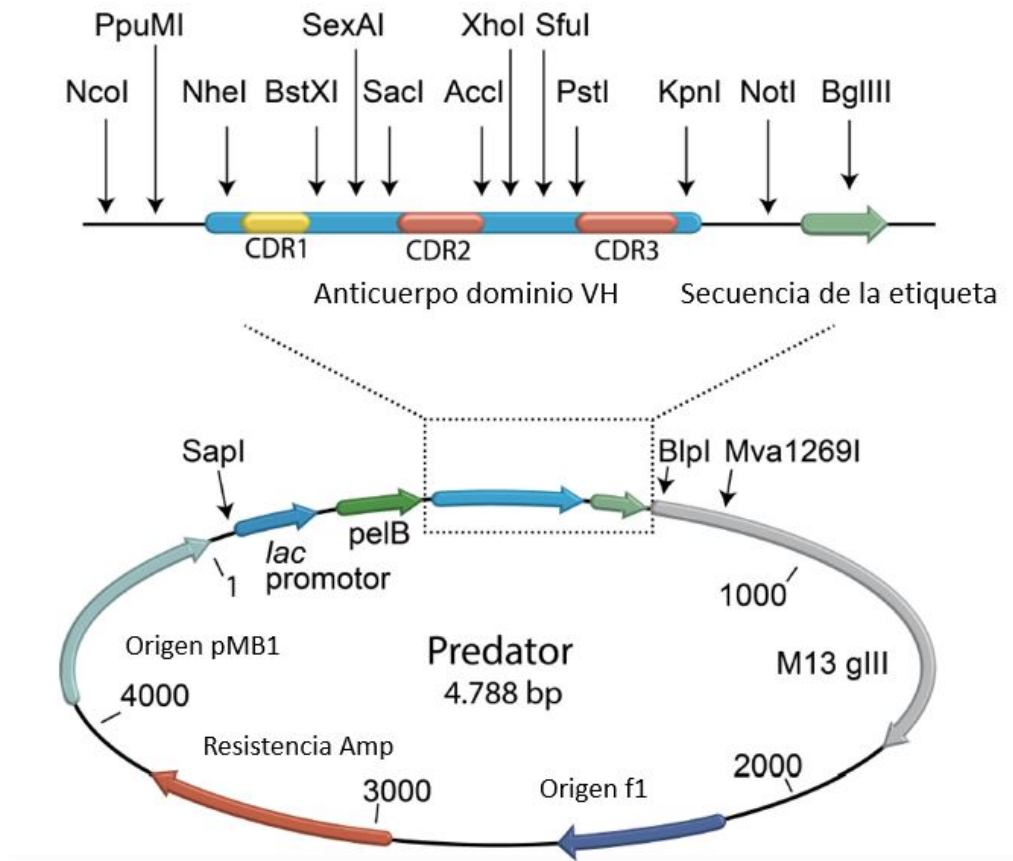


Figura 9. Mapa del vector de la librería PREDATOR.

En la parte superior de la imagen se muestra una ampliación de la región que codifica al sdAb y algunos sitios de restricción únicos alrededor de las regiones CDRs. Extraído de Mandrup et al, 2013 (15)

Los sdAbs cuentan con tres regiones denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDRs): CDR1, CDR2 y CDR3. Estas regiones son las que se unen al antígeno mediante interacciones no covalentes de algunos aminoácidos, por lo que se dice que las CDRs determinan la especificidad de unión del anticuerpo (12). La diversidad de la librería (aproximadamente 6.2×10^7 clonas únicas funcionales) se generó a partir de aleatorizaciones en 4 posiciones en la región CDR2 y en 7 posiciones en la región CDR3. La región CDR1 y el resto de la secuencia del anticuerpo no fueron modificadas debido a que se determinó previamente que afectan el plegamiento o la tendencia a la agregación del anticuerpo, sobretodo la región CDR1 que es crítica para las características de plegamiento del HEL4 (15). Luego de procesos de selección, algunos sdAbs fueron expresados como proteínas solubles mediante la clonación de las secuencias de sdAb al

vector de expresión pET-22b y la posterior transformación de bacterias BL21 Gold para la producción de la proteína.

2.10 Aplicación de los sdAbs para el diagnóstico de enfermedades

Los sdAbs han sido estudiados como herramientas prometedoras en el desarrollo de técnicas de diagnóstico basadas en anticuerpos ya que detectan específicamente una variedad de antígenos. Existen numerosos reportes que evidencian su capacidad de detectar antígenos relacionados a cáncer y enfermedades infecciosas como la tripanosomiasis humana africana, esquistosomiasis y cisticercosis (9–11).

2.11 Estudios previos de sdAbs para el diagnóstico de LTA

El Laboratorio Patho-antígenos de la Universidad Peruana Cayetano Heredia en colaboración con la Universidad de Aarhus ha trabajado en la selección de sdAbs contra antígenos de *Leishmania* mediante la técnica de phage display a partir de la librería sintética de sdAbs PREDATOR desarrollada por Mandrup et al (2013) (15). Para la expresión del sdAb como proteína soluble se cuenta con un vector pET-22b(+) (66) modificado que contiene en el extremo C-terminal dos etiquetas: 1) una etiqueta c-myc y 2) una etiqueta de 6 histidinas (6xHis-tag).

Entre los primeros trabajos del grupo Patho-antígenos se encuentra el realizado por Castrillón C y Guillén A (resultados no publicados) en el que se seleccionó un sdAb contra la histona recombinante H2B de *L. (V.) braziliensis* denominado AC10EX. El sdAb AC10EX fue caracterizado en ensayos de ELISA y Western Blot como parte del proyecto “Identificación y producción por phage display de un panel de anticuerpos monoclonales de dominio único para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea en centros de atención primaria de salud” (convenio N°148-PNICP-PIAP-2015) financiado por Innóvate Perú.

La principal limitación de este sistema de sdAbs fue la baja señal de detección obtenida con el conjugado Proteína A-HRP en los inmunoensayos (Tesis de Licenciatura de Guillén A, a ser presentada). Los conjugados de proteína A son utilizados para detectar sdAbs porque presentan unión a ciertos fragmentos de la región Fab de la IgG (15). No obstante, la fuerte afinidad entre estas dos proteínas está dada por la interacción de los

cinco dominios homólogos de la proteína A con la región Fc de la IgG, la cual no está presente en los sdAb (67). Esto explicaría la baja señal de detección en los inmunoensayos con el sdAb AC10EX y la histona H2B de *L. (V.) braziliensis*, por lo que se concluyó que el uso de este conjugado no es el adecuado.

Por otro lado se tiene el trabajo realizado en el 2017 por Aroni A (68) en el que utilizando la misma librería de sdAbs PREDATOR, se seleccionaron sdAbs contra el estadio amastigote de *Leishmania*. El sistema de detección de los sdAbs se basó en el uso del anticuerpo secundario penta his-HRP (ELISA) y los anticuerpos secundarios anti c-myc y anti IgG-HRP (Western Blot). Con el penta his-HRP los valores de absorbancia en los ELISAS también fueron bajos. Mientras que, si bien el sistema basado en los anticuerpos secundarios anti c-myc de ratón y anti IgG-HRP logró amplificar la señal de detección, aumentó el número de pasos en el procedimiento experimental. Esto ocasiona que la duración y complejidad del ensayo también se vea incrementada, características que hacen que la técnica sea inviable en los centros de salud de las zonas endémicas de LTA, que es hacia donde se apunta la tecnología de sdAbs.

A partir de resultados más recientes del proyecto financiado por Innóvate, se ha identificado un sdAb denominado “S4B1” seleccionado mediante phage display contra histonas nativas de *L. (V.) braziliensis*. Este sdAb destaca por su reactividad alta y específica a histonas del parásito en ensayos de Western Blot y ELISA, sin mostrar reacción cruzada con histonas del humano (resultados no publicados).

En resumen, el grupo de investigación cuenta con sdAbs cuyas propiedades podrían ser de utilidad en el diagnóstico de LTA. Sin embargo, ninguno de los sistemas de detección de los sdAbs ensayados hasta la fecha (proteína A-HRP, penta his-HRP y anti c-myc y anti IgG-HRP) resulta apropiado para evidenciar su reacción contra las histonas del parásito *L. (V.) braziliensis*. En este sentido, es necesario evaluar la implementación de un sistema de detección alternativo que permita detectar la unión específica de los sdAbs seleccionados en el laboratorio hacia las histonas de *L. (V.) braziliensis* con simplicidad y alta señal.

2.12 Sistema de detección de anticuerpos basado en la interacción biotina:(estrept-)avidina

La interacción altamente específica entre la avidina/estreptavidina y la biotina ha permitido su aplicación en inmunoensayos, sobretodo en el campo de inmunodiagnóstico (69). Esta tecnología es empleada en el diseño de ensayos de detección de antígenos mediante la incorporación de biotina a anticuerpos, capaces de reconocer y unirse a un antígeno en particular (19). La aplicación del sistema biotina:(estrept-)avidina en inmunoensayos se debe principalmente a que ofrece un incremento en la señal del ensayo, dado que varias moléculas de biotina pueden ser introducidas químicamente a una molécula de anticuerpo (18). De esta manera, en el paso de detección del anticuerpo más de un conjugado de avidina/estreptavidina unido a una enzima reportera como la peroxidasa Horseradish (HRP), es capaz de unirse al anticuerpo (avidina-HRP o estreptavidina-HRP). Esta característica posibilita que la señal del sistema de detección del ensayo sea mayor al de uno basado en un anticuerpo con una etiqueta directa convencional (19).

2.12.1 Biotinilación de anticuerpos

Una inmunoglobulina IgG típica de humano contiene alrededor de 120 cadenas laterales de Lys (Figura 10Figura 10) (23). A menos que los residuos de Lys más reactivos se encuentren en el sitio de unión al antígeno, la capacidad de unión del anticuerpo no debería verse afectada (23).



Figura 10. Grupos amino primarios de una inmunoglobulina G de humano.

Se muestran los grupos amino primarios de las Lys en círculos negros. Extraído de Garman, 1997 (23).

2.12.2 Biotinilación de sdAbs

Los estudios que emplean sdAbs biotinilados seleccionados mediante phage display hacen uso de la biotinilación *in vivo* (70–75). La técnica se basa en la adición de una secuencia peptídica denominada Avitag al sdAb. El péptido consiste en un dominio aceptor de biotina (BAD) de 15 aminoácidos (GLNDIFEAQ(K[^])IEWHE) que puede ser biotinilado de manera sitio-específica en el residuo lisil por la biotin ligasa de *E. coli* (BirA) (76) (Figura 11).

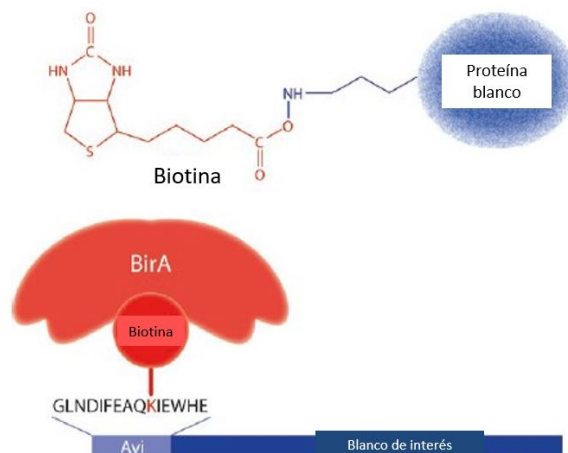


Figura 11. Representación esquemática de la biotinilación enzimática por BirA.

Una molécula de biotina (o un derivado) es unido covalentemente a un residuo de Lys ubicado en el centro de la secuencia Avitag por acción de la enzima BirA. La secuencia nucleotídica de la proteína de interés debe estar en el mismo marco de lectura que la etiqueta Avitag. Extraído de Gräslund et al, 2017 (76).

En la naturaleza, la ligasa BirA cataliza la transferencia de una biotina al grupo amino epsilon de una Lys específica ubicada en la proteína carrier biotina-carboxil (BCCP), subunidad de la carboxilasa acetil-coA (77). Sin embargo, el estudio realizado por Beckett et al (78) determinó la secuencia más corta requerida para una biotinilación catalizada por BirA la cual se denominó Avitag. De esta manera, si una proteína de interés es fusionada al Avitag y co-expresada *in vivo* con la BirA, la proteína puede ser biotinilada. La proteína también puede ser biotinilada *in vitro* mediante la incubación con la BirA purificada (79).

Con esta técnica se han obtenido sdAbs biotinilados contra procalcitonina humana (74) y los virus de la influenza H3N2 (72), H7N2 (75), H5N1 (71). La metodología consiste en la subclonación del gen codificante del sdAb en un plásmido vector que contiene la secuencia para un dominio aceptor de biotina (BAD). Luego, este plásmido se utiliza para cotransformar las bacterias con un plásmido para la expresión inducida del gen BirA.

3 Justificación del estudio

El marcaje químico con biotina de sdAbs permitirá el ahorro económico y la simplificación de pasos en la realización de inmunoensayos dirigidos a la detección específica de histonas del parásito *L. (V.) braziliensis*. Esto se debe a que permite que el sdAb sea detectado directamente con un conjugado reportero, como la estreptavidina-HRP. El sistema basado en la interacción biotina:estreptavidina reemplazará la técnica clásica que requiere dos anticuerpos secundarios para la detección de sdAbs. De esta manera, se podrá optimizar el uso de sdAbs como potenciales herramientas de diagnóstico de LTA en centros de salud de las zonas endémicas del Perú.

Otra ventaja del marcaje químico con biotina de sdAbs yace en que puede incrementar la señal de detección de sdAbs en inmunoensayos. Esto se debe a que permite la unión covalente de más de una molécula de biotina a los sdAbs, lo que incrementa los sitios de unión a los conjugados reporteros. Además, esta interacción cuenta con una alta afinidad, que se encuentra en el rango aproximado de 0.4×10^{-15} M (17).

Por último, la idea de evaluar este sistema de marcaje en sdAbs cuenta con originalidad pues no ha sido ensayada hasta la fecha. Con el presente estudio se evaluará si el marcaje químico con biotina es aplicable a los sdAbs y si tiene efectos en el reconocimiento de sus antígenos (histonas de *L. (V.) braziliensis* e histonas humanas) en ensayos de Western Blot. Los resultados aportarán en el estudio de conjugación química de sdAbs destinados a inmunoensayos.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

- Detectar las histonas nativas de *L. (V.) braziliensis* en ensayos de Western Blot mediante anticuerpos de dominio único biotinilados como parte del desarrollo de reactivos de diagnóstico de leishmaniasis cutánea

4.2 Objetivos específicos

- Obtener soluciones puras de los sdAbs AC10EX y S4B1 aptas para el marcaje químico con biotina
- Extraer histonas nativas de *L. (V.) braziliensis* en estadio promastigote e histonas humanas para su utilización como antígenos en ensayos de Western Blot
- Aplicar el marcaje químico con biotina a los sdAbs AC10EX y S4B1
- Evaluar la reactividad de los sdAbs AC10EX y S4B1 marcados con biotina frente a las histonas nativas de *L. (V.) braziliensis* y las histonas humanas en ensayos de Western Blot y compararla con el método clásico de sdAbs no marcados

5 Materiales y métodos

5.1 Flujograma de estudio

El flujograma de la Figura 12 resume los procesos realizados en el presente estudio. Cada proceso es descrito detalladamente en la sección de Materiales y métodos.

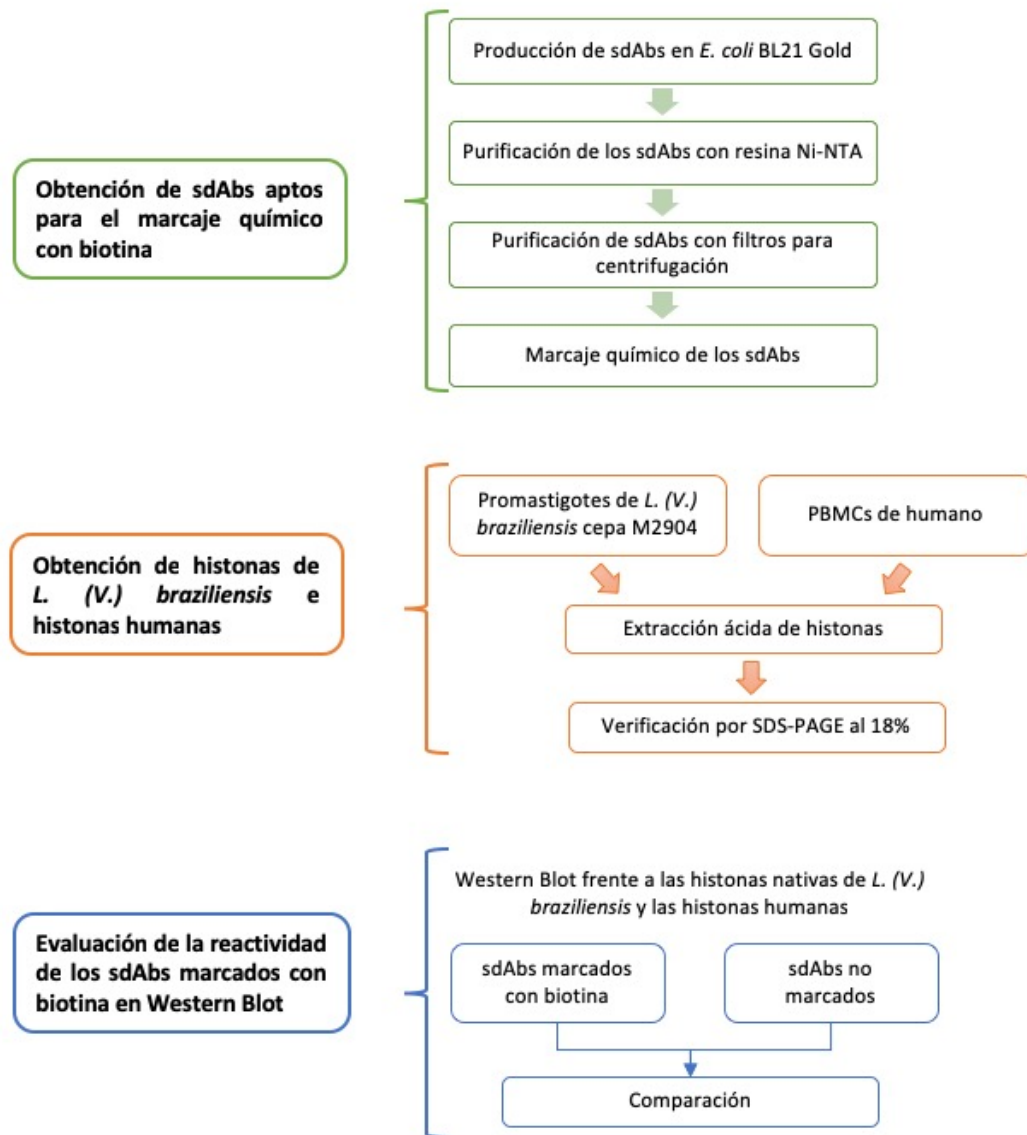


Figura 12. Flujograma de estudio

5.2 Transformación de células *E. coli* BL21 Gold con el plásmido de expresión bacteriana pET-sdAb

Para la expresión de la proteína soluble en un sistema bacteriano adecuado se transformaron células quimiocompetentes *E. coli* de la cepa BL21 Gold con 150 ng del plásmido de expresión bacteriana, vector pET-22b+ (66), que contiene el gen del sdAb de interés. Los plásmidos para la producción de los sdAbs AC10EX y S4B1 ya se encontraban disponibles en el laboratorio. Las células fueron colocadas en hielo, se adicionó 1 µl de la solución de plásmido y se dejó incubando en hielo por 20 minutos. Se realizó un shock térmico incubando las células en un baño maría a 42°C por 45 segundos y colocándolas nuevamente en hielo por 2 minutos. Se agregó 950 µl de medio LB, se mezcló suavemente y se incubó a 37°C en agitación por 1 hora. Posteriormente, las células fueron centrifugadas, el pellet fue resuspendido en 200 µl del sobrenadante y se sembró en una placa TYE con ampicilina (100 µg/ml). Se realizó el mismo procedimiento excluyendo la adición del plásmido para comprobar que efectivamente el medio con ampicilina elimina a las bacterias que no contienen el plásmido (control negativo). También se sembraron bacterias BL21 Gold quimiocompetentes en una placa TYE sin ampicilina (100 µg/ml) para comprobar de que el stock de bacterias quimiocompetentes era viable (control positivo). Las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C y posteriormente se guardaron a 4°C.

5.3 Expresión y purificación del sdAb con resina Ni-NTA

El sistema de expresión del sdAb se basa en el promotor T7/lac, en el que la inducción requiere de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Se inoculó una colonia de bacterias *E. coli* BL21 Gold transformadas con el plásmido pET-sdAb en 3 ml de medio 2xTY con ampicilina (100 µg/ml) y se incubó a 37°C en agitación durante toda una noche. Al día siguiente, se transfirió 2 ml del cultivo del día anterior a 200 ml de medio TB con ampicilina (100 µg/ml) y se incubó a 37°C, en agitación hasta alcanzar un OD₆₀₀ entre 0.4-0.6, momento en que se indujo la expresión del sdAb mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM. El cultivo se incubó a 30°C durante 18 horas. La purificación del sdAb se adaptó de protocolos de QIAGEN (80).

Dado que el sdAb cuenta con una señal que lo envía al periplasma, su purificación se realizó a partir del sobrenadante. El cultivo fue centrifugado a 4000xg por 20 minutos y

se purificó el sdAb mediante cromatografía de afinidad con resina de Ni-NTA utilizando un gradiente de elución de imidazol. La pureza de las fracciones y los eluatos del sdAb fue evaluada mediante un SDS-PAGE al 15% y tinción de Coomassie Brilliant Blue.

5.4 Purificación del sdAb con filtro para centrifugación

La biotilación de los sdAbs requirió obtener soluciones puras de las proteínas en un buffer libre de aminas, como el PBS. Para ello, se juntaron los eluatos con mayor cantidad de proteína (en el caso del sdAb S4B1 los E5-6, y para el sdAb AC10EX los E5-7) y se procedió a la purificación con un filtro para centrifugación Amicon Ultra-15 con cortes de peso molecular (MWCO) de 30 kDa y 3kDa. El procedimiento se basó en lo sugerido por el proveedor (Merck, Alemania). Se adicionó la muestra de proteína y buffer de PBS al dispositivo de 30 kDa siendo el volumen final 8 ml. Se centrifugó a 5000 x g por 20 minutos, nuevamente se adicionó PBS y se centrifugó. El líquido filtrado (aproximadamente 12 ml) se adicionó al dispositivo de 3 kDa y se centrifugó a 5000 x g por 60 minutos. Se volvió a adicionar PBS y se centrifugó. Finalmente, se recuperó la muestra de proteína concentrada (0.5-0.6 ml) del dispositivo y se evaluó la pureza de las fracciones con un SDS-PAGE al 15%.

5.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

Las muestras de proteínas fueron resuspendidas en el tampón Laemmli SDS (1:2) y denaturadas a 95°C por 5 minutos. Se cargaron las muestras en un gel de poliacrilamida con una fase resolviendo al 15% o 18% (para muestras de sdabs o histonas, respectivamente) y una fase stacking al 3%. La corrida se realizó con una fuente de poder (BioRad) a 200 V por una hora. Posteriormente, el gel fue retirado del sistema, lavado con agua destilada y teñido con una solución de Coomassie Brilliant Blue durante 40 minutos. El gel se destiñó en agua destilada por 14h-16h.

5.6 Marcaje con biotina del sdAb

Se utilizó el kit comercial de conjugación con biotina de anticuerpos “Biotin (type B) Conjugation Kit (ab102867)” (Abcam, Estados Unidos). La reacción química del marcaje está dirigida a las aminas primarias en los residuos de Lys y en el extremo N-terminal de la proteína blanco. El kit está optimizado para IgGs de 150 kDa en términos de MR biotina/IgG (81). La cantidad sugerida para la reacción fue de 100 µg (para un IgG

estándar). Sin embargo, dada la diferencia de peso molecular entre un IgG estándar y un sdAb (150 kDa vs 15 kDa), se utilizó solo 50 µg de sdAb para cada reacción. Se adicionó 1 µl del reactivo Modificador por cada 10 µl de anticuerpo a ser marcado y se mezcló con delicadeza. Luego, se añadió esta mezcla al vial de biotina liofilizado y se resuspendió gentilmente dos veces con la pipeta. La muestra se guardó a temperatura ambiente protegida de la oscuridad por 4 horas. Finalmente, se adicionó 1 µl del reactivo Apagador por cada 10 µl de anticuerpo y se resuspendió suavemente. El sdAb fue incubado por media hora a temperatura ambiente y se guardó a 4°C.

5.7 Producción in vitro de promastigotes de *L. (V.) braziliensis*

El cultivo de promastigotes de *L. (V.) braziliensis* cepa M2904 (MHOM/BR/75/M2904) se basó en lo descrito por Aroni A (68). Se transfirió 100 µl de un cultivo de promastigotes de *L. (V.) braziliensis* en medio bifásico, el cual consiste en agar de sangre de conejo y medio 199 (M199; Sigma), a tres frascos de cultivo celular con 5 ml de medio M199 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), L-glutamina al 1%, penicilina a 100 unidades/ml y estreptomycin a 100 µg/ml (Sigma Aldrich, Estados Unidos). Se dejó crecer los cultivos por cuatro días en una incubadora a 24°C. Se juntó el contenido de los tres frascos, se precipitaron las células a 1811 x g por 10 minutos y se resuspendió en 1 ml de M199-10% SFB. El número de parásitos por ml fue estimado utilizando una cámara de Neubauer y la siguiente fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de parásitos/ml} = \frac{\sum \text{parásitos en cada cuadrante}}{4} * 10^4 * \text{Factor de dilución}$$

Se empleó una dilución 1/200 del cultivo resuspendido en PBS 0.01 M a pH 7.4. El cultivo fue amplificado a 50 ml de M199-SFB 10% con una población inicial de 3 millones de parásitos por ml. Se dejó crecer por 4 días, luego de lo cual se volvió a realizar el procedimiento de centrifugación, resuspensión y conteo de células; esta vez utilizando una dilución 1/100 del cultivo resuspendido. Por último, el cultivo fue nuevamente amplificado a dos frascos de cultivo celular siguiendo la metodología descrita, también con una población inicial de 3 millones de parásitos por ml.

5.8 Extracción de histonas nativas de promastigotes de *L. (V.) braziliensis* y de histonas de humano

Se siguió el protocolo de extracción de histonas descrito por Schechter *et al.* (82) con algunas modificaciones. Para la extracción de histonas de *L. (V.) braziliensis*, el cultivo de promastigotes fue centrifugado a 1811 x g por 10 minutos para precipitar las células. El pellet fue lavado con 15 ml de PBS 0.01 M a pH 7.4 y nuevamente centrifugado a 1811 x g. Se descartó el sobrenadante y se congeló el pellet a -20°C hasta el día siguiente. En el caso de la extracción de histonas humanas, se contaba con células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de humano congeladas aisladas a partir de un protocolo estándar (83). Las muestras provinieron del proyecto SIDISI 64224 titulado “Identificación y producción por phage display de un panel de anticuerpos monoclonales de dominio único para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea en centros de atención primaria de salud” el cual cuenta con aprobación para su uso por el Comité Institucional de Ética en Investigación con Humanos de la UPCH. El pellet fue descongelado y resuspendido en 1 ml de buffer de lisis hipotónico (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM KCl, 1.5 MgCl₂ y 1 mM DTT) y se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml. Se incubó en hielo durante 30 minutos en una mesa giratoria para promover la lisis hipotónica de las células y se precipitó el núcleo con una centrifugación a 10, 000 x g por 10 minutos a 4°C. El núcleo fue resuspendido en 600 µl de H₂SO₄ 0.4 N y agitado con un vórtex por media hora. Se incubó en hielo en una mesa giratoria por media hora y se guardó a 4°C hasta el día siguiente. Se centrifugó a 16, 000 x g por 10 minutos para remover el debris nuclear. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml y se adicionó TCA (ácido tricloroacético) a una concentración final de 33%, invirtiendo el tubo varias veces para mezclar bien la solución. Se incubó en hielo en una mesa giratoria por media hora y se guardó a 4°C hasta el día siguiente. Las histonas fueron precipitadas mediante una centrifugación a 16, 000 x g por 10 minutos a 4°C y lavadas con acetona fría para remover el ácido de la solución (este paso se realizó dos veces). El pellet resultante, el cual contiene a las histonas, se dejó secar a temperatura ambiente por 20 minutos y finalmente fue resuspendido en 100 µl de agua libre de nucleasas.

5.9 Estimación de los MW de las histonas

La estimación de los pesos moleculares de las histonas se basó en un protocolo estándar (84). Brevemente, se midió la distancia de migración de cada banda estándar del marcador de peso molecular “Pink Plus Prestained Protein ladder” (CleverScientific) y del frente

de corrida. Se utilizaron estos valores para calcular la distancia relativa (Rf) de cada banda con la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{distancia de migración de cada banda estándar}}{\text{distancia de migración del frente de corrida}}$$

Se realizó un gráfico de dispersión de datos del log (MW) en función a Rf. A partir del gráfico se generó la ecuación $y = mx + b$ y esta fue utilizada para calcular el MW de las proteínas de las muestras. Los gráficos realizados para hallar la ecuación y los cálculos de MW se detallan en la sección de Anexos (Anexo 5 - Anexo 24).

5.10 Western Blot de los sdAbs y sdAbs-btn contra histonas nativas de *L. (V.) braziliensis* y de humanos

5.10.1 Transferencia de los antígenos a membrana de nitrocelulosa

Se realizó un SDS-PAGE de muestras de histonas nativas de *L. (V.) braziliensis* y de humano (0.5 µg por pozo) como se describió previamente. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante una electrotransferencia a 100 V por 60 minutos en el tampón Towbin (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20%) (85). Se comprobó la transferencia a la membrana con una tinción con solución de Ponceau-S. La membrana se lavó con agua destilada para remover el tinte y se bloqueó con BSA 3% a 4°C durante toda la noche.

5.10.2 Incubación con el anticuerpo primario (sdAbs o sdAbs-btn)

Luego del bloqueo con BSA durante toda la noche se lavó la membrana tres veces con PBS y se incubó durante una hora y media con el sdAb (sdAb o sdAb-btn) diluido en BSA 1.5%. Posteriormente, la membrana se lavó tres veces con PBST-0.05%.

5.10.3 Incubación con los anticuerpos secundarios o con los conjugados

5.10.3.1 Sistemas de detección de sdAbs de un solo conjugado: penta his-HRP y proteína A-HRP

Primero se ensayaron dos sistemas de detección basados en un solo conjugado previamente utilizados en trabajos del laboratorio: penta his-HRP y proteína A-HRP. Estos sistemas consisten en la incubación de la membrana por 1 hora con el anticuerpo secundario penta his-HRP (Qiagen, Alemania) (1:4000) o con el conjugado proteína A-

HRP (1:2000), respectivamente. Posteriormente, se lavó la membrana tres veces con PBST-0.05% y se procedió con el revelado de la reacción.

5.10.3.2 Sistema de detección de sdAb con anti c-myc y anti IgG-HRP

Dado que el sistema de detección de sdAbs de un solo conjugado no fue el más óptimo para evaluar la reactividad de los sdAbs, se evaluó la detección con los anticuerpos secundarios anti c-myc y anti IgG-HRP. Se incubó la membrana con el anti c-myc (Abcam, Estados Unidos) (1: 3000) durante 1 hora y se lavó la membrana tres veces con PBST-0.05%. Luego, se incubó la membrana con el anti IgG-HRP (Abcam, Estados Unidos) (1: 20 000). Se lavó la membrana tres veces con PBST-0.05% y se procedió con el revelado de la reacción.

5.10.3.3 Sistema de detección de sdAb-btn

La detección de los sdAbs-btn se realizó con el conjugado estreptavidina-HRP. Se incubó la membrana con la estreptavidina-HRP (Thermo Scientific, Estados Unidos) (1: 10 000) durante 1 hora y se lavó tres veces con PBST-0.05%. Luego, se procedió con el revelado de la reacción.

5.10.4 Revelado de la reacción

La membrana se colocó en una mica de plástico. Se cubrió la superficie de la membrana durante 2 minutos con el sustrato quimioluminiscente para la enzima HRP “Pierce ECL” (Thermo Scientific, Estados Unidos), que consiste en una mezcla de soluciones de luminol y peróxido de hidrógeno (1:1). Se expuso la membrana con una película de autorradiografía y la reacción fue detectada en un cuarto oscuro.

6 Resultados

6.1 Purificación de los sdAbs con resina Ni-NTA

Se obtuvieron seis y siete eluciones del sdAb S4B1 y AC10EX, respectivamente, en la purificación con resina Ni-NTA a partir de células *E. coli* BL21 Gold transformadas. La pureza de las eluciones se verificó con un SDS-PAGE al 15% seguido de una tinción con solución de Coomassie Brilliant Blue. En ambos casos, la proteína más abundante corresponde a la banda de aproximadamente 15 kDa, peso molecular esperado para los sdAbs de la librería PREDATOR. La mayor concentración del sdAb se obtuvo en las dos y tres últimas eluciones de la purificación de los sdAbs S4B1 y AC10EX, respectivamente (Figura 13).

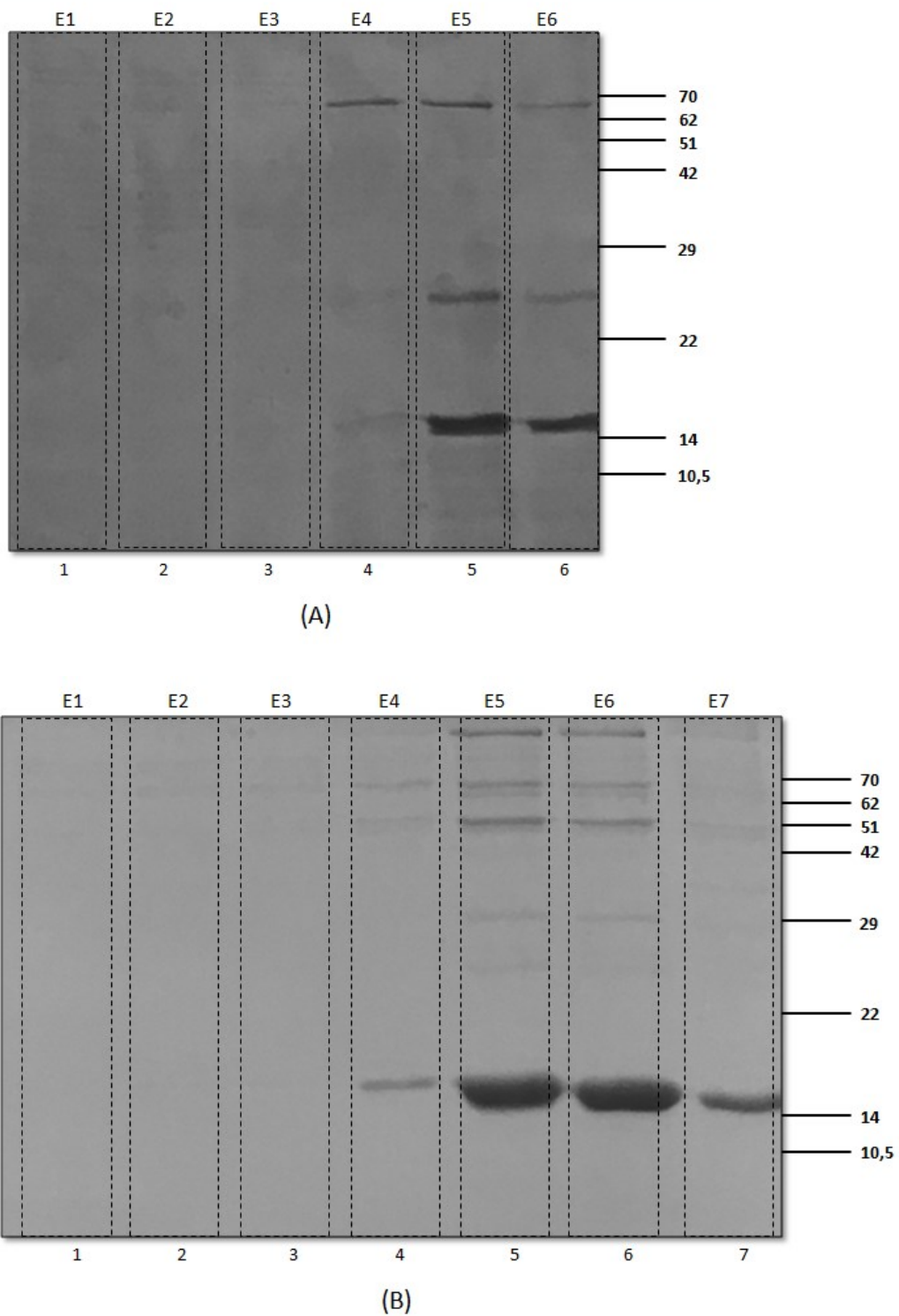
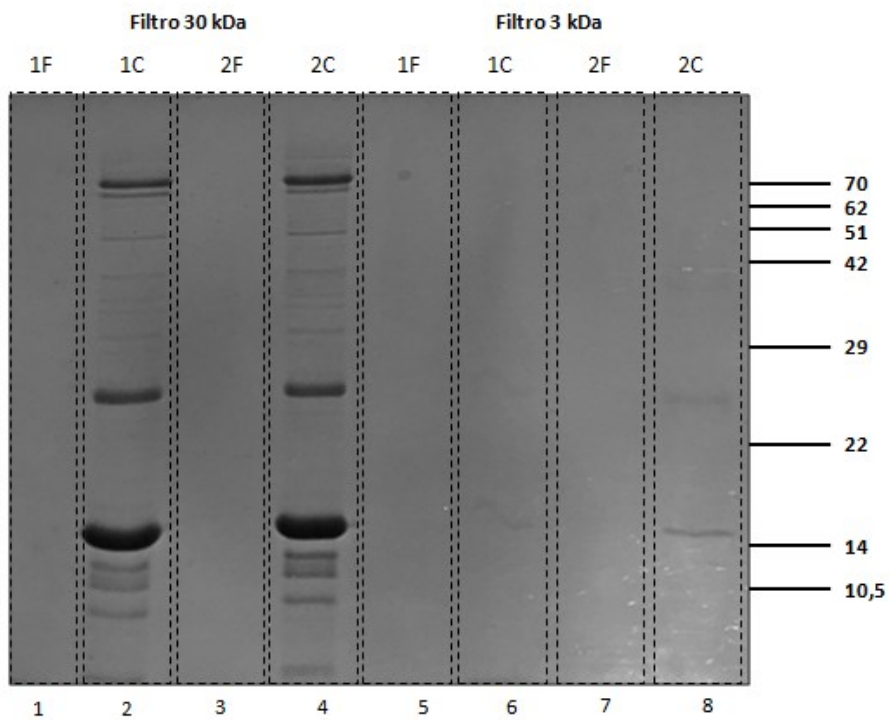


Figura 13. Purificación de los sdAbs AC10EX y S4B1. SDS-PAGE al 15% de las eluciones obtenidas en la purificación con resina Ni-NTA.

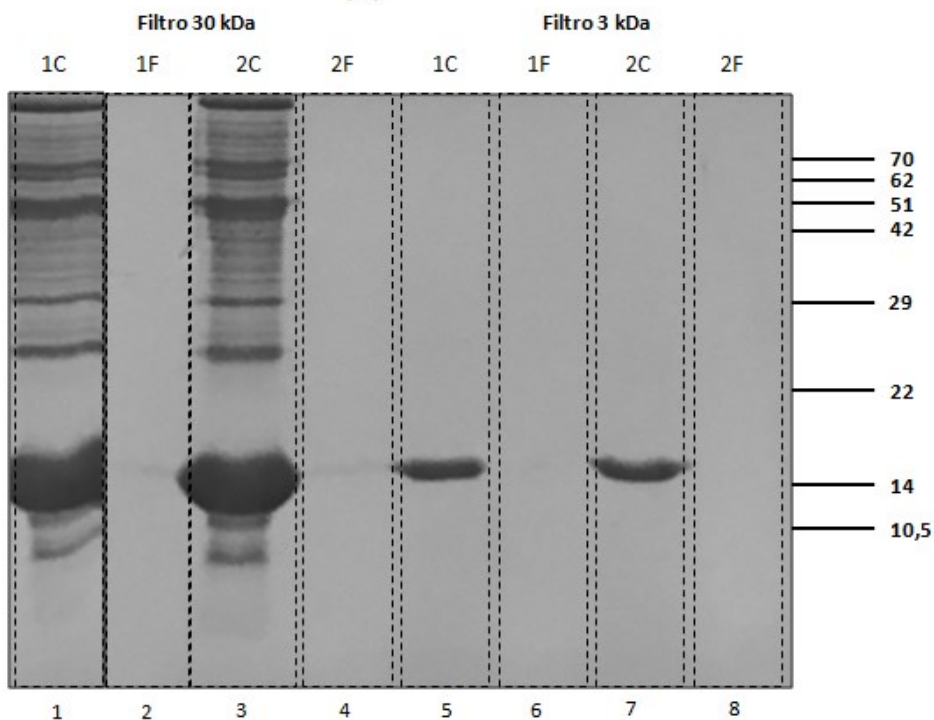
(A) Purificación del sdAb S4B1. Carriles 1-6: eluciones 1°-6°. (B) Purificación del sdAb AC10EX. Carriles 1-7: eluciones 1°-7°. Se muestra el marcador de peso molecular en kDa a la derecha.

6.2 Purificación de los sdAbs con filtros para centrifugación de 30 kDa y 3 kDa

Primero, se utilizó el dispositivo de filtro para centrifugación Amicon Ultra 30K con un MWCO de 30 kDa. La purificación por filtro fue analizada mediante SDS-PAGE al 15%. Se detectó la presencia de cada sdAb en el líquido recolectado concentrado del filtro de 30 kDa (Figura 14A, carriles 2 y 4; Figura 14B, carriles 1 y 3). En el líquido filtrado, en cambio, el sdAb no fue detectable por tinción de Coomassie Blue (Figura 14A, carriles 1 y 3; Figura 14B, carriles 2 y 4). Con el filtro de 3 kDa, se concentró cada sdAb a partir del líquido filtrado y se realizó el intercambio de buffer a PBS (Figura 14A, carriles 5-8; Figura 14B, carriles 5-8). Se calcula una pérdida del sdAb S4B1 de aproximadamente 65% en todo el proceso de centrifugación. Para el sdAb AC10EX, la pérdida fue de aproximadamente 55%.



(A)



(B)

Figura 14. Purificación de los sdAbs con filtro para centrifugación de 30 kDa y 3 kDa.

SDS-PAGE al 15% de las fracciones obtenidas en la purificación. Purificación del sdAb (A) S4B1 y (B) AC10EX. C: 1 o 2° centrifugación con el filtro de 3 kDa o 30 kDa. F: líquido filtrado, C: líquido retenido en el filtro. Se muestra el marcador de peso molecular en kDa a la derecha.

6.3 Análisis de las secuencias de los sdAbs AC10EX y S4B1

El análisis de la secuencia de aminoácidos de los sdAbs revela que ambos anticuerpos poseen cuatro sitios de biotilación correspondientes a los grupos aminos de las Lys K45, K67, K78 y K127 (Figura 15). Estas Lys se encuentran fuera de las regiones CDR. Asimismo, se observa que AC10EX y S4B1 tienen diferencias de 4 y 6 aminoácidos en las regiones CDR2 y CDR3, respectivamente. Los aminoácidos de la región CDR1 son conservados. La diferencia en la composición de aminoácidos en las CDR2 y CDR3 y la conservación en la CDR1 concuerda con el diseño reportado para los sdAbs de la librería PREDATOR (15).

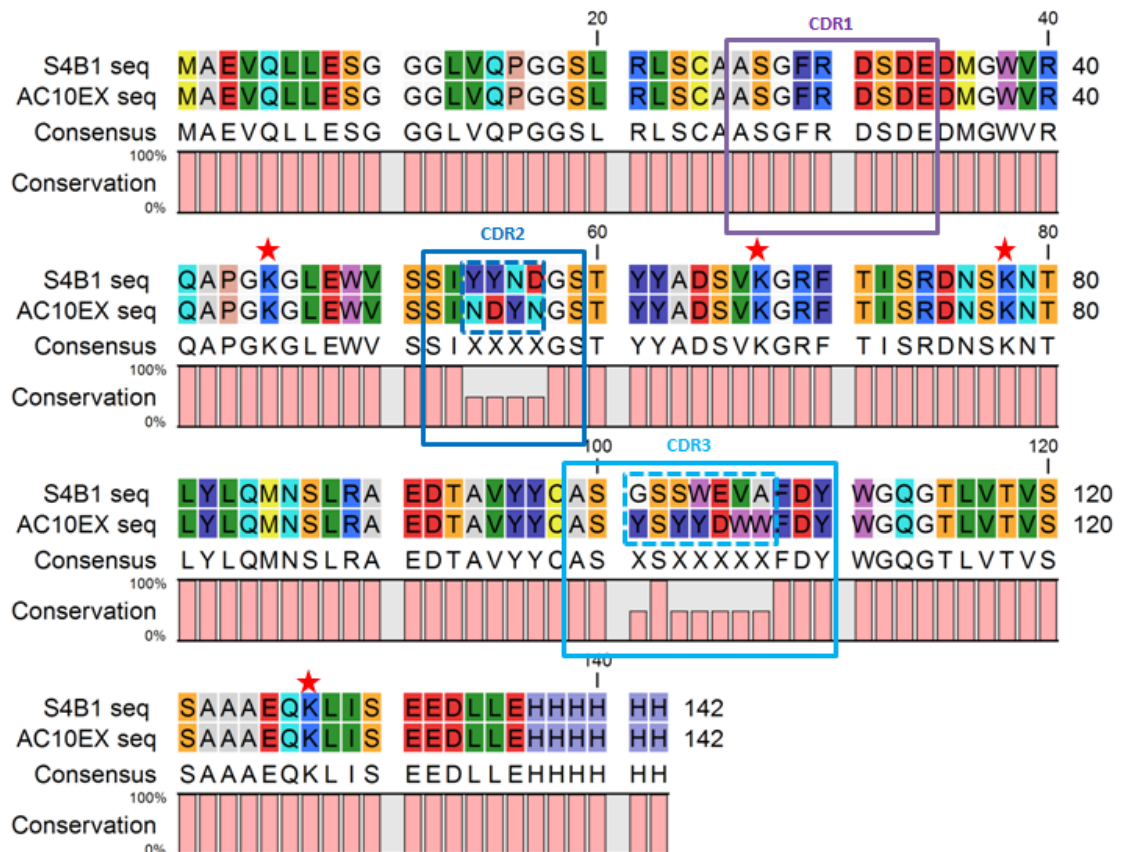


Figura 15. Análisis de las secuencias de aminoácidos de los sdAbs S4B1 y AC10EX.

La estrella roja señala los sitios potenciales de la biotilación química conformado por las Lys (K) en las posiciones K45, K67, K78 y K127. Los recuadros señalan las regiones CDR1 (morado), CDR2 (azul) y CD3 (celeste); al igual que las regiones con mutaciones dentro de las CDR2 y CDR3 (líneas punteadas). En el extremo C-terminal se observa la etiqueta c-myc (aminoácidos 125-134) y la etiqueta 6xHis (aminoácidos 137-142).

6.4 Extracción de histonas nativas de *L. (V.) braziliensis* y de humano

Las histonas extraídas de *L. (V.) braziliensis* y de humano fueron separadas en un SDS-PAGE al 18% que se tiñó con Coomassie Brilliant Blue (Figura 16). El patrón de bandas obtenido fue comparable al reportado en la literatura (82). Los MWs calculados para las bandas fueron comparables a los MWs teóricos de las histonas de *L. (V.) braziliensis* y del humano disponibles en el NCBI (Anexo 1, Anexo 5, Anexo 6).

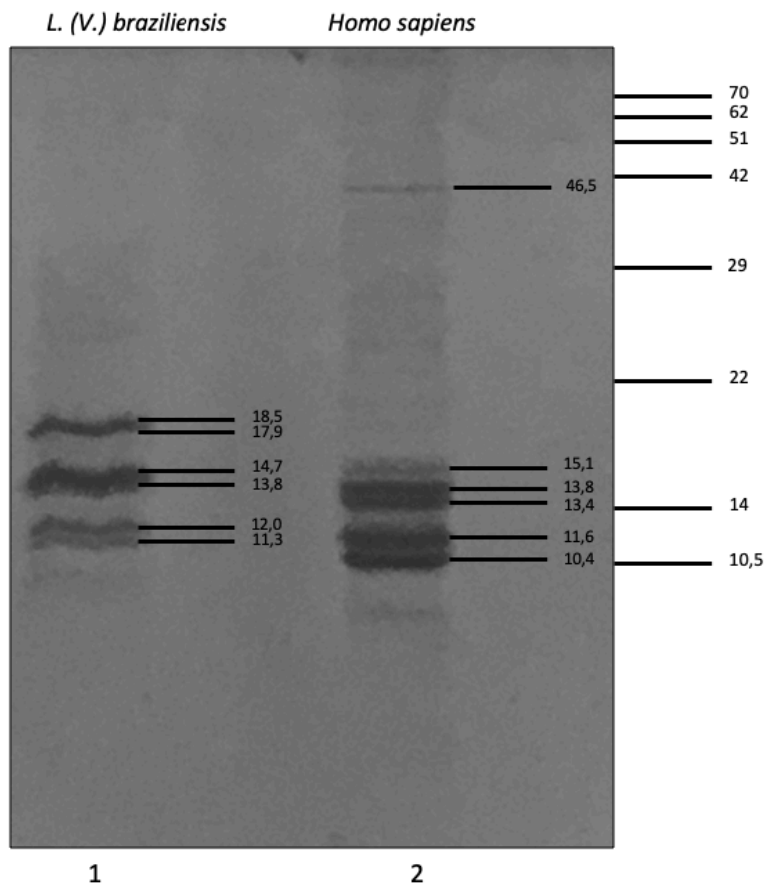


Figura 16. Histonas extraídas de *L. (V.) braziliensis* y de humano separadas por SDS-PAGE al 18% y teñidas con una solución de Coomassie Brilliant Blue

Carril 1: histonas de *L. (V.) braziliensis*. Carril 2: histonas del humano (*Homo sapiens*). Se muestra el marcador de peso molecular al lado derecho del gel en kDa.

6.5 Evaluación de la reactividad de los sdAbs hacia histonas de *L.(V.) braziliensis* y de humano

Como se observa en la Figura 17, el control del anticuerpo secundario penta his-HRP mostró reactividad tanto hacia histonas de *L. (V.) braziliensis* como hacia histonas del humano. Se obtuvo un patrón de reacción similar en los ensayos con S4B1, AC10EX y el control.

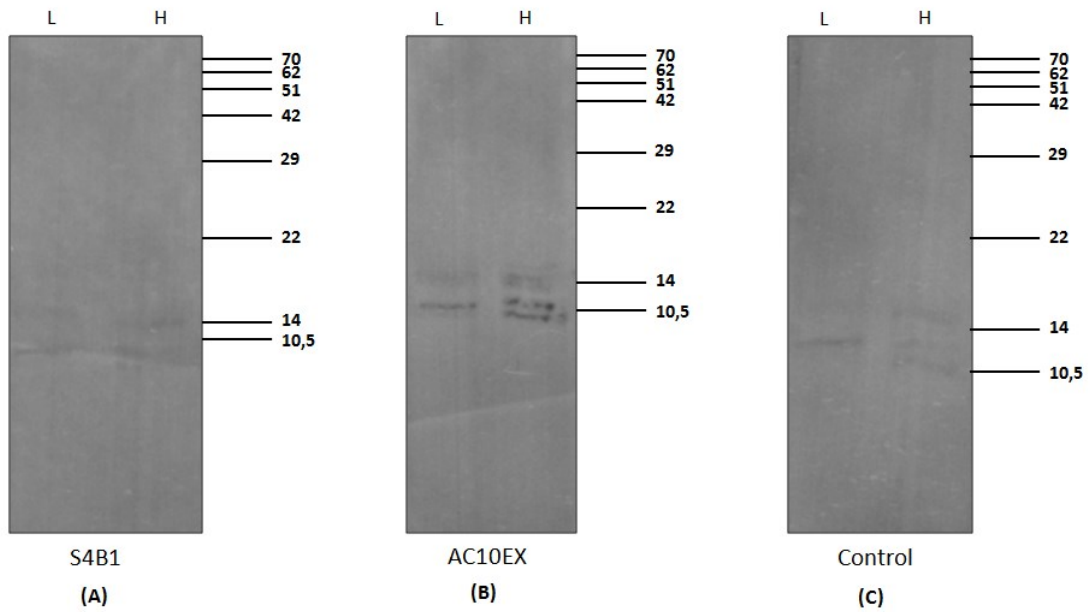


Figura 17. Análisis por Western Blot de la reactividad de los sdAbs S4B1 y AC10EX contra las histonas de *L. (V.) braziliensis* y de humano utilizando penta his-HRP.

Las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas con (A) S4B1, (B) AC10EX y (C) sin sdAb y posteriormente con el anticuerpo secundario penta his-HRP (1:4000). Se muestra el marcador de peso molecular al lado derecho en kDa.

Por otro lado, con el anticuerpo secundario Proteína A-HRP, no se detectó la unión de los sdAbs hacia las histonas (Figura 18).

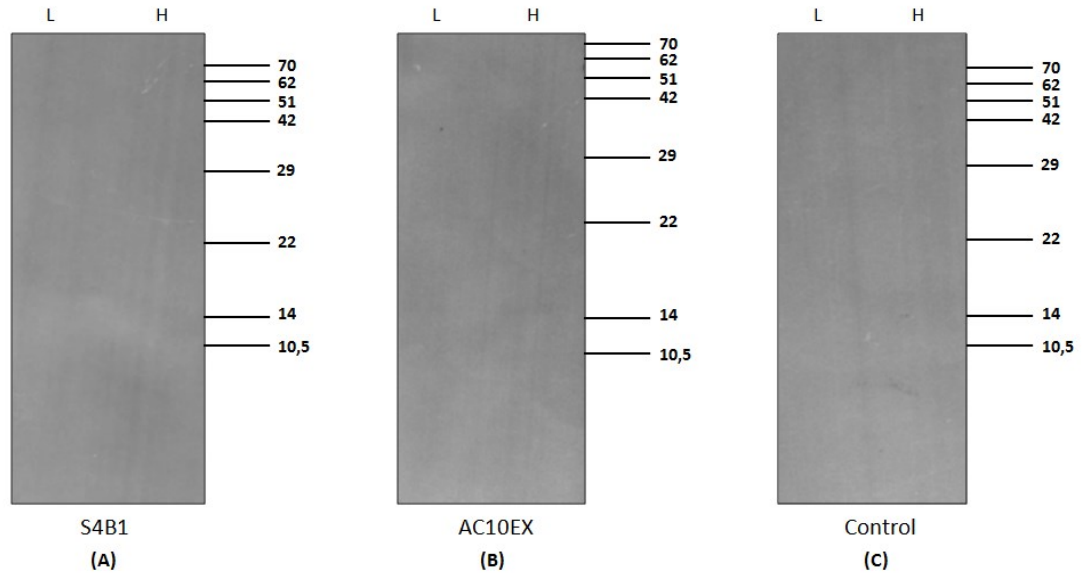


Figura 18. Análisis por Western Blot de la reactividad de los sdAbs S4B1 y AC10EX contra las histonas de *L. (V.) braziliensis* y de humano utilizando proteína A-HRP.

Las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas con (A) S4B1, (B) AC10EX y (C) sin sdAb y posteriormente con el anticuerpo secundario proteína A-HRP (1:2000). Se muestra el marcador de peso molecular al lado derecho en kDa.

Dado que los anticuerpos secundarios penta his-HRP y proteína A-HRP no fueron adecuados para detectar la unión entre sdAbs e histonas, se realizó un Western Blot con los anticuerpos anti c-myc y anti IgG-HRP.

El sdAb S4B1 reconoció específicamente una histona de *L. (V.) braziliensis* de aproximadamente 14.5 kDa (Figura 19A, Tabla 3; Anexo 7, Anexo 8). En contraste, el sdAb AC10EX reaccionó con histonas del parásito entre 11 – 13.8 kDa y una histona del humano de 12.6 kDa (Figura 19B, Tabla 3; Anexo 9, Anexo 10). No hubo reacciones inespecíficas por parte del conjugado anti IgG-HRP hacia las histonas (Figura 19C).

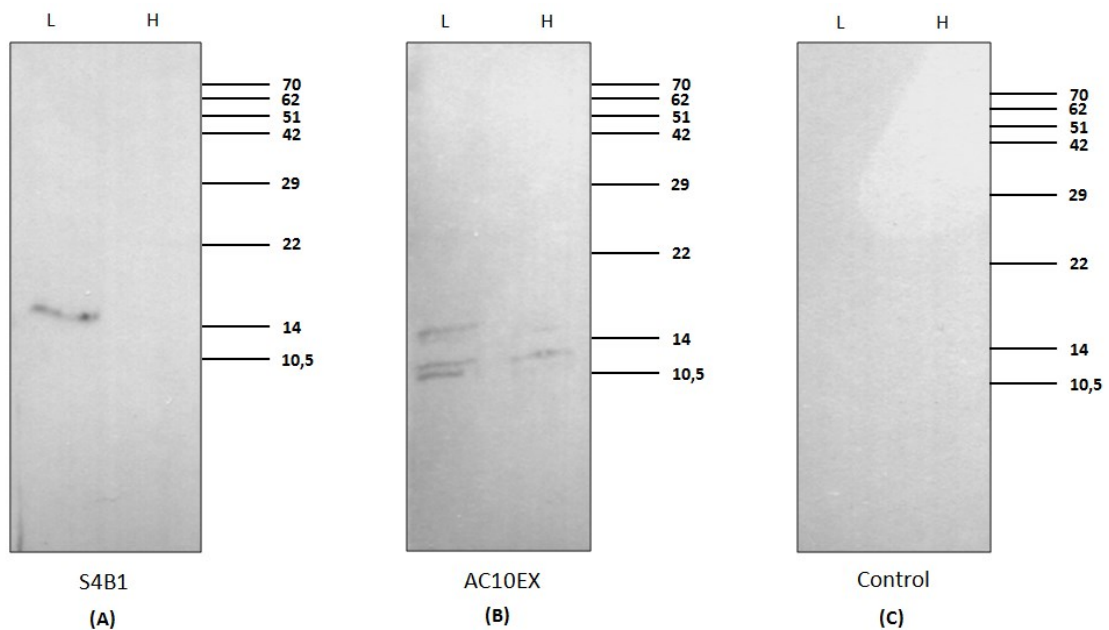


Figura 19. Análisis por Western Blot de la reactividad de los sdAbs S4B1 y AC10EX a una concentración de 0.2 μ M contra las histonas de *L. (V.) braziliensis* y de humano utilizando anti c-myc y anti IgG- HRP.

Las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas con (A) S4B1, (B) AC10EX y (C) sin sdAb y posteriormente con los anticuerpos secundarios anti c-myc(1:4000) y anti IgG-HRP (1:20 000). Se muestra el marcador de peso molecular al lado derecho en kDa.

Tabla 3. Pesos moleculares de las histonas reconocidas por los sdAbs no biotinilados S4B1 y AC10EX

S4B1 (0.2 µM)		AC10EX (0.2 µM)	
<i>L. (V.) braziliensis</i>	Humano	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Humano
14.5	No reconoció	13.8	12.6
		12.6	
		12.0	
		11.0	

Se muestran los pesos moleculares calculados de las histonas reconocidas por los sdAbs no biotinilados en el Western blot a una concentración de 0.2 µM. Los pesos se muestran en kDa.

6.6 Evaluación de los sdAbs biotinilados y no biotinilados frente a las histonas nativas de *L. (V.) braziliensis* y de humano

El patrón de reconocimiento del sdAb S4B1-btn (Figura 20A) y del S4B1 (Figura 20D), a una concentración de 0.5 µM, fue diferente. S4B1 reconoció únicamente proteínas de *L. (V.) braziliensis*. En contraste, S4B1-btn reaccionó con histonas del parásito y del humano. En la Tabla 4 se muestran los pesos moleculares calculados de las histonas reconocidas por el sdAb S4B1 biotinilado y no biotinilado (Anexo 11, Anexo 12, Anexo 15, Anexo 16). S4B1 reconoció tres histonas de *L. (V.) braziliensis* de 12.6 kDa, 13.8 kDa y 16.6 kDa; mientras que S4B1-btn reconoció histonas del parásito y del humano entre 9.7 kDa - 12.9 kDa (Tabla 4).

Por su parte, tanto AC10EX-btn como AC10EX reaccionaron con cuatro histonas de *L. (V.) braziliensis* y cuatro del humano (Figura 20B y E). Como se observa en la Tabla 5, el patrón de reconocimiento hacia las histonas fue similar (Anexo 13, Anexo 14, Anexo 17, Anexo 18). Las proteínas reconocidas por AC10EX y AC10EX-btn tuvieron un MW entre 9.6 kDa - 13.3 kDa y 10.7 kDa – 14.8 kDa, respectivamente (Tabla 5).

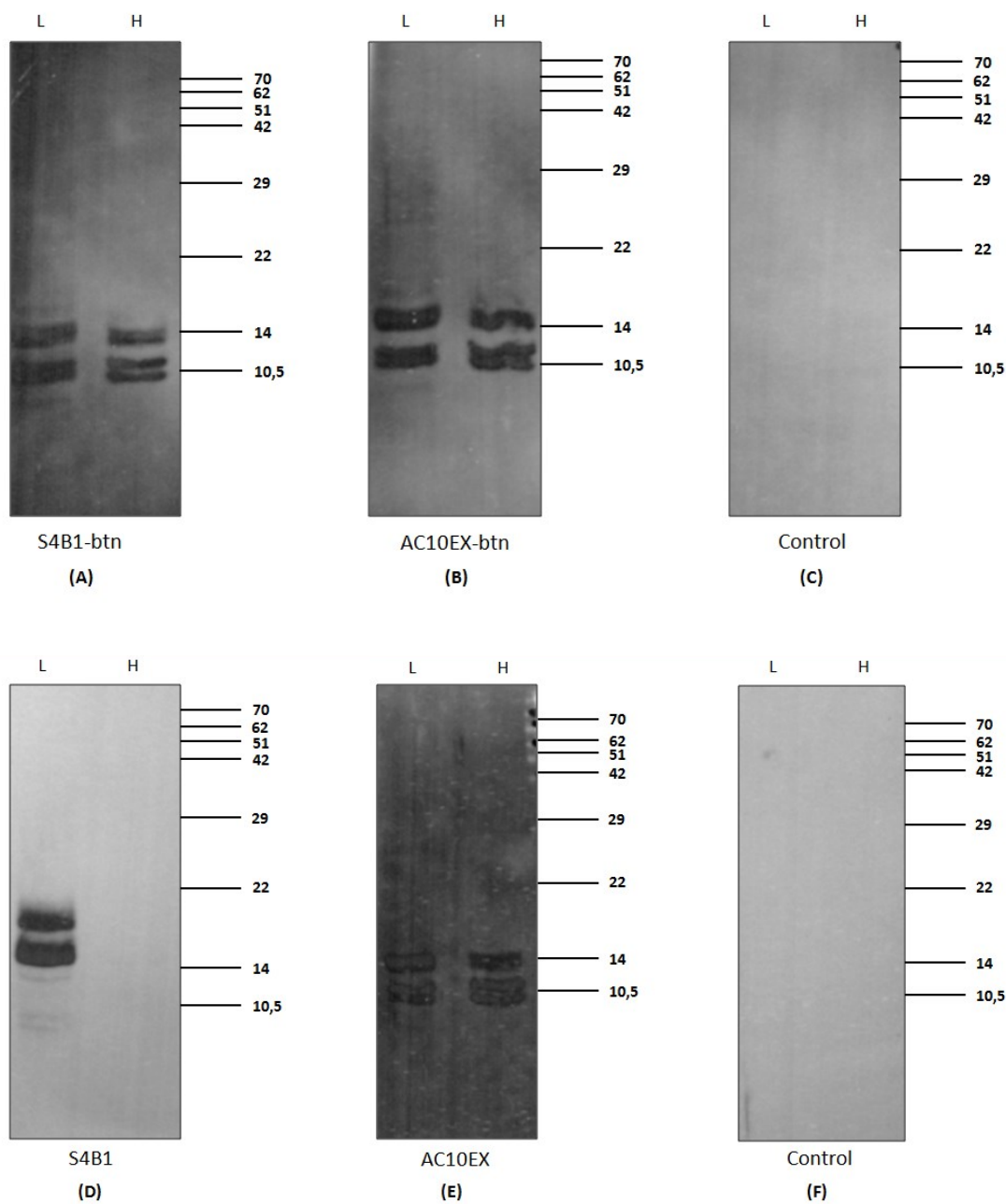


Figura 20. Western Blot de los sdAbs biotinilados y no biotinilados a una concentración de 0.5 μ M contra histonas de *L. (V.) braziliensis* y de humano.

Membrana de nitrocelulosa incubada con (A) sdAb S4B1-btn, (B) sdAb AC10EX-btn, (C) sin sdAb (control de estreptavidina-HRP), (D) sdAb S4B1, (E) sdAb AC10EX y (F) sin sdAb (control de anti IgG-HRP). Para A, B y C se utilizaron los anticuerpos secundarios anti c-myc (1:4000) y anti IgG-HRP (1:20 000). Para D, E y F se utilizó el conjugado estreptavidina-HRP (1: 10 000). Carril L: Histonas de *L. (V.) braziliensis* (0.5 μ g), Carril H: Histonas de humano (0.5 μ g). Se muestra el marcador de peso molecular al lado derecho de la membrana en kDa.

Tabla 4. Pesos moleculares de las histonas reconocidas por el sdAb S4B1 biotinilado y no biotinilado

S4B1 (0.5 μ M)		S4B1-btn (0.5 μ M)	
<i>L. (V.) braziliensis</i>	Humano	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Humano
16.6	No reconoció	12.9	12.9
13.8		12.3	12.3
12.6		10.7	10.7
		9.7	9.7

Se muestran los pesos moleculares calculados de las histonas reconocidas por el sdAb S4B1 biotinilado y no biotinilado en el Western blot a una concentración de 0.5 μ M. Los pesos se muestran en kDa.

Tabla 5. Pesos moleculares de las histonas reconocidas por el sdAb AC10EX biotinilado y no biotinilado

AC10EX (0.5 μ M)		AC10EX-btn (0.5 μ M)	
<i>L. (V.) braziliensis</i>	Humano	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Humano
13.3	13.3	14.8	14.1
12.7	12.7	13.5	13.5
11.0	10.5	11.7	11.7
10.0	9.6	10.7	10.7

Se muestran los pesos moleculares calculados de las histonas reconocidas por el sdAb AC10EX biotinilado y no biotinilado en el Western blot a una concentración de 0.5 μ M. Los pesos se muestran en kDa.

6.7 Evaluación de posibles interacciones inespecíficas generadas por la biotina remanente en las soluciones de sdAb

Dado que el kit de marcaje utilizado no incluye un paso de diálisis y en el laboratorio no se contaba con un sistema de purificación a pequeña escala (cada muestra de sdAb biotinilado tenía un volumen menor a 100 μ L), había la posibilidad que la reacción observada en los Western Blots contra las histonas se deba a uniones inespecíficas de moléculas de biotina libres remanentes en las soluciones de sdAb. Para evaluar esto, se repitió el experimento de Western Blot incluyendo un control de biotina que consistió en la incubación de la membrana (con histonas transferidas) en una solución de biotina, el conjugado y, por último, el revelado. El ensayo en esta ocasión empleó una menor concentración de sdAb (0.3 μ M) debido a la poca cantidad de muestra disponible.

Como se observa en la Figura 21B, la incubación con biotina libre disuelta no generó reacciones inespecíficas. Se observa nuevamente que el patrón de reconocimiento entre el S4B1 biotinilado y no biotinilado es diferente (Figura 21A, Figura 21D, Anexo 19, Anexo 20, Anexo 21, Anexo 22). S4B1 reconoce específicamente una histona de *L. (V.) braziliensis* (de 13.5 kDa), mientras que en su forma biotinilada, S4B1-btn reacciona con histonas del parásito (de 12.7 kDa) y del humano (entre 10 kDa - 12.7 kDa). Por su parte, el sdAb AC10EX reaccionó tanto con histonas del parásito (11.4 kDa y 13.1 kDa) como con las de humano (10.4 kDa, 11.4 kDa y 13.1 kDa) (Figura 21E, Anexo 23, Anexo 24).

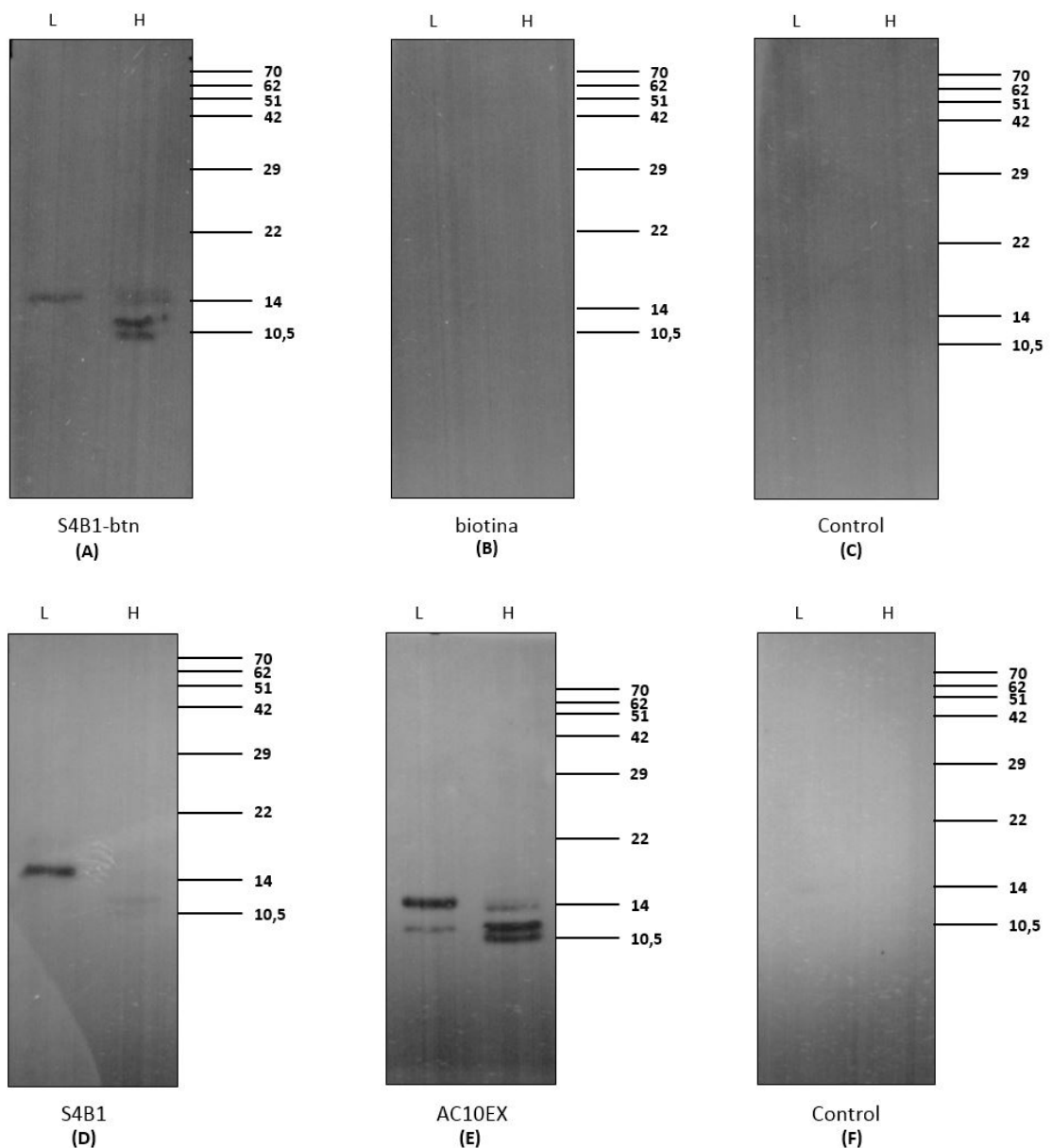


Figura 21. Western Blot del S4B1-btn, S4B1, AC10EX y el control de biotina a una concentración de 0.3 μ M contra histonas de *L. (V.) braziliensis* y de humano.

Membrana de nitrocelulosa incubada (A) con sdAb S4B1-btn, (B) con solución de biotina (C) sin sdAb (control de estreptavidina-HRP), (D) sdAb S4B1, (E) sdAb AC10EX y (F) sin sdAb (control de anti IgG-HRP). Para A, B y C se utilizaron los anticuerpos secundarios anti c-myc (1:4000) y anti IgG-HRP (1:20 000). Para D, E y F se utilizó el conjugado estreptavidina-HRP (1: 10 000). Carril L: Histonas de *L. (V.) braziliensis* (0.5 μ g), Carril H: Histonas de humano (0.5 μ g). Se muestra el marcador de peso molecular al lado derecho de la membrana en kDa.

Tabla 6. Pesos moleculares de las histonas reconocidas por el sdAb S4B1 biotinilado, S4B1 no biotinilado y AC10EX no biotinilado

S4B1 (0.3 μ M)		S4B1-btn (0.3 μ M)		AC10EX (0.3 μ M)	
<i>L. (V.) braziliensis</i>	Humano	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Humano	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Humano
13.5	No reconoció	12.7	12.7	13.1	13.1
			11.0	11.4	11.4
			10.0		10.4

Se muestran los pesos moleculares calculados de las histonas reconocidas por el sdAb S4B1 biotinilado y los sdAbs no biotinilados S4B1 y AC10EX en el Western blot a una concentración de 0.3 μ M. Los pesos se muestran en kDa.

7 Discusión

La presente tesis tuvo como objetivo la conjugación de moléculas de biotina en dos sdAbs que reconocen histonas del parásito *L. (V.) braziliensis* y la evaluación del efecto de esta conjugación en la funcionalidad de los sdAbs en ensayos de Western Blot.

La principal contribución de este estudio es que se demuestra que el marcaje químico con biotina de sdAbs afecta su especificidad hacia antígenos. Esto se demostró mediante ensayos de Western Blot con el sdAb S4B1. En su forma no biotinilada, el sdAb S4B1 reaccionó específicamente con histonas de *L. (V.) braziliensis* (Figura 20D). No obstante, al biotinilarse el sdAb reaccionó con histonas de *L. (V.) braziliensis* e histonas de humano (Figura 20A). Esta alteración en la especificidad de anticuerpos ha sido reportada previamente en estudios con anticuerpos monoclonales (Mabs) biotinilados con agentes NHS-biotina (86–88), mas no en sdAbs hasta la fecha.

Además del cambio de especificidad, el sdAb S4B1-btn mostró un patrón de reconocimiento de las histonas del parásito diferente (Tabla 4). En su forma biotinilada, el sdAb S4B1 ya no reconoció las histonas del parásito mayores a 13 kDa (Figura 20D). Es interesante notar que estos cambios en la reactividad del sdAb S4B1 luego de la biotinilación se apreciaron a pesar de que la reacción no estuvo dirigida a aminoácidos de las CDR (Figura 15). Los resultados de esta tesis coinciden con los de otros estudios con Mabs biotinilados que evidencian una disminución del reconocimiento de sus antígenos (89,90). La disminución en la capacidad de unión al antígeno de anticuerpos se ha asociado a la modificación de los grupos amino en las Lys o en el extremo N-terminal situados en la zona de reconocimiento del antígeno o cercana a esta (91). De modo que, los resultados sugieren que la biotinilación de las Lys en las posiciones K45 y K67 que se encuentran a 6 y 7 aminoácidos de distancia de la CDR2, respectivamente (Figura 15), habrían alterado el reconocimiento específico del sdAb S4B1 hacia las histonas de *L. (V.) braziliensis*.

Se sabe que la biotinilación puede cambiar el punto isoeléctrico (pI) de la proteína mediante la sustitución de los grupos amino por residuos de biotina, lo que a su vez puede alterar sus características físicas y provocar uniones inespecíficas o auto precipitación (92). En este estudio no se tuvo información concreta del agente biotinilante ni de los

otros reactivos del kit de biotilación dado que la información se encuentra protegida legalmente por el proveedor (Abcam) (81). Sin embargo, a partir del protocolo del kit (descrito en la Metodología) se deduce que el agente biotilante sería un Sulfo-NHS-biotina o un derivado (como el Sulfo-NHS-LC-biotina) ya que este compuesto es el único éster derivado de biotina soluble en agua que se emplea rutinariamente para la biotilación (19). Dentro de los agentes biotilantes más populares, se sabe que el NHS-LC-biotina y el sulfo-NHS-LC-biotina adicionan modificaciones hidrofóbicas de biotina alifática en las proteínas. Estos grupos tienen una tendencia de agregarse en solución acuosa y pueden causar precipitación de proteínas o pérdida de actividad (19).

Tomando en cuenta toda esta información, los resultados sugieren que la biotilación del sdAb S4B1 causó un incremento en su hidrofobicidad y esto alteró su unión específica hacia las histonas de *L. (V.) braziliensis* con un MW mayor a 13 kDa. Tal resultado es comparable al obtenido en 1996 por Storm et al., quienes reportaron diferencias en la unión a antígenos entre proteínas biotiladas por NHS-biotina y sus contrapartes no biotiladas asociadas a un incremento en hidrofobicidad (93).

Efecto diferencial de la biotilación en el reconocimiento de antígenos de los sdAbs S4B1 y AC10EX

A diferencia del S4B1, el reconocimiento de AC10EX hacia las histonas no varió con la biotilación. AC10EX-btn reconoció cuatro histonas de *L. (V.) braziliensis* (10.7 kDa – 14.8 kDa) y cuatro histonas del humano (10.7 kDa – 14.1 kDa) (Figura 20B, Tabla 5). Este patrón de reconocimiento fue similar al obtenido con el AC10EX sin biotilación (Figura 20E, Tabla 5). La diferencia del efecto de biotilación en el reconocimiento de las histonas entre el sdAb S4B1 y AC10EX podría estar relacionada al grado de biotilación (número promedio de moléculas de biotina incorporadas por molécula de sdAb). Varios grupos que trabajan con anticuerpos biotilados han demostrado que la pérdida de actividad de unión hacia sus antígenos es proporcional al grado de biotilación (87,89,90). Por ejemplo, en el trabajo de Muzykantov et al., (90) se ensayó la biotilación del Mab 9B9 con RMs biotina/IgG de 0.7-540 y se determinó que un RM dentro de un intervalo de 2-20 fue el más apropiado para el Mab trabajado.

Si bien ambos sdAbs cuentan con los mismos cuatro sitios de biotinylación (Figura 15), la incorporación de los residuos de biotina en las Lys depende de la disponibilidad de estos grupos aminos para reaccionar con el agente biotinylante (92). Por esta razón, a pesar que las condiciones de la biotinylación química hayan sido las mismas con respecto al RM del éster de biotina/anticuerpo, pH, temperatura y tiempo de incubación; el grado de biotinylación pudo haber diferido entre los sdAbs. En este estudio no fue posible estimar el grado de biotinylación de los sdAbs debido a que la cantidad de sdAb biotinylada fue limitada (50 µg por sdAb) y los ensayos clásicos para calcular el grado de biotinylación de proteínas, como el HABA, requieren de una cantidad considerable de muestra (alrededor de 300 µg) (94). Debido a tal limitación, no se descarta que el grado de biotinylación para la población de sdAbs S4B1 haya sido mayor que el del sdAb AC10EX, lo que explicaría su alteración en el reconocimiento específico hacia ciertas histonas de *L. (V.) braziliensis*. Tal sería el caso si el sdAb AC10EX contara con una conformación tridimensional que expone los grupos aminos de una manera más accesible a la reacción con el agente biotinylante que el sdAb S4B1. Por otro lado, una explicación no relacionada al grado de biotinylación pero sí basada en la estructura conformacional del sdAb sería que el plegamiento particular del sdAb S4B1 lo haya hecho susceptible a que los residuos de biotina interfieran con la interacción de sus CDR con las histonas.

Optimización del marcaje con biotina de los sdAbs

A partir de un ensayo piloto del marcaje químico con biotina con una solución purificada y dializada (en PBS) del sdAb AC10EX, se obtuvieron resultados que sirvieron para optimar la preparación de la muestra de sdAb para el marcaje (Anexo 2, Anexo 3, Anexo 4). Se observó que a pesar de que las proteínas contaminantes (con un MW superior a 30 kDa) se encontraban en una baja proporción en comparación al sdAb, estas también reaccionarían con los agentes biotinylantes (Anexo 2). Dado que estas reacciones afectarían la biotinylación de la proteína blanco (el sdAb), se consideró necesario incluir un proceso adicional de purificación que logre: eliminar las proteínas contaminantes remanentes en los eluatos con mayor concentración del sdAb, concentrar la solución del sdAb y realizar el intercambio de buffer a PBS. Todos estos procedimientos fueron realizados con el sistema de purificación basado en filtros para centrifugación Amicon Ultra-15 (95). Se eligió un filtro cuyo MWCO fue de 30 kDa, ya que teóricamente el filtro

permite que las proteínas con un PM mayor a 30 kDa se queden concentradas en el filtro recolector, mientras que, las proteínas de menor PM, como el sdAb de 15 kDa, son recolectadas en el líquido filtrado (95). Con la tinción de Coomassie Brilliant Blue, se observa la presencia del sdAb en el líquido retenido mas no en el líquido filtrado (Figura 14). No obstante, se debe tomar en cuenta que en la primera solución las proteínas se encuentran concentradas en un volumen de tan solo 300-500 μ L mientras que el líquido filtrado recolectado es de aproximadamente 10 ml. Por esta razón, fue posible realizar el intercambio de buffer a PBS y la concentración del sdAb en un volumen reducido con el filtro de MWCO de 3 kDa (Figura 14).

A pesar de que se reporta una pérdida entre el 55-65% de la cantidad total de sdAb inicial, el proceso de doble purificación fue necesario para obtener las soluciones puras y concentradas de los sdAbs apropiadas para el marcaje. Considerando además que tanto el AC10EX como el S4B1 mantuvieron el reconocimiento característico hacia las histonas de *L. (V.) braziliensis* y de humano observado y caracterizado en experimentos previos (Figura 17), se confirmó que los sdAbs estuviesen aptos para el marcaje químico con biotina. Si bien el ensayo de Western Blot no permitió verificar la incorporación de biotina en los sdAbs (Anexo 2) esto fue comprobado al evaluar las soluciones de sdAbs biotinilados contra las histonas, en donde hubo reacción por ELISA (Anexo 3) y Western Blot (Anexo 4).

Contribución del estudio en la conjugación de sdAbs con potencial de diagnóstico

El presente estudio aporta al área de la conjugación química de sdAbs que tienen el potencial de ser reactivos de diagnóstico al demostrar que la biotinilación química basada en la modificación de grupos amino no es una técnica de conjugación apropiada para sdAbs porque puede alterar su especificidad y presenta variabilidad. Esto es respaldado por la literatura disponible que aborda el marcaje de anticuerpos y su evaluación en inmunoensayos.

En este sentido, una alternativa prometedora para incorporar el sistema de detección biotina-estreptavidina en los sdAbs estudiados sería la biotinilación sitio específica. Esta técnica se basa en la acción de la enzima BirA sobre la etiqueta Avitag, y ha sido empleada

extensamente para biotinar sdAbs y emplearlos como anticuerpos de captura en sistemas de detección de antígenos (70–75).

8 Conclusiones

- Se obtuvieron soluciones puras de los sdAbs AC10EX y S4B1 aptas para el marcaje químico con biotina mediante un proceso de doble purificación.
- Se extrajeron histonas nativas de *L. (V.) braziliensis* en estadio promastigote e histonas humanas, las cuales fueron utilizadas como antígenos en ensayos de Western Blot contra los sdAbs.
- El marcaje químico con biotina alteró el reconocimiento específico del sdAb S4B1 hacia las histonas de *L. (V.) braziliensis* con un MW de 16.6, 13.8 y 12.6 kDa, de tal modo que el S4B1 biotinilado reaccionó con histonas del parásito y del humano con un MW inferior a 13 kDa en ensayos de Western Blot.
- El marcaje químico con biotina no modificó el patrón de reconocimiento del sdAb AC10EX, el cual reconoce histonas de *L. (V.) braziliensis* e histonas humanas en ensayos de Western Blot.

9 Recomendaciones

- Se recomienda conocer la eficiencia de la biotinilación luego de cada reacción de marcaje, pues esto brindaría información acerca de la sensibilidad de detección del sistema biotina-estreptavidina.
- Se propone ensayar el sistema de biotinilación sitio específica en sdAbs como alternativa a la biotinilación química dirigida a grupos amina para la incorporación del sistema de detección biotina-estreptavidina
- Se recomienda identificar de manera precisa la identidad de las histonas de *Leishmania* a fin de establecer la especificidad del sdAb de manera inequívoca.

10 Referencias bibliográficas

1. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. Vol. 5, World Health Organization technical report series. Geneva; 2010.
2. Martins ALGP, Barreto JA, Lauris JRP, Martins ACGP. American tegumentary leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. *An Bras Dermatol*. 2014 Jan;89(1):52–8.
3. Ministerio de Salud del Perú. Boletín Epidemiológico del Perú. Lima; 2017.
4. Goto H, Lindoso JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010 Apr 10;8(4):419–33.
5. Gomes CM, Paula NA de, Morais OO de, Soares KA, Roselino AM, Sampaio RNR. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *An Bras Dermatol*. 2014 Sep;89(5):701–9.
6. de Vries HJC, Reedijk SH, Schallig HDFH. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. *Am J Clin Dermatol*. 2015 Apr 17;16(2):99–109.
7. Ministerio de Salud del Perú. Leishmaniasis: Módulos Técnicos. Lima: Ministerio de Salud del Perú; 2000. 83 p.
8. Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol*. 2005 Sep 1;23(9):1126–36.
9. Leow C, Fischer K, Leow C, Cheng Q, Chuah C, McCarthy J. Single Domain Antibodies as New Biomarker Detectors. *Diagnostics*. 2017 Oct 17;7(4):52.
10. Stijlemans B, De Baetselier P, Caljon G, Van Den Abbeele J, Van Ginderachter JA, Magez S. Nanobodies As Tools to Understand, Diagnose, and Treat African Trypanosomiasis. *Front Immunol*. 2017 Jun 30;8(June):1–12.

11. Fernandes CFC, Pereira S dos S, Luiz MB, Zuliani JP, Furtado GP, Stabeli RG. Camelid Single-Domain Antibodies As an Alternative to Overcome Challenges Related to the Prevention, Detection, and Control of Neglected Tropical Diseases. *Front Immunol.* 2017 Jun 9;8(June):1–8.
12. Vincke C, Muyldermans S. Single Domain Antibodies. Saerens D, Muyldermans S, editors. *Single Domain Antibodies*. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. 15–26 p. (Methods in Molecular Biology; vol. 911).
13. Teillaoud J. Single Domain Antibodies. Saerens D, Muyldermans S, editors. *Single Domain Antibodies*. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. 3–13 p. (Methods in Molecular Biology; vol. 911).
14. Harmsen MM, De Haard HJ. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007 Nov 18;77(1):13–22.
15. Mandrup OA, Friis NA, Lykkemark S, Just J, Kristensen P. A Novel Heavy Domain Antibody Library with Functionally Optimized Complementarity Determining Regions. van Raaij MJ, editor. *PLoS One.* 2013 Oct 8;8(10):e76834.
16. Bayer E a, Wilchek M. The use of the avidin-biotin complex as a tool in molecular biology. *Methods Biochem Anal.* 1980;26(December 2015):1–45.
17. Green NM. Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol.* 1990;184(C):51–67.
18. Wilchek M, Bayer EA. Avidin-biotin mediated immunoassays: Overview. *Methods Enzymol.* 1990;184(C):467–9.
19. Hermanson GT. (Strept)avidin–Biotin Systems. In: *Bioconjugate Techniques*. 3rd ed. San Diego: Academic Press; 2013. p. 465–505.
20. Kessler C. General Aspects of Nonradioactive Analysis of Biomolecules. In: Kessler C, editor. *Nonradioactive Analysis of Biomolecules*. 2nd ed. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2000. p. 1–37.

21. Garman A. Introduction to non-radioactive signals and labels. In: Garman A, editor. *Non-Radioactive Labelling: A Practical Introduction*. 1st ed. London: Elsevier; 1997. p. 1–19.
22. Kessler C. Non-radioactive analysis of biomolecules. *J Biotechnol*. 1994;35(2–3):165–89.
23. Garman A. Labelling proteins and peptides: chemical background. In: Elsevier, editor. *Non-Radioactive Labelling: A Practical Introduction*. 1st ed. London; 1997. p. 20–32.
24. Diamandis EP, Christopoulos TK. The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clin Chem*. 1991 May;37(5):625–36.
25. Green NM. Avidin. *Adv Protein Chem*. 1975;29:85–133.
26. Bruch RC, White HB. Compositional and structural heterogeneity of avidin glycopeptides. *Biochemistry*. 1982 Oct 12;21(21):5334–41.
27. Duhamel RC, Whitehead JS. Prevention of nonspecific binding of avidin. *Methods Enzymol*. 1990;184(C):201–7.
28. Chalet L, Wolf FJ. The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by *Streptomyces*. *Arch Biochem Biophys*. 1964 Jul 20;106:1–5.
29. Alon R, Bayer EA, Wilchek M. Streptavidin contains an RYD sequence which mimics the RGD receptor domain of fibronectin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 Aug 16;170(3):1236–41.
30. Della-Penna D, Christoffersen RE, Bennett AB. Biotinylated proteins as molecular weight standards on Western blots. *Anal Biochem*. 1986 Feb 1;152(2):329–32.
31. Green NM, Konieczny L, Toms EJ, Valentine RC. The use of bifunctional biotinyl compounds to determine the arrangement of subunits in avidin. *Biochem J*. 1971 Dec;125(3):781–91.

32. Haugland RP, You WW. Coupling of Antibodies with Biotin. 3rd ed. Walker JM, editor. *The Protein Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press; 2009. 693–704 p. (Springer Protocols Handbooks; vol. 0).
33. Luna EJ. Biotinylation of Proteins in Solution and on Cell Surfaces. In: Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT, editors. *Current Protocols in Protein Science*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2001. p. 3.6.1-3.6.15.
34. Thermo Scientific. *Avidin-Biotin Technical Handbook*. 2009. 51 p.
35. Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 1996 Jan;22(1):1–13.
36. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. Kirk M, editor. *PLoS One*. 2012 May 31;7(5):e35671.
37. Reis LDC, Brito MEF de, Almeida ÉL de, Félix SM, Medeiros ÂCR, Silva CJ, et al. Clinical, epidemiological and laboratory aspects of patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008 Oct;41(5):439–43.
38. Veland N, Miranda-Verastegui C, Ramos AP, Valencia BM, Llanos-Cuentas A, Low DE, et al. Clinical and Demographic Stratification of Test Performance: A Pooled Analysis of Five Laboratory Diagnostic Methods for American Cutaneous Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2010 Aug 5;83(2):345–50.
39. Szargiki R, Castro EA de, Luz E, Kowalthuk W, Machado AM, Thomaz-Soccol V. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2009 Feb;13(1):47–52.
40. Espir TT, Guerreiro TS, Naiff M de F, Figueira L de P, Soares FV, da Silva SS, et al. Evaluation of different diagnostic methods of American Cutaneous

- Leishmaniasis in the Brazilian Amazon. *Exp Parasitol*. 2016 Aug;167:1–6.
41. Davies CR, Llanos-Cuentas EA, Sharp SJ, Canales J, Leon E, Alvarez E, et al. Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: factors associated with variability in clinical symptoms, response to treatment, and parasite isolation rate. *Clin Infect Dis*. 1997 Aug;25(2):302–10.
 42. Ameen M. Cutaneous leishmaniasis: Advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clin Exp Dermatol*. 2010;35(7):699–705.
 43. Boggild AK, Miranda-Verastegui C, Espinosa D, Arevalo J, Martinez-Medina D, Llanos-Cuentas A, et al. Optimization of microculture and evaluation of miniculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions in Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 2008 Dec;79(6):847–52.
 44. Reithinger R, Dujardin J-C. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. *J Clin Microbiol*. 2007 Jan 1;45(1):21–5.
 45. Oliveira JGS, Novais FO, de Oliveira CI, da Cruz Junior AC, Campos LF, da Rocha A V., et al. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Acta Trop*. 2005 Apr;94(1):55–9.
 46. Tavares CAP, Fernandes AP, Melo MN. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2003 Sep 9;3(5):657–67.
 47. Antonio L de F, Fagundes A, Oliveira RVC, Pinto PG, Bedoya-Pacheco SJ, Vasconcellos É de CF e, et al. Montenegro Skin Test and Age of Skin Lesion As Predictors of Treatment Failure in Cutaneous Leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2014;56(5):375–80.
 48. Faber WR, Oskam L, van Gool T, Kroon NCM, Knecht-Junk KJ, Hofwegen H, et al. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*. 2003;49(1):70–4.
 49. Requena JM, Alonso C, Soto M. Evolutionarily Conserved Proteins as Prominent Immunogens during *Leishmania* Infections. *Parasitol Today*. 2000 Jun;16(6):246–

- 50.
50. Soto M, Requena JM, Quijada L, García M, Guzman F, Patarroyo ME, et al. Mapping of the linear antigenic determinants from the *Leishmania infantum* histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis. *Immunol Lett.* 1995 Dec;48(3):209–14.
51. Soto M, Requena JM, Quijada L, Gomez LC, Guzman F, Patarroyo ME, et al. Characterization of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* histone H3 recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 1996 Dec;106(3):454–61.
52. Soto M, Requena JM, Quijada L, Perez MJ, Nieto CG, Guzman F, et al. Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine viscerocutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 1999 Feb;115(2):342–9.
53. Lodish H, Berk A, Zipursky SL et al. Organizing Cellular DNA into Chromosomes [Internet]. W. H. Freeman. 2000. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21500/>
54. Alsford S, Horn D. Trypanosomatid histones. *Mol Microbiol.* 2004 Jun 4;53(2):365–72.
55. Sullivan WJ, Naguleswaran A, Angel SO. Histones and histone modifications in protozoan parasites. *Cell Microbiol.* 2006 Dec;8(12):1850–61.
56. Meddeb-Garnaoui A, Toumi A, Ghelis H, Mahjoub M, Louzir H, Chenik M. Cellular and humoral responses induced by *Leishmania* histone H2B and its divergent and conserved parts in cutaneous and visceral leishmaniasis patients, respectively. *Vaccine.* 2010 Feb;28(7):1881–6.
57. Montoya Y, Leon C, Talledo M, Nolasco O, Padilla C, Muñoz-Najar U, et al. Recombinant antigens for specific and sensitive serodiagnosis of Latin American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997;91(6):674–6.
58. Carmelo E, Martinez E, Gonzalez AC, Pinero JE, Patarroyo ME, del Castillo A, et

- al. Antigenicity of *Leishmania braziliensis* Histone H1 during Cutaneous Leishmaniasis: Localization of Antigenic Determinants. *Clin Vaccine Immunol.* 2002 Jul 1;9(4):808–11.
59. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hammers C, Songa EB, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature.* 1993 Jun 3;363(6428):446–8.
 60. Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, et al. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol.* 2009 Aug 16;198(3):157–74.
 61. Hairul Bahara NH, Tye GJ, Choong YS, Ong EBB, Ismail A, Lim TS. Phage display antibodies for diagnostic applications. *Biologicals.* 2013 Jul;41(4):209–16.
 62. Schmitz U, Versmold A, Kaufmann P, Frank HG. Phage display: A molecular tool for the generation of antibodies - A review. *Placenta.* 2000;21(SUPPL.1):106–12.
 63. Goldman E, Walper S. Phage-Displayed Single Domain Antibodies as Recognition Elements. In: Lin B, Ratna B, editors. Totowa, NJ: Humana Press; 2014. p. 201–10. (Methods in Molecular Biology; vol. 1108).
 64. Qi H, Lu H, Qiu HJ, Petrenko V, Liu A. Phagemid vectors for phage display: Properties, characteristics and construction. *J Mol Biol.* 2012;417(3):129–43.
 65. Jespers L, Schon O, James LC, Veprintsev D, Winter G. Crystal Structure of HEL4, a Soluble, Refoldable Human VH Single Domain with a Germ-line Scaffold. *J Mol Biol.* 2004 Apr;337(4):893–903.
 66. Novagen. Mapa de genoma del vector pET-22b (+) [Internet]. p. 1–2. Available from: https://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET_vectors/pET-22b_map.pdf
 67. Jansson B. All individual domains of staphylococcal protein A show Fab binding. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1998 Jan;20(1):69–78.

68. Aroni A. Bio-reactivos con potencial de diagnóstico de leishmaniosis cutánea contra antígenos del estadio amastigote definidos mediante la tecnología de phage display. Tesis Maest Lima Univ Peru Cayetano Hered. 2017;
69. Wilček M, Bayer EA. Avidin-biotin mediated immunoassays: overview. *Methods Enzymol.* 1990;184(C):467–9.
70. Li H, Yan J, Ou W, Liu H, Liu S, Wan Y. Construction of a biotinylated cameloid-like antibody for label-free detection of apolipoprotein B-100. *Biosens Bioelectron.* 2015 Feb;64:111–8.
71. Zhu M, Gong X, Hu Y, Ou W, Wan Y. Streptavidin-biotin-based directional double Nanobody sandwich ELISA for clinical rapid and sensitive detection of influenza H5N1. *J Transl Med.* 2014 Dec 20;12(1):352.
72. Zhu M, Hu Y, Li G, Ou W, Mao P, Xin S, et al. Combining magnetic nanoparticle with biotinylated nanobodies for rapid and sensitive detection of influenza H3N2. *Nanoscale Res Lett.* 2014;9(1):528.
73. Yan J, Li G, Hu Y, Ou W, Wan Y. Construction of a synthetic phage-displayed Nanobody library with CDR3 regions randomized by trinucleotide cassettes for diagnostic applications. *J Transl Med.* 2014 Dec 10;12(1):343.
74. Yan J, Wang P, Zhu M, Li G, Romão E, Xiong S, et al. Characterization and applications of Nanobodies against human procalcitonin selected from a novel naïve Nanobody phage display library. *J Nanobiotechnology.* 2015 Dec 6;13(1):33.
75. Gong X, Zhu M, Li G, Lu X, Wan Y. Specific determination of influenza H7N2 virus based on biotinylated single-domain antibody from a phage-displayed library. *Anal Biochem.* 2016 May;500:66–72.
76. Gräslund S, Savitsky P, Müller-Knapp S. In Vivo Biotinylation of Antigens in *E. coli*. In: *Heterologous Gene Expression in E.coli.* 2017. p. 337–44.
77. Cronan JE. Biotination of proteins in vivo. A post-translational modification to

- label, purify, and study proteins. *J Biol Chem.* 1990 Jun 25;265(18):10327–33.
78. Beckett D, Kovaleva E, Schatz PJ. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci.* 2008 Dec 31;8(4):921–9.
79. Kay BK, Thai S, Volgina V V. High-Throughput Biotinylation of Proteins. In: *High Throughput Protein Expression and Purification.* 2009. p. 185–98.
80. Qiagen. *The QIAexpressionist.* 2003. 128 p.
81. Abcam. ab102867 – Biotin (type B) Conjugation Kit Protocol [Internet]. 2015. Available from: [https://www.abcam.com/ps/products/102/ab102867/documents/ab102867 Biotin \(type B\) Conjugation Kit v2 \(website\).pdf](https://www.abcam.com/ps/products/102/ab102867/documents/ab102867_Biotin_(type_B)_Conjugation_Kit_v2_(website).pdf)
82. Shechter D, Dormann HL, Allis CD, Hake SB. Extraction, purification and analysis of histones. *Nat Protoc.* 2007 Jun 1;2(6):1445–57.
83. Miltenyi Biotec GmbH. Isolation of mononuclear cells from human peripheral blood by density gradient centrifugation [Internet]. 2008. Available from: https://www.miltenyibiotec.com/_Resources/Persistent/6d7e0fb8a3eab613958d142051e3c7050eb0c8a9/SP_MC_PB_density_gradient.pdf
84. Laboratories B-R. Protocol for Molecular Weight Estimation [Internet]. p. 1–2. Available from: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6210.pdf
85. Towbin H, Staehelint T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications (ribosomal proteins/radioimmunoassay/fluorescent antibody assay/peroxidase-conjugated antibody/autoradiography). 1979;76(9):4350–4.
86. Panyutich A V., Baturevich EA, Kolesnikova TS, Ganz T. The effect of biotinylation on the antigenic specificity of anti-defensin monoclonal antibodies. *J Immunol Methods.* 1993 Feb;158(2):237–42.

87. Høyer-Hansen G, Hamers MJAG, Pedersen AN, Nielsen HJ, Brünner N, Danø K, et al. Loss of ELISA specificity due to biotinylation of monoclonal antibodies. *J Immunol Methods*. 2000 Feb;235(1–2):91–9.
88. Pearson J., Kane J., Petraki-Kallioti I, Gill A, Vadgama P. Surface plasmon resonance: a study of the effect of biotinylation on the selection of antibodies for use in immunoassays. *J Immunol Methods*. 1998 Dec;221(1–2):87–94.
89. Miralles F, Takeda Y, Escribano MJ. Comparison of carbohydrate and peptide biotinylation on the immunological activity of IgG1 murine monoclonal antibodies. *J Immunol Methods*. 1991;140(2):191–6.
90. Muzykantov VR, Gavriluk VD, Reinecke A, Atochina EN, Kuo A, Barnathan ES, et al. The Functional Effects of Biotinylation of Anti-angiotensin-Converting Enzyme Monoclonal Antibody in Terms of Targeting in Vivo. *Anal Biochem*. 1995 Apr;226(2):279–87.
91. Burkot TR, Wirtz RA, Lyon J. Use of fluorodinitrobenzene to identify monoclonal antibodies which are suitable for conjugation to periodate-Oxidized horseradish peroxidase. *J Immunol Methods*. 1985 Nov;84(1–2):25–31.
92. Bayer EA, Wilchek M. Protein biotinylation. *Methods Enzymol*. 1990;184(1976):138–60.
93. Storm D, Loos M, Kaul M. Biotinylation of proteins via amino groups can induce binding to U937 cells, HL-60 cells, monocytes and granulocytes. *J Immunol Methods*. 1996;199(1):87–99.
94. Cull MG, Schatz PJ. Biotinylation of proteins in vivo and in vitro using small peptide tags. *Appl Chimeric Genes Hybrid Proteins Part A Gene Expr Protein Purif*. 2000;Volume 326(1996):430–40.
95. Millipore. Amicon ® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices [Internet]. 2017. Available from: http://www.merckmillipore.com/PE/es/product/Amicon-Ultra-15-Centrifugal-Filter-Units,MM_NF-

C7715?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F

11 Anexos

11.1 Anexo 1. MWs teóricos de las histonas de *L. (V.) braziliensis* y del humano

Organismo	Histona	N° aminoácidos	MW (kDa)	Código
<i>L. (V.) braziliensis</i>	H1	163 aa	16.76	NCBI Reference Sequence: XP_001564073.1
	H2A	132 aa	14.13	NCBI Reference Sequence: XP_001564819.1
	H2B (versión larga)	182 aa	20.43	NCBI Reference Sequence: XP_001564131.2
	H2B (versión corta)	111 aa	12.4	NCBI Reference Sequence: XP_001564132.1
	H3	130 aa	14.76	NCBI Reference Sequence: XP_001562877.1
	H4	100 aa	11.39	NCBI Reference Sequence: XP_001568233.1
Humano	H1	219 aa	21.87	GenBank: AAA63187.1
	H2A	130 aa	14.09	GenBank: AAN59974.1
	H2B	126 aa	13.92	GenBank: CAA41051.1
	H3	136 aa	15.51	GenBank: AAN39284.1
	H4	103 aa	11.37	NCBI Reference Sequence: NP_003533.1

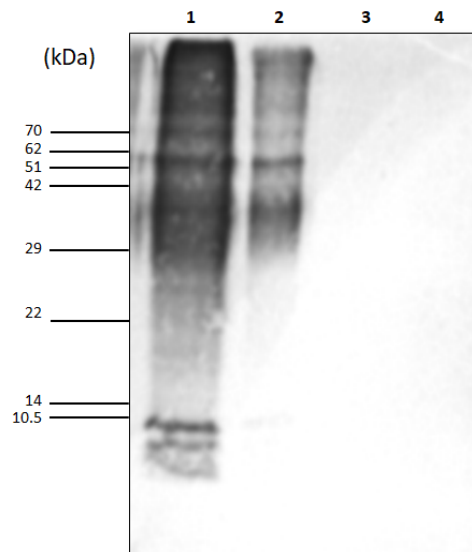
Anexo 1. Histonas de *L. (V.) braziliensis* y del humano con sus respectivos MW teóricos.

11.2 Anexo 2. Evaluación del marcaje químico con biotina del sdAb AC10EX mediante un ensayo de Western Blot

Se evaluó la incorporación de biotina en el sdAb AC10EX mediante un ensayo de Western Blot contra la estreptavidina-HRP. Se evaluaron dos cantidades de sdAb AC10EX biotilado (5 µg y 1 µg) y se utilizó como control del conjugado las mismas cantidades del sdAb no biotilado.

Como se observa en la Anexo 2, la estreptavidina-HRP reconoció proteínas solo en las muestras de sdAb biotilado (Anexo 2 Figura 22, carriles 1 y 2). El ruido de fondo en la

reacción fue evidente y no se observó claramente el reconocimiento de alguna banda con el peso esperado para el sdAb (15 kDa).



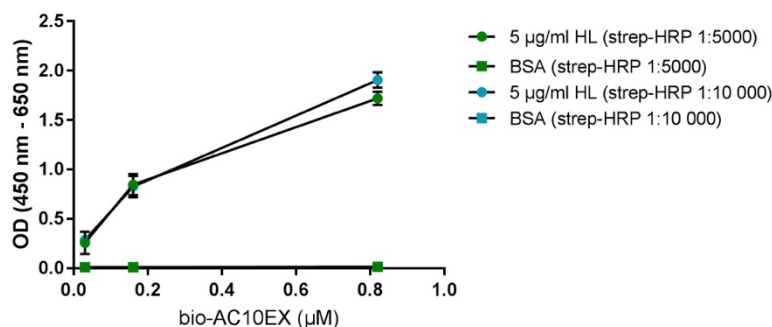
Anexo 2. Western blot para evaluar el marcaje con biotina del sdAb.

Carriles 1 y 2: sdAb AC10EX marcado con biotina (5 μ g y 1 μ g, respectivamente); Carriles 3 y 4: sdAb AC10EX sin marcar (1 μ g y 5 μ g, respectivamente). Western blot contra estreptavidina-HRP (1: 10 000). Se muestra el marcador de peso molecular al lado izquierdo de la figura en kDa.

11.3 Anexo 3. ELISA del sdAb AC10EX marcado con biotina contra histonas de *L. (V.) braziliensis*

Dado que el ensayo de verificación del marcaje con biotina del sdAb AC10EX mediante Western Blot no fue informativo, se realizó un ELISA utilizando el sdAb marcado con biotina contra las histonas de *L. (V.) braziliensis*. Se evaluaron tres concentraciones de sdAb (0.82 μ M, 0.16 μ M, 0.03 μ M). Se probaron dos concentraciones del conjugado (1:5000 y 1:10 000) para determinar la concentración más adecuada para el sistema. En ambos casos se observa que AC10EX biotinilado tiene una respuesta dependiente de la concentración específica contra las histonas de *L. (V.) braziliensis* (Anexo 3).

bio-AC10EX vs histonas de *L. (V.) braziliensis*

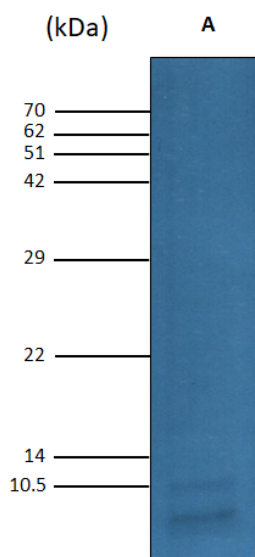


Anexo 3. ELISA de diferentes concentraciones del AC10EX-btn contra histonas nativas de *L. (V.) braziliensis*.

El eje x indica la concentración del anticuerpo SD biotinilado (μM) adicionada a los respectivos pozos de la serie de diluciones. El eje y indica los valores de absorbancia (OD450- OD650). Las barras de error muestran una desviación estándar basada en tres réplicas dentro de la placa.

11.4 Anexo 4. Western Blot con el sdAb AC10EX marcado con biotina contra histonas de *L. (V.) braziliensis*

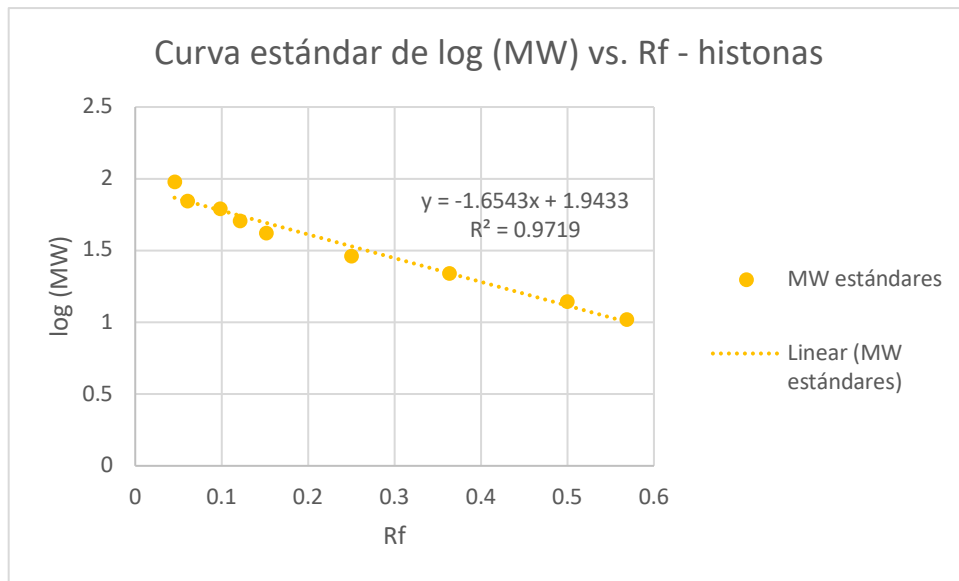
Para identificar las histonas de parásito reconocidas por el sdAb AC10EX biotinilado se realizó un ensayo de Western blot. Se observó que el sdAb reconoce a las histonas a una concentración de 7 nM con un patrón de reacción libre de ruido de fondo (Anexo 4).



Anexo 4. Ensayo de Western Blot del sdAb biotinilado contra histonas de *L. (V.) braziliensis*.

Western blot contra 7 nM de sdAb biotinilado AC10EX y estreptavidina-HRP (1: 10 000). Se muestra el marcador de peso molecular al lado izquierdo de la figura en kDa.

11.5 Anexo 5. Estimación de MWs de las histonas de *L. (V.) braziliensis* y de humano



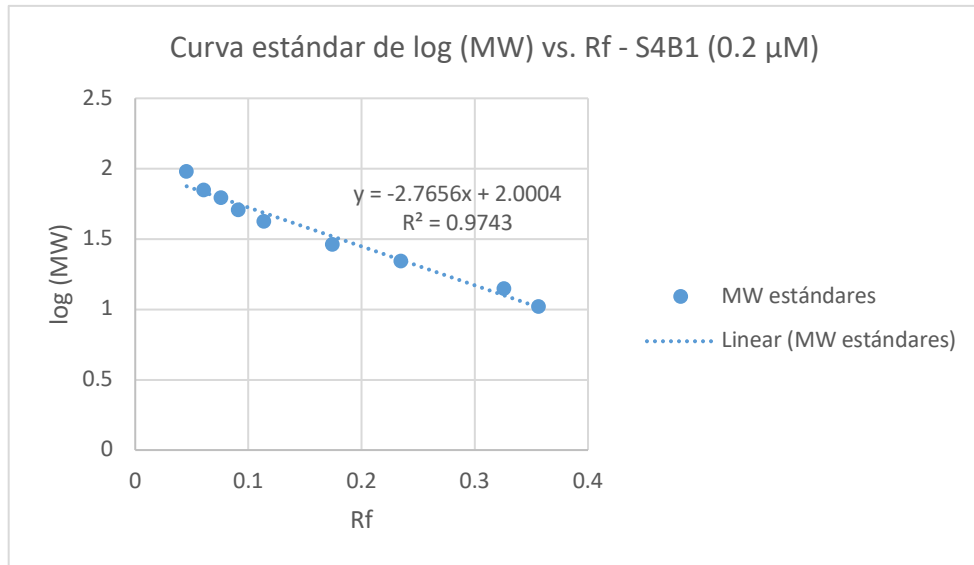
Anexo 5. Curva estándar para la estimación de MWs de las histonas de *L. (V.) braziliensis* y las histonas humanas a partir del gel de SDS-PAGE al 18%.

11.6 Anexo 6. MWs calculados para las histonas de *L. (V.) braziliensis* y las histonas de humano

Histonas	d (mm)	Rf	Log MW	MW(kDa)
<i>L. (V.) braziliensis</i>	27	0.409091	1.3	18.5
	27.5	0.416667	1.3	17.9
	31	0.469697	1.2	14.7
	32	0.484848	1.1	13.8
	34.5	0.522727	1.1	12.0
	35.5	0.537879	1.1	11.3
Humano	11	0.166667	1.7	46.5
	30.5	0.462121	1.2	15.1
	32	0.484848	1.1	13.8
	32.5	0.492424	1.1	13.4
	35	0.530303	1.1	11.6
	37	0.560606	1.0	10.4

Anexo 6. MWs calculados para las histonas de *L. (V.) braziliensis* y las histonas de humano. Los pesos se muestran en kDa.

11.7 Anexo 7. Estimación de MWs de las histonas de *L. (V.) braziliensis* y de humano reconocidas por el sdAb S4B1 (0.2 μM)



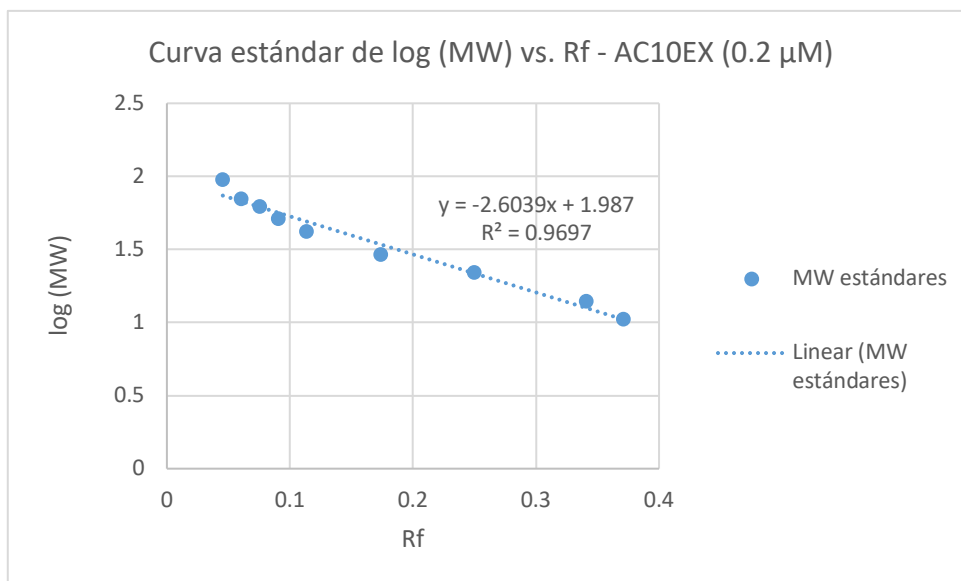
Anexo 7. Curva estándar para la estimación de MWs de las histonas reconocidas por el sdAb S4B1 (0.2 μM) en el Western Blot.

11.8 Anexo 8. MWs calculados de las histonas reconocidas por el sdAb S4B1 (0.2 μM)

Histonas	d (mm)	Rf	Log MW	MW(kDa)
<i>L. (V.) braziliensis</i>	20	0.30	1.162339394	14.5

Anexo 8. MWs calculados de las histonas reconocidas por el sdAb S4B1 (0.2 μM) en el Western blot. Los pesos se muestran en kDa.

11.9 Anexo 9. Estimación de MWs de las histonas de *L. (V.) braziliensis* y de humano reconocidas por el sdAb AC10EX (0.2 μ M)



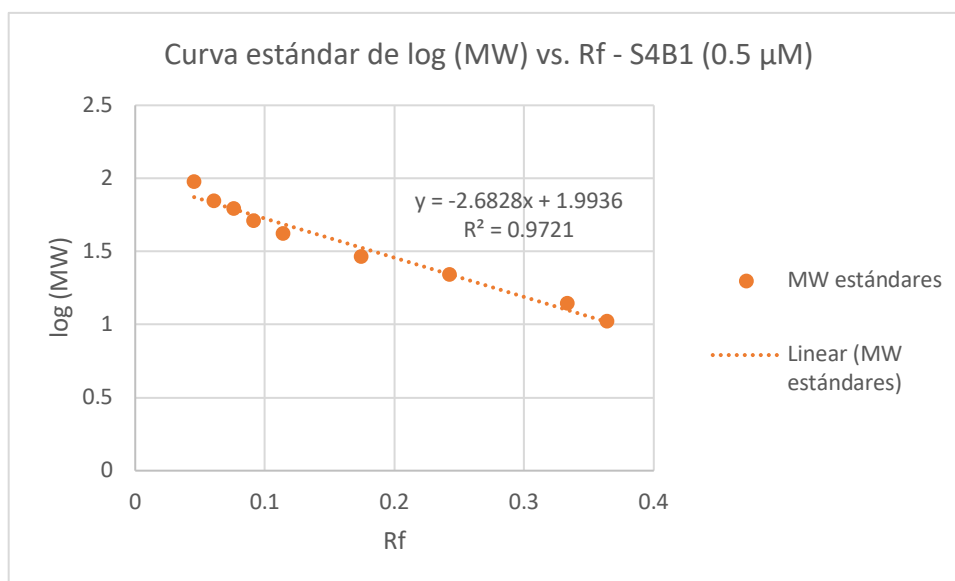
Anexo 9. Curva estándar para la estimación de MWs de las histonas reconocidas por el sdAb AC10EX (0.2 μ M) en el Western Blot.

11.10 Anexo 10. MWs calculados de las histonas reconocidas por el sdAb AC10EX (0.2 μ M)

Histonas	d (mm)	Rf	Log MW	MW(kDa)
<i>L. (V.) braziliensis</i>	21.5	0.33	1.138759848	13.8
	22.5	0.34	1.099306818	12.6
	23	0.35	1.079580303	12.0
	24	0.36	1.040127273	11.0
Humano	22.5	0.34	1.099306818	12.6

Anexo 10. MWs calculados de las histonas reconocidas por el sdAb AC10EX (0.2 μ M) en el Western Blot. Los pesos se muestran en kDa.

11.11 Anexo 11. Estimación de MWs de las histonas de *L. (V.) braziliensis* y de humano reconocidas por el sdAb S4B1 (0.5 μ M)



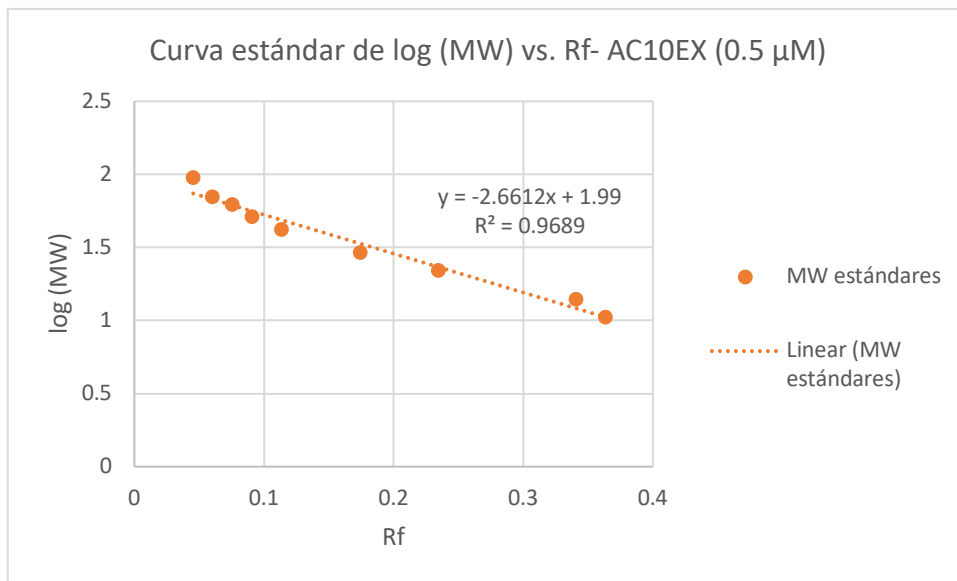
Anexo 11. Curva estándar para la estimación de MWs de las histonas reconocidas por el sdAb S4B1 (0.5 μ M) en el Western Blot.

11.12 Anexo 12. MWs calculados de las histonas reconocidas por el sdAb S4B1 (0.5 μ M)

Histonas	d (mm)	Rf	Log MW	MW(kDa)
<i>L. (V.) braziliensis</i>	19	0.29	1.221279	16.6
	21	0.32	1.139982	13.8
	22	0.33	1.099333	12.6

Anexo 12. MWs calculados de las histonas reconocidas por el sdAb S4B1 (0.5 μ M) en el Western blot. Se muestran los pesos en kDa.

11.13 Anexo 13. Estimación de MWs de las histonas de *L. (V.) braziliensis* y de humano reconocidas por el sdAb AC10EX (0.5 μM)



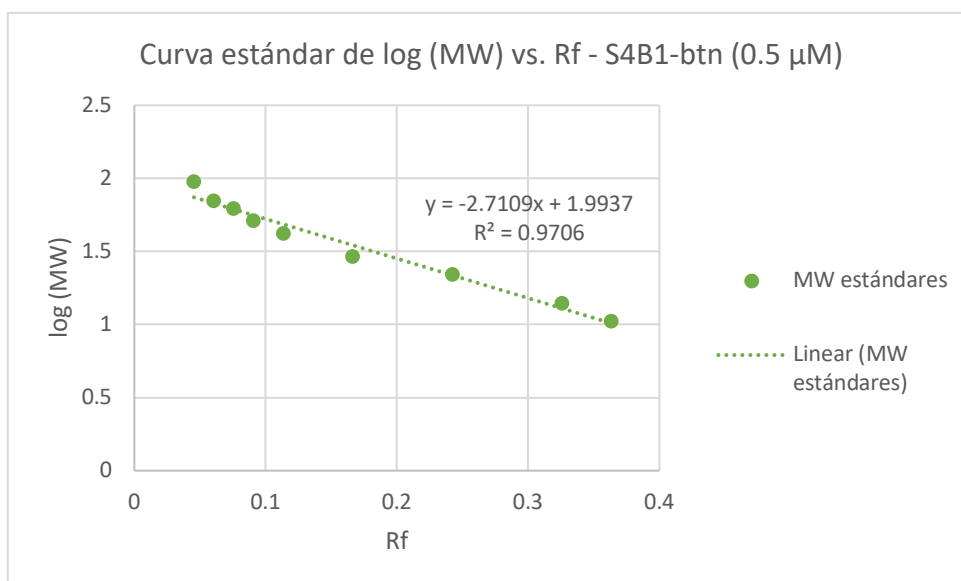
Anexo 13. Curva estándar para la estimación de MWs de las histonas reconocidas por el sdAb AC10EX (0.5 μM) en el Western Blot.

11.14 Anexo 14. MWs calculados de las histonas reconocidas por el sdAb AC10EX (0.5 μM)

Histonas	d (mm)	Rf	Log MW	MW(kDa)
<i>L. (V.) braziliensis</i>	21.5	0.33	1.123094	13.3
	22	0.33	1.102933	12.7
	23.5	0.36	1.042452	11.0
	24.5	0.37	1.00213	10.0
Humano	21.5	0.33	1.123094	13.3
	22	0.33	1.102933	12.7
	24	0.36	1.022291	10.5
	25	0.38	0.98197	9.6

Anexo 14. MWs calculados de las histonas reconocidas por el sdAb AC10EX (0.5 μM) en el Western blot. Se muestran los pesos en kDa.

11.15 Anexo 15. Estimación de MWs de las histonas de *L. (V.) braziliensis* y de humano reconocidas por el sdAb S4B1-btn (0.5 μ M)



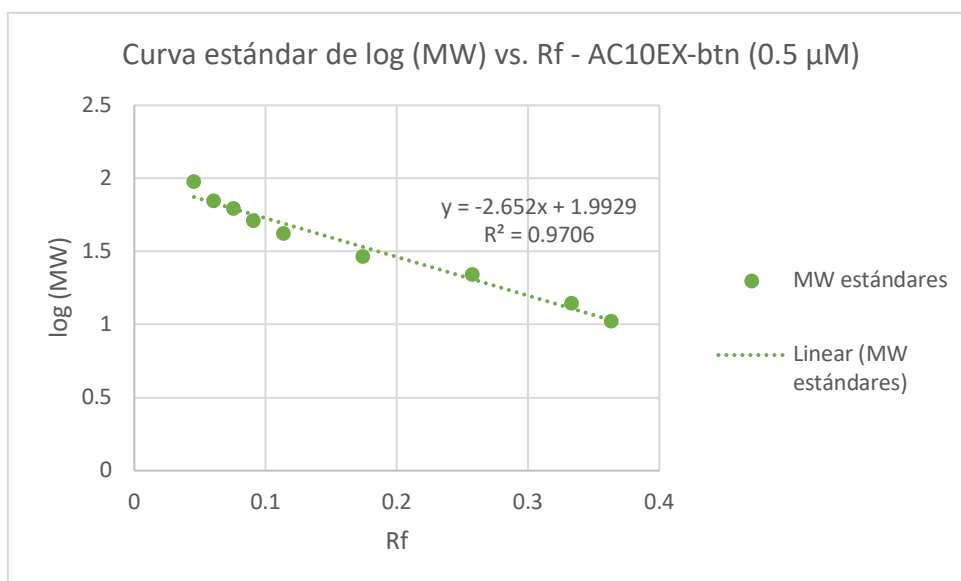
Anexo 15. Curva estándar para la estimación de MWs de las histonas reconocidas por el sdAb S4B1-btn (0.5 μ M) en el Western Blot.

11.16 Anexo 16. MWs calculados de las histonas reconocidas por el sdAb S4B1-btn (0.5 μ M)

Histonas	d (mm)	Rf	Log MW	MW(kDa)
<i>L. (V.) braziliensis</i>	21.5	0.325757576	1.110603788	12.9
	22	0.333333333	1.090066667	12.3
	23.5	0.356060606	1.028455303	10.7
	24.5	0.371212121	0.987381061	9.7
Humano	21.5	0.325757576	1.110603788	12.9
	22	0.333333333	1.090066667	12.3
	23.5	0.356060606	1.028455303	10.7
	24.5	0.371212121	0.987381061	9.7

Anexo 16. MWs calculados de las histonas reconocidas por el sdAb S4B1-btn (0.5 μ M) en el Western blot. Se muestran los pesos en kDa.

11.17 Anexo 17. Estimación de MWs de las histonas de *L. (V.) braziliensis* y de humano reconocidas por el sdAb AC10EX-btn (0.5 μM)



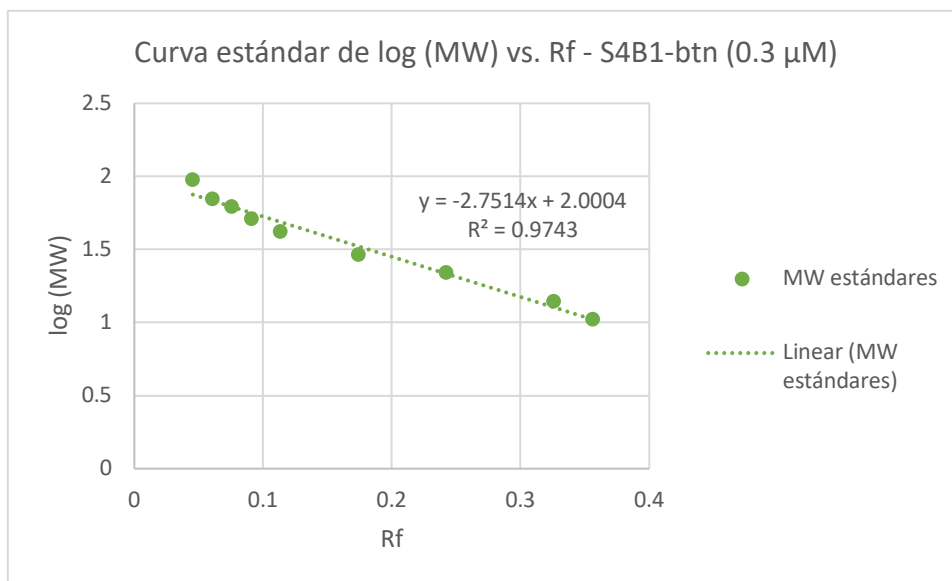
Anexo 17. Curva estándar para la estimación de MWs de las histonas reconocidas por el sdAb AC10EX-btn (0.5 μM) en el Western Blot.

11.18 Anexo 18. MWs calculados de las histonas reconocidas por el sdAb AC10EX-btn (0.5 μM).

Histonas	d (mm)	Rf	Log MW	MW(kDa)
<i>L. (V.) braziliensis</i>	20.5	0.31	1.169172727	14.8
	21.5	0.33	1.128990909	13.5
	23	0.35	1.068718182	11.7
	24	0.36	1.028536364	10.7
Humano	21	0.32	1.149081818	14.1
	21.5	0.33	1.128990909	13.5
	23	0.35	1.068718182	11.7
	24	0.36	1.028536364	10.7

Anexo 18. MWs calculados de las histonas reconocidas por el sdAb AC10EX-btn (0.5 μM) en el Western blot. Se muestran los pesos en kDa.

11.19 Anexo 19. Estimación de MWs de las histonas de *L. (V.) braziliensis* y de humano reconocidas por el sdAb S4B1-btn (0.3 μM)



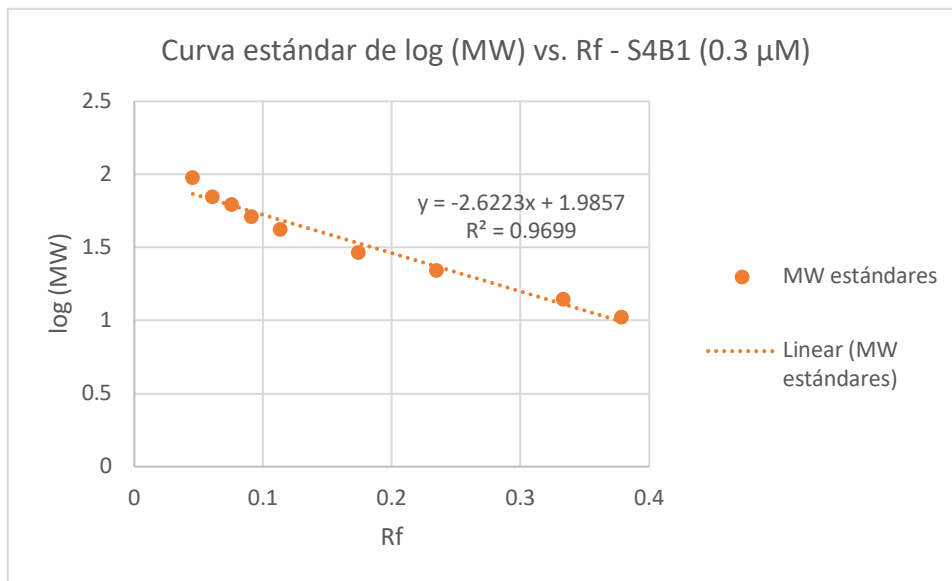
Anexo 19. Curva estándar para la estimación de MWs de las histonas reconocidas por el sdAb S4B1-btn (0.3 μM) en el Western Blot.

11.20 Anexo 20. Estimación de MWs de las histonas de *L. (V.) braziliensis* y de humano reconocidas por el sdAb S4B1-btn (0.3 μM)

Histonas	d (mm)	Rf	Log MW	MW(kDa)
<i>L. (V.) braziliensis</i>	21.5	0.325758	1.104111	12.7
Humano	21.5	0.325758	1.104111	12.7
	23	0.348485	1.041579	11.0
	24	0.363636	0.999891	10.0

Anexo 20. MWs calculados de las histonas reconocidas por el sdAb S4B1-btn (0.3 μM) en el Western blot. Se muestran los pesos en kDa.

11.21 Anexo 21. Estimación de MWs de las histonas de *L. (V.) braziliensis* y de humano reconocidas por el sdAb S4B1 (0.3 μM)



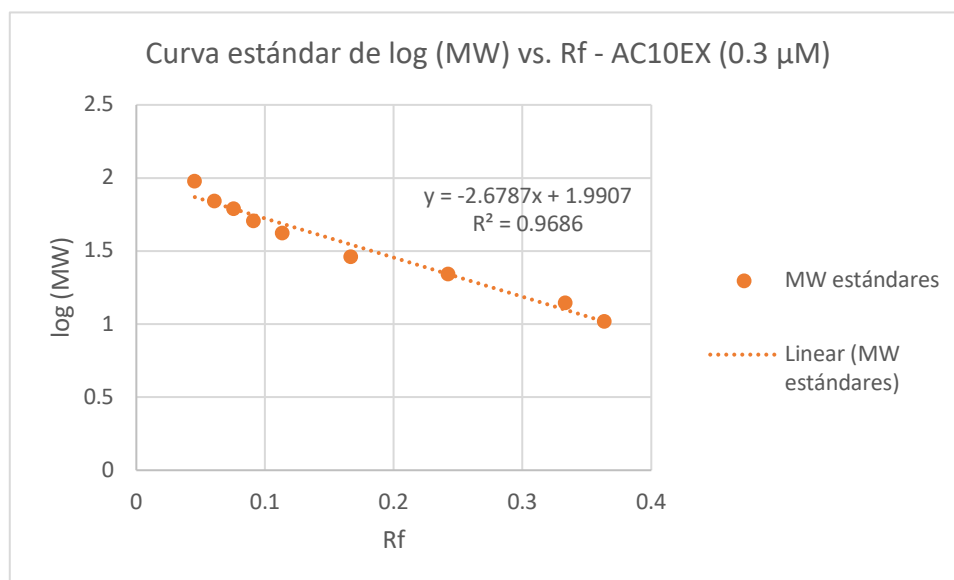
Anexo 21. Curva estándar para la estimación de MWs de las histonas reconocidas por el sdAb S4B1 (0.3 μM) en el Western Blot.

11.22 Anexo 22. Estimación de MWs de las histonas de *L. (V.) braziliensis* y de humano reconocidas por el sdAb S4B1 (0.3 μM)

Histonas	d (mm)	Rf	Log MW	MW(kDa)
<i>L. (V.) braziliensis</i>	21.5	0.325758	1.131466	13.5

Anexo 22. MWs calculados de las histonas reconocidas por el sdAb S4B1 (0.3 μM) en el Western blot. Se muestran los pesos en kDa.

11.23 Anexo 23. Estimación de MWs de las histonas de *L. (V.) braziliensis* y de humano reconocidas por el sdAb AC10EX (0.3 μM)



Anexo 23. Curva estándar para la estimación de MWs de las histonas reconocidas por el sdAb AC10EX (0.3 μM) en el Western Blot.

11.24 Anexo 24. Estimación de MWs de las histonas de *L. (V.) braziliensis* y de humano reconocidas por el sdAb AC10EX (0.3 μM)

Histonas	d (mm)	Rf	Log MW	MW(kDa)
<i>L. (V.) braziliensis</i>	21.5	0.325758	1.118093	13.1
	23	0.348485	1.057214	11.4
Humano	21.5	0.325758	1.118093	13.1
	23	0.348485	1.057214	11.4
	24	0.363636	1.016627	10.4

Anexo 24. MWs calculados de las histonas reconocidas por el sdAb AC10EX (0.3 μM) en el Western blot. Se muestran los pesos en kDa.